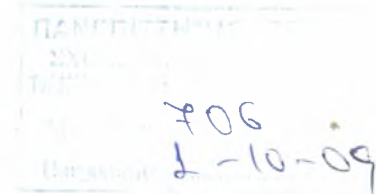


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ  
ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ  
ΚΑΘΑΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ *VICIA FABA***



**ΑΛΜΠΙΟΝΑ ΝΤΕΡΒΙΣΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2009**



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

Αριθ. Εισ.: 7658/1  
Ημερ. Εισ.: 24-11-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2009  
NTE

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087150

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κουρέτας Δημήτρης – Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας

Κομιώτης Δημήτρης – <sup>Αναπληρωτής</sup> ~~Επίκουρος~~ Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας -  
Βιοτεχνολογίας

Κοντού Μαρία – Λέκτορας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα.

Αισθάνομαι υποχρεωμένη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κ. Κουρέτα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονή του και την κατανόησή του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Υποψήφια Διδάκτωρ Σπανού Χρυσούλα για την αμέριστη βοήθειά της τόσο στην διεκπεραίωση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής εργασίας, για την μεγάλη υπομονή της και την προθυμία της να απαντήσει σε όλες τις απορίες μου καθώς και για ηθική υποστήριξη.

Τέλος, να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία, καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	9
1. Εισαγωγή	10
1.1 Ψυχανθή	10
1.1.2 Σημασία των ψυχανθών στην διατροφή	11
1.2. <i>Vicia faba</i>	12
1.3. Πολυφαινόλες	12
1.3.1. Φαινολικά όξέα	13
1.3.2. Φλαβονοειδή	14
1.3.3 Στιλβένια	16
1.3.4. Λιγνάνια	16
1.4. Ελεύθερες ρίζες	17
1.4.1 Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών	18
1.4.2 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών	20
1.4.3 Επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	20
1.5. Οξειδωτικό στρες- Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	22
1.6. Καρκινογένεση	24
1.6.1 Θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης	24
1.6.2. Χημειοπροστασία	25
1.6.3. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	26
1.6.4. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινόλων	27
1.6.5. Χημειοθεραπεία του καρκίνου	28
1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα	28
1.8 Σκοπός του πειράματος	31
2. Υλικά και μέθοδοι	32
2.1. Υλικά	32
2.1.1. Μείγματα καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων του φυτού <i>Vicia faba</i>	32
2.1.2. Νουκλεοσιδικά ανάλογα	32
2.2. Μέθοδοι	35
2.2.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη σταθερή χημική ρίζα DPPH <sup>·</sup> (DPPH <sup>·</sup> radical scavenging assay)	35
Χημικά αντιδραστήρια	35

Αρχή της μεθόδου	35
Πειραματική διαδικασία	36
Υπολογισμοί	36
Στατιστική ανάλυση	37
2.2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών στο DNA (Plasmid relaxation assay)	37
Χημικά αντιδραστήρια	37
Αρχή της μεθόδου	38
2.2.2.α) Επαγόμενη από ρίζες OH <sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	39
Αρχή της μεθόδου	39
Πειραματική διαδικασία	40
Υπολογισμοί	41
Στατιστική ανάλυση	41
2.2.2.β) Επαγόμενη από ρίζες ROO <sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	41
Αρχή της μεθόδου	41
Πειραματική διαδικασία	42
Υπολογισμοί	43
Στατιστική ανάλυση	43
3. Αποτελέσματα	44
3.1 Καμπύλη DPPH	44
3.1.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φθοριωμένων πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων της N <sup>4</sup> – βενζούλο κυτοσίνης και της N <sup>6</sup> – βενζούλο αδερίνης της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη σταθερή χημική ρίζα DPPH <sup>•</sup>	44
3.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού <i>Vicia faba</i> μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη σταθερή χημική ρίζα DPPH <sup>•</sup>	44
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής της δράσης ριζών OH <sup>•</sup> στο DNA.	46
3.2.1 Καμπύλη ριζών OH <sup>•</sup> στο DNA	46
3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού <i>Vicia faba</i> μέσω της αναστολής της δράσης ριζών OH <sup>•</sup> στο DNA.	47
3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής της δράσης ριζών περοξυλίου (ROO <sup>•</sup> ) στο DNA	50
3.3.1 Καμπύλη δράσης ριζών ROO <sup>•</sup> στο DNA	50
3.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φθοριωμένων πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων της N <sup>4</sup> – βενζούλο κυτοσίνης	

και της N <sup>6</sup> – βενζούλο αδερίνης μέσω της αναστολής της δράσης ριζών ROO <sup>•</sup> στο DNA.	50
3.3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού <i>Vicia faba</i> μέσω της αναστολής της δράσης ριζών ROO <sup>•</sup> στο DNA.	54
4. Συζήτηση	55
Βιβλιογραφία	59

## Περιεχόμενα Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Διάφορα όσπρια που καταναλώνονται παγκοσμίως	<b>11</b>
<b>Εικόνα 2:</b> <i>Vicia faba</i> καρποί.	<b>12</b>
<b>Εικόνα 3:</b> <i>Vicia faba</i> φυτό σε άνθηση.	<b>12</b>
<b>Εικόνα 4:</b> Χημική δομή των δυο κατηγοριών φαινολικών οξέων, υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά οξέα.	<b>13</b>
<b>Εικόνα 5:</b> Χημική δομή φλαβονοειδών.	<b>14</b>
<b>Εικόνα 6:</b> Χημική δομή της ρεσβερατρόλης	<b>16</b>
<b>Εικόνα 7:</b> Χημική δομή φυτικών λιγνανίων και των ζωικών παραγώγων τους	<b>17</b>
<b>Εικόνα 8:</b> Πηγές σχηματισμού ελευθέρων ριζών.	<b>19</b>
<b>Εικόνα 9:</b> Οι ελεύθερες ρίζες επειδή είναι πολύ δραστικά μόρια προσβάλλουν και οξειδώνουν τα βιομόρια το DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες	<b>20</b>
<b>Εικόνα 10:</b> Τα αντιοξειδωτικά μόρια προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες και τις σταθεροποιούν καθιστώντας τες ακίνδυνες.	<b>24</b>
<b>Εικόνα 11:</b> Μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό και τα σημεία δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.	<b>25</b>
<b>Εικόνα 12:</b> Χημικές δομές των νουκλεοσιδικών αναλόγων	<b>32-33</b>
<b>Εικόνα 13:</b> Μετατροπή DPPH <sup>•</sup> σε DPPH-H	<b>35</b>
<b>Εικόνα 14:</b> Σχηματική αναπαράσταση της μετάβασης του πλασμιδιακού DNA από την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) την ανοιχτή κυκλική (open circular) και στην γραμμική (linear) διαμόρφωση από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)	<b>39</b>
<b>Εικόνα 15:</b> Καμπύλη ριζών OH <sup>•</sup> στο DNA	<b>46</b>
<b>Εικόνα 16:</b> : Καμπύλη ριζών ROO <sup>•</sup> στο DNA	<b>50</b>

## Περιεχόμενα Πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Κλάσματα καθαρών μορίων από το φυτό <i>Vicia faba</i> (πόα)	<b>32</b>
<b>Πίνακας 2:</b> Σειρά προσθήκης διαλυμάτων	<b>40</b>
<b>Πίνακας 3:</b> Σειρά προσθήκης διαλυμάτων	<b>42</b>
<b>Πίνακας 4:</b> Ποσοστά δέσμευσης της ρίζας DPPH των κλάσμάτων καθαρών μορίων από το <i>Vicia faba</i>	<b>45</b>
<b>Πίνακας 5:</b> Τιμές των IC <sub>50</sub> των κλασμάτων καθαρών μορίων.	<b>45</b>
<b>Πίνακας 6:</b> Απεικονίζεται η % αναστολή της δράσης ριζών OH <sup>·</sup> στο DNA από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού <i>Vicia faba</i> και οι τιμές των IC <sub>50</sub> των κλασμάτων	<b>47</b>
<b>Πίνακας 7:</b> Εικόνες και γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή της δράσης των ριζών υδροξυλίου (OH <sup>·</sup> ) από τα κλάσματα καθαρών μορίων του <i>Vicia Faba</i> (συγκεντρώσεις :100, 200, 400, 800 και 1600 μg/ml).	<b>48-49</b>
<b>Πίνακας 8:</b> Χημική δομή και % αναστολή της δράσης ριζών ROO <sup>·</sup> στο DNA από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα	<b>51</b>
<b>Πίνακας 9:</b> Εικόνες που απεικονίζουν την % αναστολή της δράσης των ριζών περοξυλίου (ROO <sup>·</sup> ) από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα (συγκεντρώσεις : 5, 10, 20, 50 και 100mM)	<b>52-53</b>
<b>Πίνακας 10:</b> Απεικονίζεται η % αναστολή της δράσης ριζών ROO <sup>·</sup> στο DNA από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού <i>Vicia faba</i> και οι τιμές των IC <sub>50</sub> των κλασμάτων	<b>54</b>
<b>Πίνακας 11:</b> Εικόνες και γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή της δράσης των ριζών περοξυλίου (ROO <sup>·</sup> ) από τα κλάσματα καθαρών μορίων του <i>Vicia Faba</i> (συγκεντρώσεις :1, 2, 5, 10, 20 και 50 μg/ml)	<b>55</b>



## *Περιεχόμενα Γραφημάτων*

<b>Γράφημα 1:</b> Καμπύλη DPPH	<b>44</b>
<b>Γράφημα 2:</b> Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από τα μόρια	<b>46</b>

## *Περιεχόμενα Σχημάτων*

<b>Σχήμα 1:</b> Σχηματισμός της 8-υδροξυγουανίνης	<b>21</b>
---	-----------

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι γνωστοί αντιογκογονικοί, αντιϊκοί και χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Βρέθηκε ότι νέα νουκλεοσιδικά ανάλογα (φθοριωμένα πυρανονουκλεοσίδια της N<sup>4</sup> – βενζόϋλο κυτοσίνης και της N<sup>6</sup> – βενζόϋλο αδερίνης) είναι αποτελεσματικοί αντινεοπλασματικοί παράγοντες και παρουσίασαν σημαντική αντιϊκή δράση έναντι των ρετροϊών. Έτσι θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική δράση αυτών των νέων τροποποιημένων νουκλεοσιδικών αναλόγων η οποία μελετάται για πρώτη φορά. Τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα παρουσίασαν σημαντική δράση έναντι της δράσης των ριζών περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>) στο DNA ενώ με τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH φάνηκε πως κανένα από αυτά δεν είχε την ικανότητα να την εξουδετερώσει. Από την συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τις δομές των νουκλεοσιδίων φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού σε α,β θέση ως προς την κέτο ομάδα προκαλεί σταθεροποίηση της ρίζας του νουκλεοσιδίου που εξουδετερώνει τη ρίζα και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική της δράση.

Οι καρποί των ψυχανθών που καταναλώνονται ως τρόφιμα χαρακτηρίζονται ως όσπρια τα οποία εκτός από την θρεπτική τους αξία, περιέχουν και σημαντικές ποσότητες πολυφαινολικών ενώσεων. Οι πολυφαινολικές ουσίες που περιέχονται στα όσπρια των ψυχανθών έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην χημειοπροστασία, καθώς εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες και έτσι μπορούν να δράσουν μέσω της διατροφής ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση 5 κλάσμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia Faba*. Τα 5 κλάσματα καθαρών μορίων εξετάστηκαν με τρεις *in vitro* μεθόδους. Στην αρχή μελετήθηκε η δράση τους με τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH και στην συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την επαγόμενη από τις ελεύθερες ρίζες OH<sup>•</sup> και ROO<sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι τα κλάσματα καθαρών μορίων προερχόμενα από το φυτό *Vicia faba* παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση απέναντι στην δράση ριζών στο DNA και κυρίως απέναντι στην δράση των ριζών ROO<sup>•</sup>. Τα καθαρά μόρια που βρίσκονται στα κλάσματα είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για την δράση του αρχικού εκχυλίσματος πύας του φυτού *Vicia faba* καθιστώντας το φυτό αυτό ως σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ψυχανθή

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια των δικοτυλήδων φυτών *Leguminosae*, της τάξης των χεδρωπών. Ονομάστηκαν "ψυχανθή", γιατί το άνθος τους μοιάζει με πεταλούδα. Η ονομασία τους προέρχεται από το γεγονός ότι οι καρποί τους (legumes) είναι τα σπέρματα των ψυχανθών. Η οικογένεια φυτών *Leguminosae* ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών και ταξινομείται σε τρεις υποοικογένειες: τη *Mimosoideae*, τη *Caesalpinioideae* και τη *Faboideae* (B.S. Kurlovich and S.I. Ropyev, 1995). Μορφολογικά τα ψυχανθή χαρακτηρίζονται από ισχυρό πασαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες των ψυχανθών είναι η ικανότητα που έχουν να δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας, μέσω των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) που συμβιώνουν στις ρίζες τους, γι' αυτό και παρατηρούνται τόσο στην ρίζα όσο και στις διακλαδώσεις, εξογκώματα που ονομάζονται φυμάτια. Με την ιδιότητα της αζωτοδέσμευσης τα ψυχανθή ικανοποιούν τις ανάγκες τους σε άζωτο και συντελούν στη συντήρηση και στη βελτίωση των παραγωγικότητας του εδάφους ([www.youthfarm.com](http://www.youthfarm.com)).

Η μορφολογία των φυτών των ψυχανθών είναι χαρακτηριστική. Οι βλαστοί φέρουν διακλαδώσεις και μπορεί να είναι λείοι ή τριχωτοί με όρθια, έρπουσα ή αναρριχώμενη ανάπτυξη. Τα φύλλα αποτελούνται από τρία ή περισσότερα φυλλάρια που διαφέρουν σε υφή, σχήμα, αριθμό και μέγεθος ανάλογα με το είδος και την ποικιλία. Οι ταξιανθίες είναι επάκριες ή μασχαλιαίες και τα άνθη τους είναι διατεταγμένα σε κεφαλές ή βότρυς. Το άνθος περιλαμβάνει ένα σωληνοειδή κάλυκα που καταλήγει σε πέντε ανισομήκη ή σχεδόν ισομήκη δόντια και στεφάνη που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών ειδών. Το μεγαλύτερο από τα πέντε πέταλα είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους που αποτελούν την τροπίδα. Στο εσωτερικό της τροπίδας βρίσκονται δέκα στήμονες των οποίων τα νήματα μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι. Ο ύπερος αποτελείται από ένα καρπόφυλλο το οποίο σχηματίζει ένα στύλο που καταλήγει σε ένα μόνο στίγμα. Το καρπόφυλλο αποτελείται από μία ωθήκη που περικλείει μία ή περισσότερες σπερματικές βλάστες (ωάρια). Ο καρπός είναι λοβός με δύο τοιχώματα, τα οποία συνδέονται με δύο ραφές. Ο λοβός ποικίλει σε σχήμα, υφή, χρώμα, μέγεθος και

στο εσωτερικό του βρίσκονται ένας ή περισσότεροι σπόροι ενωμένοι με το λοβό στο σημείο του οφθαλμού (μάτι ή hilum) μέσω του ομφαλικού ιμάντα ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)). Οι καρποί των ψυχανθών που καταναλώνονται ως τρόφιμα χαρακτηρίζονται ως όσπρια (pulses) (Εικόνα 1) (Duranti, 2006).

### **1.1.2 Σημασία των ψυχανθών στην διατροφή**

Τα όσπρια αποτελούν την δεύτερη πιο σημαντική κατηγορία εδώδιμων σπόρων, μετά τα σιτηρά, Αποτελούσαν επί πολλούς αιώνες τη σημαντικότερη πηγή πρωτεΐνης για τους ανθρώπους. Τα όσπρια βρίσκονται στη βάση της Μεσογειακής πυραμίδας και ανήκουν στις τροφές που πρέπει να καταναλώνονται με μεγάλη συχνότητα ([www.newline.gr](http://www.newline.gr)). Πληθώρα επιστημονικών μελετών έχει αποδείξει ότι τα όσπρια προστατεύουν από διάφορα είδη καρκίνου, βοηθούν στη μείωση της χοληστερόλης, είναι χρήσιμα στους διαβητικούς, σταθεροποιούν την αρτηριακή πίεση κ.α. (Duranti, 2006).

Τα όσπρια, που καταναλώνονται παγκοσμίως έχουν αναγνωριστεί για την υψηλή τους περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και αποτελούν καλή πηγή αμύλου, τροφικών ινών, ιχνοστοιχείων όπως το Ca, Fe, K, Mg, και το Zn, και έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Εκτός από την θρεπτική τους αξία, περιέχουν και σημαντικές ποσότητες πολυφαινόλων και φλαβονοειδών (π.χ κερκετίνη, ανθοκιανίνες και ταννίνες), επίσης περιέχουν ισοφλαβόνες (π.χ γενιστεΐνη) και φαινολικά οξέα. Με αφορμή αυτές τις παρατηρήσεις ξεκίνησε μία σειρά ερευνών με σκοπό την εξακρίβωση της δράσης κυρίως των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων αλλά και των ισοφλαβινών και των λιγνάνων που αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των συστατικών των οσπρίων (Z. Madar, A. Stark, 2002).



**Εικόνα 1:** Διάφορα όσπρια που καταναλώνονται παγκοσμίως

## 1.2. *Vicia faba*

Το φυτό *Vicia faba* είναι ποώδες, ετήσιο φυτό, της οικογένειας *Leguminosae*, του γένους *Vicia* που καλλιεργείται για τους καρπούς του. Το λατινικό της όνομα είναι *Vicia faba*. Πιστεύεται ότι μαζί με τις φακές, τα μπιζέλια και τα ρεβίθια, έγιναν μέρος της διατροφής της Ανατολικής Μεσογείου περίπου το 6.000 π.Χ. ή και νωρίτερα. Τα φύλλα της είναι σύνθετα πτερωτά, τα άνθη της σχηματίζουν βότρυες και μοιάζουν με αυτά της μπιζελιάς. Είναι χρώματος λευκού ή μοβ έχοντας μία χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα σε κάθε πέταλο και το ύψος του φυτού φτάνει το 1 μέτρο. Πρόκειται για ένα διπλοειδές φυτό όπου κάθε κύτταρο περιέχει 12 χρωμοσώματα (6 ομόλογα ζεύγη). Ο καρπός του φυτού (κουκιά) είναι ένα πλατύ σκληρό περικάρπιο οσπρίου με μια πλατιά χνουδωτή επιφάνεια που μέσα περιέχει 3-8 σπόρους. Η θρεπτική αξία των κουκιών είναι μεγάλη αφού είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, φυτικές ίνες και φυτικά έλαια. Είναι πλούσια σε φολικό οξύ, φωσφόρο, μαγγάνιο, μαγνήσιο, χαλκό, κάλιο, νάτριο, σίδηρο. Περιέχει επίσης λιπαρά οξέα ω6 και ω3 και θεωρούνται σημαντική πηγή πολυφαινόλων ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).



**Εικόνα 2:** *Vicia faba* καρποί.



**Εικόνα 3:** *Vicia faba* φυτό σε άνθηση.

## 1.3. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μια ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά και είναι υπεύθυνα για το χρώμα των λαχανικών και των φρούτων. Βρίσκονται σε πολλές τροφές όπως είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το κακάο, τα **όσπρια** και το ελαιόλαδο κ.α (Chung S. Yang, et al 1997)

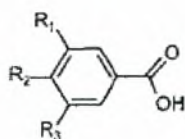


Ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε δεκατέσσερις μεγάλες κατηγορίες: φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ) κινναμικά, κουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες και τα στυλβένια. Οι κυριότερες και πιο μελετημένες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων αποτελούν οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες (Harborne JB and Baxter H. 1993).

### 1.3.1. Φαινολικά οξέα

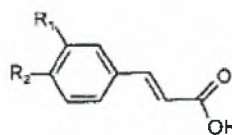
Τα φαινολικά οξέα είναι αρωματικά οξέα, περιέχουν δηλαδή στο μορίο τους αρωματικό δακτύλιο. Τα φαινολικά οξέα είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος και του υδροξυκινναμικού οξέος (Εικόνα 4). Τα παράγωγα των υδροξυβενζοϊκών οξέων, και κυρίως το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ και το ελλαγικό οξύ βρίσκονται στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυσιμμένες ταννίνες (A. Scalbert and G. Williamson) (Chung S Yang, et al 2001). Τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων βρίσκονται σε διάφορα τρόφιμα και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα απαντούν συνήθως δεσμευμένα με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών (A. Scalbert and G. Williamson) (Chung S Yang, et al 2001).

#### Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Gallic acid

#### Hydroxycinnamic acids

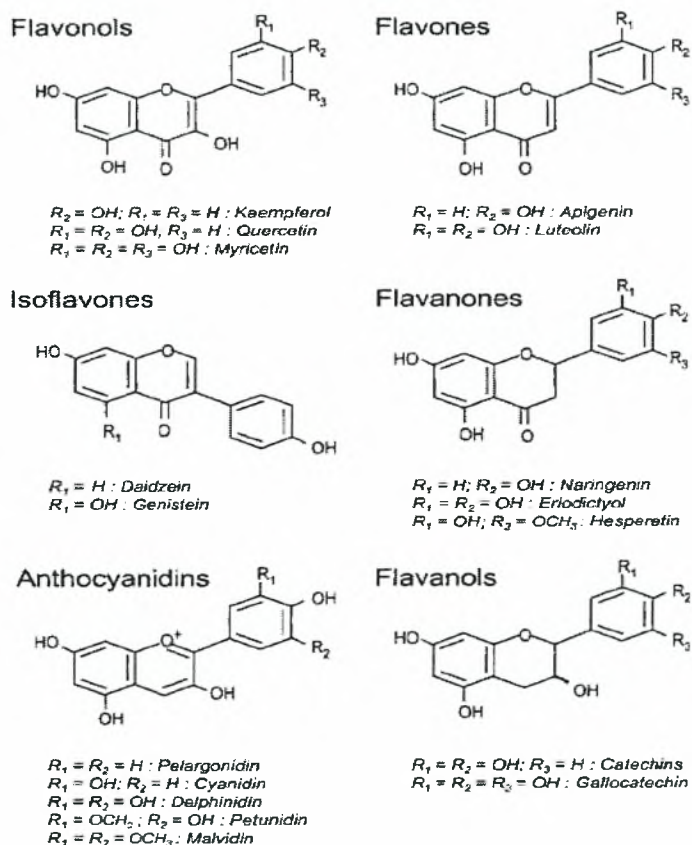


$R_1 = OH$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Caffeic acid  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$  : Ferulic acid

**Εικόνα 4:** Χημική δομή των δυο κατηγοριών φαινολικών οξέων, υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά οξέα.

### 1.3.2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και περιλαμβάνει περισσότερες από 4000 φαινολικές ενώσεις. Οι Geissman και Hinreiner ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν τον όρο φλαβονοειδή το 1952 για να χαρακτηρίσουν όλες τις χρωστικές ουσίες που κατέχουν το σκελετό (C6-C3-C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που αποτελείται από τρεις άνθρακες (C6-C3-C6). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω με υδροξυλίωση και/ή μεθυλίωση. Συνήθως βρίσκονται στις γλυκοσυλιωμένες μορφές τους αλλά μπορούν να είναι ακυλιωμένες με τα αλειφατικά ή αρωματικά οξέα. Τα σάκχαρα είναι συνήθως συνδεδεμένα με τις υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται στον Α δακτύλιο της δομής των φλαβονοειδών. Διακρίνονται σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη, λουτεΐνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη), τις φλαβονόνες (π.χ. ναριγκίνη), τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και προανθοκυανιδίνες) και τις ανθοκυανίνες (π.χ. κυανιδίνη, μαλβιδίνη) (Εικόνα 5) (C. Manach et al. 2004).



Εικόνα 5: Χημική δομή φλαβονοειδών.

Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο. Οι κυριότερες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, η ρουτίνη και η μυρικετίνη που βρίσκονται σε υψηλή περιεκτικότητα στο τσάι, στο κρασί, στο μπρόκολο, στο κρεμμύδι και άλλες τροφές. Οι φλαβόνες είναι λιγότερο συχνές και βρίσκονται στην κόκκινη πιπεριά (λουτεΐνη) και στο σέλινο (απιγενίνη). Ισοφλαβόνες περιέχονται κυρίως στη σόγια η οποία περιέχει περίπου 1 mg γενιστεΐνης ανα γραμμάριο ξηρού καρπού. Οι ισοφλαβόνες ανήκουν στις ασθενείς οιστρογονικές ουσίες, γνωστές ως φυτο-οιστρογόνα, οι οποίες έχουν την ικανότητα σύνδεσης με υποδοχείς οιστρογόνων. Ανάλογα με τα επίπεδα των ορμονών στον οργανισμό, οι ενώσεις αυτές μπορεί να εμφανίσουν είτε οιστρογονική είτε αντι-οιστρογονική δράση. Επίσης οι ισοφλαβόνες παρουσιάζουν μια σειρά από βιολογικές ιδιότητες όπως, προστατευτική δράση ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις, ενάντια στην οστεοπόρωση, προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου κ.α. (Mark J. Messina 1999).

Η ονομασία ανθοκυανιδίνη χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ενώσεις που ήταν υπεύθυνες για το χρώμα των ανθέων του αραβοσίτου. Αργότερα εφαρμόστηκε σε ενώσεις που ήταν διαλυτές στο νερό και το χρώμα τους ήταν κόκκινο, μωβ, μπλε, βιολετί στους καρπούς και τα άνθη. Οι ενώσεις αυτές έχουν έντονο αντιμυκητοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση (X. Σουλελές, 1988).

Μια άλλη κατηγορία είναι οι προανθοκυανιδίνες οι οποίες είναι πολυμερισμένες φαινόλες που απαντώνται στα φυτά. Οι ενώσεις αυτές σε αντίθεση με τις ανθοκυανιδίνες είναι άχρωμες ενώσεις που κοκκινίζουν όμως γρήγορα στην επαφή τους με τον αέρα. Οι προανθοκυανιδίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση η οποία εκδηλώνεται με την δέσμευση υδροξυ- και υπεροξυ-ριζών. Οι προανθοκυανιδίνες με μεγαλύτερο αριθμό μορίων κατεχίνης και επικατεχίνης εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης, οι προανθοκυανιδίνες όπως και οι ανθοκυανιδίνες, εμφανίζουν επίσης χημειοπροστατευτική δράση απέναντι στον καρκίνο (X. Σουλελές, 1988).

Και τα φλαβονοειδή έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για την αντιοξειδωτική τους δράση και την δράση τους απέναντι στον καρκίνο. Σαν ισχυρότερα αντιοξειδωτικά θεωρούνται η κερκετίνη, μυρικετίνη και γκοσουπετίνη. Η κερκετίνη εμποδίζει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και προστατεύει στους χυμούς των εσπεριδοειδών από την αυτοοξείδωση της βιταμίνης C (X. Σουλελές, 1988).

Όσον αφορά την δράση τους απέναντι στον καρκίνο, τα φλαβονοειδή εμφανίζουν ποικίλους μηχανισμούς δράσης που περιλαμβάνουν επιδράσεις σε κυτταρικά μηνύματα



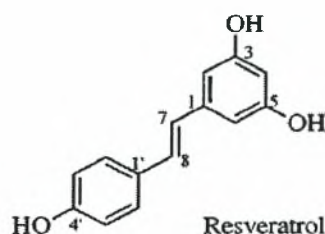
και την κυτταρική ανάπτυξη, αναστολή της δράσης ενζύμων κ.α. (C. Manach, et al 2004).

### 1.3.3 Στιλβένια

Τα στιλβένια απαντώνται λιγότερο συχνά στα φυτικά τρόφιμα. Σημαντικός εκπρόσωπος της κατηγορίας των στιλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη που υπάρχει στο κόκκινο κρασί (Εικόνα 6) (C. Manach et al 2004). Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο φαινυλικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου (C.S.Yang et al., 2001). Η ρεσβερατρόλη εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, δράσεις που θεωρούνται υπεύθυνες για την δράση του κόκκινου κρασιού στις καρδιαγγειακές παθήσεις (French paradox) (St . Leger, 1979, H. Arichi, 1982).

Η ένωση αυτή δρα επίσης και ως ισχυρός χημιοπροστατευτικός παράγοντας απέναντι στον καρκίνο, εμφανίζοντας ανασταλτική δράση σε διαδικασίες του κυττάρου που σχετίζονται με τα στάδια έναρξης, επαγωγής, προαγωγής και προόδου της καρκινογένεσης. Η ρεσβερατρόλη έχει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως η αναστολή της δράσης των κυκλοοξυγενασών (COX- 1, COX-2), επίσης επάγουν την δράση των ενζύμων της Φάσης II του μεταβολισμού και σε κάποιες μελέτες η ρεσβερατρόλη εμφάνισε οιστρογονομιμητική δράση (Yang et al 2001).

#### Stilbenes

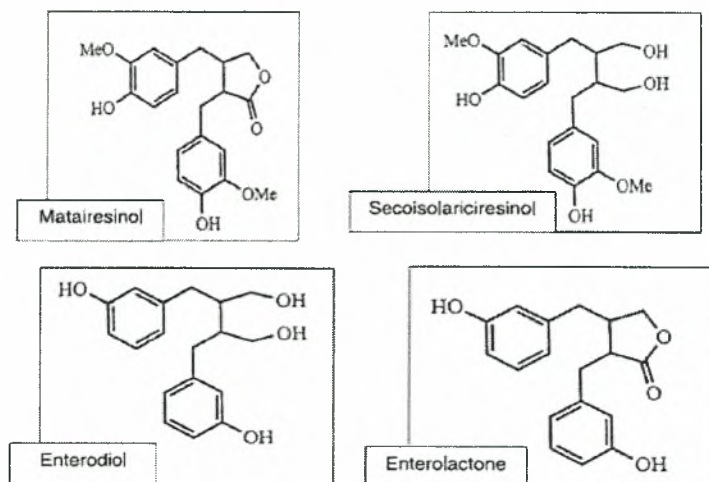


**Εικόνα 6:** Χημική δομή της ρεσβερατρόλης

### 1.3.4. Λιγνάνια

Τα λιγνάνια είναι χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους οι οποίες προέρχονται από την φαινυλαλανίνη των φυτών. Εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα γι'αυτό και αποτελούν μία από τις δύο κύριες κατηγορίες φυτο-οιστρογόνων. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ άλλα φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες. Φυτικά λιγνάνια είναι η ματαιρεσινόλη και η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη και η εντερολακτόνη (Εικόνα 7). Από τις πιο γνωστές

δράσεις των λιγνανίων είναι οι αντιοξειδωτικές και οι χημειοπροστατευτικές τους δράσεις (C. Manach et al 2004, W. Ren et al 2003).



Εικόνα 7: Χημική δομή φυτικών λιγνανίων και των ζωικών παραγώγων τους

#### 1.4. Ελεύθερες ρίζες

Στα άτομα και τα μόρια, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Οι ελεύθερες ρίζες είναι φορτισμένα άτομα ή μόρια, ιδιαίτερα επιβλαβή για τα κύτταρα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να βρίσκεται σε άτομο οξυγόνου (π.χ ρίζα του σουπεροξειδίου  $O_2^{\cdot}$  και ρίζα του υδροξυλίου  $OH^{\cdot}$ ), σε άτομο θείου (π.χ ρίζες  $RS^{\cdot}$ ), σε άτομο άνθρακα (π.χ ρίζα  $CCl_3^{\cdot}$ ) ή τέλος, σε άτομο αζώτου (π.χ ρίζα  $NO^{\cdot}$ ).

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) (Reactive oxygen species ή ROS) είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες με κέντρο το οξυγόνο όπως το  $O_2^{\cdot}$  και το  $OH^{\cdot}$ , αλλά και κάποια παράγωγα του οξυγόνου όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ) τα οποία δεν είναι ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες και μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες. Ένας άλλος παρόμοιος όρος είναι οι δραστικές μορφές αζώτου (ΔΜΑ) που περιλαμβάνει τις ελεύθερες ρίζες στις οποίες το ελεύθερο ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε άτομο αζώτου (π.χ  $NO^{\cdot}$  και  $NO_2$ ) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά

οξειδωτικοί παράγοντες (M. Valko et al.2006-2007). Στους ζωντανούς οργανισμούς οι ΔΜΟ και οι ΔΜΑ παράγονται ως προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού.

#### 1.4.1 Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς στο ανθρώπινο σώμα. Το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο που περιέχουν, γενικά, αυξάνει τη δραστικότητα του μορίου ή του ατόμου γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος ηλεκτρονίων (Miller, Buettner, & Aust, 1990).

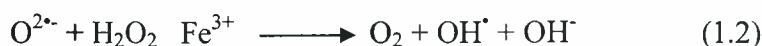
Οι ΔΜΟ μπορούν να παραχθούν και από ενδογενείς και από εξωγενείς ουσίες. Πιθανές ενδογενείς πηγές είναι τα μιτοχόνδρια, τα φαγοκύτταρα κλπ.

Το μοριακό οξυγόνο έχει μια μοναδική ηλεκτρονιακή διαμόρφωση και θεωρείται από μόνο του μια ρίζα. Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο O<sub>2</sub> δημιουργεί την ρίζα του σουπεροξειδίου O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Miller et al., 1990). Υπολογίζεται ότι περίπου 1-3% του O<sub>2</sub> στα κύτταρα μετατρέπεται σε O<sub>2</sub><sup>-</sup> στα μιτοχόνδρια λόγω της "διαρροής" ηλεκτρονίων από τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. (M,Valko, et al 2005).

Η δημιουργία αρκετών ελευθέρων ριζών είναι στενά συνδεδεμένη με την παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Στα βιολογικά συστήματα το κύρια μεταβατικό μέταλλο είναι συνήθως ο σίδηρος, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με διάφορες πρωτεΐνες. Τα επίπεδα του σιδήρου ρυθμίζονται έτσι ώστε να μην υπάρχει ελεύθερος ενδοκυττάριος σίδηρος. *In vivo*, έχει παρατηρηθεί ότι κάτω από συνθήκες stress το υπεροξείδιο του υδρογόνου απελευθερώνει σίδηρο. Έτσι ο σίδηρος συμμετέχει στην αντίδραση Fenton από όπου παράγεται μία από τις πιο δραστικές ρίζες, η ρίζα του υδροξυλίου OH<sup>•</sup>.



Η ρίζα του υπεροξειδίου συμμετέχει επίσης σε μία άλλη αντίδραση, την αντίδραση Haber- Weiss, που θεωρείται σημαντική για την παραγωγή ελευθέρων ριζών.



Εκτός από τα μιτοχόνδρια, ΔΜΟ σχηματίζονται και κατά την διάρκεια των αντιδράσεων διαφόρων ενζυμικών συστημάτων όπως της οξειδάσης της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μία σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών. Στον καταβολισμό των πουρινών, η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης σε

ξανθίνη και στη συνέχεια της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Στα δύο αυτά βήματα απελευθερώνεται μοριακό οξυγόνο το οποίο σχηματίζει πρώτα το ανιόν του σουπεροξειδίου και στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Επιπλέον, ΔΜΟ δημιουργούνται και από τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα αυξάνουν την πρόσληψη οξυγόνου με αποτέλεσμα να σχηματίζονται το ανιόν του σουπεροξειδίου και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το σύστημα μεταβολισμού του κυτοχρώματος P450 συμμετέχει στον σχηματισμό των ΔΜΟ.

Πολλές εξωγενείς πηγές μπορεί να είναι η αφορμή για να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες όπως είναι οι χλωριούχες ενώσεις, η ιονίζουσα ακτινοβολία, το υπεριώδες φως, η περιβαλλοντική μόλυνση, η χρήση χημικών φαρμάκων, καπνού, αλκοόλ και συντηρητικών των τροφών (Εικόνα 8) (M. Valko et al.2006-2007).

Το NO<sup>•</sup> είναι μία ελεύθερη ρίζα που περιέχει ένα αζευγάρωτο ηλεκτρόνιο. Το NO<sup>•</sup> παράγεται στους βιολογικούς ιστούς από μία ειδική συνθάση των νιτρικών οξειδίων (nitric oxide synthases), (NOSs), που μεταβολίζει την αργινίνη σε κιτροουλίνη σχηματίζοντας έτσι το NO<sup>•</sup> (M. Valko et al.2006-2007). Σε περίπτωση φλεγμονής, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παράγουν και ανιόν σουπεροξειδίου και NO<sup>•</sup>. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το NO<sup>•</sup> και το ανιόν του σουπεροξειδίου μπορούν να αντιδράσουν μαζί και να παραχθούν σημαντικά ποσά ενός πολύ πιο ενεργού μορίου, το ανιόν περοξυνιτρίτη (ONOO<sup>-</sup>), το οποίο είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει τεμαχισμό του DNA αλλά και οξείδωση λιπιδίων (Carr, et al., 2000).

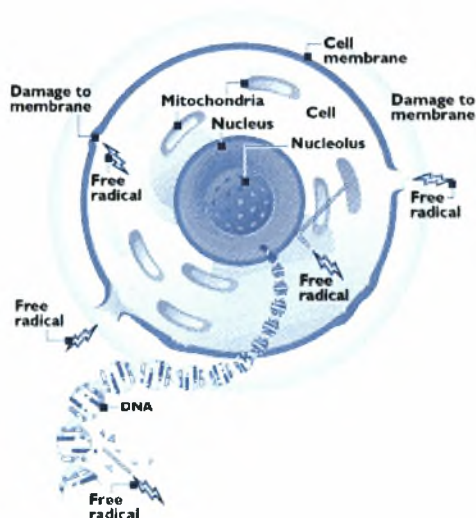


**Εικόνα 8.** Πηγές σχηματισμού ελευθέρων ριζών

#### 1.4.2 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών

Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται συνέχεια μέσα στο σώμα μας σαν παράπλευρα προϊόντα του μεταβολισμού και είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα. Χρησιμοποιούνται από το αμυντικό μας σύστημα σε περίπτωση εισβολής μικροβίων και ιών: Όπως για παράδειγμα σε περίπτωση φλεγμονής, τα φαγοκύτταρα μετά από απόκριση σε φλεγμονώδεις παράγοντες και σε προϊόντα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων παράγουν  $O_2^{\cdot-}$  για να σκοτώνουν τα βακτήρια. Εκτός από αυτό, οι ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιούνται και σε άλλες χρήσιμες λειτουργίες, όπως στην αποδόμηση των φαρμάκων και στη σύνθεση των προσταγλανδινών. Επίσης, το  $NO^{\cdot}$  που συντίθεται στα αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα, στα φαγοκύτταρα και σε διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους έχει πολλές λειτουργίες. Για παράδειγμα, το  $NO^{\cdot}$  συμβάλλει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης προκαλώντας διαστολή των αγγείων και στη θανάτωση των μικροβίων από τα φαγοκύτταρα. Το  $H_2O_2$  χρησιμοποιείται από το ένζυμο υπεροξειδάση του θυρεοειδή για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών (Halliwell & Gutteridge, 1999).

#### 1.4.3 Επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών



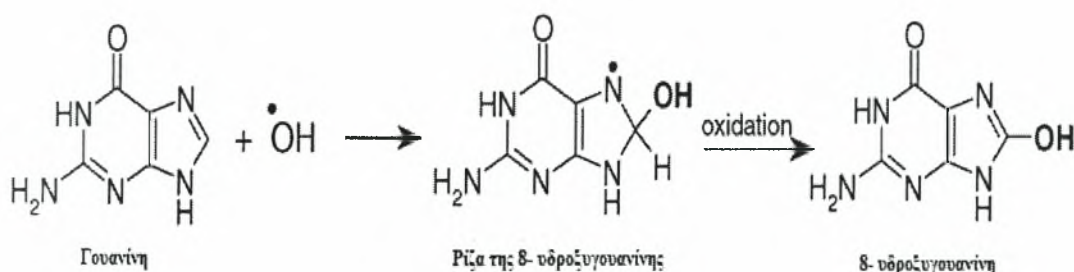
**Εικόνα 9.** Οι ελεύθερες ρίζες επειδή είναι πολύ δραστικά μόρια προσβάλλουν και οξειδώνουν τα βιομόρια το DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες



Η ρίζα OH<sup>•</sup> μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό διαφόρων προϊόντων αφού μπορεί να αντιδράσει και με τη δεοξυριβόζη του DNA αλλά και με τις αζωτούχες βάσεις (Halliwell & Gutteridge, 1999). Για παράδειγμα, η OH<sup>•</sup> μπορεί να προστεθεί στη βάση του DNA, γουανίνη, στις θέσεις 4, 5 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου. Η προσθήκη OH<sup>•</sup> στη θέση C8 οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυγουανίνης (Σχήμα 1) (M.K. Shigenaga, et al 1989). Αυτό το οξειδωμένο προϊόν του DNA είναι σημαντικό επειδή σχηματίζεται σχετικά εύκολα και είναι μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο. Ο προσδιορισμός της 8-υδροξυγουανίνης χρησιμοποιείται ως δείκτης για την πρόκληση βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες (Breen and Murphy 1995).

Ο περοξυνιτρίτης φαίνεται ότι αντιδρά με την γουανίνη και σχηματίζει την 8-ντιρογουανίνη. Λόγω της δομής του, αυτό το σύμπλεγμα έχει δυνατότητα να προκαλέσει G:C→T:A μεταστροφές. Αν και η σταθερότητα αυτής της βλάβης στο DNA είναι χαμηλή, εντούτοις, στο RNA αυτό το σύμπλεγμα αζώτου είναι σταθερό.

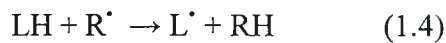
Εκτός από τις εκτενείς μελέτες που αναφέρονται στη σχέση ανάμεσα στη οξειδωτική βλάβη του πυρηνικού DNA και στο καρκίνο, υπάρχουν στοιχεία και για τη συμμετοχή της οξειδωτικής βλάβης του μιτοχονδριακού DNA στην καρκινογενετική διαδικασία. Μεταλλάξεις και αλλαγμένη έκφραση σε μιτοχονδριακά γονίδια και σε κάποιες περιοχές του μιτοχονδριακού DNA έχουν προσδιοριστεί σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους .



**Σχήμα 1.** Σχηματισμός της 8-υδροξυγουανίνης.

Η πιο ευαίσθητη κατηγορία βιολογικών μακρομορίων στην προσβολή από ελεύθερες ρίζες θεωρούνται τα λιπίδια (Halliwell & Gutteridge 1984). Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) που εύκολα μπορούν να οξειδωθούν από ελεύθερες ρίζες. Η λιπιδιακή υπεροξείδωση ξεκινάει με την οξείδωση

ενός λιπαρού οξέος (LH) από μια ρίζα (R<sup>•</sup>) με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας λιπδιακής ρίζας (L<sup>•</sup>) (αντίδραση 1.4). Η λιπδιακή ρίζα στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο O<sub>2</sub> και να σχηματιστεί μια ρίζα περοξυλίου (LOO<sup>•</sup>) (αντίδραση 1.5). Οι ρίζες περοξυλίου (LOO<sup>•</sup>) μπορούν να οξειδώσουν περισσότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και να σχηματιστούν έτσι λιπδιακά υπεροξειδία (LOOH) (αντίδραση 1.6) που μπορούν να διασπαστούν σε πιο δραστικά μόρια, ιδιαίτερα σε αλδεϋδες (RCHO) (αντίδραση 1.7) (C.Mylonas, D.Kouretas, 1999).



### 1.5. Οξειδωτικό στρες- Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** αναφέρεται στην κατάσταση σοβαρής ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας, σε βάρος της τελευταίας, γεγονός το οποίο οδηγεί σε επιβλαβείς επιδράσεις. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει από:

1. *Αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου ΔΟΜ.* π.χ. σε περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης οξυγόνου, λόγω παρουσίας τοξινών.
2. *Μείωση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών.* π.χ. διάφορες μεταλλάξεις στα αντιοξειδωτικά ένζυμα ή μείωση της πρόσληψης αντιοξειδωτικών από τη διατροφή.

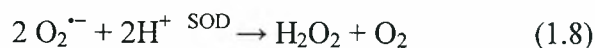
Η κατάσταση αυτή οδηγεί σε περίσσεια ελευθέρων ριζών στην οποία το κύτταρο είτε θα προσαρμοστεί είτε θα δεχτεί την βλαπτική της επίδραση (B. Halliwell, 2001). Επίσης, το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί ισχυρά με τον κυτταρικό θάνατο καθώς οδηγεί είτε σε νέκρωση είτε σε απόπτωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με διάφορες ασθένειες όπως αθηροσκλήρωση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ασθένειες ήπατος, καταράκτη, κυστική ίνωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα καθώς και διάφορες μορφές καρκίνου (J. Lee, et al 2003).

Ο κυριότερος μηχανισμός άμυνας του οργανισμού απέναντι στις επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών είναι τα αντιοξειδωτικά συστήματά του και οι

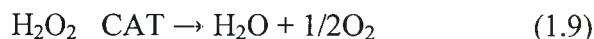
αντιοξειδωτικές ουσίες. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού περιλαμβάνουν τις εξής κατηγορίες: 1) αντιοξειδωτικά ένζυμα, 2) πρωτεΐνες που προστατεύουν τα βιολογικά μακρομόρια από βλάβες, 3) πρωτεΐνες που απομακρύνουν προ-οξειδωτικές ουσίες (π.χ. αιμοπηξίνη, τρανσφερίνες), 4) αντιοξειδωτικά μόρια που εξουδετερώνουν τις ΔΜΟ.

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα βρίσκονται σε διάφορα οργανίδια του κυττάρου και υποκυτταρικά τμήματα και ελέγχουν την τοπική παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Τα κυριότερα ένζυμα είναι :

i) Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) η οποία απομακρύνει το  $O_2^{\cdot-}$  επιταχύνοντας τη μετατροπή του σε  $H_2O_2$  (αντίδραση 1.8).



ii) Η καταλάση (CAT) η οποία είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που διασπά το  $H_2O_2$  σε  $O_2$  και  $H_2O$  (αντίδραση 1.9).

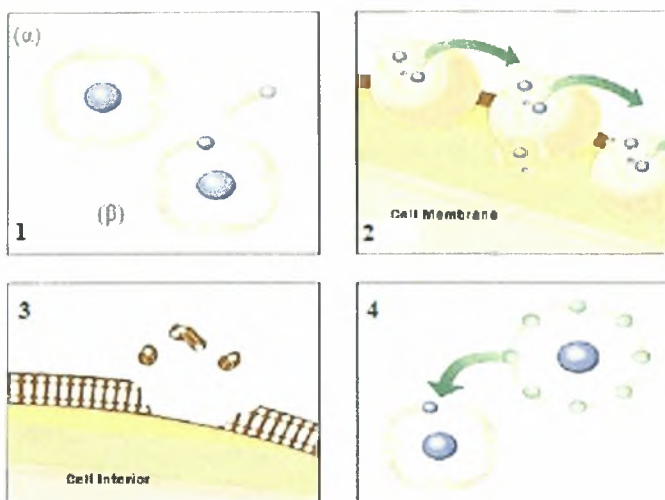


iii) Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH- Px), οι οποίες απαιτούν σελήνιο για τη δράση τους, βρίσκονται κυρίως στην καρδιά, στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Τα ένζυμα αυτά οξειδώνουν την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη (GSSG) χρησιμοποιώντας το  $H_2O_2$  (αντίδραση 1,10) (Mylonas & Kouretas 1999).



Εκτός από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και τις πρωτεΐνες υπάρχουν και τα αντιοξειδωτικά μόρια, τα οποία δρουν ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου, σταθεροποιώντας μια ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνοντάς την. Για παράδειγμα, η γλουταθειόνη (GSH), η οποία είναι ένα τριπεπτίδιο μπορεί να εξουδετερώσει δραστικές μορφές οξυγόνου (Mylonas & Kouretas 1999). Επίσης, μόρια με σημαντική αντιοξειδωτική δράση υπάρχουν στα πράσινα λαχανικά, στον χυμό πορτοκαλιού, στον καφέ, το τσάι, και τα όσπρια. Κάποια από αυτά τα μόρια είναι οι βιταμίνες, τα μέταλλα, όπως σελήνιο και ψευδάργυρος, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες. Για παράδειγμα, η βιταμίνη C είναι μια ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Μια άλλη βιταμίνη με αντιοξειδωτική δράση είναι η βιταμίνη E, η οποία λόγω του ότι είναι λιπόφιλο μόριο μπορεί και διεισδύει στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες και προστατεύει από τη λιπιδιακή υπεροξείδωση (Das S, 1994, Meydani M, et al. 1997).





**Εικόνα 10:** Τα αντιοξειδωτικά μόρια προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες και τις σταθεροποιούν καθιστώντας τες ακίνδυνες.

## **1.6. Καρκινογένεση**

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο φέρει ένα πολύπλοκο και αυστηρά ρυθμιζόμενο γενετικό πρόγραμμα, που ελέγχει τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Ο καρκίνος οφείλεται σε μια διαταραχή αυτού του φυσιολογικού ρυθμιστικού προτύπου, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, γεγονότα που χαρακτηρίζουν έναν κακοήθη όγκο. Για την μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό συνήθως επιδρούν περισσότεροι από έναν βλαπτικοί παράγοντες που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, σε συνδυασμό ή διαδοχικά. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες βλαπτικών παραγόντων που έχουν ενοχοποιηθεί για τον καρκίνο: χημικές ουσίες, ακτινοβολία και ογκογόνοι ιοί.

### **1.6.1 Θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης**

Με βάση τα αποτελέσματα από πειραματικά μοντέλα σε πειραματόζωα, επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπινους καρκίνους και τις πρόσφατες μελέτες της έρευνας των ογκογονιδίων, έχει αποδειχθεί ότι η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό κύτταρο με ικανότητα μετάστασης δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου.

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης.

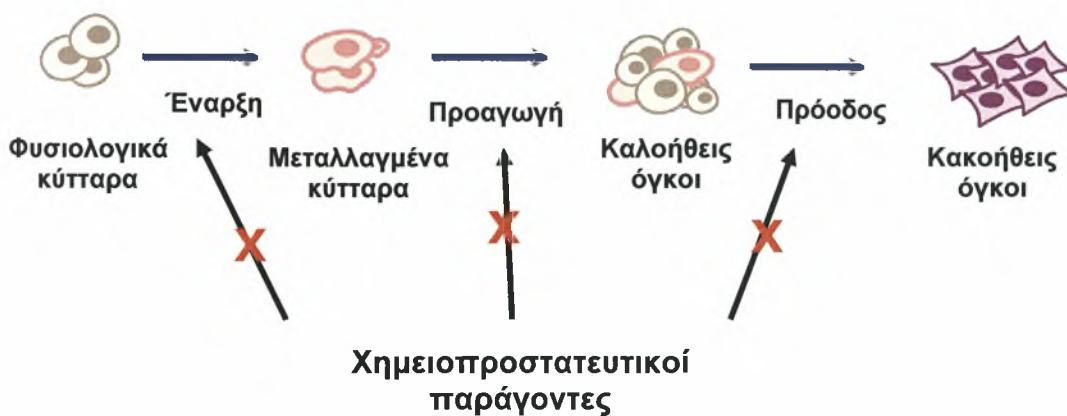
α) Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το πρώτο στάδιο (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας, είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο προγεννήτορα. Κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα προκαλείται μετάλλαξη, δίνοντας γένεση

σε ένα κύτταρο που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε.

β) Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο στάδιο (promotion), είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων-μυημένων κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων που προάγουν την μίτωση. Καθώς το μυημένο κύτταρο διαιρείται, όταν πλησιάζει την διαίρεση που κανονικά θα πέθαινε, και συνεχίζει πέρα από αυτόν τον κύκλο να διαιρείται, προστίθενται γενωμικές βλάβες στα κύτταρα απογόνους οι οποίες, αν το κύτταρο πέθαινε μετά την κρίσιμη διαίρεση, δεν θα γίνονταν. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο.

γ) Στο τρίτο στάδιο (progression), το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο, μετατρέπεται σε ένα καρκινικό, ανεξάρτητο από προαγωγέα, κύτταρο (Valko et al, 2006).

Το πολυσταδιακό μοντέλο ως γενικό παράδειγμα για την προέλευση του καρκίνου παρουσιάζεται στην Εικόνα 11 όπου φαίνεται η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό (Valko et al., 2006, Δ. Κουρέτας Βιοχημική Τοξικολογία 2003).



**Εικόνα 11:** Μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό και τα σημεία δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

### 1.6.2. Χημειοπροστασία

Η χημειοπροστασία αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της συνολικής προσπάθειας πρόληψης και αποτελεσματικής θεραπείας του καρκίνου. Ο όρος χημειοπροστασία ορίστηκε ως η χρήση ειδικών φυσικών και συνθετικών χημικών ουσιών, οι οποίες αναστέλλουν, καταστέλλουν ή προλαμβάνουν την εξέλιξη προκαρκινικών βλαβών σε διηθητικό καρκίνωμα (Μ.Β. Καραμούζης και Α.Γ. Παπαβασιλείου 2005).

Οι παράγοντες χημειοπροστασίας μπορεί να είναι συνθετικές ενώσεις ή φυτικές ουσίες που περιέχονται στη φυσιολογική διατροφή. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχουν μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός φυτοχημικών παραγόντων (phytochemicals) που περιέχονται σε βότανα, φρούτα και λαχανικά και έχουν επιδείξει χημειοπροστατευτική δράση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου σε ποικίλες *in vitro*, *in vivo* αλλά και επιδημιολογικές μελέτες (Yang et al 2001).

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες :

- Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
- Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου. Οι παράγοντες αυτοί ανατέλλουν την πρώτη φάση (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας.
- Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την προαγωγική (promotion) και την προοδευτική (progression) φάση της καρκινογένεσης (G.D. Stoner et al 1997).

### **1.6.3. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

#### **ι) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου (Inhibitors of Carcinogen Formation)**

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου συνήθως αναστέλλουν το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν κάποια αναγωγικά (π.χ. ασκορβικό οξύ), κάποιες φυτικές πολυφαινόλες (π.χ. φερούλικό οξύ, το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ) κ.α. Το ασκορβικό οξύ ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (G.D. Stoner et al 1997).

#### **ιι) Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents)**

Οι παράγοντες αυτοί ανατέλλουν την πρώτη φάση (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν: οι αναστολείς του κυτοχρώματος P-450, οι επαγωγείς του κυτοχρώματος P-450, οι επαγωγείς του κυτοχρώματος P-450, οι επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II, οι εξουδετερωτές των ηλεκτρόφιλων και των ελεύθερων ριζών και οι επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA (G.D Stoner et al 1997). Για παράδειγμα, οι αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών μερικές φορές οδηγούν στη μετατροπή προ-καρκινογόνων ουσιών σε καρκινογόνες. Οι εξουδετερωτές των ηλεκτρόφιλων και των

ελεύθερων ριζών θεωρούνται βασικός μηχανισμός χημειοπροστασίας. Οι ουσίες αυτές αντιδρούν με το DNA οδηγώντας σε μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του, με αποτέλεσμα να αυξηθούν οι πιθανότητες για ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση αντιογκογονιδίων (G.D Stoner et al., 1997).

ιι) Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης (Suppressing agents).

Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών, οι επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης, οι ρυθμιστές της οδού μετάδοσης του μηνύματος, οι ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, οι αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων, οι επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας, οι παράγοντες αποκατάστασης της ανοσολογικής απάντησης, οι επαγωγείς της απόπτωσης, οι επιδιορθωτές της ανισοροπίας της μεθυλίωσης του DNA, οι αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης και οι αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (G.D.Stoner et al., 1997).

#### **1.6.4. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινόλων**

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες, μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία και να προστατεύει από πολλές ασθένειες όπως διαβήτης, παχυσαρκία, καρδιαγγειακές παθήσεις και διάφορες μορφές καρκίνου (J. D. Lambert, et al., 2005). Οι πολυφαινόλες είναι σημαντικοί αδρανοποιητές οξειδωτικών μορίων και ελευθέρων ριζών, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA και την δημιουργία όγκων (M. Hanausek, et al 2003)

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν επίσης σημαντική επίδραση στην βιοδραστικότητα των καρκινογόνων ουσιών. Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα για να μπορέσουν να συνδεθούν με το DNA, θα πρέπει να τροποποιηθούν από τα μεταβολικά ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού σε μία πιο δραστική μορφή. Έτσι, αρκετά φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση καρκινογόνων παραγόντων στον άνθρωπο, όπως είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.α. Επιπλέον, *in vitro* έρευνες έχουν δείξει ότι αρκετές φαινολικές ενώσεις συμβάλλουν στην αύξηση της δράσης αρκετών οξειδωτικών ενζύμων, όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (C. S. Yang, et al )

Πολλές φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν επίσης σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλοντας ένζυμα όπως το COX2. Η χρόνια φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο

στην αιτιολογία πολλών μορφών καρκίνου, γι' αυτό και οι αναστολείς αυτοί θεωρούνται σημαντικοί προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου (C. S. Yang, et al )

Τέλος, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εκδήλωση της αντικαρκινικής δράσης των φαινολικών ενώσεων αναφέρονται σε επιδράσεις σε κυτταρικά μηνύματα και την κυτταρική ανάπτυξη, σε αναστολή δράσης ενζύμων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σε επαγωγή της διαδικασίας της απόπτωσης (M. Hanausek, et al 2003, Yang, et al., 2001).

#### **1.6.5. Χημειοθεραπεία του καρκίνου**

Χημειοθεραπεία είναι η χρήση φαρμάκων, δηλαδή χημικών ουσιών, στα πλαίσια αντιμετώπισης μιας ασθένειας. Σήμερα, η χρησιμοποίηση του όρου περιορίζεται κατά κανόνα στη χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων, με αποτέλεσμα η έννοια χημειοθεραπεία σήμερα να ισοδυναμεί με την αντινεοπλασματική αγωγή ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

#### **1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα**

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι γνωστά ως αντιογκογονικοί, αντικοί και χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (W. Zhou, et al 2004, C. Perigaud, et al 1992, R.K, Robins, G.D. Kini, 1990, MacCoss, M.; Robins, M.J.1990), Έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και σακχάρου των φυσικών νουκλεοσιδίων με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους. Η σύνθεση των νουκλεοσιδίων συνήθως πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά. Μπορούν επίσης να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Αυτό επιτρέπει στα ανάλογα νουκλεοσιδίων με αντικική ή και αντικαρκινική δράση να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (W. Zhou, et al. 2004).

Τα νουκλεοσιδία μπορούν να ενεργήσουν με διαφορετικούς μηχανισμούς: μπορούν να αναστείλουν τη δράση βασικών ενζύμων στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων ή και μπορούν να ενσωματωθούν στα πρόσφατα συντειθέμενα νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας τον τερματισμό των αλυσίδων ή την παραγωγή μη λειτουργικών βιομορίων (W. Zhou, et al. 2004).

Το πιο κοινό αποτέλεσμα των ενεργειών αυτών είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να είναι επιθυμητός όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου και των αυτοάνοσων ασθενειών. Επιπλέον, οι ενώσεις που μπορούν να στοχεύσουν επιλεκτικά



στα βακτηριακά ή στα προερχόμενα από ιό ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακή ή αντικοί παράγοντες (W. Zhou, et al. 2004).

Τα ανάλογα νουκλεοσιδίων είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για την φαρμακολογική τους δράση. Τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα ανάλογα όμως εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοσιδίων. Στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό (W. Zhou, et al. 2004).

Οι αρχικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη δημιουργία νουκλεοσιδικών αναλόγων με αντιϊκή και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση νουκλεοσιδίων που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη. Όμως, με τη πάροδο του χρόνου, προβλήματα όπως η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων κ.α. οδήγησαν στη μελέτη άλλων νουκλεοσιδίων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μία εξόζη ([www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html](http://www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html)).

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα νουκλεοσίδια με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιϊκές και αντιβιοτικές τους ιδιότητες καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων (S. Manta et al. 2006).

Μια σημαντική κατηγορία των πυρανονουκλεοσιδίων αποτελούν τα φθορονουκλεοσίδια. Τα συγκεκριμένα νουκλεοσιδικά ανάλογα έχουν δείξει την ισχυρή αντιϊκή τους δράση καθώς επίσης και τις χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητές τους λόγω του μικρού μεγέθους και της ιδιαίτερα ηλεκτροαρνητικής φύσης του ατόμου φθορίου. Η αντικατάσταση ενός υδρογόνου από ένα φθόριο σε ένα βιολογικά ενεργό μόριο δεν αναμένεται να προκαλέσει στερεοχημικές μεταβολές όσον αφορά στον τρόπο σύνδεσης του μορίου έναντι διαφόρων υποδοχέων και ενζύμων. Αντίθετα, η μεγάλη ισχύς του δεσμού C-F, σε σχέση με αυτή του δεσμού C-H, παρεμποδίζει το μεταβολισμό με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου. Επιπλέον, η ικανότητα έλξης ηλεκτρονίων από το φθόριο, δεδομένου ότι είναι το πιο ηλεκτραρνητικό όλων των στοιχείων, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη χημική δραστηριότητα (S. Manta et al. 2006).

Άλλη μία κατηγορία πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων αποτελούν τα ακόρεστα κετονουκλεοσίδια. Τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα είναι γνωστά για την αντινεοπλαστική τους δραστηριότητα και τα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματά τους (J. Paterson, et al 1998, M. Alaoui, et al 1986, M. Alaoui, et al 1987, M.J.Egron, 2005, T.

Halmos, D. Komiotis, K. Antonakis, 1986). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικά όχι μόνο σε περιπτώσεις καρκινωμάτων *in vitro* (K. Antonakis, I. Chouroulinkov, 1974, T. Halmos, et al 1983) και της λευχαιμίας L1210 *in vivo* (K. Antonakis, et al 1980, I. Chouroulinkov, K. Antonakis, 1977) αλλά μπορούν επίσης να αποτελέσουν σημαντικούς συνθετικούς μεσάζοντες στον τομέα των νουκλεοσιδίων εξαιτίας της χημικής τους δραστηριότητας στα διάφορα μέσα (Antonakis, K. 1975, Antonakis, K. 1973)

Με βάση τα παραπάνω, τα ακόρεστα 3'-φθόρο-2'-κετονουκλεοσίδια της N<sup>4</sup> – βενζοϋλο κυτοσίνης έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των μολύνσεων που οφείλονται σε ρετροϊούς και στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου (S. Manta, 2007). Μια νέα κατηγορία ακόρεστων 3'-φθόρο-4'-κετονουκλεοσιδίων, της N<sup>4</sup> – βενζοϋλο κυτοσίνης και της N<sup>6</sup> – βενζοϋλο αδενίνης αντίστοιχα συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκρίθηκαν με την 5FU. Τα νέα νουκλεοσιδικά ανάλογα αυτά εμφανίστηκαν πιο αποτελεσματικοί αντινεοπλασματικοί παράγοντες και παρουσίασαν αντιϊκή δράση έναντι των ρετροϊών (S. Manta, et al 2008). Έτσι θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική δράση αυτών των νέων τροποποιημένων νουκλεοσιδικών αναλόγων.

## 1.8 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιάς σειράς φθοριωμένων πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων της  $N^4$  – βενζοϋλο κυτοσίνης και της  $N^6$  – βενζοϋλο αδερίνης και κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba*. Τα νέα νουκλεοσιδικά ανάλογα (φθοριωμένα πυρανονουκλεοσίδια της  $N^4$  – βενζοϋλο κυτοσίνης και της  $N^6$  – βενζοϋλο αδερίνης) εμφανίστηκαν αποτελεσματικοί αντινεοπλασματικοί παράγοντες και παρουσίασαν σημαντική αντιϊκή δράση έναντι των ρετροϊών. Έτσι θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική δράση αυτών των νέων τροποποιημένων νουκλεοσιδικών αναλόγων, η οποία μελετάται για πρώτη φορά.

Στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων Ελληνικών ψυχανθών κλάσματα πολυφαινολικών ενώσεων απομονώθηκαν από ένα εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση κάποιων από αυτών.

Για να μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των καθαρών πολυφαινολικών μορίων και των νουκλεοσιδίων χρησιμοποιήθηκαν τρεις *in vitro* μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος ήταν ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH που βασίζεται στην ικανότητα των εξεταζόμενων ουσιών να εξουδετερώνουν τη ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>). Με τη δεύτερη και τη τρίτη μέθοδο παρατηρήθηκε η ιδιότητά τους να προστατεύουν το DNA από την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>) και από την επαγόμενη από ρίζες OH<sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων.



## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Μείγματα καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων του φυτού *Vicia faba*

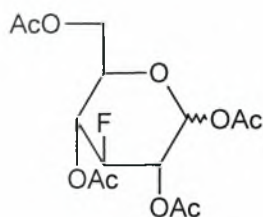
Συνολικά μελετήθηκαν πέντε μείγματα καθαρών πολυφαινολικών μορίων τα οποία απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba* (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Κλάσματα καθαρών μορίων από το φυτό *Vicia faba* (πόα).

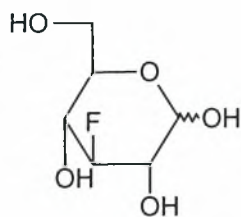
<i>Vicia faba</i>
Vfm 32-34
Vfm 76-81
Vfm 92-97
Vfm 135-137
Vfm 155-160

#### 2.1.2. Νουκλεοσιδικά ανάλογα

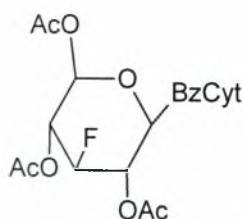
Ακόμη, για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, μελετήθηκαν 13 νουκλεοσιδικά ανάλογα (Εικόνα 12).



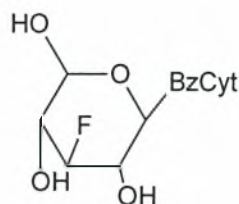
**Product 1**



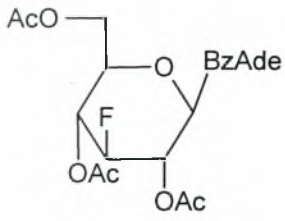
**Product 2**



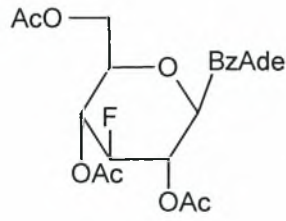
**Product 3**



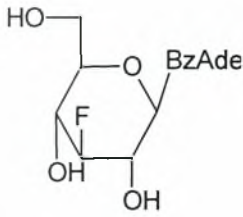
**Product 4**



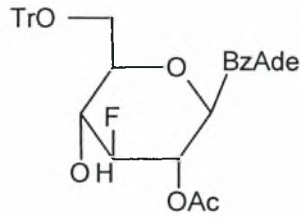
**Product 5**



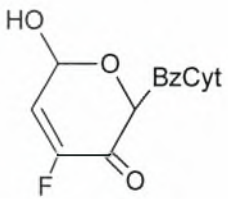
**Product 6**



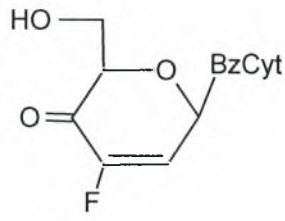
**Product 7**



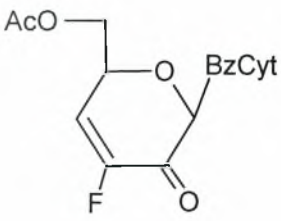
**Product 8**



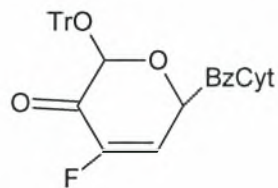
**Product 9**



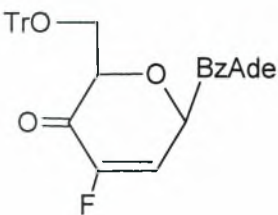
**Product 10**



**Product 11**



**Product 12**



**Product 13**

**Εικόνα 12:** Χημικές δομές των νουκλεοσιδικών αναλόγων



## 2.2. Μέθοδοι

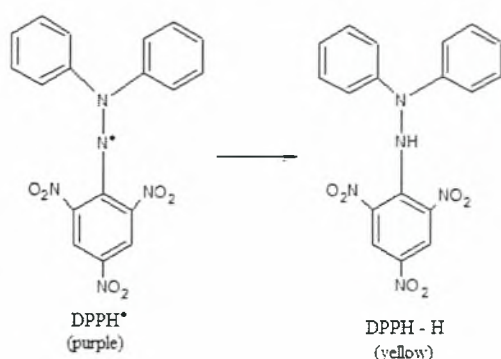
### 2.2.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη σταθερή χημική ρίζα DPPH<sup>•</sup> (DPPH<sup>•</sup>) radical scavenging assay)

#### Χημικά αντιδραστήρια

- 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>)(Sigma-Aldrich- St Louis, MO, USA)
- Μεθανόλη (Merck-Γερμανία)

#### Αρχή της μεθόδου

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα του DPPH<sup>•</sup> (1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων μορίων. Βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των εξεταζόμενων μορίων με τη σταθερή ρίζα του DPPH<sup>•</sup> η οποία προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Το διάλυμα της ρίζας DPPH<sup>•</sup> έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν προστεθεί σ' αυτό μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH<sup>•</sup> ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός e<sup>-</sup> και μετατρέπεται στην 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη, η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Μετατροπή DPPH<sup>•</sup> σε DPPH-H

## Πειραματική διαδικασία

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο διαλύματος 1ml μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100μM ρίζας DPPH· και η εξεταζόμενη ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το διάλυμα του DPPH· σε μεθανόλη προετοιμάζεται τη μέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την αρχική προσθήκη των διαλυμάτων της εξεταζόμενης ουσίας, στην συνέχεια της μεθανόλης και τέλος του διαλύματος της ρίζας, το οποίο προστίθεται με σταθερό ρυθμό. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 20 min, στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 517 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιούνταν η κάθε συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας διαλυμένης σε μεθανόλη.

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία εξετάζονταν:

1. Ένας μάρτυρας (control) το οποίο περιείχε μεθανόλη και DPPH· σε συγκέντρωση 100μM.
2. Δείγματα με τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των μορίων παρουσία της ρίζας.

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50, 100μM, ενώ τα κλάσματα φλαβονοειδών του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Vicia faba* στις συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 μg/ml. Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα τα οποία διαλύθηκαν σε DMSO, το οποίο επηρεάζει την μέθοδο.

## Υπολογισμοί

Κάθε δείγμα εξεταζόταν εις τριπλούν, ενώ η συνολική διαδικασία εις διπλούν. Για κάθε εξεταζόμενη ουσία υπολογιζόταν το ποσοστό μείωσης της απορρόφησης με βάση τον τύπο.

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{A_0 - A_d}{A_0} \times 100$$

Όπου: A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του control στα 517nm

A<sub>d</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

Τα ποσοστά μείωσης της απορρόφησης αντικατοπτρίζουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης της εξεταζόμενης ουσίας με την σταθερή ρίζα του DPPH<sup>·</sup>. Με βάση τα ποσοστά υπολογιζόταν κάθε φορά η τιμή του IC<sub>50</sub>, που αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας στην οποία παρατηρείται το 50% της μείωσης της απορρόφησης στα 517nm. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο πιο ισχυρή είναι η ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα του DPPH<sup>·</sup>.

### **Στατιστική ανάλυση**

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των αποπρόφησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της δέσμευσης της ρίζας από τις εξεταζόμενες ουσίες και συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για  $p < 0,05$ .

### **2.2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών στο DNA (Plasmid relaxation assay)**

#### ***Χημικά αντιδραστήρια***

- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)
- NaCl (Panreac-Ισπανία)
- KCl (Merck-Γερμανία)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck-Γερμανία)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck-Γερμανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Tris (Merck-Γερμανία)
- Boric Acid (Sigma-Γερμανία)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-H.Π.Α)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck-Γερμανία)

## Αρχή της μεθόδου

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα των μορίων να παρεμποδίζουν την τοξική δράση ελευθέρων ριζών πάνω στο DNA. Ως μοντέλο για παρατήρηση της τοξικής δράσης των ελευθέρων ριζών καθώς και της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων ουσιών πάνω στο DNA, χρησιμοποιείται πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι συνήθως μικρά, κυκλικά, υπερελικωμένα, δίκλιωνα μόρια DNA. Βρίσκονται σε εξωχρωμοσωματική κατάσταση στα περισσότερα είδη βακτηρίων και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Πολλά πλασμίδια περιέχουν γονίδια τα οποία προσδίδουν στα κύτταρα- ξενιστές ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά. Από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του πλασμιδιακού DNA είναι ότι απομονώνεται εύκολα και όταν τρέχει σε gel (αγαρόζης) ηλεκτροφόρησης, έχει την ιδιότητα να εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις.

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

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης με την πιο μικρή σε μέγεθος διαμόρφωση να διαπερνά πιο γρήγορα τους πόρους της αγαρόζης. Το υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA λόγω της συμπαγούς διαμόρφωσής του διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης πιο γρήγορα και τρέχει πρώτο. Δεύτερο τρέχει το γραμμικό και τρίτο το ανοιχτό κυκλικό.



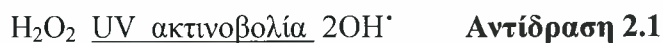
**Εικόνα 14:** Σχηματική αναπαράσταση της μετάβασης του πλασμιδιακού DNA από την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην ανοιχτή κυκλική (open circular) και στην γραμμική (linear) διαμόρφωση από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

### 2.2.2.α) Επαγόμενη από ρίζες $\text{OH}^\bullet$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

#### Αρχή της μεθόδου

Η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) δεν είναι πολύ δραστική, αλλά παρουσία UV ακτινοβολίας έχει την δυνατότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών  $\text{OH}^\bullet$  οι οποίες είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου (Αντίδραση 1).



Οι ρίζες υδροξυλίου  $\text{OH}^\bullet$  προσβάλλουν τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Μια από τις επιδράσεις των ριζών αυτών στο DNA είναι η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.



## Πειραματική διαδικασία

Προετοιμάζουμε gel αγαρόζης 0,8% σε TBE 1x (Tris, Boric acid, EDTA 0,5M). Στη συνέχεια προετοιμάζουμε την αντίδρασης (10μl) η οποία περιέχει 10 mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=8.0), DNA Bluescript plasmid 1 μg, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 mM, και την εξεταζόμενη ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία χρησιμοποιείται:

- 1- Ένα αρνητικό control το οποίο περιείχε 1μg πλασμίδιο
- 2- Ένα θετικό control το οποίο περιείχε 1 μg πλασμίδιο, 40mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- UV
- 3- Ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο διαλύματος 10μl και η προσθήκη των υλικών έγινε με τη σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

	εξεταζόμενη						
	Tris-HCl	EDTA	H <sub>2</sub> O	ουσία	DNA plasmid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	UV
Control	2μl		6μl	-	2μl	-	(-)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +UV	2μl		4μl	-	2μl	2μl	(+)
Ουσία	2μl		1μl	3μl	2μl	2μl	(+)
Ουσία (μόνη)	2μl		3μl	3μl	2μl	-	(-)

Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά του πίνακα. Τα δείγματα αναδεύονται (spin-vortex-spin) και τοποθετούνται κάτω από λάμπα 300W UV σε απόσταση 52cm για 3 λεπτά ακριβώς. Προστίθεται 3μl loading buffer (σε 10 ml loading buffer περιέχονται: 25mg Bromophenol Blue, και 4gr sucrose ή 30% glucose) το οποίο σταματά και την αντίδραση. Ύστερα γίνεται ανάδευση (spin-vortex-spin) και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 0,8% στα 70V για 1 ώρα. Στη συνέχεια, γίνεται χρώση του gel με βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 λεπτά., μετά γίνεται πλύση του gel 250ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O για 30 λεπτά. Τέλος φωτογραφίζεται το gel ηλεκτροφόρησης κάτω από UV.

Τα κλάσματα εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 100, 200, 400, 800, 1600μg/ml. Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα δεν δοκιμάστηκαν με την μέθοδο αυτή γιατί ο διαλύτης στο οποίο ήταν διαλυμένα (DMSO) επηρέαζε τα αποτελέσματα.

## **Υπολογισμοί**

Κάθε δείγμα εξεταζόταν εις τριπλούν. Για κάθε εξεταζόμενη ουσία υπολογιζόταν η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών  $\text{OH}^\bullet$ , που παράχθηκαν από τη έκθεση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε ακτινοβολία UV με βάση τον τύπο:

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

Όπου:  $S_{\text{control}}$  : το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control

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

$S$ : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  και UV ακτινοβολία.

## **Στατιστική ανάλυση**

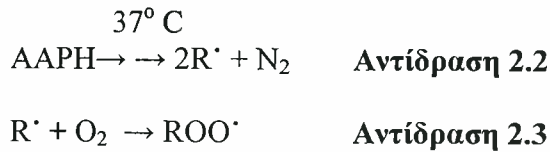
Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της οξείδωσης που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για  $p < 0,05$ .

### **2.2.2.β) Επαγόμενη από ρίζες $\text{ROO}^\bullet$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Οι ρίζες  $\text{ROO}^\bullet$  που παράγονται και μέσα στον οργανισμό, εκτός από την ιδιότητά τους να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξείδωση, έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Ως πηγή παραγωγής ριζών  $\text{ROO}^\bullet$  χρησιμοποιείται το AAPH (2,2' -Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) το οποίο σε θερμοκρασία 37° C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών  $\text{ROO}^\bullet$  (Αντιδράσεις 2,3).



### Πειραματική διαδικασία

Προετοιμάζουμε gel αγαρόζης 0,8% σε TBE 1x (Tris , Boric acid, EDTA 0,5M). Στη συνέχεια προετοιμάζουμε την αντίδραση (10μl) η οποία περιέχει PBS, DNA Bluescript plasmid 1 μg, AAPH 2,5mM και την εξεταζόμενη ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία χρησιμοποιείται:

- 1- Ένα αρνητικό control το οποίο περιείχε 1μg πλασμίδιο
- 2- Ένα θετικό control το οποίο περιείχε 1 μg πλασμίδιο, 2,5mM AAPH
- 3- Ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο διαλύματος 10μl και η προσθήκη των υλικών έγινε με τη σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

	PBS	ουσία με αντιοξειδωτική δράση	DNA plasmid	AAPH
Control	8μl	-	2μl	-
AAPH 2.5mM	4μl	-	2μl	4μl
Ουσία	1μl	3μl	2μl	4μl
Ουσία (μόνη)	5μl	3μl	2μl	-

Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά του πίνακα. Αφού ετοιμαστούν, αναδεύονται (spin-vortex-spin) και επωάζονται στους 37° C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται 3μl loading buffer το οποίο σταματά και την αντίδραση. Ύστερα γίνεται ανάδευση (spin-vortex-spin) και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης 0,8% στα 70V για 1 ώρα. Στη συνέχεια, γίνεται χρώση του gel με βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 λεπτά., μετά γίνεται πλύση του gel 250ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O για 30 λεπτά. Τέλος φωτογραφίζεται το gel ηλεκτροφόρησης κάτω από UV.

Τα ανάλογα νουκλεοσιδίων εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις: 5, 10, 20, 50, 100μΜ, και τα κλάσματα καθαρών μορίων στις συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 20, 50 μg/ml. Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα τα οποία διαλύθηκαν σε DMSO, μετά την δημιουργία πρότυπης καμπύλης φάνηκε ότι σε συγκέντρωση μέχρι και < 9% δεν επηρεάζουν την μέθοδο.

### **Υπολογισμοί**

Κάθε δείγμα εξεταζόταν εις τριπλούν. Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO<sup>•</sup>, που παράγονται από το AAPH υπολογίζονται με βάση τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S0 - S)/(S0 - S_{\text{control}})] \times 100.$$

Όπου: Scontrol : το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control

S0: το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control

S: το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 2,5mM AAPH.

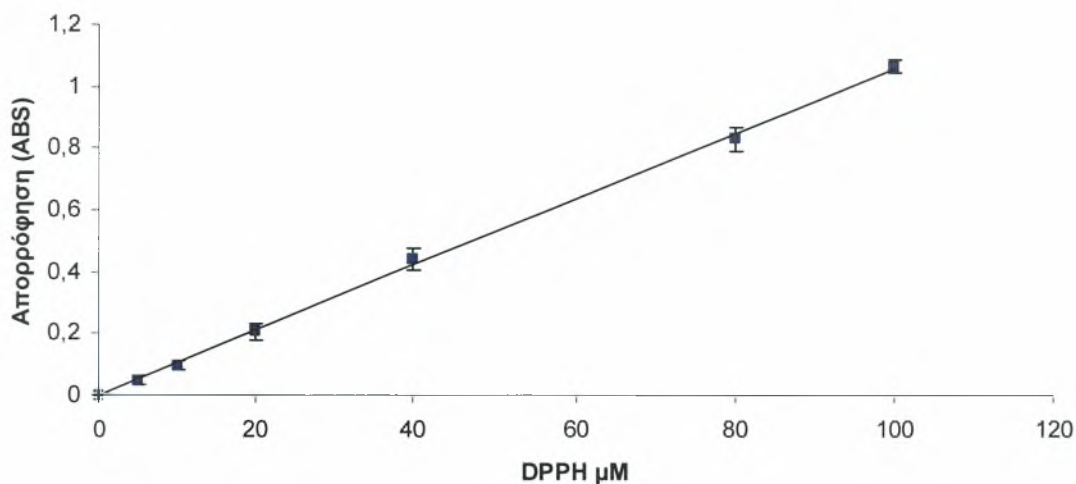
### **Στατιστική ανάλυση**

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της οξείδωσης που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για  $p < 0,05$ .

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Καμπύλη DPPH

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης DPPH κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις DPPH (5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu$ M) φωτομετρήθηκαν στα 517nm (Γράφημα 1 ). Επιλέχθηκαν τα 100 $\mu$ M γιατί η συγκέντρωση αυτή προκαλούσε μια ικανοποιητική αύξηση στην απορρόφηση με αποτέλεσμα να φαίνεται καθαρά η μείωση της απορρόφησης του DPPH παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα.



Γράφημα 1: Καμπύλη DPPH

#### 3.1.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φθοριωμένων πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων της N<sup>4</sup> – βενζούλο κυτοσίνης και της N<sup>6</sup> – βενζούλο αδερίνης της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη σταθερή χημική ρίζα DPPH

Από τα 13 νουκλεοσιδικά ανάλογα που μελετήθηκαν φάνηκε πως κανένα από αυτά δεν είχε την ικανότητα να εξουδετερώσει τη ρίζα του DPPH.

#### 3.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη σταθερή χημική ρίζα DPPH

Τα 5 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba* εμφάνισαν ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τη ρίζα του DPPH (Πίνακας 4). Οι τιμές

IC<sub>50</sub> για τα μόρια Vfm 32-34, vfm 76-81, vfm 92-97, vfm 135-137 και vfm 155-160 ήταν 73, 50, 100, 195 και 36μg/ml αντίστοιχα (Πίνακας 5 – Γράφημα 2). Με βάση τις τιμές του IC<sub>50</sub> το πιο δραστικό κλάσμα ήταν το vfm 155-160.

**Πίνακας 4.** Ποσοστά δέσμευσης της ρίζας DPPH των κλάσμάτων καθαρών μορίων από το *Vicia faba*

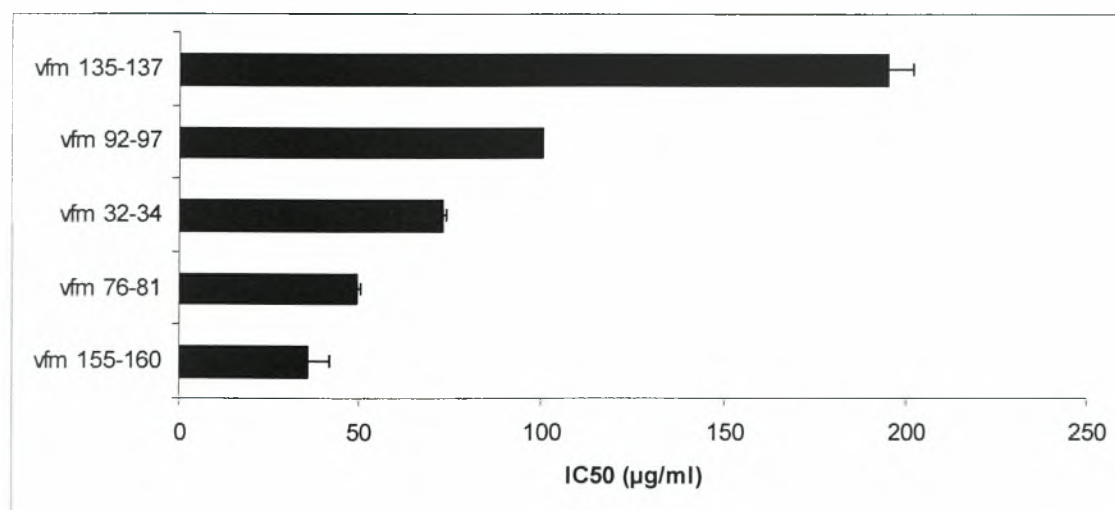
καθαρά μόρια (μg/ml)	Αναστολή %				
	Vfm 32-34	Vfm 76-81	Vfm 92-97	Vfm 135-137	Vfm 155-160
5	NA	6	1	NA	7
10	2	11*	4	NA	15
20	8	21*	9	NA	31*
50	44*	52*	23*	8	65*
100	56*	80*	48*	22*	87
200	95*		84*	66*	
400	100*				

NA: no activity, >10% δέσμευση της ρίζας

\* Στατιστικά αμμαντικό για  $p < 0,05$ .

**Πίνακας 5.** Τιμές των IC<sub>50</sub> των κλασμάτων καθαρών μορίων

καθαρά μόρια	IC <sub>50</sub>
vfm 32-34	73±1 μg/ml
vfm 76-81	50±0,7 μg/ml
vfm 92-97	100±0,07 μg/ml
vfm 135-137	195±7 μg/ml
vfm 155-160	36±5,7 μg/ml



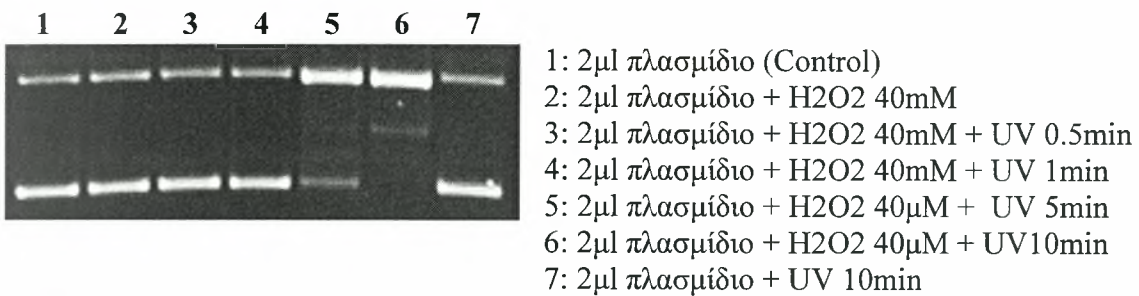
**Γράφημα 2:** Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από τα μόρια



### 3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής της δράσης ριζών OH<sup>·</sup> στο DNA.

#### 3.2.1 Καμπύλη ριζών OH<sup>·</sup> στο DNA

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης ριζών OH<sup>·</sup> κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Το πλασμιδιακό DNA εκτέθηκε παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40mM σε ακτινοβολία UV για 0.5, 1, 5, 10 λεπτά. Επιλέχθηκαν τα 3 λεπτά έκθεσης στα 52cm απόστασης από την λάμπα γιατί σε αυτόν τον χρόνο το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει επαρκώς στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση χωρίς να καταστρέφεται (Εικόνα 15). Η ακτινοβολία UV και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν επηρέαζαν μόνα τους την υπερελιωμένη διαμόρφωση του πλασμιδίου.



Εικόνα 15: Καμπύλη ριζών OH<sup>·</sup> στο DNA

**3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* μέσω της αναστολής της δράσης ριζών OH<sup>•</sup> στο DNA.**

Όλα τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση στην δράση των ριζών OH<sup>•</sup> (Πίνακας 6). Οι τιμές IC<sub>50</sub> για τα μόρια Vfm 32-34, vfm 76-81, vfm 92-97, vfm 135-137 και vfm 155-160 ήταν 1080, 420, 450, 293 και 457μg/ml αντίστοιχα (Πίνακας 7). Με βάση τις τιμές του IC<sub>50</sub> το πιο δραστικό κλάσμα ήταν το vfm 135-137.

**Πίνακας 6:** Απεικονίζεται η % αναστολή της δράσης ριζών OH<sup>•</sup> στο DNA από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* και οι τιμές των IC<sub>50</sub> των κλασμάτων

Καθαρά μόρια μg/ml	% Αναστολή					IC <sub>50</sub> μg/ml
	100	200	400	800	1600	
Vfm 32-34	17±2*	27±2*	42±4*	46±2*	58±3*	1080
Vfm 76-81	14±1*	25±1*	49±2*	58±4*	66±4*	420
Vfm 92-97	19±1*	21±1*	48±1*	64±5*	71±5*	450
Vfm 135-137	24±2*	38±1*	59±4*	63±1*	63±1*	293
Vfm 155-160	15±3	22±3	43±4*	55±2*	66±3*	457

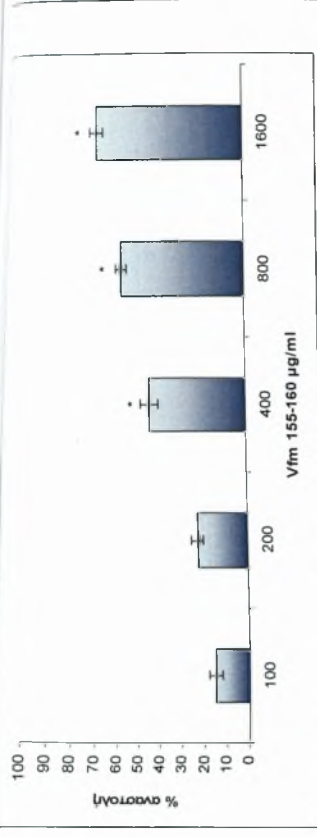
Οι τιμές είναι μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση)

\*Στατιστικά σημαντική αναστολή  $p > 0.05$

**Πίνακας 7:** Εικόνες και γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή της δράσης των ριζών υδροξυλίου (OH<sup>-</sup>) από τα κλάσματα καθαρών μορίων του *Vicia Faba* (συγκεντρώσεις :100, 200, 400, 800 και 1600 µg/ml).

	1	2	3	4	5	6	7	8												
Καθαρά μόρια Vfm 32-34																				
	<table border="1"> <caption>Vfm 32-34 µg/ml</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µg/ml)</th> <th>% αναστολή</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>~35</td> </tr> <tr> <td>400</td> <td>~45</td> </tr> <tr> <td>800</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td>1600</td> <td>~75</td> </tr> </tbody> </table>								Concentration (µg/ml)	% αναστολή	100	~15	200	~35	400	~45	800	~65	1600	~75
Concentration (µg/ml)	% αναστολή																			
100	~15																			
200	~35																			
400	~45																			
800	~65																			
1600	~75																			
Vfm 76-81																				
	<table border="1"> <caption>Vfm 76-81 µg/ml</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µg/ml)</th> <th>% αναστολή</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>~25</td> </tr> <tr> <td>400</td> <td>~45</td> </tr> <tr> <td>800</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td>1600</td> <td>~75</td> </tr> </tbody> </table>								Concentration (µg/ml)	% αναστολή	100	~15	200	~25	400	~45	800	~65	1600	~75
Concentration (µg/ml)	% αναστολή																			
100	~15																			
200	~25																			
400	~45																			
800	~65																			
1600	~75																			
Vfm 92-97																				
	<table border="1"> <caption>Vfm 92-97 µg/ml</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µg/ml)</th> <th>% αναστολή</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>~25</td> </tr> <tr> <td>400</td> <td>~45</td> </tr> <tr> <td>800</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td>1600</td> <td>~75</td> </tr> </tbody> </table>								Concentration (µg/ml)	% αναστολή	100	~15	200	~25	400	~45	800	~65	1600	~75
Concentration (µg/ml)	% αναστολή																			
100	~15																			
200	~25																			
400	~45																			
800	~65																			
1600	~75																			
Vfm 135-137																				
	<table border="1"> <caption>Vfm 135-137 µg/ml</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µg/ml)</th> <th>% αναστολή</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>~35</td> </tr> <tr> <td>400</td> <td>~55</td> </tr> <tr> <td>800</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td>1600</td> <td>~75</td> </tr> </tbody> </table>								Concentration (µg/ml)	% αναστολή	100	~15	200	~35	400	~55	800	~65	1600	~75
Concentration (µg/ml)	% αναστολή																			
100	~15																			
200	~35																			
400	~55																			
800	~65																			
1600	~75																			

Vfm 155-160

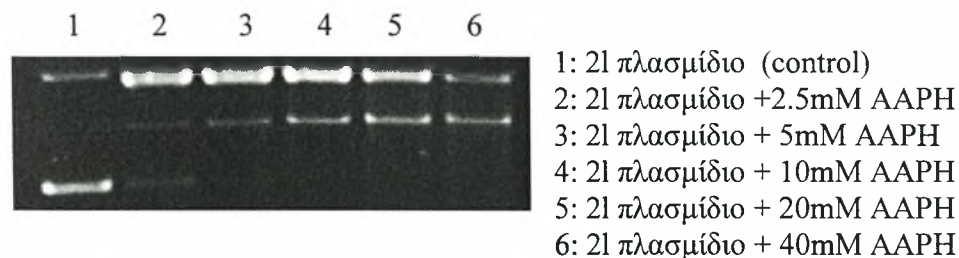


Μπάντα 1: αρνητικό control, Μπάντες 2: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV, Μπάντες 3-7: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV μαζί με 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml και 1600 µg/ml κλάσμα καθαρού μορίου. Μπάντα 8: 1600 µg/ml κλάσμα καθαρών μορίων.

### 3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναστολής της δράσης ριζών περοξυλίου (ROO<sup>·</sup>) στο DNA

#### 3.3.1 Καμπύλη δράσης ριζών ROO<sup>·</sup> στο DNA

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης ριζών ROO<sup>·</sup> κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις AAPH (2.5, 5, 10, 20, 40, mM) επώαστηκαν με το πλασμιδιακό DNA για 45 min στους 37°C. Στη συγκέντρωση AAPH 2.5 mM το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει επαρκώς στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση χωρίς να καταστρέφεται (Εικόνα 16).

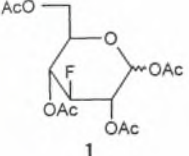
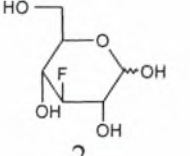
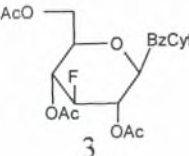
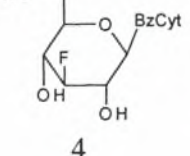
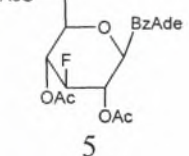
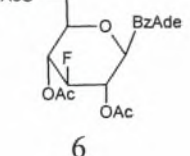
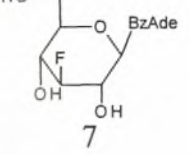
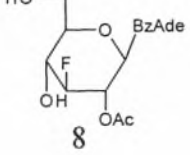
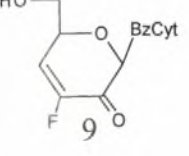
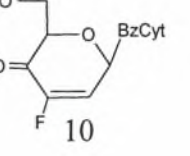
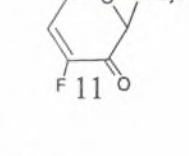
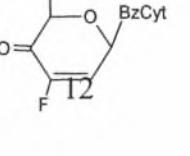
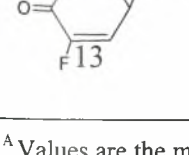


Εικόνα 16: Καμπύλη δράσης ριζών ROO<sup>·</sup> στο DNA

#### 3.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φθοριωμένων πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων της N<sup>4</sup> – βενζούλο κυτοσίνης και της N<sup>6</sup> – βενζούλο αδενίνης μέσω της αναστολής της δράσης ριζών ROO<sup>·</sup> στο DNA.

Μελετήθηκε η ικανότητα 13 νουκλεοσιδικών αναλόγων να προστατεύουν το DNA από την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες περοξυλίου (ROO<sup>·</sup>) πρόκληση θραυσμάτων. Από τα 13 μόρια που μελετήθηκαν 6 από αυτά παρουσίασαν ανασταλτική δράση. Πιο συγκεκριμένα τα μόρια που παρουσίασαν κάποια ανασταλτική δράση ήταν τα 3, 4, 8, 9, 10, 11. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται ότι οι ενώσεις 3, 4, 5, 6, 7 και 8 εμφάνισαν μηδενική ή μικρή ανασταλτική δράση και μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις (50 και 100μM). Αντίθετα, τα νουκλεοσιδικά ανάλογα 9, 10 και 11 που φέρουν το α,β-κετοακόρεστο σύστημα εμφανίστηκαν να είναι αποτελεσματικά ενάντια στη δράση των ROO<sup>·</sup> ριζών. Το προϊόν 10 εμφανίστηκε να είναι το πιο ισχυρό παρουσιάζοντας αναστολή 18%, 19%, 25% και 26% στις συγκεντρώσεις 10, 20, 50 και 100μM, αντίστοιχα. Τέλος, οι ενώσεις 12 και 13 παρά το ότι φέρουν το α,β-κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση (Πίνακας 8+9).

**Πίνακας 8:** Χημική δομή και % αναστολή της δράσης ριζών ROO<sup>•</sup> στο DNA από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα.

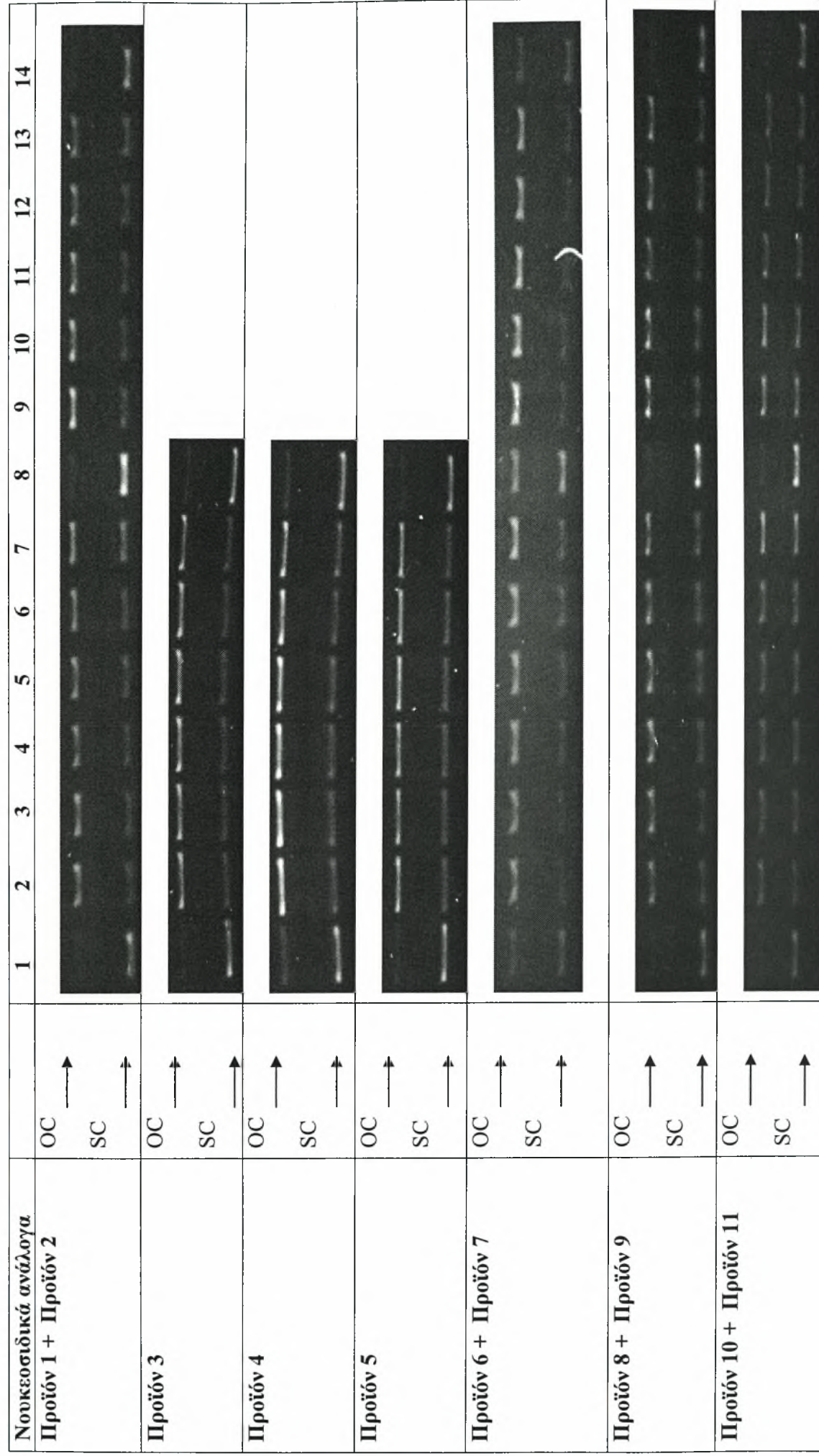
Products	% Inhibition					Products	% Inhibition					
	μM	5	10	20	50		100	μM	5	10	20	50
	NI	NI	NI	NI	NI	NI		NI	NI	NI	NI	NI
	NI	NI	NI	11±1 <sup>A*</sup>	24±1*	NI		NI <sup>B</sup>	NI	10±5	11±1*	27±4*
	NI	NI	NI	NI	NI	NI		NI	NI	NI	NI	NI
	NI	NI	7±2	7±3	11±3	NI		NI	NI	NI	16±4	20±2*
	NI	NI	NI	16±5	27±3*	NI		9±3	18±1*	19±1*	25±3*	26±2*
	NI	NI	8±3	20±2*	37±1*	NI		NI	NI	NI	NI	NI
	NI	NI	NI	NI	NI	NI						



<sup>A</sup> Values are the means ± SE of the percent inhibition from three independent experiments.

<sup>B</sup> NI: no significant inhibition (less than 7 %). \*p < 0.05 when compared with control (plasmid DNA plus AAPH). Ac: Acetyl, Tr: Triphenylmethyl.



**Πίνακας 9:** Εικόνες που απεικονίζουν την % αναστολή της δράσης των ριζών περοξυλίου (ROO<sup>·</sup>) από τα νουκεοσιδικά ανάλογα (συγκεντρώσεις : 5, 10, 20, 50 και 100mM).



Προϊόν 12	OC ↑ SC ↑	
Προϊόν 13	OC ↑ SC ↑	

Μπάντα 1: αρνητικό control, Μπάντες 2: 2.5mM ΑΑΡΗ, Μπάντες 3-8: ΑΑΡΗ μαζί με 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml και 100 µg/ml κλάσμα καθαρού μορίου. Μπάντα8:1600 µg/ml κλάσμα καθαρών μορίων.

**3.3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* μέσω της αναστολής της δράσης ριζών ROO<sup>·</sup> στο DNA.**

Όλα τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση απέναντι στη δράση των ριζών ROO<sup>·</sup> στο DNA. Οι τιμές IC<sub>50</sub> για τα μόρια Vfm 32-34, vfm 76-81, vfm 92-97, vfm 135-137 και vfm 155-160 ήταν 5.5, 2.7, 6.2, 6,9 και 1,9μg/ml, αντίστοιχα (πίνακας10). Με βάση τις τιμές του IC<sub>50</sub> το πιο δραστικό κλάσμα ήταν το vfm 155-160.

**Πίνακας 10:** Απεικονίζεται η % αναστολή της δράσης ριζών ROO<sup>·</sup> στο DNA από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* και οι τιμές των IC<sub>50</sub> των κλασμάτων

Καθαρά μόρια μg/ml	% Αναστολή						IC <sub>50</sub> μg/ml
	1	2	5	10	20	50	
Vfm 32-34	8±2	28±2*	45±4*	80±2*	86±3*	89±6*	5.5
Vfm 76-81	19±2*	40±4*	71±4*	92±5*	96±3*	99±1*	2.7
Vfm 92-97	9±3	16±4	39±3*	84±4*	92±2*	97±1*	6.2
Vfm 135-137	4±1	13±2	29±2*	71±3*	91±4*	98±2*	6.9
Vfm 155-160	24±1*	63±5*	82±4*	97±1*	97±1*	100±1*	1.9

Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση)

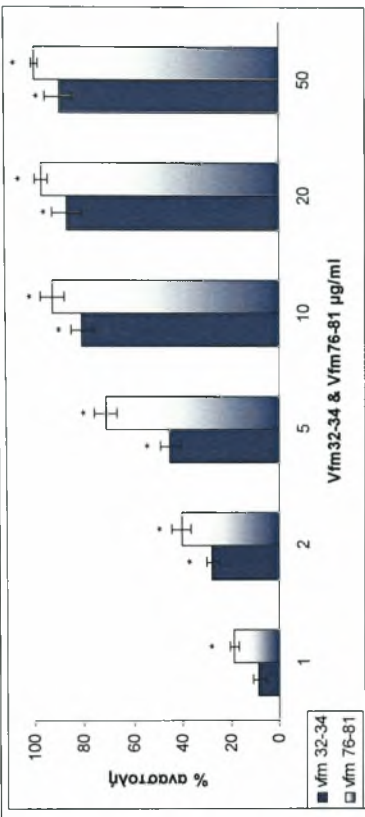
\*Στατιστικά σημαντική αναστολή ρ>0.05.

**Πίνακας 11:** Εικόνες και γραφήματα για την % αναστολή της δράσης ριζών ROO' στο DNA από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* (συγκεντρώσεις :1, 2, 5, 10, 20 και 50 µg/ml)

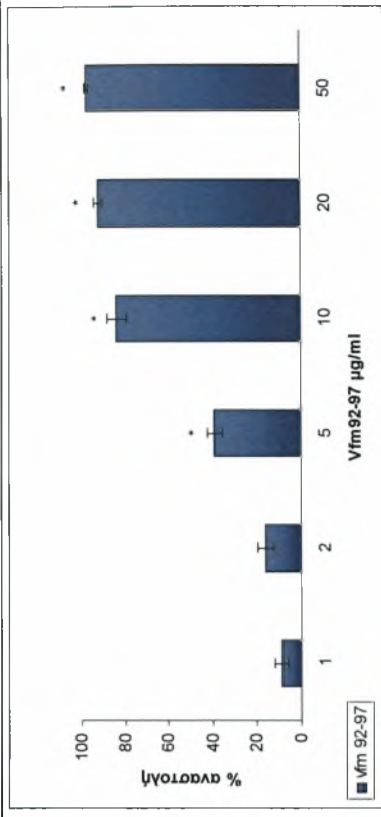
Καθαρὰ μόρια

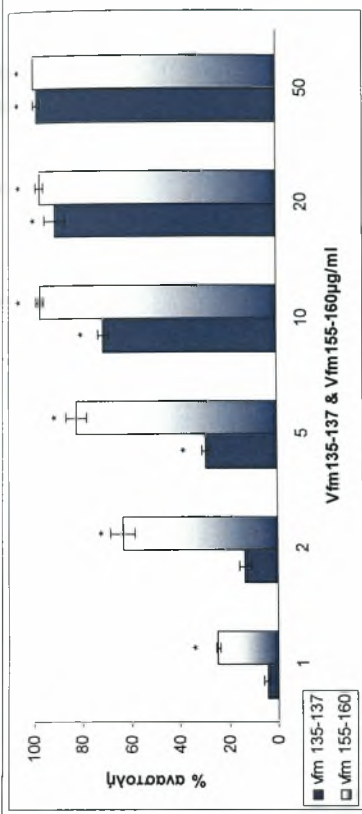
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Vfm 32-34 & Vfm76-81



Vfm 92-97







#### 4. Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας σειράς φθοριωμένων πυρανοουκλεοσιδικών αναλόγων της  $N^4$  – βενζοϋλο κυτοσίνης και της  $N^6$  – βενζοϋλο αδενίνης καθώς και κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba*.

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι γνωστοί αντιογκογονικοί, αντιϊικοί και χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (W. Zhou, et al 2004, C. Perigaud, et al 1992, R.K, Robins, G.D. Kini, 1990, MacCoss, M. Robins, M.J.1990). Μια σημαντική κατηγορία των πυρανοουκλεοσιδίων αποτελούν τα φθορονουκλεοσίδια. Έχει δειχθεί ότι η ισχυρή αντική δράση των συγκεκριμένων νουκλεοσιδικών αναλόγων καθώς επίσης και οι χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητές τους οφείλονται στο μικρό μέγεθος και στην ιδιαίτερα ηλεκτραρνητική φύση του ατόμου του φθορίου. Άλλη μία κατηγορία πυρανοουκλεοσιδικών αναλόγων αποτελούν τα ακόρεστα κετονουκλεοσίδια. Τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα είναι γνωστά για την αντινεοπλαστική δράση και τα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματά τους (J. Paterson, et al 1998, M.Alaoui, et al 1986, M. Alaoui, et al 1987, M.J.Egron, 2005, T. Halmos, D. Komiotis, K. Antonakis, 1986).

Βρέθηκε ότι τα νέα νουκλεοσιδικά ανάλογα (φθοριωμένα πυρανοουκλεοσίδια της  $N^4$  – βενζοϋλο κυτοσίνης και της  $N^6$  – βενζοϋλο αδενίνης) είναι αποτελεσματικοί αντινεοπλασματικοί παράγοντες και παρουσίασαν σημαντική αντιϊκή δράση έναντι των ρετροϊών. Έτσι θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική δράση αυτών των νέων τροποποιημένων νουκλεοσιδικών αναλόγων.

Η αντιοξειδωτική δράση των τροποποιημένων φθοριωμένων πυρανοουκλεοσιδικών αναλόγων της  $N^4$  – βενζοϋλο κυτοσίνης και της  $N^6$  – βενζοϋλο αδενίνης μελετάται για πρώτη φορά. Δεκατρία νουκλεοσιδικά ανάλογα μελετήθηκαν με δύο *in vitro* μεθόδους. Αρχικά εκτιμήθηκε η δράση των νουκλεοσιδικών αναλόγων ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν και να εξουδετερώνουν τη σταθερή ρίζα του DPPH. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως κανένα από αυτά δεν είχε την ικανότητα να την εξουδετερώσει. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα προϊόντα αυτά είναι μεγάλα μόρια και δεν μπόρεσαν να πλησιάσουν τη ρίζα ώστε να την αδρανοποιήσουν.

Στην συνέχεια τα νουκλεοσιδικά ανάλογα μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την δράση ριζών περοξυλίου στο DNA. Κάποια από τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα παρουσίασαν σημαντική δράση έναντι της δράσης των ριζών περοξυλίου ( $ROO^{\cdot}$ ) στο DNA. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνεται ότι ο ρόλος της νουκλεοβάσης στη χημική δομή των εξεταζόμενων μορίων είναι



καθοριστικός για την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης, μιας και οι ενώσεις 1 και 2 δεν παρουσίασαν καμία ανασταλτική δράση. Από την άλλη, παρατηρήθηκε ότι τα νουκλεοσιδικά ανάλογα που δεν φέρουν το α,β-κετοακόρεστο σύστημα στη δομή τους, οι ενώσεις 3, 4, 5, 6, 7 και 8 εμφάνισαν μηδενική ή μικρή ανασταλτική δράση και μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις (50 και 100μM). Αντίθετα, τα νουκλεοσιδικά ανάλογα που φέρουν το α,β-κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, ενώσεις 9, 10 και 11 εμφανίστηκαν να είναι αποτελεσματικά ενάντια στη δράση των ROO<sup>•</sup> ριζών. Φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού σε α,β θέση ως προς την κέτο ομάδα προκαλεί σταθεροποίηση της ρίζας του νουκλεοσιδίου που εξουδετερώνει τη ρίζα και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική της δράση. Τέλος, οι ενώσεις 12 και 13 παρά το γεγονός ότι φέρουν το α,β-κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, δεν παρουσίασαν καμία ανασταλτική δράση.

Τα όσπρια, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και αποτελούν καλή πηγή αμύλου, τροφικών ιών, ιχνοστοιχεία όπως Ca, Fe, K, Mg, και Zn, και έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Εκτός από την θρεπτική τους αξία, τα όσπρια περιέχουν και σημαντικές ποσότητες πολυφαινόλων και φλαβονοειδών (π.χ κερκετίνη, ανθοκιανίνες και ταννίνες), επίσης περιέχουν ισοφλαβόνες (π.χ γενιστεΐνη) και φαινολικά οξέα (Z. Madar, A. Stark, 2002). Το φυτό *Vicia faba* που ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae*, του γένους *Vicia* καλλιεργείται για τους καρπούς του (κουκιά) και θεωρείται σημαντική πηγή πολυφαινόλων (K. Ethelton et al 2002).

Οι πολυφαινόλες είναι σημαντικοί αδρανοποιητές οξειδωτικών μορίων και ελευθέρων ριζών, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA και την δημιουργία όγκων (M. Hanausek, et al 2003). Έτσι τροφές που τις περιέχουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσω της διατροφής ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες (C.S. Yang et al., 2001). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πολυφαινόλες μπορούν να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σχετίζονται με τα τρία στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (έναρξης, προαγωγής και προόδου) (S. De Flora et al., 2005).

Στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων Ελληνικών ψυχανθών, κλάσματα πολυφαινολικών ενώσεων απομονώθηκαν από ένα εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση κάποιων από αυτά. Σε προηγούμενη μελέτη εκχυλίσματα που προέρχονταν από ψυχανθή όπως το *Vicia faba* παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση (Spanou et al 2007). Με σκοπό την μελέτη των δραστικών ουσιών των εκχυλισμάτων, απομονώθηκαν 10

κλάσματα καθαρών μορίων από το μεθανολικό εκχύλισμα αυτού του φυτού. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση 5 από τα 10 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν.

Τα 5 κλάσματα καθαρών μορίων εξετάστηκαν με τρεις *in vitro* μεθόδους. Στην αρχή μελετήθηκε η δράση τους με τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH και στην συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την επαγόμενη από τις ελεύθερες ρίζες OH<sup>•</sup> και ROO<sup>•</sup> πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

Όλα τα κλάσματα καθαρών μορίων εμφάνισαν ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τη ρίζα του DPPH (Πίνακας 4). Οι τιμές IC<sub>50</sub> για τα μόρια Vfm 32-34, Vfm 76-81, Vfm 92-97, Vfm 135-137 και Vfm 155-160 ήταν 73, 50, 100, 195 και 36μg/ml αντίστοιχα (Πίνακας 5 - Γράφημα 2). Τα διαφορετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται στην δράση των 5 κλασμάτων μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό συνδυασμό των δραστικών μορίων που βρίσκονται μέσα σε αυτά ή στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα δραστικά μόρια. Επειδή όλα τα κλάσματα παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα άξιζε να μελετηθεί η πιθανή επίδρασή τους στην επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ελεύθερες ρίζες.

Όλα τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Vicia faba* εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση απέναντι στην δράση των ριζών OH<sup>•</sup> και ROO<sup>•</sup> (Πίνακες 6 και 7). Σύμφωνα με τις τιμές IC<sub>50</sub> τα κλάσματα αυτά παρουσίασαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση απέναντι στη δράση των ROO<sup>•</sup> ριζών στο DNA από ότι παρουσίασαν απέναντι στη δράση των OH<sup>•</sup> ριζών στο DNA, με IC<sub>50</sub> από 293 μέχρι 1080μg/ml και 1.9 μέχρι 6.9 αντίστοιχα. Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα κλάσματα οφείλονται στον διαφορετικό συνδυασμό των δραστικών μορίων που βρίσκονται μέσα σε αυτά ή στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσά τους. Από προηγούμενη μελέτη το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* παρουσίασε τιμές IC<sub>50</sub> 28 και >1600 μg/ml απέναντι στις ρίζες ROO<sup>•</sup> και OH<sup>•</sup> αντίστοιχα (Spanou et al 2007). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κλάσματα είναι πιο δραστικά από το αρχικό εκχύλισμα. Επομένως οι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται μέσα στο εκχύλισμα και απομονώθηκαν μέσα στα κλάσματα είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση του αρχικού εκχυλίσματος. Μέσα στο αρχικό εκχύλισμα υπάρχει μια ποικιλομορφία πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και άγνωστα συστατικά που μπορεί να αναστέλλουν την δράση των δραστικών τους μορίων. Έτσι προκύπτει ότι πιθανόν τα μόρια όταν βρίσκονται μόνα τους δρουν διαφορετικά από ότι όταν βρίσκονται στο

εκχύλισμα καθώς μπορεί να υπάρχουν ουσίες που να παρεμποδίζουν την δράση τους μέσα στα εκχυλίσματα.

Το γεγονός ότι τα 5 αυτά κλάσματα καθαρών μορίων παρουσίασαν διαφορετική δράση απέναντι στις ρίζες DPPH<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup> και ROO<sup>•</sup> οφείλεται στην διαφορετική φύση των ριζών. Η ρίζα ROO<sup>•</sup> παράγεται από την θερμική διάσπαση του AAPH και η ρίζα OH<sup>•</sup> από την φωτόλυση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με UV. Η ρίζα του DPPH είναι μια σταθερή ρίζα αζώτου κι έτσι αντιοξειδωτικά που μπορεί να δράσουν γρήγορα με τη ρίζα του ROO<sup>•</sup> ενώ μπορεί να δράσουν αργά ή και καθόλου με τη ρίζα του DPPH (R.L. Prior, 2005).

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι τα κλάσματα καθαρών μορίων προερχόμενα από το φυτό *Vicia faba* παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση απέναντι στην δράση ριζών στο DNA και κυρίως απέναντι στην δράση των ριζών ROO<sup>•</sup>. Τα καθαρά μόρια που βρίσκονται στα κλάσματα είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για την δράση του αρχικού εκχυλίσματος πύας του φυτού *Vicia faba* καθιστώντας το φυτό αυτό ως σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

## Βιβλιογραφία

- ❖ Scalbert, G. Williamson, (2000), Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *Journal of Nutrition*, **130**:2073-2085
- ❖ Carr, M. R. McCall, B. Frei, (2000), Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*,**20**:1716–1723
- ❖ A.P. Breen, J.A Murphy, (1995), Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radical Biology Medicine*, **18**: 1033-1077
- ❖ Arichi. H, Kimura. Y, Okuda. H. Baba, K. Kozawa, (1982), Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum Cospidatum* Sieb. et Zucc on lipid metabolism
- ❖ B.S. Kurlovich, S.I. Repeyev, (1995), The gene bank and breeding of grain legumes, *The N.I Vavilov Institute of Plant Industry*, **111**:438
- ❖ B. Halliwell, (2001), Free radicals and other reactive species in disease, *Encyclopedia of life sciences*
- ❖ B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, (1999), Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). *Oxford University Press*
- ❖ C. S. Yang, J. M. Landau, M.-T. Huang, H. L. Newmark, (2001), Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annual Reviews*, **21**:381-406
- ❖ C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr*, **79**: 727-747
- ❖ C. Mylonas, D. Kouretas, (1999), Lipid peroxidation and tissue damage, *In Vivo*,**13**: 295-309
- ❖ C. Perigaud, G. Gosselin, J.L. Imbach, Nucleosides Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 903-945
- ❖ C S. Yang, J M. Landau, M. Huang, H L. Newmark, (1997), Polyphenols As Inhibitors of Carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, **105**: 971-976
- ❖ D. M. Miller, G. R. Buettner, S. D. Aust, (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biological Medicine*, **8**: 95–108.

- ❖ G.D. Stoner, M. Morse, G. Kelloff, (1997), Perspective in cancer chemoprevention, *Environmental Health Perspectives*, **105**:945-954
- ❖ Chouroulinkov, K. Antonakis, (1977), Antitumor Effects of Keto-Nucleosides. Study of the Antitumor Activity of Y(3'-O-Acetyl-4',6'-Dideoxy-Beta-L-Glycero-Hex-3'-Eno-pyranosyl)Theophylline and 1(4'-Keto-2',3'-O-Isopropylidene-Alpha-L-"Rhammosyl" O Thymine Against L1210 Leukemia in Mice. *C R Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D* **285**: 1021-1024
- ❖ JB. Harborne, H. Baxter, (1993), *Phytochemical Dictionary*, London: Taylor and Francis.
- ❖ J D. Lambert, J. Hong, G. Yang, J. Liao, C S. Yang, (2005), Inhibition of carcinogenesis by polyphenols evidence from laboratory Investigations, *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**:284S-91S
- ❖ J. Lee, N. Koo, D.B. Min, (2003), Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Society*, **3**:21-33
- ❖ J. Paterson, C. Uriel, M.J. Egron, J. Herscovici, K. Antonakis, M. Alaoui, (1998), Antiproliferative and Apoptotic Activities of Ketonucleosides and Keto-C-Glycosides against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells with Intrinsic Drug Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 779-784
- ❖ K. Antonakis, (1975), Synthesis of Nucleoside Analogues. *Chimia* **29**, 59.
- ❖ K. Antonakis, M.J. Egron, (1973), Unsaturated Ketonucleosides. The Synthesis and Properties of 7-(3-OAcetyl-4,6-Dideoxy-β-L-Glycero-Hex-3 Enopyranosylulose)Theophylline. *Carbohydr. Res.* **27**: 468-470
- ❖ K. Antonakis, I. Chouroulinkov, (1974), Studies on the Inhibition of the Growth of KB Cells by 9- and 7-(Ketonucleosides), *Biochem. Pharmacol.* **23**: 2095-2100
- ❖ K. Antonakis, T. Halmos, J. Bach, I. Chouroulinkov, (1980), Antitumor Activity of Ketonucleosides. Unsaturated Ketohehexosyl Purines. *Eur. J. Med. Chem.* **15**:237-240
- ❖ M. Alaoui, C. Lasne, K. Antonakis, I. Chouroulinkov, (1986) Absence of Genotoxic Effects in Cells Exposed to Four Ketonucleoside Derivatives. *Mutagenesis*, **1**, 411-417
- ❖ M. Alaoui, M.J. Egron, M. Bessodes, K. Antonakis, I. Chouroulinkov, (1987),

- Relationship Between The Structure and Cytotoxic Activity of New Unsaturated Ketonucleosides Tested on Eight Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **22**: 305-310
- ❖ Mark. J. Messina, (1999), Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects, *Am J Clin Nutr*, **70**: 439-450
  - ❖ M. Hanausek, Z. Walaszek, T. J. Slaga, (2003), Detoxifying Cancer Causing Agents to Prevent Cancer, *Interactive cancer therapies*, **2**: 139-144
  - ❖ M. Meydani, J.G. Meisler, (1997), A closer look at vitamin E. Can this antioxidant prevent chronic diseases? *Postgrad Medecine*, **102**: 199-201, 206-207
  - ❖ M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T.D. Cronin, M. Mazur, J.Telser, (2007), Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**: 44-84
  - ❖ M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, (2006), Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, **160**: 1-40
  - ❖ M. Valko, H. Morris, M. T. D. Cronin, (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 1161-1208
  - ❖ M. MacCoss, M.J. Robins, Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs. In the chemistry of Antitumor Agents; *Wilman, D.E.V. Ed.; Chapman and Hall: New York*, 261-298
  - ❖ M.J. Egron, D. Komiotis, I. Dorange, J. Herscovici, K. Antonakis, (2005), New Short Route to Unsaturated Fluoroketonucleosides: Case of 5-Fluoro-1-(6-O-Acetyl-3,4-Di-deoxy-3-Fluoro-β-DGlycero-Hex-3-Eno-Pyranos-2-Ulosyl) Uracil. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **24**:243-246
  - ❖ R.K. Robins, G.D. Kini, Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents. In The Chemistry of Antitumor Agents, *Wilman, D.E.V. Ed.; Chapman and Hall: New York*, 299-321
  - ❖ R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, (2005), Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem*, **53**, 4290-4302.



- ❖ R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, (2005), Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4290-4302
- ❖ S.Chung Yang, Mao-Jung Lee, Laishun Chen, and Guang-yu Yang, (1997), Polyphenols As Inhibitors of Carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, **105**: 971-976
- ❖ S. Das, (1994), Vitamin E in the genesis and the prevention of cancer, *Acta Oncologica*, **33**: 615 – 619
- ❖ S. De Flora, L.R. Ferguson, (2005), Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents, *Mutation Research*, **591**:8-15
- ❖ S. Manta, G. Agelis, T. Botic, A. Cencic, D. Komiotis, (2008), Unsaturated Fluoro-Ketopyranosyl Nucleosides: Synthesis and Biological Evaluation of 3-Fluoro-4-Keto- $\beta$ -D-Glucopyranosyl Derivatives of N<sup>4</sup>-Benzoyl Cytosine and N<sup>6</sup>- Benzoyl Adenine. *Eur. J. Med. Chem.***43**: 420-428
- ❖ S. Manta, G. Agelis, T. Botic, A. Cencic, D. Komiotis, (2006), Fluoro-ketopyranosil nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto- $\beta$ -D-glucopyranosil derivatives of N<sup>4</sup>-benzoyl cytosine, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**: 980-987
- ❖ St . Leger, A.S. Cochrane, A.L. and Moore. F, (1979), Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine
- ❖ T. Halmos,D. Komiotis, K. Antonakis, (1986), Cancer Oriented Ketonucleosides: Synthesis of 7-[6-O-(5-Carboxypentyl)-3,4-Dideoxy-and 3,4- Dideoxy-6-O-(6-Hydroxyhexyl)- $\beta$ -D-Glycero-Hex-3-Enopyranosyl-2 ulose]Theophyllines and Their Coupling with Cancer-Specific Proteins.*Carbohydr. Res.* **156**: 256-263
- ❖ T. Halmos, A. Cardon, K. Antonakis, (1983), Interactions of Cytostatic Unsaturated Ketonucleosides with Sulfhydryl Containing Cell Constituents. *Chem. Biol. Interact*, **46**:11-29
- ❖ W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang (2003), Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*,**23**: 519-534
- ❖ W. Zhou, G. Gumina, Y. Chong, J. Wang, R F. Shinazi, C K. Chu, (2004), Synthesis, Structure-activity relationships, and drug resistance of  $\beta$ -D-3'-

Fluoro-2',3'-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents. *J. Med. Chem.***47**:  
3399-3408

- ❖ [www.youthfarm.com](http://www.youthfarm.com)
- ❖ [www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)
- ❖ [www.newline.gr](http://www.newline.gr)
- ❖ [www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html](http://www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html)
- ❖ Z. Madar, A. Stark, (2002), New legume sources as therapeutic agents, *British Journal of Nutrition*, **88**:287-292
- ❖ Z. Walaszek, M. Hanausek, T. J. Slaga, (2004), Mechanisms of Chemoprevention, *Chest*:125:128-133
- ❖ Z. Madar, A. Stark, (2002), New legume sources as therapeutic agents, *British Journal of Nutrition*, **88**:287-292
  
- ❖ X. Σουλελής, Φλαβονοειδή και συγγενείς ομάδες φυτικών χρωστικών-χημική τους δομή και θεραπευτικές ιδιότητες, (Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας, Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ ).
- ❖ X. Σουλελής, (1988), Γενική Φαρμακογνωσία Δρογοχημεία, εκδόσεις Τσολαγοπούλο.
- ❖ Μ.Β. Καραμούζης και Α.Γ. Παπαβασιλείου, (2005), Η θέση της χημειοπροφύλαξης στη σύγχρονη θεραπευτική του καρκίνου του παχέος εντέρου, *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, **23**:547-559
- ❖ Δ. Κουρέτας, (2003), Βιοχημική Τοξικολογία, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

