



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Προσδιορισμός της ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικά θαλάσσια φύκη και αγγειόσπερμα να προστατεύουν έναντι βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο DNA.

Determination of the ability of Greek seaweed and angiosperm extracts to protect DNA damage caused by free radicals.



Πτυχιακή εργασία

Σαββίδη Σταυρούλα

Του Ξενοφών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

Σελίδα 1 | 62

Τριμελής επιτροπή

Στάγκος Δημήτριος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σαββίδη Σταυρούλα

του Ξενοφών

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο, αρχικά για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια και τον χρόνο που αφιέρωσε τόσο στο εργαστηριακό κομμάτι, όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας. Ακόμα, θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη και την κατανόηση που μου έδειξε όλους αυτούς τους μήνες.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αντώνη Γιακουντή που δέχτηκαν να αποτελούν μέλη αυτής της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος, ευχαριστώ την απόφοιτο πλέον, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Μπάρδα Σοφία, για την πολύτιμη βοήθεια της στο εργαστηριακό κομμάτι αυτής της διπλωματικής εργασίας, αλλά και για την ευχάριστη παρέα της στις πολύωρες αναμονές του πειράματος.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	7
1.1.1 Ορισμός.....	7
1.1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών	8
1.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	12
1.2.1 Ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου (OH•).....	12
1.2.2 Ελεύθερη ρίζα του αλκοξυλίου (RO•) και του περοξυλίου (ROO•).....	13
1.2.3 Ελεύθερη ρίζα του σουπεροξειδίου (O ₂ ^{•-}).....	13
1.3 Οξειδωτικό στρες	14
1.3.1 Επιδράσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια	14
1.4 Αντιοξειδωτική άμυνα	17
1.4.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών.....	17
1.5 Βρωμοφαινόλες φυκών	21
1.5.1 Χημική προέλευση βρωμοφαινολών.....	21
1.5.2 Βρωμοφαινόλες φυκών και αντιοξειδωτική δράση.....	22
1.5.3 Είδη φυκών και αγγειοσπέρμων	24
2 . Σκοπός του πειράματος	36
3. Μεθοδολογία.....	37
3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	37
3.2 Επαγόμενη από Ρίζες Περοξυλίου (ROO [•]) Πρόκληση Μονόκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.....	39
4. Αποτελέσματα.....	44
5. Συζήτηση.....	54
6. Βιβλιογραφία	58

Περίληψη

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικά είδη, τα οποία διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα. Ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων, καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ιδιαίτερα ασταθή μόρια, τα οποία προσπαθούν να αποσπάσουν ένα ηλεκτρόνιο από κοντινά μόρια ή άτομα, μετατρέποντάς τα αυτομάτως σε ελεύθερες ρίζες. Γενικά, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται είτε ενδογενώς, είτε προσλαμβάνονται από την τροφή. Επομένως, μπορεί να είναι ωφέλιμες για τον οργανισμό ή επιζήμιες αν παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, που δεν μπορούν να εξουδετερωθούν από το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού. Η κατάσταση αυτή, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών. Το οξειδωτικό στρες, μπορεί να αντιμετωπιστεί από την παραγωγή ή πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών από τον οργανισμό, άρα είναι σημαντική η εύρεση τέτοιων ουσιών. Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται έντονο ενδιαφέρον για την αντιοξειδωτική ικανότητα, που εμφανίζουν οι βρωμοφαινόλες, οι οποίες προέρχονται από θαλάσσια φύκη και αγγειόσπερμα.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η ικανότητα εκχυλισμάτων από ελληνικά θαλάσσια φύκη (14 εκχυλίσματα) και αγγειόσπερμα (1 εκχύλισμα) να προστατεύουν το DNA έναντι βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την δράση των ελεύθερων ριζών στο DNA. Ισχυρότερη δράση εμφάνισαν το αγγειόσπερμα *Ruppia maritima* (IC50: 0,04 mg/ml). Από τα φύκη τα 5 πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν τα *Gigartina teedei* (IC50: 0,038 mg/ml), *Gigartina pistillata* (IC50: 0.25 mg/ml), *Cystoseira barbata* (IC50: 0.32 mg/ml), *Gracilaria sp* (IC50: 0.42 mg/ml) και *Gracilaria bursa pastoris* (IC50: 0.5 mg/ml). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράσης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων, έναντι ελεύθερων ριζών.

Abstract

Free radicals are reactive species, that possess an unpaired electron in their outer shell. The odd number of electrons makes free radicals particularly unstable molecules, that try to distract an electron from nearby molecules or atoms and automatically turning them into free radicals. In general, free radicals are either produced endogenously or received from food. Therefore, they can be beneficial for the human or harmful, if they are produced in large quantities that cannot be neutralized by the human's antioxidant system. This condition, is defined as oxidative stress and can lead to the development of chronic and degenerative diseases. Oxidative stress can be treated by the production or intake of antioxidants, so it is important to find out such substances. Nowadays, there has been shown intense interest in the antioxidant capacity of bromophenols, which come from marine algae and angiosperms.

In the present study, the ability of Greek seaweed extracts (14 extracts) and angiosperm (1 extract) to protect DNA against free radical damage was examined. The results showed that all the extracts inhibit the action of free radicals on DNA. The angiosperm *Ruppia maritima* showed the strongest effect (IC₅₀: 0.04 mg/ml). From the algae the 5 most active extracts were the *Gigartina teedei* (IC₅₀: 0.038 mg/ml), the *Gigartina pistillata* (IC₅₀: 0.25 mg/ml), the *Cystoseira barbata* (IC₅₀: 0.32 mg/ml), the *Gracilaria* sp (IC₅₀: 0.42 mg /ml) and the *Gracilaria bursa pastoris* (IC₅₀: 0.5 mg/ml). The above results show the existence of antioxidant activity of these specific extracts against free radicals.

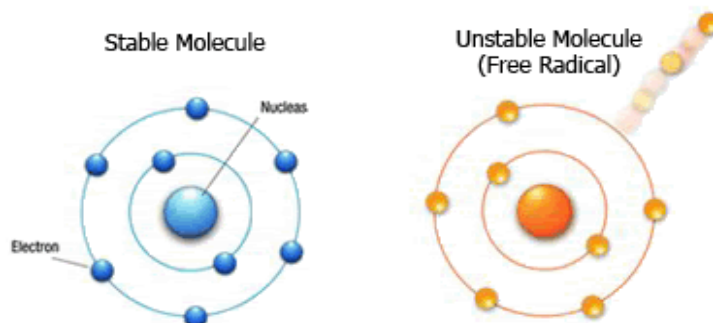
1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

1.1.1 Ορισμός

Το άτομο αποτελεί το πιο μικρό «κομμάτι» ενός στοιχείου. Στο κέντρο του ατόμου βρίσκεται ο πυρήνας του, ο οποίος αποτελείται από πρωτόνια και νετρόνια, ενώ γύρω από τον πυρήνα περιστρέφονται σε τροχιακά τα ηλεκτρόνια. Στα τροχιακά της πλειοψηφίας των σταθερών μορίων, τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας είναι ζευγαρωμένα. Σε κάθε ζεύγος, τα ηλεκτρόνια έχουν αντίθετο *spin*, στοιχείο απαραίτητο για τη σταθερότητα των μορίων αυτών.

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα χημικό είδος, το οποίο μπορεί να είναι μόριο, άτομο ή ιόν που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα του (Sergio Di Meo et al. , 2020). Αυτός ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ιδιαίτερα ασταθή και δραστικά μόρια και κατά συνέπεια έχουν μικρή διάρκεια ζωής (Phaniendra et al, 2015). Η αστάθεια, αλλά και η έντονη δραστικότητα των ελεύθερων ριζών, προωθούν την απόσπαση ηλεκτρονίων από άλλα μόρια, με στόχο την συμπλήρωση της εξωτερικής τους στιβάδας. Βέβαια, η απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο το μετατρέπει αυτομάτως σε ελεύθερη ρίζα, με αποτέλεσμα την εκκίνηση ενός καταρράκτη αλυσιδωτών αντιδράσεων, που τελικά ζημιώνουν ολόκληρο το κύτταρο (Phaniendra, et al., 2015). Ακόμα, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν και μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή ή/και πολυμερή.

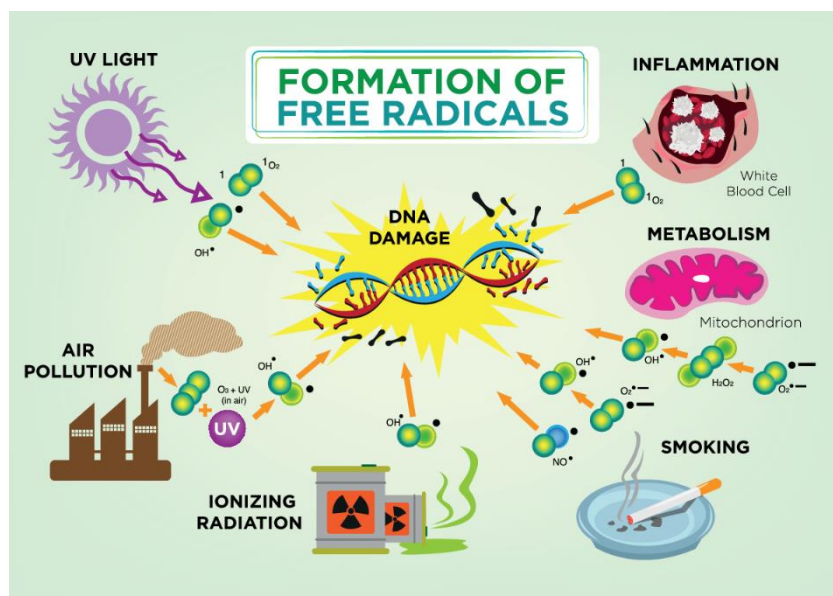


Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να είναι επιβλαβείς ή ευεργετικές για τον οργανισμό. Παράγονται είτε από φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες μέσα στα κύτταρα, είτε από εξωτερικές πηγές. Σε περίπτωση μη-αναστρέψιμης συσσώρευσης του ανθρώπινου οργανισμού με ελεύθερες ρίζες προκαλείται οξειδωτικό στρες, που με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών. Ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες παράγονται αντιοξειδωτικά, είτε ενδογενώς, είτε εξωγενώς με την παροχή συμπληρωμάτων (V. Lobo et al., 2010).

1.1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών μπορεί να οφείλεται είτε σε ενδογενείς, είτε σε εξωγενείς παράγοντες.



Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.

Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

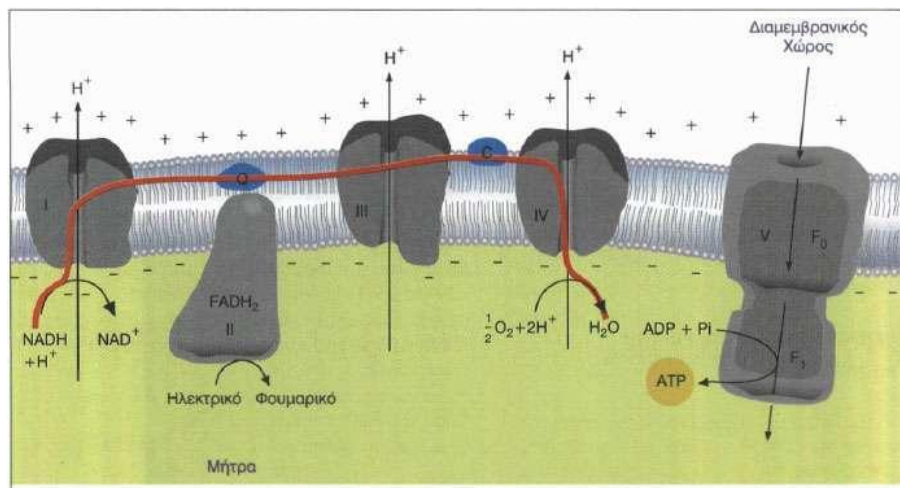
Την μεγαλύτερη πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών αποτελούν διάφορες ενδογενείς μεταβολικές διεργασίες, οι οποίες πραγματοποιούνται φυσιολογικά μέσα στα κύτταρα και κυρίως σχετίζονται με το οξυγόνο. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή των δραστικών

μορφών οξυγόνου, οι οποίες σε μεγάλες ποσότητες είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά σε φυσιολογικές αναλογίες χαρακτηρίζονται ευεργετικές.

Ορισμένες από τις ενδογενείς πηγές παραγωγής των ελεύθερων ριζών φαίνονται παρακάτω:

- **Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση**

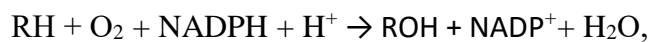
Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του μεγαλύτερου μέρους της ενέργειας των αερόβιων οργανισμών και ταυτόχρονα αποτελεί την βασική πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και ειδικότερα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Στην διεργασία αυτή παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή/ και το FADH₂ προς το O₂. Όμως, ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα προκαλώντας την δημιουργία ελεύθερων ριζών, με τη μορφή ROS, ως παραπροϊόντα.



Εικόνα 3: Αναπνευστική αλυσίδα.

- **Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P-450**

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 καταλύουν την οξείδωση και το μεταβολισμό πολλών ξενοβιοτικών και ενδογενών ενώσεων, συνήθως με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο O₂, οξειδώνοντας το υπόστρωμα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



όπου με RH συμβολίζεται η ξενοβιοτική ουσία

Τα ένζυμα αυτά, αποτελούν την κύρια άμυνα του οργανισμού απέναντι σε ξενοβιοτικές ουσίες, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιθανόν να προκαλέσουν βλάβη στο κύτταρο με την μετατροπή των ξενοβιοτικών ουσιών σε τοξικές, κυρίως με την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Κατά βάση έχουν εντοπιστεί σε ηπατικά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό βρέθηκαν σε κύτταρα του υπόλοιπου σώματος. (K. Shankar, H.M. Mehendale, in Encyclopedia of Toxicology (Third Edition, 2014).

- ***Αιμοσφαιρίνη***

Η αιμοσφαιρίνη, είναι μία πρωτεΐνη απαραίτητη για τη μεταφορά οξυγόνου. Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες είναι ανά δύο όμοιες και σε καθεμία από αυτές συνδέεται ένα μόριο αίμης. Κάθε μόριο αίμης περιέχει ένα άτομο σιδήρου, το οποίο έχει μεγάλη τάση να δημιουργήσει σύμπλοκο με το οξυγόνο και μετατρέπεται σε οξυαιμοσφαιρίνη. Στη συνέχεια, η οξυαιμοσφαιρίνη μεταφέρεται σε όλους τους ιστούς και αποδεσμεύεται στα τριχοειδή αγγεία. Αντίστοιχα στα μυϊκά κύτταρα εντοπίζεται η μυοσφαιρίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την δέσμευση του οξυγόνου από τα ερυθρά κύτταρα του αίματος, για την αποθήκευσή του και τη μεταφορά του στα μυϊκά κύτταρα. Όμως, σε συνθήκες έντονης άσκησης οι απαιτήσεις του οργανισμού για οξυγόνο είναι αυξημένες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης ή της μυοσφαιρίνης και μετέπειτα στην παραγωγή ROS.

- ***Υπεροξειδιοσώματα***

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια, που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα, τα οποία προκαλούν την διάσπαση ουσιών που θα προκαλέσουν βλάβες στο κύτταρο, μέσω της οξείδωσης των ουσιών αυτών. Ακόμα, βασική λειτουργία των υπεροξειδιοσωμάτων είναι η αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Κατά την οξείδωση των λιπιδίων παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό $FADH_2$ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O_2 (Berg et al.,2010). Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως τα

υπεροξειδισώματα αποτελούν μία ακόμα ενδογενή πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Εξωγενείς παράγοντες

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν και από εξωγενείς παράγοντες, εκτός από τους ενδογενείς που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Βασικές πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών αποτελούν τα απόβλητα βιομηχανιών, η χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων, αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, το όζον και η ατμοσφαιρική ρύπανση. Ακόμα, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και το στρες ενισχύουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Τέλος, η διατροφή κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην παρουσία μη-φυσιολογικής ποσότητας ελεύθερων ριζών, καθώς αυτή θα πρέπει να περιέχει όλες τις απαραίτητες αντιοξειδωτικές βιταμίνες και μέταλλα, τα οποία αποτελούν συμπαράγοντες των αντιοξειδωτικών και επηρεάζουν τη δράση τους (Halliwell 2007).

Μηχανισμοί παραγωγής ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά βάση με δύο τρόπους:

- **Ηλεκτρονική μεταφορά.** Η ηλεκτρονική μεταφορά περιλαμβάνει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όπου μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να προκύψει είτε από οξείδωση ενός φυσιολογικού μορίου και το μόριο να χάσει ένα ηλεκτρόνιο, είτε από αναγωγή όπου το μόριο θα δεχτεί ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο (Cheeseman et al., 1993).
- **Διάσπαση ομοιοπολικού δεσμού.** Η διάσπαση αυτή μπορεί να είναι ομολυτική ή ετερολυτική. Όμως, σε παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να οδηγήσει μόνο η ομολυτική διάσπαση, αφού στην περίπτωση αυτή ο δεσμός σπάει συμμετρικά και κάθε θραύσμα διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο από τον δεσμό αυτόν και ως αποτέλεσμα σχηματίζονται δύο ελεύθερες ρίζες. Η διάσπαση

του δεσμού απαιτεί αρκετή ενέργεια που συνήθως προέρχεται από υψηλή θερμοκρασία,

UV ακτινοβολία, ή ιονίζουσα ακτινοβολία. Αντίθετα, στην ετερολυτική διάσπαση το ένα θραύσμα διατηρεί και τα δύο ηλεκτρόνια του δεσμού, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ιόντων (Cheeseman et al., 1993).

1.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Η χρήση του μοριακού οξυγόνου από τους αερόβιους οργανισμούς προωθεί το σχηματισμό ορισμένων δραστικών ειδών, που περιέχουν οξυγόνο και ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Οι ROS είναι ένας συλλογικός όρος που περιλαμβάνει ελεύθερες ρίζες που περιέχουν άτομα οξυγόνου, όπως η ρίζα του αλκοξυλίου (RO^\bullet), του περοξυλίου (ROO^\bullet), του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), του υδροξυλίου (OH^\bullet), και του υδροπεροξυλίου (HO_2^\bullet). Όμως, δεν είναι όλες οι ROS ρίζες, αφού μπορεί να είναι και άλλα παράγωγα του οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το υποβρωμιώδες οξύ (HOBr), το όζον (O_3) και το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) που μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών (B. Zorov et al., 2014)

Οι ROS παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσιολογία όσο και στην παθοφυσιολογία των αερόβιων μικροοργανισμών (R. Li et al., 2016) και μπορούν να μετατραπούν από το ένα είδος σε άλλο με ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς.

1.2.1 Ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου (OH^\bullet)

Οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου, παράγονται από την ιονίζουσα ακτινοβολία ή από το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία ενός ιόντος μετάλλου και αποτελούν έναν από τους πιο ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες, αφού είναι σε θέση να αντιδρούν χωρίς εξειδίκευση με γειτονικές χημικές ομάδες, τη στιγμή του σχηματισμού τους. Η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να βλάψει μία πληθώρα τύπων μακρομορίων, όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και τα αμινοξέα και δεν μπορεί να εξαλειφθεί με ενζυμική αντίδραση, ενώ έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής.

1.2.2 Ελεύθερη ρίζα του αλκοξυλίου (RO•) και του περοξυλίου (ROO•)

Οι ρίζες υπεροξυλίου (ROO•) και αλκοξυλίου (RO•) είναι πολύ καλοί οξειδωτικοί παράγοντες και κυρίως εμπλέκονται στην διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Ο σχηματισμός τους προκύπτει από την αντίδραση οξυγόνου με ρίζες αλκυλίου (R•), αλλά και από την αποσύνθεση των αλκυλο υπεροξειδίων (ROOH). Ακόμα, η ακτινοβολία υπεριώδους φωτός ή η παρουσία ιόντων μετάλλων μεταπτώσεως μπορεί να προκαλέσει αιμόλυση υπεροξειδίων για την παραγωγή ριζών υπεροξυλίου και αλκοξυλίου. (Pawan et al., 2014)

Οι ρίζες περοξυλίου (ROO•) είναι πιο σταθερές από τις ελεύθερες ρίζες με «κέντρο» τον άνθρακα, αλλά και από τις ρίζες αλκοξυλίου (RO•). Ακόμα, οι ρίζες περοξυλίου έχουν χρόνο ημιζωής επτά δευτερόλεπτα (7 s) στους 37 °C, και μπορούν έτσι να διαχέονται σε μέτριες αποστάσεις των βιολογικών συστημάτων. Τα οργανικά υδροϋπεροξειδία (ROOH) δεν είναι ρίζες, αλλά αντιπροσωπεύουν ασταθή και αντιδραστικά προϊόντα ριζών υπεροξυλίου.

1.2.3 Ελεύθερη ρίζα του σουπεροξειδίου (O₂•⁻)

Το σουπεροξειδίο παράγεται με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μόριο του οξυγόνου. Πρόκειται για μία ρίζα με μικρή διάρκεια ζωής, η οποία δυσκολεύεται ιδιαίτερα να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Κατά κύριο λόγο, παράγεται ως υποπροϊόν της αναπνοής, μέσω της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, αλλά και στα φαγοκύτταρα μέσω της οξειδάσης του φωσφορικού δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδικής αδενίνης (NADPH). Επομένως, πρόκειται για ένα υποπροϊόν της αναπνοής, αλλά και ένα ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο του ανοσοποιητικού συστήματος.

1.3 Οξειδωτικό στρες

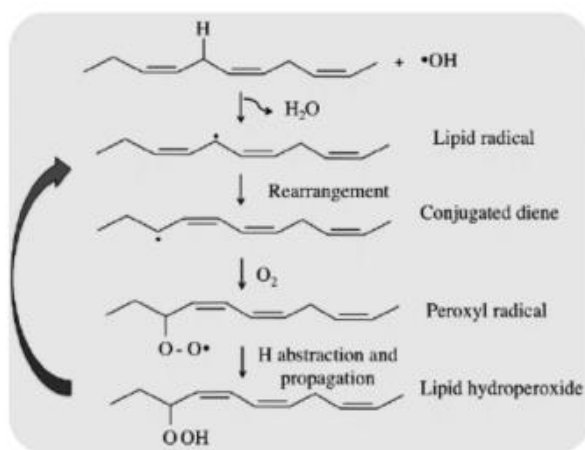
Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε πλήρη ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως σοβαρή ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού, αλλά και ως διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων (B. Halliwell et al., 1990 ; Y. Dotan, 2004). Η ανισορροπία αυτή μπορεί να οφείλεται:

- Σε αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όταν η παραγωγή των αντιοξειδωτικών του οργανισμού είναι φυσιολογική. Η κατάσταση αυτή, παρατηρείται κυρίως λόγω της παρατεταμένης έκθεσης του οργανισμού σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα.
- Σε φυσιολογική παραγωγή ROS, αλλά μειωμένη παραγωγή ή/και δράση των αντιοξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού.
- Στον συνδυασμό αυξημένης παραγωγής ROS και μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού.

1.3.1 Επιδράσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

Λιπίδια: Τα λιπίδια αποτελούν τα βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και συνεισφέρουν στη διατήρηση του σχήματος των κυττάρων, αλλά και στον έλεγχο της λειτουργίας τους. Όμως, τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών αποτελούν συνήθη στόχο των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), με άμεση συνέπεια την υπεροξειδωσή τους. Η διαδικασία αυτή, αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, όπου παράγεται μια ρίζα λιπαρών οξέων ($L\bullet$), συνήθως από μια ρίζα ROS. Έπειτα, παρατηρείται η διάδοση, όπου η παραγόμενη ρίζα αλληλεπιδρά με το μοριακό οξυγόνο και προκύπτει $LOO\bullet$, το οποίο ακολούθως αλληλεπιδρά με κάποιο άλλο λιπαρό οξύ παράγοντας μια νέα ρίζα λιπαρών οξέων και ένα λιπιδιακό υπεροξειδίο. Τελευταίο στάδιο είναι ο τερματισμός, όταν η ποσότητα των ριζών έχει ξεπεράσει τα επιθυμητά επίπεδα, όπου παρατηρείται η αλληλεπίδραση δύο ριζών, με άμεση συνέπεια την παραγωγή μιας μη-ρίζας (Yin et al, 2011).

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αρχίζει όταν ένα άτομο υδρογόνου αποσπάται από ένα λιπαρό οξύ, έπειτα από την αντίδραση του με μια ρίζα. Άμεση συνέπεια αυτού είναι η δημιουργία ανασυνδιασμένων διενίων, αφού το άτομο άνθρακα από το οποίο έγινε η απόσπαση του υδρογόνου βρίσκεται ανάμεσα σε δύο διπλούς δεσμούς και η ρίζα που προκύπτει αναδιατάσσεται με ηλεκτρόνια από διπλανούς δεσμούς. Η ρίζα άνθρακα που σχηματίστηκε αντιδρά με ένα μόριο O_2 και σχηματίζει μια υπερόξυλ-ρίζα ($LOO\bullet$), η οποία λόγω της έντονης δραστηριότητάς της μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό μόριο λιπαρού οξέος και ταυτόχρονα να μετατραπεί σε υδροϋπεροξειδίο ($LOOH$) και η νέα λιπιδική ρίζα ακολουθεί την ίδια αλυσιδωτή διαδρομή οξειδωσης (Pham-Huy et al., 2008 ; Jairam et al., 2012).



Εικόνα 4: Υπεροξειδωση λιπιδίων

Νουκλεϊκά οξέα: Τα περισσότερα μακροχρόνια προβλήματα που δημιουργεί το οξειδωτικό στρες οφείλονται σε βλάβες που προκαλεί στο DNA (Evans et al., 2004). Οι βλάβες αυτές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, αποικοδόμηση βάσεων, τροποποιήσεις σε πουρίνες και πυριμιδίνες, μονόκλινα ή δίκλινα θραύσματα, διαγραφές, μετατοπίσεις, αλλά και χημικές τροποποιήσεις ή διάσπαση δεσμών σε σάκχαρα και φωσφοδιεστέρες (Birben et al., 2012). Η ρίζα υδροξυλίου είναι η κυριότερη ROS, που προκαλεί βλάβες στο DNA και συγκεκριμένα είναι υπεύθυνη για περισσότερα από 80 είδη βλάβης στις νουκλεοτιδικές βάσεις. Από τις βασικότερες βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο DNA είναι ο σχηματισμός της 8-οξογουανίνης (8-oxoG) και της γλυκόλης της θυμίνης. Όσο αφορά την 8-οξογουανίνη, μπορεί να

σχηματίζει δεσμό τόσο με την κυτοσίνη, όσο και με την αδενίνη, ανάλογα με τη διαμόρφωσή της. Αν το ζεύγος 8-οχοG-A δεν επιδιορθωθεί, προκαλεί μια μεταλλαγή μεταστροφής, όπου ένα ζεύγος C-G θα μετατραπεί σε ζεύγος A-T. Από την άλλη, η γλυκόλη της θυμίνης αποτελεί μία κυτταροτοξική ουσία, η οποία αναστέλλει την αντιγραφή του DNA. (Tropp, 2012).

Οι βλάβες στο DNA είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τα κύτταρα, καθώς επηρεάζουν ολόκληρο το γονιδίωμα, επομένως η άμεση επιδιόρθωσή τους κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική. Αν η επιδιόρθωση δεν επιτευχθεί τότε ξεκινάει η διαδικασία της απόπτωσης ή της νέκρωσης σε περίπτωση που η βλάβη είναι μη-αναστρέψιμη και εμποδίζει την διαδικασία της απόπτωσης.

Πρωτεΐνες: Οι ROS, είναι δυνατόν να προκαλέσουν θραύση της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλαγή του ηλεκτρικού φορτίου, σύνδεση πρωτεϊνών και οξείδωση αμινοξέων, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού πρωτεόλυσης από συγκεκριμένες πρωτεάσες, αλλά και δομικές αλλαγές ή απώλεια λειτουργίας (Birben et al., 2012; Halliwell, 2007). Ειδικότερα, οι ROS μπορούν να οξειδώσουν πλευρικές ομάδες όλων των αμινοξέων και ιδιαίτερα της κυστεΐνης και της μεθειονίνης (Stadtman, 2004). Η οξείδωση των καταλοίπων κυστεΐνης είναι πιθανό να προκαλέσει τον αναστρέψιμο σχηματισμό μικτών δισουλφιδίων μεταξύ των ομάδων θειολών (-SH), που βρίσκονται σε πρωτεΐνες, και θειολών, που υπάρχουν σε μόρια με μικρό μοριακό βάρος. Η πιο συνηθισμένη τροποποίηση είναι η καρβονυλίωση, η οποία μπορεί να έχει πολλαπλές επιδράσεις στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα καρβονυλίου σε πολλές καταστάσεις, όπως η γήρανση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), η αναιμία, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, βρογχοπνευμονική δυσπλασία νεογνών και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. (Dalle-Donne et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2005)

1.4 Αντιοξειδωτική άμυνα

Εφόσον οι οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς στις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες, γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία μηχανισμών, οι οποίοι μπορούν να εξουδετερώσουν ή ακόμα και να περιορίσουν τις αρνητικές αυτές συνέπειες, είναι απαραίτητη. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικοί όσο αφορά την πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης αλλά είναι σε θέση να την καθυστερήσουν ή να την αναστείλουν, μέσω της ιδιότητας τους να εντοπίζουν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell et al., 1995). Οι μηχανισμοί αυτοί είναι τα αντιοξειδωτικά. Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ουσία, η παρουσία της οποίας σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή εμποδίζει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων (Sarangarajan et al., 2017).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να προστατεύσουν τα κύτταρα και τα όργανα του σώματος από την επιβλαβή επίδραση του οξειδωτικού στρες, τόσο με ενζυματικές όσο και με μη ενζυματικές αντιδράσεις, που λειτουργούν συνεργιστικά μεταξύ τους. Ο πιο συνηθισμένος από αυτούς, αποτελεί το σπασίμο της αλυσίδας, όπου το κύριο αντιοξειδωτικό δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην ρίζα ή δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από αυτήν με αποτέλεσμα να μετατρέπονται τα ίδια σε σταθερές, μη δραστικές ρίζες (Young et al., 2001). Ένας άλλος μηχανισμός περιλαμβάνει την αφαίρεση των εκκινητών των ROS, επηρεάζοντας την προϋπάρχουσα ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασής τους (Rice-Evans et al., 1993). Ακόμα τα αντιοξειδωτικά μπορούν να επιδράσουν στα βιολογικά συστήματα μέσω της δέσμευσης μετάλλων, όπως είναι ο σίδηρος (Fe), αποτρέποντάς τα έτσι από το να συμμετάσχουν στην αντίδραση Fenton (Krinsky, 1992).

1.4.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Υπάρχουν πολλά ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ROS. Αυτά τα ένζυμα σχηματίζουν τους ενδογενείς αμυντικούς μηχανισμούς του σώματος έναντι των ελευθέρων ριζών, για την προστασία του κυττάρου. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα υπεροξειδάση της

γλουταθειόνης (GPx), καταλάση (CAT) και δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) είναι οι πιο γνωστές ουσίες του συστήματος αντιοξειδωτικής προστασίας (Butnariu M. et al.,2012).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση αποτελεί βασική κυτταρική άμυνα κατά της βλάβης που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD είναι πρωτεΐνες που περιέχουν μέταλλα και καταλύουν τη μετάλλαξη του εξαιρετικά δραστικού ανιόντος υπεροξειδίου $O_2^{\cdot-}$ σε O_2 και στο λιγότερο δραστικό είδος H_2O_2 . Στα θηλαστικά, υπάρχουν τρεις μορφές SOD, οι οποίες κατηγοριοποιούνται με βάση τους μεταλλικούς συμπράγοντες που χρησιμοποιούν, με πιο γνωστές μορφές:

- κυτταροπλασματική CuZnSOD: δεσμεύει χαλκό και ψευδάργυρο
- μιτοχονδριακή MnSOD/FeSOD: δεσμεύουν μαγγάνιο και σίδηρο αντίστοιχα
- εξωκυττάρια ECSOD: δεσμεύει χαλκό και ψευδάργυρο

Όλες οι μορφές καταλύουν την ίδια αντίδραση, παρόλο που παράγονται από διαφορετικά γονίδια. (Halliwell et al., 2001)

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση υπάρχει στα περισσότερα ζωικά κύτταρα και είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του H_2O_2 που παράγεται από οξειδάσες που εμπλέκονται στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, την αναπνοή και τον καταβολισμό πουρίνης. Τα υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας CAT μετρώνται στο ήπαρ, τα νεφρά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Σύστημα γλουταθειόνης

Το σύστημα της γλουταθειόνης βρίσκεται σε ζώα, φυτά, μικροοργανισμούς και περιλαμβάνει:

- Τις περοξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx): ενδοκυτταρικό ένζυμο που καταλύει τόσο την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό, όσο και τη μετατροπή των υπεροξειδίων των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες. Αυτό το επιτυγχάνει κατά την οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH).

- Τις S-τρανσφεράσες (GST) της γλουταθειόνης: ένζυμο με μεγάλη δραστικότητα στα λιπιδιακά οξείδια, βοηθώντας στην αποτοξίνωση του μεταβολισμού (Hayes et al., 2005).
- Τις αναγωγάσες της γλουταθειόνης (GRx): ένζυμο εξαρτώμενο από νουκλεοτίδια φλαβίνης

Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Όπως φαίνεται από πληθώρα ερευνών, η διατροφή μας μάς παρέχει μεγάλες ποσότητες αντιοξειδωτικών, απαραίτητων για την προστασία του οργανισμού μας έναντι του οξειδωτικού στρες, αλλά και άλλων ασθενειών. Οι υδροξυλομάδες, στη δομή διάφορων τροφίμων, είναι αυτές που προσδίδουν των αντιοξειδωτικό χαρακτήρα στα τρόφιμα αυτά. Τα συνθετικά και φυσικά αντιοξειδωτικά των τροφών περιορίζουν την οξειδωτική βλάβη σε μακρομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών. Αυτά τα αντιοξειδωτικά αποτελούνται από μικρά μόρια που περιλαμβάνουν βιταμίνη C, E και β-καροτίνη ή φυσικά αντιοξειδωτικά όπως φλαβονοειδή, τανίνες, κουμαρίνες, φαινολικά και τερπενοειδή (Perumalla VS et al., 2011).

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα ενδοκυτταρικό τριπεπτίδιο, το οποίο προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από οξειδωτικούς τραυματισμούς. Βρίσκεται κυρίως στην ανηγμένη του μορφή και εκτός από τη δράση του ως αντιοξειδωτικό που δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, δρα και ως συμπαράγοντας για πολλά ένζυμα, όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (Pocsi I. et al., 2004).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό, το οποίο εκτιμάται ότι διατηρεί το ~60% της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών στο πλάσμα (Ames BN et al., 1981).

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο συνδέεται με τη μεμβράνη, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέποντας την οξείδωση των λιπιδίων εντός των μεμβρανών (Arredondo ML, 2016).

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, που βρίσκεται στα εξωκυττάρια υγρά και μπορεί να προστατεύσει τις βιομεμβράνες από πιθανές βλάβες που προκύπτουν λόγω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, μέσω της απόδοσης ηλεκτρονίων σε αντιδρώντα είδη, έτσι ώστε να προσδώσει σταθερότητα. Arredondo ML (Arredondo ML, 2016).

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι φυσικές χρωστικές που βρίσκονται σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά των καροτενοειδών περιλαμβάνουν τη δέσμευση μεμονωμένων ριζών οξυγόνου και υπεροξυλίου, ριζών θειλίου, σουλφονυλίου, καθώς και την προστασία των λιπιδίων από προσβολή υπεροξειδίων και ριζών υδροξυλίου (Rahman K., 2007).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ο κύριος τύπος φαινολικών ενώσεων στα φυτά. Χαρακτηρίζονται από υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό, γεγονός που τους επιτρέπει να δρουν ως αντιοξειδωτικά, τα οποία λειτουργούν ως αναγωγικοί παράγοντες (Walter M. et al., 2011)

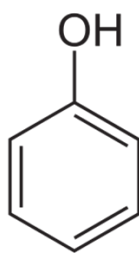
1.5 Βρωμοφαινόλες φυκών

Πολλές έρευνες των τελευταίων χρόνων έχουν αποφανθεί πως οι βρωμοφαινόλες των φυκών παρουσιάζουν μια πληθώρα θετικών επιδράσεων στον άνθρωπο. Ορισμένες από αυτές τις θεραπευτικές ιδιότητες των βρωμοφαινολών είναι αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιδιαβητική και αντιθρομβωτική δράση (Liu et al., 2011). Βέβαια, οι βρωμοφαινόλες πέρα από τις θετικές επιδράσεις που παρέχουν, αρκετές φορές μπορεί να φανούν επιζήμιες τόσο στον άνθρωπο, προκαλώντας ενδοκρινείς διαταραχές, όσο και στο περιβάλλον (Ji et al., 2011; A de Wit, 2002).

Οι βρωμοφαινόλες προέρχονται από θαλάσσια φύκη και συνήθως αποτελούνται από πολλούς αρωματικούς δακτυλίους, υποκαταστάτες βρωμίου, πρόσθετων ομάδων, αλλά και υδροξυλικών ομάδων (Liu et al., 2011). Οι πρώτες βρωμοφαινόλες βρέθηκαν στα κόκκινα φύκη, τα οποία συνήθως έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ορισμένες από αυτές (Whitfield et al., 1999; Sun HH et al., 1983; Chung HY et al., 2003), ενώ στη συνέχεια απομονώθηκαν από πράσινα και καφέ φύκη. Οι βρωμοφαινόλες ακόμα βρέθηκαν σε άλλους κατώτερους θαλάσσιους οργανισμούς όπως τα ασκίδια και τα σφουγγάρια (Liu et al., 2004; Lindsay et al., 1998). Συμπληρωματικά, οι βρωμοφαινόλες των φυκών αποτελούν θαλάσσιους δευτερογενείς μεταβολίτες και είναι πολύ πιθανό, χωρίς όμως να έχει διασαφηνιστεί πλήρως, πως η λειτουργία τους είναι κατά κύριο λόγο η χημική άμυνα (Liu et al., 2011).

1.5.1 Χημική προέλευση βρωμοφαινολών

Οι βρωμοφαινόλες, προκύπτουν από μία φαινόλη, δηλαδή ένα υδροξυπαράγωγο αρωματικών υδρογονανθράκων, το οποίο έχει τουλάχιστον ένα υδροξύλιο ενωμένο απευθείας στον άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Ακόμα, οι φαινόλες διακρίνονται σε μονοσθενείς, δισθενείς, τρισθενείς κλπ., ανάλογα με τον αριθμό των υδροξυλίων που είναι ενωμένα στον αρωματικό δακτύλιο.



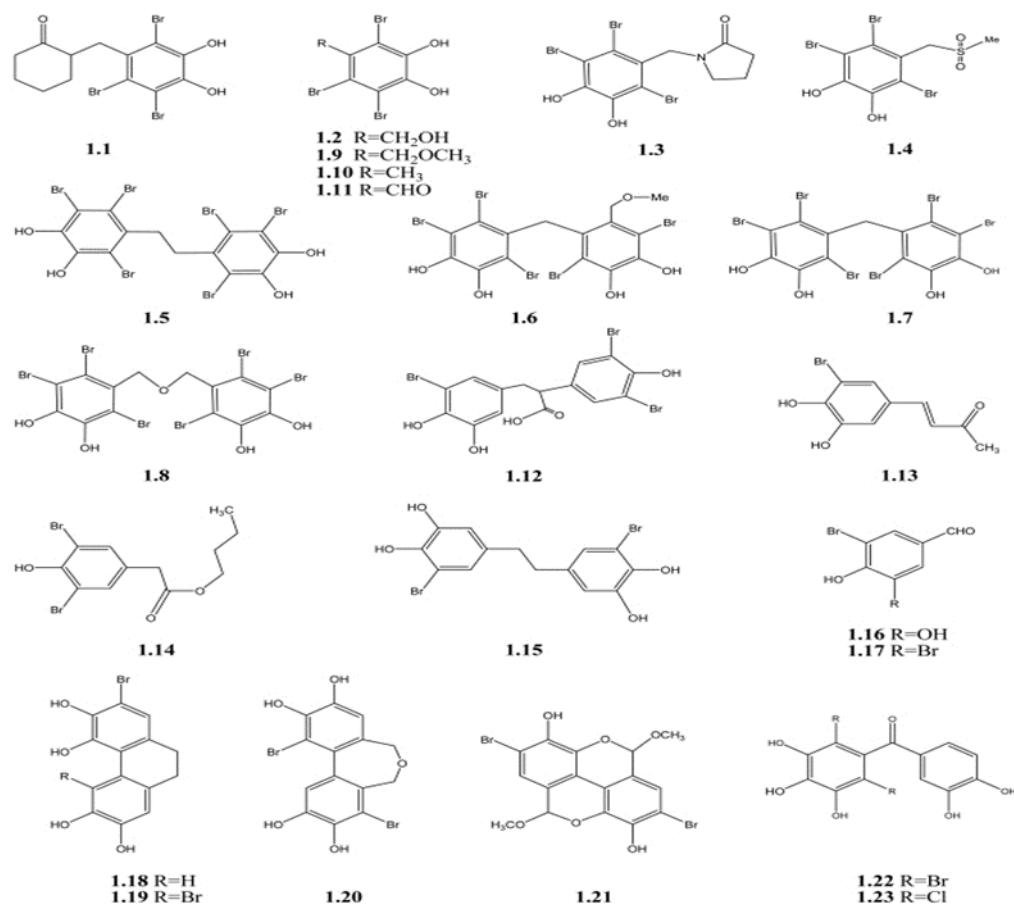
Εικόνα 5: Μοριακή απεικόνιση της φαινόλης.

Όσο αφορά τις χημικές ιδιότητες της φαινόλης, αξίζει να σημειωθεί πως μπορεί να δώσει μόνο δύο κατηγορίες αντιδράσεων, η μία αφορά τον αρωματικό δακτύλιο (κυρίως η υποκατάσταση των υδρογόνων του δακτυλίου πχ. με αλογόνο) και η άλλη την πλευρική ομάδα που είναι το υδροξύλιο. Η βασικότερη από αυτές είναι η ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση, η οποία μπορεί να είναι μία βρωμίωση, δηλαδή προσθήκη μίας ομάδας βρωμίου (Br) στον αρωματικό δακτύλιο της φαινόλης. Το βρώμιο κατευθύνεται σε θέσεις -όρθο και -πάρα του αρωματικού δακτυλίου από το υδροξύλιο, το οποίο αποτελεί έναν ισχυρό ενεργοποιητή. Η αντίδραση σταματάει όταν το βρώμιο εισαχθεί σε θέσεις -όρθο, -μέτα και -πάρα (Wade Jr., 2013).

1.5.2 Βρωμοφαινόλες φυκών και αντιοξειδωτική δράση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται στα μακρομόρια προκαλώντας προβλήματα υγείας στον άνθρωπο, όπως είναι ο διαβήτης, διάφορες νευροπάθειες και ο καρκίνος. Φαίνεται όμως πως τα αντιοξειδωτικά, μπορεί να έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία, προλαμβάνοντας τη βλάβη από τις ελεύθερες ρίζες.

Όλο και περισσότερες έρευνες αποδεικνύουν πως οι βρωμοφαινόλες έχουν πιθανώς αντιοξειδωτική δράση. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται μόρια βρωμοφαινολών με αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 6: Μόρια βρωμοφαινολών με αντιοξειδωτική δράση.

Με βάση τα αποτελέσματα ερευνών διαπιστώθηκε πως το μόριο 1.2 της παραπάνω εικόνας παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε αντίθεση με το μόριο 1.11 της ίδιας εικόνας, το οποίο παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό είναι πιθανόν να φανερώνει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των βρωμοφαινολών μπορεί να έχει στενή σχέση με τον αριθμό των υδροξυλομάδων στο μόριο (Duan et al., 2007), υπόθεση που ενισχύεται από τις ενώσεις 1.18 και 1.19, οι οποίες διαθέτουν την μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και αποτελούνται από τέσσερις υδροξυλικές ομάδες εξίσου (Liu et al., 2011). Προς υπεράσπιση του παραπάνω συμπεράσματος, η ένωση 1.17 διαθέτει την μικρότερη αντιοξειδωτική δράση και έχει μόνο μία υδροξυλομάδα στο μόριό της. Όμως, σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα φαίνεται πως ο βαθμός βρωμίωσης του κάθε μορίου δεν είναι καθοριστικός παράγοντας της δράσης του. Αναλυτικότερα, η βρωμίωση μειώνει ελαφρώς τη δραστηριότητα στην περίπτωση των 1,5 και 1,15, ενώ την αυξάνει ελαφρά στο μόριο 1,19 έναντι του 1,18.

Σε μία άλλη σύγκριση μεταξύ των φυσικών BPs και των αντίστοιχων αποβρωμιωμένων ενώσεων τους, βρέθηκε ότι η βρωμίωση οδηγεί σε μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Επομένως, φαίνεται πως η βρωμίωση στις παρούσες BPs φαίνεται μικρής σημασίας για την αντιοξειδωτική τους δράση (Lee JH et al., 2007) Επιπλέον, τα μόρια 1,22 και 1,23 επιτρέπουν τη σύγκριση μεταξύ υποκατάστασης του βρωμίου και του χλωρίου, όπου και φαίνεται πως η βρωμίωση οδηγεί σε ελαφρώς πιο δραστικές ενώσεις.

Σχεδόν 30 βρωμοφαινόλες θαλάσσιων φύκων βρέθηκαν να έχουν αντιοξειδωτική δράση *in vitro*, αλλά δεν αποδείχθηκε κάτι τέτοιο *in vivo*. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αποκαλύπτουν ότι οι βρωμοφαινόλες αυτές, είναι ένας από τους πιθανούς υποψήφιους για την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με προσβολή από ελεύθερες ρίζες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και η φλεγμονή (Liu et al., 2011).

1.5.3 Είδη φυκών και αγγειοσπέρμων

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 2 θαλάσσιων αγγειοσπέρμων που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα παρακάτω είδη:

- *Gracilaria gracilis*.

Το φύκος *G. gracilis* έχει χόνδρινο, κυλινδρικό σχήμα και μωβ φύλλα, μήκους έως 500 mm, από τα οποία ένα ή περισσότερα προκύπτουν από μικρό, σαρκώδες και δισκοειδές στήριγμα. Η διακλάδωσή του είναι πολύ ακανόνιστη, αραιή ή άφθονη (κλαδιά σε διάμετρο 2 mm με μυτερές κορυφές). Έχει ενδοπαλιρροιακό ιστό από μεγάλα κύτταρα με λεπτό τοίχωμα και στενή εξωτερική φλοιώδη ζώνη μικρών άχρωμων κυττάρων. Συναντάται συνήθως σε βράχους και πέτρες, μεσοπαλιρροιακά και υποπαλιρροιακά, και ιδιαίτερα σε αμμώδεις ακτές. Έχει μια γενικά κοινή κατανομή.

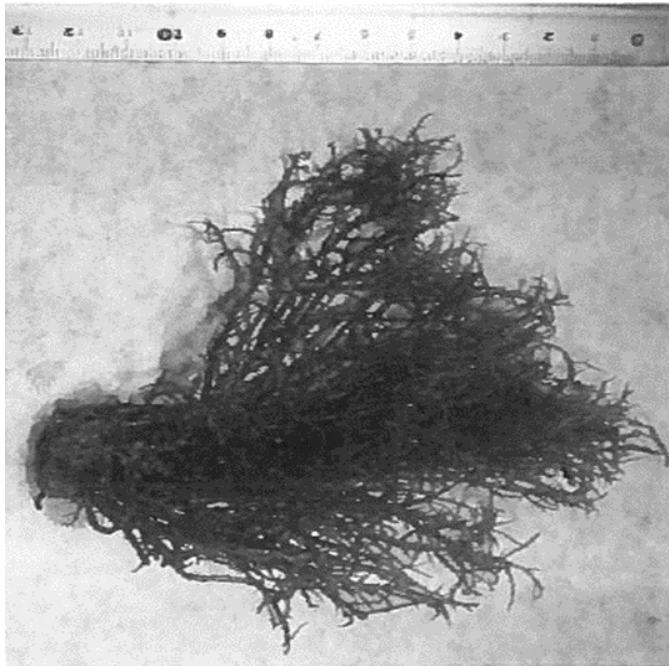


Εικόνα 7: *Gracilaria gracilis*.

- *Gracilaria sp.*

Τα είδη του γένους *Gracilaria* είναι ροδοφύκη. Το γένος *Gracilaria* διακρίνεται για την οικονομική του σημασία ως αγρόφυτο, καθώς και για τη χρήση του ως τροφή για τον άνθρωπο και διάφορα είδη οστρακοειδών. Διάφορα είδη του γένους καλλιεργούνται μεταξύ της Ασίας, της Νότιας Αμερικής, της Αφρικής και της Ωκεανίας. Τα είδη του *Gracilaria* χρησιμοποιούνται ως τροφή στις κουζίνες των Φιλιππίνων, της Χαβάης, της Ιαπωνίας και της Κορέας. Στην ιαπωνική κουζίνα, ονομάζεται ογκονόρι. Οι πολυσακχαρίτες του γένους *Gracilaria* έχουν αποδειχθεί σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα ότι είναι ένας αποτελεσματικός προφυλακτικός παράγοντας κατά της ιογενούς λοίμωξης από ιαπωνική εγκεφαλίτιδα. Επίσης, θειικοί

ολιγοσακχαρίτες από είδη *Gracilaria*. φαίνεται να έχουν αντικές ιδιότητες.



Εικόνα 8: *Gracilaria* sp.

- *Ulva rigida*.

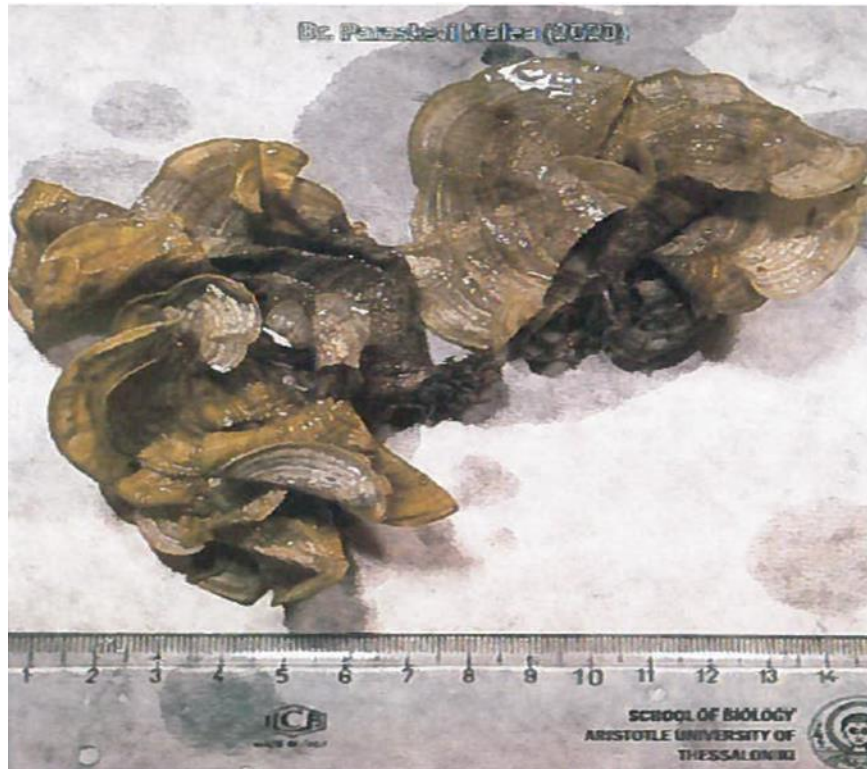
Το φύκος *U. rigida* αναπτύσσεται στα παράκτια ύδατα και στις εκβολές ποταμών. Απαντάται ευρέως στη Μεσόγειο, ιδιαίτερα στις ακτές της Ελλάδας. Αποτελείται από λεπτούς, πεπλατυσμένους θαλάμους, τα κύτταρα των οποίων έχουν ομοιόμορφη δομή. Συχνά πληροί τις απαιτήσεις για χρήση ως «βιολογικός δείκτης» για την αξιολόγηση της ρύπανσης από μέταλλα στα παράκτια συστήματα, καθώς βιοσυσσωρεύει υψηλές συγκεντρώσεις ορυκτών που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις μετάλλων στο θαλάσσιο περιβάλλον.



Εικόνα 9: *Ulva rigida*.

- *Padina pavonica*.

Το *P. pavonica* είναι ένα μικρό φαιοφύκος που αναπτύσσεται σε μία διάμετρο έως και 10 cm. Βρίσκεται στον Ινδικό Ωκεανό, τον Ειρηνικό Ωκεανό, τον Ατλαντικό Ωκεανό και τη Μεσόγειο θάλασσα. Συναντάται στην παράκτια ζώνη συνήθως με αργιλώδη, ιλυώδη ή αμμώδη ιζήματα. Άλλοι βιότοποι του περιλαμβάνουν βράχους και θραύσματα κοχυλιών, ρηχά λιβάδια υποπαραθαλάσσιων φυτών, ρίζες μαγκρόβιων και κοραλλιογενείς υφάλους σε παλιρροϊκά επίπεδα. Τα νεαρά φύλλα του είναι λεπτά, φυλλώδη και επίπεδα, με ολόκληρα περιθώρια. Τα παλαιότερα φύλλα είναι παχύτερα, κοίλα, σε σχήμα βεντάλιας ή σε σχήμα χωνιού, με λοβωτά περιθώρια. Η εξωτερική (κάτω) επιφάνεια έχει ομόκεντρες σειρές μικρών, λεπτών τριγών και έχει ζώνες λαδοπράσινου, ωχρού και σκούρου καφέ, ενώ η εσωτερική (άνω) επιφάνεια καλύπτεται με ένα λεπτό στρώμα λάσπης. Και οι δύο πλευρές είναι αραιά ασβεστοποιημένες και τα περιθώρια τείνουν να λυγίζουν προς τα μέσα. Οι λεπίδες του συνδέονται με βάση στήριξης.



Εικόνα 10: *Padina pavonica*.

- *Codium fragile*.

Το φύκος *C. fragile* εισήχθη τυχαία, πιθανώς σε πολλές περιπτώσεις μέσω της ναυτιλίας και μέσω στρειδιών που εισήχθησαν από τον Β. Ειρηνικό για καλλιέργεια, στη Μεσόγειο, και βρέθηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία το 1946. Τώρα είναι ευρέως διαδεδομένο στη Μεσόγειο.



Εικόνα 11: *Codium fragile*.

- *Cystoseira barbata*.

Το *C. barbata* βρίσκεται στην άνω υποπαραθαλάσσια ζώνη, βάθους 0,2 m, σε ανοιχτές και προστατευμένες βραχώδεις ακτές, σε ημίκλειστες περιοχές και παράκτιες λιμνοθάλασσες.



Εικόνα 12: *Cystoseira barbata*.

- *Cystoseira amentacea*.

Το *C. amentacea* είναι το τυπικό είδος του γένους *Cystoseira*. Αναπτύσσεται σε εκτεθειμένες θέσεις, στην άνω υποπαραθαλάσσια ζώνη, κοντά στην επιφάνεια της θάλασσας.



Εικόνα 13: *Cystoseira amentacea*.

- *Ulva intestinalis*.

Το *U. intestinalis* είναι ένα χλωροφύκος, κατανεμημένο σε όλο τον κόσμο και μπορεί να είναι αναπαραγωγικό όλες τις εποχές του χρόνου. Τα φύλλα του έχουν κλαδιά, είναι εντελώς σωληνοειδή και εκτείνονται σε πλάτος μέχρι το μέσο θαλλό, φτάνοντας τα 15 cm μήκος ή περισσότερο. Τα κύτταρα είναι ακανόνιστα διατεταγμένα και ο χλωροπλάστης έχει σχήμα ‘κουκούλας’ και τοποθετείται στη μία πλευρά του κυττάρου, με μόνο ένα πυρηνοειδή. Το είδος μπορεί να έχει μήκος 10-30 εκατοστά και πλάτος 6-18 χιλιοστά.



Εικόνα 14: *Ulva intestinalis*.

- *Colpomenia sinuosa*.

Το φύκος *Colpomenia sinuosa* που ονομάζεται κοινώς ο ‘κλέφτης των στρειδιών’ ή η ‘κολποειδής μπάλα’, είναι ένα είδος φαιοφυκών του γένους *Colpomenia*. Είναι το τυπικό είδος του γένους του. Είναι ευρέως διαδεδομένο σε ζεστά και εύκρατα νερά.



Εικόνα 15: *Colpomenia sinuosa*.

- *Cystoseira compressa*.

Το φύκος *C. compressa* μπορεί να βρεθεί στις ανώτερες περιοχές της παλίρροιας ζώνης, συνήθως σε μέρη που δεν εκτίθενται στον αέρα και όπου το ρεύμα δεν είναι ισχυρό. Είναι πολυετές είδος και απαντάται όλες τις εποχές του χρόνου, αν και σε ορισμένες εποχές χάνονται κλαδιά και παρατηρείται μείωση του πληθυσμού που μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υποβάθμισης της ποιότητας του νερού στη Μεσόγειο. Αναπτύσσεται σε βραχώδη και αμμώδη υποστρώματα σε ρηγά νερά. Είναι

ένα θαμνώδες φαιοφύκος, με στήριγμα που αποτελείται από μία ενιαία μονάδα. Το φύκος έχει δύο μορφές κλαδιών: μερικά πεπλατυσμένα, που δίνουν το όνομά στο είδος και άλλα πιο κυλινδρικά. Τα κυστίδια επίπλευσης βυθίζονται μέσα στους πλευρικούς κλάδους. Τα περισσότερα φύκη αυτού του είδους έχουν μήκος μεταξύ 15-30 cm, αλλά μπορούν να βρεθούν και μεγαλύτερα. Το χρώμα του φύκου έχει αποχρώσεις του ανοιχτού καφέ και του μπλεζ, άλλοτε ομοιόμορφα κατανεμημένο και άλλοτε με στίγματα. Όταν στεγνώσει ο θαλλός αποκτά μία πιο σκούρα απόχρωση.



Εικόνα 16: *Cystoseira sompressa*.

- *Sargassum vulgare*.

Είναι ένα φαιοφύκος, που αναπτύσσεται σε κοραλλιογενείς υφάλους, βράχους και πέτρες με κύριο άξονα μήκους περίπου 40 cm, που επιπλέει όρθιο μέσω αέριων κύστεων σε προστατευμένες ή εκτεθειμένες θέσεις όλων των τροπικών και υποτροπικών ακτών από την υψηλή παλίρροια έως τις υποπαραθαλάσσιες ακτές.



Εικόνα 17: *Sargassum vulgare*.

- *Gigartina teedei*.

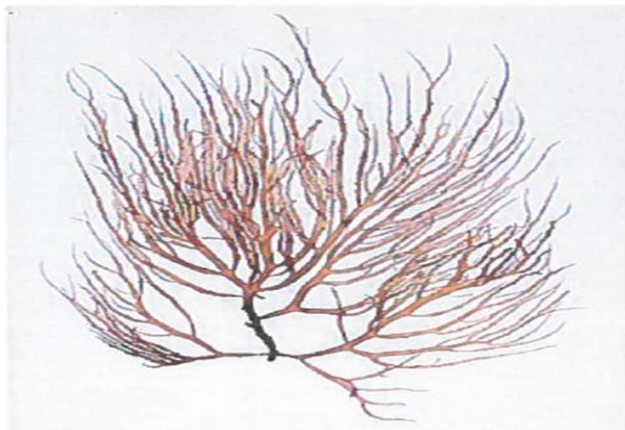
Το φύκος *G. teedei* βρίσκεται ευρέως διαδεδομένο στον Ατλαντικό Ωκεανό, τη Μεσόγειο Θάλασσα, τη Μαύρη Θάλασσα και τον Ινδικό Ωκεανό. Ο βιότοπος του είναι επιλιθικός σε προστατευμένες περιοχές και άνω υποπαραθαλάσσιος έως τουλάχιστον 3 μέτρα. Αναπτύσσεται σε βράχους ανάμεσα στα σημάδια της παλίρροιας κοντά στην άνω παλιρροιακή ζώνη. Είναι ένα μικρό ροδοφύκος, του οποίου τα φύλλα είναι χόνδρινα μεμβρανώδη, με χρώμα σκούρο βυσσίני έως κόκκινο μαύρο, που γίνονται κιτρινοπράσινα λόγω σήψης. Οι κύριοι άξονες του λόγω των πλατιών κλαδιών τους φτάνουν το 1 cm.



Εικόνα 18: *Gigartina teedei*.

- *Gracilaria bursa pastoris*.

Το φύκος *G. bursa-pastoris* εντοπίζεται κυρίως στον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό Ωκεανό καθώς και στη Μεσόγειο Θάλασσα. Είναι γενικά διαδεδομένο σε ζεστά νερά. Είναι επιλιθικό και βρίσκεται σε προστατευμένες θέσεις στο ανώτερο υποπαραθαλάσσιο τμήμα, ενώ συχνά συνδέεται με περιοχές όπου υπάρχει εναπόθεση άμμου.



Εικόνα 19: *Gracilaria bursa pastoris*.

- *Gigartina pistillata*.

Το *G. pistillata* είναι ένα εδάδιμο ροδοφύκος που βρίσκεται τόσο στον Βορειοανατολικό όσο και στο Νοτιοανατολικό Ατλαντικό και στη Νοτιοανατολική Ασία και αποτελεί πηγή καραγενάνης η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Το *G. pistillata* αποτελεί το τυπικό είδος του γένους *Gigartina*, οι θάλλοι του είναι όρθιοι, ύψους έως 20 cm, με σκούρο κόκκινο ή κόκκινο-καφέ, χρώμα, χόνδρινοι, ελαστικοί, διχοτομικά διακλαδισμένοι και προσκολλημένοι στο υπόστρωμα μέσω ενός μικρού δίσκου. Το *G. pistillata* μπορεί να δείξει μία σπάνια παρουσία ετεροσπορικών θαλλών (δηλαδή, παράγοντας τετρασπόρια και καρποσπόρια στους θαλλούς), παρόλο που έχει έναν ισομορφικό τριφασικό κύκλο ζωής.



Εικόνα 20: *Gigartina pistillata*..

- *Ruppia maritima*.

Το *R. maritima* είναι ένα αγγειόσπερμο που βρίσκεται σε όλο τον κόσμο. Είναι ένα ετήσιο ή πολυετές φυτό με λεπτό νήμα, που μοιάζει με γρασίδι, το οποίο αναπτύσσεται από ένα ρίζωμα στερεωμένο στα ρηγά στο υγρό υπόστρωμα. Παράγει μια μακρόστενη, ίσια ή χαλαρά κουλουριασμένη ταξιανθία με δύο μικροσκοπικά λουλούδια. Το φυτό συχνά αυτογονιμοποιείται, αλλά τα άνθη απελευθερώνουν και γύρη. Το φυτό αναπαράγεται επίσης αγενώς φυτρώνοντας από το ρίζωμά του για να σχηματίσει αποικίες.



Εικόνα 21: *Ruppia maritima*.

2 . Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικά θαλάσσια φύκη και αγγειόσπερμα να προστατεύουν έναντι βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο DNA. Για το σκοπό αυτό τα εκχυλίσματα 14 θαλάσσιων φυκών και 1 θαλάσσιου αγγειοσπέρμου που συλλέχθηκαν από ελληνικές θάλασσες εξετάστηκαν με τη μέθοδο πρόκληση θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA.

3. Μεθοδολογία

3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι: το αντιβιοτικό αμικιλίνη, το θρεπτικό μέσο LB Broth, το διάλυμα SDS (10%), το διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA), αιθανόλη 70%, προπανόλη και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase).

Τα τρία διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: το Solution 1 (0.9gr glucose, 0.303gr Tris, 2ml EDTA 0.5M), Solution 2 (0.8gr NaOH, 1gr SDS) και το Solution 3 (29.44gr potassium acetate, 11.5ml acetic acid 28.5ml H₂O).

Αρχικά, παράγεται σε κωνική φιάλη των 250ml το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, το οποίο περιέχει 3 gr LB broth και 2 gr NaCl, διαλυμένα σε 200ml H₂O. Ακολουθεί η αποστείρωση του θρεπτικού μέσου, στην κωνική φιάλη όπου και βρίσκεται. Στην συνέχεια προστίθενται στο θρεπτικό μέσο 200μl διαλύματος αμικιλίνης, αφού πρώτα έχει κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί, η προσθήκη 5 ml θρεπτικού μέσου σε δύο falcon και στην συνέχεια η επιμόλυνσή τους με μικρή ποσότητα βακτηρίων E. Coli. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται για τέσσερις ώρες, κάνοντας ταυτόχρονα ανάδευση στις 210 στροφές. Αυτό συμβαίνει γιατί με την κίνηση της καλλιέργειας πετυχαίνουμε την καλύτερη οξυγόνωση της, σε σύγκριση με μια στατική καλλιέργεια. Έπειτα, γίνεται επιμόλυνση με αυτές τις καλλιέργειες στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, όπου και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση στις 210 στροφές, σε θερμοκρασία 37 °C για 12-13 ώρες.

Η καλλιέργεια χωρίζεται σε τέσσερα falcon των 50ml και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 4000 στροφές και στους 4 °C, όπου διατηρείται μόνο το ίζημα που έχει δημιουργηθεί. Στην πορεία, προστίθενται 4ml Solution 1, με σκοπό την διάλυση του ιζήματος. Η διάλυση αυτή, πραγματοποιείται μέσω ανάδευσης με πιπέτα, ενώ ακολουθεί έντονο αλλά σύντομο vortex. Αν η διάλυση πραγματοποιούνταν εξαρχής

με δυνατό vortex τα κύτταρα θα δέχονταν ισχυρή πίεση και θα έσπαγαν. Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην συνέχεια, γίνεται προσθήκη 8ml Solution 2 και πολύ ήπια ανάδευση, μέχρι διάλυμα στο falcon να γίνει διαυγές. Είναι σημαντικό η ανάδευση να γίνει απαλά καθώς το Solution 2 μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας πόρους στην μεμβράνη και όπως γίνεται αντιληπτό, εντονότερη ανάδευση θα προκαλέσει μεγαλύτερους πόρους με αποτέλεσμα να απομονωθεί και χρωμοσωμικό DNA μαζί με το πλασμιδιακό.

Το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη χαλάρωση του DNA από την υπερελικωμένη στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση για αυτό μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές πρέπει να προστεθεί αμέσως το επόμενο διάλυμα. Επομένως προστίθενται 6ml Solution 3 και αναδεύονται απαλά. Ακολουθεί επώαση για 7-8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 5000στροφές και στους 4°C.

Μετά την φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται μέτρηση του όγκου του. Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις ίδιες συνθήκες με προηγουμένως, έτσι ώστε το διάλυμα να είναι πλήρως διαυγές και εκ νέου μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούργιο σωλήνα, με ταυτόχρονη προσθήκη 60% του όγκου του σε προπανόλη και έντονη ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 5000στροφές και στους 4°C, απόχυση του υπερκειμένου, προσθήκη 50% του όγκου του σε αιθανόλη 70% και ήπια ανάδευση. Τα falcon φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά στις 5000στροφές και στους 4°C, όπου ακολουθεί απόχυση το υπερκείμενο και τοποθέτηση του ιζήματος στον κλίβανο στους 37°C μέχρι να στεγνώσει και να πραγματοποιηθεί η διάλυση του σε TE 1.5ml, στο οποίο προστίθεται RNase 10μg/ml για την διάσπαση του RNA.

Τέλος, έγινε η μέτρηση της καθαρότητας και της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Αναφορικά, η μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε

συγκέντρωση DNA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm, όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280. Όταν ο λόγος αυτός, είναι μεγαλύτερος από 1,8 τότε η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V.

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ βρωμιούχου αιθιδίου για 30 λεπτά σε ήπια ανάδευση. Το βρωμιούχου αιθίδιο προστίθεται με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, καθώς σε αντίθετη περίπτωση θα δεσμευόταν στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του DNA. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα, την αλλαγή του μοριακού βάρους του υπερελικωμένου DNA και επομένως αυτό να τρέχει πιο αργά στην ηλεκτροφόρηση από την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση και επομένως οι ζώνες να φαίνονται ανάποδα. Έπειτα, αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 λεπτά με ήπια ανάδευση και τελικά το πλασμίδιο χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C .

3.2 Επαγόμενη από Ρίζες Περοξυλίου (ROO^\bullet) Πρόκληση Μονόκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.

Πλασμιδιακό DNA και Διαμορφώσεις

Το πλασμιδιακό DNA, είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA, που βρίσκεται κατά βάση στα βακτήρια. Τα βακτήρια, με τη σειρά τους μπορεί να έχουν ένα ή πολλά αντίγραφα πλασμιδιακού DNA, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αυτοδιπλασιάζονται και ταυτόχρονα φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

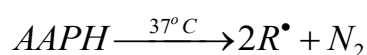
Το πλασμιδιακό DNA, το οποίο «τρέχει» σε ένα gel αγαρόζης, βρίσκεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις:

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation). Στην διαμόρφωση αυτή, στην οποία το πλασμιδιακό DNA δεν έχει θραύσματα και βρίσκεται στην πιο συμπαγή μορφή του.
2. Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation). Το DNA βρίσκεται στην φάση αυτή, όταν έχει μονόκλινα θραύσματα. Τα θραύσματα αυτά, μπορεί να προκληθούν από διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες.
3. Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation). Δημιουργείται, έπειτα από δίκλινα θραύσματα.

Η ταχύτητα με την οποία «τρέχει» το DNA σε ένα gel ηλεκτροφόρησης, εξαρτάται άμεσα από την διαμόρφωση στην οποία βρίσκεται. Γίνεται εύκολα κατανοητό πως όσο μικρότερη είναι η διαμόρφωση, τόσο πιο γρήγορα αυτό διαπερνά τους πόρους της αгарόζης και επομένως τόσο πιο γρήγορα κινείται. Επομένως, το υπερελικωμένο κινείται γρηγορότερα από το γραμμικό και αυτό γρηγορότερα από το ανοιχτό κυκλικό.

Ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και παραγωγή τους από θέρμανση του AAPH

Για την παραγωγή ριζών ROO[•], χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)], το οποίο όταν βρεθεί σε θερμοκρασία 37 °C, μέσα στο υδατόλουτρο, διασπάται και παράγει ελεύθερες ρίζες ROO[•].



Οι ρίζες αυτές έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλινα θραύσματα στο DNA και προάγουν την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, από την υπερελικωμένη μορφή που ήδη βρίσκεται. Με βάση τη μετατροπή αυτή, της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική διαμόρφωση θα γίνει ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του εκάστοτε φυτικού εκχυλίσματος και επομένως της προστατευτικής δράση αυτών απέναντι στις ρίζες ROO[•].

Πειραματική Διαδικασία

Διαλύματα

EDTA 0.5M pH = 8.0

H ₂ O	EDTA	Προσθήκη NaOH μέχρι pH = 8.0
1lt	186.1gr	~ 20gr NaOH
500ml	93.05gr	~ 10gr NaOH
250ml	46.53gr	~ 5gr NaOH

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 5x

	<u>Tris</u>	<u>Boric acid</u>	<u>EDTA 0.5M</u>
1000ml	54gr	27.5gr	20ml
500ml	27gr	13.75gr	10ml
200ml	10.8gr	5.5gr	4ml

Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 1x

1/5 αραιώση διαλύματος TBE 5x. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

PBS pH=7,4

	<u>1000ml</u>	<u>500ml</u>
NaCl 137mM	8 gr	4 gr
KCl 2,7mM	0,2 gr	0,1 gr
Na ₂ HPO ₄ 8,1mM	1,44 gr	0,72 gr

KH ₂ PO ₄ 1,5mM	0,2 gr	0,1 gr
---------------------------------------	--------	--------

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου

AAPH 100mM

13,56 mg + 500μl PBS (Η αναλογία προέκυψε μετά από δοκιμές)

Η προετοιμασία του διαλύματος γίνεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο σε σκιερό μέρος, καθώς η AAPH είναι φωτοευαίσθητη.

Loading buffer

10ml 25mg Bromophenol Blue
 4gr sucrose or 30% glycerol

Διατήρηση -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

Ethidium Bromide 10mg/ml

10 ml 100mg Eth. Br.

Διάλυμα φωτοευαίσθητο, διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4 °C.

Διαδικασία

- Προετοιμασία 0,8% gel αгарόζης σε TBE 1x
- Προετοιμασία διαλυμάτων αντίδρασης

Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) είναι τα εξής:

- PBS
- DNA Bluescript plasmid 3,2μg
- AAPH 2,5mM

Εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον παρακάτω πίνακα:

	PBS	Εκχύλισμα	DNA Plasmid	ΑΡΡΗ
Αρνητικό C	9 μl	-	1 μl	-
Θετικό C	5 μl	-	1 μl	4 μl
Cmax	6 μl	3 μl	1 μl	-
C1	2 μl	3 μl	1 μl	4 μl
C2	2 μl	3 μl	1 μl	4 μl
C3	2 μl	3 μl	1 μl	4 μl
C4	2 μl	3 μl	1 μl	4 μl
C5	2 μl	3 μl	1 μl	4 μl
C6	2 μl	3 μl	1 μl	4 μl

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control, ένα θετικό control και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως φαίνεται στον πίνακα. Για κάθε ουσία πραγματοποιούμε 5 αραιώσεις 1:1 με την προσθήκη 100μl της προηγούμενης συγκέντρωσης και 100μl PBS.

- Προσθήκη των διαλυμάτων με την σειρά του πίνακα
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά
- Προσθήκη 3μl loading buffer
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Ηλεκτροφόρηση 100V για 1h περίπου σε gel αγαρόζης 0,8%
- Χρόση με Βρωμιούχο Αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά
- Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- Φωτογραφία: οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με σύστημα ανάλυσης εικόνας
- Ποσοτικοποίηση: χρήση του λογισμικού της ImageJ για την ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα.

Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

Στατιστική ανάλυση:

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

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

όπου:

S_0 : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control,

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

S : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα και του οξειδωτικού παράγοντα.

IC₅₀

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν οι καμπύλες για την εύρεση των IC₅₀ τιμών τους.

Ως IC₅₀ ορίζεται η τιμή της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος που αναστέλλει κατά 50% την δράση των ελεύθερων ριζών και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης του κάθε εκχυλίσματος.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA σε συνδυασμό με post-hoc ανάλυση με το λογισμικό SPSS (version 13.0). Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε το $p < 0,05$.

4. Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 14 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και 1 εκχύλισμα θαλάσσιου αγγειοσπέρματος, που συλλέχθηκαν από περιοχές του Αιγαίου πελάγους. Τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν έναντι των βλαβών που προκαλούνται σε πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα περοξυλίου (ROO*), δηλαδή εξετάστηκε η ικανότητα τους να αποτρέπουν τη δημιουργία μονόκλωνων θραυσμάτων και επομένως την μετατροπή του πλασμιδιακού DNA από υπερελικωμένη σε ανοιχτή κυκλική ή γραμμική διαμόρφωση.

Τα εκχυλίσματα όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρεμπόδισαν δοσοεξαρτώμενα τον σχηματισμό θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO*). Επομένως, φαίνεται πως τα εκχυλίσματα έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τη ρίζα περοξυλίου (ROO*), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-

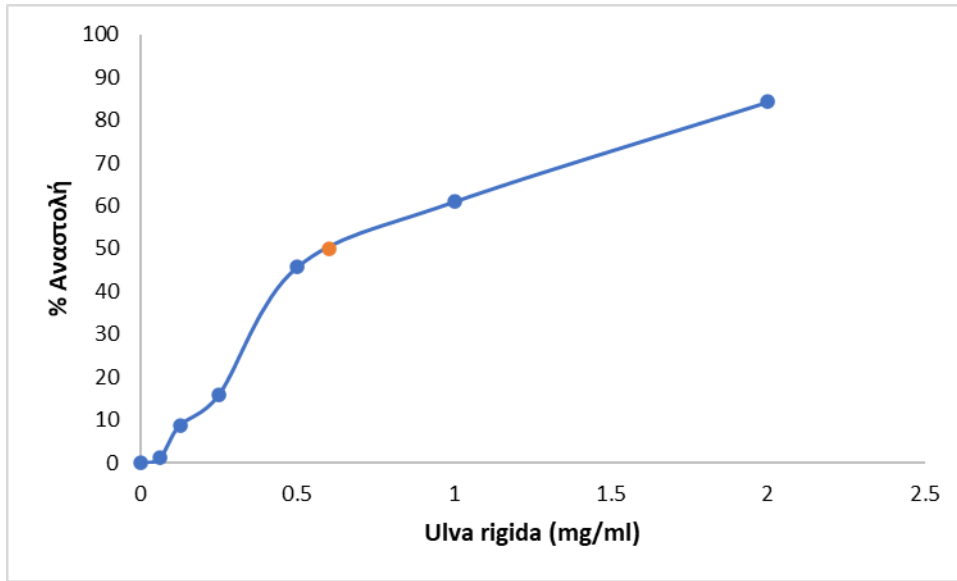
αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το πλασμιδιακό DNA επωάστηκε με τα εκχυλίσματα σε διάφορες συγκεντρώσεις και για κάθε συγκέντρωση προσδιορίστηκε η % αναστολή στη δημιουργία μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Από τα διαγράμματα συσχέτισης της % αναστολής με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος προσδιορίστηκαν οι τιμές IC50 δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος όπου αναστέλλεται η θραυσματοποίηση του DNA κατά 50%. Γενικά, όσο μικρότερη η τιμή IC50, τόσο πιο δραστικό θεωρείται το εκχύλισμα.

Στα διαγράμματα 1 – 15 φαίνεται η % αναστολή στην δημιουργία μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος. Στο διάγραμμα 16 φαίνονται συγκεντρωτικά οι τιμές IC50 όλων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

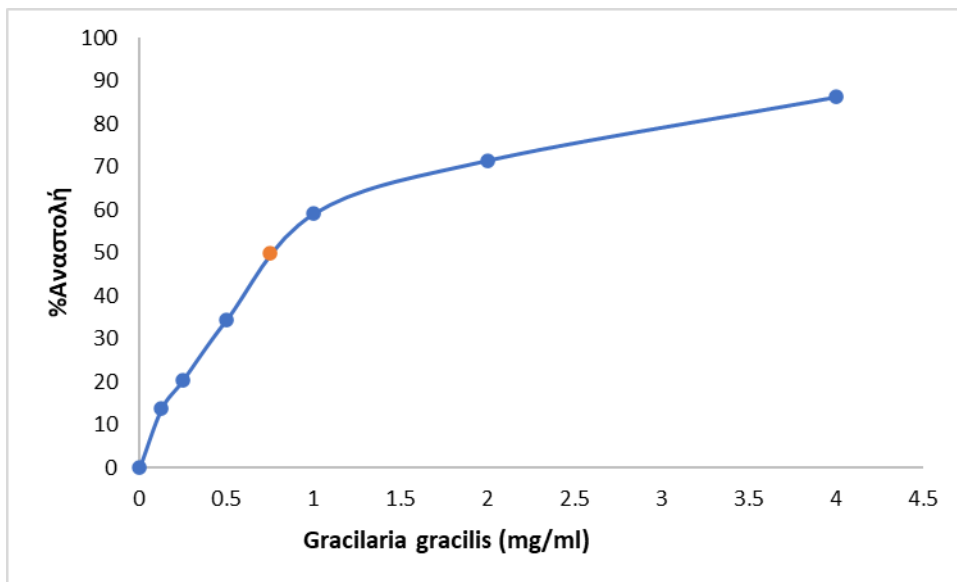
Οι τιμές IC50 κυμαίνονται από 0,04 – 1,8 mg/ml. Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν το αγγειόσπερμα, *Ruppia maritima* (IC50: 0,04 mg/ml). Από τα φύκη τα 5 πιο δραστικά εκχύλιστα ήταν τα *Gigartina teedei* (IC50: 0,038 mg/ml), *Gigartina pistillata* (IC50: 0.25 mg/ml), *Cystoseira barbata* (IC50: 0.32 mg/ml), *Gracilaria sp* (IC50: 0.42 mg/ml) και *Gracilaria bursa pastoris* (IC50: 0.5 mg/ml).



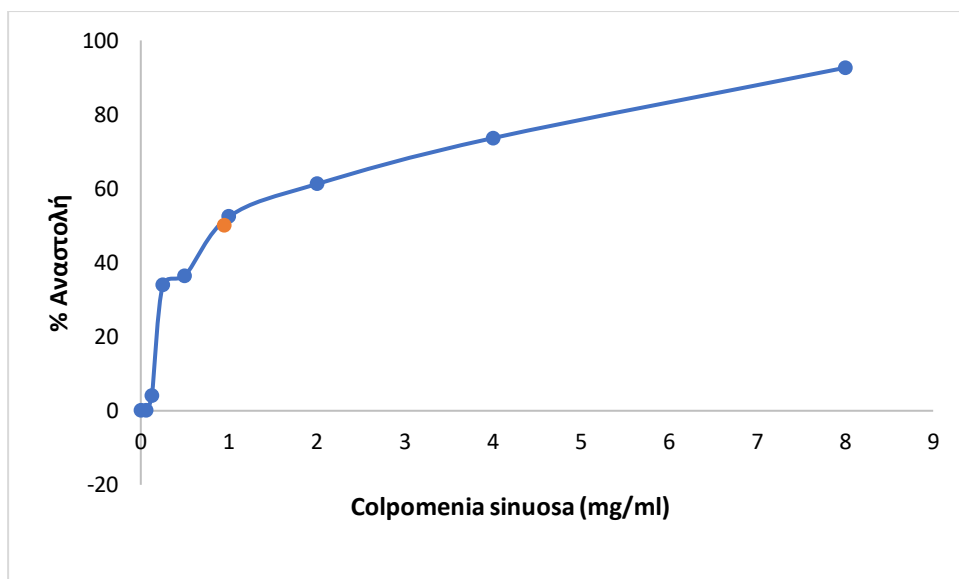
Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης όπου φαίνεται η προστατευτική δράση από βλάβη στο DNA του εκχυλίσματος *G. teedei* που προκαλείται από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]): σειρά 1, πλασμίδιο DNA, σειρά 2, πλασμίδιο DNA εκτεθειμένο σε ρίζα ROO[•], σειρές 3-6 πλασμίδιο DNA που εκτίθεται σε ρίζα ROO[•] παρουσία εκχυλίσματος στα 8, 16, 32, 64 και 128 μg/ml, σειρά 7 πλασμίδιο DNA που εκτέθηκε σε εκχύλισμα στα 128 μg/ml.



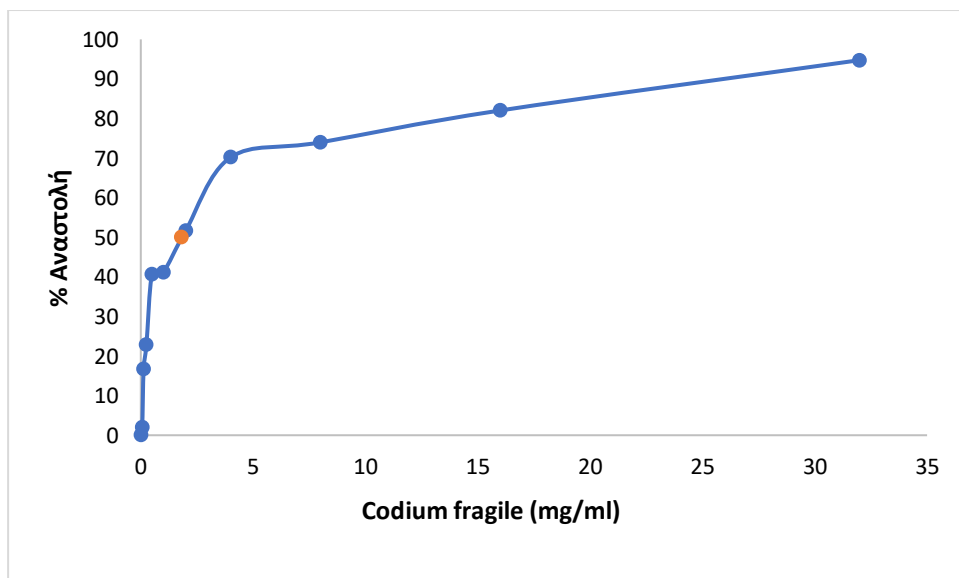
Διάγραμμα 1: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Ulva rigida*.



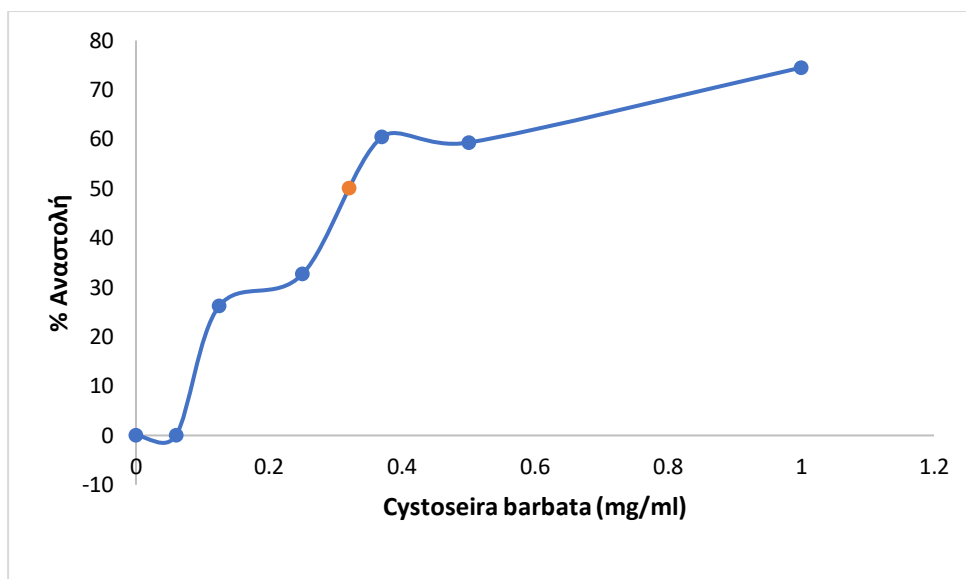
Διάγραμμα 2: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Gracilaria gracilis*.



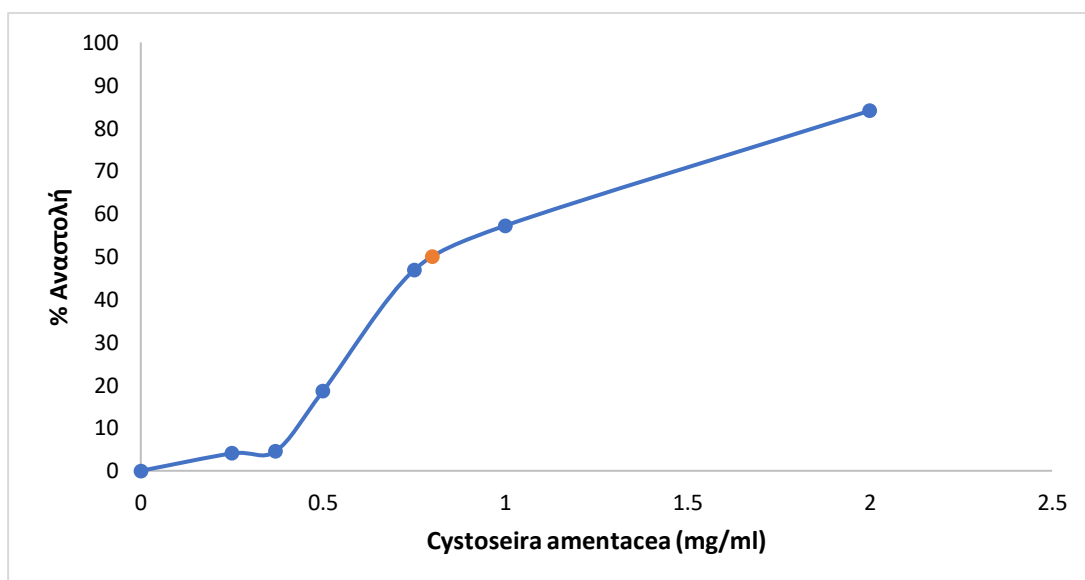
Διάγραμμα 3: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Colpomenia sinuosa*.



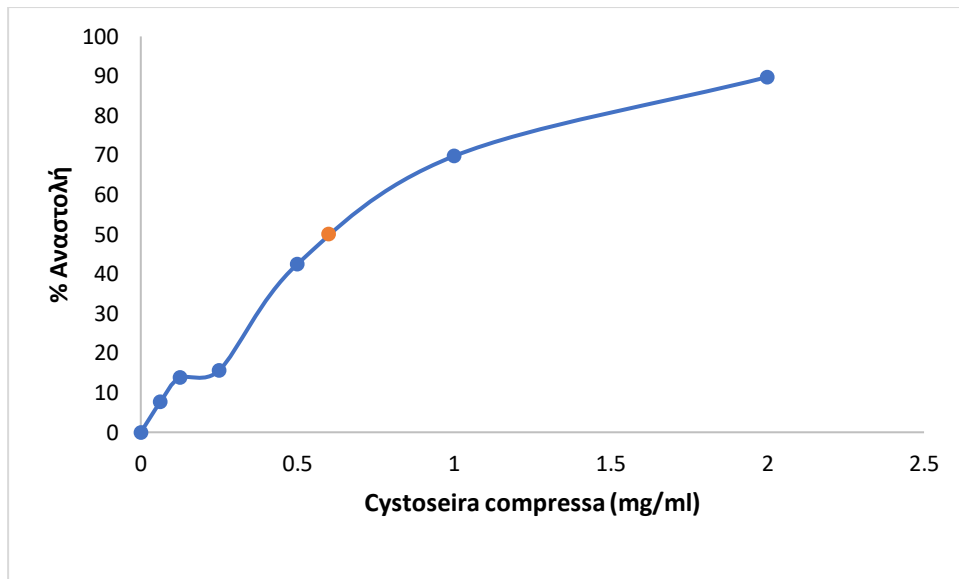
Διάγραμμα 4: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Codium fragile*.



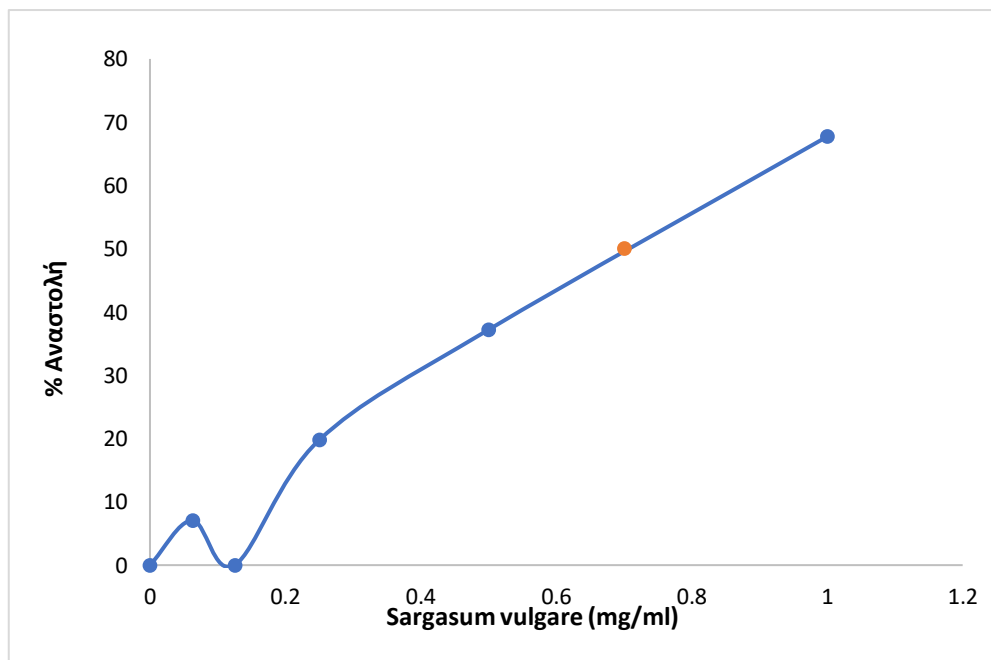
Διάγραμμα 5: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Cystoseira barbata*.



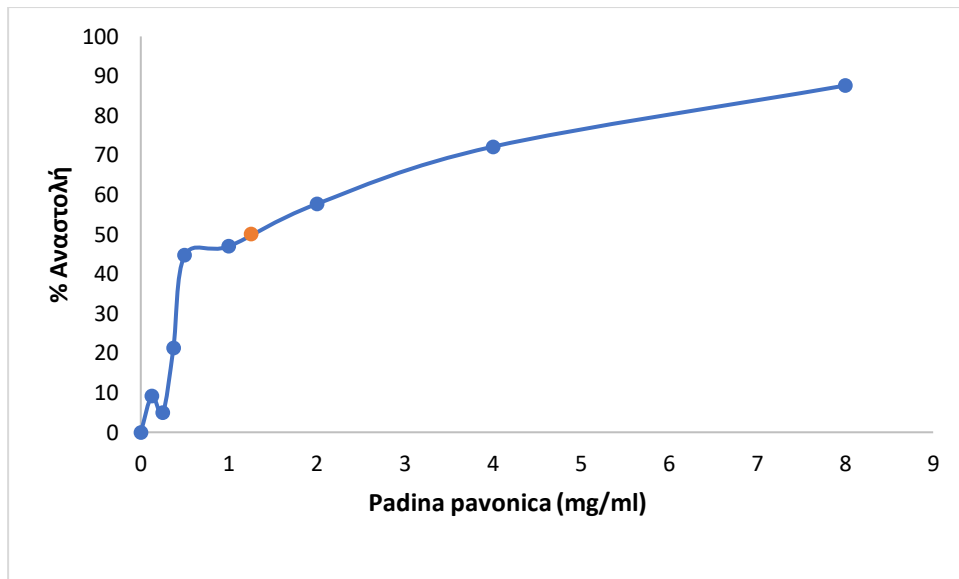
Διάγραμμα 6: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Cystoseira amentacea*.



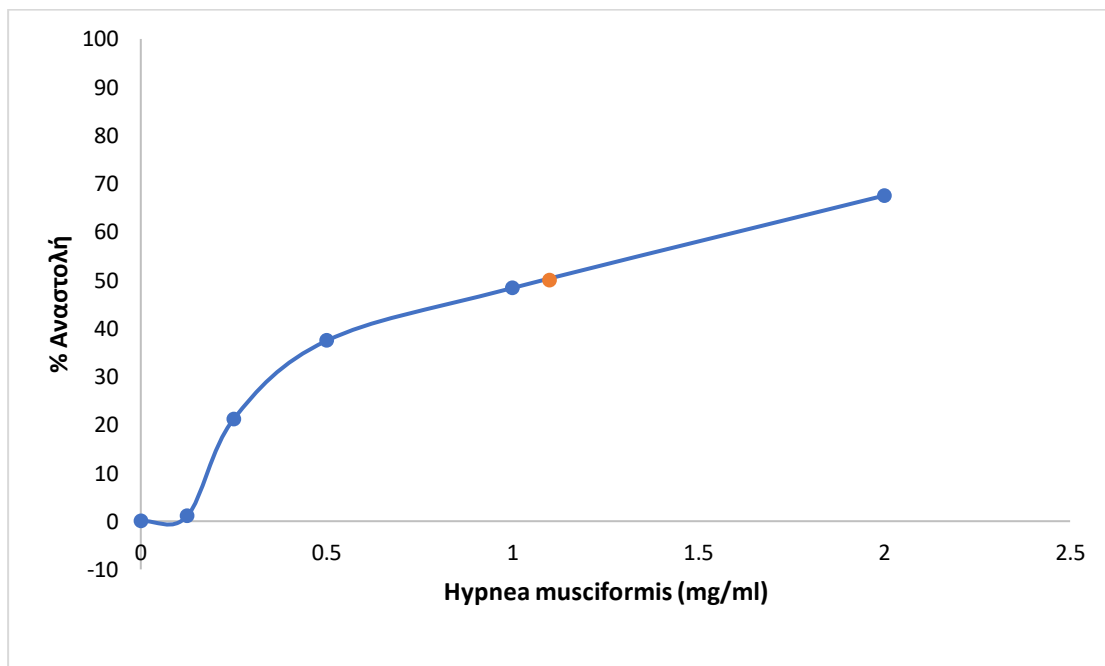
Διάγραμμα 7: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Cystoseira compressa*.



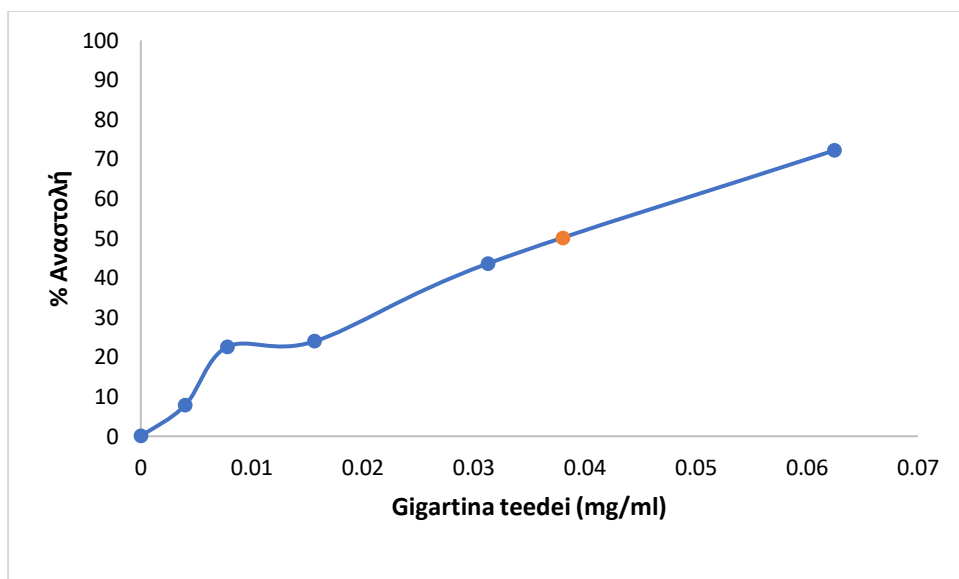
Διάγραμμα 8: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Sargasum vulgare*.



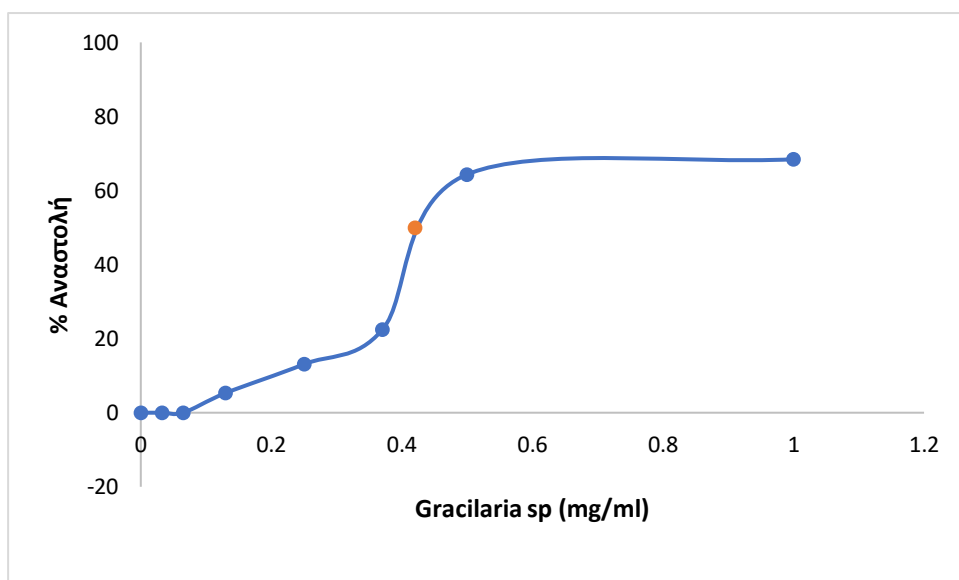
Διάγραμμα 9: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Padina pavonica*.



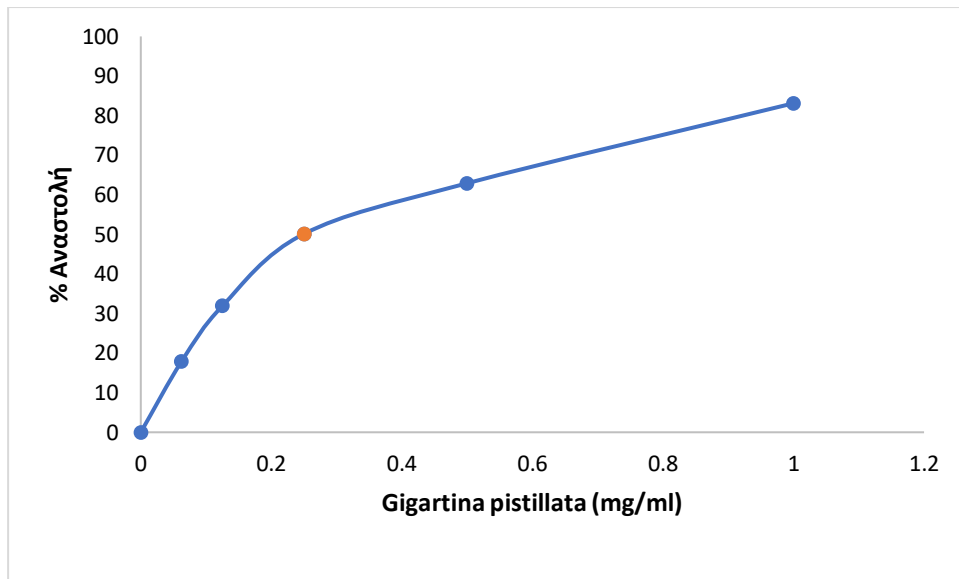
Διάγραμμα 10: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Hypnea musciformis*.



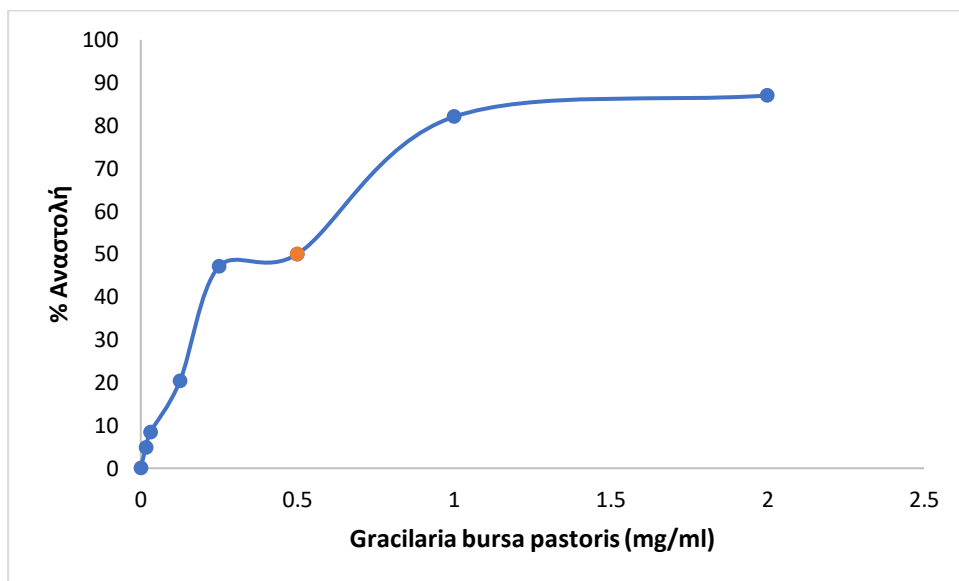
Διάγραμμα 11: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Gigartina teedei*.



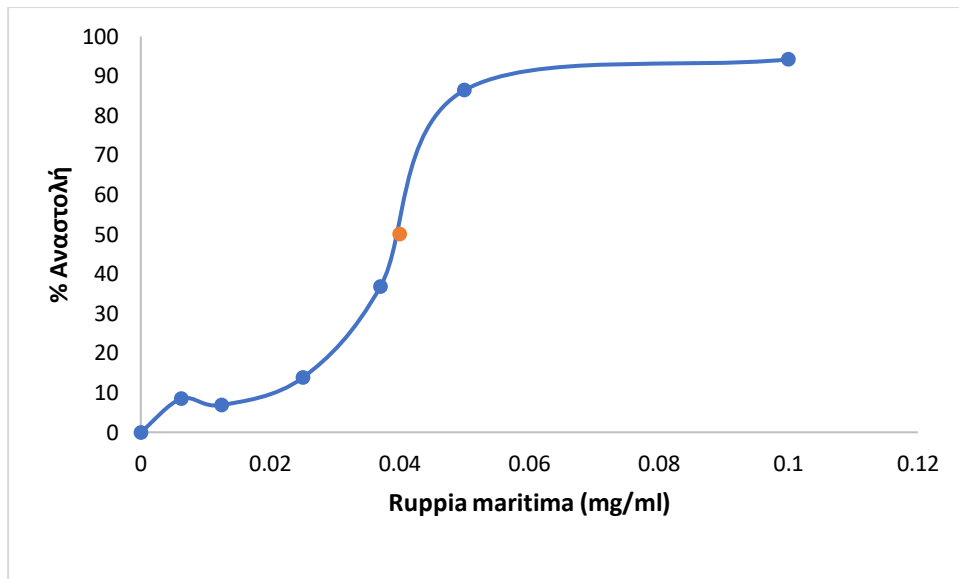
Διάγραμμα 12: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Gracilaria sp.*



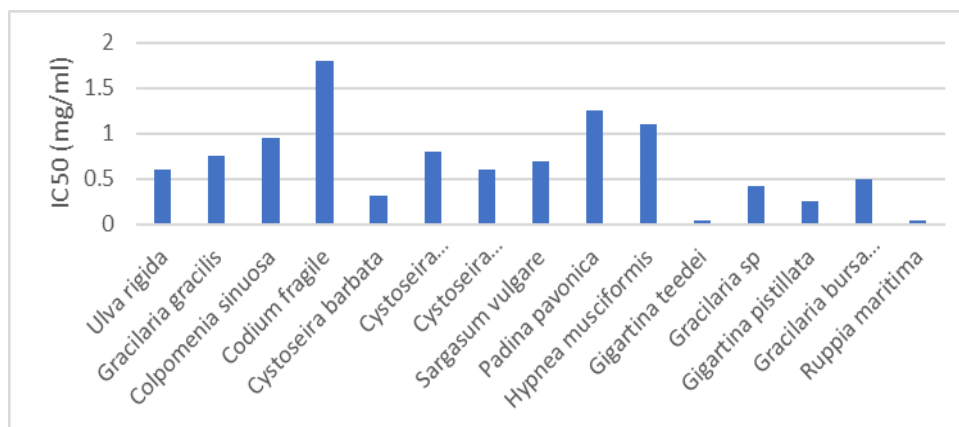
Διάγραμμα 13: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Gigartina pistillata*.



Διάγραμμα 14: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το φύκος *Gracilaria bursa pastoris*.



Διάγραμμα 15: Η % αναστολή δημιουργίας μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, που προκαλεί η ρίζα περοξυλίου (ROO•), από το αγχειόσπερμιο *Ruppia maritima*.



Διάγραμμα 16: Συγκεντρωτικό διάγραμμα τιμών IC50, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην επαγωγή μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

5. Συζήτηση

Πληθώρα ερευνών καταδεικνύει πως οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί σε μια δυσμενή συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και ταυτόχρονα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αξιοποίησης των ελεύθερων ριζών προς όφελός τους. Κάποιες από τις κυριότερες φυσιολογικές λειτουργίες που συμμετέχουν οι ελεύθερες ρίζες ή τα παράγωγά τους αποτελούν η ρύθμιση του αγγειακού τόνου, ο υπολογισμός της τάσης του οξυγόνου, η ρύθμιση των λειτουργιών που ελέγχονται από τη συγκέντρωση αυτού αλλά και οι αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες, που διασφαλίζουν τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Όταν, όμως τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβούν το ανώτατο όριο, που μπορεί να αντιμετωπίσει η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, συσσωρεύονται στο σώμα και προκαλείται οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και της απομάκρυνσής τους από το αντιοξειδωτικό σύστημα (Veskoukis et al., 2008). Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής, είναι πιθανό να οφείλεται είτε στη μειωμένη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων, είτε στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, λόγω της συνεχούς έκθεσης σε οξειδωτικό παράγοντα. Τα δεδομένα αυτά, συχνά προκαλούν αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό αφού δημιουργούν βλάβες τόσο σε αμυντικά συστήματα, όσο και στη δομή και λειτουργία των βιομορίων, απορρυθμίζοντας βασικές βιολογικές διεργασίες του οργανισμού και κατά συνέπεια προκαλούν προβλήματα υγείας, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευρολογικές παθήσεις (Brieger et al., 2012).

Οι αρνητικές αυτές συνέπειες στην υγεία κυρίως του ανθρώπου έχει οδηγήσει στην αυξημένη αναζήτηση αντιοξειδωτικών, τα οποία θα μπορούν να καταπολεμούν και να προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες. Η λήψη των απαραίτητων αντιοξειδωτικών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της χορήγησης φαρμάκων ή συμπληρωμάτων διατροφής, είτε μέσω των τροφίμων. Ιδιαίτερα οι φυτικές αντιοξειδωτικές ουσίες μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά σε αυτή την προστασία.

Έχει βρεθεί πως μια ομάδα φυσικών ουσιών που προσδίδουν χημειοπροφυλακτική δράση είναι οι βρωμοφαινόλες, οι οποίες προέρχονται από θαλάσσια φύκη. Γενικά, είναι γνωστό πως οι βρωμοφαινόλες έχουν σημαντική αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αλλά και αντιοξειδωτική δράση. Απόρροια των παραπάνω, αλλά και της μεγάλης ποικιλίας των θαλάσσιων φυκών που διαθέτουν οι ελληνικές θάλασσες, αποτελεί η παρούσα μελέτη, σκοπός της οποίας ήταν ο προσδιορισμός της ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικά θαλάσσια φύκη και αγγειόσπερμα, να προστατεύουν έναντι βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο DNA.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 16 εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών και αγγειόσπερμων. Όπως προαναφέρθηκε, το 1 από αυτά προέρχεται από θαλάσσια αγγειόσπερμα, ενώ τα 14 προέρχονταν από θαλάσσια φύκη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν το αγγειόσπερμα *Ruppia maritima*, φάνηκε να έχει ιδιαίτερα μεγάλη αντιοξειδωτική δράση ($IC_{50} = 0,04 \text{ mg/ml}$). Σε έρευνα των Enerstvedt et al. (2017), διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η υψηλή περιεκτικότητα του αγγειόσπερμου σε κιχωρικό οξύ και ακόμα εντοπίστηκαν 8 είδη φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή, παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, πιθανόν λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζουν τα φαινολικά τμήματά τους στην οξείδωση (Speisky et al., 2022). Ακόμα, παρατηρήθηκε πως εκχυλίσματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση κιχωρικού οξέος, εμφάνιζαν και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Enerstvedt et al., 2017). Άρα, είναι πιθανόν η αντιοξειδωτική δράση του *Ruppia maritima* να οφείλεται σε αυτά τα συστατικά του, όμως είναι σημαντική η επιβεβαίωση αυτού του συμπεράσματος με περαιτέρω πειράματα.

Από τα θαλάσσια φύκη, εκείνα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση αποτελούν τα φύκη του γένους *Gigartina*, το *Gigartina teedei* ($IC_{50} = 0,038 \text{ mg/ml}$) και το *Gigartina pistilata* ($IC_{50} = 0,25 \text{ mg/ml}$) και ανήκουν στα κόκκινα φύκη. Αυτό το είδος φυκών αποτελεί την πλουσιότερη πηγή θεικού πολυσακχαρίτη (fucoidan) (Fauziee et al., 2020). Ο θεικός πολυσακχαρίτης διαθέτει σημαντική αντικαρκινική δράση, αφού δρα έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου στοχεύοντας σε βασικά μόρια απόπτωσης, αλλά και πιθανότατα η αντιοξειδωτική ικανότητα του φύκους έναντι των ελεύθερων ριζών. Επομένως, φαίνεται πως το φύκος παρουσιάζει

τόσο αντικαρκινική όσο και αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, είναι σημαντική περαιτέρω ανάλυση του πολυσακχαρίτη για να επιβεβαιωθεί η αντικαρκινική και η αντιοξειδωτική του ικανότητα και αν αυτό δεν ισχύει να αποσαφηνιστούν τα συστατικά του φύκου, που του προσδίδουν αυτές τις ιδιότητες.

Το φύκος *Cystoseira barbata* (IC50: 0.32 mg/ml) ήταν το τρίτο ισχυρότερο, όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, όπως και στα προηγούμενα φύκη, διαθέτει υψηλά επίπεδαθεικού πολυσακχαρίτη (Sellimi et al., 2014).

Ακολουθούν τα φύκη *Gracilaria sp* (IC50: 0.42 mg/ml) και *Gracilaria bursa pastoris* (IC50: 0.5 mg/ml), τα οποία ανήκουν στο γένος *Gracilaria*. Τα δύο φύκη είχαν παραπλήσιες τιμές IC50, που υποδηλώνει ότι ίσως οι ίδιες βιοδραστικές ουσίες των δύο φυκών ήταν υπεύθυνες για την παρατηρούμενη δράση.

Ακολουθεί το φύκος *Ulva rigida* (IC50: 0.6 mg/ml), το οποίο εκτός από αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει και αντικαρκινικές ιδιότητες (Salem. et al. 2011), υποδηλώνοντας ότι μπορεί να υπάρχουν βιοδραστικά συστατικά με ταυτόχρονη αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση.

Στη συνέχεια, τα φύκη *Cystoseira compressa* (IC50 = 0,6 mg/ml) το *Cystoseira amentacea* (IC50 = 0,8 mg/ml), τα οποία ανήκουν στο γένος *Cystoseira* (μαζί με το *Cystoseira barbata* IC50: 0.32 mg/ml) και δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στις τιμές IC50 και επομένως είναι πιθανό κοινές ουσίες του γένους να προσδίδουν στα φύκη την αντιοξειδωτική τους δράση.

Επιπλέον, το φύκος *Gracilaria gracilis* του γένους *Gracilaria* (μαζί με τα φύκη *Gracilaria sp* IC50: 0.42 mg/ml και *Gracilaria bursa pastoris* IC50: 0.5 mg/ml), τα οποία ομοίως δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές IC50.

Επιπρόσθετα, στο φύκος *Padina pavonica* (IC50 = 1,25 mg/ml). η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να οφείλεται σε φαινολικές ενώσεις, ενώ αντίθετα, η αντιοξειδωτική δράση στο *Sargassum vulgare* (IC50 = 0.7 mg/ml) μπορεί να οφείλεται σε φαινολικές ενώσεις ή/και άλλα μόρια όχι φαινολικής φύσης (Khaled et al., 2012). Για το φύκος *Colpomenia sinuosa* (IC50 ίσο με 0,95 mg/ml) βρέθηκε, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, αντικαρκινική δράση σε πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Monla et al., 2020).

Εν κατακλείδι, στην συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν για αντιοξειδωτική δράση έναντι ελεύθερων ριζών, εκχυλίσματα από τα είδη φυκών: *Ulva rigida*, *Gracilaria*

gracilis, *Colpomenia sinuosa*, *Codium fragile*, *Cystoseira barbata*, *Cystoseira amentacea*, *Cystoseira compressa*, *Sargasum vulgare*, *Padina pavonica*, *Hypnea musciformis*, *Gigartina teedei*, *Gracilaria sp*, *Gigartina pistillata*, *Gracilaria bursa pastoris*, *Ruppia maritima*. Αν και αυτά τα θαλάσσια είδη είναι ευρέως διαδεδομένα στην περιοχή της Μεσογείου, έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες μελέτες για να διερευνηθούν οι πολλά υποσχόμενες δυνατότητές τους, τόσο στον τομέα των τροφίμων όσο και στον τομέα της ιατρικής και στην αναζήτηση νέων φυσικών ανανεώσιμων πηγών φυτοθεραπευτικών ουσιών. Επομένως, κρίνεται σκόπιμο να γίνουν περαιτέρω μελέτες.

6. Βιβλιογραφία

- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- K. Shankar, H.M. Mehendale, in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, 2014
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 4.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- Li, Y. R., & Trush, M. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species*, 1(1). <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Pawan KumarMaurya (2014). Animal Biotechnology as a Tool to Understand and Fight Aging. *Animal Biotechnology*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00010-9>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90510-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90510-6)
- Dotan, Y. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.001>
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>

- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Stadtman, E. R. (2004). Role of Oxidant Species in Aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), 1105–1112. <https://doi.org/10.2174/0929867043365341>
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1), 55–99. <https://doi.org/10.1002/mas.20006>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS*, 4(2), 8.
- Jairam, V., Uchida, K., & Narayanaswami, V. (2012). Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., & Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1–2), 7–20. <https://doi.org/10.1080/10408399509527682>
- Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., & Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1111–1116. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.017>
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Antioxidants in Health and Disease*, 11. doi: 10.1136/jcp.54.3.176
- Rice-Evans, C. A., & Diplock, A. T. (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(1), 77–96. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90127-G](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90127-G)
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 248–254. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
- Halliwell, Butnariu M, Grozea I. (2001). Antioxidant (antiradical) compounds. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*. 2012;4(6):4-6
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>

- Perumalla VS., Hettiarachchy NS. (2011). Green tea and grape seed extracts potential applications in food safety and quality. *Food Research International*. 2011;44(4):827-839
- Pócsi, I., Prade, R. A., & Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 49, pp. 1–76). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6858–6862. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6858>
- Arredondo ML. (2016). Relationship between vitamin intake and total antioxidant capacity in elderly adults. *Universitas Scientiarum*. DOI:10.11144/Javeriana.SC21-2.rbvi
- Rahman K. (2007). Studies on free eadicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(2):219-236
- Walter, M., & Marchesan, E. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 371–377. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000200020>
- Liu. M., Hansen. E. P. and Lin. X., (2011). Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities. *Marine Drugs*, 9(7): 1273-1292.
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D. (199). Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *J. Agric. Food Chem*. 1999;47:2367–2373
- Sun HH, Paul VJ, Fenical W. Avrainvilleol (1983). A brominated diphenylmethane derivative with feeding deterrent properties from the tropical green alga *Avrainvillea longicaulis*. *Phytochemistry*. 1983;22:743–745
- Ji. K., et al., (2011). Genotoxicity of Several Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hydroxylated PBDEs, and Their Mechanisms of Toxicity. *Environmental Science and Technology*, 45(11): 5003-5008.
- A de Wit. C., (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46(5): 583-624.
- Chung HY, Ma WCJ, Ang PO, Kim JS, Chen F. (2003). Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *J. Agric. Food Chem*. 2003;51:2619–2624.
- Liu. H., et al., (2004). Isolation and Characterization of Polybrominated Diphenyl Ethers as Inhibitors of Microtubule Assembly from the Marine Sponge *Phyllospongia dendyi* Collected at Palau. *Journal of natural products*, 67(3): 472-474.
- Lindsay. S. B., et al., (1998). Isolation of 2-(3'-Bromo-4'-hydroxyphenol)ethanamine from the New Zealand Ascidian *Cnemidocarpa bicornuta*. *Journal of natural products*, 61(6): 857-858.

- Duan XJ, Li XM, Wang BG. Highly brominated mono- and bis-phenols from the marine red alga *Symphyclocladia latiuscula* with radical-scavenging activity. *J. Nat. Prod.* 2007;70:1210–1213
- Lee JH, Lee TK, Kang RS, Shin HJ, Lee HS. The in vitro antioxidant activities of the bromophenols from the red alga *Tichocarpus crinitus* and phenolic derivatives. *J. Korean Magn. Reson. Soc.* 2007;11:56–6
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr., F. J., & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142(3334)
- Kolsi RBA, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, Belghith K. Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea Nodosa* sulfated polysaccharide. *Carbohydr Polym.* 2016:511–22.
- Kolsi A. B. R., et al., (2017). In vitro biological properties and health benefits of a novel sulfated polysaccharide isolated from *Cymodocea nodosa*. *Lipids in Health and Disease*, 16(1): 252.
- Enerstvedt. K. K., et al., (2018). Characterization of Polyphenolic Content in the Aquatic Plants *Ruppia cirrhosa* and *Ruppia maritima* —A Source of Nutritional Natural Products. *Molecules*, 23(1): 16.
- Speisky, H., Shahidi, F., Costa de Camargo, A., & Fuentes, J. (2022). Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, Conservation or Enhancement of Their Antioxidant Properties. *Antioxidants*, 11(1), 133.
- Mohd Fauziee, N. A., Chang, L. S., Wan Mustapha, W. A., Md Nor, A. R., & Lim, S. J. (2021). Functional polysaccharides of fucoidan, laminaran and alginate from Malaysian brown seaweeds (*Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata* and *Padina boryana*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1135–1145.
- Khaled, N., Hiba, M., & Asma, C. (2012). Antioxidant and Antifungal activities of *Padina Pavonica* and *Sargassum Vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. 7.
- Salem. A. T. and Ibrahim. M. A., (2011). Anticancer activity of Egyptian marine alga *Ulva rigida*. *International Journal of Health Sciences*, 5: 6-8
- Sellimi, S., Kadri, N., Barragan-Montero, V., Laouer, H., Hajji, M., & Nasri, M. (2014). Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: Structural characteristics and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 281–288.

- L. G. Wade Jr., (2013), Organic Chemistry, Pearson; 8th edition.
- Burton E. Tropp, (2012), Principles Of Molecular Biology, Jones & Bartlett Learning.
- <https://www.algaebase.org/>
- <https://www.what-are-algae.com/>
- <https://www.lenntech.com/eutrophication-water-bodies/algae.htm>