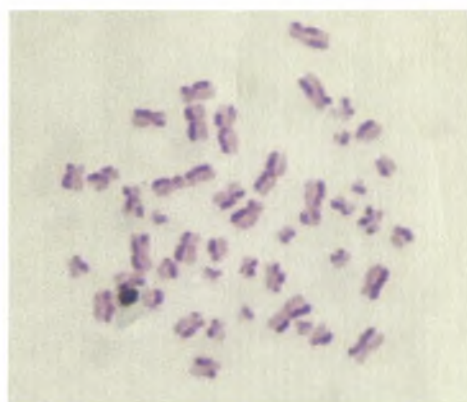


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΠΑΝΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ  
ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΑΣΣΥΡΤΙΚΟ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ ΣΤΗΝ  
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΤΟΜΥΚΙΝΗ C ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**



ΛΑΡΙΣΑ 2005

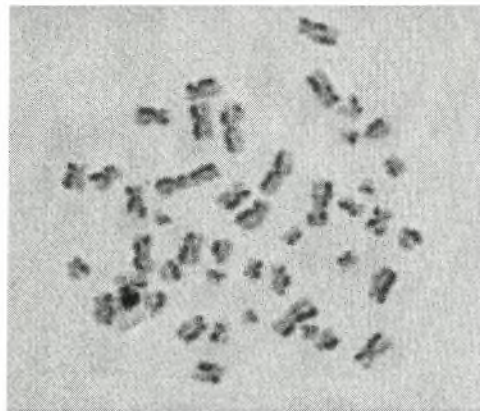
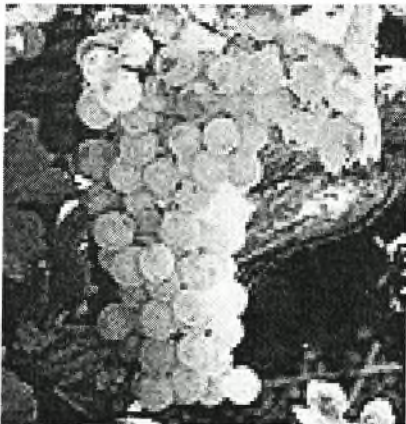
A.n.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΠΑΝΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ  
ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΑΣΣΥΡΤΙΚΟ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ ΣΤΗΝ  
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΤΟΜΥΚΙΝΗ C ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΔΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**



ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4636/1  
Ημερ. Εισ.: 20/09/2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΣΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087894

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον κ.Δημήτριο Κουρέτα, Αναπληρωτή 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 να ευχαριστήσω επίσης τον κ.Δημήτριο Στάγκο για την αμέριστη βοήθειά του τόσο στην διεκπεραίωση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής εργασίας καθώς και για την μεγάλη υπομονή του και την προθυμία του να απαντήσει όλες τις απορίες και προβληματισμούς μου.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου, για την πολύ καλή συνεργασία, καθώς και των γύρω εργαστηρίων για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	8
1.1. Χημική σύσταση του κρασιού – σταφυλιών	8
1.2. Πολυφαινόλες	9
1.2.1. Φλαβονοειδή	9
1.2.2. Φαινολικά οξέα	12
1.2.3. Στιλβένια	13
1.3. Βιοσύνθεση πολυφαινολών	14
1.4. Βιοδιαθεσιμότητα – Μεταβολισμός των πολυφαινολών	16
1.5. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών	18
1.5.1. Αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών	18
1.5.2. Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών	19
1.5.3. Προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών	27
1.5.4. Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών	30
1.6. Καφεϊκό οξύ	32
1.7. Φερουλικό οξύ	33
1.8. Κατεχίνη - Επικατεχίνη	34
1.9. Υδατικό – Μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικο Σαντορίνης	35
1.10. Μιτομυκίνη C (Mitomycin C)	36
1.11. Σκοπός του πειράματος	37
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	38
2.1. Υλικά	38
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια – Καλλιεργητικά υλικά	38
2.1.2. Εκχυλίσματα	38
2.2. Μέθοδοι	39
2.2.1. Ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange ή SCEs)	39
2.2.2. Δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού (PRI)	43
2.2.3. Πειραματική διαδικασία	43
2.2.4. Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί	46
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	49
3.1. Επαγόμενη από μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων	49
3.2. Επίδραση των διαλυτών στους οποίους είναι διαλυμένες οι εξεταζόμενες ουσίες στην επαγόμενη από μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών	49
3.3. Επίδραση υδατικού και μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων	49
3.4. Επίδραση των εξεταζόμενων πολυφαινολών στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων	50
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	66
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	70

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1.: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, τα χαρακτηριστικά μέλη των ομάδων αυτών και τα τρόφιμα τα οποία αποτελούν σημαντικές διατροφικές πηγές τους.	12
Πίνακας 1.2. Κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες.	21
Πίνακας 1.3.: Ιεράρχηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων φλαβονοειδών σε σχέση με τα δομικά χαρακτηριστικά τους.	25
Πίνακας 1.4.: Υπολογισμός των μιολε κάθε πολυφαινόλης του υδατικού εκχυλίσματος ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.	35
Πίνακας 1.5.: Υπολογισμός των μιολε κάθε πολυφαινόλης του μεθανολικού εκχυλίσματος ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.	35
Πίνακας 2.1. : Πίνακας κατανομής t	48
Πίνακας 3.1.: Επαγόμενη από μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων και επίδραση της μιτομυκίνης C στον δείκτη PRI	51
Πίνακας 3.2.: Επίδραση του διαλύτη, μεθανόλης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	52
Πίνακας 3.3.: Επίδραση του διαλύτη, DMSO στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	53
Πίνακας 3.4.: Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	54
Πίνακας 3.5.: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	56
Πίνακας 3.6.: Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	58
Πίνακας 3.7.: Επίδραση του φερουλικού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	60
Πίνακας 3.8.: Επίδραση του κατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	62
Πίνακας 3.9.: Επίδραση της επικατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	64



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. : Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών.	9
Εικόνα 1.2.: Βασικές χημικές δομές των πολυφαινολών της οικογένειας των φλαβονοειδών	10
Εικόνα 1.3.: Βασική χημική δομή των πολυμερών των συμπυκνωμένων ταννινών, προανθοκυανιδινών, παράδειγμα χημικής δομής μιας τριμερούς προανθοκυανιδίνης.	11
Εικόνα 1.4.: Βασική χημική δομή ανθοκυανιδίνης και της γλυκοσυλιωμένης ανθοκυανίνης.	11
Εικόνα 1.5.: Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων, υδροξυβενζοϊκά – υδροξυκινναμικά οξέα.	12
Εικόνα 1.6.: Παράδειγμα χημικής δομής μιας υδρολυμένης ταννίνης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και 8 μόρια γαλλικού οξέος.	13
Εικόνα 1.7.: Βασική χημική δομή στυλβενίων. (αριστερά) Χημική δομή ρεσβερατρόλης (τριυδροξυστυλβένιο) χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο των στυλβενίων που βρίσκονται στα σταφύλια. Γλυκοσυκλιωμένη μορφή ρεσβερατρόλης.	13
Εικόνα 1.8.: Βιοσύνθεση φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό	14
Εικόνα 1.9.: Διάγραμμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των φυτικών πολυφαινολών.	14
Εικόνα 1.10.: Μονοπάτι βιοσύνθεσης του καφεϊκού και του φερουλικού οξέος από το π-κουμαρικό οξύ.	15
Εικόνα 1.11.: Βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης. RS: συνθάση της ρεσβερατρόλης.	15
Εικόνα 1.12.: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού των πολυφαινολών.	17
Εικόνα 1.13.: 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.	20
Εικόνα 1.14.: Χημική δομή της κερκετίνης και της κατεχίνης καθώς και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα.	24
Εικόνα 1.15.: Πιθανές θέσεις χηλικής δέσμευσης μετάλλων στα φλαβονοειδή.	26
Εικόνα 1.16. Αντιδράσεις πολυφαινόλης με $\text{Cu}^{2+}$ .	28
Εικόνα 1.17.: Συμβολική αναπαράσταση της ισοροπίας της αντιοξειδωτικής και προ-οξειδωτικής των πολυφαινολών.	29
Εικόνα 1.18.: Χημική δομή του καφεϊκού οξέος	32
Εικόνα 1.19.: Χημική δομή φερουλικού οξέος (αριστερά). Σχηματισμός φερουλικού οξέος από το καφεϊκό οξύ (δεξιά).	33
Εικόνα 1.20.: 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.	34
Εικόνα 1.21.: Λευκό σταφύλι Ασύρτικο.	35
Εικόνα 1.22.: Χημική δομή της μιτομυκίνης C (αριστερά). Ανηγγμένη μορφή μιτομυκίνης C με δύο $2e^-$ (bifunctional activation). Η υδροκινόννη $\text{MCH}_2$ που είναι αυτή που αλκυλιώνει το DNA και οδηγεί στον σχηματισμό των cross-links (δεξιά).	37
Εικόνα 1.23.: Τρόπος σύνδεσης της ενεργοποιημένης μιτομυκίνης C τα μόρια γουανίνης του DNA και δημιουργία διάφορων cross-link adducts.	37
Εικόνα 2.1.: Σχηματική αναπαράσταση των χρωματιδιακών ανταλλαγών.	39
Εικόνα 2.2.: Σχηματική αναπαράσταση της αντικατάστασης της θυμίνης από BrdU κατά τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αυτοδιπλασιασμό του DNA και αντικατοπτρισμός αυτής της αντικατάστασης στην εμφάνιση των χρωμοσωμάτων.	41
Εικόνα 2.3. : Α) Πυρήνας $1^{15}$ μιτωτικής διαίρεσης. Β) Πυρήνας $2^{15}$ μιτωτικής διαίρεσης. Γ) Πυρήνας $3^{15}$ μιτωτικής διαίρεσης.	41
Εικόνα 2.4.: Σχηματική αναπαράσταση των μιτωτικών κύκλων κατά την 72 ωρών καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων	43
Εικόνα 3.1.: Καμπύλη των επαγόμενων από διάφορες συγκεντρώσεις μιτομυκίνης C,	51

χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων.	
Εικόνα 3.2.: Επίδραση του διαλύτη, μεθανόλης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	52
Εικόνα 3.3.: Επίδραση του διαλύτη, DMSO στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	53
Εικόνα 3.4.: Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	54
Εικόνα 3.5.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	55
Εικόνα 3.6.: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	56
Εικόνα 3.7.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	57
Εικόνα 3.8.: Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	58
Εικόνα 3.9.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του καφεϊκού οξέως στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	59
Εικόνα 3.10.: Επίδραση του φερουλικού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	60
Εικόνα 3.11.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του φερουλικού οξέως στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	61
Εικόνα 3.12.: Επίδραση της κατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	62
Εικόνα 3.13.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής της κατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	63
Εικόνα 3.14.: Επίδραση της επικατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	64
Εικόνα 3.15.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής της επικατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.	65



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες, οι οποίες βρίσκονται σε μια πληθώρα τροφίμων της καθημερινής διατροφής, και ιδιαίτερα οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στα σταφύλια και στο κρασί έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον λόγω των συνεχών ευεργετικών βιολογικών δράσεων που τους αποδίδονται. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι η αντικαρκινική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση πιθανών μηχανισμών χημειοπροστατευτικής, αντικαρκινικής δράσης εκχυλισμάτων σταφυλιών και πολυφαινολών που βρίσκονται σ' αυτά. Για την επίτευξη του στόχου παρατηρήθηκε η επίδραση δύο εκχυλισμάτων της ποικιλίας αμπέλου *Vitis Vinifera* Ασύρτικου Σαντορίνης καθώς και κάποιων καθαρών πολυφαινολών που βρίσκονται σ' αυτά (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, κατεχίνη, επικατεχίνη), στην επαγόμενη μεταλλαξιγένεση, δημιουργία των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες SCEs, από μιτομυκίνη C σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Η αναστολή σχηματισμού τους αντικατοπτρίζει κάποιον μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης, αφού η προστασία από μεταλλάξεις αποτελεί ένα βήμα προστασίας από την έναρξη της καρκινογένεσης. Παρόλα αυτά κανένα εκχύλισμα ούτε και κάποια από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες δεν παρουσίασε αναστολή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών, αντίθετα τα εκχυλίσματα και κάποιες από τις πολυφαινόλες σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις παρουσίασαν επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs παρουσία μιτομυκίνης C. Αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη της μεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων που τις περιέχουν. Ωστόσο το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα αύξησαν τον αριθμό των SCEs παρουσία μιτομυκίνης C ενώ μόνα τους δεν επηρέασαν τον αριθμό τους, ίσως υποδηλώνει μια επιλεκτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών στα φυσιολογικά κύτταρα έναντι κυττάρων που βρίσκονται κάτω από την επίδραση κάποιου μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Επίσης η ενίσχυση των βλαβών του DNA στα κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, μπορεί να τα οδηγεί σε απόπτωση η οποία είναι ένας σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας. Τέλος τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το καφεϊκό οξύ και η κατεχίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην χημειοθεραπεία για το λόγο ότι αύξησαν την δράση της μιτομυκίνης C, που χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- SCEs: Sister Chromatid Exchanges
- DMSO: διμέθυλο-σουλφοξείδιο
- Mit.C: μιτομυκίνη C
- PHA: Phytohemagglutinin
- FCS: Fetal Calf Serum
- BrdU: βρωμοδεόξυουριδίνη
- Fix : διάλυμα μονιμοποίησης
- PRI: Δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού
- ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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. (G.Soleas et al. 1997, A.Van de Wiel et al. 2001)

Από τότε το κρασί και γενικότερα το αλκοόλ αποτελεί σημαντικό κομμάτι τόσο της διατροφής όσο και του τρόπου ζωής. Το κρασί θεωρείται ότι δρα ως τονωτικό, διεγερτικό ακόμη και ως αναλγητικό. Ωστόσο έχει ενοχοποιηθεί, ιδιαίτερα όταν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες, για την συμβολή του σε πολλές ασθένειες όπως καρδιομυοπάθειες, κίρρωση ήπατος ακόμη και ορισμένες μορφές καρκίνου. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι μικρή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και ιδιαίτερα κρασιού (1-2 ποτά την ημέρα) μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία και μάλιστα να προστατεύει κυρίως από καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο (F.Bianchini et H.Vanio 2003). Η άποψη αυτή ξεκίνησε από την δεκαετία του 70, που επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην μείωση των θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις και στην κατανάλωση μέτριας ποσότητας αλκοόλ (A.Van de Wiel et al. 2001). Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία από τους Renaud και De Logeril το 1992. Με βάση την έρευνα αυτή παρατηρήθηκε το λεγόμενο «Γαλλικό παράδοξο», σύμφωνα με το οποίο στην Γαλλία, όπου υπήρχε κατανάλωση κρασιού, τα ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο ήταν χαμηλότερα από ότι σε άλλες βιομηχανικές χώρες αν και η κατανάλωση κορεσμένων λιπών, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα που συμβάλλει στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου, καθώς και άλλοι παράγοντες που μπορούν να συμβάλουν στην εμφάνισή της όπως υψηλή αρτηριακή πίεση, κάπνισμα, μεγάλο σωματικό βάρος, μικρή σωματική άσκηση κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα. (G.Soleas et. al. 1997, P-L.Teissedre et Landrault 2000). Με αφορμή αυτές τις παρατηρήσεις ξεκίνησε μία σειρά ερευνών με σκοπό την εξακρίβωση της δράσης του κρασιού, αν η δράση αυτή είναι τελικά ευεργετική και ποια συστατικά του κρασιού και των σταφυλιών ευθύνονται γι' αυτή.

### 1.1. Χημική σύσταση του κρασιού – σταφυλιών

Το κρασί είναι ένα ποτό το οποίο είναι πλούσιο σε πολλές ενώσεις, γύρω στις 500 ουσίες έχουν αναγνωριστεί στο κρασί από τις οποίες η πλειοψηφία προέρχεται από τα σταφύλια και κάποιες είναι μεταβολικά παραπροϊόντα της ζύμωσης του σακχαρομύκητα. Οι περισσότερες από αυτές βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις γύρω στα  $10^{-1}$  με  $10^{-6}$ mg/L ενώ κάποιες υπάρχουν σε συγκεντρώσεις γύρω στα 100mg/L. Ωστόσο η ακριβής σύσταση του κρασιού και των σταφυλιών δεν είναι απόλυτα γνωστή. Οι σημαντικότερες ενώσεις που βρίσκονται στο κρασί είναι το νερό, τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα, η γλυκερόλη, (>100mg/L), η αιθανόλη (10-14%), οι αρωματικές ενώσεις (0,8-1,2g/L) και οι πολυφαινόλες η συγκέντρωση των οποίων διαφέρει ανάμεσα στο λευκό και το κόκκινο κρασί, με μεγαλύτερη στο κόκκινο κρασί. Κάθε μία από τις ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνη για την σταθερότητα, την γεύση, το άρωμα και τα άλλα χαρακτηριστικά του κρασιού. (G.Soleas et al. 1997, A. Van de Wiel et al. 2001)

Από αυτές τις ενώσεις οι πιο σημαντικές οι οποίες έχουν συσχετιστεί με την πιθανή προστατευτική, ευεργετική δράση του κρασιού είναι η αιθανόλη και οι πολυφαινόλες. Η αιθανόλη φαίνεται να σχετίζεται με την προστατευτική δράση του κρασιού απέναντι κυρίως στις καρδιαγγειακές παθήσεις λόγω της ικανότητάς της να αυξάνει τα ποσοστά της HDL (high-density lipoprotein) της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης και μειώνει την συγκόλληση των

αιμοπεταλίων. Ωστόσο επειδή η αιθανόλη έχει βρεθεί ότι δρα σαν ένας παράγοντας που συμβάλλει στην εμφάνιση του καρκίνου αυξάνοντας την ενεργοποίηση των καρκινογόνων, το οξειδωτικό στρες και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είναι πιο πιθανό η προστατευτική δράση του κρασιού απέναντι κυρίως στον καρκίνο να οφείλεται στην παρουσία των πολυφαινόλων παρά της αιθανόλης (F. Bianchini et H.Vanio 2003).

## 1.2. Πολυφαινόλες

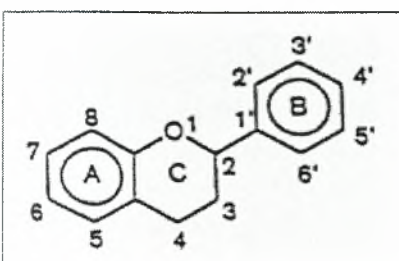
Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, στα φρούτα στα λαχανικά και κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί. Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων σε πολλά ανώτερα φυτά, ενώ εκατοντάδες από αυτές έχουν αναγνωριστεί στα εδάδιμα φυτά. Οι πολυφαινόλες έχουν χαρακτηριστική δομή η οποία αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες δεσμευμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Αυτά τα μόρια είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπερϊώδη 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)

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 και τα στιλβένια.

### 1.2.1. Φλαβονοειδή

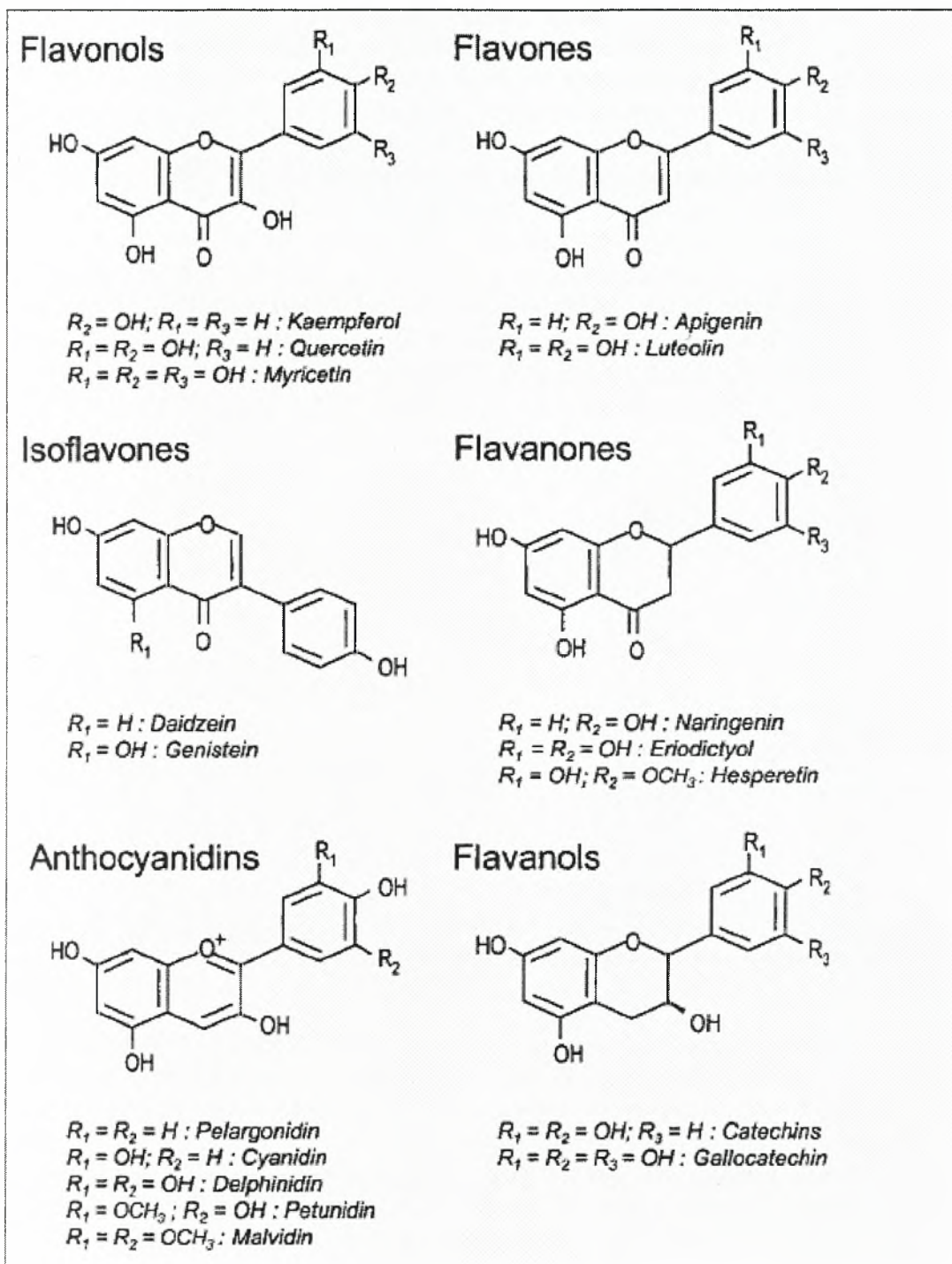
Είναι μία ομάδα που αποτελείται από περισσότερες από 4000 φαινολικές ενώσεις που η βασική χημική τους δομή φαίνεται στην Εικόνα 1.1.. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με ένα ανθρακικό πυρανικό 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 περισσότερα φλαβονοειδή βρίσκονται στην φύση κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών. Τα σάκχαρα είναι συνήθως συνδεδεμένα με τις υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται στον Α δακτύλιο της δομής των φλαβονοειδών, ωστόσο πιο συχνά το σάκχαρο είναι συνδεδεμένο με την υδροξυλική ομάδα του άνθρακα που βρίσκεται στην θέση 3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου (Εικόνα 1.1.). Ανάλογα με το σάκχαρο που συμμετέχει διαφοροποιούνται και οι ιδιότητές τους (Καράταγλης 1994).

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες οι οποίες είναι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες). Η βασική χημική δομή τους φαίνεται στην Εικόνα 1.2.(C. Manach et al. 2004).



Εικόνα 1.1. : Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών. Α, Β είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώ C είναι ο ανθρακικός πυρανικός δακτύλιος. (A. Van de Wiel et al. 2001)





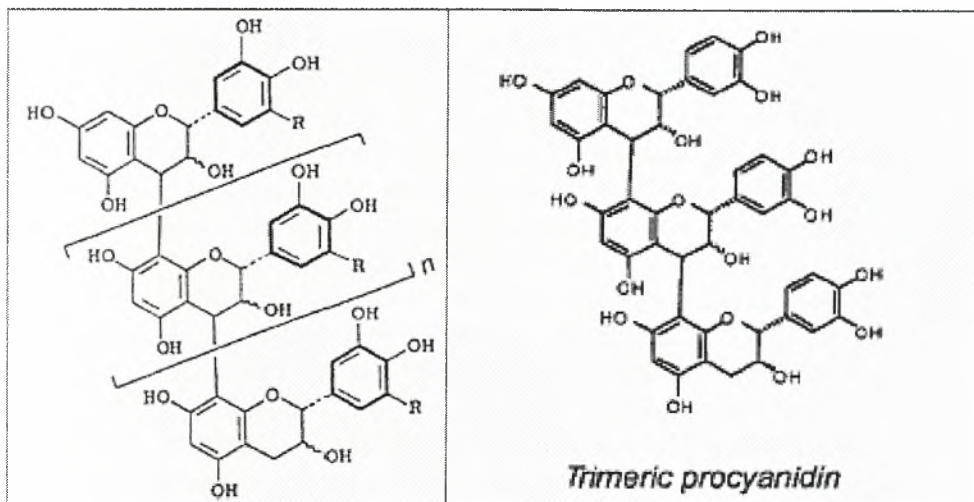
Εικόνα 1.2.: Βασικές χημικές δομές των πολυφαινόλων της οικογένειας των φλαβονοειδών (C. Manach et al. 2004)

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 ( $\leq 50\text{mg/L}$ ) (G.Soleas et al. 1997). Η περιεκτικότητα τους στις κύριες διατροφικές πηγές τους φαίνονται στον Πίνακα 1.1..

Οι φλαβονόλες είναι από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή που βρίσκονται στα τρόφιμα με πιο αντιπροσωπευτική την κερκετίνη και την ρουτίνη και βρίσκονται κυρίως στις γλυκοσυλιωμένες μορφές τους. Οι φλαβόνες είναι λιγότερο κοινές στα φρούτα και τα

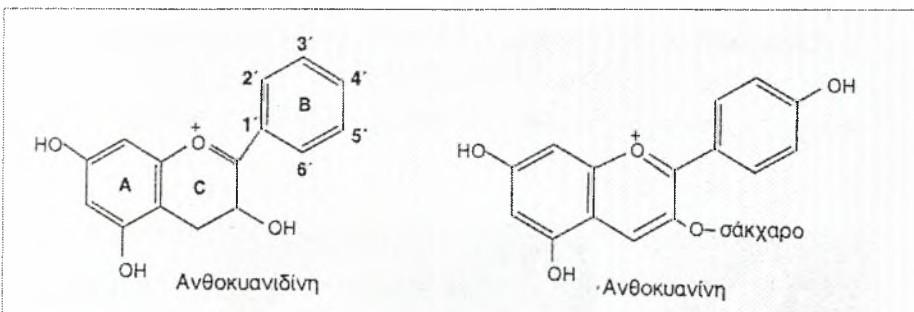
λαχανικά, ενώ μεγάλες ποσότητες πολυμεθοξυλιωμένων φλαβονών βρίσκονται στα κίτρα. Οι πολυμεθοξυλιωμένες φλαβόνες είναι τα πιο υδρόφοβα φλαβονοειδή.

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 1.3. αριστερά) που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς ανάμεσα στον άθρακα C4 και C8 (ή C6) των ενώσεων (Εικόνα 1.3. 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. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν οι φλαβανόλες είναι ότι, σε αντίθεση με τα άλλα φλαβονοειδή δεν βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένες μορφές στα τρόφιμα (C.Manach et al. 2004).



Εικόνα 1.3.: Βασική χημική δομή των πολυμερών των συμπυκνωμένων ταννινών, προανθοκυανιδινών (αριστερά) (G.Soleas et al. 1997). (δεξιά) Παράδειγμα χημικής δομής μιας τριμερούς προανθοκυανιδίνης (C. Manach et al. 2004).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την γλυκοσυλιωμένη μορφή των ανθοκυανιδινών (Εικόνα 1.4.). 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/L.(C. Manach et al. 2004)



Εικόνα 1.4.: Βασική χημική δομή ανθοκυανιδίνης και της γλυκοσυλιωμένης ανθοκυανίνης. (Καράταγλης 1994)

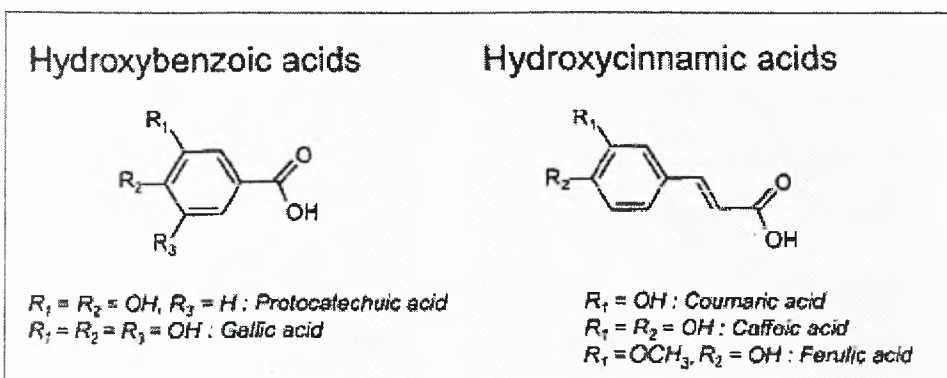
Πίνακας 1.1.: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, τα χαρακτηριστικά μέλη των ομάδων αυτών και τα τρόφιμα τα οποία αποτελούν σημαντικές διατροφικές πηγές τους. (C. Manach et al. 2004, Nijveldt et al. 2001, W.Ren et al. 2003)

Ομάδα Φλαβονοειδών	Χαρακτηριστικές πολυφαινόλες	Κύριες διατροφικές πηγές
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
Φλαβανόλες	Κατεχίνη, Επικατεχίνη	σταφύλια, τσάι, σοκολάτα
Ανθοκυανίνες	Κυανιδίνη, Μαλβιδίνη	σταφύλια, κεράσια, βατόμουρα, τσάι, φράουλες

### 1.2.2. Φαινολικά οξέα

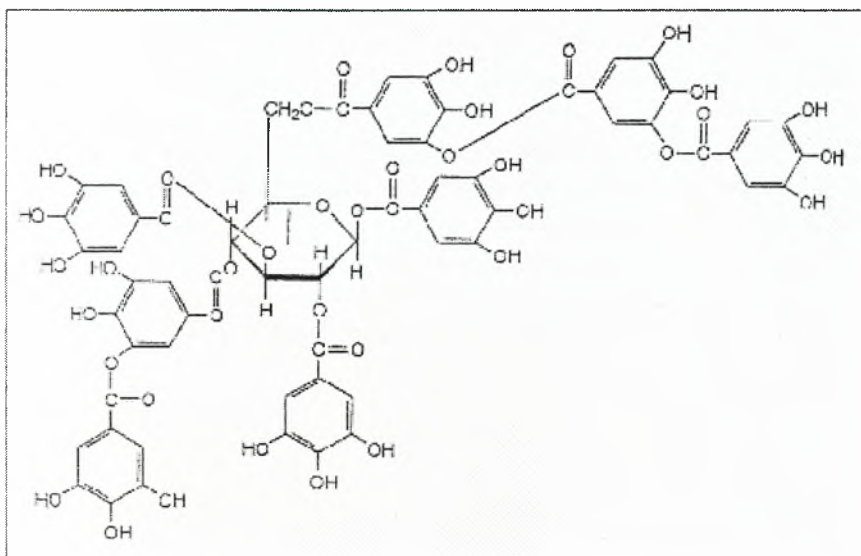
Τα φαινολικά οξέα είναι απλούστερα στην δομή από τα φλαβονοειδή και αποτελούνται από έναν αρωματικό, βενζοϊκό δακτύλιο. Διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6-C1) και στα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέως αντίστοιχα (Εικόνα 1.5.). Βρίσκονται στα σταφύλια στα κενοτόπια των κυττάρων τους και απελευθερώνονται κατά το στάδιο πίεσης των σταφυλιών κατά την παραγωγή του κρασιού. Από τους πιο χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους των υδροξυβενζοϊκών οξέων που βρίσκονται στα σταφύλια είναι το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το ελλαγικό οξύ, ενώ των υδροξυκινναμικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το φερούλικό 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 1.6.). Τα μόρια των υδατοδιαλυτών ταννινών είναι μικρότερα από αυτά των συμπυκνωμένων ταννινών και σε όζινες 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 εδάφιμα φυτά και στο κρασί η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από αν το κρασί ωρίμασε σε βαρέλια από ξύλο βελανιδιάς. Τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων που βρίσκονται σε μια ποικιλία τροφίμων, βρίσκονται σ' αυτά είτε ελεύθερα, είτε εστεροποιημένα με σάκχαρα, οργανικά οξέα ή διάφορες αλκοόλες. (G.Soleas et al. 1997, C. Manach et al. 2004)



Εικόνα 1.5.: Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων, υδροξυβενζοϊκά – υδροξυκινναμικά οξέα. (C. Manach et al. 2004)

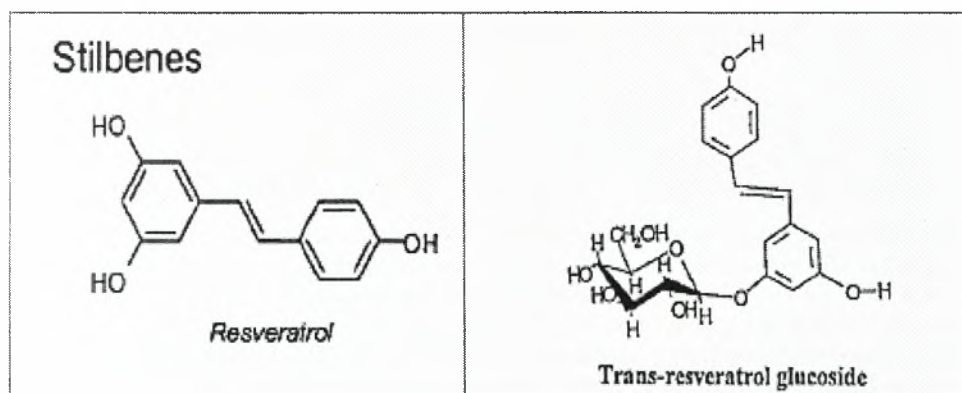




Εικόνα 1.6.: Παράδειγμα χημικής δομής μιας υδρολυμένης ταννίνης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και 8 μόρια γαλλικού οξέος. (Καράταγλης 1994)

### 1.2.3. Στιλβένια

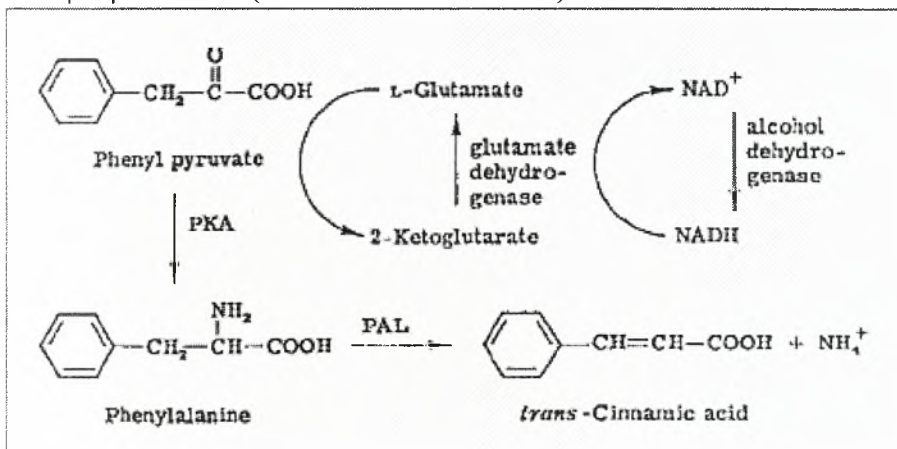
Τα στιλβένια είναι μία ακόμη ομάδα φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών. Ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες (phytoalexins) οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά την διάρκεια περιβαλλοντικού stress, όπως είναι οι μεταβολές του καιρού, τραυματισμός από έντομα ή μόλυνση από διάφορα παθογόνα (κυρίως μύκητες). Η βασική τους χημική δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μία γέφυρα μεθυλενίου. Υπάρχει μια ποικιλία ενώσεων που διαφέρουν ως προς την θέση και τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με τους αρωματικούς δακτυλίους, ως προς τον βαθμό κατά τον οποίο οι ομάδες αυτές συνδέονται με σάκχαρα, μεθυλομάδες, μεθοξυλομάδες και άλλα κατάλοιπα, ως προς τη στεreoχημική τους διαμόρφωση στο χώρο και ως προς την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε αντιδράσεις για τον σχηματισμό πολυμερών (G.Soleas et al. 1997). Από τα πιο μελετημένα και τα πιο χαρακτηριστικά στιλβένια που βρίσκονται στα σταφύλια και στο κρασί είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη (Εικόνα 1.7. δεξιά). 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 (F.Bianchini, H. Vanio 2003).



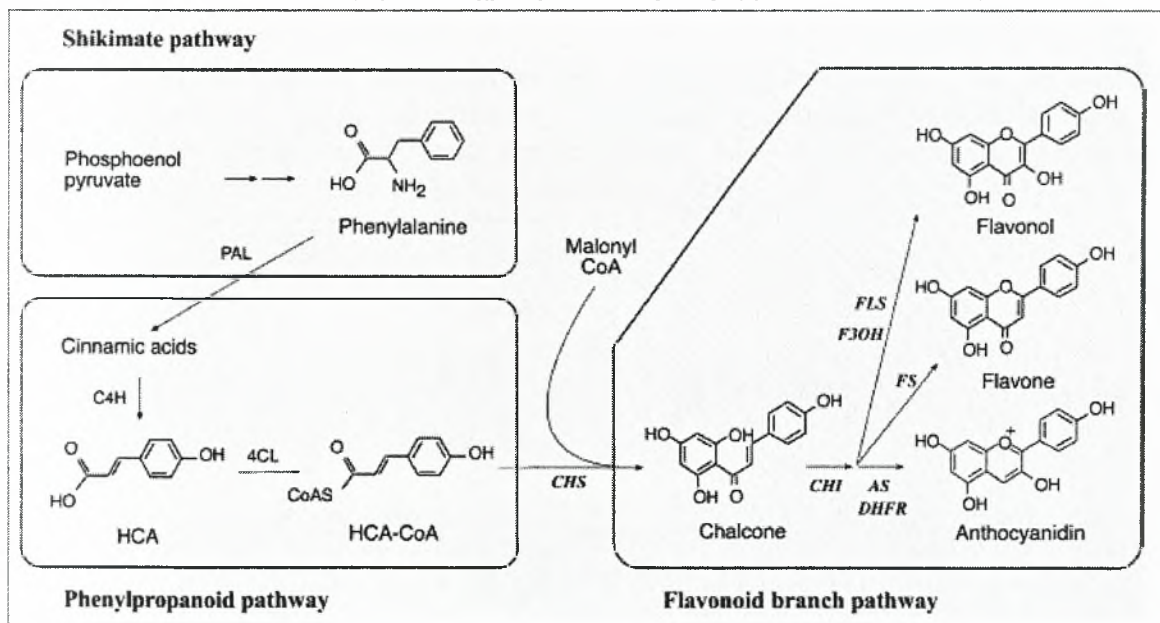
Εικόνα 1.7.: Βασική χημική δομή στιλβενίων. (αριστερά) Χημική δομή ρεσβερατρόλης (τριυδροξυστιλβένιο) χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο των στιλβενίων που βρίσκονται στα σταφύλια. (C. Manach et al. 2004) (δεξιά) Γλυκοσυκλωμένη μορφή ρεσβερατρόλης. (G.Soleas et al. 1997)

### 1.3. Βιοσύνθεση πολυφαινολών

Τα υδροξυκιναμικά οξέα (C6-C3) και τα φλαβονοειδή (C6-C3-C6) παράγονται από την φαινυλαλανίνη. Το πρώτο στάδιο για την βιοσύνθεσή τους προϋποθέτει το σχηματισμό της φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό (Εικόνα 1.8.) (G.Soleas et al.1997) και την μετατροπή της σε κινναμικό οξύ μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέως. Στην συνέχεια τα υδροξυκιναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή παράγονται μέσω του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλοπροπανοειδή και του ειδικού μονοπατιού για τα φλαβονοειδή. Η Εικόνα 1.9. συνοψίζει τα μονοπάτια βιοσύνθεσης και τις βασικές χημικές δομές των υδροξυκιναμικών οξέων και των φλαβονοειδών.(Y.Sakihama et al. 2002)

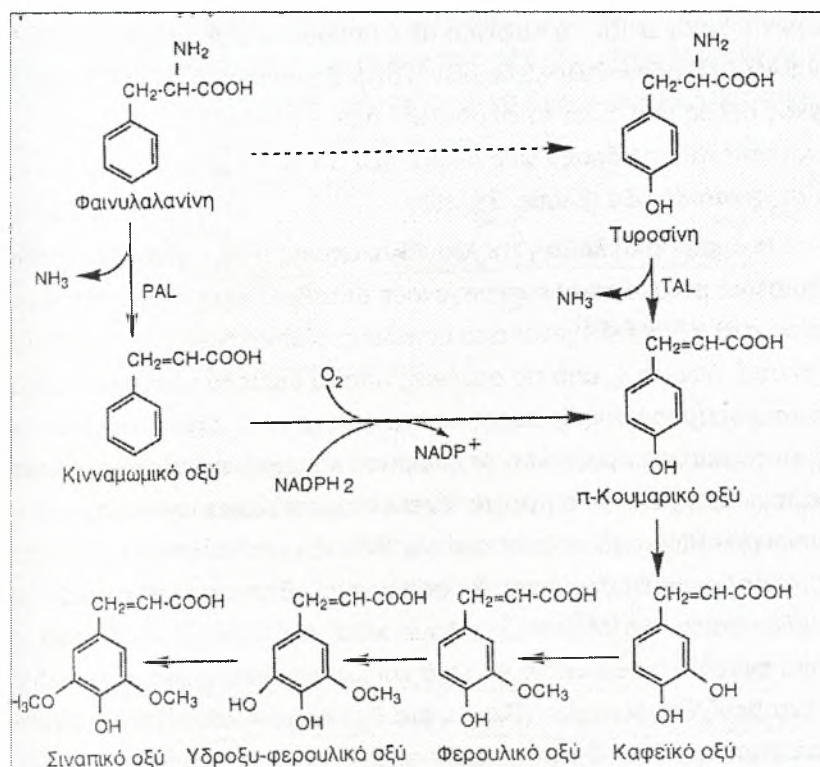


Εικόνα 1.8.: Βιοσύνθεση φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό (μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέως) μέσω της αμινοτρανσφεράσης του L-φαινυλαλανιν-2-κετογλουταρικού (PKA) παρουσία L-γλουταμικού. Στην συνέχεια μέσω της λύσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL) ακολουθεί η μετατροπή της σε κινναμικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση αμμωνιακών ιόντων. (G.Soleas et al. 1997)



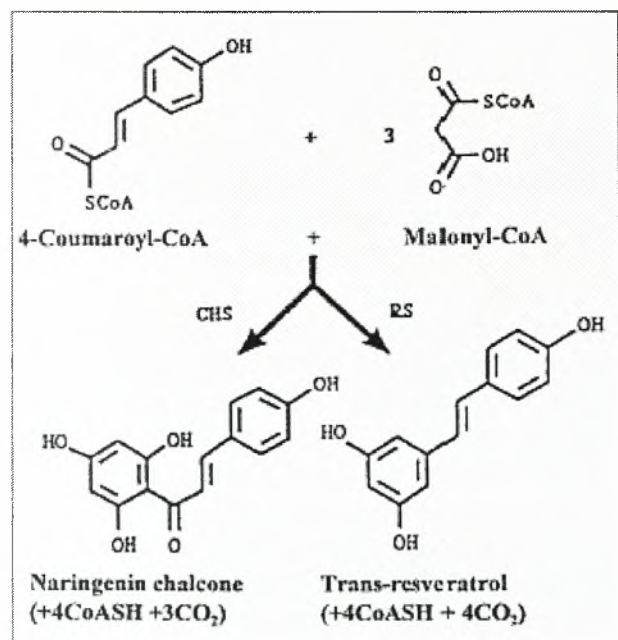
Εικόνα 1.9.: Διάγραμμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των φυτικών πολυφαινολών. Τα υδροξυκιναμικά οξέα (HCAs) και τα φλαβονοειδή παράγονται από το κινναμικό οξύ το οποίο παράγεται από την φαινυλαλανίνη μέσω της λύσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL). Το κινναμικό οξύ μετατρέπεται σε HCAs μέσω της cinnamate-4 υδροξυλάσης (C4H) και μιας ο-μεθυλτρανσφεράσης. Το ένζυμο 4-κουμαράση:CoA-λιγάση (4CL) καταλύει τον σχηματισμό του υδροξυκιναμοϋλ-CoA (HCA-CoA) και αυτά τα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα χρησιμοποιούνται την βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και της λιγνίνης. Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με την συμπύκνωση του HCA-CoA με 3 μόρια μαλόνυλ-CoA, η οποία καταλύεται από την συνθάση της χαλκόνης (CHS). Στην συνέχεια η χαλκόνη μετατρέπεται σε διάφορα φλαβονοειδή όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες. CHI: ισομεράση της χαλκόνης, F3OH: υδροξυλάση της 3-φλαβονόλης, ISF: συνθάση ισοφλαβονόλης, FS: συνθάση φλαβονόλης, FLS: συνθάση φλαβονόλης, DHFR: ρεδοκτάση της διυδροφλαβονόλης, AS: συνθάση ανθοκυανίνης. (Y.Sakihama et al. 2002)

Τα δύο πιο αντιπροσωπευτικά υδροξυκιναμικά οξέα το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ παράγονται από το π-κουμαρικό οξύ το οποίο παράγεται από το κινναμικό οξύ (κινναμωνικό οξύ) (Εικόνα 1.10.). (Καράταγλης 1994)



Εικόνα 1.10.: Μονοπάτι βιοσύνθεσης του καφεϊκού και του φερουλικού οξέος από το π-κουμαρικό οξύ. (Καράταγλης 1994)

Η *trans*- ρεσβερατρόλη, που είναι το πιο χαρακτηριστικό στυλβένιο που βρίσκεται στα σταφύλια παράγεται μέσω συμπύκνωσης ενός μορίου π-κουμάρυλο-CoA με τρία μόρια μαλόνυλο-CoA μέσω της δράσης της συνθάσης των στυλβενίων, της συνθάσης της ρεσβερατρόλης (RS) (Εικόνα 1.11.). (G.Soleas et al. 1997)



Εικόνα 1.11.: Βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης. RS: συνθάση της ρεσβερατρόλης. CHS: συνθάση της χαλκόνης. (G.Soleas et al. 1997)



#### 1.4. Βιοδιαθεσιμότητα – Μεταβολισμός των πολυφαινολών

Οι βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται από την βιοδιαθεσιμότητά τους μέσα στον οργανισμό. Μπορεί μία πολυφαινόλη να βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής όμως η δράση της μέσα στον οργανισμό να είναι μικρή γιατί δεν απορροφάται από το έντερο ή απομακρύνεται πολύ γρήγορα από τον οργανισμό (C. Manach et al. 2004). Οι πολυφαινόλες βρίσκονται στα τρόφιμα έχοντας διάφορες χημικές δομές, είτε ελεύθερες, είτε γλυκοσυλιωμένες, είτε ως πολυμερή. Η χημική δομή τους επηρεάζει τον ρυθμό και την έκταση της απορρόφησής τους από το έντερο, τον μεταβολισμό τους καθώς και την φύση των μεταβολιτών τους που θα κυκλοφορούν στο πλάσμα (A.Scaltbert et Williamson 2000).

Όταν οι πολυφαινόλες είναι γλυκοσυλιωμένες ή με την μορφή πολυμερών δεν μπορούν να απορροφηθούν από τον οργανισμό σε αυτή τη μορφή. Οι ενώσεις αυτές θα πρέπει να υδρολυθούν για να μπορέσουν να απορροφηθούν. Στις γλυκοσυλιωμένες πολυφαινόλες, όπως τα περισσότερα φλαβονοειδή εκτός από τις φλαβανόλες, η μονάδα του σακχάρου είναι συνήθως η γλυκόζη, καθώς και άλλα σάκχαρα όπως ραμνόζη, ξυλόζη, αραβινόζη. Το πρώτο στάδιο του μεταβολισμού τους είναι η απομάκρυνση του σακχάρου η οποία δεν συμβαίνει από τα ένζυμα του στομάχου αλλά από εντερικά ένζυμα όπως είναι τις  $\beta$ -γλυκοσιδάσες καθώς και από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Στην περίπτωση που το σάκχαρο είναι ραμνόζη από τις ραμνοσιδάσες της μικροχλωρίδας, προτού απορροφηθούν. Εξάιρεση αποτελούν οι ανθοκυανίνες επειδή η μορφή που έχουν μέσα στον οργανισμό είναι η γλυκοσυλιωμένη μορφή. Επειδή η μη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή είναι ασταθής οι ανθοκυανίνες απορροφώνται από ένα ειδικό μηχανισμό απορρόφησης που δεν περιλαμβάνει την απομάκρυνση του σακχάρου (C. Manach et al. 2004). Οι πολυμερείς πολυφαινόλες, όπως οι ταννίνες, (ελλαγιταννίνες, γαλλοταννίνες) έχοντας μεγάλο μοριακό βάρος δεν μπορούν εύκολα να απορροφηθούν. Κάτω από τις όξινες συνθήκες του στομάχου ή από την μικροχλωρίδα του εντέρου υδρολύονται σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους που είναι ευκολότερο να απορροφηθούν (A.Scaltbert et Williamson 2000). Εξάιρεση αποτελούν οι προανθοκυανιδίνες, οι οποίες επειδή είναι από τις πιο άφθονες πολυφαινόλες στα τρόφιμα απορροφώνται σε πολύ μικρό βαθμό. Έχει βρεθεί ότι *in vivo*, απορροφώνται μόνο διμερείς και τριμερείς προανθοκυανιδίνες στο λεπτό έντερο γιατί ενώ θα μπορούσαν να υδρολυθούν σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους κάτω από τις όξινες συνθήκες του στομάχου, οι προανθοκυανιδίνες είναι ανθεκτικές στις συνθήκες αυτές (C. Manach et al. 2004).

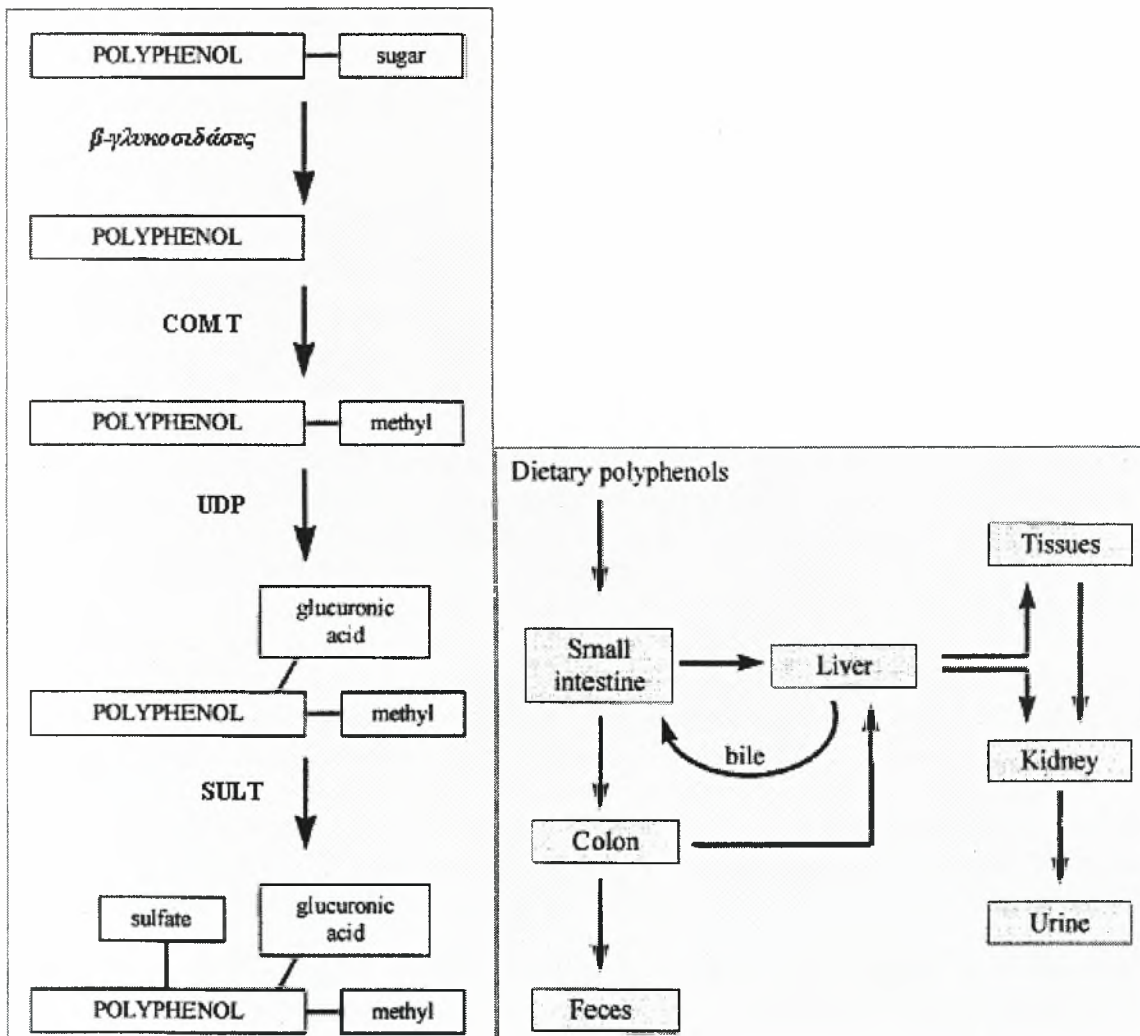
Κατά την πορεία της απορρόφησης οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται από τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών στο λεπτό έντερο και στο ήπαρ. Τα ένζυμα αυτά που είναι κυρίως οι κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες (COMT), γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες (UDP) και οι σουλφοτρανσφεράσες (SULT) οι οποίες προσθέτουν μεθυλικές, γλυκουρονικές καιθειικές ομάδες αντίστοιχα (P.A.Kroon et al.2004, C. Manach et al. 2004). Οι πολυφαινόλες υπάρχουν στο αίμα με τις υποκατεστημένες τους μορφές, τους μεταβολίτες τους και ορισμένες φορές με τις ελεύθερές τους μορφές. Απομακρύνονται μέσω των ούρων και της χολής. Όταν απομακρύνονται μέσω της χολικής οδού απελευθερώνονται πίσω στο έντερο όπου ξανάμεταβολίζονται και μπορεί να ξανααπορροφηθούν (Εικόνα 1.12.).

Τα φαινολικά οξέα και ιδιαίτερα τα υδροξυκιναμικά οξέα, όταν βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους απορροφώνται πολύ γρήγορα από το λεπτό έντερο και συνδέονται κυρίως με γλυκουρονικό οξύ, όπως τα φλαβονοειδή. Ωστόσο τα φαινολικά οξέα είναι συνήθως εστεροποιημένα (πχ. χλωρογενικό οξύ) στα τρόφιμα και αυτό επηρεάζει την απορρόφησή τους. Οι ανθρώπινοι ιστοί (βλενογόνος του λεπτού εντέρου, ήπαρ) και τα βιολογικά υγρά (πλάσμα, γαστρικό υγρό) δεν περιέχουν ένζυμα τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν αυτή την υδρόλυση. Αυτό γίνεται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται στην εντερική μικροχλωρίδα. Γενικότερα η απορρόφηση των φαινολικών οξέων μειώνεται όταν αυτά είναι εστεροποιημένα (C. Manach et al. 2004). Οι φλαβανόλες όπως η επικατεχίνη βρίσκονται στα τρόφιμα ακυλομένες κυρίως με γαλλικό οξύ. Σε αυτή την μορφή δεν χρειάζεται να υδρολυθούν για να

αποροφηθούν αλλά διαχέονται διαμέσω των κυτταρικών μεμβρανών (A.Scalbert et Williamson 2000).

Όσες πολυφαινόλες δεν μπόρεσαν να απορροφηθούν στο στομάχι ή στο λεπτό έντερο φτάνουν στο παχύ έντερο. Εκεί φτάνουν και οι πολυφαινόλες που απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ και εκκρίνονται στην χολή ή από τα εντεροκύτταρα πάλι πίσω στο λεπτό έντερο, με διαφορετική όμως δομή, για παράδειγμα με την μορφή γλυκουρονιδίου. Η εντερική μικροχλωρίδα απομακρύνει τα σάκχαρα και τις πρόσθετες ομάδες από τις πολυφαινόλες φέροντας ισχυρά υδρολυτικά ένζυμα και τις μετατρέπει σε απλούστερα οργανικά οξέα τα οποία στην συνέχεια απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ (A.Scalbert et Williamson 2000, P.A. Kroon et al.2004).

Από το μονοπάτι μεταβολισμού των πολυφαινολών φαίνεται ότι βρίσκονται στον οργανισμό κυρίως με την συζευγμένη τους μορφή. Οι μορφές αυτές έχουν διαφορετικό σχήμα, πολικότητα, ιονική ισχύ σε σχέση με την αρχική πολυφαινόλη. Αυτό ίσως αντικατοπτρίζει κάποια διαφορά ανάμεσα στις ιδιότητες ανάμεσα στην αρχική πολυφαινόλη και στην συζευγμένη, ωστόσο πάνω σ' αυτό υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις και πολλά πράγματα ακόμη να διαλευκανθούν (P.A. Kroon et al.2004, A.R. Rechner et al.2001).



Εικόνα 1.12.: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού των πολυφαινολών. COMT: κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες, UDP: UDP γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες, SULT: σουλφοτρανσφεράσες (δεξιά). Πιθανή πορεία μεταβολισμού των πολυφαινολών στον άνθρωπο (αριστερά). (A.Scalbert et Williamson 2000)

## 1.5. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινόλων

Στις πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές δράσεις. Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού παρουσιάζουν ευεργετική δράση απέναντι στις καρδιαγγειακές παθήσεις με βάση το «Γαλλικό παράδοξο», και κυρίως απέναντι στην στεφανιαία νόσο, και στην αρτηριοσκλήρυνση. Η δράση τους αυτή αποδόθηκε στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL (Low Density Lipoprotein) και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που αποτελούν γεγονότα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (G.Soleas et. al. 1997, R.J.Nijveldt et al. 2001). Άλλες βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι έχουν, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντικτική δράση και δρουν κατά της οστεοπόρωσης (Y.Yilmaz et.al. 2004, R.J.Nijveldt et al. 2001). Ωστόσο ένα πλήθος από επιδημιολογικές μελέτες, και πειραμάτων τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*, δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς αντικαρκινικούς, χημειοπροστατευτικούς παράγοντες (W.Ren et al. 2003). Οι αντιοξειδωτικές και οι αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες που παρουσιάζουν ορισμένες πολυφαινόλες είναι αυτές οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με τις περισσότερες βιολογικές δράσεις τους και κυρίως με την αντικαρκινική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Ωστόσο κάποιες από τις πολυφαινόλες παρουσιάζουν και μεταλλαξιγόνο, προ-οξειδωτική δράση.

### **1.5.1. Αντικαρκινική δράση των πολυφαινόλων**

Μία πληθώρα επιδημιολογικών ερευνών έχουν συσχετίσει την υψηλή κατανάλωση πολυφαινόλων, κυρίως φλαβονοειδών, με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνων στους ανθρώπους. Την συσχέτιση αυτή επιβεβαιώνουν πολλά πειράματα τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* τα οποία δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες έχουν προστατευτική δράση απέναντι στον καρκίνο επιδρώντας με διάφορους τρόπους και στα τρία βασικά στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας που είναι το αρχικό στάδιο, η φάση της μύησης (initiation), το στάδιο προαγωγής (promotion) και το στάδιο προόδου (progression) της καρκινογένεσης (W.Ren et al. 2003, Y.Kuroda et Hara 1999).

Για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας βασική προϋπόθεση είναι η πρόκληση βλαβών στο γενετικό υλικό. Αυτό συμβαίνει στην φάση μύησης της καρκινογενετικής διαδικασίας στην οποία κάποιος καρκινογόνος, μεταλλαξιγόνος παράγοντας προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό. Οι πολυφαινόλες προστατεύουν στο στάδιο αυτό εμποδίζοντας είτε τον σχηματισμό του καρκινογόνου, μεταλλαξιγόνου παράγοντα, είτε εμποδίζοντας την δράση του. Αυτό επιτυγχάνεται με την ιδιότητα που παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες να αναστέλλουν ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού (πχ. κυτόχρωμα P450), που συμβάλουν στην ενεργοποίηση πολλών προκαρκινογόνων, να επάγουν ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, που συμβάλουν στην απομάκρυνση πολλών καρκινογόνων-μεταλλαξιγόνων παραγόντων, καθώς και με την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους. Συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση δύο ισοενζύμων του P450, της CYP1A1 και CYP1A2, ενώ επάγουν την δράση της τρανφεράσης της γλουταθειόνης και της UDP-γλυκουρόνυλο τρασφεράσης που είναι ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού (W.Ren et al. 2003).

Στα επόμενα δύο στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (promotion, progression), οι πολυφαινόλες μπορεί να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες παρεμποδίζοντας με διάφορους τρόπους την νεοπλασματική ανάπτυξη. Η δράση τους αυτή έχει αποδοθεί στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να επάγουν την απόπτωση και την διαφοροποίηση και να αναστέλλουν την αγγειογένεση. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτυγχάνεται με την παρεμπόδιση σηματοδοτικών μονοπατιών που θα οδηγούσαν στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω αναστολής ενζύμων κλειδιών στα μονοπάτια αυτά (πχ PKC), με την αναστολή οξειδωτικών ενζύμων που επάγουν ή ενεργοποιούν προαγωγείς καρκινογένεσης (πχ. κυκλοοξειγενάση COX, λιποοξειγενάση)



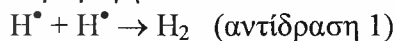
καθώς και ενζύμων που συμβάλουν στην σύνθεση του DNA (πχ. αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης) (W.Rep et al. 2003). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι κάποιες πολυφαινόλες αναστέλλουν την δράση των ενζύμων της τοποϊσομεράσης I/II οι οποίες εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα καρκινικά κύτταρα και είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA. Συγκεκριμένα κάποιες πολυφαινόλες των σταφυλίων παρουσίασαν την ικανότητα να μειώνουν την δράση της τοποϊσομεράσης I. (D.Stagos et al. 2005)

### 1.5.2. Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών

#### Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια τα οποία παράγονται από διάφορες διαδικασίες ακόμη και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Ως ελεύθερη ρίζα χαρακτηρίζεται ένα μόριο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Είναι μόρια πολύ ασταθή, αλλά πολύ ενεργά. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. 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 οιθειούχες ρίζες ( $RS^{\bullet}$ ). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το  $O_2^{\bullet}$ , και το  $OH^{\bullet}$ . Στις ROS όμως εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $COCl$ ) καθώς και οι δραστικές μορφές αζώτου όπως το  $NO^{\bullet}$  και το  $NO_2^{\bullet}$ . (B. Halliwell 2001, Y-Z.Fang et al. 2002)

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν μεταξύ τους αλλά και με διάφορα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της, ωστόσο αυτό δεν συμβαίνει πάντα, γιατί μπορεί η ένωση που παράγεται να είναι πιο δραστική. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της πρώτης περίπτωσης είναι αντίδραση ανάμεσα σε δύο άτομα υδρογόνου που οδηγούν στον σχηματισμό του διατομικού υδρογόνου (αντίδραση 1), ενώ της δεύτερης περίπτωσης είναι η αντίδραση της ρίζας του σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet}$  με την ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου  $NO^{\bullet}$  που οδηγούν στον σχηματισμό του περοξυνιτρίτη  $ONOO^-$  (αντίδραση 2) ο οποίος είναι πιο δραστικός από τις δύο ελεύθερες ρίζες που οδήγησαν στην παραγωγή του.



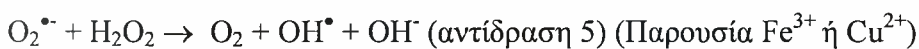
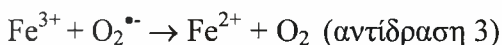
Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιολογικά μόρια, παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορεί να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά καταλήγωντας σε καταστροφικές συνέπειες για τον οργανισμό.

Έτσι οι ελεύθερες ρίζες, σαν πολύ δραστικά μόρια, έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές επιβλαβείς δράσεις μέσα στον οργανισμό. Έχει βρεθεί ότι αντιδρούν με τις πρωτεΐνες και τις μετουσιώνουν, ότι αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA οδηγώντας στην δημιουργία μεταλλάξεων και ότι αντιδρούν με τα λιπίδια των μεμβρανών οξειδώνοντάς τα. Χαρακτηριστική είναι η δράση της ρίζας του υδροξυλίου  $OH^{\bullet}$ , που είναι μια πολύ δραστική ρίζα η οποία αντιδρά με οτιδήποτε βρίσκεται κοντά στην περιοχή που παράγεται. Παράγεται συνήθως όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία διασπά τους δεσμούς O-H στο νερό, που είναι το πιο άφθονο συστατικό των κυττάρων, οδηγώντας στην παραγωγή των ριζών  $OH^{\bullet}$  και  $H^{\bullet}$ . Στην Εικόνα 1.13. φαίνονται οι αντιδράσεις με τις οποίες έστω και μία ρίζα  $OH^{\bullet}$  αντιδρώντας με υδρογονάνθρακες συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωση των λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων η οποία μπορεί να οδηγήσει στην συνέχεια στον θάνατό τους (B. Halliwell 2001, C.Mylonas, D. 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
	$L-O-OH \rightarrow L-O-O^\bullet, LO^\bullet, \text{αλδεϋδες}$

Εικόνα 1.13.: 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. (αριστερά) Αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου  $OH^\bullet$  με υδρογονάνθρακες, συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων (LH), που οδηγούν στον σχηματισμό μιας ρίζας με κεντρικό μόριο τον άνθρακα ( $-C^\bullet$ ) η οποία στην συνέχεια αντιδρά με ένα μόριο  $O_2$  οδηγώντας στον σχηματισμό μιας ρίζας περοξυλίου (peroxyl radical), η οποία με την σειρά της μπορεί να αντιδράσει με έναν νέο υδρογονάνθρακα οδηγώντας στον σχηματισμό νέας ρίζας η οποία μπορεί να ξαναξεκινήσει τον κύκλο των αντιδράσεων (B. Halliwell 2001). (δεξιά) Γενική σειρά αντιδράσεων με τις οποίες έστω και μία ελεύθερη ρίζα ( $R^\bullet$ ) μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξείδωση των λιπιδίων και στον σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών (C.Mylonas, D. Kouretas 1999).

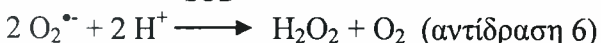
Οι ρίζες υδροξυλίου  $OH^\bullet$  παράγονται επίσης από τις ρίζες σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$  και υπεροξειδίου του υδρογόνου  $H_2O_2$  μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (αντιδράσεις 3,4,5) και της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 4) αντίστοιχα παρουσία μετάλλων ιόντων σιδήρου (Fe) ή χαλκού (Cu) (B. Halliwell 2001, C.Mylonas, D.Kouretas 1999).



Εκτός από τις ρίζες  $OH^\bullet$  άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$ , το υπεροξείδιο 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  $O_2^{\bullet-}$ , η οποία είναι ένα μόριο  $O_2$  που έχει δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα, μπορεί να παραχθεί από την 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. Σαν ελεύθερη ρίζα έχει την ιδιότητα να οδηγεί σε βλάβες αντιδρώντας με διάφορα μόρια μέσα στον οργανισμό. Ωστόσο η ρίζα του σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$  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. Το υπεροξείδιο 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).

SOD



Το  $H_2O_2$  έχει επιβλαβής 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  $\text{NO}^*$ , το οποίο παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη, μπορεί μαζί με την ρίζα του σουπεροξειδίου  $\text{O}_2^*$  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 την χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων, την αρτηριακή πίεση, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αγγειογέννεση. Επιπλέον είναι ένας από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές των νευρικών συνάψεων και παράγεται από τα μακροφάγα με σκοπό την εξόντωση μικροοργανισμών. (B. Halliwell 2001, Y-Z.Fang et al. 2002)

### Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα κύτταρα στην προσπάθειά τους να αντιμετωπίσουν τις επιβλαβείς δράσεις των ελευθέρων ριζών έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνουν την παραγωγή τους. Υπάρχουν δύο αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί αντιμετώπισης ο ενζυμικός και ο μη ενζυμικός. Στον ενζυμικό μηχανισμό συμμετέχουν διάφορα ένζυμα τα οποία ή δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνουν την παραγωγή τους, από τα οποία τα πιο σημαντικά 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 1.2. (O.Blochina et al. 2003).

Τον μη ενζυμικό μηχανισμό αντιμετώπισης της δράσης των ελευθέρων ριζών απαρτίζουν μία μεγάλη ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται ως αντιοξειδωτικά. Με τον όρο αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα, έχει την ιδιότητα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος (B. Halliwell 2001). Στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών ανήκουν διάφορα διατροφικά συστατικά όπως η βιταμίνη E, το β-καροτένιο και το ασκορβικό οξύ. Στην κατηγορία αυτών των αντιοξειδωτικών ανήκουν και οι διάφορες πολυφαινόλες.

Επειδή οι ελεύθερες ρίζες παράγονται και φυσιολογικά στον οργανισμό, και μάλιστα συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και η παραγωγή των ελευθέρων ριζών βρίσκονται σε μία ισορροπία. Όταν η ισορροπία κλίνει προς την παραγωγή των ελευθέρων ριζών τότε οργανισμός αντιμετωπίζει το λεγόμενο οξειδωτικό στρες. (B. Halliwell 2001, C.Mylonas, D.Kouretas 1999).

Πίνακας 1.2. Κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες.

Ένζυμο	Αντίδραση που καταλύει
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	$2 \text{O}_2^* + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPX)	$\text{GSH}^1 + \text{R}^* \rightarrow \text{GSSG} + \text{R}$
Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης	$\text{NADPH} + \text{GSSG}^2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$
Καταλάση	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$

<sup>1</sup>GSH: γλουταθειόνη

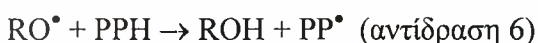
<sup>2</sup>GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης



## Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων

Η διαθεσιμότητα των τροφών σε πολυφαινόλες και η χαρακτηριστική τους χημική δομή τις καθιστά ιδανικά μόρια για τον χαρακτηρισμό τους ως αντιοξειδωτικά. Μία πολυφαινόλη για να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό θα πρέπει να πληρεί δύο βασικές προϋποθέσεις. Η πρώτη προϋπόθεση είναι, όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωσή του (ορισμός αντιοξειδωτικού). Η δεύτερη προϋπόθεση είναι η ρίζα που προκύπτει μετά την δέσμευση της ελεύθερης ρίζας να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (C.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 διάφορα μέταλλα (O.Blocina et al. 2003, L.R. Ferguson 2001).

Οι πολυφαινόλες μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους. Δρουν ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες και οδηγούν στην δημιουργία φαινολικών ριζών (αντίδραση 6). Έτσι εμποδίζουν τις ελεύθερες ρίζες να οξειδώσουν είτε τα λιπίδια είτε άλλα μόρια και να δημιουργήσουν προβλήματα στα κύτταρα.



Όπου :  $RO^{\bullet}$ : η ελεύθερη ρίζα

$PPH$ : η πολυφαινόλη

$PP^{\bullet}$ : η φαινολική ρίζα

Η φύση της φαινολικής ρίζας που παράγεται αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων, γιατί οι περισσότερες φαινολικές ρίζες είναι σταθερές και έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό και να οδηγήσει σε μία νέα σειρά αντιδράσεων. Η ρίζα αυτή μπορεί ακόμη να αδρανοποιησει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (αντίδραση 7) οδηγώντας στην δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (L.R.Ferguson et al.2001).



Χαρακτηριστική είναι η δράση των φλαβονοειδών τα οποία δεσμεύουν διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρώντας άμεσα με το δραστικό τμήμα της ρίζας. Λόγω της μεγάλης δραστικότητας των υδροξυλικών ομάδων των φλαβονοειδών οι ελεύθερες ρίζες αδρανοποιούνται και οι ρίζες των φλαβονοειδών που παράγονται είναι λιγότερο δραστικές από τις αρχικές ελεύθερες ρίζες (αντίδραση 8) (R.J.Nijveldt et al. 2001).



Συγκεκριμένα οι φλαβόνες και οι κατεχίνες θεωρούνται από τα πιο δραστικά φλαβονοειδή που προστατεύουν τον οργανισμό από την καταστροφική δράση των ελευθέρων ριζών και οι ρίζες τις οποίες δεσμεύουν κυρίως τα φλαβονοειδή είναι οι ρίζες σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet}$  και οι ρίζες του περοξυνιτρίτη ( $ONOO^{\bullet}$  αντίδραση 2).

Η ικανότητα των πολυφαινόλων, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση τους αφού μπορούν να δεσμεύουν 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 (R.Nijveldt et al. 2001). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που καθιστά τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά είναι ότι η χηλική δέσμευση ενός δισθενούς κατιόντος διατηρεί την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Έτσι προστατεύουν διπλά, και δεσμεύοντας τις ρίζες και εμποδίζοντας των σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (K.E.Heim et al. 2002).

Εκτός από τις προηγούμενες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ορισμένες πολυφαινόλες προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες, επάγοντας ορισμένα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), βοηθώντας έτσι στην απέκκριση διάφορων οξειδωμένων μορίων, ή επάγοντας ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως μεταλλοθειονίνες οι οποίες μπορούν με την σειρά τους να δεσμεύουν μέταλλα όπως χαλκός και σίδηρος και να εμποδίσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (L.R.Ferguson 2001). Επιπλέον ορισμένες πολυφαινόλες έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν ένζυμα όπως η κυκλοοξυγενάση και η λιποοξυγενάση που έχουν οξειδωτικές δράσεις (L.R.Ferguson 2001, C.Rice-Evans et al. 1996). Αναστέλλουν επίσης την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης η οποία μετατρέποντας την ξανθίνη σε ουρικό οξύ ανάγει το  $O_2$  σε  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$ , αναστέλοντας έτσι την παραγωγή αυτών των ριζών (N. Cotelle. 2001).

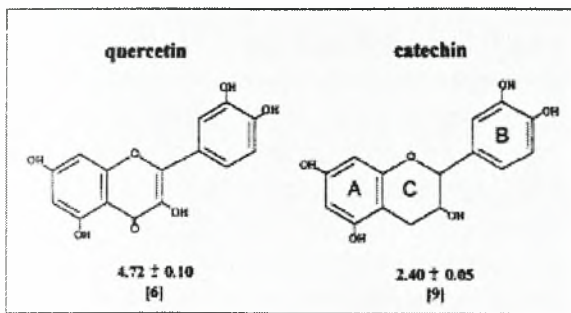
Στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών αποδίδονται κάποιες από τις προτεινόμενες βιολογικές τους δράσεις όπως η αντιφλεγμονώδης και η αντιαλλεργική δράση τους, όπου δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, τις εμποδίζουν να προσελκύσουν διάφορους μεταγωγείς της φλεγμονής (Y.Yilmaz et al. 2004, R.Nijveldt 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 υπεροξείδωση της LDL, γεγονός που συμβάλλει στην εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς και να προκαλέσουν βλάβες στο DNA και μεταλλάξεις που αποτελούν σημαντικό βήμα για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας (L.R.Ferguson et al. 2001).

### ***Συσχέτιση δομής των πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής δράσης τους***

Η χαρακτηριστική χημική δομή των πολυφαινολών είναι εκείνη η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική τους δράση. Στα φλαβονοειδή η θέση και ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων, η παρουσία διπλών δεσμών στον δακτύλιο C, της γενικής δομής των φλαβονοειδών (Εικόνα 1.1.), και οι υποκαταστάσεις των υδροξυλικών ομάδων με σάκχαρα, μεθυλομάδες ή άλλους υποκαταστάτες επηρεάζουν την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Έχει βρεθεί ότι στην χημική τους δομή υπάρχουν τρία κριτήρια τα οποία όταν πληρούνται εξασφαλίζουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα κριτήρια αυτά είναι τα εξής (C.Rice-Evans et al. 1996, N. Cotelle 2001):

1. Η ύπαρξη της ορθο-διφαινυλικής τοποθέτησης των 3' και 4' υδροξυλομάδων στον B δακτύλιο, της βασικής χημικής δομής των φλαβονοειδών (Εικόνα 1.1.), η οποία παρέχει μεγαλύτερη σταθερότητα στην ρίζα της πολυφαινόλης μετά από την εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας και συμμετέχει στην μετατόπιση του ηλεκτρονίου ώστε να μην είναι διαθέσιμο για επόμενη αντίδραση.
2. Η ύπαρξη διπλού δεσμού ανάμεσα στους άνθρακες 2-3 του δακτυλίου C, σε συνδυασμό με την 4οξο-θέση του, ο οποίος συμβάλλει στην μετατόπιση του ηλεκτρονίου από τον δακτύλιο B. Επειδή η αντιοξειδωτική ισχύς σχετίζεται με την θέση που βρίσκεται το ηλεκτρόνιο στον αρωματικό πυρήνα, όταν οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες οι φαινολικές ρίζες που παράγονται, σταθεροποιούνται μέσω του φαινομένου του συντονισμού του αρωματικού πυρήνα.
3. Η 3-OH ομάδα του δακτυλίου A και η 5-OH ομάδα μαζί με την οξο-θέση του δακτυλίου C είναι απαραίτητες για την μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβονοειδούς που πληρεί και τα τρία παραπάνω κριτήρια είναι η κερκετίνη, η οποία είναι πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό από τις φλαβονόλες όπως η κατεχίνη που πληρούν μόνο το πρώτο κριτήριο (Εικόνα 1.14.)(C.Rice-Evans et al. 1996).



Εικόνα 1.14.: Χημική δομή της κερκετίνης και της κατεχίνης καθώς και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Όπως φαίνεται από την δομή της κερκετίνης πληρεί και τα τρία βασικά κριτήρια που εξασφαλίζουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ η κατεχίνη φέρει μόνο την ο-διυδροξύ δομή στον Β δακτύλιο. (C.Rice-Evans et al. 1996)

Εκτός από αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά που παρέχουν την μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών είναι:

- Η υδροξυλίωση στον Β δακτύλιο. Οι υδροξυλομάδες του Β δακτυλίου των φλαβονοειδών μπορούν και δίνουν ένα υδρογόνο στις ρίζες υδροξυλίου, περοξυλίου, περοξυνιτρίτη, τις σταθεροποιούν και σχηματίζουν μια σταθερή φαινολική ρίζα. Ανάμεσα σε ομόλογες δομικά φλαβόνες και φλαβανόνες η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι ανάλογη του αριθμού των υδροξυλομάδων στον δακτύλιο (K.E.Heim et al. 2002). Εκτός όμως από την υδροξυλίωση του Β δακτυλίου σημαντικό ρόλο παίζει και η διαμόρφωση των υδροξυλίων σ' αυτόν με πιο αποτελεσματική την ορθο-δифαινολική διαμόρφωση (C.Rice-Evans et al. 1996).
- Η ύπαρξη διπλού δεσμού στον C δακτύλιο της γενικής χημικής δομής των φλαβονοειδών έχει μεγάλη σημασία στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Η σημασία του φαίνεται από την διαφορά ανάμεσα στην αντιοξειδωτική ικανότητα της κερκετίνης και της κυανιδίνης με την κατεχίνη. Η παρουσία διπλού δεσμού στις δύο πρώτες οδηγεί σε διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την κατεχίνη στην οποία δεν υπάρχει ο δεσμός αυτός (C.Rice-Evans et al. 1996).
- Η Γλυκοσυλίωση των υδροξυλομάδων. Η παρουσία του σακχάρου ενώ αυξάνει την διαλυτότητα του μορίου και την βιοδιαθεσιμότητά του (Y.Yilmaz et al. 2004), παράλληλα μειώνει την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Αυτό φαίνεται από το ότι η κερκετίνη και οι ανθοκυανίνες έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική από την ρουτίνη και τις ανθοκυανιδίνες που είναι οι αντίστοιχες γλυκοσυλιωμένες μορφές τους (L.R.Ferguson et al. 2001, C. Rice-Evans et al. 1996). Εκτός όμως από την παρουσία του σακχάρου παίζει ρόλο και η θέση και η δομή του σακχάρου. Αυτό συμβαίνει γιατί εκτός από το ότι καταλαμβάνει τις ελεύθερες υδροξυλομάδες η θέση του και η δομή του μπορεί να επηρεάζουν με διάφορους τρόπους την επίπεδη διαμόρφωση των φλαβονοειδών στον χώρο, που είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική τους δράση (K.E.Heim et al. 2002).
- Ο πολυμερισμός των φλαβονοειδών, ο οποίος αυξάνει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Οι διμερής και τριμερής προκυανιδίνες είναι πιο αποτελεσματικές από μονομερή φλαβονοειδή στη δέσμευση ριζών σουπεροξειδίου και όσο αυξάνεται ο πολυμερισμός τόσο αυξάνει η ικανότητά τους να δεσμεύουν διάφορες ελεύθερες ρίζες (K.E.Heim et al. 2002).
- Ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων. Γενικά όσο αυξάνεται ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων τόσο αυξάνεται η ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Για παράδειγμα οι γαλλοκατεχίνες έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις απλές κατεχίνες λόγω της παρουσίας του γαλλικού οξέως που φέρει επιπλέον τρεις υδροξυλομάδες (C.Rice-Evans et al. 1996).
- Η επίπεδη διαμόρφωση των δακτυλίων των φλαβονοειδών. Η ροπή στρέψης του Β δακτυλίου σε συνδυασμό με την δομή του υπόλοιπου μορίου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Πιστεύεται ότι οι



υδροξυλομάδες του Β δακτυλίου δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με την 3-OH ευθυγραμμίζοντας των Β δακτύλιο με τον Α δακτύλιο. Η επίπεδη διαμόρφωση στον χώρο επιτρέπει την μετατόπιση του ηλεκτρονίου η οποία συμβάλλει στην σταθερότητα τις ρίζας του φλαβονοειδούς που σχηματίζεται μετά την δέσμευση της ελεύθερης ρίζας. Οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες οι οποίες φέρουν μία 3-OH ομάδα είναι επίπεδες, ενώ οι φλαβόνες και οι φλαβανόνες στις οποίες δεν υπάρχει αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι τόσο επίπεδες. Η απομάκρυνση της 3-OH επηρεάζει την επίπεδη διαμόρφωση και έτσι μειώνει την ικανότητα δέσμευσης. Επιπλέον αυτό συμβαίνει και με την υποκατάσταση της 3-OH με μεθυλομάδα ή σάκχαρο (K.E.Heim et al. 2002). Η σημασία της υδροξυλομάδας στην θέση 3 φαίνεται από το ότι η λουτεονίνη, που διαφέρει μόνο στην υδροξυλομάδα στην θέση 3 από την κερκετίνη, έχει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την κερκετίνη (C.Rice-Evans et al. 1996).

- Η υποκατάσταση των υδροξυλομάδων από μεθυλομάδες. Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα ανάμεσα στα πολυυδροξυλιωμένα φλαβονοειδή και τα πολυμεθοξυλιωμένα οφείλονται στις διαφορές στην υδροφοβικότητα και στην επίδραση στην επίπεδη διαμόρφωση που είναι σημαντική για την σταθερότητα της ρίζας του φλαβονοειδούς. Ωστόσο η αναλογία των μεθυλικών υποκαταστατών δεν μπορεί να προβλέψει την επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα, συνήθως όμως οδηγεί στην μείωσή της (K.E.Heim et al. 2002).

Στον Πίνακα 1.4. παρουσιάζεται συνοπτικά και ιεραχικά η αντιοξειδωτική ικανότητα κάποιων φλαβονοειδών σε σχέση με τα δομικά χαρακτηριστικά τους (C.Rice-Evans et al. 1996).

Πίνακας 1.3.: Ιεράρχηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας<sup>1</sup> ορισμένων φλαβονοειδών σε σχέση με τα δομικά χαρακτηριστικά τους. (C.Rice-Evans et al. 1996)

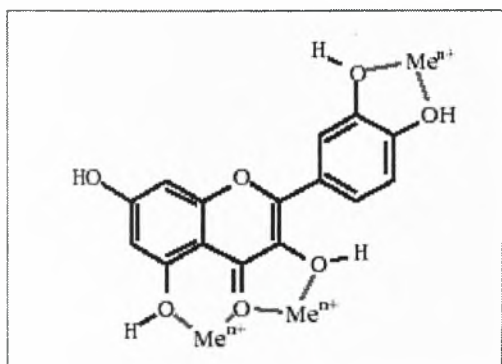
Compound	Free OH-Substituents	Glycosylated Position	TEAC (mM)	n	Family
Epicatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 3'', 4'', 5''		4.9 ± 0.02	[3]	flavanol
Epigallocatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5''		4.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'		4.7 ± 0.1	[6]	flavonol
Delphinidin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		4.44 ± 0.11	[5]	anthocyanidin
Cyanidin	3, 5, 7, 3', 4'		4.4 ± 0.12	[5]	anthocyanidin
Epigallocatechin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Keracyanin	5, 7, 3', 4'	3-rut	3.25 ± 0.1	[3]	anthocyanin
Myricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.1 ± 0.30	[6]	flavanol
Galllic acid	3, 4, 5		3.01 ± 0.05	[7]	hydroxybenzoate
Ideain	5, 7, 3', 4'	3-gal	2.9 ± 0.03	[3]	anthocyanin
Morin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		2.55 ± 0.02	[3]	flavanol
Epicatechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.5 ± 0.02	[6]	flavanol
Galllic acid methyl ester	3, 4, 5		2.44 ± 0.03	[3]	hydroxybenzoate
Catechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.4 ± 0.05	[9]	flavanol
Rutin	5, 7, 3', 4'	3-rut	2.4 ± 0.06	[7]	flavanol
Apigenidin	5, 7, 4'		2.35 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Peonidin	3, 5, 7, 4'	3'-OMe	2.22 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Luteolin	5, 7, 3', 4'		2.1 ± 0.05	[4]	flavone
Malvidin	3, 5, 7, 4'	3',5'-di-OMe	2.06 ± 0.1	[4]	anthocyanidin
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'		1.9 ± 0.03	[6]	flavanone
Oenin	5, 7, 4'	3',5'-diOMe 3-gluc	1.78 ± 0.02	[3]	anthocyanin
Luteolin-4'-glucoside	5, 7, 3'	4'-gluc	1.74 ± 0.09	[4]	flavone
Naringenin	5, 7, 4'		1.53 ± 0.05	[4]	flavanone
Apigenin	5, 7, 4'		1.45 ± 0.08	[6]	flavone
Chrysin	5, 7		1.43 ± 0.07	[6]	flavone
Hesperidin	3, 5, 7, 3'	4'-OMe	1.37 ± 0.08	[3]	flavanone
Kaempferol	3, 5, 7, 4'		1.34 ± 0.08	[6]	flavanol
Pelargonidin	3, 5, 7, 4'		1.30 ± 0.1	[6]	anthocyanidin
Hesperidin	3, 5, 3'	4'-OMe 7-rut	1.08 ± 0.04	[5]	flavanone
Luteolin-3',7-diglucoside	5, 4'	3',7-digluc	0.79 ± 0.04	[4]	flavone
Nanrutin	5, 4'	5-rut	0.76 ± 0.05	[3]	flavanone

<sup>1</sup> Για την μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των φλαβονοειδών μετρήθηκε η λεγόμενη ισοδύναμη με το Trolox (ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E) αντιοξειδωτική ικανότητα (TEAC). Η τιμή TEAC ορίζεται ως η συγκέντρωση (mM) του διαλύματος Trolox που έχει την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα με διάλυμα συγκέντρωσης 1mM της υπό εξέταση ουσίας. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετράται μέσω της δέσμευσης της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> που φαίνεται ως καταστολή του φάσματος απορρόφησης που δίνει η ρίζα αυτή. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του διαλύματος Trolox (mM) τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ριζών που σταθεροποιήθηκαν άρα και τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα της υπό εξέταση ουσίας.

Όσον αφορά την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα έχει βρεθεί ότι η παραγωγή ριζών που προκύπτει μέσω της αντίδρασης Fenton, αναστέλλεται ισχυρά από φλαβονοειδή τα οποία παρουσίαζαν 3'- 4' υδροξυλίωση στον Β δακτύλιο, 4οξο-θέση και 5-OH στον δακτύλιο C. Πιστεύεται ότι τα χηλικά σύμπλοκα με τα δισθενή κατιόντα, όπως  $Fe^{2+}$ , μπορεί να συμβαίνουν ανάμεσα στην 5-OH και την 4-οξο ομάδα του δακτυλίου C ή ανάμεσα στην 3' και 4'-OH του Β δακτυλίου, καθώς και ανάμεσα στην 3-OH και την 4-οξο ομάδα του δακτυλίου C (Εικόνα 1.15.) (K.E.Heim et al. 2002, N.Cotelle 2001). Επιπλέον η γλυκοσυλίωση δεν φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν μέταλλα, γιατί ανάμεσα στην κερκετίνη και την ρουτίνη, που είναι η γλυκοσυλιωμένη της μορφή, δεν υπάρχει διαφορά στην ιδιότητά τους αυτή και είναι και οι δύο ισχυροί δεσμευτές των μετάλλων (K.E.Heim et al. 2002).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους εξαρτάται από τον αριθμό και την θέση των υδροξυλικών ομάδων τους. Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Εικόνα 1.5.) η καρβοξυλική ομάδα που βρίσκεται στον αρωματικό δακτύλιο εμποδίζει την ικανότητα των υδροξυλίων που βρίσκονται στον βενζολικό δακτύλιο να δώσουν το υδρογόνο τους προκειμένου να αδρανοποιήσουν κάποια ρίζα. Στα υδροξυκινναμικά οξέα (Εικόνα 1.5.) δεν συμβαίνει αυτό, με αποτέλεσμα να έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Αυτό συμβαίνει γιατί η ομάδα  $-CH=CH-COOH$  που είναι συνδεδεμένη με τον αρωματικό δακτύλιο στα υδροξυκινναμικά οξέα συμβάλλει στην καλύτερη σταθεροποίηση της φαινολικής ρίζας που παράγεται μετά την δέσμευση μιας ελεύθερης ρίζας.

Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τον αριθμό και την θέση των υδροξυλίων τους. Συγκεκριμένα η παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη μετα-θέση του βενζοϊκού δακτυλίου είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ίδιο συμβαίνει και στα υδροξυκινναμικά οξέα στα οποία όσο μεγαλώνει ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων τόσο αυξάνει η ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Η μεθοξυλίωση των υδροξυλομάδων φαίνεται να μειώνει την ικανότητα των υδροξυκινναμικών οξέων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Αυτό ίσως εξηγεί ότι το καφεϊκό οξύ είναι πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό από το φερούλικό που φέρει μία μεθοξυλομάδα στην χημική του δομή. (C.Rice-Evans et al. 1996)



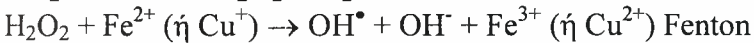
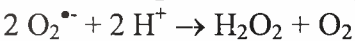
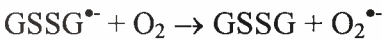
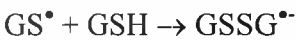
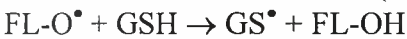
Εικόνα 1.15.: Πιθανές θέσεις χηλικής δέσμευσης μετάλλων στα φλαβονοειδή.  $Me^{n+}$ : ιόν μετάλλου. (N.Cotelle 2001).

### 1.5.3. Προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών

Παρότι οι πολυφαινόλες με την αντιοξειδωτική τους δράση μπορούν να συμβάλουν θετικά στην προστασία από τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, κάποιες από τις πολυφαινόλες παρουσιάζουν προ-οξειδωτική δράση. Δηλαδή αντί να προστατεύουν από τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, συμμετέχουν με διάφορους τρόπους στον σχηματισμό τους, προάγοντας έτσι την οξείδωση διάφορων υποστρωμάτων.

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών είναι η δημιουργία μιας οξειδοαναγωγικά ασταθούς φαινολικής ρίζας. Η ικανότητα των πολυφαινολών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες συνήθως συνοδεύεται από τον σχηματισμό σταθερών φαινολικών ριζών ή ριζών που αντιδρούν με άλλες ρίζες και οδηγούν στον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων παραγωγής νέων ελευθέρων ριζών, με την δημιουργία αδρανών προϊόντων (αντίδραση 7).

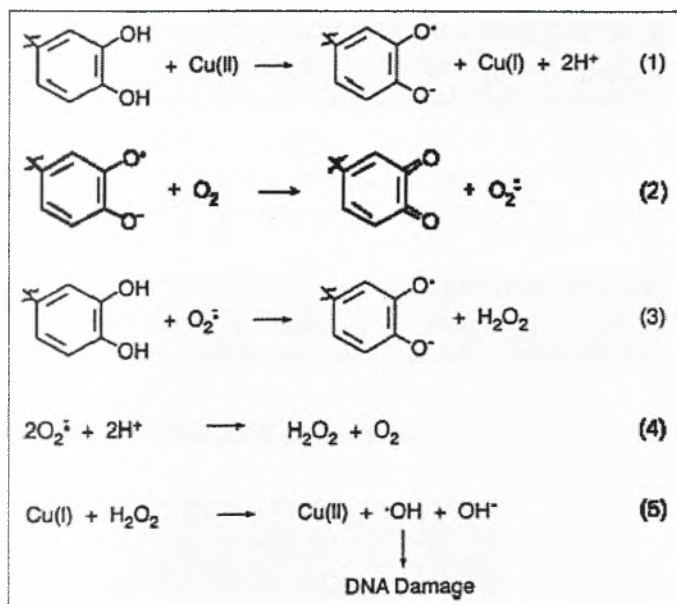
Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που όταν κάποια φλαβονοειδή δεσμεύουν μία ελεύθερη ρίζα, η φαινολική ρίζα που παράγεται, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μπορεί να μην είναι σταθερή, να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο ή την γλουταθειόνη (GSH) και να οδηγήσει στην παραγωγή ριζών σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$ . Το σουπεροξειδίο με την σειρά του μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου  $H_2O_2$  το οποίο μέσω της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 4) οδηγεί στον σχηματισμό των ιδιαίτερα δραστικών ριζών υδροξυλίου  $OH^{\bullet}$ . Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι οι εξής:



Όταν η ρίζα του φλαβονοειδούς αντιδρά με την γλουταθειόνη (GSH) την οξειδώνει και σχηματίζει μία θειϊκή ρίζα ( $GS^{\bullet}$ ) η οποία αντιδρώντας με την γλουταθειόνη δίνει ένα δισουλφιδικό ριζικό ανιόν ( $GSSG^{\bullet-}$ ) το οποίο ανάγει αμέσως το  $O_2$  σε σουπεροξειδίο. Οι αντιδράσεις αυτές συμβαίνουν όταν υπάρχει μεγάλη παρουσία μεταβατικών μετάλλων τα οποία καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις (N. Cotelle 2001).

Επειδή τα φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι μπορούν να έχουν προ-οξειδωτική δράση κυρίως σε συστήματα που περιέχουν οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα, ένας ακόμη μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών περιλαμβάνει την συμμετοχή μεταβατικών μετάλλων όπως ο χαλκός και ο σίδηρος. Παρουσία  $O_2$ , μέταλλα όπως ο χαλκός (Cu) και ο σίδηρος (Fe), συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανακύκλωσης των φαινολικών ριζών, οι οποίες καταλήγουν σε σχηματισμό ROS και άλλων οργανικών ριζών οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, στα λιπίδια και σε άλλα βιολογικά μόρια. Έτσι ένας μηχανισμός με τον οποίο οι πολυφαινόλες μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, είναι μέσω της αντίδρασής τους με δισθενή ιόντα χαλκού  $Cu^{2+}$ . Αρχικά η πολυφαινόλη αντιδρά με τον δισθενή χαλκό  $Cu^{2+}$  και τον ανάγει σε  $Cu^+$  ενώ η ίδια μετατρέπεται σε φαινολική ρίζα η οποία με την σειρά της προσβάλλει το  $O_2$  και το μετατρέπει σε ρίζα σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$ . Το σουπεροξειδίο με την σειρά του αντιδρά με μία νέα πολυφαινόλη, ανακυκλώνοντας την φαινολική ρίζα και σχηματίζοντας την ρίζα υπεροξειδίου του υδρογόνου  $H_2O_2$ . Το  $H_2O_2$  μαζί με τα ιόντα  $Cu^+$  που παράχθηκαν από την πρώτη αντίδραση συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton (αντίδραση 4) και οδηγούν στον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου  $OH^{\bullet}$  που, όπως έχει αναφερθεί, είναι πολύ δραστικές και προκαλούν πολλές βλάβες στα κύτταρα. Οι αντιδράσεις φαίνονται συνοπτικά στην Εικόνα 1.16. (Y.Sakihama et al. 2002, G. Galati et O'Brien 2004).





Εικόνα 1.16. Αντιδράσεις πολυφαινόλης με  $\text{Cu}^{2+}$ . Οι αντιδράσεις αυτές αποτελούν έναν ακόμη μηχανισμό προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών οι οποίες μέσω της αντίδρασής τους με ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  οδηγούν στον σχηματισμό των ιδιαίτερα δραστικών ριζών υδροξυλίου  $\text{OH}^\bullet$  (Y.Sakihama et al. 2002).

Ένας ακόμη μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης στον οποίο συμμετέχει ο χαλκός, είναι η άμεση πρόκληση βλαβών στο DNA από την άμεση αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με τον Cu που είναι συνδεδεμένος με το DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει θεωρηθεί ότι προκαλεί βλάβες στο DNA, που περιλαμβάνουν οξειδωτική τροποποίηση των βάσεων, σπασίματα των κλώνων, και δημιουργία ομοιοπολικών συνδέσεων (adducts) στο DNA (Y.Sakihama et al. 2002).

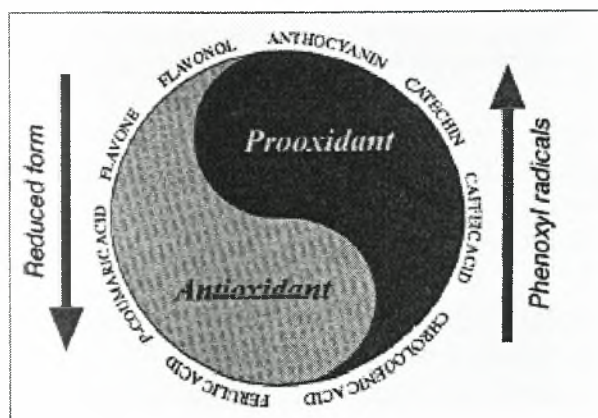
Γενικά η προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών και γενικά των πολυφαινολών φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι δομικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών τα οποία είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική τους δράση είναι σημαντικά και για την προ-οξειδωτική τους δράση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στα φλαβονοειδή ο διπλός δεσμός στην θέση 2,3 και η 4οξο θέση στον δακτύλιο C, που είναι σημαντικές για την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, μπορεί να προωθούν τον σχηματισμό ROS επαγόμενο από δισθενές  $\text{Cu}^{2+}$  παρουσία οξυγόνου (K.E. Heim et al. 2002). Επιπλέον όπως η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνει όσο αυξάνει ο αριθμός των υδροξυλομάδων, έτσι και η προ-οξειδωτική ικανότητα γίνεται πιο έντονη όσο αυξάνει ο αριθμός των υδροξυλομάδων στην χημική δομή των φλαβονοειδών. Το γεγονός ότι οι υδροξυλομάδες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην αντιοξειδωτική όσο και στην προ-οξειδωτική ικανότητα φαίνεται και από το ότι φλαβόνες και φλαβανόνες οι οποίες διατηρούσαν όλα τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών, όμως δεν έφεραν υδροξυλομάδες, δεν παρουσίαζαν ούτε αντιοξειδωτική ούτε προ-οξειδωτική δράση (N. Cotelle 2001). Όμοια η μεθυλίωση των υδροξυλομάδων μειώνει ταυτόχρονα τόσο την αντιοξειδωτική ικανότητα όσο και την προ-οξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών (G. Cao et al. 1997). Έχει προταθεί επίσης, ότι η κατεχόλ-δομή στον B δακτύλιο (2 υδροξυλικές ομάδες ορθο-θέση) και ο 2,3διπλός δεσμός στον δακτύλιο C είναι εκείνα τα δομικά χαρακτηριστικά που ρυθμίζουν την οξειδοαναγωγική ισχύ του φλαβονοειδούς. Η κερκετίνη η οποία είναι από τα χαρακτηριστικά φλαβονοειδή, το οποίο φέρει αυτά τα χαρακτηριστικά έχει τόσο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα όσο και προ-οξειδωτική ικανότητα (C.Rice-Evans et al. 1996). Αυτό ισχύει και στα υδροξυκιναμικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ που αυτή η κάτεχολ- δομή στον αρωματικό του δακτύλιο, είναι πολύ σημαντική τόσο για την ικανότητά του να δεσμεύει χηλικά μέταλλα αλλά και του προσδίδει σημαντική προ-οξειδωτική ικανότητα (C.E. Grey et al. 2003, Y. Sakihama et al. 2002).

Γενικά η προ-οξειδωτική και η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών βρίσκεται σε μία ισορροπία η οποία εξαρτάται από την ικανότητά τους να ανάγουν τα μέταλλα, να τα δεσμεύουν

χηλικά και την ικανότητά τους να αντιδρούν με το O<sub>2</sub>. Η αντίδραση με το O<sub>2</sub> εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική ισχύ και τον χρόνο ημιζωής της φαινολικής ρίζας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ημιζωής της φαινολικής ρίζας τόσο πιθανότερο είναι η ρίζα να αλληλεπιδράσει με το O<sub>2</sub> και να οδηγήσει στον σχηματισμό νέων ελευθέρων ριζών (Y.Sakihama et al. 2002). Επιπλέον η ισορροπία επιτυγχάνεται και από την παρουσία συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών των πολυφαινολών. Για παράδειγμα η 3',4' υδροξυλομάδα και η 3-OH ομάδα στα φλαβονοειδή, που σταθεροποιούν την δομή της ρίζας του φλαβονοειδούς, είναι ένας τρόπος ρύθμισης της ισορροπίας ανάμεσα στην αντιοξειδωτική και προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών (K.E.Heim et al. 2002).

Επειδή η παρουσία μεταβατικών μετάλλων συμβάλει στην προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών, η προ-οξειδωτική τους δράση εξισορροπείται όχι μόνο από την χηλική δέσμευση των μετάλλων αλλά και από την ικανότητα που έχουν οι πολυφαινόλες να εμποδίζουν τον σίδηρο να βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή Fe<sup>2+</sup> ώστε να μην μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ελευθέρων ριζών. Τα ιόντα σιδήρου έχουν την ικανότητα να αυτοοξειδώνονται από Fe<sup>2+</sup> σε Fe<sup>3+</sup>. Τα φλαβονοειδή μπορούν να εμποδίζουν την συμμετοχή των ιόντων Fe<sup>2+</sup> στην παραγωγή ριζών αυξάνοντας την αυτοοξείδωση των ιόντων σιδήρου. Τα μη-φλαβονοειδή προστατεύουν όμοια με τον σχηματισμό ενός αδρανούς συμπλόκου Fe<sup>2+</sup>-πολυφαινόλης το οποίο δεν μπορεί να αντιδράσει με το O<sub>2</sub> και να οδηγήσει στον σχηματισμό ριζών σουπεροξειδίου (M.Yoshino, K.Murakami 1998).

Παρότι η χημειοπροστατευτική δράση των φλαβονοειδών απέναντι στον καρκίνο γενικά πιστεύεται ότι οφείλεται στην αντιοξειδωτική τους δράση, ωστόσο και η προ-οξειδωτική τους δράση φαίνεται να συμβάλει στην προστασία απέναντι στον καρκίνο. Οι ROS που παράγονται μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών μπορούν να οδηγήσουν στον κατακερματισμό του DNA που είναι ένας μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση. Έτσι οι πολυφαινόλες μέσω της προ-οξειδωτικής τους δράσης μπορούν να οδηγήσουν στην επαγωγή της απόπτωσης η οποία αποτελεί μηχανισμό που εμποδίζει την καρκινογενετική διαδικασία, δρώντας χημειοπροστατευτικά. Το γεγονός ότι πολλές ιδιότητες των πολυφαινολών, όπως σύνδεση και κόψιμο του DNA, παραγωγή ROS παρουσία μεταβατικών μετάλλων είναι όμοιες με τις δράσεις γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων αποτελεί ένα ακόμη στοιχείο για την ευεργετική πλευρά της προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών απέναντι στον καρκίνο.(G.Galati et O'Brien 2004)



Εικόνα 1.17.: Συμβολική αναπαράσταση της ισορροπίας της αντιοξειδωτικής και προ-οξειδωτικής των πολυφαινολών (Y.Sakihama et al. 2002).

#### 1.5.4. Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινόλων

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 (L.R.Ferguson 2000).

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

- Επίδραση στην σύνθεση του DNA: Οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάζουν την σύνθεση του DNA αλληλεπιδρώντας με αυτό είτε άμεσα είτε έμμεσα με την σύνδεσή τους με μέταλλα. Ένας πιθανός μηχανισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινόλων, είναι μέσω της μείωσης της σύνθεσης του DNA χωρίς να σχηματίζονται DNA adducts, γεγονός που θεωρείται ότι μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία μεταλλάξεων (L.R.Ferguson 2000).
- Επίδραση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA: Πολλές ουσίες παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση αυξάνοντας την ικανότητα αποκατάστασης βλαβών στο DNA οι οποίες στην συνέχεια θα οδηγούσαν σε μεταλλάξεις. Ένας αριθμός πολυφαινόλων όπως η βανιλίνη, η κουμαρίνη, το ταννικό οξύ έχουν θεωρηθεί ότι δρουν ως αντιμεταλλαξιγόνα τροποποιώντας την αντιγραφή του DNA και/ή διορθώνοντας τις βλάβες που έχουν γίνει στο DNA μετά από την επίδραση του μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Οι πολυφαινόλες μπορεί να επηρεάζουν άμεσα την δράση ενζύμων επιδιόρθωσης μέσω ρύθμισης της έκφρασή τους. Για παράδειγμα η μυρικετίνη βρέθηκε να επάγει την έκφραση της πολυμεράσης II, η οποία συμβάλλει στην παραγωγή DNA το οποίο θα είναι ελεύθερο από λάθη (L.R. Ferguson 2001). Ακόμη η αντιμεταλλαξιγόνος δράση του ταννικού οξέος μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της δράσης ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA ή στην απευθείας αλληλεπίδρασή του με το DNA. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού που είναι κυρίως κατεχίνες και γαλλοκατεχίνες παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση επιδρώντας στην πολυμεράση III, που είναι ένα ένζυμο το οποίο μπορεί να επηρεάσει την πιστότητα με την οποία γίνεται η αντιγραφή (Y. Kudora et Y.Hara 1999).
- Επίδραση στην δέσμευση των μεταλλαξιγόνων στο DNA: Πολλά μεταλλαξιγόνα προκειμένου να προκαλέσουν βλάβες στο γενετικό υλικό συδέονται ομοιοπολικά με αυτό. Κάποιες πολυφαινόλες όπως το ελλαγικό εμποδίζουν την σύνδεση ορισμένων μεταλλαξιγόνων, όπως το διβενζοπυρένιο, στο DNA και έτσι εμποδίζουν την δράση τους. (L.R. Ferguson 2001).
- Αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I/II: Τα ένζυμα τοποϊσομεράση I/II μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία μεταλλάξεων μέσω μιας ομάδας ενώσεων που ονομάζονται “topoI/II poisons”. Γενικά οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA, τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA, προκαλούν σπασίματα σε ένα σημείο της μιας (τοποI) ή και των δύο αλυσίδων (τοποII), πέρασμα ενός τμήματος του DNA μέσω αυτού του σπασίματος και επανασυγκόλληση του σπασίματος του DNA, με σκοπό την δημιουργία θετικών και αρνητικών υπερελικώσεων απαραίτητων για την αντιγραφή. Τα “topoI/II poisons” εμποδίζουν το πέρασμα του DNA και οδηγούν στην δημιουργία συμπλόκων που προκαλούν σπασίματα στο DNA με αποτέλεσμα να οδηγούν στη δημιουργία μεταλλάξεων. Ένας μηχανισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης ορισμένων πολυφαινόλων είναι η αναστολή της ικανότητας αυτών των “topoI/II poisons” να σταθεροποιούν το σύμπλοκο που οδηγεί σε σπασίματα στο DNA και σε μεταλλάξεις. Το



ελλαγικό οξύ είναι μία πολυφαινόλη η οποία παρουσιάζει αυτή την δράση (L.R. Ferguson 2001).

- Παρεμπόδιση νιτροσυλίωσης: Οι N-νιτροσο ενώσεις, όπως η νιτροζαμίνη, θεωρούνται ότι είναι μεταλλαξιγόνα τα οποία προκαλούν καρκίνους σε πειράματα *in vivo* σε ζώα και πιθανά καρκινογόνα για τους ανθρώπους. Πολλές πολυφαινόλες μπορούν να έχουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση αναστέλλοντας την νιτροσυλίωση πολλών ενώσεων. Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ είναι από τις πολυφαινόλες οι οποίες εμποδίζουν την μετατροπή πρόδρομων ενώσεων σε N-νιτροσο ενώσεις σε χαμηλό pH, όπως το pH του στομάχου, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του οργανισμού από την μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο δράση αυτών των ενώσεων (L.R.Ferguson 2001, Kuenzing et al.1984). Ανασταλτική δράση στις αντιδράσεις νιτροσυλίωσης βρέθηκε ότι παρουσιάζουν και πολλές πολυφαινόλες του τσαγιού (Y. Kudora et Y.Hara 1999).
- Αντιοξειδωτική δράση: Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι ένας μηχανισμός αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολών γιατί οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται από τους σημαντικούς παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό. Οι βλάβες αυτές συμβάλουν στην δημιουργία μεταλλάξεων. Οι πολυφαινόλες αποτρέποντας είτε τον σχηματισμό είτε την δράση των ελεύθερων ριζών εμποδίζουν τον σχηματισμό μεταλλάξεων.
- Επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών: Η ρύθμιση της δράσης των ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ενώσεων μπορεί να έχει επίδραση τόσο στην ενεργοποίηση όσο και στην απέκκριση εξωγενών μεταλλαξιγόνων, καρκινογόνων παραγόντων. Πολλές πολυφαινόλες έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την δράση συγκεκριμένων ενζύμων του P450, ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού, που συμβάλουν στην ενεργοποίηση πολλών προκαρκινογόνων. Επιπλέον ότι μπορούν να αυξάνουν την δράση κάποιων ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η τρανσφεράση της S γλουταθειόνης (GST), τα οποία συμβάλουν στην απομάκρυνση ξενοβιοτικών μεταλλαξιγόνων παραγόντων, παρεμποδίζοντας έτσι την δράση τους στο γενετικό υλικό (L.R.Ferguson 2001).

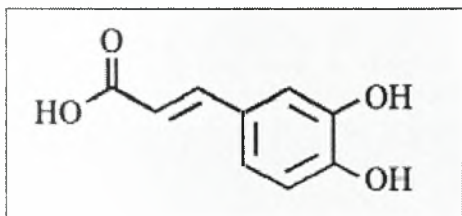
## 1.6. Καφεϊκό οξύ

Το καφεϊκό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδροξυκινναμικών οξέων (C6-C3) (Εικόνα 1.5.) συγκεκριμένα είναι το 3,4διδυδροξυκινναμικό οξύ και παράγεται από το π-κουμαρικό οξύ με την προσθήκη μιας ακόμη υδροξυλομάδας στον αρωματικό του δακτύλιο (Εικόνα 1.18.). 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 υδροξυκινναμικά οξέα. Στα φρούτα βρίσκεται σε όλα τα μέρη του φρούτου, με μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις να συναντώνται στα εξωτερικά μέρη των ώριμων φρούτων (C. 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  $\text{NO}^{\bullet}$  και ρυθμίζοντας την έκφραση διάφορων μεταγωγέων της φλεγμονής (F.M.Da Cunha et al.2004) καθώς και αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την δράση διάφορων ενζύμων όπως της PKC (F.M.Da Cunha et al.2004) και της τοποϊσομεράσης I (D. Stagos et al 2005).

Η αντιοξειδωτική του ικανότητα οφείλεται στην 3,4διδυδροξυ δομή του (Εικόνα 1.18.) η οποία του προσδίδει σημαντική ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (C.Rice-Evans et al. 1996). Το καφεϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι δεσμεύει πολλά είδη ελευθέρων ριζών όπως ρίζες υδροξυλίου  $\text{HO}^{\bullet}$ , σουπεροξειδίου  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , περοξυνιτρίτη  $\text{ONOO}^{\bullet}$ , καθώς και μεταλλαξιγόνες ενώσεις όπως νιτροζαμίνες (F.M. Da Cunha et al.2004). Επιπλέον αυτή η ορθο3,4-διδυδροξυ δομή που παρουσιάζει το καφεϊκό οξύ δεν είναι μόνο σημαντική για την ικανότητά του να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες αλλά και για την ικανότητά του να δεσμεύει χηλικά ιόντα μετάλλων όπως ο δισθενής σίδηρος ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Μαζί με την κερκετίνη θεωρούνται πολύ σημαντικοί δεσμευτές των ιόντων  $\text{Fe}^{2+}$ . Η ικανότητά του αυτή ίσως εξηγεί την αντιμεταλλαξιγόνο δράση που παρουσίασε το καφεϊκό οξύ σε Ames τεστ με *Salmonella Typhimurium* TA102, παρουσία μεταλλαξιγόνου παράγοντα το υπεροξειδίου του υδρογόνου  $\text{H}_2\text{O}_2$ , γιατί δεσμεύοντας τα ιόντα  $\text{Fe}^{2+}$  τα εμπόδισε να αντιδράσουν με το  $\text{H}_2\text{O}_2$  και μέσω της αντίδρασης Fenton να οδηγήσουν στον σχηματισμό των ιδιαίτερα βλαπτικών ριζών  $\text{OH}^{\bullet}$  (C.E. Grey, P. Aldlercreutz 2003). Άλλες ενδείξεις για την αντιμεταλλαξιγόνο δράση του, που ίσως οφείλεται στην ικανότητά του να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες και μέταλλα, προκύπτουν από ότι παρουσίασε αναστολή στην μεταλλαξιγένεση σε διάφορα στελέχη *Salmonella Typhimurium*, σε Ames τεστ, επαγόμενη από διάφορα μεταλλαξιγόνα όπως η αφλατοξίνη B (V. Karekar et al. 2000), η μπλεομυκίνη (D.Stagos et al 2004) καθώς και το  $\text{H}_2\text{O}_2$  (C.E. Grey, P. Aldlercreutz 2003).

Η ισχυρή όμως αντιοξειδωτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος συνοδεύεται και από ισχυρή προ-οξειδωτική ικανότητα. Παρουσία ιόντων χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) το καφεϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι έχει την ικανότητα να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στο DNA ή παρουσία Fe/GSH γενικά βλάβες στο DNA, συμμετέχοντας στα αντίστοιχα μονοπάτια παραγωγής ελευθέρων ριζών που εμπλέκουν τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και τον Fe/GSH αντίστοιχα (Y. Sakihama et al. 2002, M. Lodovici et al 2001).



Εικόνα 1.18.: Χημική δομή του καφεϊκού οξέος (Y. Sakihama et al. 2002)

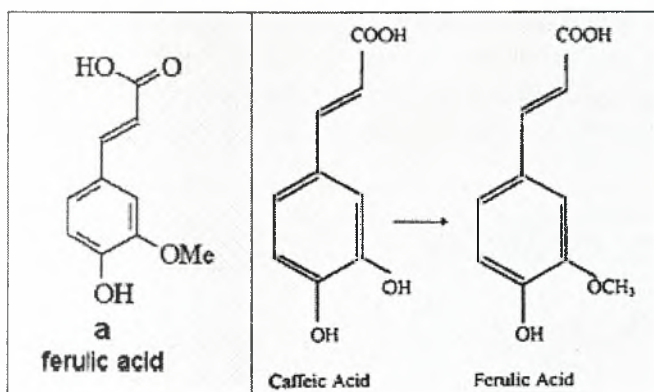
## 1.7. Φερουλικό οξύ

Το φερουλικό οξύ (Εικόνα 1.19 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 1.19, 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 αγλάδια και σε διάφορα άλλα φρούτα (C. Mannach et al. 2004).

Παρουσιάζει σημαντική αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την δράση του ενζύμου CYP1A1 του P450 της φάσης I του μεταβολισμού ξеноβιοτικών ενώσεων, συμβάλλοντας έτσι στην παρεμπόδιση ενεργοποίησης προκαρκινογόνων μέσω του ενζύμου αυτού, καθώς και αναστέλλοντας την έκφραση της COX-2 που συμβάλλει στο στάδιο promotion της καρκινογένεσης (L. R. Ferguson et al. 2005). Επιπλέον, μαζί με το καφεϊκό οξύ προστατεύουν τον οργανισμό από την μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο δράση των N-νιτρόσο ενώσεων εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους σε χαμηλό pH παρόμοιο με αυτό του στομάχου (L.R.Ferguson 2001, Kuenzing et al.1984).

Το φερουλικό οξύ παρουσιάζει σημαντική ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες κυρίως σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$ , 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 (J. Psotova et al 2003). Αυτό φαίνεται και από το ότι δεν παρουσίασε μεταβολή στην μεταλλαξιγένεση επαγόμενη από μπλεομυκίνη και  $H_2O_2$ , σε Ames τεστ με *Salmonella Typhimurium* TA102 σε αντίθεση με το καφεϊκό οξύ (D.Stagos et al 2004, C.E. Grey, P. Aldlercreutz 2003).

Παρόλα αυτά το φερουλικό οξύ έχει σημαντική αντιμεταλλαξιγόνο δράση γιατί σε κύτταρα θηλαστικών (HT-29) παρουσίασε μείωση της δημιουργίας σπασιμάτων στο DNA επαγόμενων από  $H_2O_2$ , σε COMET assay που είναι ενδεικτικό της σταθερότητας του DNA. Επιπλέον παρουσία καρκινογόνου IQ (2-amino-3-methylimidazo[4-5f]quinoline) σε πειράματα σχηματισμού μικροπυρήνων, που αποτελούν δείκτη μεταλλαξιγένεσης, σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών κυττάρων, παρουσίασε μείωση του σχηματισμού των μικροπυρήνων επαγόμενο από IQ, έχοντας έτσι αντιμεταλλαξιγόνο δράση. (L. R. Ferguson et al. 2005).



Εικόνα 1.19.:Χημική δομή φερουλικού οξέος (αριστερά) (L.R. Ferguson et al. 2005). Σχηματισμός φερουλικού οξέος από το καφεϊκό οξύ (δεξιά) (C.Rice-Evans et al. 1996).



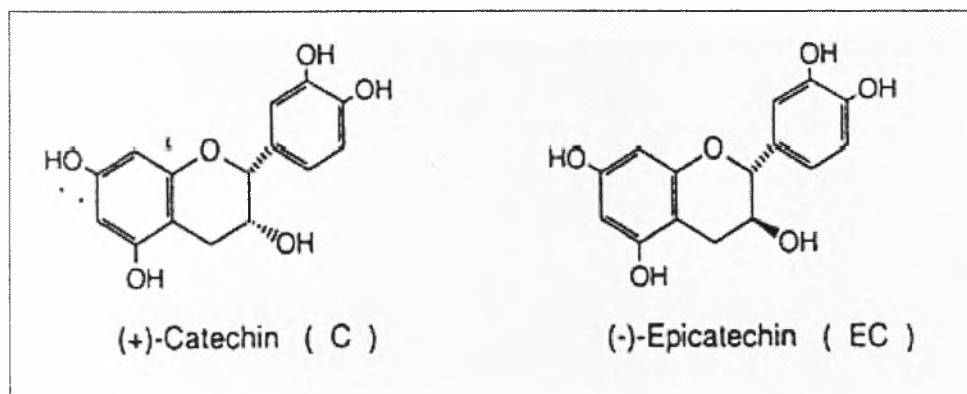
### 1.8. Κατεχίνη - Επικατεχίνη

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών τις φλαβανόλες (Εικόνα 1.2.). 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 1.20.). 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) (C.Mannach et al. 2004).

Η μεγάλη συγκέντρωση της κατεχίνης και της επικατεχίνης στο τσάι, το οποίο καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό σε όλο τον κόσμο, οδήγησε σε μια πληθώρα πειραμάτων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, για την διαλεύκανση της δράσης τους. Οι βιολογικές δράσεις που τους έχουν αποδοθεί είναι ότι έχουν αντιβακτηριακή, αντι-ική δράση, νευροπροστατευτική (Q.Huang et al.2005) καρδιοπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση (G.D. Stoner, H. Mukhtar 1995) αλλά κυρίως αντικαρκινογόνο, αντιοξειδωτική, προ-οξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση (T.Geetha 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) (G.D. Stoner, H. 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  $\text{OH}^\bullet$ , περοξυλίου  $\text{ROO}^\bullet$ , σουπεροξειδίου  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , οξειδίου του αζώτου  $\text{NO}^\bullet$  του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) και του περοξυνιτρίτη  $\text{ONOO}^-$  (Y.Yilmaz, R.T.Toledo 2004) με την επικατεχίνη να είναι πιο αποτελεσματικός δεσμευτής από την κατεχίνη (T.Geetha et al. 2004). Η ορθο-διϋδροξυ δόμη τους στον Β δακτύλιο είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική τους δράση τους η οποία όμως τους προσδίδει και ισχυρή προ-οξειδωτική δράση. Και οι δύο παρουσία ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  αύξησαν την δημιουργία σπασιμάτων σε απομονωμένο DNA με την επικατεχίνη πάλι να παρουσιάζει μεγαλύτερη δράση από την κατεχίνη (S. Azam et al. 2003, F. Hauakawa et al.1999).

Όσον αφορά την αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους υπάρχει ένα πλήθος πειραμάτων *in vitro* που την υποδεικνύουν. Κάποια πειράματα έδειξαν ότι η επικατεχίνη, παρότι θεωρείται ισχυρός δεσμευτής ιόντων σιδήρου δεν παρουσίασε αναστολή της μεταλλαξιγένεσης επαγόμενη από  $\text{H}_2\text{O}_2$  και t-BOOH (tertiary butyl hydroperoxide) σε Ames τεστ με *Salmonella Typhimurium* TA102 (C.E. Grey, P. Aldlercreutz 2003). Παρόλα αυτά υπάρχει ένα πλήθος πειραμάτων σε διάφορα στελέχη *Salmonella Typhimurium* που δείχνουν ότι η κατεχίνη και η επικατεχίνη έχουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι σε πολλά μεταλλαξιγόνα όπως ετεροκυκλικές αμίνες, αφλατοξίνη B1, βενζοπυρένια και άλλα, καθώς και σε επαγόμενη από t-BOOH ή  $\text{H}_2\text{O}_2$  μεταλλαξιγένεση (T.Geetha et al. 2004).



Εικόνα 1.20.: 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. (Y. Kuroda et Y. Hara 1999)

### 1.9. Υδατικό – Μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικο Σαντορίνης

Το Ασσύρτικο Σαντορίνης αποτελεί μία Ελληνική ποικιλία *Vitis Vinifera* λευκού σταφυλιού της Βόρειας Μεσογείου, από τις πιο εκλεκτές ποικιλίες σταφυλιών που καλλιεργούνται στην Σαντορίνη. Καλλιεργήθηκε πρώτη φορά στην Σαντορίνη και εκεί απόκτησε τον μοναδικό χαρακτήρα του και οδήγησε στην παραγωγή ενός πολύ καλού λευκού κρασιού στο οποίο το κλίμα, το έδαφος, το υψόμετρο έχουν σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα της οινοποίησης. Η ποικιλία του Ασσύρτικου Σαντορίνης παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι διατηρεί την οξύτητα του καθώς ωριμάζει και είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο εκχυλίσματα της ποικιλίας αυτής ένα μεθανολικό και ένα υδατικό εκχύλισμα η σύσταση των οποίων, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, βρίσκεται στους Πίνακες 1.4., 1.5..



Εικόνα 1.21.: Λευκό σταφύλλι Ασσύρτικο. (Santorini.web)

Πίνακας 1.4.: Υπολογισμός των  $\mu\text{mole}$  κάθε πολυφαινόλης του υδατικού εκχυλίσματος ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

Συγκέντρωση εκχυλίσματος ( $\mu\text{g/ml}$ )	gallic acid ( $\mu\text{mole}$ )	catechin ( $\mu\text{mole}$ )	epicatechin ( $\mu\text{mole}$ )	trans-resveratrol ( $\mu\text{mole}$ )	quercetin ( $\mu\text{mole}$ )	viniferin ( $\mu\text{mole}$ )
75	0,21	1,05	0,54	0,0065	0,0067	0,010
150	0,42	2,11	1,08	0,013	0,014	0,020
300	0,84	4,22	2,17	0,026	0,027	0,041

Πίνακας 1.5.: Υπολογισμός των  $\mu\text{mole}$  κάθε πολυφαινόλης του μεθανολικού εκχυλίσματος ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

Συγκέντρωση εκχυλίσματος ( $\mu\text{g/ml}$ )	gallic acid ( $\mu\text{mole}$ )	catechin ( $\mu\text{mole}$ )	epicatechin ( $\mu\text{mole}$ )	trans-resveratrol ( $\mu\text{mole}$ )	p-coumaric ( $\mu\text{mole}$ )	ferulic ( $\mu\text{mole}$ )
75	0,64	0,40	0,16	0,06	0,0075	0,0055
150	1,27	0,80	0,32	0,12	0,014	0,011
300	2,55	1,61	0,65	0,25	0,029	0,022

## 1.10. Μιτομυκίνη C (Mitomycin C)

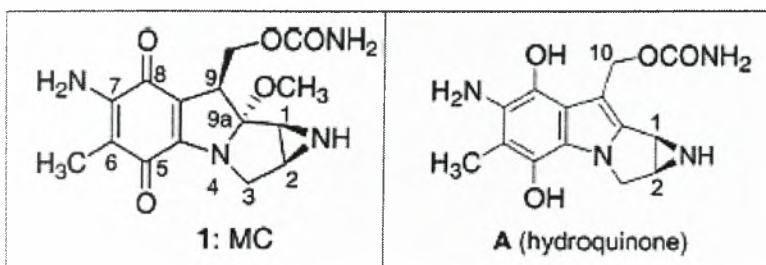
Η Μιτομυκίνη C είναι ένα φυσιολογικό αντιβιοτικό, το οποίο παράγεται από πολλά στελέχη του γένους *Streptomyces* (P.G. Penketh et al. 2001), και ανήκει στην κατηγορία των αντικαρκινικών φαρμάκων που δημιουργούν ομοιοπολικές συνδέσεις με το DNA (X.L. Yang et H.-J.Wang 1999). Χρησιμοποιείται για την θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου και η κυτταροτοξικότητά της στα καρκινικά κύτταρα οφείλεται στην ικανότητά της να προκαλεί χιάσματα (cross-links) ανάμεσα στις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και να αναστέλλει την σύνθεση και την λειτουργία του. (M.Paz et al. 2004).

Η δημιουργία των χιασμάτων, cross-links, επιτυγχάνεται από την μιτομυκίνη C μέσω διαδοχικής αλκυλίωσης δύο γουανινών(G) σε μια αλληλουχία CpG CpG στο DNA, από ένα μόριο μιτομυκίνης C. Οι αλκυλιωτικές ιδιότητες της μιτομυκίνης αποδίδονται στους C1 και C10 της χημικής δομής της, οι οποίοι στην αρχική της δομή είναι ανενεργοί (Εικόνα 1.22. αριστερά) (M.Paz et al. 2004). Η μιτομυκίνη προκειμένου να συνδεθεί ομοιοπολικά με το DNA, να δράσει ως αλκυλιωτικός παράγοντας και να οδηγήσει στον σχηματισμό των χιασμάτων θα πρέπει πρώτα να αναχθεί. Η αναγωγή της μπορεί να γίνει ή ενζυμικά, από ρεδοκτάσες ή χημικά, ή από ήπιες όξινες συνθήκες, προσλαμβάνοντας ένα  $e^-$  ηλεκτρόνιο ή δύο  $2e^-$  ηλεκτρόνια (M. Tomaz et al. 1987). Για την ενεργοποίηση των θέσεων C1 και C10 μετά αναγωγή της ακολουθείται η απώλεια της ομάδας  $-OCH_3$  (Εικόνα 1.22. αριστερά). Το προϊόν της αναγωγής με ένα ηλεκτρόνιο  $e^-$  είναι ένα ανιόν μιας ρίζας ημικινόνης ( $MC^{\bullet-}$ ) η οποία αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο  $O_2$  για να δώσει την μιτομυκίνη C και ιόν σουπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$  το οποίο με την σειρά του μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία άλλων ριζών όπως  $H_2O_2$  και  $OH^{\bullet}$ . Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναγέννηση της μιτομυκίνης C η οποία δεν μπορεί να προκαλέσει χιάσματα, καθώς και τη δημιουργία της ρίζας του σουπεροξειδίου που είναι μία ρίζα η οποία δεν είναι τόσο δραστική στο να προκαλεί σπασίματα και χιάσματα στο DNA. Έτσι η μορφή  $MC^{\bullet-}$  δεν είναι η κύρια μορφή της μιτομυκίνης C που προκαλεί χιάσματα στο DNA, όμως μπορεί να προκαλεί σπασίματα μέσω των άλλων ριζών που παράγονται από το  $O_2^{\bullet-}$ . Η κύρια μορφή της είναι εκείνη που προκύπτει με την αναγωγή της με δύο ηλεκτρόνια  $2e^-$  (bifunctional activation), η οποία οδηγεί στην μετατροπή της σε μία υδροκινόνη ( $MCH_2$ ) (Εικόνα 1.22. δεξιά) η οποία δεν αντιδρά με το  $O_2$  και είναι ικανή να προκαλέσει χιάσματα (M.Paz et al 2004, P.G. Penketh et al. 2001). Τα cross-links που επάγονται από την μιτομυκίνη C σχηματίζονται με την σύνδεσή της με τις αμινομάδες στην θέση 2 (N2) δύο γουανινών μιας αλληλουχίας CpG CpG, που βρίσκεται στην ίδια αλυσίδα (intrastrand) ή σε διαφορετικές αλυσίδες (interstrand), και έτσι δημιουργείται το ομοιοπολικό χίασμα (cross-link adduct) (Εικόνα 1.23.) (M.Paz et al. 2004).

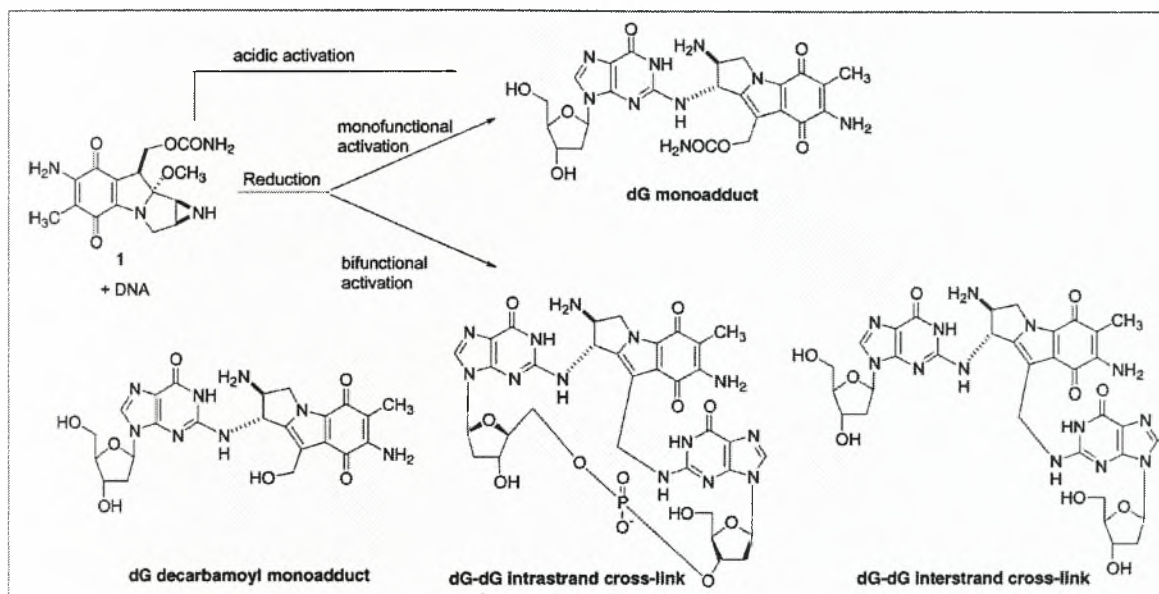
Η μιτομυκίνη C εκτός από τη δημιουργία των ομοιοπολικών χιασμάτων, αποτελεί σημαντικό παράγοντα μεταλλαξιγένεσης προκαλώντας σπασίματα στους κλώνους του DNA και διάφορους τύπους ανταλλαγών στα χρωμοσώματα. Συμβάλλει στην δημιουργία ανταλλαγών ανάμεσα στις χρωματίδες διαφορετικών χρωμοσωμάτων αλλά κυρίως στις χρωματιδιακές ανταλλαγές ανάμεσα στις δύο αδελφές χρωματίδες των χρωμοσωμάτων SCEs. Το γεγονός ότι οι SCEs επάγονται κυρίως από παράγοντες που προκαλούν ομοιοπολικά χιάσματα στο DNA, καθιστά την μιτομυκίνη C ισχυρό παράγοντα επαγωγής τους λόγω της ικανότητά της να προκαλεί τέτοια χιάσματα (R. Meschini et al.1996). Στον μηχανισμό επαγωγής των βλαβών στο DNA, συμπεριλαμβανομένων των SCEs, που προκαλούνται από την μιτομυκίνη C, φαίνεται να συμμετέχουν με κάποιον τρόπο και κάποιες δραστικές μορφές μορφές οξυγόνου όπως η ρίζα  $OH^{\bullet}$ , γιατί η δημιουργία των βλαβών επαγόμενων από την μιτομυκίνη C αναστέλλεται από ουσίες που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και από χηλικές ενώσεις (K.Ueda et T.Komano 1984).

Η μιτομυκίνη C χρησιμοποιείται συχνά για την επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs σε πειράματα in vitro με σκοπό την παρατήρηση της δράσης διάφορων παραγόντων στην δημιουργία τους.





Εικόνα 1.22.: Χημική δομή της μιτομυκίνης C (mitomycinC) (αριστερά). Ανηγμένη μορφή μιτομυκίνης C με δύο 2e<sup>-</sup> (bifunctional activation). Η υδροκινόνη MCH<sub>2</sub> που είναι αυτή που αλκυλιώνει το DNA και οδηγεί στον σχηματισμό των cross-links (δεξιά). (M. M.Paz et al 2004)



Εικόνα 1.23.: Τρόπος σύνδεσης της ενεργοποιημένης μιτομυκίνης C στα μόρια γουανίνης του DNA και δημιουργία διάφορων cross-link adducts. Όταν ενεργοποιείται μόνο η μία θέση αλκυλίωσης, με την απώλεια μόνο της ομάδας -OCH<sub>3</sub> (monofunctional activation), σχηματίζεται μόνο ένας ομοιοπολικός δεσμός (monoadduct). Όταν ενεργοποιούνται και οι δύο θέσεις C1 και C10 (bifunctional activation MCH<sub>2</sub>) τότε σχηματίζονται τα χιάσματα, cross-links, μέσα σε δύο γουανίνες της ίδιας αλυσίδας (intrastrand cross-link) ή διαφορετικών αλυσίδων (interstrand cross-link). (M. M.Paz et al 2004)

### 1.11. Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση πιθανών μηχανισμών χημειοπροστατευτικής δράσης δύο εκχυλισμάτων της ποικιλίας αμπέλου *Vitis Vinifera* Ασσύρτικου Σαντορίνης (λευκά σταφύλια), και κάποιων πολυφαινολών που βρισκόταν σε αυτά. Για την επίτευξη του στόχου παρατηρήθηκε η αναστολή της μεταλλαξιγένεσης που προκαλείται από παράγοντες που δρουν μέσω δραστικών μορφών οξυγόνου όπως πιθανολογείται ότι δρα η μιτομυκίνη C, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μεταλλαξιγόνος παράγοντας σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων SCEs. Η παρατήρηση της αναστολής της μεταλλαξιγένεσης σε συνδυασμό με την αφθονία των πολυφαινολών 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. Χημικά αντιδραστήρια – Καλλιεργητικά υλικά**

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

*Biochrom (Γερμανία)*

RPMI1640

Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)

Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη

Φυτοαιμογλουτινίνη (PHA)

L- γλουταμίνη

*Sigma (Η.Π.Α)*

5-Βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU)

Χρωστική Hoechst

Κολχικίνη

Καφεϊκό οξύ

Φερρουλικό οξύ

Κατεχίνη

Επικατεχίνη

*Kyoma (Ιαπωνία)*

Μιτομυκίνη C (Mitomycin C)

*Merk (Γερμανία)*

Χλωριούχο κάλιο (KCl)

Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH)

Οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH)

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Κιτρικό οξύ

Χρωστική Giemsa

Αιθανόλη (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)

*Fluka (Η.Π.Α.)*

DMSO

*Leo (Γερμανία)*

Ηπαρίνη

#### **2.1.2. Εκχυλίσματα**

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο τύπων, μεθανολικό και υδατικό, και προέρχονταν από μία ποικιλία αμπέλου (*Vitis Vinifera*). Η ποικιλία αυτή ονομάζεται Ασσύριτικο Σαντορίνης και πρόκειται για λευκά σταφύλια.

## 2.2. Μέθοδοι

### *2.2.1. Ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges ή SCEs)*

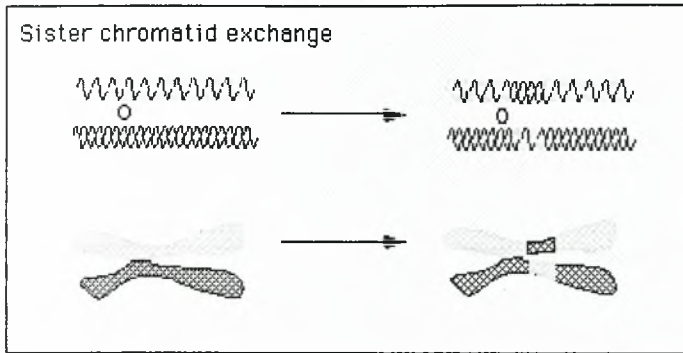
#### *Γενικά*

Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1958 από τους Herbert Taylor και τους συνεργάτες του. Είναι ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο συμβαίνει κατά το στάδιο αντιγραφής του DNA, κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η δημιουργία τους προϋποθέτει το σπάσιμο και την επανένωση των αλυσίδων του DNA ώστε να υπάρχει ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα σε απόλυτα ομόλογες θέσεις ανάμεσα στις δύο αδελφές χρωματίδες, χωρίς να αλλάζει η συνολική δομή του χρωμοσώματος (Εικόνα 2.1). Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνουν οι χρωματιδιακές ανταλλαγές δεν είναι απόλυτα γνωστός ωστόσο η μέτρηση της συχνότητάς τους θεωρείται μια ευαίσθητη δοκιμασία για την διαπίστωση βλαβών στο DNA που προκαλούνται από διάφορους εξωγενείς παράγοντες.

Η μέθοδος μέτρησης της συχνότητας των χρωματιδιακών ανταλλαγών είναι μια κυτταρογενετική μέθοδος και καθώς η αύξηση της συχνότητάς τους αντανakλά την αποτυχία επισκευής βλαβών του DNA, αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη γενωμικής, χρωμοσωμικής σταθερότητας η οποία είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση και την σωστή λειτουργία των κυττάρων. Αυτό συμβαίνει γιατί η συχνότητα των SCEs εξαρτάται από την ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν τις βλάβες που έχουν προκληθεί στο γενετικό υλικό από κάποιους εξωγενείς παράγοντες και μάλιστα πριν τον διπλασιασμό του DNA. Θεωρητικά εάν τα κύτταρα κατορθώσουν να επιδιορθώσουν όλες τις βλάβες που έχουν προκληθεί στο DNA πριν αυτά περάσουν στην φάση S του κυτταρικού κύκλου τότε το κύτταρο δεν θα εμφανίζει καμία αύξηση στις SCEs. Στην αντίθετη περίπτωση η αδυναμία των κυττάρων να επιδιορθώσουν τις προκαλούμενες βλάβες οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας των SCEs, γεγονός που αποδεικνύεται από την αύξηση της συχνότητάς τους σε άτομα τα οποία έχουν ελαττωματική ή μειωμένη επιδιορθωτική ικανότητα το οποίο αντικατοπτρίζει παράλληλα ότι ο μηχανισμός δημιουργίας τους είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αντιγραφή DNA το οποίο περιέχει ανεπιδιόρθωτες βλάβες. (Mourelatos D. 1996) Ωστόσο υπάρχει η άποψη ότι η δημιουργία των χρωματιδιακών ανταλλαγών αντικατοπτρίζει έναν μηχανισμό επιδιόρθωσης που γίνεται μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού. (E.Sonada et. al.1999).

Ένα από τα πλεονεκτήματα που παρέχει αυτή η μέθοδος είναι ότι εκτός από την παρατήρηση της συχνότητας των χρωματιδιακών ανταλλαγών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παρατήρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων υπό την επίδραση των διάφορων παραγόντων, δίνοντας την δυνατότητα υπολογισμού του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI). Επιπλέον η μέθοδος παρέχει την παρατήρηση μεγάλου αριθμού κυττάρων που, δίνοντας έτσι την δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης. Από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί καλλιέργεια κυττάρων in vitro που απαιτεί χρόνο και ασυπτικές συνθήκες αλλά και δύο συνεχόμενες φάσεις αντιγραφής του DNA, S φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ακόμη μπορεί να αποτελεί δείκτη μεταλλαξιγένεσης ωστόσο οι ίδιες οι SCEs δεν θεωρούνται οι ίδιες βλάβες στο DNA. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι έχει μεγάλη ευαισθησία αλλά μικρότερη εξειδίκευση. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να επισημανθεί η καρκινογόνος δράση μίας ουσίας λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας όμως είναι επίσης μεγάλη η πιθανότητα μία μη καρκινογόνος ουσία να δώσει θετικό αποτέλεσμα (Tennant et. al.1987). Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ουσιών που μπορεί να αποτελούν μέρος του ανθρώπινου διαιτολογίου καθώς και για την εκτίμηση της δράσης διάφορων φυσικών ή χημικών παραγόντων του περιβάλλοντος.



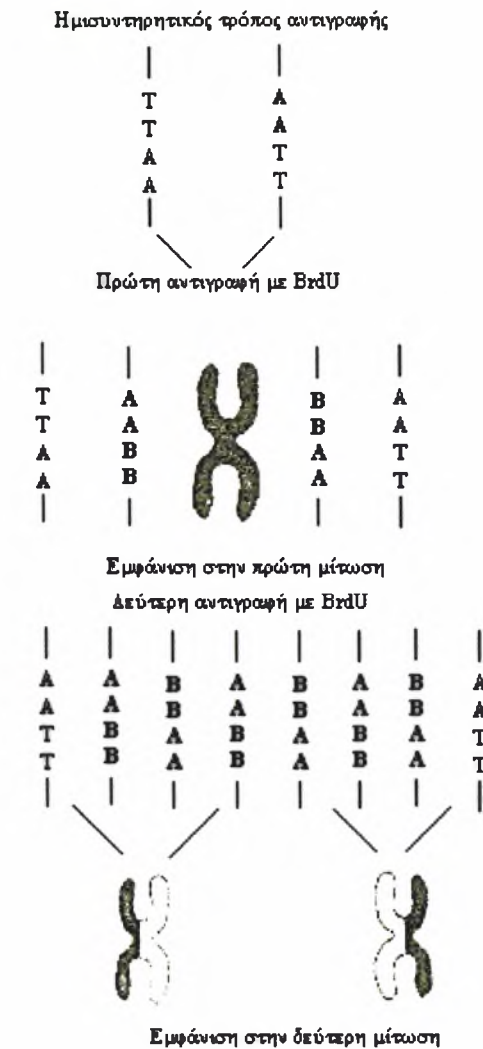


Εικόνα 2.1.: Σχηματική αναπαράσταση των χρωματιδιακών ανταλλαγών.

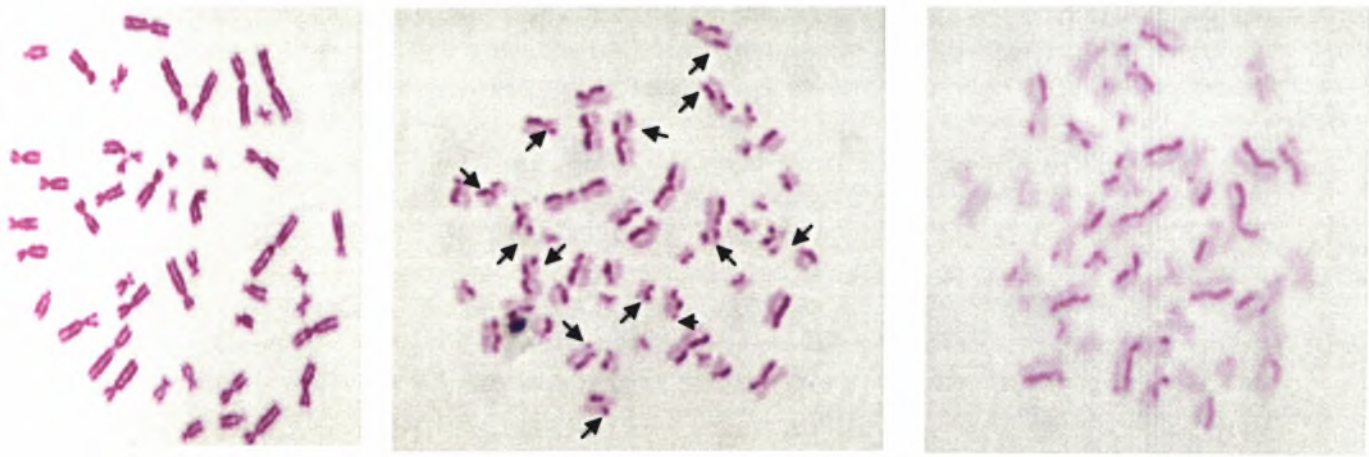
Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να συμβάλλει στην εκτίμηση της αντινεοπλασματικής θεραπείας με πειράματα *in vitro*, *in vivo* ή σε συνδυασμό *in vivo-in vitro*. Ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνου δράσης ορισμένων ουσιών με την παρατήρηση της επίδρασης της εξεταζόμενης ουσίας στην συχνότητα των ανταλλαγών παρουσία κάποιου επαγωγέα τους.

Η παρατήρηση και καταμέτρηση των SCEs γίνεται σε μεταφασικά χρωμοσώματα  $2^{ns}$  μιτωτικής διαίρεσης, ωστόσο για να μπορέσουν να γίνουν ορατές χρησιμοποιείται ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο η 5-βρωμοδεόξυουριδίνη BrdU που αντικαθιστά την θυμιδίνη. Η εμφάνιση των δύο αδελφών χρωματίδων προκύπτει από την εκμετάλλευση του ημισυντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Σύμφωνα με τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αυτόδιπλασιασμού του DNA μετά τον πρώτο μιτωτικό κύκλο οι χρωματίδες έχουν αντικατασταθεί απλά από την BrdU γιατί στην πατρική αλυσίδα υπάρχει θυμιδίνη ενώ στην θυγατρική αλυσίδα η θυμιδίνη έχει αντικατασταθεί από την BrdU. Μετά τον δεύτερο μιτωτικό κύκλο η μία χρωματίδα έχει αντικατασταθεί απλά και η άλλη διπλά γιατί στην μία χρωματίδα χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο η αρχική πατρική αλυσίδα και στην άλλη χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο η θυγατρική αλυσίδα της πρώτης διαίρεσης. Για την εμφάνιση των ανταλλαγών χρησιμοποιείται μια χρωστική, η Hoechst η οποία με την έκθεση των παρασκευασμάτων σε υπεριώδη ακτινοβολία αντιδρά μέσω μιας φωτοχημικής αντίδρασης με την BrdU. Στην συνέχεια γίνεται χρώση με μια δεύτερη χρωστική την Giemsa. Όπου υπάρχει απλή αντικατάσταση της χρωματίδας με BrdU οι χρωματίδα βάφεται σκούρη ενώ όταν υπάρχει διπλή αντικατάσταση η διπλάσια ποσότητα της BrdU οδηγεί στον αποχρωματισμό της χρωστικής και έτσι η χρωματίδα φαίνεται άχρωμη (Εικόνα 2.2.). Μετά τον τρίτο μιτωτικό κύκλο και οι δύο χρωματίδες έχουν αντικατασταθεί από BrdU έτσι η ποσότητα είναι ικανή να οδηγήσει στον αποχρωματισμό και των δύο αδελφών χρωματίδων.

Έτσι όταν όλα τα χρωμοσώματα αποτελούνται από δύο σκούρες αδελφές χρωματίδες τότε ο πυρήνας χαρακτηρίζεται ως πρώτης μιτωτικής διαίρεσης. Όταν όλα τα χρωμοσώματα αποτελούνται από μία σκούρη και μία ανοιχτόχρωμη αδελφή χρωματίδα τότε ο πυρήνας χαρακτηρίζεται δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης. Όταν έστω και ένα χρωμόσωμα αποτελείται από δύο ανοιχτόχρωμες αδελφές χρωματίδες τότε θεωρείται ότι το κύτταρο έχει περάσει στον τρίτο μιτωτικό κύκλο και θεωρείται ως τρίτης μιτωτικής διαίρεσης. Στην εικόνα 2.3. φαίνονται χαρακτηριστικά τρεις πυρήνες πρώτης, δεύτερης και τρίτης μιτωτικής διαίρεσης. Στους πυρήνες  $2^{ns}$  μιτωτικής διαίρεσης οι χρωματιδιακές ανταλλαγές φαίνονται σαν τμήματα της σκούρης αλυσίδας που έχουν μεταφερθεί στην ανοιχτόχρωμη αλυσίδα και το αντίστροφο (Εικόνα 2.3. B)). Η καταμέτρηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών γίνεται με την μέτρηση των σπασιμάτων που πρέπει να γίνουν για την δημιουργία τους.



Εικόνα 2.2.: Σχηματική αναπαράσταση της αντικατάστασης της θυμίνης από BrdU κατά τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αυτοδιπλασιασμό του DNA και αντικατοπτρισμός αυτής της αντικατάστασης στην εμφάνιση των χρωμοσωμάτων.



Εικόνα 2.3. : Α) Πυρήνας 1<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Σε όλα τα χρωμοσώματα οι δύο αδελφές χρωματίδες εμφανίζονται σκούρες. Β) Πυρήνας 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Στα σημεία που βρίσκονται τα βέλη είναι τα σημεία όπου υπάρχουν SCEs (σύνολο 14/46 χρωμοσώματα) Γ) Πυρήνας 3<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Υπάρχουν χρωμοσώματα που και οι δύο αδελφές χρωματίδες είναι ανοιχτόχρωμες.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση των μεταβολών της συχνότητας των χρωματιδιακών ανταλλαγών ήταν ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Επειδή είναι τα μόνα εμπύρρινα κύτταρα του περιφερικού αίματος, δίνουν καλή ποιότητα μεταφασικών χρωμοσωμάτων και η εύρεση και καλλιέργειά τους είναι σχετικά εύκολη, ενδείκνυται για την παρατήρηση των χρωμοσωμάτων τους και για την εφαρμογή της μεθόδου.

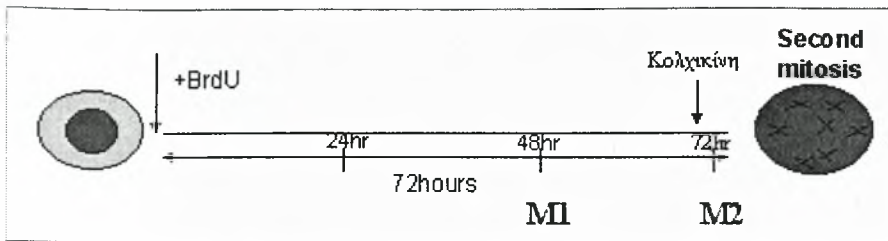
Τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από φλεβικό αίμα που συλλέγεται μέσα σε αποστειρωμένες σύριγγες που περιείχαν ηπαρίνη. Η ηπαρίνη εμποδίζει την πήξη του αίματος χωρίς να επηρεάζει τα παρακάτω βήματα της διαδικασίας. Η καλλιέργειά τους πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI1640 το οποίο περιέχει απαραίτητες ποσότητες πολλών αμινοξέων, βιταμινών, σακχάρων, ενζύμων, αυξητικών παραγόντων εξασφαλίζοντας τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό τους. Επιπλέον περιέχει ανόργανα άλατα για την εξασφάλιση κατάλληλης ωσμωτικής πίεσης και δείκτη pH (ερυθρό της φαινόλης) για την παρακολούθηση της διατήρησης του pH στα κατάλληλα επίπεδα, pH=7,1-7,5 για την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων.

Στο θρεπτικό αυτό μέσο προστίθεται και άλλα συστατικά τα οποία συμβάλουν στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτά είναι η L-γλουταμίνη, ο ορός εμβρύου μόσχου (FCS) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη τα οποία προστίθενται στο μέσο λίγο πριν την χρήση του. Η L-γλουταμίνη είναι ένα αμινοξύ που συμβάλλει μαζί με τα άλλα αμινοξέα ως πηγή άνθρακα ωστόσο επειδή είναι σχετικά ασταθές αμινοξύ προστίθεται λίγο πριν την χρήση του. Ο ορός προστίθεται σε συγκέντρωση 5-15% για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού μέσου αλλά και για την εξασφάλιση γρήγορου πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς παρέχει στα κύτταρα πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, πρόδρομους μεταβολίτες νουκλεϊκών οξέων, αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες. Συμβάλλει επίσης στην διατήρηση του pH στα φυσιολογικά επίπεδα. Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη προστίθενται για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεων από Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια αντίστοιχα. (Πρακτική Μικροβιολογία, 1996)

Για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού μόνο των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος προστίθεται στο θρεπτικό μέσο το μιτογόνο φυτοαιμογλουτινίνη, PHA. Η φυτοαιμογλουτινίνη είναι μία πρωτεΐνη η οποία εκχυλίζεται από την κοινή φασολιά *Phaseolus vulgaris*, και έχει την ικανότητα να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό κυρίως των T-λεμφοκυττάρων, που αποτελούν το 70% των λεμφοκυττάρων ενός υγιούς ανθρώπου, *in vitro*. Η ικανότητά της αυτή οφείλεται στο ότι μπορεί και προσδένεται σε μόρια της επιφάνειας των T-λεμφοκυττάρων τα οποία εμπλέκονται στην ενεργοποίησή τους όπως τα TCR και CD2 (Roit, Brostoff, Male, Ανοσολογία 2000). Η ενεργοποίηση αυτή μοιάζει με την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από ένα αντιγόνο μόνο που σ' αυτή την περίπτωση το αντιγόνο, PHA, είναι μη ειδικό. Η αρχική διέγερση πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων οδηγεί και στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μικρού αριθμού και B-λεμφοκυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός μόνο των λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται επίσης εξαιτίας της ικανότητας της PHA να προκαλεί συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Τα λεμφοκύτταρα καλλιεργούνται για 72 ώρες. Η αρχική διέγερση των λεμφοκυττάρων συμβαίνει στις πρώτες 24ώρες. Τις επόμενες 24 ώρες ο ρυθμός σύνθεσης του RNA αυξάνει και ξεκινά η σύνθεση του DNA. Η πρώτη μιτωτική διαίρεση έχει ολοκληρωθεί μετά τις 48 ώρες και κάθε 24 ώρες πραγματοποιείται ένας ακόμη μιτωτικός κύκλος. Έτσι στις 72 ώρες η πλειοψηφία των κυττάρων θα έχει ολοκληρώσει την δεύτερη μιτωτική διαίρεση στην οποία μπορούν να παρατηρηθούν οι χρωματιδιακές ανταλλαγές λόγω της BrdU που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο (Εικόνα 2.4.). Ωστόσο επειδή τα κύτταρα δεν αντιδρούν ταυτόχρονα στην PHA κάποια από τα κύτταρα βρίσκονται στην πρώτη ή στην τρίτη μιτωτική διαίρεση μετά από τις 72 ώρες.





Εικόνα 2.4.: Σχηματική αναπαράσταση των μιτωτικών κύκλων κατά την 72 ωρών καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων

Η διακοπή της μίτωσης των κυττάρων στην φάση της μετάφασης του κυτταρικού κύκλου, στην οποία τα χρωμοσώματα είναι ευδιάκριτα, γίνεται με την προσθήκη κολχικίνης στις 70 ώρες καλλιέργειας. Η κολχικίνη εμποδίζει τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου εμποδίζοντας τον πολυμερισμό των υπομονάδων των μικροσωληνίσκων και έτσι το κύτταρο σταματά στην μέση της μίτωσης ανίκανο να κατανέμει τα χρωμοσώματά του σε δύο ομάδες (Kihlman et Anderson 1984). Κατά την προετοιμασία του θρεπτικού μέσου καθώς και κατά την προσθήκη της κολχικίνης και των διάφορων ουσιών που προστίθενται στις καλλιέργειες οι χειρισμοί διενεργούνται σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar Air Flow) για την εξασφάλιση ασυπτικών συνθηκών.

### 2.2.2. Δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού (PRI)

Η ίδια μεθοδολογία εκτός από την παρατήρηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών δίνει την δυνατότητα παρατήρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τον καθορισμό του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού PRI. Ο δείκτης PRI υπολογίζεται με την παρατήρηση 100 πυρήνων και την ταυτόχρονη καταγραφή της μιτωτικής διαίρεσης στην οποία βρίσκεται ο καθένας με βάση των τύπο:

$$PRI = \frac{M^1 + 2M^2 + 3M^3}{M^1 + M^2 + M^3}$$

Όπου:  $M^1$ : αριθμός πυρήνων 1<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης

$M^2$ : αριθμός πυρήνων 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης

$M^3$ : αριθμός πυρήνων 3<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης

Ο δείκτης PRI αποτελεί ένα δείκτη κυτταροστατικότητας, κυτταροτοξικότητας και παίρνει τιμές από 1-3. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του, δηλαδή όσο πιο κοντά βρίσκεται στην τιμή 1, τόσο σημαίνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των πυρήνων που μετρήθηκαν βρισκόταν στην 1<sup>η</sup> μιτωτική διαίρεση, γεγονός που σημαίνει ότι τα κύτταρα στην συγκεκριμένη καλλιέργεια δεν μπόρεσαν να προχωρήσουν στους επόμενους μιτωτικούς κύκλους.

### 2.2.3. Πειραματική διαδικασία

#### **Προετοιμασία του θρεπτικού μέσου**

Αρχικά προετοιμάζεται το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων το οποίο αποτελείται από το καλλιεργητικό υλικό RPMI1640, L-γλουταμίνη, ορό εμβρύου μόσχου (FCS), αντιβιοτικά (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη), φυτοαιμογλουτινίνη (PHA), και βρωμοδεόξυουριδίνη (BrdU). Αρχικά ετοιμάζεται μία ποσότητα καλλιεργητικού μέσου η οποία στην συνέχεια διαμοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια Falcon όπου γίνεται η καλλιέργεια.

Σε 100ml έτοιμου καλλιεργητικού υλικού RPMI1640 προστίθενται 10ml FCS, 2ml διαλύματος πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, 2ml διαλύματος L-γλουταμίνης και 2,5ml PHA. Ο ορός εμβρύου μόσχου είναι έτοιμος και διατηρείται στην κατάψυξη στους -20°C και αποψύχεται πριν την χρήση. Τα διαλύματα της L-γλουταμίνης, της PHA και της πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης ετοιμάζονται με την προσθήκη 5ml αποστειρωμένου νερού σε ποσότητα

λυοφιλημένης σκόνης τους. Ακολουθεί ανάδευση του θρεπτικού μέσου και κατανομή του στα σωληνάρια Falcon, χρησιμοποίηση όσον χρειάζονται και αποθήκευση των υπόλοιπων στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Η προσθήκη της ΡΗΑ μπορεί να γίνει και ξεχωριστά με την προσθήκη 100μl σε κάθε καλλιέργεια λίγο πριν την προσθήκη του αίματος, γιατί η προσθήκη της στο αρχικό θρεπτικό μέσο περιορίζει τον χρόνο αποθήκευσής του λόγω αλλοίωσης.

Στα 5ml θρεπτικού μέσου προστίθενται λίγο πριν την προσθήκη του αίματος 50μl από φωτοευαίσθητο διάλυμα βρωμοδεόξυουριδίνης 1mg/ml που ετοιμάζεται με την διάλυση της αντίστοιχης ποσότητας σε αποστειρωμένο νερό.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες καθώς και η προετοιμασία της καλλιέργειας των λεμφοκυττάρων και η προσθήκη όλων των απαραίτητων ουσιών γίνονται σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar Air Flow) για την αποφυγή επιμόλυνσης των υλικών και των καλλιιεργειών.

### **Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων**

Σε 5ml θρεπτικού μέσου (με ΡΗΑ) προστίθενται 50μl Brdu και στην συνέχεια προστίθενται 10 σταγόνες ηπαρινισμένου αίματος. Οι καλλιέργειες εισάγονται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  για 72 ώρες. Στις 24 ώρες γίνεται η προσθήκη της μιτομυκίνης C και των ουσιών προς μελέτη, ακολουθεί απαλή ανάδευση και επανατοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο.

Κάθε σειρά καλλιιεργειών αποτελείται από:

- Ένας αρνητικός μάρτυρας (αρνητικό control), στον οποίο δεν προστίθεται τίποτα.
- Ένας θετικός μάρτυρας (θετικό control), ο μάρτυρας της μιτομυκίνης, στο οποίο προστίθεται μόνο 50μl διαλύματος μιτομυκίνης C (τελική συγκέντρωση 20ng/ml).
- Τρεις καλλιέργειες με 100μl της ουσίας ή του εκχυλίσματος σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μαζί με 50μl διαλύματος μιτομυκίνης.
- Ένας τρίτος μάρτυρας ο οποίος περιέχει μόνο την ουσία ή το εκχύλισμα (100μl) στην μεγαλύτερη συγκέντρωση μαζί με 50μl διαλύματος μιτομυκίνης C.
- Ένας τέταρτος μάρτυρας στον οποίο υπάρχει στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ο διαλύτης (100μl) στον οποίο βρίσκεται διαλυμένη η ουσία ή το εκχύλισμα μαζί με 50μl διαλύματος μιτομυκίνης C. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το DMSO και μεθανόλη σε συγκεντρώσεις 2,5% και 0,3% αντίστοιχα.

Στις 70 ώρες προστίθεται 50μl διαλύματος κολχικίνης 50μg/ml (τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml) σε όλες τις καλλιέργειες οι οποίες στην συνέχεια ανακινούνται απαλά και επανεισάγονται στον επωαστικό κλίβανο για τις υπόλοιπες 2 ώρες καλλιέργειας.

### **Προετοιμασία παρασκευάσματος**

Μετά την ολοκλήρωση της 72 ωρών καλλιέργειας ακολουθούν κάποια βήματα τα οποία καταλήγουν στην μικροσκοπική παρατήρηση και την καταμέτρηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών στα χρωμοσώματα των λεμφοκυττάρων. Αφού οι καλλιέργειες βγουν από τον επωαστικό κλίβανο αναδεύονται έντονα και μεταγγίζονται σε σωληνάρια φυγοκέντρησης των 10ml και φυγοκεντρούνται στις 1500 στροφές για 10 λεπτά στους  $25^{\circ}\text{C}$ .

Λίγο πριν βγουν οι καλλιέργειες ετοιμάζεται διάλυμα KCl 0,075M το οποίο τοποθετείται και αυτό στον επωαστικό κλίβανο ώστε να έχει θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$ . Επιπλέον παράλληλα ετοιμάζεται διάλυμα μονιμοποίησης Fix το οποίο αποτελείται από 3:1 αναλογία μεθανόλη:οξικό οξύ το οποίο πρέπει πάντα να φτιάχνεται καινούριο. Το διάλυμα αναδεύεται, καλύπτεται με μεμβράνη και τοποθετείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ώστε να είναι κρύο όταν θα χρησιμοποιηθεί. Μετά την φυγοκέντρηση αποχύνεται το υπερκείμενο διάλυμα ώστε να μείνει γύρω στο 1ml υπερκείμενου προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν απώλεια στερεού υλικού. Ακολουθεί προσθήκη 7-8ml διαλύματος KCl 0,075M σταγόνα σταγόνα με την βοήθεια πιπέτας Pasteur με ταυτόχρονη ανάδευση. Στην συνέχεια τα δείγματα παραμένουν για 20min στον επωαστικό κλίβανο και μετά φυγοκεντρούνται στις 1500 στροφές για 10 λεπτά στους  $25^{\circ}\text{C}$ .

Μετά την φυγοκέντρωση παραμένουν για 10 λεπτά έξω από την φυγόκεντρο και αποχύνεται το υπερκείμενο όπως προηγουμένως. Το διάλυμα του KCl συμβάλει στην απομόνωση λεμφοκυττάρων και στην απελευθέρωση των χρωμοσωμάτων ώστε να είναι εφικτή η μετέπειτα παρατήρησή τους. Επειδή είναι υπότονο επιτρέπει την διέλευση του νερού διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης κάνοντας τα κύτταρα να διογκωθούν και τα χρωμοσώματα να διασκορπιστούν μέσα στα λεμφοκύτταρα. Το διάλυμα αυτό επίσης οδηγεί και στην διάρρηξη των ερυθροκυττάρων και την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης η οποία είναι υπεύθυνη για το χρώμα του υπερκείμενου μετά την φυγοκέντρωση.

Μετά την προσθήκη του KCl ακολουθεί η πλύση των κυττάρων με το διάλυμα μονιμοποίησης Fix το οποίο διατηρεί την μορφολογία των χρωμοσωμάτων και απομακρύνει τις πυρηνικές πρωτεΐνες συμβάλλοντας σημαντικά στην δημιουργία καλών παρασκευασμάτων. Αρχικά γίνεται αργή προσθήκη 7-8ml διαλύματος Fix σταγόνα σταγόνα με ταυτόχρονη ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1500 στροφές για 10 λεπτά στους 25°C και απόχυση του υπερκείμενου. Η τελευταία διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ακόμη τρεις φορές προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλή ποιότητα των παρασκευασμάτων. Μετά τη τελευταία πλύση τα δείγματα διατηρούνται για 24 ώρες στους -20°C.

Για την δημιουργία των παρασκευασμάτων τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 1500 στροφές για 10 λεπτά στους 25°C, αποχύνεται το υπερκείμενο με προσοχή χωρίς να απομακρυνθεί το ίζημα ώστε να μείνει μικρή ποσότητα υπερκείμενου. Με την βοήθεια πιπετών Pasteur το ίζημα διαλύεται στην ποσότητα του υπερκείμενου που μένει και ενσταλάζεται από ύψος πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες διατηρούνται στο ψυγείο μέσα σε αιθανόλη. Η μικρή ποσότητα της αιθανόλης που βρίσκεται πάνω στη αντικειμενοφόρο βοηθά στο καλύτερο άπλωμα των χρωμοσωμάτων. Η θερμοκρασία του χώρου (20-25°C) και των αντικειμενοφόρων καθώς και η υγρασία του χώρου (40-45%) συμβάλουν στην ποιότητα των παρασκευασμάτων. Τα παρασκευάσματα αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα για να ακολουθήσει η χρώση τους.

### **Χρώση των παρασκευασμάτων**

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την χρώση τα οποία είναι το διάλυμα της χρωστικής Hoechst, το ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen (pH=6,8) και το διάλυμα Mac Lvaines.

- Το διάλυμα της χρωστικής Hoechst ετοιμάζεται πριν την χρώση με συγκέντρωση 50μg/ml, με την διάλυση της αντίστοιχης ποσότητας χρωστικής σε απεσταγμένο νερό.
- Για το ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen παρασκευάζονται διαλύματα  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Για την παρασκευή 500ml ρυθμιστικού διαλύματος διαλύονται με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα 2,42gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  σε 267ml απεσταγμένο νερό (διάλυμα A) και 2,77gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  σε 233ml νερό (διάλυμα B). Στην συνέχεια γίνεται ανάμιξη των δύο διαλυμάτων με την σταδιακή προσθήκη του διαλύματος B στο A με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα και ταυτόχρονη μέτρηση του pH, μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό pH. Το διάλυμα προστίθεται σε δοχείο φύλαξης, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και διατηρείται στο ψυγείο.
- Για το ρυθμιστικό διάλυμα Mac Lvaines διάλυμα κιτρικού οξέως 21,02gr/lit (διάλυμα A) αναμιγνύεται με διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  35,6gr/lit (διάλυμα B). Η ανάμιξη των διαλυμάτων γίνεται με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα και ταυτόχρονη μέτρηση του pH σε αναλογία 15:85 διάλυμα A:διάλυμα B ώστε να προκύψει διάλυμα με pH=8. Το διάλυμα αυτό αποστειρώνεται διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Κάθε παρασκευάσμα αφού στεγνώσει καλύπτεται με το διάλυμα της χρωστικής Hoechst για 12 λεπτά. Στην συνέχεια γίνεται ενστάλαξη 2 σταγόνων διαλύματος Mac Lvaines σε κάθε αντικειμενοφόρο και τοποθετούνται οι καλυπτρίδες. Το διάλυμα αυτό θεωρείται ότι προστατεύει τα κύτταρα από την υπεριώδη ακτινοβολία στην οποία υποβάλλονται στην συνέχεια. Τα παρασκευάσματα ακτινοβολούνται με υπεριώδη ακτινοβολία για 1 ώρα και 15 λεπτά. Έπειτα αφαιρούνται οι καλυπτρίδες και τα παρασκευάσματα τοποθετούνται σε διάλυμα



χρωστικής Giemsa 4% (48ml διαλύματος Sorensen και 2ml χρωστικής Giemsa) για ακριβώς 8 λεπτά. Στην συνέχεια ξεπλένονται με νερό και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα ώστε να είναι έτοιμα για την μικροσκοπική παρατήρηση.

### **Μικροσκοπική παρατήρηση**

Για την μικροσκοπική παρατήρηση των μεταφασικών πυρήνων και των χρωμοσωμάτων τους γίνεται σε οπτικό μικροσκόπιο στον καταδυτικό φακό με μεγέθυνση x100 με ταυτόχρονη χρήση κεδρελαίου. Για να είναι αξιόπιστη η μέτρηση των SCEs και ο καθορισμός του PRI θα πρέπει υπάρχει ικανοποιητική διαφοροποίηση στο χρώμα των αδελφών χρωματίδων (σκούρη – ανοιχτόχρωμη) ώστε να είναι ευδιάκριτες οι SCEs και να υπάρχει σαφής διάκριση ανάμεσα στους πυρήνες 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Επιπλέον θα πρέπει τα χρωμοσώματα να έχουν απλώσει καλά ώστε να μην υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις ανάμεσά τους και γίνεται απόκρυψη κάποιων ανταλλαγών και άρα αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

Με την εύρεση ενός μεταφασικού πυρήνα γίνεται αρχικά αναγνώριση σε ποια μιτωτική διαίρεση βρίσκεται ανάλογα με την χρώση των χρωμοσωμάτων του. Αν ο πυρήνας αναγνωριστεί ότι είναι 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης τότε ακολουθεί καταμέτρηση των χρωμοσωμάτων του. Αν ο αριθμός τους είναι κάτω από 42 δεν γίνεται καταμέτρηση των ανταλλαγών, ενώ αν δεν φαίνονται κάποια χρωμοσώματα (ο αριθμός τους να μην ξεπερνά τα 4) τότε γίνεται αναγωγή των ανταλλαγών στα 46 χρωμοσώματα με το πολλαπλασιασμό του πηλίκου του αριθμού των ανταλλαγών δια του αριθμού των χρωμοσωμάτων επί 46.

### **2.2.4. Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί**

#### **Στατιστική ανάλυση**

Για την στατιστική ανάλυση υπολογίζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του αριθμού των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ενός κυττάρου σε 30 πυρήνες 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Ο σκοπός της στατιστικής ανάλυσης είναι η αξιολόγηση της διαφοράς ανάμεσα στην μέση τιμή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών στα 46 χρωμοσώματα των καλλιέργειών που περιείχαν τις εξεταζόμενες ουσίες και στην αντίστοιχη μέση τιμή των καλλιέργειών του θετικού μάρτυρα της μιτομυκίνης C. Η μέση τιμή των SCEs στην καλλιέργεια που είχε προστεθεί μόνο η εξεταζόμενη ουσία στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (τρίτος μάρτυρας) συγκρίνεται με την μέση τιμή του αρνητικού μάρτυρα.

Η αξιολόγηση της διαφοράς των μέσων τιμών των χρωματιδιακών ανταλλαγών χρησιμοποιείται το Student's t-test. Η τιμή του κριτηρίου t υπολογίζεται από τον τύπο:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}}$$

Όπου :  $\bar{x}_1, \bar{x}_2$  : Οι μέσες τιμές του αριθμού των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα στις αντίστοιχες καλλιέργειες

$S_1, S_2$  : Οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων του αριθμού των SCEs σε κάθε καλλιέργεια

n : το πλήθος του δείγματος (στην περίπτωσή μας n=30)

Η τυπική απόκλιση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$s = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

Όπου:  $\bar{x}, x_i$  : οι αντίστοιχες μέσες τιμές

S= Η τυπική απόκλιση

n = το πλήθος του δείγματος

Για να διαπιστωθεί ότι η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών είναι στατιστικά σημαντική, η τιμή του κριτηρίου t συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής (Πίνακας 2.1.) για  $p < 0,05$  (οι βαθμοί ελευθερίας υπολογίζονται με βάση τον τύπο  $df = n_1 + n_2 - 2 = 30 + 30 - 2 = 58$ ). Όταν η τιμή του κριτηρίου t είναι μεγαλύτερη από την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα τότε η διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών είναι στατιστικά σημαντική.

### **Υπολογισμός της %αναστολής/επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης (χρωματιδιακών ανταλλαγών)**

Η %αναστολή/επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών που προκαλείται από μία εξεταζόμενη ουσία υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή/επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{x_c - m} 100$$

Όπου:  $\bar{x}_c$  : η μέση τιμή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών του θετικού

μάρτυρα (control της μιτομυκίνης C)

$\bar{x}$  : η μέση τιμή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών στις καλλιέργειες που βρίσκονται οι εξεταζόμενες ουσίες στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις

m : η μέση τιμή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών του αρνητικού μάρτυρα (αρνητικό control)

Πίνακας 2.1. : Πίνακας κατανομής t

df	$\alpha$ for a 1-tailed test					
	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
	$\alpha$ for a 2-tailed test					
	.20	.10	.05	.02	.01	.001
1	3.078	6.314	12.706	31.820	63.656	636.615
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.599
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.141
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.849
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.768
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
35	1.306	1.690	2.030	2.438	2.724	3.591
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
45	1.301	1.679	2.014	2.412	2.690	3.520
50	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.496
55	1.297	1.673	2.004	2.396	2.668	3.476
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
70	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.435
80	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.416
90	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.402
100	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.390



### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1. Επαγόμενη από μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων**

Για την επιλογή της συγκέντρωσης της μιτομυκίνης C που θα χρησιμοποιούνταν για την επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών πραγματοποιήθηκε μια σειρά καλλιεργειών η οποία αποτελούνταν από ένα αρνητικό μάρτυρα (στον οποίο δεν είχε προστεθεί τίποτε) και 6 καλλιέργειες με έξι αυξανόμενες συγκεντρώσεις μιτομυκίνης (10ng/ml, 20ng/ml, 30ng/ml, 50ng/ml, 70ng/ml, 100ng/ml τελική συγκέντρωση). Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις επιτεύχθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις σε διάλυμα μιτομυκίνης C 500ng/ml. Όπως παρατηρείται από την καμπύλη των συγκεντρώσεων της μιτομυκίνης (Εικόνα 3.1.), όλες οι συγκεντρώσεις της μιτομυκίνης C έδωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Πίνακας 3.1.). Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης που επιλέχθηκε είναι 20ng/ml, γιατί η συγκέντρωση αυτή παρουσιάζει ικανοποιητική επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών ώστε να διακρίνεται καθαρά η επαγωγή ή η αναστολή της συχνότητας των ανταλλαγών προκαλούμενη από την εξεταζόμενη ουσία. Επιπλέον η συγκέντρωση αυτή δεν είναι κυτταροστατική (PRI=1,8) επιτρέποντας ικανοποιητικό αριθμό μεταφασικών πυρήνων  $2^{15}$  μιτωτικής διαίρεσης για την πραγματοποίηση της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

#### **3.2. Επίδραση των διαλυτών στους οποίους είναι διαλυμένες οι εξεταζόμενες ουσίες στην επαγόμενη από μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών**

Η δυσκολία διάλυσης ορισμένων εξεταζόμενων ουσιών σε νερό οδήγησε στην διάλυση τους σε μεθανόλη ή DMSO. Για τον έλεγχο της επίδρασης της παρουσίας των διαλυτών στην δράση της μιτομυκίνης C πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές καλλιεργειών κάθε μία από τις οποίες αποτελούνταν από έναν αρνητικό μάρτυρα, έναν θετικό μάρτυρα [+Mit.C] (20ng/ml τελική συγκέντρωση) και μία καλλιέργεια με τον αντίστοιχο διαλύτη στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (+Mit.C), μεθανόλη 0,3%v/v, και DMSO 2,5%v/v, στην οποία βρίσκεται διαλυμένη η εξεταζόμενη ουσία. Και στις δύο καλλιέργειες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αναστολή/επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά 46 χρωμοσώματα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (Πίνακες 3.2., 3.3., Εικόνες 3.2., 3.3.). Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζουν την επαγόμενη από την μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών. Σχετικά με τον δείκτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI) η μεθανόλη δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή του σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ωστόσο το DMSO παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση 20% στον δείκτη PRI σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (Πίνακες 3.2., 3.3.). Στις πολυφαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν η τελική συγκέντρωση των διαλυτών στις καλλιέργειες ήταν πολύ μικρή, και έτσι δεν παρουσιάζουν κάποια επίδραση στα αποτελέσματα.

#### **3.3. Επίδραση υδατικού και μεθανολικού εκχύλισματος Ασύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων**

Για κάθε εκχύλισμα εξετάστηκε η επίδραση τριών συγκεντρώσεων (75μg/ml, 150μg/ml, 300μg/ml) που δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις στα αρχικά διαλύματα των εκχυλισμάτων που είχαν συγκέντρωση 460mg/ml και 320mg/ml για το υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου και το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου αντίστοιχα. Για κάθε εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε μια σειρά καλλιεργειών που αποτελούνταν από έναν αρνητικό μάρτυρα (-Mit.C), έναν θετικό μάρτυρα (+Mit.C), τρεις καλλιέργειες με τις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις παρουσία μιτομυκίνης C, και μία καλλιέργεια με το εκχύλισμα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (300μg/ml) χωρίς την προσθήκη μιτομυκίνης C (-Mit.C).

Το υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικο παρουσίασε στατιστικά σημαντική επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά 46 χρωμοσώματα στις καλλιέργειες που η συγκέντρωσή

του ήταν 150μg/ml και 300μg/ml αντίστοιχα παρουσία μιτομυκίνης C. Μόνο του το εκχύλισμα δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (Πίνακας 3.4., Εικόνες 3.4., 3.5.). Όσον αφορά τον δείκτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων PRI, το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικο παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε όλες τις καλλιέργειες παρουσία μιτομυκίνης C ακόμα και στην καλλιέργεια που βρισκόταν μόνο του.

Το μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικο παρουσίασε στατιστικά σημαντική επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά 46 χρωμοσώματα στις καλλιέργειες που η συγκέντρωσή του ήταν 150μg/ml και 300μg/ml παρουσία μιτομυκίνης C. Μόνο του το εκχύλισμα δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (Πίνακας 3.5, Εικόνες 3.6., 3.7.). Όσον αφορά τον δείκτη PRI το μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικο στατιστικά σημαντική μείωση μόνο στην καλλιέργεια που βρισκόταν σε συγκέντρωση 300μg/ml παρουσία μιτομυκίνης C.

#### 3.4. Επίδραση των εξεταζόμενων πολυφαινόλων στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργειες λευφοκυττάρων

Οι πολυφαινόλες που εξετάστηκαν ήταν το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, η κατεχίνη και η επικατεχίνη. Για κάθε πολυφαινόλη εξετάστηκε η επίδραση τριών συγκεντρώσεων (5μM, 50μM, 100μM) που δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αιραιώσεις στα αντίστοιχα αρχικά διαλύματα που είχαν συγκέντρωση 100μM. Για κάθε πολυφαινόλη πραγματοποιήθηκε μια σειρά καλλιεργειών που αποτελούνταν από έναν αρνητικό μάρτυρα (-Mit.C), έναν θετικό μάρτυρα (+Mit.C), τρεις καλλιέργειες με τις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις παρουσία μιτομυκίνης C, και μία καλλιέργεια με την πολυφαινόλη στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM) χωρίς την προσθήκη μιτομυκίνης C (-Mit.C).

Το καφεϊκό οξύ παρουσίασε στατιστικά σημαντική επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά 46 χρωμοσώματα στην καλλιέργεια που βρίσκονταν στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 100μM, παρουσία μιτομυκίνης C καθώς και στην καλλιέργεια στην οποία βρίσκονταν μόνο του το καφεϊκό οξύ στην συγκέντρωση 100μM (Πίνακας 3.6, Εικόνες 3.8., 3.9.). Επιπλέον παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη PRI στην καλλιέργεια που βρισκόταν σε συγκέντρωση 100μM παρουσία μιτομυκίνης C και στην καλλιέργεια που βρισκόταν μόνο του (100μM).

Το φερουλικό οξύ, δεν παρουσίασε κάποια επίδραση στον αριθμό των χρωματιδιακών, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, σε όλες τις συγκεντρώσεις του παρουσία μιτομυκίνης C. Ακόμα και στην καλλιέργεια που το φερουλικό οξύ βρισκόταν μόνο του στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 100μM, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (Πίνακας 3.7., Εικόνες 3.10., 3.11.). Το φερουλικό οξύ δεν επηρέασε τον δείκτη PRI σε καμία καλλιέργεια.

Η κατεχίνη, παρουσίασε στατιστικά σημαντική επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά 46 χρωμοσώματα, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση 100μM, παρουσία μιτομυκίνης C. Στην καλλιέργεια που η κατεχίνη βρισκόταν μόνο της στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 100μM, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Πίνακας 3.8., Εικόνες 3.12., 3.13.). Επιπλέον η κατεχίνη παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη PRI στις καλλιέργειες που η συγκέντρωσή της ήταν 50μM και 100μM παρουσία μιτομυκίνης C ακόμη και στην καλλιέργεια που βρισκόταν μόνη της στην συγκέντρωση (100μM).

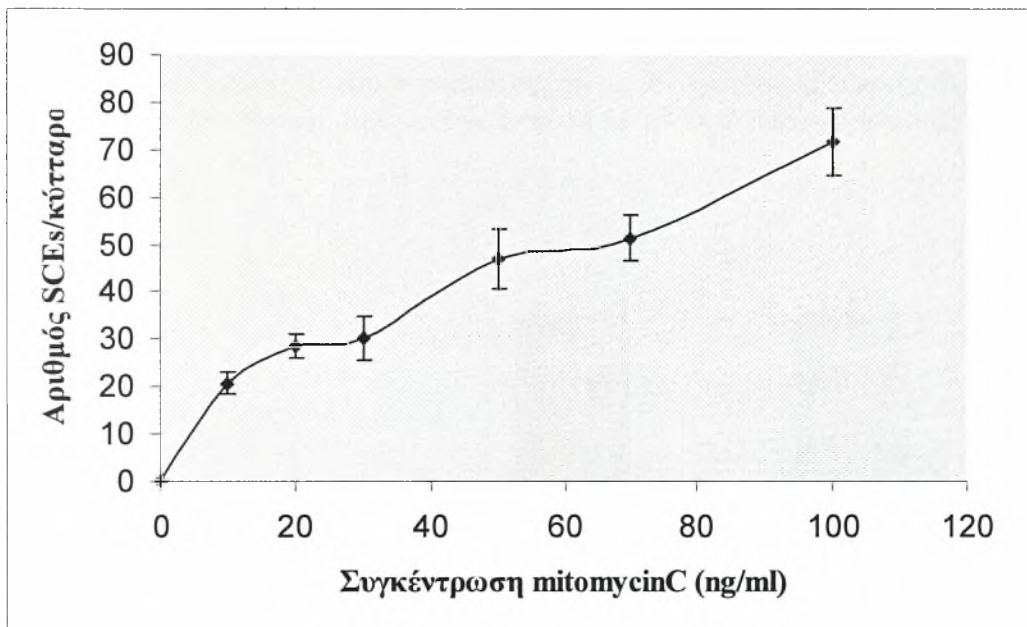
Η επικατεχίνη, δεν παρουσίασε κάποια επίδραση στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά 46 χρωμοσώματα, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, σε όλες τις συγκεντρώσεις του παρουσία μιτομυκίνης C. Ακόμα και στην καλλιέργεια που η επικατεχίνη βρισκόταν μόνο της στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 100μM, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Πίνακας 3.9., Εικόνες 3.14., 3.15.). Η επικατεχίνη παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη PRI σε όλες τις καλλιέργειες παρουσία μιτομυκίνης C ακόμη και στην καλλιέργεια που βρισκόταν μόνη της.

Πίνακας 3.1.: Επαγόμενη από μιτομυκίνη C αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων και επίδραση της μιτομυκίνης C στον δείκτη PRI

Συγκέντρωση Μιτομυκίνη C ng/ml	SCEs <sup>1</sup>	PRI
Αρνητικός Μάρτυρας	9,67±2,7	1,9
10 ng/ml	20,65±2,37*	1,8
20ng/ml	28,33±2,47*	1,66
30ng/ml	30,28±4,65*	1,74
50ng/ml	46,70±6,26*	1,55
70ng/ml	51,20±4,73*	1,43
100ng/ml	71,54±7,19*	1,37

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ( $p < 0,05$ )



Εικόνα 3.1.: Καμπύλη των επαγόμενων από διάφορες συγκεντρώσεις μιτομυκίνης C, χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>95</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Οι γραμμές σφάλματος στα σημεία της καμπύλης συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Πίνακας 3.2.: Επίδραση του διαλύτη, μεθανόλης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,73±2,82	1,44	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	22,02±2,96**	1,18	-	-
0,3%v/v Μεθανόλη (+ Mit.C)	22,21±2,47	1,25	-	1,4

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

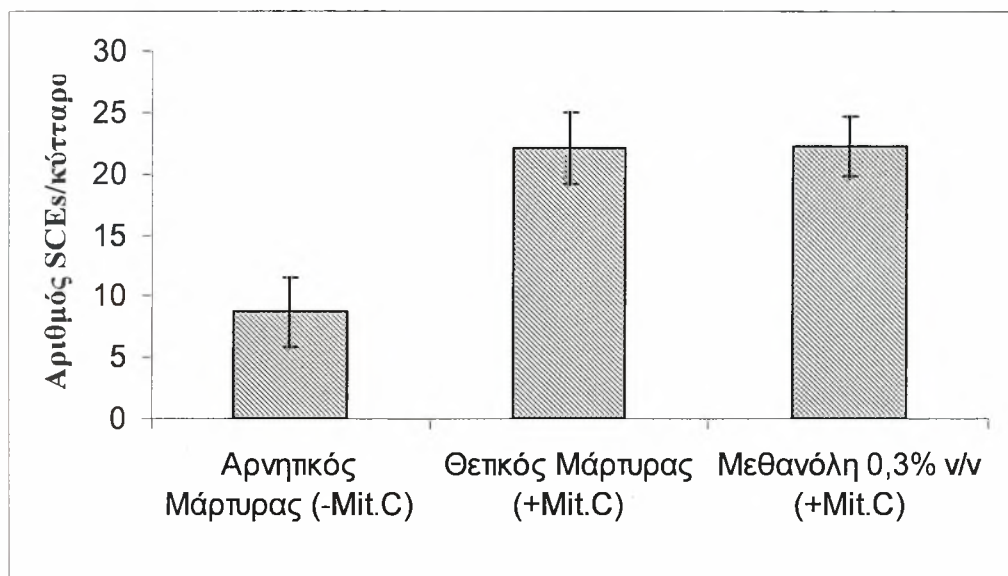
<sup>2</sup> Η μιτομυκίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή/επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{x_c - m} 100$$

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.(p<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.(p<0,05)



Εικόνα 3.2.: Επίδραση του διαλύτη, μεθανόλης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>15</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομυκίνηςC στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.

Πίνακας 3.3.: Επίδραση του διαλύτη, DMSO στις επαγόμενες από μιτομικίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	7,64±2,73	2,23	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	25,12±4,80**	2,10**	-	-
2,5%v/v DMSO (+Mit.C)	25,37±4,78	1,69*	-	0,9

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

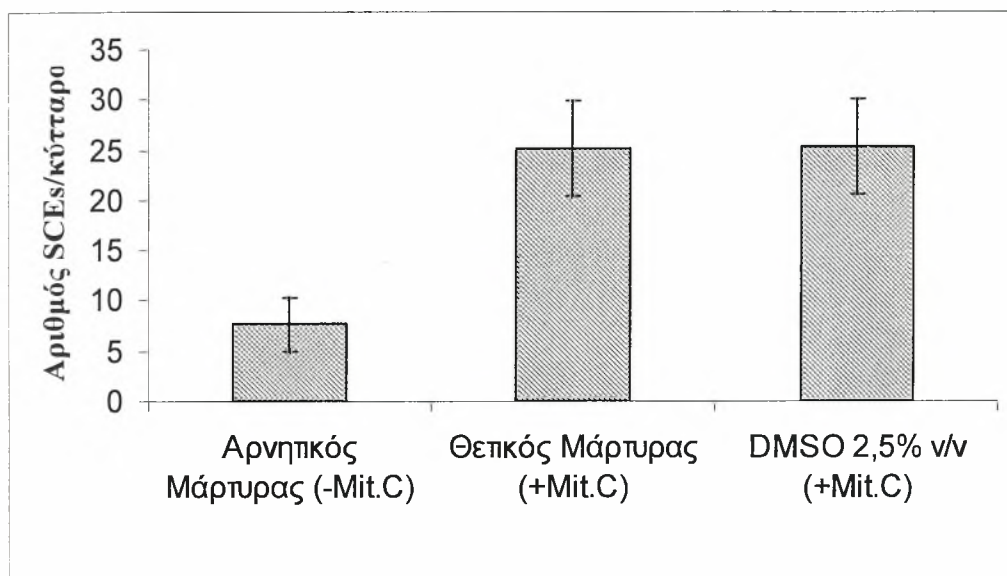
<sup>2</sup> Η μιτομικίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή} / \text{επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{\bar{x}_c - m} 100$$

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. ( $p < 0,05$ )

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. ( $p < 0,05$ )



Εικόνα 3.3.: Επίδραση του διαλύτη, DMSO στις επαγόμενες από μιτομικίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομικίνης C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.

Πίνακας 3.4.: Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομικίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,82±1,36	2,12	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	19,92±3,00**	1,97**	-	-
Υδ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 75μg/ml (+Mit.C)	20,44±2,66	1,86*	-	4,69
Υδ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 150μg/ml (+Mit.C)	21,91±2,75*	1,77*	-	29,97*
Υδ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 300μg/ml (+Mit.C)	23,44±2,46*	1,73*	-	31,79*
Υδ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 300μg/ml (-Mit.C)	8,51±2,01	1,72**	3,56	-

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

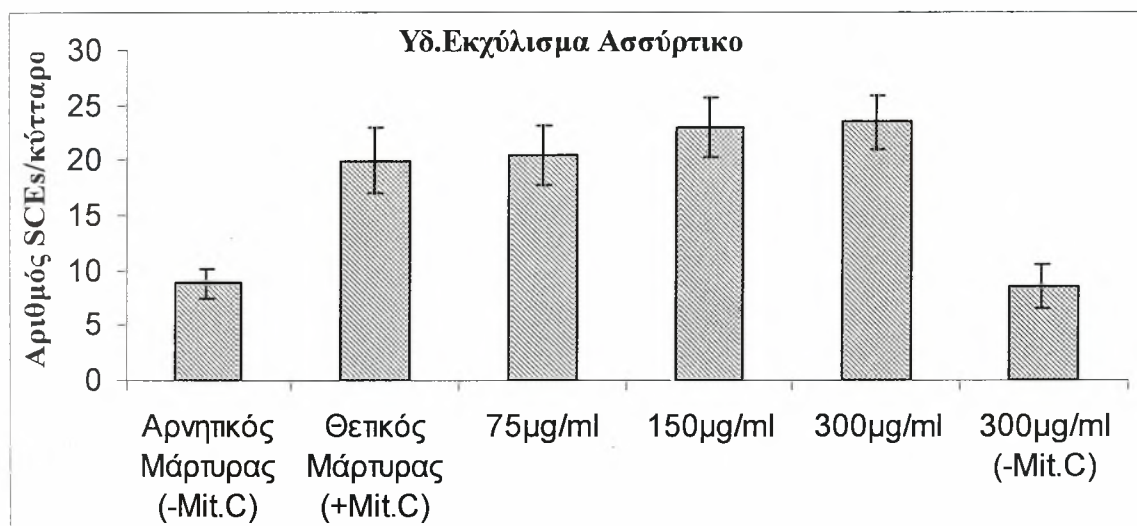
<sup>2</sup> Η μιτομικίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή} / \text{επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{x_c - m} 100$$

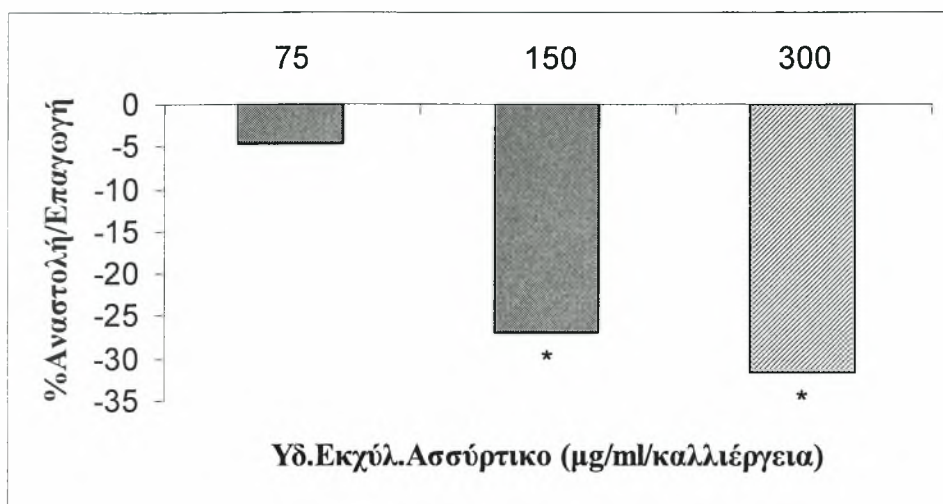
\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. (p<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (p<0,05)



Εικόνα 3.4.: Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομικίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>15</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομικίνης C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα και της καλλιέργειας που το εκχύλισμα βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (300μg/ml) μόνο του, είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.





Εικόνα 3.5.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. \* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα της μιτομυκίνης C, με βάση την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής t για  $p < 0,05$ . Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

Πίνακας 3.5.: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομικίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,56±1,78	1,85	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	21,2±2,59**	1,71**	-	-
Μεθ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 75μg/ml (+Mit.C)	19,84±2,7	1,69	10,74	-
Μεθ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 150μg/ml (+Mit.C)	23,9±1,6*	1,67	-	21,4*
Μεθ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 300μg/ml (+Mit.C)	24,21±3,7*	1,26*	-	23,81*
Μεθ.Εκχυλ.Ασσύρτικο 300μg/ml (-Mit.C)	8,57±2,06	1,74	-	0,12

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

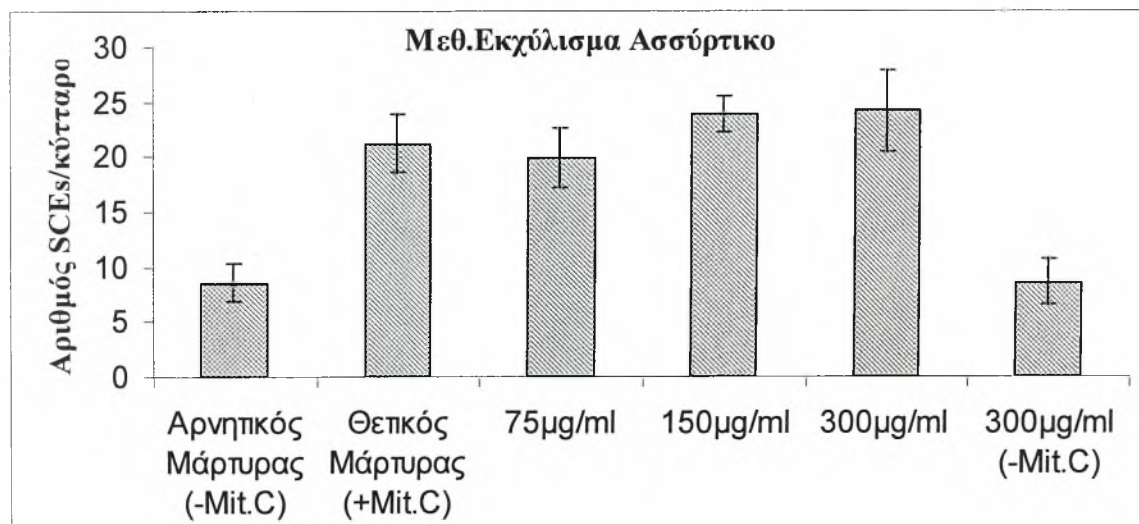
<sup>2</sup> Η μιτομικίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

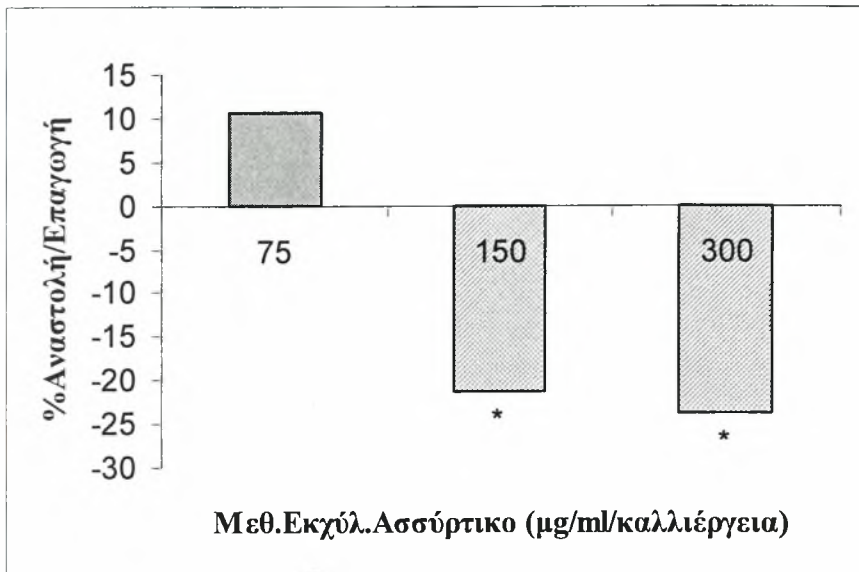
$$\% \text{αναστολή/επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{x_c - m} 100$$

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. (p<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (p<0,05)



Εικόνα 3.6.: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομικίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομικίνης C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα και της καλλιέργειας που το εκχύλισμα βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (300μg/ml) μόνο του, είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.7.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. \* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα της μιτομυκίνης C, με βάση την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής t για  $p < 0,05$ . Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι θετικές την αναστολή.



Πίνακας 3.6.: Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,05±2,57	2,23	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	23,46±3,36**	2,07**	-	-
5μM Καφεϊκό (+Mit.C)	24,23±2,74	2,07	-	4,99
50μM Καφεϊκό (+Mit.C)	24,37±2,99	2,05	-	5,91
100μM Καφεϊκό (+Mit.C)	31,95±3,18*	1,89*	-	55,15*
100μM Καφεϊκό (-Mit.C)	10,15±2,08**	1,57**	-	26,01**

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

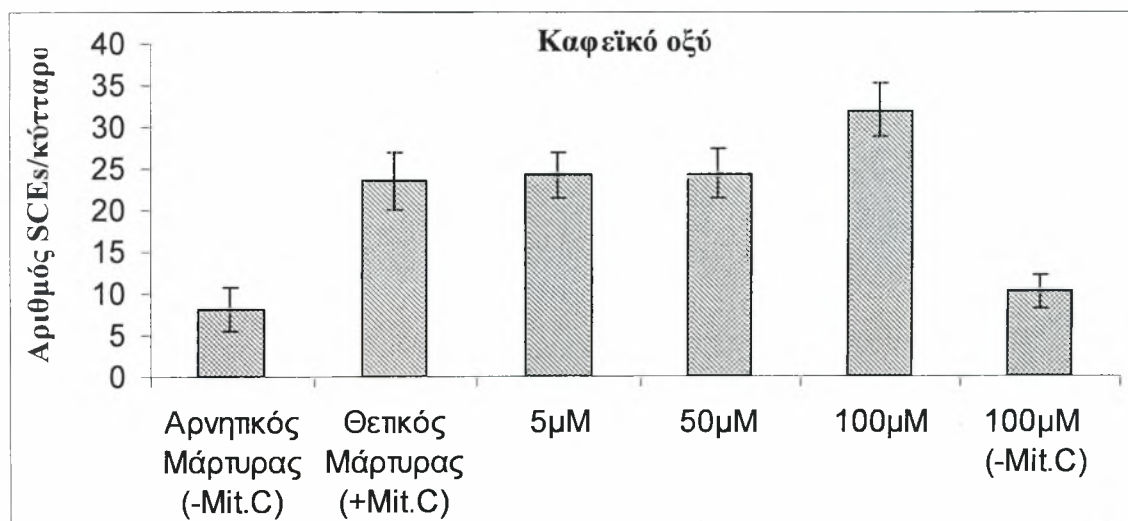
<sup>2</sup> Η μιτομυκίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

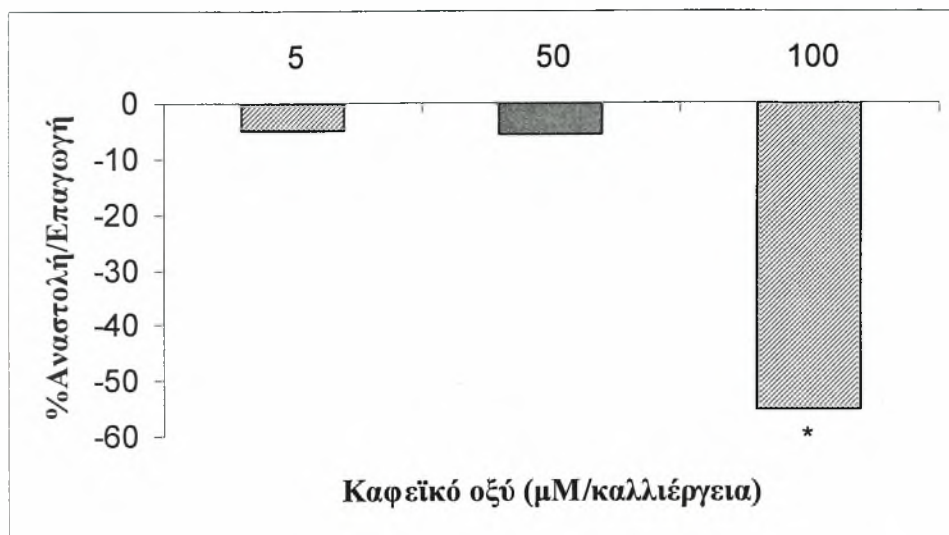
$$\% \text{αναστολή/επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{x_c - m} 100$$

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. (p<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (p<0,05)



Εικόνα 3.8.: Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομυκίνης C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα και της καλλιέργειας που το καφεϊκό οξύ βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM) μόνο του, είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.9.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του καφεϊκού οξέως στις επαγόμενες από μιτομυκίνηC χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. \* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα της μιτομυκίνης C, με βάση την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής t για  $p < 0,05$ . Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης. Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

Πίνακας 3.7.: Επίδραση του φερουλικού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,05±2,57	2,23	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	23,46±3,36**	2,07**	-	-
5μM Φερουλικό (+Mit.C)	23,85±3,86	2,11	-	2,52
50μM Φερουλικό (+Mit.C)	24,78±3,02	1,93	-	8,60
100μM Φερουλικό (+Mit.C)	23,27±3,34	1,98	-	1,19
100μM Φερουλικό (-Mit.C)	8,20±2,40	2,22	-	1,84

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

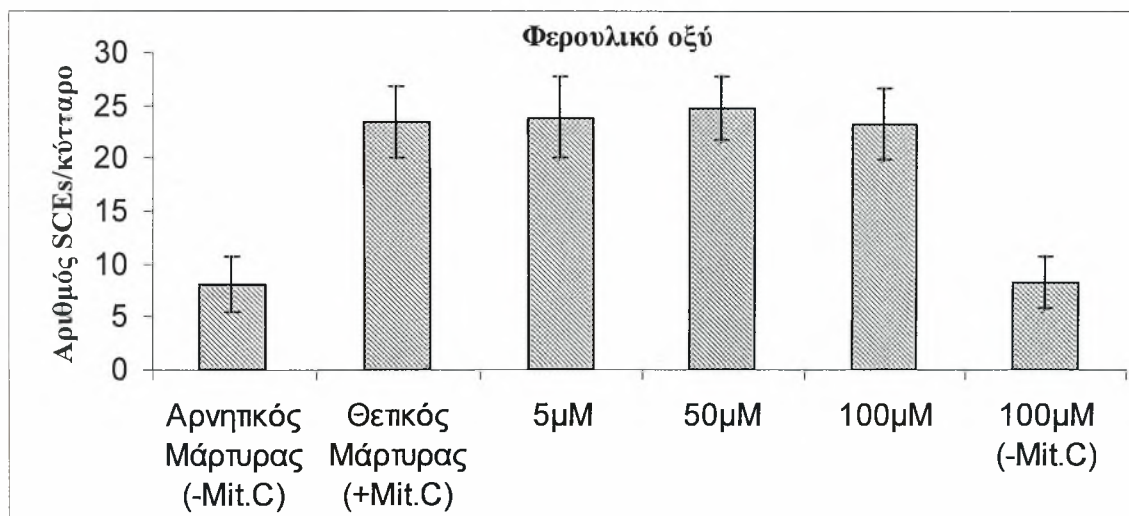
<sup>2</sup> Η μιτομυκίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή/επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{\bar{x}_c - m} 100$$

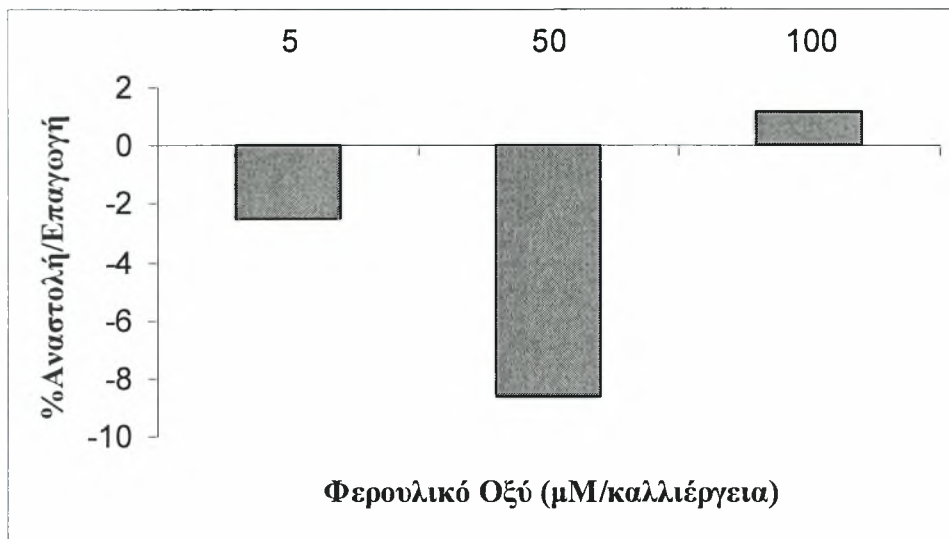
\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. (p<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (p<0,05)



Εικόνα 3.10.: Επίδραση του φερουλικού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>15</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομυκίνης C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα και της καλλιέργειας που το φερουλικό οξύ βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM) μόνο του, είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.





Εικόνα 3.11.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής του φερουλικού οξέως στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. \* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα της μιτομυκίνης C, με βάση την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής t για  $p < 0,05$ . Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι θετικές την αναστολή.

Πίνακας 3.8.: Επίδραση του κατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,81±2,96	2,09	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	19,90±3,38**	1,94**	-	-
5μM Κατεχίνη (+Mit.C)	21,08±3,66	1,96	-	10,61
50μM Κατεχίνη (+Mit.C)	21,37±4,02	1,58*	-	13,27
100μM Κατεχίνη (+Mit.C)	21,77±4,08*	1,67*	-	16,87*
100μM Κατεχίνη (-Mit.C)	9,27±3,50	1,76**	-	5,2

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

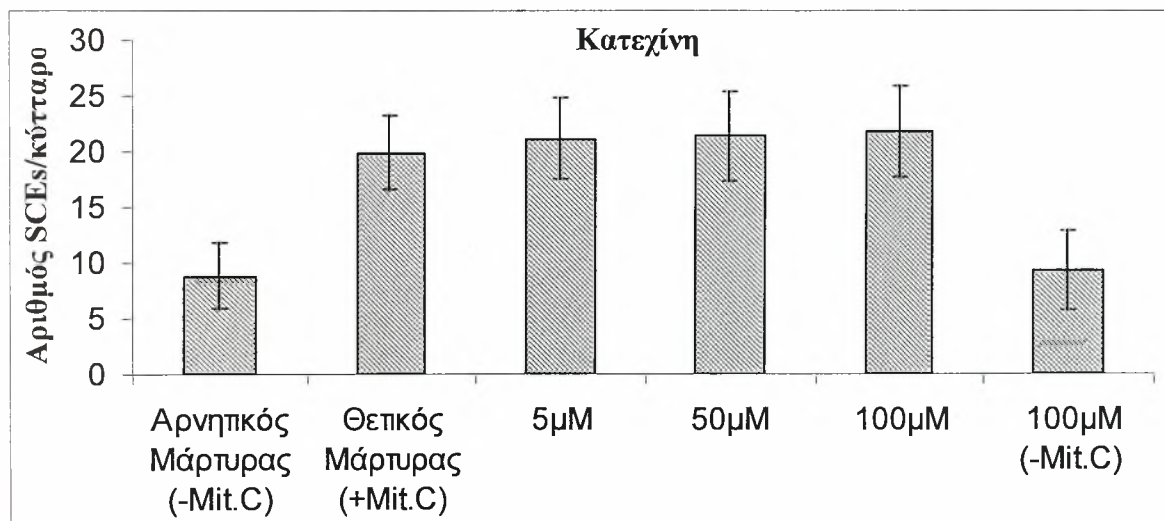
<sup>2</sup> Η μιτομυκίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

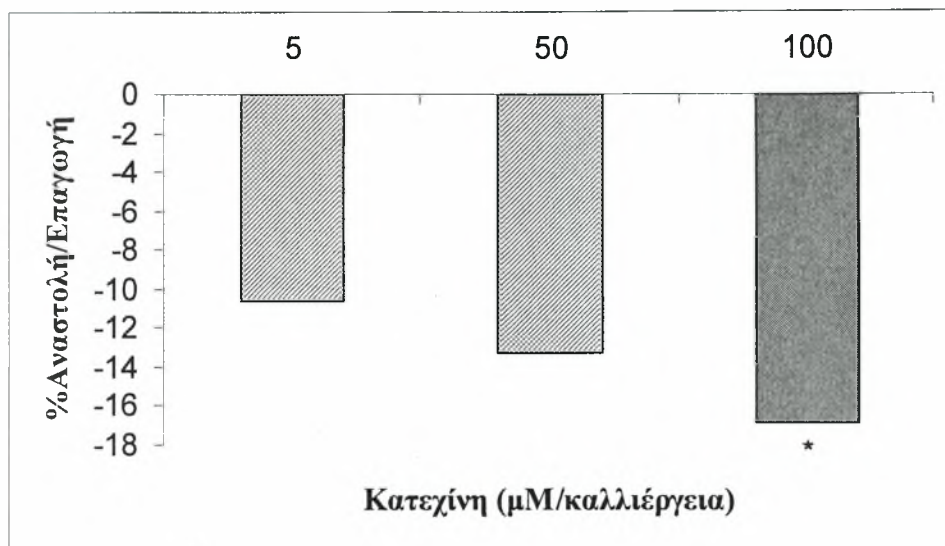
$$\% \text{αναστολή/επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{\bar{x}_c - m} 100$$

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. (p<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (p<0,05)



Εικόνα 3.12.: Επίδραση της κατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνηC χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>15</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομυκίνη C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα και της καλλιέργειας που η κατεχίνη βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM) μόνη της, είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.13.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής της κατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. \* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα της μιτομυκίνη C, με βάση την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής t για  $p < 0,05$ . Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.



Πίνακας 3.9.: Επίδραση της επικατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές και στον δείκτη PRI σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων.

Καλλιέργεια	SCEs <sup>1</sup>	PRI	%αναστολή <sup>3</sup>	%επαγωγή <sup>3</sup>
Αρνητικός Μάρτυρας (-Mit.C)	8,81±2,96	2,09	-	-
Θετικός Μάρτυρας (+Mit.C) <sup>2</sup>	19,90±3,38**	1,94**	-	-
5μM Επικατεχίνη (+Mit.C)	19,31±2,96	1,85*	5,35	-
50μM Επικατεχίνη (+Mit.C)	19,39±3,56	1,68*	4,56	-
100μM Επικατεχίνη (+Mit.C)	20,83±3,73	1,70*	-	8,35
100μM Επικατεχίνη (-Mit.C)	8,67±2,91	1,76**	1,5	-

<sup>1</sup> Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα ± την τυπική απόκλιση. Η μέση τιμή προκύπτει από τα αποτελέσματα καταμέτρησης ανταλλαγών σε 30 μεταφασικούς πυρήνες.

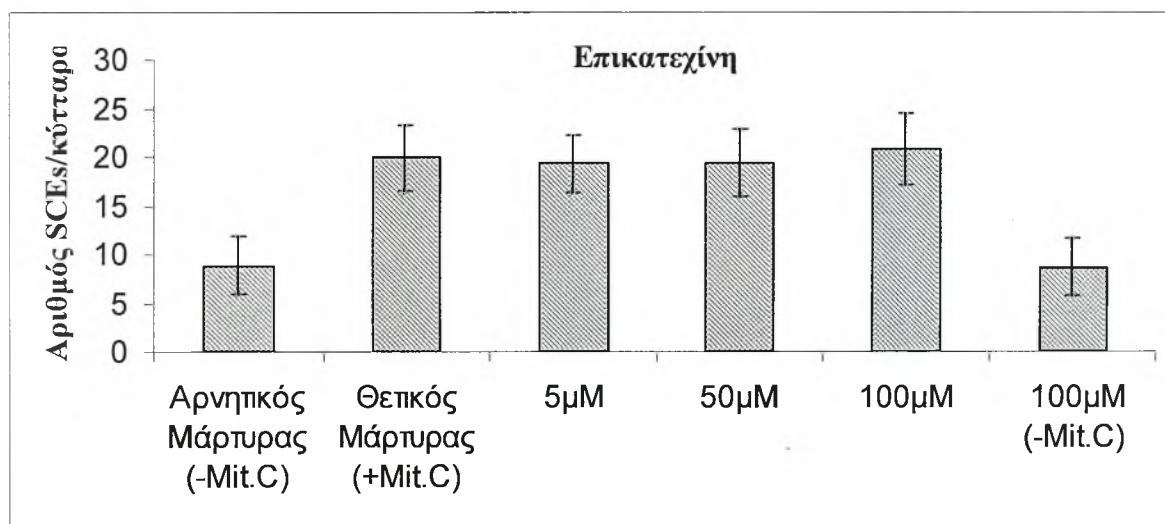
<sup>2</sup> Η μιτομυκίνη C έχει τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20ng/ml

<sup>3</sup> Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

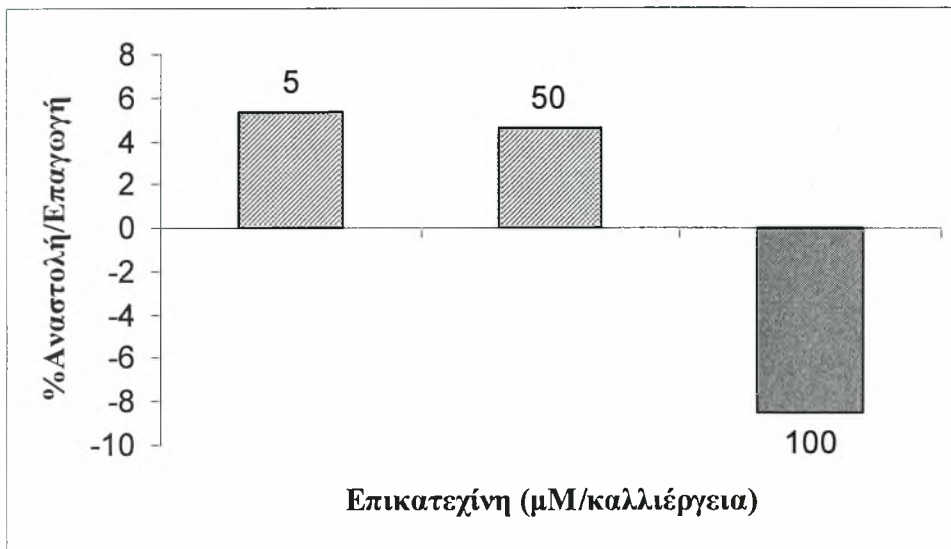
$$\% \text{αναστολή} / \text{επαγωγή} = \frac{[(\bar{x}_c - m) - (\bar{x} - m)]}{\bar{x}_c - m} \cdot 100$$

\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. (ρ<0,05)

\*\* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. (ρ<0,05)



Εικόνα 3.14.: Επίδραση της επικατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των SCEs ανά 46 χρωμοσώματα κάθε κυττάρου που προκύπτει από καταμέτρηση σε 30 μεταφασικούς πυρήνες 2<sup>16</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Η τελική συγκέντρωση της μιτομυκίνης C στις καλλιέργειες εκτός του αρνητικού μάρτυρα και της καλλιέργειας που βρίσκεται η επικατεχίνη στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM) μόνη της, είναι 20ng/ml. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.15.: Απεικόνιση της %Αναστολής/Επαγωγής της επικατεχίνης στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωματιδιακές ανταλλαγές σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. \* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα της μιτομυκίνης C, με βάση την τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής t για  $p < 0,05$ . Οι αρνητικές τιμές συμβολίζουν την επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι θετικές την αναστολή της.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια αυξάνει συνεχώς το ενδιαφέρον για τις ευεργετικές δράσεις των πολυφαινόλων που βρίσκονται στο κρασί και στα σταφύλια. Ο μεγάλος αριθμός τους και η μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα που παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες στο κρασί και στα σταφύλια (G.Soleas et. al. 1997) τις καθιστά σημαντικό αντικείμενο μελέτης. Ένα πλήθος από επιδημιολογικές μελέτες, και πειραμάτων *in vitro* και *in vivo* υποδεικνύουν την χημειοπροστατευτική τους δράση απέναντι σε διάφορες μορφές καρκίνου. Συγκεκριμένα πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα σταφυλιών παρουσίασαν προστατευτική, αντικαρκινική δράση απέναντι σε καρκίνο του πνεύμονα, του γαστρεντερικού συστήματος και του μαστού καθώς και σε άλλες μορφές καρκίνου, η οποία αποδόθηκε στις πολυφαινόλες που βρίσκονταν σε αυτά. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται προστατευτική δράση τους αυτή, είναι ποικίλοι και εμπλέκονται και στα τρία βασικά στάδια της καρκινογένεσης (φάση μύησης [initiation], στάδιο προαγωγής [promotion], στάδιο προόδου [progression]). Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν εκτίμηση πιθανών μηχανισμών χημειοπροστατευτικής δράσης μέσω παρατήρησης της επίδρασης των εξεταζόμενων ουσιών σε επαγόμενη από μιτομυκίνη C μεταλλαξιγένεση.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η παρατήρηση της μεταβολής του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών που συμβαίνουν ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες των χρωμοσωμάτων SCEs που επάγονταν από την μιτομυκίνη C σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Η μιτομυκίνη C αποτελεί ένα αντικαρκινικό αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για την θεραπεία διάφορων μορφών καρκίνου και έχει την ικανότητα να επάγει βλάβες στο DNA, κυρίως όμως τον αριθμό των SCEs. Η αύξηση των επαγόμενων από μιτομυκίνη C αριθμού των SCEs παρουσία της εξεταζόμενης ουσίας αποτελεί δείκτη τοξικότητας, μεταλλαξιγόνου δράσης της ουσίας αυτής. Αντίθετα η αναστολή σχηματισμού τους παρουσία μιτομυκίνης C, μπορεί να υποδεικνύει την αντιμεταλλαξιγόνο-χημειοπροστατευτική δράση της ουσίας απέναντι στην δημιουργία βλαβών στο DNA. Στην διαδικασία επαγωγής των SCEs, φαίνεται να συμμετέχουν με κάποιον τρόπο και οι ελεύθερες ρίζες (ROS), γιατί η δημιουργία των βλαβών επαγόμενων από την μιτομυκίνη C αναστέλλεται από ουσίες που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες (ROS) και από χηλικές ενώσεις (K.Ueda et T.Komano 1984). Έτσι η αναστολή της δημιουργίας τους μπορεί να αντικατοπτρίζει κάποιον μηχανισμό προστασίας μέσω αλληλεπίδρασης με τις ελεύθερες ρίζες.

Στην παρούσα μελέτη από τις πολυφαινόλες που εξετάστηκαν που ήταν το καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, κατεχίνη και επικατεχίνη, καμία δεν παρουσίασε αναστολή του αριθμού των SCEs επαγόμενη από μιτομυκίνη C. Μάλιστα κάποιες από τις πολυφαινόλες παρουσίασαν επαγωγή του αριθμού των SCEs σε κάποιες συγκεντρώσεις παρουσία μιτομυκίνης C καθώς και στις καλλιέργειες που βρίσκονταν μόνες τους στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυκινναμικό οξύ) παρουσίασε αύξηση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο επαγόμενων από μιτομυκίνη C στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση 100μM. Επιπλέον παρουσίασε επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών, στην καλλιέργεια που βρισκόταν μόνο του (100μM) γεγονός που δείχνει την μεταλλαξιγόνο, προ-οξειδωτική δράση του καφεϊκού οξέος. Είναι γνωστό ότι η 3,4-διυδροξυ δομή του καφεϊκού οξέος στον αρωματικό του δακτύλιο το καθιστά ισχυρό αντιοξειδωτικό όμως ταυτόχρονα και ισχυρό προ-οξειδωτικό παράγοντα. Το καφεϊκό οξύ παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) έχει βρεθεί ότι προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα σε απομονωμένο πλασμιδιακό DNA (Y.Sakihama et al.2002) καθώς και ότι αυξάνει την ικανότητα της μιτομυκίνης C να προκαλεί σπασίματα μέσω ελευθέρων ριζών πάλι σε απομονωμένο πλασμιδιακό DNA (D.Stagos et al 2005). Επιπλέον το καφεϊκό οξύ παρουσίασε επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs παρουσία μιτομυκίνης C σε κύτταρα ποντικών (Chinese hamster ovary cells CHO K-1) (Y.F. Sasaki et al 1989). Γενικά το καφεϊκό οξύ, έχει παρατηρηθεί, από μια πληθώρα πειραμάτων ότι παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων, όπως Cu και Fe παρουσιάζει προ-οξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά το καφεϊκό παρουσιάζει και σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε έναν



μεγάλο αριθμό πειραμάτων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* σε διάφορα τεστ ενδεικτικά την αντιμεταλλαξιγόνου δράσης ουσιών. Έτσι η προ-οξειδωτική του δράση μπορεί να σχετίζεται με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες μελετάται η δράση του.

Ακόμη όσον αφορά την προ-οξειδωτική δράση που παρουσιάζουν ορισμένες πολυφαινόλες όπως το καφεϊκό και κάποιες κατεχίνες θα πρέπει να υπάρχει μια επιφύλαξη για το αν η δράση αυτή είναι ίδια και μέσα στον οργανισμό. Πολλές φορές μια ουσία που δρα προστατευτικά *in vivo*, όπως φαίνεται για πολλές πολυφαινόλες, να έχει αντίθετο αποτέλεσμα *in vitro*, γιατί εκεί μπορεί να απουσιάζουν μηχανισμοί που υπήρχαν *in vivo* και να συνέβαλλαν στην προστατευτική τους δράση. Μια πιθανή εξήγηση για τις αντιφάσεις των δράσεων των πολυφαινολών *in vivo* και *in vitro* είναι τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνωσης και η παρουσία των μεταβατικών μετάλλων Fe, Cu. Στις κυτταροκαλλιέργειες *in vitro* η μερική πίεση του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη από αυτή που υπάρχει μέσα στον οργανισμό *in vivo*, με αποτέλεσμα οι συνθήκες να είναι πιο ευνοϊκές για την αυτό-οξειδωση των πολυφαινολών και την προ-οξειδωτική τους δράση μέσω της αντίδρασής τους με το μοριακό οξυγόνο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της αντίφασης παρουσίασε το ασκορβικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό ότι είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μέσα στον οργανισμό. Ωστόσο σε πειράματα *in vitro*, σε κυτταροκαλλιέργειες λεμφοκυττάρων παρουσία μιτομυκίνης C παρουσίασε αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών δηλαδή, παρουσίασε προ-οξειδωτική μεταλλαξιγόνο δράση (A.P. Krishnaja, N.K. Sharma 2003). Έτσι πολυφαινόλες οι οποίες παρουσίασαν επαγωγή του αριθμού των SCEs *in vitro* στις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων μπορεί *in vivo* να μην παρουσιάζουν την δράση αυτή. Μια ακόμη πιθανή εξήγηση της προ-οξειδωτικής δράσης που παρουσίασαν ορισμένες πολυφαινόλες *in vitro*, η οποία μπορεί να μην ισχύει *in vivo* είναι η απαίτηση μεταβατικών μετάλλων για την προ-οξειδωτική δράση. Τα μέταλλα μεταβατικά μέταλλα Cu, Fe *in vivo* στο πλάσμα είναι συνήθως συνδεδεμένα με πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμα ώστε να καταλύσουν προ-οξειδωτική δράση πολλών πολυφαινολών (G.Galati et al 2002, S. Kawanishi et al. 2002).

Το φερουλικό οξύ δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs σε καμία συγκέντρωση. Το φερουλικό οξύ διαφέρει από το καφεϊκό οξύ μόνο στο ότι μία υδροξυλομάδα η οποία είναι υποκατεστημένη με μια μεθυλομάδα. Η επαγωγική δράση του καφεϊκού οξέος σε σχέση με την μη επίδραση του φερουλικού οξέος προτείνει ότι η 3,4-διυδροξυ δομή μπορεί να είναι απαραίτητη για την ικανότητα επαγωγής των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs και η προσθήκη της μεθοξυ-ομάδας να την αποδιοργανώνει και να επηρεάζει την δραστηριότητα του φερουλικού οξέος. Παρόλα αυτά σε επαγόμενες SCEs από μιτομυκίνη C σε κύτταρα ποντικών (Chinese hamster ovary cells CHO K-1) το φερουλικό οξύ παρουσίασε επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs (Y.F. Sasaki et al 1989). Ωστόσο υπάρχει ένας αριθμός πειραμάτων που δείχνουν ότι η μεθοξυλίωση του καφεϊκού οξέος, που οδηγεί στο φερουλικό, καταλήγει σε απώλεια πολλών ιδιοτήτων του όπως μείωση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας (C.Rice-Evans et al. 1996), της ιδιότητάς του να αναστέλλει την τοποϊσομεράση I (D. Stagos et al. 2005), μείωση της ικανότητάς του να δεσμεύει χηλικά μέταλλα (J. Psotova et al. 2003) και της απώλειας της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης του, όπως φάνηκε από την μη αντιμεταλλαξιγόνο δράση που παρουσίασε το φερουλικό οξύ σε αντίθεση με το καφεϊκό οξύ σε επαγόμενη από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε Ames τεστ με *Salmonella Typhimurium* TA102 (C.E. Grey, P. Aldercreutz 2003).

Όσον αφορά την κατεχίνη και την επικατεχίνη, μόνο η κατεχίνη παρουσίασε επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs μόνο στην καλλιέργεια που βρισκόταν στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 100μM παρουσία μιτομυκίνης C. Η επικατεχίνη δεν παρουσίασε μεταβολή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε καμία καλλιέργεια ακόμα και σε εκείνη που βρισκόταν μόνη της στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Και η κατεχίνη και η επικατεχίνη θεωρούνται πολυφαινόλες που παρουσιάζουν σημαντική ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες η οποία είναι μάλιστα είναι και παρόμοια, λόγω την ομοιότητας της δομής τους (C.Rice-Evans et al. 1996). Παρόλα αυτά υπάρχουν πειράματα αντιμεταλλαξιγένεσης (Ames test) και παρατήρησης της αντιοξειδωτικής και προ-οξειδωτικής τους δράσης *in vitro*, που υποδεικνύουν την αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους και την ικανότητά

τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και μέταλλα με την επικατεχίνη να είναι πιο δραστικό μόριο από την κατεχίνη (T.Geetha et al. 2004, F.Haukawa et al. 1999, Y. Yilmaz, R.T. Toledo 2004). Με κάποιο τρόπο η διαμόρφωση στο χώρο της υδροξυλομάδας στην 3-θέση επηρεάζει την δράση της κατεχίνης και της επικατεχίνης καθιστώντας την δεύτερη ισχυρότερο αντιοξειδωτικό, προ-οξειδωτικό και αντιμεταλλαξιγόνο μόριο.

Τα εκχυλίσματα τόσο το υδατικό όσο και το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου Σαντορίνης παρουσίασαν επαγωγή του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών παρουσία μιτομυκίνης C, γεγονός που εξηγείται από την δράση των περιεχόμενων πολυφαινολών τους (Πίνακες 1.4., 1.5.). Συγκεκριμένα στο μεθανολικό εκχύλισμα η επαγωγή που παρουσίασε το γαλλικό οξύ (με βάση αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου), σε συνδυασμό με την επαγωγή που παρουσίασε η κατεχίνη και την μη επαγωγή που παρουσίασε η επικατεχίνη και το φερουλικό παρουσία μιτομυκίνης C, εξηγεί την παρατηρούμενη επαγωγή του αριθμού των SCEs παρουσία μιτομυκίνης C. Αντίστοιχα στο υδατικό εκχύλισμα η περιεχόμενη κερκετίνη παρουσίασε αναστολή (με βάση αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου) ωστόσο η συνολική περιεκτικότητα των άλλων περιεχόμενων πολυφαινολών (γαλλικό οξύ, κατεχίνη, επικατεχίνη) που προκάλεσαν επαγωγή υπερισχύει και έτσι οδηγεί στην επαγωγή των SCEs παρουσία μιτομυκίνης C. Ωστόσο επειδή η συγκέντρωση των πολυφαινολών στα εκχυλίσματα στις καλλιέργειες που παρουσίασαν επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών (150μg/ml και 300μg/ml) είναι πολύ μικρή σε σχέση με την συγκέντρωση που οι καθαρές επιμέρους πολυφαινόλες παρουσίασαν κάποια επίδραση στις χρωματιδιακές ανταλλαγές ( $\geq 100\mu\text{M}$ ), η δράση των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται σε άλλους παράγοντες που βρίσκονται σ' αυτά και που η δράση τους δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί.

Ταυτόχρονα με την παρατήρηση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών γινόταν και παρατήρηση του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού PRI των κυττάρων. Στο καφεϊκό και στο φερουλικό οξύ υπήρχε συσχέτιση της αύξησης του αριθμού των ανταλλαγών και της μείωσης του δείκτη PRI. Το καφεϊκό οξύ στις καλλιέργειες που παρουσίασε επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή του δείκτη PRI σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα στις καλλιέργειες αυτές. Το φερουλικό το οποίο δεν παρουσίασε κάποια επίδραση στον αριθμό των SCEs δεν επηρέασε αντίστοιχα και τον δείκτη PRI. Η συσχέτιση του αυξημένου αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs και της κυτταροστατικότητας, που υποδεικνύει ο χαμηλός δείκτης PRI, συμβαίνει λόγω του ότι η αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs κάνει το κύτταρο να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο προκειμένου να διορθώσει τις βλάβες που έχουν προκληθεί στο γενετικό υλικό.

Στην κατεχίνη υπήρχε συσχέτιση του δείκτη PRI και της αύξησης του αριθμού των επαγόμενων χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs. Αντίθετα στην επικατεχίνη δεν υπήρχε αυτή η συσχέτιση αυτή, γιατί παρότι και δεν επηρέασε τον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs παρόλα αυτά παρουσίασε μείωση του δείκτη PRI ακόμη και στις καλλιέργειες που βρισκόταν μόνη της στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Αυτό ίσως συμβαίνει γιατί η επικατεχίνη αλλά και η κατεχίνη, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν ένζυμα σημαντικά για τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η κατεχίνη και η επικατεχίνη μπορούν και αναστέλλουν την δράση των DNA πολυμερασών θηλαστικών εμποδίζοντας την αντιγραφή του γενετικού υλικού και έτσι την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου (Y.Mizushina et al.2005).

Στα εκχυλίσματα και στο υδατικό και στο μεθανολικό υπήρχε συσχέτιση της μείωσης του PRI και της επαγωγής των χρωματιδιακών ανταλλαγών παρουσία μιτομυκίνης C. Στο υδατικό εκχύλισμα παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη PRI στην καλλιέργεια που βρισκόταν μόνο του στην μεγαλύτερη συγκέντρωση που ίσως οφείλεται στις δράσεις των περιεχόμενων πολυφαινολών του.

Συμπερασματικά ο στόχος ήταν η παρατήρηση της αναστολής της μεταλλαξιγένεσης επαγόμενης από την μιτομυκίνη C σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών, η οποία θα υποδείκνυε έναν άμεσο μηχανισμό χημειοπροστασίας. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών SCEs επαγόμενων από μιτομυκίνη C στα εκχυλίσματα γεγονός που δείχνει την μεταλλαξιγόνο προ-οξειδωτική τους δράση. Ωστόσο

η δράση τους αυτή μπορεί να υποδεικνύει έναν έμμεσο μηχανισμό χημειοπροστασίας. Το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα αύξησαν τον αριθμό των SCEs παρουσία μιτομυκίνης C ενώ μόνα τους δεν επηρέασαν τον αριθμό τους, ίσως υποδηλώνει μια επιλεκτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών στα φυσιολογικά κύτταρα έναντι κυττάρων που βρίσκονται κάτω από την επίδραση κάποιου μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Η ενίσχυση των βλαβών του DNA στα κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, μπορεί να τα οδηγήσει σε απόπτωση η οποία είναι ένας σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας. Ακόμη το γεγονός ότι η συγκέντρωση των πολυφαινόλων στον οργανισμό δεν προσεγγίζει τα 100μM, όπου παρουσιάζουν δράση οι καθαρές πολυφαινόλες, αλλά προσεγγίζει αυτή των εκχυλισμάτων μπορεί να ενισχύσει την χρήση των εκχυλισμάτων ως χημειοπροστατευτικούς παράγοντες της διατροφής και τις καθαρές πολυφαινόλες ως φάρμακα στην χημειοθεραπεία σε συγκεντρώσεις  $\geq 100\mu\text{M}$ .

Επιπλέον το γεγονός ότι και η ρεσβερατρόλη, που είναι αποδεδειγμένα μία πολυφαινόλη που έχει πολλές ευεργετικές δράσεις στον οργανισμό, *in vivo*, επάγει τον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών SCEs *in vitro* μπορεί αυτή η «μεταλλαξιγόγος» δράση τελικά να μην είναι απόλυτα αρνητική για τον οργανισμό αλλά να είναι απλά μια ένδειξη δραστηριότητας της ουσίας (A. Matsuoka et al. 2002). Τέλος τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το καφεϊκό οξύ και η κατεχίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην χημειοθεραπεία για το λόγο ότι αύξησαν την δράση της μιτομυκίνης C, που χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο.



## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- A. Van de Wiel, P.H.M. van Golde, H.Ch.Hart (2001), Blessings of the grape, *European Journal of Internal Medicine*, **12**:484-48
- A. Matsuoka, K. Takeshita, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara, N.Miyata, (2002), The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol, *Mutation Research*, **521**:29-35
- A.P. Krishnaja, N.K. Sharma, (2003), Ascorbic Acid potentiates Mitomycin C-induced Micronuclei and Sister Chromatid Exchanges in human Peripheral Blood Lymphocytes in Vitro, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement*, **1**:99-112
- A.R. Rechner, G. Kuhnle, P. Bremner, G.P. Hubbard, K.P. moore, C.A. Rice-Evans, (2002), The Metabolic Fate of Dietary Polyphenols in Humans, *Free Radical Biology & Medicine*, **33** No2:220-235
- A. Scalbert and G. Williamson, (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J.Nutrition*, **130**:20735-855
- Barry Halliwell (2001) Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*
- B.A. Kihlman and H.C. Anderson, (1984), Root tips of *Vicia Faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges, Handbook of mutagenicity test procedures, Second edition
- Claudine Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, **79**:727-47
- C. A. Rise-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, **20** No.7 933-956
- C. Mylonas, D. Kouretas, (1999), Lipid Peroxidation and tissue Damage, *In Vivo*, **13**:295-310
- C. E. Grey, P.Aldlercreutz,(2003), Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutation Research*, **527**:27-36
- D. Stangos, G. Kazantzoglou, P. Magiatis, S. Mitaku, K. Anagnostopoulos, D. Kouretas, (2005), Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis Vinifera* on mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA, *International Journal of Molecular Medicine*, **15**:1013-1022
- D. Stangos, S. Kouris, D. Kouretas, (2004), Plant Phenolics Protect from Bleomycin-induced Oxidative Stress and Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102, *Anticancer Research*, **24**:743-746
- E. Sonada, M. S. Sakaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M.Takata, S. Takeda, (1999), Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells, *Molecular and Cellular Biology*, **19**:No7, 5166-5169
- F. Bianchini and H. Vainio, (2003), Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?, *European Journal of Cancer Prevention*, **12**:417-425
- F.M.Da Cunha, D. Duma, J. Asseuy, F. C. Buzzi, R. Niero, M. M. Campos, J.B. Calixto, (2004), Caffeic Acid Derivatives: In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory properties, *Free Radical Research*, **88**No11:1241-1253
- F. Hayakawa, T. Kimura, N. Hoshino, T. Ando, (1999), DNA Cleavage activities of (-)-Epigallocatechin, (-)-Epicatechin, (+)-Catechin and (-)-Epigallocatechin gallate with various kind of metal ions, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**:1654-1656
- G. J. Soleas, E.R. Diamandidis, D.M. Goldberg, (1997), *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **11**:287-313
- G.Galati, P.J.O'Brien, (2004), Potential Toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radical Biology & Medicine*, **37** No3:287-303



- G. Galati, O. Sabzevari, J. X. Wilson, P. J.O'Brien, (2002), Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics, *Toxicology*, **177**:91-104
- G.Cao,E.Sofic, R.L. Prior, (1997), Antioxidant and Prooxidant Behaviour of flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free Radical Biology & Medicine*, **22** No5: 749-760
- J. D. Lambert, C.S. Yang, (2003), Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols, *Mutation Research*, **523-524**:201-208
- J. Psotova, J. Lasovsky, J. Vicar, (2003), Metal-Chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics, *Biomed.Papers*, **147**(2) 147-153
- K. Ueda and T. Komano, (1984), Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxy-phenyl)mitomycin C, *Nucleic Acids Research*, **12** No17
- Kuenzig W., Chau J., Norkus E., Howaschenko N., Newmark H., Mergens W., Conney A.H., (1984), Caffeic and Ferulic acid as blockers of nitrosamine formation, *Carcinogenesis*, **5**(3): 309-13
- K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, (2002), Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, **13**:572-584
- Lynnette R.Ferguson, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, **475**:89-111
- Lynnette R.Ferguson, Shuo-tun Zhu, P.J. Harris, (2005), Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells, *Molecular Nutrition Food Research*, **49**:585-693
- M.Yoshino and K.Murakami (1998), Interaction of iron with Polyphenolic Compounds: Application to Antioxidant Characterization, *Analytical Chemistry*, **257**:40-44
- M.M. Paz, G.S. Kumar, M.Glover, M.J. Waring and M. Tomasz, (2004), Mitomycin Dimers: Polyfunctional Cross-linkers of DNA, *Journal of Medical Chemistry*, **47**:3308-3319
- M.Tomaz, R.Lipman, D.Chrowdary, J.Pawlak, G.L.Verdine, K.Nakanishi,(1986), Isolation and Structure of a covalent Cross-Link Adduct between Mitomycin C and DNA, *Science*, **235**:1204-1208
- M. Lodovici, F. Guglielmi, M. Moeni, P. Dolara, (2001), Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, **39**:1205-1210
- Mourelatos D., (1996), Chromosomes Study as predictor of chemoresponse of tumors, *The cancer Journal*, **9** No.3,136-14.
- Nicolle Cotelle, (2001), Role of flavonoids in Oxidative stress, *Current Topics in Medical Chemistry*, **1**:569-590
- O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt, (2003), Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review, *Annals of Botany*, **91**:179-194
- P.G. Penketh, W. F. Hodnick, M.F.Belcourt,K. Shyam, D.H. Sherman and A.C. Sartonely (2001), Inhibition of DNA Cross-linking by Mitomycin C by Peroxidase-mediated Oxidation of Mitomycin C Hydroquinone, *The Journal of Biological Chemistry*, **276** No37:34445-34452
- P. A. Kroon, m. N. Clifford, A. Crozier, A.J. Day, J. L. Donovan, C. Manach, G. Williamson, (2004), How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?, *American Society for Clinical Nutrition*, **80**:15-21
- P-L. Teissedre, N.Laundrault, (2000), Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability, *Food Research International*, **33**:461-467
- Q. Huang, Li-J. Wu, S.Tashiro, H. Gao, S.Onodera, T. Ikejima, (2005), (+)-Catechin, an ingredient of Green Tea, Protects Murine Microglia from Oxidative Stress-Induced DNA damage and cell cycle arrest, *Journal of Pharmacological Sciences*, **98**:16-24

- R. Mechini, R. Bastianelly, F. Palitti, (1996), The diplochromosome of endoreduplicated cells: a new approach to highlight the mechanism of sister chromatid exchange, *Chromosoma*, **105**:50-54
- R.J. Nijveldt, Els van Nood, D.EC van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, P.AM van Leeuwen, (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *American Society for Clinical Nutrition*, **74**:48-25
- Roit, Brostoff, Male, Ανοσολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Έκδοση 2000
- Stoner G.D., Mukhtar H. (1995), Polyphenols as cancer chemopreventive agents, *J.Cell Biochemistry Suppl.*, **22**:169-80
- S. Azam, N. Hadi, N.U. Khan, S.M.Hadi, (2004), Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties, *Toxicology in vitro*, **18**:555-561
- S. Kawanishi, Y. Hiraku, M. Murata, S.Oikawa, (2002), The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis, *Free Radical Biology & Medicine*, **32** No9:822-832
- Στέφανος Κολιάης, Πρακτική Μικροβιολογία βασικά στοιχεία, University Studio Press, Έκδοση 1996
- Σ. Καράταγλης, Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text 1994
- Santorini web
- Tennant R. W., Malgolin B. H., Shelby M. D., Zeiger E., Hoesman J. K. Spalding J. et al., (1987), Prediction of chemical carcinogenesis in rodent from in vitro genetic toxicity assay, *Science*, **236**: 933-940
- T. Geetha, A. Garg, K. Chopra, I.Pal Kaur, (2004) Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract, *Mutation Research*, **556**:65-74
- V. Karekar, S. Joshi, S.L. Shinde, (2000), Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test, *Mutation Research*, **468**:183-196
- W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, (2003), Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medical Research Reviews*, **23** No4:519-534
- Xiang-Lie Yang, A.H.-J.Wang, (1999), Structural studies of atom specific anticancer drugs acting on DNA, *Pharmacology and Therapeutics*, **83**:181-215
- Yun-Zhong Fang , S. Yang, G. Wu, (2002), Free Radicals, Antioxidants and Nutrition, *Nutrition*, **18**:872-879
- Y. Sakihama, M.F. Cohen, S. C. Grace, H. Yamasaki, (2002), Plant phenolic antioxidants and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, **177**:67-80
- Y. Mizushima, Saito A., Tanaka A., Nakajima N, Kuriyama I., Takemura M., Takeuchi T., Sugawara F., Yoshida H., (2005), Structural Analysis of catechin derivatives as mammalian DNA polymerase inhibitors, *Biochemistry Biophysics Research*, **9**;333(1):101-109
- Y.F. Sasaki, H. Imanishi, T. Otha and Y. Shirasu, (1989), Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchanges in cultured Chinese Hamster ovary cells, *Mutation Research*, **226**:103-110
- Y. Yilmaz and R.T. Toledo, (2004), Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends in Food Science & Technology*, **15**:422-433
- Y. Kudoda, Y. Hara, (1999), Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols, *Mutation Research*, **436**:69-97

