

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο
“Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος”
του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

ΑΓΟΡΙΤΣΑ ΑΒΡΑΜΟΥΛΗ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ
ΚΑΙ ΒΟΣΤΡΥΧΩΝ ΣΤΑ ΦΥΛΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΤΟΥ DNA, *IN VITRO***



Λάρισα 2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7001/1
Ημερ. Εισ.: 09-09-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
547.632
ΑΒΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087198

Επίδραση Εκχυλισμάτων Στέμφυλων Και Βοστρύχων Σταφυλιών στην Οξειδωτική Βλάβη του DNA, *IN VITRO*

Επιβλέπων: Δημήτριος Κουρέτας

Τριμελής Επιτροπή:

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Δημήτριος Κομιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας

Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορας Φαρμακολογίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την κατανόηση σε ότι προέκυψε κατά την διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Χρύσα Σπανού για την επίβλεψη μου κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, την καθοδήγηση και την υπομονή, για την βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της συγγραφής της πτυχιακής εργασίας, για την προθυμία της να απαντά σε όλες τις απορίες μου καθώς και για τη συμβολή της στις νέες γνώσεις που αποκόμισα κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου, για την καλλιέργεια ενός ευχάριστου και ταυτόχρονα παραγωγικού κλίματος συνεργασίας.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	11
1.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	12
1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	16
1.3.1 Πολυφαινόλες	17
1.3.2 Φλαβονοειδή	18
1.3.2.1 Κατεχίνη - Επικατεχίνη	22
1.3.3 Φαινολικά οξέα	22
1.3.3.1 Γαλλικό οξύ	23
1.3.3.2 Καφεϊκό οξύ	24
1.3.3.3 Φερούλικό οξύ	25
1.3.4 Στυλβένια	26
1.3.5 Λιγνάνια	27
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	28
1.4.1 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών	28
1.4.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών	30
1.5 ΣΤΑΦΥΛΙΑ-ΣΤΕΜΦΥΛΑ- ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ	31
1.6 ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ	34
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	36
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 ΥΛΙΚΑ	37
2.1.1 Πλασμιδιακό DNA	37
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια	37
2.1.3 Εκχυλίσματα	38
2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ	38
2.2.1 Αρχή της μεθόδου	38
2.2.1.1 Επαγόμενη από H ₂ O ₂ και UV ακτινοβολία πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	40
2.2.1.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	40
2.2.2 Πειραματική διαδικασία	41
2.2.2.1 Επαγόμενη από H ₂ O ₂ και UV ακτινοβολία πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	41
2.2.2.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	42
2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ	44
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ, ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ.	45
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΑΡΗ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ	45
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55
6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	61

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1.1 : Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS.	13
Εικόνα 1.2 : Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών.	14
Εικόνα 1.3: Χημική δομή φλαβονοειδών.	19
Εικόνα 1.4: Βασική χημική δομή των πολυμερών των συμπυκνωμένων ταννινών.	20
Εικόνα 1.5: Βασική χημική δομή ανθοκυανιδίνης και της γλυκοσυλιωμένης ανθοκυανίνης.	21
Εικόνα 1.6 : Χημικές δομές της κατεχίνης και της επικατεχίνης.	22
Εικόνα 1.7: Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαιολικών οξέων.	23
Εικόνα 1.8 : Παράδειγμα χημικής δομής υδρολυμένης ταννίνης.	24
Εικόνα 1.9: Χημική δομή του καφεϊκού οξέος.	25
Εικόνα 1.10: Χημική δομή και σχηματισμός φερουλικού οξέος.	26
Εικόνα 1.11: Βασική χημική δομή στυλβενίων.	27
Εικόνα 1.12: Χημική δομή φυτικών λιγνανίων.	28
Εικόνα 1.13: Βότρυς σταφυλιού.	31
Εικόνα 1.14 : Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.	32
Εικόνα 2.1: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA.	39

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1.1: Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες.	17
Πίνακας 1.2: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, τα χαρακτηριστικά μέλη των ομάδων αυτών και τα τρόφιμα τα οποία αποτελούν σημαντικές διατροφικές πηγές τους.	21
Πίνακας 1.3: Τυπική (% κατά βάρος) σύσταση λευκών και κόκκινων κρασιών.	34
Πίνακας 2.1: Υδατικά εκχυλίσματα ποικιλιών σταφυλιών Σαντορίνης.	38
Πίνακας 2.2: Ποσότητες αντιδραστηρίων.	42
Πίνακας 2.3: Ποσότητες αντιδραστηρίων.	43
Πίνακας 3.1: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες OH [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.	46
Πίνακας 3.2: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.	47
Πίνακας 3.3: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες OH [•] πρόκληση θραυσμάτων στο DNA από το ασθενέστερο προς το ισχυρότερο.	49
Πίνακας 3.4: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.	50
Πίνακας 6.1: Σύσταση πολυφαινόλων εκχυλισμάτων σταφυλιών από κόκκινες και λευκές ποικιλίες.	61

Περιεχόμενα Γραφημάτων

Γράφημα 3.1: Σύγκριση όλων των υδατικών εκχυλισμάτων σταφυλιών Σαντορίνης που μελετήθηκαν συναρτήσει των ποσοστών αναστολής της δράσης των ριζών OH [•] και των IC ₅₀ τους.	46
Γράφημα 3.2: Σύγκριση όλων των υδατικών εκχυλισμάτων σταφυλιών Σαντορίνης που μελετήθηκαν συναρτήσει των ποσοστών αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•] και των IC ₅₀ τους.	47
Γράφημα 3.3: Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH [•] των δύο πιο δραστικών εκχυλισμάτων και του λιγότερου δραστικού.	48
Γράφημα 3.4: Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•] των δύο πιο δραστικών εκχυλισμάτων Σαντορίνης και του λιγότερου δραστικού.	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια τα σταφύλια και το κρασί έχουν κερδίσει γενικότερο ενδιαφέρον, για τις ευεργετικές τους ιδιότητες και τις βιολογικές δράσεις που τους αποδίδονται, κυρίως λόγω των πολυφαινόλων που περιέχουν. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι η αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων στέμφυλων και βοστρύχων σταφυλιών Σαντορίνης, μέσω αναστολής τοξικής δράσης οξειδωτικών παραγόντων στο DNA. Για την επίτευξη του στόχου, παρατηρήθηκε η επίδραση 10 εκχυλισμάτων των ποικιλιών του *Vitis Vinifera* var. Ασσύρτικου, Αθήρι, Μαυροτράγανου, Βοηδόματου και Λιαστά Μανδηλαριάς Σαντορίνης, στην επαγόμενη από ρίζες περόξυ (ROO^{\bullet}) και υδροξυλίου (OH^{\bullet}) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Η αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική, αντικατοπτρίζει κάποιον μηχανισμό αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξιγόνου δράσης. Οι ρίζες περόξυ (ROO^{\bullet}) και υδροξυλίου (OH^{\bullet}) παράχθηκαν από τη θερμική διάσπαση του 2,2'-Azobis 2-amidinopropane hydrochloride (AAPH) και τη φωτόλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας αντίστοιχα. Όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν εξαιρετική προστατευτική δράση απέναντι στη επαγόμενη από τις παραπάνω ρίζες βλάβη του DNA. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι της επαγόμενης τοξικής δράσης ριζών ROO^{\bullet} σε σχέση με την αντίστοιχη δράση των ριζών OH^{\bullet} υποδηλώνοντας και ένα διαφορετικό μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης των περιεχόμενων πολυφαινόλων τους. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν σημαντικές ενδείξεις για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων στέμφυλων και βοστρύχων Σαντορίνης.

ABSTRACT

Recently, grapes and wine have gained a lot of interest because they are considered to be significant chemopreventive, antioxidants agents. The antioxidant properties of grapes are linked to their content in polyphenols. In the present study, ten extracts of unique varieties of *Vitis Vinifera* L. family plants cultivated in Santorini (Asyrtiko, Athiri, Mayrotragano, Voidomato and sun dried Mandilaria) screened for their antioxidant and chemopreventive properties by the hydroxyl radical- and the peroxy radical- induced DNA strand scission assays. Hydroxyl (OH^\bullet) and peroxy (ROO^\bullet) were generated from ultraviolet (UV) photolysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) and thermal decomposition of 2,2'-Azobis 2-amidinopropane hydrochloride (AAPH) respectively. All of these fractions exerted significant protective activity against ROO^\bullet and OH^\bullet radical-induced DNA damage. This activity was more potent against ROO^\bullet radical-induced DNA damage than against that induced by OH^\bullet radicals. These results imply that the polyphenolic compounds identified in the fractions were responsible of the observed properties of extracts and indicate different mechanisms by which these phenolic compounds may act as chemopreventive agents.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

RSC: Radical scavenging capacity

AAPH: 2, 2'-Azobis (2-amidinopropanen hydrochloride)

ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου

H_2O_2 : Υπεροξειδίο του υδρογόνου

OH^\bullet : ρίζα υδροξυλίου

ROO^\bullet : περόξυ ρίζα

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σήμερα, η χημειοπροστασία θεωρείται εξαιρετικά ελπιδοφόρα για τη πρόληψη του καρκίνου. Η εξέλιξη των χημειοπροστατευτικών συστατικών προέρχονται κυρίως από καταγραφή ουσιών των τροφών (Surch, 2003; Kelloff et al., 2000). Για παράδειγμα, αρκετές επιδημιολογικές και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση τροφών όπως είναι τα φρούτα, τα λαχανικά και τα όσπρια, σχετίζεται με τη μείωση της εμφάνισης αρκετών τύπων καρκίνου (π.χ καρκίνος του στήθους, προστάτη, εντέρου και πνεύμονα) (Kelloff et al., 2000, Kris – Ethelton et al., 2002, Nerka et al., 1999).

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών οφείλεται κυρίως στην πληθώρα φυσικών προϊόντων που παράγονται από το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών και έχουν αντιοξειδωτική δράση.

Ο όρος ‘αντιοξειδωτικό’ είναι όρος που χρησιμοποιείται συχνά αν και είναι δύσκολο κανείς να τον ορίσει επακριβώς. Οι ερευνητές που ασχολούνται με την τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιούν τα αντιοξειδωτικά για την παρεμπόδιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία προκαλεί την τάγγιση των τροφών. Επίσης, τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των οργανικών εκθεμάτων σε μουσεία. Στη χημική βιομηχανία τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται στον έλεγχο αντιδράσεων πολυμερισμού για την παραγωγή ελαστικών, πλαστικών, βαφών καθώς και για την προστασία των καθαρών πλαστικών από την υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον, η καύση είναι μια διαδικασία στην οποία εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες, στη βιομηχανία καυσίμων γίνεται εκτεταμένη χρήση των αντιοξειδωτικών ώστε να σχεδιαστούν εξελιγμένα καύσιμα κίνησης και λάδια λίπανσης.

Όταν δραστικές μορφές των ελευθέρων ριζών παράγονται *in vivo*, έχουν ως αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση πληθώρας αντιοξειδωτικών που λειτουργούν ως αντίβαρο στη δράση τους. Η σχετική αξία των αντιοξειδωτικών εξαρτάται από το ποιες μορφές ελευθέρων ριζών δημιουργούνται σε κάθε ξεχωριστή περίπτωση, καθώς και ποιο βιολογικό σύστημα εξετάζεται.

Για την περιγραφή των επί μέρους εφαρμογών και την ενιαία από όλες τις επιστήμες χρήση της ονοματολογίας, υιοθετήθηκε ένας ευρύτερος ορισμός του αντιοξειδωτικού, ως εκείνο το συστατικό που όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με το εν δυνάμει οξειδωμένο υπόστρωμα, επιβραδύνει ή παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος.

Ο όρος που περιγράφει ένα «εν δυνάμει οξειδωμένο υπόστρωμα» (oxidizable substrate) περιλαμβάνει κάθε μόριο που απαντάται *in vivo* και μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για τις ελεύθερες ρίζες. Ο συγκεκριμένος όρος εμπεριέχει επίσης τη σημαντικότητα της βλάβης του μορίου στόχου αλλά και την πηγή των δραστικών ελευθέρων ριζών που χρησιμοποιούνται όταν η αντιοξειδωτική δράση μελετάται *in vitro*. Δεν υπάρχει η έννοια του καλύτερου αντιοξειδωτικού, απλά, διαφορετικά αντιοξειδωτικά απαιτούνται για την προστασία έναντι διαφορετικών βιομορίων *in vivo*.

Στους ζωντανούς οργανισμούς, τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και άλλων «δραστικών μορφών» ελέγχονται από ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας, η οποία ελαχιστοποιεί, αλλά σε πολλές περιπτώσεις δεν προλαμβάνει τελείως, την οξειδωτική βλάβη των βιομορίων. Όπως είναι προφανές σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η «οξειδωτική- αντιοξειδωτική» ισορροπία βαίνει προς όφελος των δραστικών μορφών έτσι ώστε η οξειδωτική βλάβη να αυξάνει (Halliwell, 2001).

1.1 Προσέγγιση των σταφυλιών ως αντιοξειδωτικά

Η ιστορία της καλλιέργειας των σταφυλιών και της παραγωγής του κρασιού είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιστορία του ανθρώπου. Δεν είναι γνωστό πότε ακριβώς οι άνθρωποι άρχισαν να παράγουν κρασί, ωστόσο ενδείξεις υπάρχουν ότι η ανακάλυψη της οινοποίησης, ή έστω η ανάπτυξή της, ξεκίνησε πριν 6000 χρόνια σε περιοχές νότια του Καυκάσου. Τα σταφύλια είναι φρούτα της οικογένειας *Vitaceae*, του γένους *Vitis*. Συγκεκριμένα η ποικιλία σταφυλιών που πιστεύεται ότι ήταν η ποικιλία από την οποία ξεκίνησε η παραγωγή του κρασιού είναι η *Vitis Vinifera* η οποία από τις περιοχές νότια του Καυκάσου διαδόθηκε στην Μεσοποταμία, την Παλαιστίνη, την Αίγυπτο και σταδιακά κατέκλισε όλη την Μεσόγειο. Η ποικιλία αυτή θεωρείται μία από τις καλύτερες για την παραγωγή κρασιού στην Ευρώπη. (Soleas et al., 1997; Van de Wiel et al., 2001).

Τα τελευταία χρόνια, τα εκχυλίσματα σταφυλιών και το κρασί έγιναν το επίκεντρο αρκετών μελετών που αφορούσαν τις ευεργετικές τους ιδιότητες στην υγεία (Torres et al, 2002; Renaud et Lorgetil, 1992). Για παράδειγμα, ένας σημαντικός αριθμός *in vivo* και *in vitro* μελετών έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιών εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυτταροκαλλιιεργειών, π.χ στήθους και πνεύμονα, (Ye et al., 1999) όπως και αναστολή ανάπτυξης όγκου, σε ποντίκια μετά από εμφύτευση τους ανθρώπινου καρκινικού μοσχεύματος (Agarwal et al., 2000). Για αυτή τη χημειοπροστασία

τους, έχουν προταθεί διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί όπως η επαγωγή της απόπτωσης μέσω ρύθμισης των διακυτταρικών σηματοδοτικών μορίων και των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (Agarwal et al., 2000), η αναστολή της δράσης των ενζύμων που παίζουν βασικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως η τοποισομεράση I (Stagos et al., 2005) και η δικαρβοξυλάση της ορνιθίνης (Bomser et al., 2000), και τέλος η αναστολή της αγγειογέννησης (Agarwal et al., 2004). Παρόλα αυτά, αυτοί οι μηχανισμοί προστασίας δεν έχουν ακόμη πλήρως κατανοηθεί.

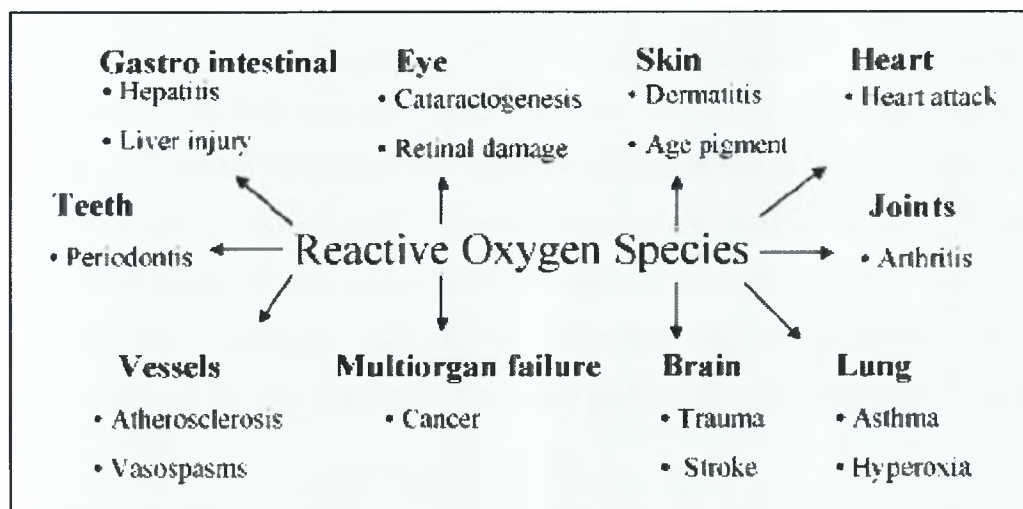
Πιστεύεται ότι η επαγωγή βλάβης στο DNA, και ειδικά η οξειδωτική βλάβη, είναι ένα κρίσιμο βήμα για την εξέλιξη του καρκίνου (Wiseman et al., 1995) και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, π.χ Parkinson και Alzheimer, (McCord., 1993) αλλά και η πρόωρη γήρανση (Finkel et Holbrook, 2000). Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιών είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (Murthy et al., 2002) και παρεμποδίζουν τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (free radical scavengers) (Faucouneau et al., 1997) και ότι είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της επαγόμενης από ρίζες ROS μεταλλαξιγέννησης. (Stagos et al., 2006; Stagos et al., 2005)

1.2 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται τα μόρια τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια τα οποία μπορούν να παραχθούν από διάφορες βιολογικές διεργασίες ακόμη και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Από χημικής άποψης οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ασταθή και ταυτόχρονα εξαιρετικά ενεργά. Το πιο απλό μόριο των ελευθέρων ριζών αποτελεί το άτομο του υδρογόνου με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. Επιπλέον, χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^{\bullet}), του υδροξυλίου (OH^{\bullet}), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\bullet}), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}), του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\bullet}), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\bullet}) και οι θειούχες ρίζες (RS^{\bullet}) (Halliwell, 2001). Η πολύ υψηλή δραστικότητα των ελευθέρων ριζών μπορεί να αποδοθεί στα ασύζευκτα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας.

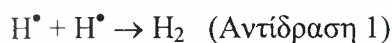
Η σημαντικότερη βιολογικά τάξη ελευθέρων ριζών προέρχεται από το οξυγόνο και αναφέρονται ως ROS (Reactive Oxygen Species) (Valko et al., 2004). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) χωρίζονται στις οξυγονοκεντρικές ρίζες, στις οποίες ανήκουν η ρίζα του

σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) (superoxide radical), του υδροξυλίου (OH^{\bullet}) (hydroxyl radical), και οι ρίζες περοξυλίου (ROO^{\bullet}) (peroxyl radicals) και στις λεγόμενες μη ρίζες, οι οποίες έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο και στις οποίες ανήκουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η μονήρης κατάσταση του οξυγόνου (1O_2). Άλλες ελεύθερες ρίζες είναι κάποιες δραστικές μορφές αζώτου όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\bullet}) και το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\bullet}) (Halliwell, 2001). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά την λιπιδική οξείδωση, από ακτινοβολία, από φλεγμονή, από κάπνισμα και από μολυσμένη ατμόσφαιρα. Στην Εικόνα 1.1 παρατίθενται μερικές κλινικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Lee et al., 2003).



Εικόνα 1.1 : Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν μεταξύ τους αλλά και με βιολογικά ενεργά μακρομόρια όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οι ελεύθερες ρίζες οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας, η οποία συνήθως είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με τα αντιδρώντα. Παρόλα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις, η παραγομένη ένωση είναι πιο δραστική. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της πρώτης περίπτωσης αποτελεί η αντίδραση ανάμεσα σε δύο άτομα υδρογόνου, που οδηγούν στο σχηματισμό του διατομικού υδρογόνου (Αντίδραση 1), ενώ για τη δεύτερη περίπτωση η αντίδραση της ρίζας του σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$ με τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου NO^{\bullet} που οδηγούν στο σχηματισμό του περοξυνιτρίτη $ONOO^{\bullet}$ (Αντίδραση 2), ο οποίος είναι δραστικότερος των δύο ελευθέρων ριζών που οδήγησαν στην παραγωγή του.

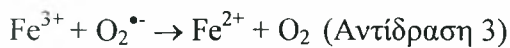


Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με βιολογικά παραγόμενα μόρια, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν νέες ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσουν εκ νέου και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η αλυσιδωτή αυτή διαδικασία μπορεί να επαναλαμβάνεται καταλήγοντας σε καταστροφικές συνέπειες για τον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατό να αντιδράσουν με πρωτεΐνες και να τις μετουσιώσουν. Επιπλέον, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA οδηγώντας στη δημιουργία μεταλλάξεων. Τέλος, είναι δυνατό να αντιδράσουν με τα λιπίδια οξειδώνοντας τα καταστρέφοντας με αυτό τον τρόπο τη δομή των μεμβρανών. Χαρακτηριστική είναι η δράση της πολύ δραστικής ρίζας του υδροξυλίου OH^{\bullet} , η οποία αντιδρά άμεσα με μόρια που βρίσκονται στην περιοχή που παράγεται. Το συγκεκριμένο μόριο συνήθως παράγεται όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία διασπά τους δεσμούς O-H του νερού, που είναι το πιο άφθονο συστατικό των κυττάρων. Η διάσπαση αυτή οδηγεί στην παραγωγή των ριζών OH^{\bullet} και H^{\bullet} . Στην Εικόνα 1.2 φαίνονται οι αντιδράσεις με τις οποίες έστω και μία ρίζα OH^{\bullet} αντιδρώντας με υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβανομένων και των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων, μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωσή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με συνέπεια ακόμη και το θάνατο (Halliwell, 2001, Mylonas et Kouretas, 1999).

$-CH + OH^{\bullet} \rightarrow -C^{\bullet} + H_2O$	$LH + R^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + H_2O$
$-C^{\bullet} + O_2 \rightarrow -C-O-O^{\bullet}$ peroxyl radical	$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow L-O-O^{\bullet}$
$-C-O-O^{\bullet} + -CH \rightarrow -C-O-OH + -C^{\bullet}$	$L-O-O^{\bullet} + LH \rightarrow L-O-OH + L^{\bullet}$ Lipid hydroperoxide
	$L-O-OH \rightarrow L-O-O^{\bullet}, LO^{\bullet}, \text{ αλδεύδες}$

Εικόνα 1.2 : Αντιδράσεις με τις οποίες έστω και μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή νέων ριζών και την έναρξη της αλυσιδωτής παραγωγής και άλλων ριζών, οδηγώντας τελικά σε καταστροφή των κυττάρων.

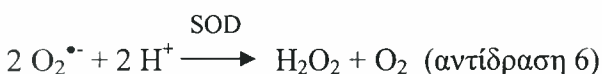
Οι ρίζες υδροξυλίου OH^{\bullet} μπορούν επίσης να παραχθούν από τις ρίζες σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$ και υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (Αντιδράσεις 3,4,5) και της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση 4) αντίστοιχα, παρουσία μετάλλων ιόντων σιδήρου (Fe) ή χαλκού (Cu) (Halliwell, 2001; Mylonas et Kouretas, 1999).



Εκτός από τις ρίζες OH^{\bullet} άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$, το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 , η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου NO^{\bullet} οι οποίες παράγονται με διάφορους τρόπους μέσα στον οργανισμό, και παρότι η δράση τους μπορεί να είναι καταστροφική, ωστόσο, η παραγωγή τους αποτελεί τμήμα ορισμένων φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού.

Η ρίζα του σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$, η οποία είναι ένα μόριο O_2 που έχει δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα, μπορεί να παραχθεί από τη «διαρροή» ηλεκτρονίων από τους μεταφορείς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας, και μεταφορά τους κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο. Μπορεί επίσης να παραχθεί από την δράση πολλών ενζύμων όπως οξειδάσες διάφορων αμινοξέων, οξειδάση της ξανθίνης και άλλα ένζυμα. Το $\text{O}_2^{\bullet-}$ έχει την ιδιότητα να προκαλεί βλάβες αντιδρώντας όπως ήδη αναφέρθηκε με διάφορα μόρια μέσα στον οργανισμό. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η ρίζα του υπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$ παράγεται από τα φαγοκύτταρα με σκοπό την καταστροφή βακτηρίων που έχουν εισέλθει στον οργανισμό. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι μικρές ποσότητες των ριζών αυτών, που εντοπίζονται εξωκυτταρικά, παράγονται ως διακυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλά κύτταρα (Torres et al., 1998).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) παράγεται στον οργανισμό όταν έχουν παραχθεί πολλές ρίζες υπεροξειδίου μέσω μιας αντίδρασης (Αντίδραση 6) που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).



Το H_2O_2 έχει επιβλαβή δράση συμμετέχοντας στην αντίδραση Fenton (Αντίδραση 4) μέσω της οποίας οδηγεί στην παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών OH^{\bullet} . Ωστόσο μπορεί να έχει ευεργετικές δράσεις αφού χρησιμοποιείται από το ένζυμο θυρεοειδική δισμουτάση για την σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών και μερικές φορές δρα σαν διακυτταρικό σηματοδοτικό μόριο.

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου NO^{\bullet} , το οποίο παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη, μπορεί μαζί με την ρίζα του σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$ να συμβάλουν στον σχηματισμό του περοξυνιτρίτη (Αντίδραση 1) που είναι ιδιαίτερα επιβλαβές μόριο. Ωστόσο, είναι από τα πιο διαδεδομένα σηματοδοτικά μόρια και συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, θεωρείται ένας από τους παράγοντες που ρυθμίζει τη χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων, την αρτηριακή πίεση, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αγγειογένεση. Επιπλέον είναι ένας από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές των νευρικών συνάψεων και παράγεται από τα μακροφάγα με σκοπό την εξόντωση μικροοργανισμών (Halliwell, 2001, Fang et al., 2002). Με τα μέχρι σήμερα επιστημονικά δεδομένα η διπλή υπόσταση των ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς ενισχύεται.

1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Όπως ήδη ειπώθηκε, ως αντιοξειδωτικό ορίζεται η ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις επιβραδύνει ή/και παρεμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell, 2001). Η αντιοξειδωτική δράση τους στα βιολογικά συστήματα έγκειται είτε στο ότι εμποδίζουν άμεσα την οξείδωση των ευαίσθητων μακρομορίων από τις ελεύθερες ρίζες είτε περιορίζουν το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (Scalbert et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά είναι δυνατό να προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Halliwell, 2001).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και στους μη ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν 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 (GSHPX), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Οι αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 1.1 (Blokina et al., 2003).

Στους μη ενζυμικούς ανήκουν κάποιες πρωτεΐνες, βιταμίνες, λιπίδια, μέταλλα και ουσίες όπως οι πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι διάφορες πολυφαινόλες στηρίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες

λειτουργούν σαν δέκτες ηλεκτρονίων για να σχηματίσουν σταθερές φαινοξυλικές ρίζες, σταματώντας με αυτό τον τρόπο τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδωσης (Scalbert et al., 2005). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης των πολυφαινόλων περιλαμβάνουν και την ικανότητα τους να δρουν σαν δότες υδρογόνου και να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα όπως ο Fe, ο οποίος δρα ως συμπαράγοντας στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών.

Πίνακας 1.1: Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες.

Ένζυμο	Αντίδραση που καταλύει
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	$2 O_2^{\bullet -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPX)	$GSH^1 + R^{\bullet} \rightarrow GSSG + R$
Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης	$NADPH + GSSG^2 \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$
Καταλάση	$2 H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + H_2O$

¹GSH: γλουταθειόνη

²GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης

1.3.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύπλοκη και μεγάλη ομάδα ενώσεων που απαντώνται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, στα φρούτα στα λαχανικά και κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί. Μάλιστα, τα συστατικά αυτά είναι υπεύθυνα για το χρώμα των οίνων, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών (στυφάδα, τραχύτητα) αυτών, προσφέρουν στους οίνους αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή προστασία και παίζουν αποφασιστικό ρόλο στη παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές επεξεργασίες τους (Σουφλερός, 2000). Ως τώρα, έχουν αναγνωριστεί χιλιάδες τέτοιων ενώσεων σε πολλά ανώτερα φυτά, ενώ εκατοντάδες από αυτές έχουν αναγνωριστεί στα εδάδιμα φυτά.

Το κοινό χαρακτηριστικό των πολυφαινόλων είναι η ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζοϊκού) δακτυλίου και μίας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Αυτά τα μόρια είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα. Είναι υπεύθυνα επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (C.Manach et

al., 2004). 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. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης, 1994).

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια, και τα λιγνάνια.

1.3.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις ευρέως διαδεδομένες σε όλα τα αγγειώδη φυτά και είναι υπεύθυνα για το χρώμα των λουλουδιών. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή είναι σημαντικά για την φυσιολογική ανάπτυξη, επέκταση και άμυνα του φυτού. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με ένα ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο που αποτελείται από τρεις άνθρακες (C6-C3-C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Οι υδροξυλικές ομάδες βρίσκονται συνήθως στις θέσεις 5, 7, 4', χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να βρεθούν και σε άλλες θέσεις.

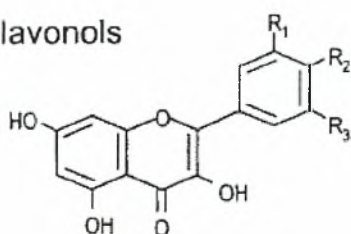
Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και προανθοκυανιδίνες ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου (Εικόνα 1.3) (Di Carlo et al., 1999).

Ένα από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στις τροφές είναι οι φλαβονόλες με περισσότερο συνηθισμένες τις κερκετίνη, καιμπερόλη και μυρικετίνη. Οι φλαβανόνες βρίσκονται συνήθως στα εσπεριδοειδή φρούτα και οι φλαβόνες στο σέλινο, ενώ οι κατεχίνες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβανόνων, φλαβανόλων βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και το μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί. Οι ανθοκυανίνες

βρίσκονται στις φράουλες και σε άλλα σαρκώδη φρούτα. Τέλος οι ισοφλαβόνες όπως οι γενιστεΐνη και ντενζεΐνη βρίσκονται στα όσπρια και κυρίως στη σόγια (Di Carlo et al., 1999).

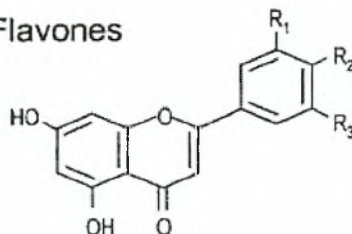
Από τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή ακόμη, είναι τα ισοφλαβονοειδή. Χωρίζονται σε 5 κατηγορίες στις ισοφλαβόνες (isoflavones), ισοφλαβάνες (isoflavanes), ισοφλαβανόνες (isoflavanones), κουμεστάνες (coumestanes), πτεροκαρπάνες (pterocarpanes). Εμφανίζουν αρκετά οφέλη για την υγεία αφού παρουσιάζουν προστατευτική δράση ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία και η καρδιακή θρόμβωση καθώς και ενάντια στην οστεοπόρωση και στο κλιμακτηριακό σύνδρομο (Watanabe et al., 2002).

Flavonols



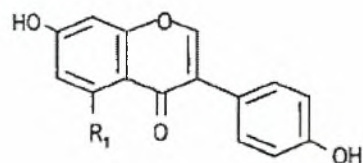
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$: Kaempferol
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Quercetin
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Myricetin

Flavones



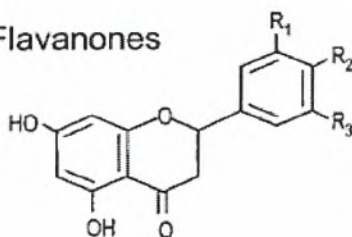
$R_1 = H; R_2 = OH$: Apigenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Luteolin

Isoflavones



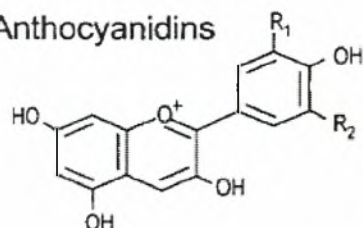
$R_1 = H$: Daidzein
 $R_1 = OH$: Genistein

Flavanones



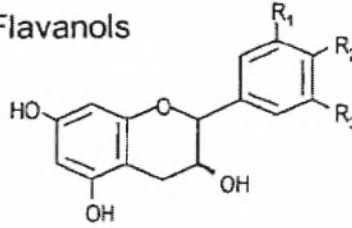
$R_1 = H; R_2 = OH$: Naringenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Eriodictyol
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Hesperetin

Anthocyanidins



$R_1 = R_2 = H$: Pelargonidin
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Cyanidin
 $R_1 = R_2 = OH$: Delphinidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidin
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Malvidin

Flavanols



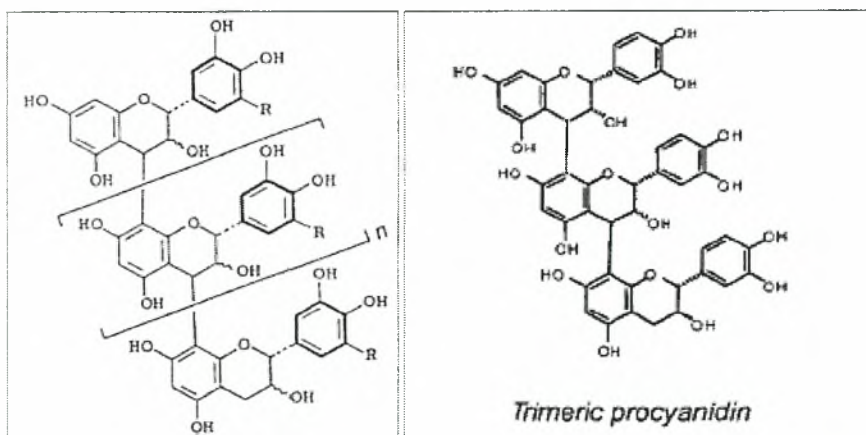
$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Catechins
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallocatechin

Εικόνα 1.3: Χημική δομή φλαβονοειδών

Οι ισοφλαβόνες ανήκουν στα φυτοοιστρογόνα και εμφανίζουν οιστρογονική, αντιοιστρογονική, αντικαρκινική, αντιϊκή, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δράση (Mazur et al., 1998).

Τα σταφύλια και τα προϊόντα των σταφυλιών αποτελούν σημαντική πηγή φλαβονοειδών, τα οποία προέρχονται από την φλούδα, τους σπόρους, και τους βλαστούς των φρούτων. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες προέρχονται κυρίως από τις φλούδες, ενώ οι φλαβανόλες από τους σπόρους και τους βλαστούς των σταφυλιών. Στα κόκκινα κρασιά τα φλαβονοειδή αποτελούν >85% της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες ($\geq 1,000\text{mg/L}$) ενώ στα λευκά κρασιά αποτελούν <20% της περιεκτικότητας ($\leq 50\text{mg/L}$) (Soleas et al., 1997). Η περιεκτικότητά τους στις κύριες διατροφικές πηγές τους φαίνονται στον Πίνακα 1.2.

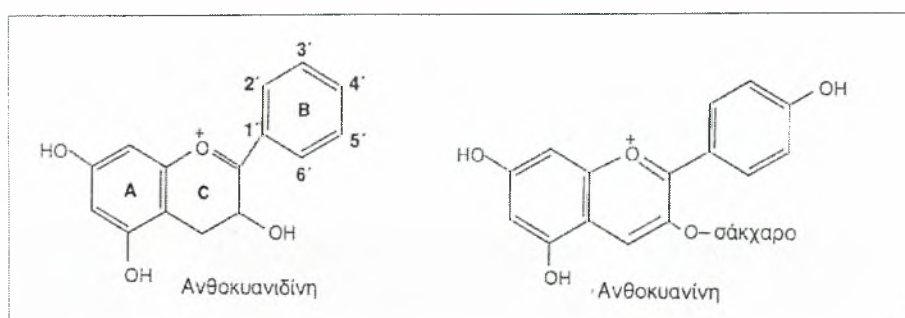
Από τα φλαβονοειδή που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα σταφύλια, στο κρασί και στο τσάι είναι οι φλαβανόλες, οι οποίες βρίσκονται τόσο στην μονομερή μορφή τους, με πιο αντιπροσωπευτικές την κατεχίνη και την επικατεχίνη όσο και στην πολυμερή μορφή τους τις προανθοκυανιδίνες. Οι προανθοκυανιδίνες ονομάζονται και συμπυκνωμένες ταννίνες που είναι μια ετερογενής ως προς την χημική δομή και το μοριακό βάρος ομάδα ενώσεων, που αποτελείται από διμερή, ολιγομερή, πολυμερή κατεχίνης (Εικόνα 1.4 αριστερά) που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς ανάμεσα στον άνθρακα C4 και C8 (ή C6) των ενώσεων (Εικόνα 1.4 δεξιά). Ονομάζονται προανθοκυανιδίνες γιατί κατεργαζόμενες με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες. Ο ακριβής μηχανισμός πολυμερισμού δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, πιστεύεται όμως ότι πραγματοποιείται ως αυτόματη συμπύκνωση.



Εικόνα 1.4: Βασική χημική δομή των πολυμερών των συμπυκνωμένων ταννινών, προανθοκυανιδινών (αριστερά). Παράδειγμα χημικής δομής μιας τριμερούς προανθοκυανιδίνης(δεξιά).

Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν οι φλαβονόλες είναι ότι, σε αντίθεση με τα άλλα φλαβονοειδή δεν βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένες μορφές στα τρόφιμα (Manach et al., 2004).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την γλυκοσυλιωμένη μορφή των ανθοκυανιδινών (Εικόνα 1.5). Επειδή οι ανθοκυανιδίνες απουσία του σακχάρου είναι ασταθή μόρια, οι πολυφαινόλες αυτές βρίσκονται στην γλυκοσυλιωμένη τους μορφή στα φρούτα που είναι οι ανθοκυανίνες. Ανήκουν στα χρωμοφόρα φλαβονοειδή και είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, μπλε, μοβ χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Βρίσκονται κυρίως στα κόκκινα φρούτα και στο κόκκινο κρασί. Η συγκέντρωσή τους στα λευκά σταφύλια και στο λευκό κρασί είναι πολύ μικρή. Γενικά στο κρασί περιέχονται $\approx 200-350\text{mg}$ ανθοκυανίνες (Manach et al., 2004)



Εικόνα 1.5: Βασική χημική δομή ανθοκυανιδίνης και της γλυκοσυλιωμένης ανθοκυανίνης.

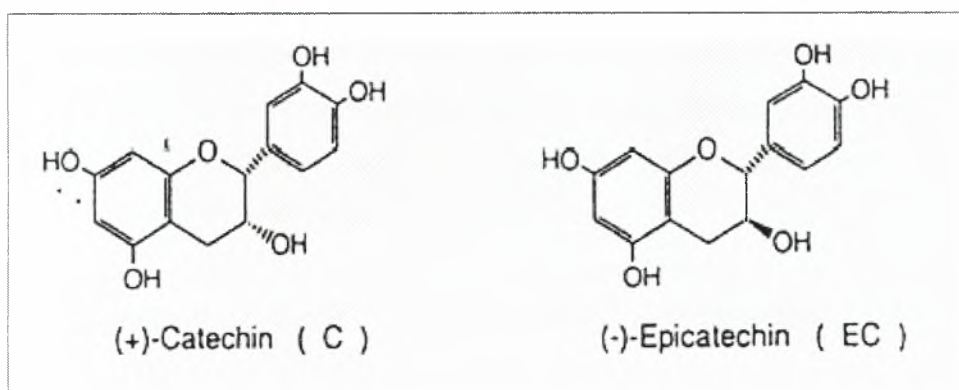
Πίνακας 1.2: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, τα χαρακτηριστικά μέλη των ομάδων αυτών και τα τρόφιμα τα οποία αποτελούν σημαντικές διατροφικές πηγές τους.

Ομάδα	Χαρακτηριστικές	
	πολυφαινόλες	Κύριες διατροφικές πηγές
Φλαβονοειδών		
Φλαβονόλες	Κερκετίνη, Ρουτίνη, Μυρικετίνη	κρεμμύδια, σταφύλια, τσάι, μαρούλι, κεράσια, βατόμουρα, μπρόκολα, μήλα, ντομάτες
Φλαβόνες	Λουτεΐνη, Απιγενίνη	Κίτρα
Ισοφλαβόνες	Γενιστεΐνη	όσπρια, σόγια
Φλαβανόνες	Ναριγκίνη, Ταξιφολίνη	ντομάτες, μέντα, κίτρα, πορτοκάλια
Φλαβονόλες	Κατεχίνη, Επικατεχίνη	σταφύλια, τσάι, σοκολάτα
Ανθοκυανίνες	Κυανιδίνη, Μαλβιδίνη	σταφύλια, κεράσια, βατόμουρα, τσάι, φράουλες

1.3.2.1 Κατεχίνη - Επικατεχίνη

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών, τις φλαβανόλες (Εικόνα 1.3). Έχουν την ίδια χημική δομή και αποτελούν δύο ισομορφές του ίδιου μορίου με την κατεχίνη να αποτελεί την *cis*-ισομορφή και την επικατεχίνη την *trans*-ισομορφή (Εικόνα 1.6). Βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε πολλά φρούτα, στα σταφύλια, στο κρασί, στη σοκολάτα και ιδιαίτερα στο τσάι τόσο στην μονομερή μορφή τους όσο και στην πολυμερή μορφή τους καθώς και συνδεδεμένες με γαλλικό οξύ, γνωστές ως γαλλοκατεχίνες (EG, ECG, EGCG) (Mannach et al., 2004).

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση επιδρώντας με διάφορους τρόπους στα τρία βασικά στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (initiation, promotion, progresion) (Stoner et Mukhtar., 1995). Επιπλέον παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση δεσμεύοντας διάφορες ελεύθερες ρίζες και δεσμεύοντας χηλικά μέταλλα (χαλκός, σίδηρος). *In vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι μπορούν να δεσμεύουν ρίζες υδροξυλίου OH^\bullet , περοξυλίου ROO^\bullet , σουπεροξειδίου O_2^\bullet , οξειδίου του αζώτου NO^\bullet , του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) και του περοξυνιτρίτη ONOO^- (Yilmaz et Toledo., 2004) με την επικατεχίνη να είναι πιο αποτελεσματικός δεσμευτής από την κατεχίνη (Geetha et al., 2004)



Εικόνα 1.6 : Χημικές δομές της κατεχίνης και της επικατεχίνης. Οι δύο αυτές ενώσεις είναι στην ουσία χημικά ίδιες, στο μόνο που διαφέρουν είναι η θέση της 3-OH στον χώρο.

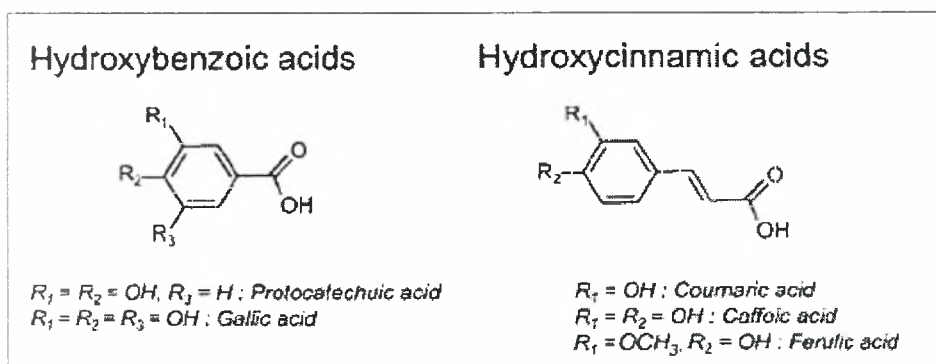
1.3.3 Φαινολικά οξέα

Ενώσεις απλούστερες στην δομή από τα φλαβονοειδή είναι τα φαινολικά οξέα τα οποία αποτελούνται από έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο. Διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6-C1) και στα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) τα οποία είναι παράγωγα του

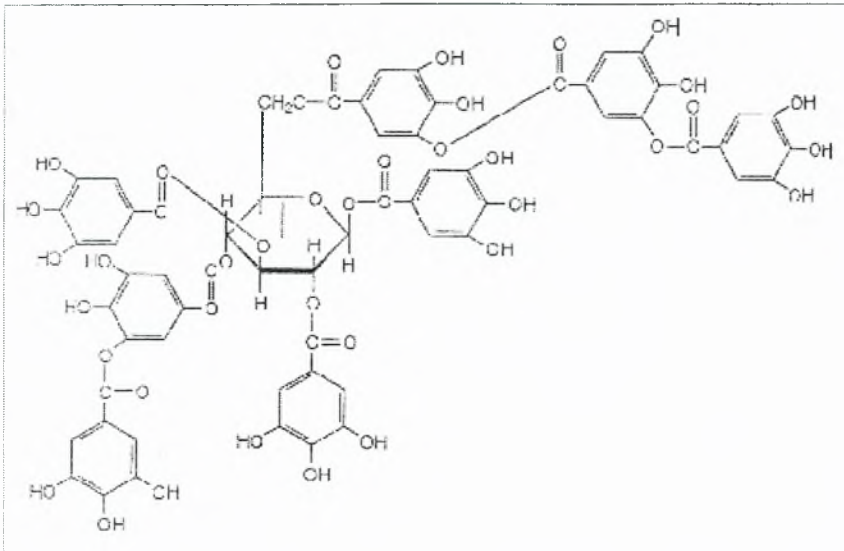
βενζοϊκού και του κινναμικού οξέως αντίστοιχα (Εικόνα 1.7). Στα σταφύλια, τα φαινολικά οξέα, βρίσκονται στα κενοτόπια των κυττάρων τους ενώ απελευθερώνονται και κατά το στάδιο πίεσης των σταφυλιών και την παραγωγή του κρασιού. Το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το ελλαγικό οξύ είναι από τους πιο χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους των υδροξυβενζοϊκών οξέων που βρίσκονται στα σταφύλια ενώ των υδροξυκινναμικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ.

1.3.3.1 Γαλλικό οξύ

Τα παράγωγα των υδροξυβενζοϊκών οξέων, και ιδιαίτερα το γαλλικό οξύ και το ελλαγικό οξύ, βρίσκονται στα τρόφιμα αποτελώντας τμήματα μιας άλλης κατηγορίας ταννινών, τις υδρολυόμενες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι και αυτές μία ετερογενής ομάδα πολυμερών ενώσεων, που περιέχουν ένα σάκχαρο και άφθονα μόρια γαλλικού οξέος. Τα μόρια του γαλλικού οξέος, στο μόριο της υδρολυόμενης ταννίνης, συνδέονται με ποικίλους τρόπους. Το σάκχαρο είναι συνήθως γλυκόζη χωρίς όμως να αποκλείεται η παρουσία κάποιου άλλου σακχάρου (Εικόνα 1.8). Τα μόρια των υδατοδιαλυτών ταννινών είναι μικρότερα από αυτά των συμπυκνωμένων ταννινών και σε όξινες συνθήκες διαχωρίζονται πολύ εύκολα σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα. Αυτό συμβαίνει γιατί το χαμηλό pH μπορεί και εξασθενεί τον δεσμό ανάμεσα στο υδρογόνο και το οξυγόνο των συνδεδεμένων φαινολών στις υδρολυόμενες ταννίνες, ενώ στις συμπυκνωμένες ταννίνες οι δεσμοί είναι ομοιοπολικοί και είναι σταθεροί σε αυτές τις συνθήκες. Τα παράγωγα των υδροξυβενζοϊκών οξέων δεν βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες σε εδώδιμα φυτά (Soleas et al., 1997; Manach et al., 2004).



Εικόνα 1.7: Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων, υδροξυβενζοϊκά – υδροξυκινναμικά οξέα.



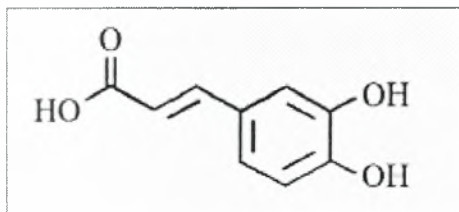
Εικόνα 1.8 : Παράδειγμα χημικής δομής μιας υδρολυμένης ταννίνης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και 8 μόρια γαλλικού οξέος.

1.3.3.2 Καφεϊκό οξύ

Το καφεϊκό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδροξυκιναμικών οξέων (C6-C3) (Εικόνα 1.7), συγκεκριμένα είναι το 3,4 διυδροξυκιναμικό οξύ και παράγεται από το π-κουμαρικό οξύ με την προσθήκη μιας ακόμη υδροξυλομάδας στον αρωματικό του δακτύλιο (Εικόνα 1.9). Το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα (φρούτα, λαχανικά, κρασί, ελαιόλαδο) είτε στην ελεύθερη μορφή του είτε στην εστεροποιημένη του μορφή με σάκχαρα, οργανικά οξέα ή διάφορες αλκοόλες. Είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ που υπάρχει στα τρόφιμα και αντιπροσωπεύει το 75-100% της συνολικής περιεκτικότητας των φρούτων σε υδροξυκιναμικά οξέα. Στα φρούτα βρίσκεται σε όλα τα μέρη του φρούτου, με μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις να συναντώνται στα εξωτερικά μέρη των ώριμων φρούτων (Mannach et al., 2004).

Στο καφεϊκό οξύ έχουν αποδοθεί διάφορες βιολογικές δράσεις οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι ότι έχει σημαντική αντιοξειδωτική, προ-οξειδωτική δράση και αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Επιπλέον θεωρείται ότι το καφεϊκό οξύ και οι εστεροποιημένες μορφές του παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση, δεσμεύοντας ρίζες NO^\bullet και ρυθμίζοντας την έκφραση διάφορων μεταγωγέων της φλεγμονής (Da Cunha et al., 2004) καθώς και αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την δράση διάφορων ενζύμων όπως της τοποϊσομεράσης I (Stagos et al., 2005).

Η αντιοξειδωτική του ικανότητα οφείλεται στην 3,4 διυδροξύ δομή του (Εικόνα 1.9) η οποία του προσδίδει σημαντική ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans et al., 1996). Το καφεϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι δεσμεύει πολλά είδη ελευθέρων ριζών όπως ρίζες υδροξυλίου HO^\bullet , σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$, περοξυνιτρίτη ONOO^- , καθώς και μεταλλαξιγόνες ενώσεις όπως νιτροζαμίνες (Da Cunha et al., 2004).

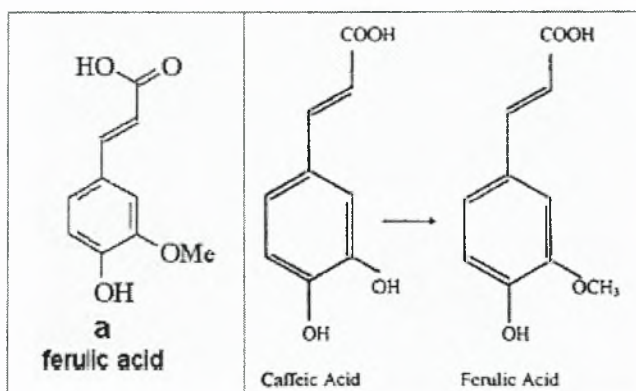


Εικόνα 1.9: Χημική δομή του καφεϊκού οξέος

1.3.3.3 Φερουλικό οξύ

Το φερουλικό οξύ (Εικόνα 1.10 αριστερά) είναι το δεύτερο σημαντικό φαινολικό οξύ που ανήκει στην κατηγορία των υδροξυκιναμικών οξέων. Έχει την ίδια δομή με το καφεϊκό οξύ, με την διαφορά ότι στο φερουλικό οξύ η μία υδροξυλομάδα είναι υποκατεστημένη με μία μεθυλομάδα. Αυτό συμβαίνει γιατί το φερουλικό οξύ παράγεται από την μεθυλίωση μιας υδροξυλομάδας του καφεϊκού οξέος (Εικόνα 1.10 δεξιά). Είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ που βρίσκεται στους κόκκους των δημητριακών απαρτίζοντας το 90% της περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες καθώς επίσης και στα σταφύλια, στα αχλάδια και σε διάφορα άλλα φρούτα (Mannach et al., 2004).

Το φερουλικό οξύ παρουσιάζει σημαντική ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες κυρίως σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$, υδροξυλίου OH^\bullet και μονοξειδίου του αζώτου NO^\bullet , ωστόσο η αντιοξειδωτική του ικανότητα είναι μικρότερη από αυτή του καφεϊκού οξέος. Επιπλέον δεν παρουσιάζει ικανότητα χηλικής δέσμευσης ιόντων μετάλλων χαλκού και σιδήρου όπως το καφεϊκό οξύ (Psotova et al., 2003).

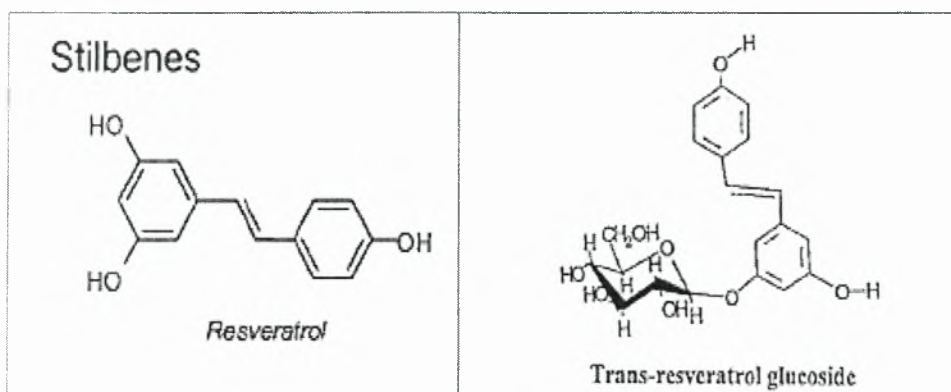


Εικόνα 1.10: Χημική δομή φερουλικού οξέος (αριστερά). Σχηματισμός φερουλικού οξέος από το καφεϊκό οξύ (δεξιά).

1.3.4 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι μία ακόμη ομάδα φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών. Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι αποτελούνται από δύο φαινυλικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου (Yang et al., 2001). Η ρεσβερατρόλη (resveratrol) είναι το κυριότερο μέλος της ομάδας των στιλβενίων και βρίσκεται συχνότερα στα σαρκώδη φρούτα είτε σε ελεύθερη μορφή είτε με τη μορφή του γλυκοσιδίου (Εικόνα 1.11). Έχει παρατηρηθεί ότι έχει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως αναστολή του σχηματισμού ελεύθερων ριζών και αναστολή της κυκλοξυγενάσης 1. Εμφανίζει επίσης αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, ενώ αναστέλλει την βιοενεργοποίηση των καρκινογόνων και επάγει τα μεταβολικά ένζυμα της φάσης II. Τέλος εμφανίζει οιστρογονική δράση και μπορεί να λειτουργήσει σαν ανοσοκατασταλτικός και ανοσοπροαγωγικός παράγοντας (Nishenametla et al., 2006).

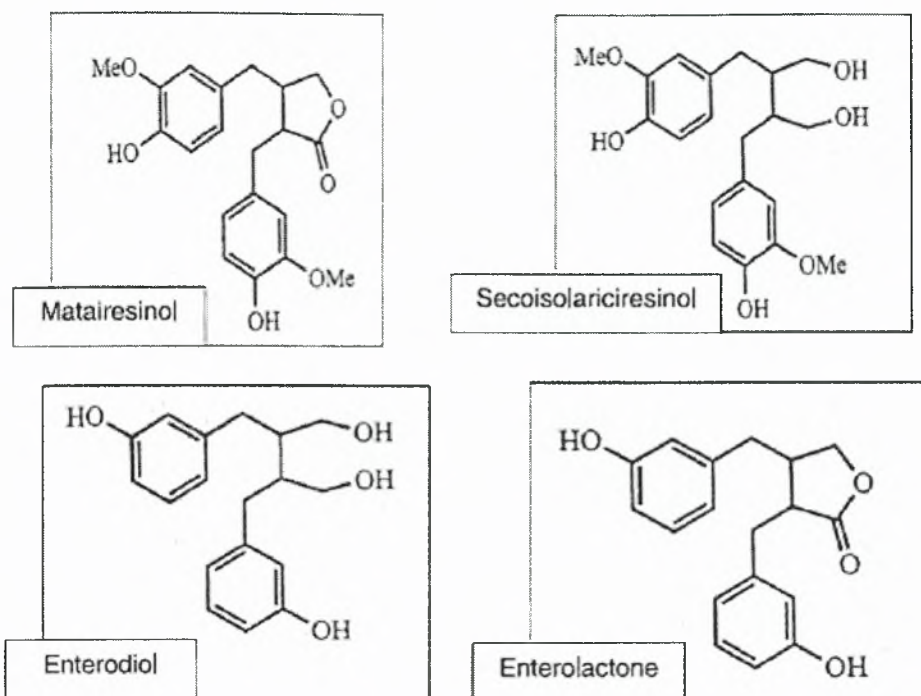
Από τα πιο μελετημένα και τα πιο χαρακτηριστικά στιλβένια που βρίσκονται στα σταφύλια και στο κρασί είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη. Ανακαλύφθηκε στα κλήματα τύπου *Vitis vitifera* το 1976 και στο κρασί το 1992. Στα σταφύλια η ρεσβερατρόλη συντίθεται στην φλούδα και στους σπόρους και η συγκέντρωσή της φτάνει στα 50-100μg/g (Bianchini et Vanio, 2003).



Εικόνα 1.11: Βασική χημική δομή στυλβενίων. (αριστερά) Χημική δομή ρεσβερατρόλης (τριυδροξυστυλβένιο) χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο των στυλβενίων που βρίσκονται στα σταφύλια. (δεξιά) Γλυκοσυλιωμένη μορφή ρεσβερατρόλης.

1.3.5 Λιγνάνια

Τα λιγνάνια ανήκουν στην ομάδα των φυτοιστρογόνων μαζί με τα φλαβονοειδή και τις κουμεστάνες. Εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα. Απομονώνονται από τα ξυλώδη μέρη των φυτών, τα επικαλύμματα των σπόρων και τους αλεσμένους κόκκους. Φυτικά λιγνάνια είναι η ματαιρεσινόλη (matairesinol) και η σεκοΐσολαρισρεσινόλη (secoisolariciresinol) ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη (enterodiols) και η εντερολακτόνη (enterolactone) (Εικόνα 1.12). Βρίσκονται κυρίως στους φυτικούς κόκκους, στα φρούτα και τα λαχανικά. Μία από τις πιο γνώστες δράσεις τους είναι η αναστολή της προκαλούμενης από ορμόνη καρκινογένεσης αφού δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webb et Cullough, 2005).



Εικόνα 1.12: Χημική δομή φυτικών λιγανίων και των ζωικών παραγώγων τους.

1.4 Βιολογικές δράσεις ιδιότητες των πολυφαινολών

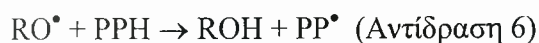
Στις πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως η αντιφλεγμονώδης και η αντιαλλεργική δράση τους, όπου δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, τις εμποδίζουν την προσέλκυση διαφόρων μεταγωγέων της φλεγμονής (Yilmaz et Toledo, 2004; Nijveldt et al., 2001), καθώς και η καρδιοπροστατευτική και η αντικαρκινική τους δράση. Οι δύο τελευταίες μπορεί να οφείλονται στο ότι δεσμεύοντας οι πολυφαινόλες τις ελεύθερες ρίζες τις εμποδίζουν να προκαλέσουν υπεροξειδωση της LDL (Low Density Lipoprotein), γεγονός που συμβάλει στην εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς και να προκαλέσουν βλάβες στο DNA και μεταλλάξεις που αποτελούν σημαντικό βήμα για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας (Ferguson et al., 2001).

1.4.1 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών

Η χαρακτηριστική τους χημική δομή τις καθιστά ιδανικά μόρια αντιοξειδωτικής δράσης. Οι δύο βασικές προϋποθέσεις για το χαρακτηρισμό των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικά μόρια, είναι η παρεμπόδιση ή/και καθυστέρηση της οξείδωσης του υποστρώματος από χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών σε σχέση με το προς οξείδωση

υπόστρωμα (ορισμός αντιοξειδωτικού) και η δευτερογενής ρίζα που προκύπτει μετά τη δέσμευση της αρχικής ελεύθερης ρίζας να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans et al., 1996). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ότι δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και ότι μπορούν να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Blochina et al., 2003; Ferguson, 2001).

Λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους οι πολυφαινόλες μπορούν και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Δρουν ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες και οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών (Αντίδραση 6). Με αυτό τον τρόπο εμποδίζουν τις ελεύθερες ρίζες να οξειδώσουν είτε τα λιπίδια είτε άλλα μόρια και να προκαλέσουν κυτταρικές αλλοιώσεις.



Όπου : RO^{\bullet} : η ελεύθερη ρίζα

PPH : η πολυφαινόλη

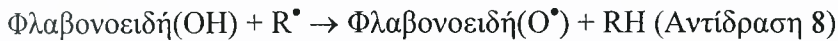
PP^{\bullet} : η φαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό και να οδηγήσει σε μία νέα σειρά αντιδράσεων, προσαυξάνοντας έτσι την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (Αντίδραση 7) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



Από την άλλη μεριά τα φλαβονοειδή αντιδρούν άμεσα με το δραστικό τμήμα της ρίζας δεσμεύοντας έτσι και διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου. Οι υδροξυλικές ομάδες των φλαβονοειδών είναι πολύ δραστικές και αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, ενώ οι ρίζες των

φλαβονοειδών που παράγονται είναι λιγότερο δραστικές από τις αρχικές ελεύθερες ρίζες (Αντίδραση 8) (Nijveldt et al., 2001).



Από τα πιο δραστικά φλαβονοειδή που προστατεύουν τον οργανισμό από την καταστροφική δράση των ελευθέρων ριζών θεωρούνται οι φλαβόνες και οι κατεχίνες. Οι ρίζες οι οποίες δεσμεύονται κατά κύριο λόγο από τα φλαβονοειδή είναι οι ρίζες σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$ και οι ρίζες του περοξυνιτρίτη (ONOO^-) (Αντίδραση 2).

Η ικανότητα των πολυφαινολών, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση τους αφού μπορούν να δεσμεύουν, πιθανότατα στοχευμένα, ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (Αντίδραση 3,4,5) και της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση 4) θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Η χηλική δέσμευση ενός δισθενούς κατιόντος διατηρεί την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες καθιστώντας τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά αφού έτσι προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας τις ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (Heim et al., 2002).

1.4.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Γενικά ο χαρακτηρισμός μιας ουσίας ως αντιμεταλλαξιγόνου εξαρτάται από την ακριβή χημική δομή της και από το αν η ουσία αυτή ήταν παρούσα πριν ή κατά την διάρκεια της έκθεσης σε κάποιον μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Οι διάφορες αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες έχουν προκύψει από παρατήρηση της δράσης τους παρουσία κάποιων μεταλλαξιγόνων παραγόντων τόσο σε πειράματα *in vitro*, *in vivo*, καθώς και συνδυασμού *in vivo-in vitro*. Κάποιες από αυτές είναι μη εξειδικευμένες όπως η παρεμπόδιση απορρόφησης των μεταλλαξιγόνων μέσω ενεργοποίησης των ενζύμων του μεταβολισμού. Ωστόσο έχουν αποδοθεί και δράσεις εξειδικευμένες απέναντι σε συγκεκριμένα μεταλλαξιγόνα (Ferguson, 2001).

Γενικά οι διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στις πολυφαινόλες είναι οι ακόλουθοι: επίδραση στην σύνθεση και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, επίδραση στην δέσμευση των μεταλλαξιγόνων, όπως το διβενζοπυρένιο, στο DNA, αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I/II και τέλος επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών (Ferguson, 2001).

1.5 Σταφύλια-Στέμφυλα- Βόστρυχοι

Το σταφύλι, ως πρώτη ύλη στην παραγωγή οίνου, ασκεί σπουδαία επίδραση στον τύπο και την ποιότητα αυτού. Ο βότρυς του σταφυλιού απαρτίζεται από δύο κύρια μέρη (Εικόνα 1.13)

- το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας ή τσαμπί και
- τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού.



Εικόνα 1.13: Βότρυς σταφυλιού.

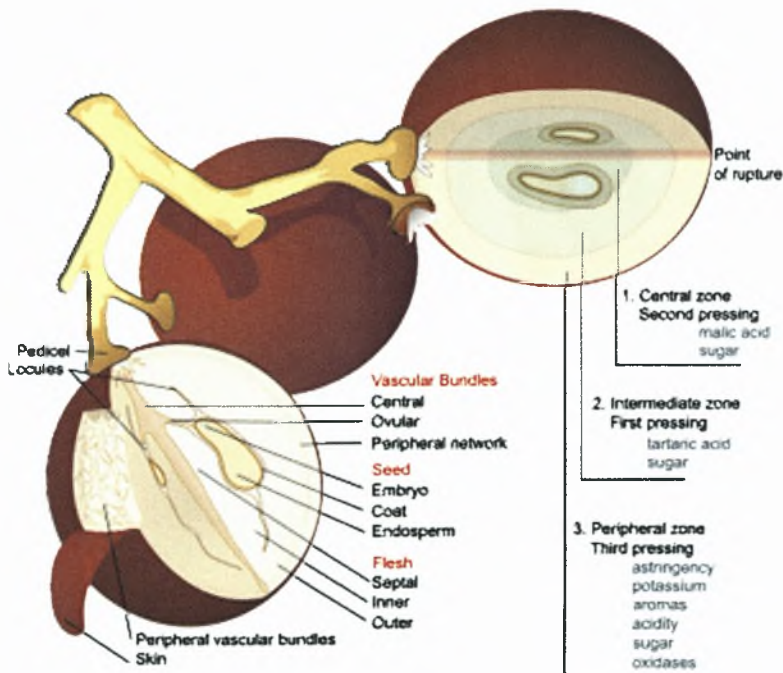
Η επί της εκατό αναλογία των δυο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία αυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, την ηλικία των πρέμων, το χρόνο του τρυγητού, την προσβολή από διάφορες ασθένειες και γενικά από κάθε παράγοντα που θα επηρέαζε το μέγεθος του βότρυ. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχας, σε σχέση με το σύνολο των ραγών. Κατά μέσο όρο πάντως, η σύνθεση του σταφυλιού κυμαίνεται στις παρακάτω αναλογίες:

- βόστρυχας 3-7% κατά βάρος και 30% κατ' όγκο
- ράγες 93 -97% κατά βάρος και 70% κατ' όγκο

Το συστατικό που περιέχεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο βόστρυχα είναι το νερό, το οποίο αρχικά μπορεί να φτάσει μέχρι και 90% κατά βάρος. Στη συνέχεια και ανάλογα με το βαθμό ξυλοποίησης των ιστών του ή ξήρανης του, το νερό περιορίζεται στο 65-75%. Η μείωση του νερού στο βόστρυχα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ξηρής ουσίας αυτού, η οποία από 10 % μπορεί να φτάσει στο 25-35 % κατά βάρος ή σε μεγαλύτερα ακόμη ποσοστά σε μερικές περιπτώσεις. Το μεγαλύτερο μέρος της ξηρής ουσίας αποτελείται από τις ξυλώδεις ουσίες, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει κυρίως ταννίνες (2-4 % κατά βάρος).

Η ράγα αποτελείται από το φλοιό, το σαρκώδες μέρος ή σάρκα και τα γίγαρτα με την ακόλουθη εκατοστιαία σύνθεση κατά βάρος: Φλοιός 10-20%, σάρκα 74-87%, γίγαρτα 3-6%. Τα τελευταία σε μερικές περιπτώσεις λείπουν ολότελα. Τα ποσοστά αυτά κυμαίνονται ανάλογα με τη ποικιλία του σταφυλιού, τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες και το βαθμό ωρίμανσης.

Η ανατομία (Εικόνα 1.14) και η σύσταση του καθενός από τα μέρη της ράγας παρουσιάζονται παρακάτω (Σουφλερός, 2000).



Εικόνα 1.14 : Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.

Τα σταφύλια (*Vitis vinifera L.*), όπως ήδη ειπώθηκε, περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινόλων και ιδιαίτερα φλαβονοειδών. Η ποσότητα και η σύνθεση των βιολογικά ενεργών μορίων που υπάρχουν στα σταφύλια και τα προϊόντα τους ποικίλουν ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, την ωριμότητα, της συνθήκες της εποχής, την περιοχή παραγωγής και την απόδοση του φρούτου. Οι κυριότερες πολυφαινόλες του σταφυλιού είναι οι ανθοκυανίνες και οι φλαβανόλες στα κόκκινα και στα λευκά αντίστοιχα. Γενικά τα κόκκινα σταφύλια περιέχουν περισσότερες πολυφαινόλες σε σχέση με τα λευκά. Τα γίγαρτα και ο φλοιός τους είναι επίσης μια σημαντική πηγή φλαβονοειδών και συγκεκριμένα τα γίγαρτα περιέχουν αξιόλογες ποσότητες προανθοκυανιδινών ή συμπυκνωμένων ταννινών. Η σύσταση των γιγάρτων είναι πολύ περισσότερο μεταβλητή από την αντίστοιχη του φλοιού (Girar et al., 1998).

Το πιο διαδεδομένο εμπορικό παράγωγο του σταφυλιού είναι το κρασί. Η διαδικασία οινοποίησης μετασχηματίζουν τις υπάρχουσες στο σταφύλι πολυφαινόλες και ως αποτέλεσμα οι κύριες πολυφαινόλες στο κρασί να είναι οι φλαβανόλες, οι φλαβανοδιόλες, οι ανθοκυανίνες και οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι συμπυκνωμένες ταννίνες και η εξαιρετικά βιολογικά ενεργή ρεσβερατρόλη της οποίας η συγκέντρωση κυμαίνεται από 1.5 έως 3 mg/l (Girar et al., 1998; Shahidi, 2004). Δεδομένου το φαινολικό περιεχόμενο στην πρώτη ύλη, τα κόκκινα κρασιά επιδεικνύουν και μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με αντίστοιχο των λευκών (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3: Τυπική (% κατά βάρος) σύσταση λευκών και κόκκινων κρασιών.

Component	Table wines		Dessert wines	
	White	Red	White	Red
Water (by difference)	87	87	76	74
Ethanol	10	10	14	14
Other volatiles	0.04	0.04	0.05	0.05
Extract	2.6	2.7	10.1	12.2
Sugars	0.05	0.05	8	10
Pectins	0.3	0.3	0.25	0.25
Glycerol	1.1	1.1	0.9	0.9
Acids	0.7	0.6	0.5	0.05
Ash	0.2	0.2	0.2	0.2
Phenols ^b	0.01	0.2	0.01	0.1
Amino acids	0.25	0.25	0.2	0.2
Fats, terpenoids	0.01	0.02	0.01	0.02
Vitamins, etc.	0.01	0.01	0.01	0.01
Total:	100	100	100	100

^a Singleton (93)

^b Εκτός από το περιεχόμενο σε ζάχαρη, το φαινολικό περιεχόμενο είναι η μόνη ουσιαστική διαφορά των λευκών και κόκκινων κρασιών και των δυο μεγάλων κατηγοριών του πίνακα.

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά και στην ποιότητα των κόκκινων κρασιών ενώ η συγκέντρωσή τους στο λευκό κρασί είναι πολύ χαμηλότερη. Οι φαινόλες και οι παρόμοιες τους ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση, την γεύση, την αίσθηση στη γλώσσα και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του κρασιού.

Το ποσό των φλαβονοειδών, που εξάγεται κατά την οινοποίηση, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το χρόνο επαφής του φλοιού, την ανάμειξη, τον τύπο της δεξαμενής ζύμωσης, τη σύσταση σε αιθανόλη, το SO₂, το pH και τα πεκτολυτικά ένζυμα (Soleas et al. 1997).

1.6 Σταφύλια Σαντορίνης

Το έδαφος του νησιού της Σαντορίνης αποτελείται από ασβεστόλιθο και σχιστόλιθο, οι οποίοι από τις διαδοχικές ηφαιστειογενείς εκρήξεις σκεπάστηκαν από σκουριά, στάχτη, λάβα και ελαφρόπετρα. Τα φτωχά αυτά υλικά αποτέλεσαν το έδαφος, όπου γεννήθηκαν οι εξαιρετικοί οίνοι «Σαντορίνη» ανώτερης ποιότητας.

Εκτός από το έδαφος, ιδιαιτερότητες παρουσιάζουν, επίσης, και οι κλιματολογικές συνθήκες του νησιού. Κατά την εποχή της ωρίμανσης των σταφυλιών, στη Σαντορίνη επικρατούν υψηλές ημερήσιες θερμοκρασίες και πυκνή νυκτερινή υγρασία. Η υγρασία αυτή, όμως με το φύσημα των ανέμων δεν συγκεντρώνεται πάνω στα σταφύλια, παρά μόνο στο απορροφητικό έδαφος του αμπελώνα. Οι συνθήκες αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα να ευνοούν μια ολοκληρωμένη ή ακόμη και προχωρημένη ωρίμανση των σταφυλιών, χωρίς ωστόσο να επιδρούν στην αποσύνθεση των όξινων συστατικών του σταφυλιού.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες παράγονται οίνοι με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη (μέχρι και 17 %) και οξύτητας σχεδόν ίσης με εκείνους της Β. Ελλάδας.

Οι λευκοί οίνοι της Σαντορίνης παράγονται από σταφύλια των λευκών ποικιλιών Ασύρτικο, Αηδάνι λευκό και Αθήρι ενώ οι ερυθροί οίνοι από την ερυθρή ποικιλία Μανδηλαριά. Οι τελευταίοι χρησιμοποιούνται είτε για αναμίξεις είτε για απευθείας κατανάλωση (Σουφλερός, 2000).

1.7 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της προστατευτικής-αντιοξειδωτικής δράσης δέκα εκχυλισμάτων της ποικιλίας αμπέλου *Vitis Vinifera* Σαντορίνης (λευκά και κόκκινα σταφύλια), συλλογής 2003 και 2004, πάνω στο DNA. Για την επίτευξη του στόχου χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων από παράγοντες που δρουν μέσω δραστικών μορφών οξυγόνου. Ως τέτοιοι παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία UV ακτινοβολίας και οι περόξυ ρίζες (ROO^{\cdot}) που παράχθηκαν από τη θερμική διάσπαση του 2,2'- azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH). Η παρατήρηση της αναστολής της οξειδωτικής βλάβης του DNA σε συνδυασμό με την αφθονία των πολυφαινόλων σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, μπορεί να αποτελεί μια ακόμη ένδειξη ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να είναι σημαντικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.



2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλασμιδιακό DNA

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

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

H₂O₂ (Merck-Γερμανία)

AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)

Tris-HCl (Merck-Γερμανία)

NaCl (Panreac-Ισπανία)

EDTA (Panreac-Ισπανία)

Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)

Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)

Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics- Η.Π.Α)

Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)

Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) (Merck-Γερμανία)

Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) (Merck-Γερμανία)

2.1.3 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την Σαντορίνη, ήταν υδατικά και απομονώθηκαν από βόστρυχους και μόνο ένα από στέμφυλα. Τέλος οι ποικιλίες αυτές αναφέρονται σε λευκά και σε κόκκινα σταφύλια συλλογής 2003 και 2004 (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1: Υδατικά εκχυλίσματα ποικιλιών σταφυλιών Σαντορίνης.

Ποικιλία	Χρονιά	Τμήμα φυτού ^a	Κωδικός
Λιαστά Μανδηλαριάς	2004	Βόστρυχοι	B12
Αθήρι Σαντορίνης	2003	Βόστρυχοι	B11
Βοηδόματο Σαντορίνης	2003	Βόστρυχοι	B2
Ασύρτικο Σαντορίνης (1)	2003	Στέμφυλα	B13
Ασύρτικο Σαντορίνης (1)	2004	Βόστρυχοι	B10
Αθήρι Σαντορίνης	2004	Βόστρυχοι	B14
Μαυροτράγανο Σαντορίνης	2004	Βόστρυχοι	B15
Ασύρτικο Σαντορίνης (2)	2004	Βόστρυχοι	B8
Μαυροτράγανο Σαντορίνης (2)	2004	Βόστρυχοι	B7
Ασύρτικο Σαντορίνης	2003	Βόστρυχοι	B5

^a Τμήμα φυτού από το οποίο προέκυψε το εκχύλισμα

2.2 Μέθοδος

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών στο DNA

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένηση και η καρκινογέννηση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση λοιπόν της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς των εκχυλισμάτων σταφυλιού.

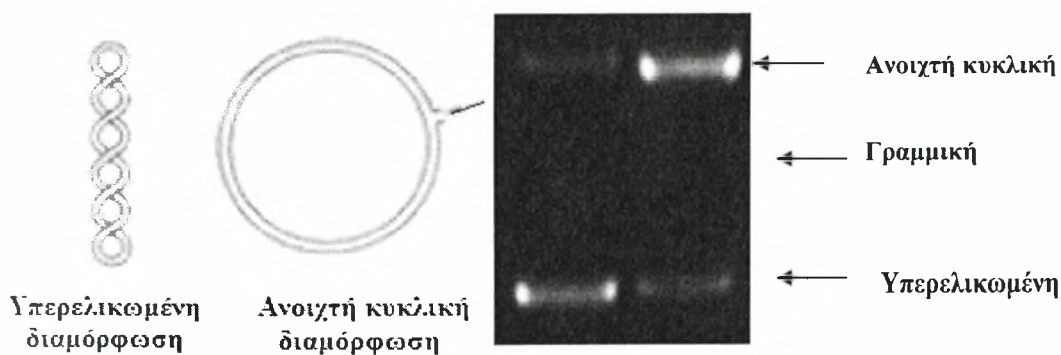
2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η εξέταση της τοξικής δράσης των ριζών OH[•] και ROO[•] καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων ουσιών ή εκχυλισμάτων πάνω στο DNA, χρησιμοποιεί ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλιωνα κυκλικά μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, φέροντας συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε

αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA το πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 2.1).

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

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



Εικόνα 2.1: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα των

ριζών OH^\bullet , ROO^\bullet να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

2.2.1.1 Επαγόμενη από H_2O_2 και UV ακτινοβολία πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες OH^\bullet είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου, προσβάλλοντας τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Παρουσία UV ακτινοβολίας η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH^\bullet (Αντίδραση 9).



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

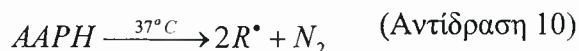
Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών OH^\bullet .

2.2.1.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO^\bullet πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες ROO^\bullet είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξείδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO^\bullet χρησιμοποιείται το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride). Το AAPH σε θερμοκρασία $37^\circ C$ διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO^\bullet (Αντιδράσεις 10,11).



Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO^\bullet να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξειδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

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

2.2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.2.1 Επαγόμενη από H_2O_2 και UV ακτινοβολία πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

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

Κάθε φορά δοκιμαζόταν τα εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 100, 200, 400, 800, 1600 $\mu g/ml$.

Πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος H_2O_2 40mM. Το stock διάλυμα H_2O_2 αλλά και το αντίστοιχο αραιωμένο είναι φωτοευαίσθητα, γι' αυτό λαμβάνονται και τα κατάλληλα μέτρα προστασίας τυλίγοντας τα με αλουμινόχαρτο, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του διατηρείται στον πάγο.

Τα συστατικά της αντίδρασης (10 μl) αποτελούνταν από: 10mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=7.5), DNA Bluescript plasmid 3,2 μg , H_2O_2 40mM, H_2O και το

εξεταζόμενο υδατικό εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

	Tris-HCl	EDTA	H ₂ O	αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Control	2μl		6μl	-	2μl	-	(-)
H ₂ O ₂ +UV	2μl		4μl	-	2μl	2μl	(+)
Εκχ. (100 μg/ml)	2μl		1μl	3μl	2μl	2μl	(+)
Εκχ. (200 μg/ml)	2μl		1μl	3μl	2μl	2μl	(+)
Εκχ. (400 μg/ml)	2μl		1μl	3μl	2μl	2μl	(+)
Εκχ. (800 μg/ml)	2μl		1μl	3μl	2μl	2μl	(+)
Εκχ.(1600 μg/ml)	2μl		1μl	3μl	2μl	2μl	(+)
Εκχ.μόνο	2μl		3μl	3μl	2μl	-	(-)

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

Τα δείγματα αναδεύονταν (spin-vortex-spin) και τοποθετούνταν κάτω από 300W λάμπα UV (Osram) σε απόσταση 52cm για 3 min ακριβώς. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 0,8% στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ξεβαφόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

2.2.2.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Αφού προετοιμαστεί το gel αγαρόζης, ακολουθώντας όπως παραπάνω την ίδια διαδικασία και τις ίδιες συγκεντρώσεις, και αποχυθεί στο καλούπι, γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

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

- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

- **AAPH 2,5mM**: Αραιώνεται το διάλυμα AAPH 100mM 16 φορές. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 1, 2, 5 και 10 μg/ml. Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 2,5mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

	PBS	αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control	8μl	-	2μl	-
AAPH 2.5mM	4μl	-	2μl	4μl
Εκχ. (0.25 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (0.5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (1 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (2 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (10 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl

Για κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (1μg πλασμίδιο) και ένα θετικό control (1μg πλασμίδιο + 2,5mM AAPH).

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ξεβαφόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

2.3 Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH^\bullet , που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H_2O_2 αλλά και η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^\bullet , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

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

όπου S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control, S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 40mM H_2O_2 και UV ακτινοβολία ή DNA + 2,5mM AAPH) και S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H_2O_2 και UV ακτινοβολία ή 2,5mM AAPH.

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

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση στη δράση του H₂O₂, σε συνδυασμό με UV ακτινοβολία, υδατικών εκχυλισμάτων σταφυλιών Σαντορίνης.

Από τα 10 υδατικά εκχυλίσματα σταφυλιών Σαντορίνης, όλα εμφάνισαν προστατευτική δράση στη επαγόμενη από ρίζες OH[•] βλάβη του DNA (Πίνακας 3.1). Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 3.1 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Η προστατευτική αυτή δράση, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3.1, είναι δοσοεξαρτώμενη ($r > 0.96$) με τις τιμές των IC₅₀ να κυμαίνονται από 200 μg/ml 390μg/ml.

Σύμφωνα λοιπόν με τις τιμές IC₅₀ του γραφήματος 3.1, το εκχύλισμα που προέκυψε από τα στέμφυλα Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 (B13) επέδειξε την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενώ την αντίστοιχη μικρότερη το εκχύλισμα από βόστρυχους Λιαστά Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2004 (B12). Ενδεικτικά το εκχύλισμα από στέμφυλα Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 (B13) για συγκεντρώσεις 100, 200, 400, 800 στις 1600 μg/ml παρουσίασε αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH[•] πάνω στο DNA κατά 41 %, 49%, 66%, 75% και 92 % αντίστοιχα.

3.2 Επίδραση στη δράση του AAPH υδατικών εκχυλισμάτων σταφυλιών Σαντορίνης

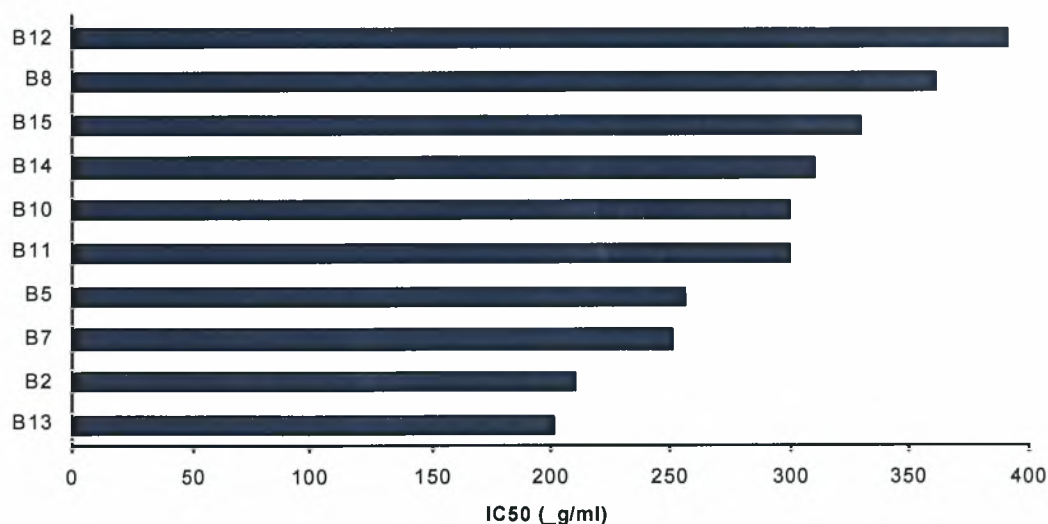
Όλα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις των 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 μg/ml και επέδειξαν δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιοξειδωτική δράση ($r > 0.98$) απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO[•]. Σύμφωνα με τις IC₅₀ τιμές τους, τα εκχυλίσματα αυτά επέδειξαν ισχυρότερη δράση στην επαγόμενη από ROO[•] ρίζες βλάβη σε σχέση την αντίστοιχη των ριζών OH[•], με τις τιμές IC₅₀ να κυμαίνονται από 0.7 έως 1.5 μg/ml.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της δράσης αναστολής των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της επίδρασης του AAPH διαφέρει από εκχύλισμα σε εκχύλισμα με τα εκχυλίσματα από βόστρυχους Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 (B5) και βόστρυχους Μαυροτράγανου Σαντορίνης 2004 (1) (B15) να υπερισχύουν. Το εκχύλισμα από βόστρυχους Βοηδόματου Σαντορίνης 2003 (B2) παρουσίασε την μικρότερη

αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία όμως είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη οποιουδήποτε εκχυλίσματος απέναντι στις ρίζες OH[•].

Πίνακας 3.1: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες OH[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

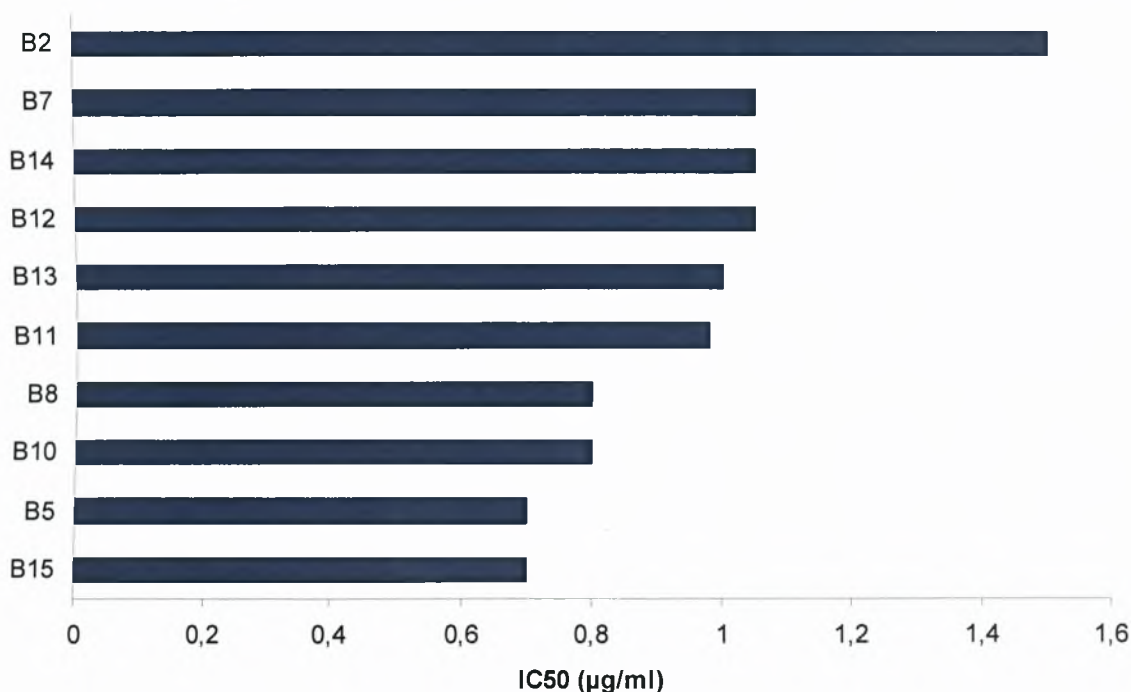
Εκχύλισμα Συγκεντρώσεις (μg/ml)	% Αναστολή					IC ₅₀ (μg/ml)	r
	100	200	400	800	1600		
Βόστρυχοι Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004 (B12)	23±1*	37±3*	52±3*	79±2*	96±2*	390	0.982
Βόστρυχοι Αθήρι Σαντορίνη 2003 (B11)	25±2*	40±3*	56±2*	70±2*	91±3*	300	0.983
Βόστρυχοι Βοηδόματο Σαντορίνη 2003 (B2)	28±1*	47±4*	63±4*	81±4*	95±3*	210	0.983
Στέμφυλα Ασύρτικο Σαντορίνη 2003 (1) (B13)	41±2*	49±3*	66±1*	75±1*	92±2*	200	0.983
Βόστρυχοι Ασύρτικο Σαντορίνη 2004 (1) (B10)	24±2*	38±2*	58±5*	72±4*	89±3*	300	0.971
Βόστρυχοι Αθήρι Σαντορίνη 2004 (B14)	12±2	28±2*	61±2*	81±5*	93±4*	310	0.977
Βόστρυχοι Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004 (1) (B15)	21±1*	32±1*	60±1*	78±2*	93±4*	330	0.984
Βόστρυχοι Ασύρτικο Σαντορίνη 2004 (2) (B8)	18±1*	26±1*	54±3*	70±3*	86±2*	360	0.983
Βόστρυχοι Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004 (2) (B7)	22±2*	43±2*	61±3*	76±5*	89±6*	250	0.960
Βόστρυχοι Ασύρτικο Σαντορίνη 2003 (B5)	29±2*	44±3*	59±2*	73±1*	90±3*	255	0.982

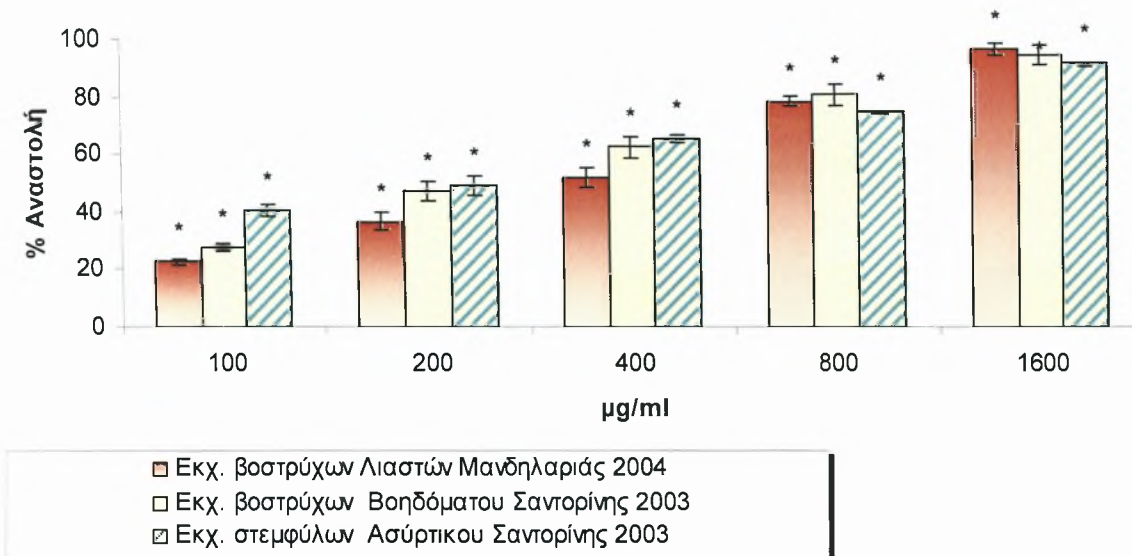


Γράφημα 3.1: Σύγκριση όλων των υδατικών εκχυλισμάτων σταφυλιών Σαντορίνης που μελετήθηκαν συναρτήσει των ποσοστών αναστολής της δράσης των ριζών OH[•] και των IC₅₀ τους. B12:Βόστρυχοι Λιαστά Μανδηλαριάς 2004, B8: Βόστρυχοι Ασύρτικο 2004 (2), B15: Βόστρυχοι Μαυροτράγανο 2004 (1), B14: Βόστρυχοι Αθήρι 2004, B10: Βόστρυχοι Ασύρτικο 2004 (1), B11: Βόστρυχοι Αθήρι 2003, B5: Βόστρυχοι Ασύρτικο 2003, B7: Βόστρυχοι Μαυροτράγανο 2004 (2), B2: Βόστρυχοι Βοηδόματο 2003, B13: Στέμφυλα Ασύρτικο 2003 (1).

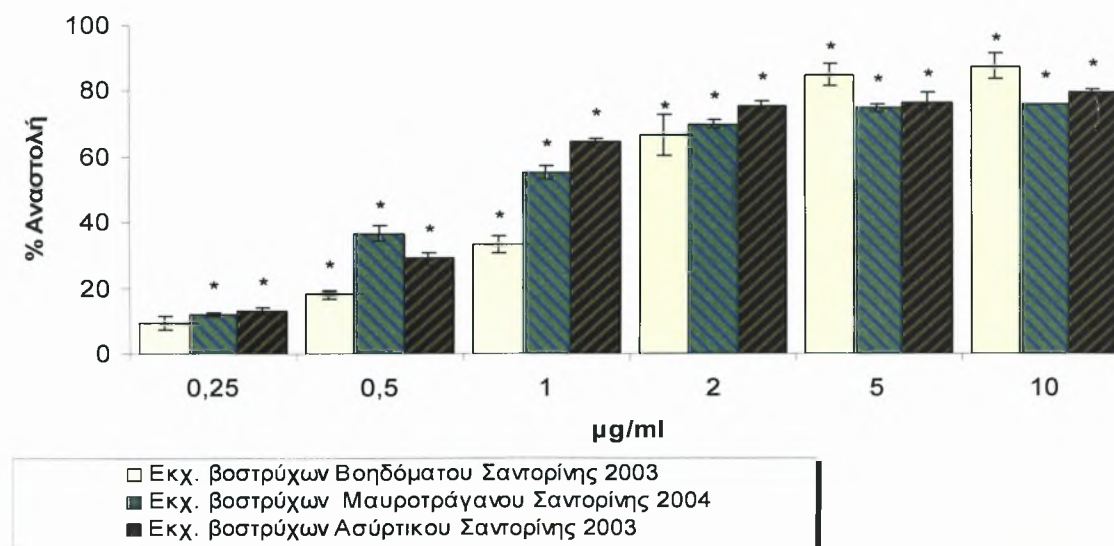
Πίνακας 3.2: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Εκχύλισμα Συγκεντρώσεις (μg/ml)	% Αναστολή						IC ₅₀ (μg/ml)	r
	0.25	0.5	1	2	5	10		
Βόστρυχοι Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη 2004 (B12)	15±1*	25±2*	48±1*	69±3*	82±6*	94±3*	1,05	0.980
Βόστρυχοι Αθήρι Σαντορίνη 2003 (B11)	15±1*	27±3*	51±4*	76±5*	83±4*	86±5*	0,98	0.951
Βόστρυχοι Βοηδόματο Σαντορίνη 2003 (B2)	9±1	18±2*	33±3*	67±6*	85±3*	88±4*	1,5	0.969
Στέμφυλα Ασύρτικο Σαντορίνη 2003 (1) (B13)	19±1*	29±1*	50±3*	61±1*	76±3*	78±3*	1	0.964
Βόστρυχοι Ασύρτικο Σαντορίνη 2004 (1) (B10)	21±1*	33±3*	59±2*	76±3*	79±2*	84±2*	0,8	0.978
Βόστρυχοι Αθήρι Σαντορίνη 2004 (B14)	5±3	24±1*	49±4*	68±6*	77±4*	78±4*	1,05	0.930
Βόστρυχοι Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004 (1) (B15)	12±1*	37±2*	55±2*	70±1*	75±1*	76±1*	0,7	0.979
Βόστρυχοι Ασύρτικο Σαντορίνη 2004 (2) (B8)	5±1	27±2*	57±4*	75±6*	81±5*	83±*	0,8	0.913
Βόστρυχοι Μαυροτράγανο Σαντορίνη 2004 (2) (B7)	11±2	26±2*	48±3*	76±2*	86±4*	88±2*	1,05	0.954
Βόστρυχοι Ασύρτικο Σαντορίνη 2003 (B5)	13±1*	29±2*	64±1*	76±2*	77±3*	80±1*	0,7	0.930

**Γράφημα 3.2:** Σύγκριση όλων των υδατικών εκχυλισμάτων σταφυλιών Σαντορίνης που μελετήθηκαν συναρτήσει των ποσοστών αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•] και των IC₅₀ τους. B12: Βόστρυχοι Λιαστά Μανδηλαριάς 2004, B8: Βόστρυχοι Ασύρτικο 2004 (2), B15: Βόστρυχοι Μαυροτράγανο 2004 (1), B14: Βόστρυχοι Αθήρι 2004, B10: Βόστρυχοι Ασύρτικο 2004 (1), B11: Βόστρυχοι Αθήρι 2003, B5: Βόστρυχοι Ασύρτικο 2003, B7: Βόστρυχοι Μαυροτράγανο 2004 (2), B2: Βόστρυχοι Βοηδόματο 2003, B13: Στέμφυλα Ασύρτικο 2003 (1).

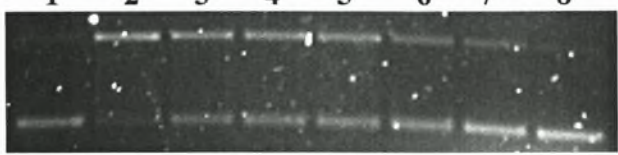

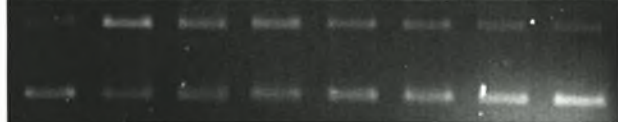


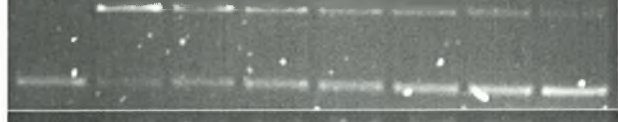
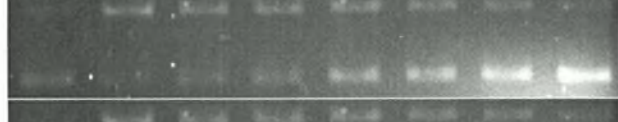
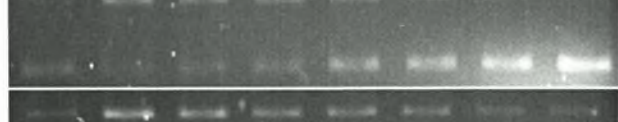
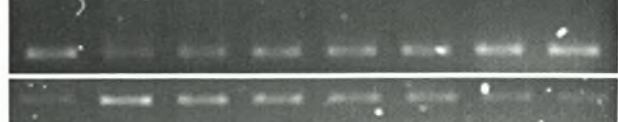



Γράφημα 3.3: Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH[•] των δύο πιο δραστικών εκχυλισμάτων (Στέμφυλα Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 και βόστρυχοι Βοηδόματου Σαντορίνης) και του λιγότερου δραστικού Βόστρυχοι Λιαστών Μανδηλαριάς 2004. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση ενώ οι αστερίσκοι τις στατικά σημαντικές τιμές.



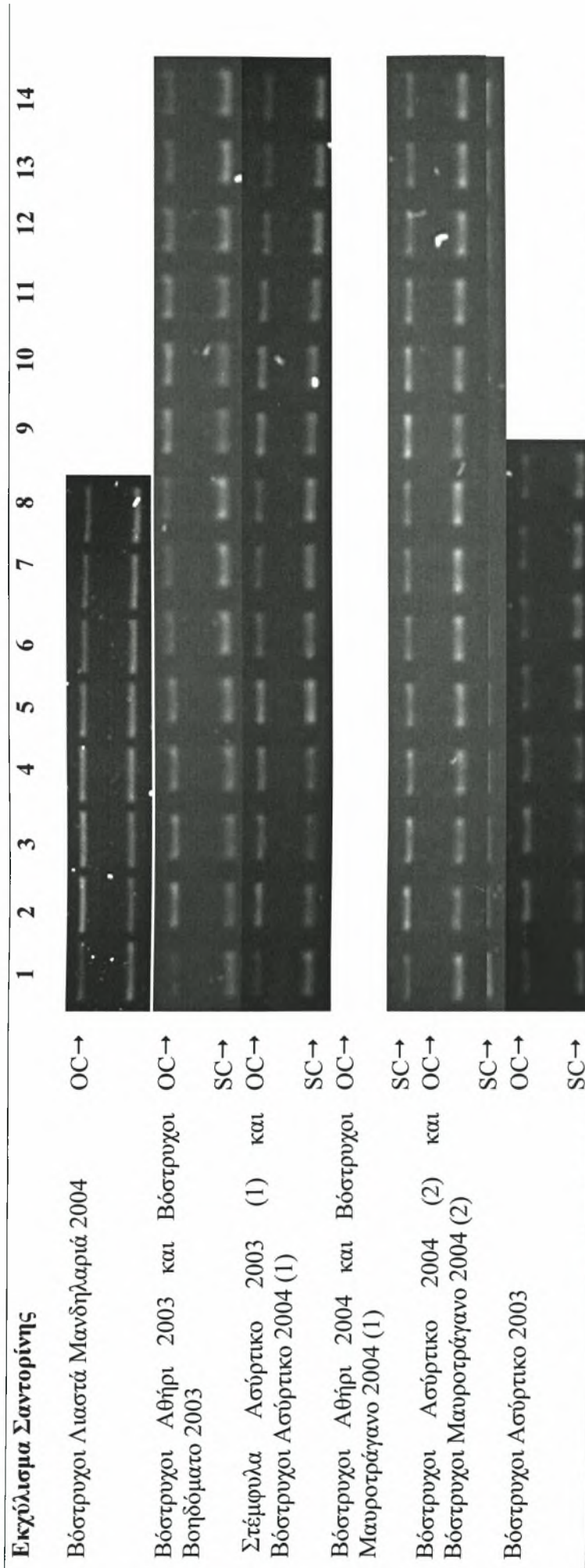
Γράφημα 3.4: Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•] των δύο πιο δραστικών εκχυλισμάτων (Βόστρυχοι Ασύρτικο 2003 και Βόστρυχοι Μαυροτραγάνο 2004) και του λιγότερου δραστικού (Βόστρυχοι Βοηδόματο Σαντορίνης 2003). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση ενώ οι αστερίσκοι τις στατικά σημαντικές τιμές.

Πίνακας 3.3: Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες OH[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από το ασθενέστερο προς το ισχυρότερο.

Εκχύλισμα	Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων
Bόστρυχοι Λιαστά Μανδηλαριά 2004	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> 12345678 </div> 
Bόστρυχοι Ασύρτικο 2004 (2)	
Bόστρυχοι Μαυροτράγανο 2004 (1)	
Bόστρυχοι Αθήρι 2004	
Bόστρυχοι Ασύρτικο 2004 (1)	
Bόστρυχοι Αθήρι 2003	
Bόστρυχοι Ασύρτικο 2003	
Bόστρυχοι Μαυροτράγανο 2004 (2)	
Bόστρυχοι Βοηδόματο 2003	
Στέμφυλα Ασύρτικο 2003 (1)	

1: 1μg plasmid, 2: 1μg plasmid + 40mM H₂O₂, 3: 1μg plasmid + 40mM H₂O₂ + 100μg/ml, 4: 1μg plasmid + 40mM H₂O₂ + 200μg/ml, 5: 1μg plasmid + 40mM H₂O₂ + 400μg/ml B12, 6: 1μg plasmid + 40mM H₂O₂ + 800μg/ml, 7: 1μg plasmid + 40mM H₂O₂ + 1600μg/ml, 8: 1μg plasmid + 1600μg/ml εκχύλισμα. OC: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση DNA (Open circular Conformation), SC: Υπερελικωμένη διαμόρφωση DNA (Supercoiled Conformation).

Πίνακας 3.4: Αντιοξειδωτική δράση των εγκυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.



1: 1µg plasmid, 2: 1µg plasmid + 2.5mM AAPH, 3-8: 1µg plasmid, 2.5mM AAPH και 0.25µg/ml, 0.5µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml αντίστοιχη συγκέντρωση εγκυλισματος, 9-14 1µg plasmid, 2.5mM AAPH και 0.25µg/ml, 0.5µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml αντίστοιχη συγκέντρωση εκφυλισματος OC: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση DNA (Open circular Conformation), SC: Υπερελικομένη διαμόρφωση DNA (Supercoiled Conformation).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες του κρασιού αλλά και των εκχυλισμάτων από σταφύλια, ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν (Meyer et al., 1997; Torres et al., 2002). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής, και συνεπώς και της χημειοπροστατευτικής, δράσης εκχυλισμάτων στέμφυλων και βοστρύχων από σταφύλια Σαντορίνης στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι οι ρίζες OH^\bullet και ROO^\bullet . Άλλωστε, η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγέννηση και η καρκινογέννηση (Stagos et al., 2005).

Συνολικά δοκιμάστηκαν δέκα εκχυλίσματα από σταφύλια Σαντορίνης, εννέα από βοστρύχους και μόνο ένα από στέμφυλα. Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονταν από συγκεκριμένες ποικιλίες σταφυλιού της Σαντορίνης όπως Λιαστά Μανδηλαριάς, Ασύρτικο, Βοηδόματο, Μαυροτράγανο και Αθήρι, κόκκινων δηλαδή και λευκών σταφυλιών, σοδειάς 2003 και 2004.

Με βάση τις τιμές των IC_{50} του Πίνακα 3.1 και τα 10 υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν προστατευτική δράση στη επαγόμενη από ρίζες OH^\bullet βλάβη του DNA. Η προστατευτική αυτή δράση, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.1, είναι δοσοεξαρτώμενη ($r > 0.96$) με τις τιμές των IC_{50} να κυμαίνονται από 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 390 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Συγκρίνοντας τις τιμές IC_{50} του Γραφήματος 3.1, το εκχύλισμα που προέκυψε από τα στέμφυλα Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 (B13) επέδειξε την πιο ισχυρή προστατευτική δράση ενώ την αντίστοιχη μικρότερη το εκχύλισμα από βόστρυχους Λιαστά Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2004 (B12). Ενδεικτικά το εκχύλισμα από στέμφυλα Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 (B13) για συγκεντρώσεις 100, 200, 400, 800 στις 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ παρουσίασε αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH^\bullet πάνω στο DNA κατά 41%, 49%, 66%, 75% και 92% αντίστοιχα ενώ πολύ καλή προστατευτική δράση επέδειξε και το εκχύλισμα από βοστρύχους Βοηδόματου Σαντορίνης 2003 (B2) με τιμή IC_{50} ίση με 210 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Γράφημα 3.3).

Η διαφορετική δράση των εκχυλισμάτων πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων μιας και προέρχονται και από διαφορετικές ποικιλίες. Όπως βρέθηκε αργότερα από ίδιες ποικιλίες σταφυλιών, μεταγενέστερων όμως ετών, η χημική τους ανάλυση με την μέθοδο HPLC (Πίνακας 6.1) έδειξε ότι υπάρχουν αρκετές διαφορές στις περιεχόμενες πολυφαινόλες ακόμα και στη συνολική περιεκτικότητά τους σε αυτές (εκφρασμένο σε mg/Kg επί ξηρού). Σύμφωνα λοιπόν με τον πίνακα του παραρτήματος, τα εκχυλίσματα περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία από πολυφαινόλες οι οποίες ανήκουν στις ομάδες

των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και των στυλβενίων. Συγκεκριμένα, τα στυλβένια *trans*-ρεσβερατρόλη και *ε*-βινιφερίνη, και τα φαινολικά οξέα γαλλικό και καφεϊκό οξύ εντοπίστηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Πίνακας 6.1). Από την άλλη μεριά, η ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών ποικίλει σημαντικά από σοδειά σε σοδειά ενώ δεν γίνεται φανερή η κυριαρχία των κόκκινων ποικιλιών σε πολυφαινόλες έναντι των λευκών όπως αντίθετα συμβαίνει με τα κόκκινα κρασιά (Πίνακας 1.3). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να επεκταθεί λαμβάνοντας υπόψη την διαφορετική τεχνική οινοποίησης στα κόκκινα κρασιά η οποία επιτρέπει την εκχύλιση μεγαλύτερων ποσοτήτων πολυφαινολών. Γενικά, όλα τα εκχυλίσματα του πίνακα είχαν σχετικά μεγάλες τιμές συνολικής ποσότητας πολυφαινολών (TPC, Total Polyphenolic Content) υποδηλώνοντας ότι συνιστούν μια εξαιρετική πηγή βιοδραστικών πολυφαινολών. Ανάμεσα στα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν, οι ποικιλίες Μανδηλαριά και Ασύρτικο επέδειξαν τις υψηλότερες τιμές TPC.

Σε προηγούμενες έρευνες οι παραπάνω πολυφαινόλες, καφεϊκό, φερουλικό, γαλλικό, πρωτοκατεχοϊκό οξύ και ρουτίνη) απομονώθηκαν από άλλες ποικιλίες σταφυλιών και μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με *in vitro* μεθόδους (Stagos et al., 2004; Stagos et al., 2005). Η αναστολή στην επαγόμενη βλάβη από διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες έδειξε ότι οι πολυφαινόλες αυτές, που συναντιούνται στις ίδιες ποσότητες και στα εκχυλίσματα από σταφύλια, αποτελούν εξαιρετικά αντιοξειδωτικά (Stagos et al., 2004; Stagos et al., 2005). Από τα παραπάνω, ενισχύεται η άποψη ότι τα πολυφαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων από σταφύλια είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική δράση τους.

Σε προηγούμενη έρευνα, εκχυλίσματα σταφυλιών Σαντορίνης ανέστειλαν την επαγόμενη από μιτομυκίνη C θραύση του DNA, κάνοντας ευνόητη την υπόθεση ότι θα μπορούσαν να προστατεύσουν το τελευταίο και από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ενώ αντίθετα οι απομονωμένες από σταφύλια πολυφαινόλες την ενίσχυσαν (Stagos et al., 2005). Αυτό αποδόθηκε στο ότι οι καθαρές πολυφαινόλες, δρουν με διαφορετικό τρόπο απομονωμένες από ότι μέσα στα εκχυλίσματα. Πιθανές αλληλεπιδράσεις μπορούν να συμβαίνουν μεταξύ των πολυφαινολικών συστατικών ή και με άλλα συστατικά του εκχυλίσματος, οι οποίες όμως δεν είναι ακόμα γνωστές.

Στη μέθοδο της επίδρασης ριζών OH[•], επάνω στο πλασμιδιακό DNA τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα επέδειξαν ιδιαίτερη προστατευτική δράση στην επαγόμενη βλάβη του από τις ρίζες αυτές. Οι ρίζες αυτές παράχθηκαν με φωτόλυση του H₂O₂ μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας. Περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα δύναται να προκαλούν τον

σηματισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (Halliwell, 1997), οι οποίες εκτός των άλλων επιπτώσεων έχουν κατηγορηθεί και για τη γήρανση του δέρματος (Ames et al, 1993). Η υπεριώδης ακτινοβολία (UVR) επάγει ένα μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων στο δέρμα με πιο επιβλαβή τον καρκίνο του δέρματος. Η βλάβη του DNA έχει προσδιοριστεί ως η εκινητής του σχηματισμού αυτού του είδους του καρκίνου. Ακόμη, έχει αποδειχτεί ότι τα αντιηλιακά εμποδίζουν την επαγόμενη βλάβη στο DNA από τις άμεσες συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας (Ley et Leevne, 1997). Συνεπώς η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν υποδεικνύει την πιθανή χρήση αυτών των εκχυλισμάτων ως βασικά συστατικά των αντιηλιακών.

Εκτός από τις ρίζες OH^\bullet , τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν απέναντι και στην τοξική δράση των ριζών ROO^\bullet σε συγκεντρώσεις των 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$. Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} , όλα τα εκχυλίσματα αυτά επέδειξαν ισχυρή δόσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιοξειδωτική δράση ($r > 0.98$) στην επαγόμενη από ROO^\bullet ρίζες βλάβη στο DNA, με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 0.7 έως 1.5 $\mu\text{g/ml}$. Τα εκχυλίσματα από βόστρυχους Ασύρτικου Σαντορίνης 2003 (B5) και από βόστρυχους Μαυροτράγανου Σαντορίνης 2004 (1) (B15) υπέρσχυσαν των υπόλοιπων εκχυλισμάτων έχοντας τιμή IC_{50} ίση με 0.7 $\mu\text{g/ml}$. Το εκχύλισμα από βόστρυχους Βοηδόματου Σαντορίνης 2003 (B2) παρουσίασε την μικρότερη προστατευτική δράση. Η διαφορετική δράση των εκχυλισμάτων πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική σύστασή τους σε πολυφαινόλες όπως και με τη δράση τους απέναντι στις ρίζες OH^\bullet . Η αποτελεσματικότητα της δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι στις ROO^\bullet είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη οποιουδήποτε εκχυλίσματος απέναντι στις ρίζες OH^\bullet γιατί οι συγκεντρώσεις που παρουσίασαν δράση απέναντι στις ROO^\bullet (0.25-10 $\mu\text{g/ml}$) ήταν πολύ μικρότερες από εκείνες απέναντι στις OH^\bullet (100-1600 $\mu\text{g/ml}$). Η διαφορετική συμπεριφορά των εκχυλισμάτων απέναντι σε αυτές τις ρίζες οφείλεται στο ότι αποτελούν διαφορετικές δραστικές μορφές οξυγόνου και υποδηλώνει διαφορετικό μηχανισμό δράσης των εκχυλισμάτων απέναντι σε αυτές.

Τα τελευταία χρόνια διαφαίνεται έντονα το γεγονός ότι η οξείδωση των λιπών ή αλλιώς η λιπιδική υπεροξείδωση αποτελεί βασικό βήμα στη παθογένεση αρκετών ασθενειών σε ενήλικες και βρέφη. Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα φυσικά σε μικρή ποσά στον οργανισμό, κυρίως κάτω από την επίδραση αρκετών ελευθέρων ριζών. Επίσης, η έναρξή της αποδίδεται και στην δράση αρκετών φαγοκυττάρων. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου «επιτίθενται» δυναμικά στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης γεγονός επικίνδυνο για την βιωσιμότητα των κυττάρων, ακόμη και των ιστών. Αν και οργανισμός αρχικά διαθέτει μηχανισμούς άμυνας, ενζυμικούς και μη, αυτοί μπορεί να

αποτύχουν με αποτέλεσμα τη σοβαρή βλάβη των ιστών (Mylonas et Kouretas, 1999). Στη παρούσα μελέτη, εκχυλίσματα σταφυλιών ανέστειλαν την δράση των παραγόμενων κατά την λιπιδική υπεροξειδωση περόξυ ριζών ROO[•]. Η ενδεχόμενη χρήση των τελευταίων για θεραπευτικούς σκοπούς μπορεί να βασιστεί άμεσα στην επιδεικνυόμενη προστατευτική τους δράση.

Λαμβάνοντας υπόψη τον Πίνακα 6.1 του παραρτήματος και τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα περιέχουν μεγάλο ποσοστό πολυφαινόλων που είναι υπαίτια της ισχυρής τους αντιοξειδωτικής βλάβης. Συνεπώς, τα εκχυλίσματα μπορούν να θεωρηθούν πιθανή πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φάρμακα, καλλυντικά κ.τ.λ. Οι βόστρυχοι και τα στέμφυλα των σταφυλιών είναι παραπροϊόντα των κρασιών και η εκμετάλλευσή τους για την παραγωγή αντιοξειδωτικών παραγόντων ωφελεί και στη προστασία του περιβάλλοντος. Η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών θεωρείται μια από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες και το 2006 άγγιξε τα 69 εκατομμύρια τόνους (FAOSTAT, 2007). Περίπου το 80% της όλης ποσότητας χρησιμοποιείται στην οινοποιία οπότε εύκολα υπολογίζεται ότι ο όγκος των απορριμάτων των σταφύλια ανέρχονται στους 10 εκατομμύρια τόνους μέσα σε λίγες εβδομάδες από την έναρξη της καλλιεργητικής σαιζόν.

- Renaud S. and Lorgeril M., (1992), Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet* 339:1523–1526
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- Scalbert A. and Williamson G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J.Nutrition*, 130:20735-855
- Shahidi, F & Naczki, M., (2004), *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. Boca Raton, FL:CRC Press
- Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., (1997), Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*,11:287-313
- Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005), Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, *In Vivo*: 741-747
- Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K and Kouretas D, (2005), Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek Varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15:1013-1022
- Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S and Kouretas D, (2006), Antimutagenic activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydroden peroxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mut Res* 609: 165-175
- Stagos D, Kouris S and Kouretas D, (2004), Plant phenolics protect from Bleomycin- induced oxidative stress and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102, *Anticancer Research* 24:743-746
- Stagos D., Karaberis E., Kouretas D., (2005), Assessment of antioxidant/anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *in vivo* 19: 741–748
- Stoner G.D., Mukhtar H. (1995), Polyphenols as cancer chemopreventive agents, *J.Cell Biochemistry Suppl.*, 22:169-80
- Surch YJ, (2003), Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev* 3: 768-793

- Torre JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X and Bober R, (2002), Valorization of grape (*Vitis Vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric Food Chem* 50: 7548-7555
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548–7555
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J., (2004), Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266:37-56
- Van de Wiel A., van Golde P.H.M., Hart H.Ch, (2001), Blessings of the grape, *European Journal of Internal Medicine*, 12:484-48
- Watanabe S., Uesugi S., Kikuchi Y., (2002), Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynaecological problems and possible immune potentiation, *Biomed Pharmacother*, 56:302-312
- Webb A., McCullough M, (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, 51:117-131
- Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120
- www.wikipedia.com
- Yang C.S., Landau J.M., Huang M., Newmark H., (2001), Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annual Review of Nutrition*, 21:381-406
- Ye X, Krohn R.L., Liu W., Joshi S.S., Kuszynski C.A., McGinn T.R., Bagchi M, Preuss H.G., Stohs S.J. and Bagchi D., (1999), The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells, *Mol. Cell. Biochem.* 196: 99–108
- Yilmaz Y. and Toledo R.T., (2004), Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends in Food Science & Technology*, 15:422-433
- Καρατάγλης Σ., (1994), Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text

- Σουφλερός Ε. (2000), Οινολογία, τόμος Ι, Εκδόσεις Παπαγεωργίου

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.1: Σύσταση πολυφαινόλων σαφρών από κόκκινες και λευκές ποικιλίες.

Βόστροχος (mg/g)	Gallic acid	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Proyanidin B3	Proyanidin B2	Epicatechin gallate	trans-Caffeic acid	trans-Resveratrol	ε-Viniferin	3-O-galactoside	3-O-glucoside	Quercetin	Kampferol	Caffeic acid	Syringic acid	p-Coumaric acid	Ferulic acid	TPC*		
Κόκκινες ποικιλίες																				
B3	Μανδηλαριά Σαντορίνη 2006	31,44	65,39	4,34	26,01	5,15	3,14	4,87	12,62	20,15	8,20	2,06	0,34	1,40	0,32	0,34	0,46	0,04	0,04	584
B12	Λιαστά Σαντορίνη 2007	12,84	85,81	0,43	31,55	0,00	7,78	1,62	17,56	31,42	6,63	4,61	0,46	0,60	0,20	ND**	0,07	0,08	0,03	537
B7	Μαυροπράγανο Σαντορίνη 2007	8,33	66,28	5,21	21,04	3,36	2,68	2,33	4,85	15,82	11,04	5,84	0,63	0,96	0,17	0,05	0,01	0,07	0,00	584
B15	Μαυροπράγανο Σαντορίνη 2008	6,46	100,96	5,59	19,41	4,13	8,53	11,89	12,14	24,53	14,30	5,87	0,79	0,58	0,12	0,05	0,03	0,12	0,00	464
B2	Βοηδόματο Σαντορίνη 2006	11,49	46,74	11,14	20,54	0,00	5,61	16,11	5,47	12,79	12,06	3,86	0,90	0,80	0,00	0,51	0,14	0,12	0,00	494
B6	Βοηδόματο Σαντορίνη 2007	32,96	84,28	0,00	16,36	0,00	7,68	6,38	20,56	49,08	14,95	7,27	2,82	2,32	0,28	0,06	ND	0,08	0,00	367
Λευκές ποικιλίες																				
B5	Ασύρτικο Σαντορίνη 2006	22,65	75,87	1,27	31,59	2,52	4,12	4,84	6,10	15,54	13,47	4,53	0,32	2,16	0,09	0,00	0,13	0,08	0,00	451
B10	Ασύρτικο Σαντορίνη 2007	1,78	68,85	0,00	30,02	2,48	3,25	2,15	5,13	8,54	9,09	5,15	0,71	0,19	ND	0,01	ND	0,04	0,00	574
B8	Ασύρτικο Σαντορίνη 2008	2,27	98,29	0,00	25,79	8,55	4,46	12,25	11,42	14,53	19,22	7,16	1,53	0,32	0,04	0,00	ND	0,01	0,00	372
B11	Αθήρι Σαντορίνη 2006	8,90	36,49	2,69	20,01	2,55	4,02	0,40	3,86	8,73	4,55	3,01	0,90	0,49	0,03	0,07	0,18	0,04	0,06	559
B14	Αθήρι Σαντορίνη 2007	7,25	51,05	4,02	14,90	2,49	2,37	9,39	8,59	12,07	13,63	4,95	1,34	0,50	0,07	0,01	ND	0,01	0,00	464
B9	Βιλάνα Σητεία 2006	14,67	46,46	0,00	19,45	6,66	6,51	0,61	11,60	50,10	17,12	6,15	1,91	0,93	0,17	0,05	0,05	0,07	0,00	454
B13	Ασύρτικο Σαντορίνη (Στέμνους)	22,21	47,40	12,50	5,22	21,32	12,21	0,44	0,29	1,41	4,25	4,63	1,90	3,52	0,54	0,23	0,25	0,26	0,09	167,0

a Quercetin

* mg GAE /K.g dim

** Δεν ανιχνεύθηκε (Not Detected)

