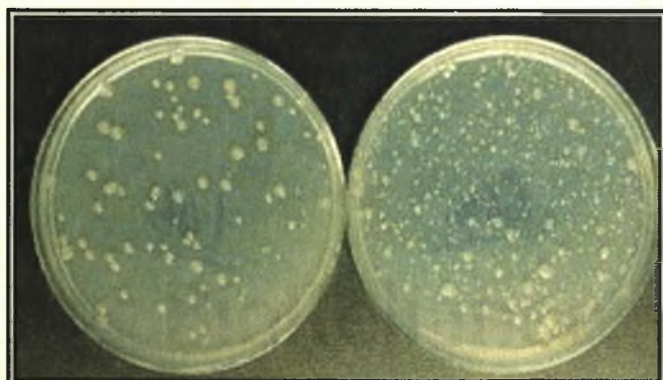




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αντιμεταλλαξιογόνου δράσης φλαβονοειδών του
φυτού *Lotus Edulis* με τη μέθοδο Ames test**



Επιμέλεια Εργασίας: Βάιου Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Δ. Κουρέτας

Λάρισα 2008



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

Αριθ. Εισ.: 6586/1

Ημερ. Εισ.: 22-04-2010

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2008

ΒΑΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087094



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης φλαβονοειδών του φυτού
Lotus Edulis με τη μέθοδο Ames test

Επιμέλεια Εργασίας: Βάιον Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Δ. Κουρέτας

Λάρισα 2008

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καθηγητής Δ. Κουρέτας (Επιβλέπων)
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επίκουρος Καθηγητής Δ. Κομιώτης
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Διδάσκων με το ΠΔ 407/80 Α. Κυπάρης
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Το πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας με τίτλο *‘Μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης φλαβονοειδών του φυτού Lotus Edulis με τη μέθοδο Ames test’*, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δ. Κουρέτα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κουρέτα Δ., Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις για την περαιτέρω πορεία μου. Ακόμη, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την πολύτιμη συμπαράσταση, ενθάρρυνση και αρωγή που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Χρύσα Σπανού για την καθοδήγηση, επίβλεψη και βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευγνώμων είμαι και στα μέλη της επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κομιώτη Δ. και τον διδάσκοντα με το ΠΔ 407/80 κ. Κυπάρη Α.

Περιεχόμενα

Συντομογραφίες.....	σελ. 10
Περίληψη	σελ. 12
1. Εισαγωγή	σελ. 13
1.1 Ψυχανθή	σελ. 13
1.2 Πολυφαινόλες	σελ. 15
1.2.1. Φαινολικά οξέα	σελ. 15
1.2.2. Φλαβονοειδή	σελ. 16
1.2.3. Λιγνάνια	σελ. 17
1.2.4. Στιλβένια	σελ. 18
1.2.5. Μεταβολισμός των πολυφαινολών	σελ. 18
1.3 Ελεύθερες ρίζες-Καρκινογένεση	σελ. 20
1.3.1. Ελεύθερες ρίζες	σελ. 20
1.3.2. Καρκινογένεση	σελ. 21
1.3.3. Συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με την πρόκληση καρκινογένεσης.....	σελ. 22
1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	σελ. 23
1.5 Πολυφαινόλες και χημειοπροστασία	σελ. 25
1.5.1. Κατηγορίες χημειοπροστατευτικών παραγόντων	σελ. 25
1.5.2. Αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών	σελ. 27
1.5.2.α.Παρέμβαση των πολυφαινολών στο στάδιο έναρξης της καρκινογενετικής διαδικασίας	σελ. 27
1.5.2.β.Παρέμβαση των πολυφαινολών στα στάδια προαγωγής και προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας	σελ. 29
1.5.2.γ.Αντικαρκινικές ιδιότητες των φυτοοιστρογόνων	σελ. 32
1.6 Λοιπές βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών	σελ. 32
1.6.1. Φλαβονοειδή	σελ. 32
1.6.2. Φυτοοιστρογόνα	σελ. 33
1.6.3. Φαινολικά οξέα	σελ. 33
1.6.4. Προανθοκυανιδίνες	σελ. 33
1.6.5. Κίνδυνοι που σχετίζονται με την υψηλή κατανάλωση πολυφαινολών	σελ. 34
1.7 Σκοπός	σελ. 35
1.8 <i>Lotus Edulis</i> και <i>Vicia faba</i>	σελ. 36
1.8.1. <i>Lotus Edulis</i>	σελ. 36
1.8.2. <i>Vicia faba</i>	σελ. 36
1.9 Μπλεομυκίνη (Bleomycin, BLM)	σελ. 37
2. Υλικά και μέθοδοι	σελ. 41
2.1 Υλικά	σελ. 41
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	σελ. 41
2.1.2. Στελέχη <i>Salmonella</i>	σελ. 41
2.1.3. Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων	σελ. 41
2.2. Μέθοδοι	σελ. 43
2.2.1. Δοκιμή του Ames (Ames test)	σελ. 43
2.2.1.α.Αρχή της μεθόδου	σελ. 43
2.2.1.β.Στελέχη <i>Salmonella</i>	σελ. 44
2.2.2. Πειραματική διαδικασία	σελ. 45
2.2.2.α.Προετοιμασία των τριβλίων GM Agar	σελ. 45

2.2.2.β. Ames antimutagenicity assay	σελ. 47
2.2.2.γ. Έλεγχος τοξικότητας	σελ. 49
2.2.2.δ. Υπολογισμός της % αναστολής/επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης	σελ. 49
2.2.2.ε. Στατιστική ανάλυση	σελ. 49
3. Αποτελέσματα	σελ. 50
3.1 Επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 (Καμπύλη μπλεομυκίνης).....	σελ. 50
3.2 Επίδραση μεθανολικών εκχυλισμάτων πόας από τα φυτά <i>Vicia faba</i> και <i>Lotus edulis</i> στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.....	σελ. 50
3.3 Επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού <i>Lotus edulis</i> στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	σελ. 50
3.4 Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων των υπό εξέταση εκχυλισμάτων και κλασμάτων	σελ. 52
3.5 Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων των υπό εξέταση εκχυλισμάτων και κλασμάτων	σελ. 53
4. Συζήτηση	σελ. 65
Βιβλιογραφία	σελ. 68

Περιεγόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων (<i>Manach C. et al. 2004</i>).	15
Εικόνα 2: Χημική δομή φλαβονοειδών (<i>Manach C. et al. 2004</i>).	16
Εικόνα 3: Χημική δομή της σεκοϊσολαρισιρεσινόλης και των παραγώγων της εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (<i>Tham D.M. et al. 1998</i>).	18
Εικόνα 4: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης (<i>Manach C. et al. 2004</i>).	18
Εικόνα 5: Πιθανές οδοί για τις πολυφαινόλες που καταναλώνει ο άνθρωπος (<i>Scalbert A. and Williamson G. 2000</i>).	20
Εικόνα 6: Πολυσταδιακή καρκινογένεση και ο ρόλος των ελευθέρων ριζών (<i>Βαλαβανίδης Α. 2003</i>).	22
Εικόνα 7: Συμμετοχή των αντιοξειδωτικών ενζύμων (<i>Mylonas C. and Kouretas D. 1999</i>).	24
Εικόνα 8: Πολυσταδιακή καρκινογένεση και μηχανισμοί δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.	26
Εικόνα 9: Γενική δομή των φλαβονοειδών (<i>Rice Evans C.A. et al. 1997</i>).	28
Εικόνα 10: <i>Lotus Edulis</i> : (A) καρπός και (B) φυτό.	36
Εικόνα 11: <i>Vicia faba</i> (καρποί και σπέρματα).	36
Εικόνα 12: Χημική δομή της μπλεομυκίνης (τύπος A2 και B2) (<i>Burger R.M. 1998</i>).	37
Εικόνα 13: Προϊόντα αποικοδόμησης του DNA από το σύμπλεγμα Fe BL (<i>Burger R.M. 1998</i>).	39
Εικόνα 14: Φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού <i>L. edulis</i> . Ένωση 7 ή Le N: kaempferol 3,7-di-O-rhamnopyranosyl. Ένωση 11 ή Le E: a) kaempferol 3-O-(3-O-acetyl-rhamnopyranosyl)-7-O-rhamnopyranosyl ή και b) kaempferol 3-O-(2-O-acetyl-rhamnopyranosyl)-7-O-rhamnopyranosyl. Ένωση 12 ή Le O: kaempferol 3-O-apiofuranosyl-7-O-rhamnopyranosyl. Ένωση 13 ή Le B: kaempferol 3-O-(5-O-acetylapiosyl)-7-O-rhamnopyranosyl.	42
Εικόνα 15: Παρατήρηση της μεταλλαξιγόνου/αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μίας ουσίας. A) αρνητικό control (στελέχη <i>Salmonella</i>), B) θετικό control (μεταλλαξιγόνος παράγοντας), Γ) μεταλλαξιγόνος παράγοντας + αντιμεταλλαξιγόνος ουσία (<i>Moltermans K. And Zeiger E. 2000</i>).	44

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Κύρια πολυφαινολικά συστατικά των οσπρίων (<i>Champ M.M.-J. 2002</i>).	13
Πίνακας 2: Βασικά μη θρεπτικά των οσπρίων και οι πιθανές ευεργετικές τους δράσεις (<i>Champ M.M.-J.2002</i>)	14
Πίνακας 3: Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων από τα φυτά <i>Lotus Edulis</i> .	41
Πίνακας 4: Αριθμός αυθόρμητων (His^+) αποικιών/τριβλίο σε βακτηριακά στελέχη <i>Salmonella typhimurium</i> (<i>Moltermans K. and Zeiger E. 2000</i>).	43
Πίνακας 5: Επαγόμενη από μπλεομυκίνη αύξηση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.	51
Πίνακας 6: Ποσοστά (%) αναστολής της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 από τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών <i>Lotus edulis</i> και <i>Vicia faba</i> .	52
Πίνακας 7: Ποσοστά (%) αναστολής της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού <i>Lotus edulis</i> .	52
Πίνακας 8: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού <i>Lotus edulis</i> στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	53
Πίνακας 9: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού <i>Vicia faba</i> στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	55
Πίνακας 10: Επίδραση του κλάσματος Le B στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	57
Πίνακας 11: Επίδραση του κλάσματος Le E στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	59
Πίνακας 12: Επίδραση του κλάσματος Le N στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	61
Πίνακας 13: Επίδραση του κλάσματος Le O στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	63

Περιεχόμενα Γραφημάτων

- Γράφημα 1:** Καμπύλη μπλεομυκίνης. Οι τιμές είναι η μέση τιμή του αριθμού των αποικιών/τριβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στα σημεία της καμπύλης συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. 51
- Γράφημα 2:** Ποσοστά (%) επαγωγής μεταλλάξεων από τη μπλεομυκίνη σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ($p<0,05$). 51
- Γράφημα 3:** Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. 53
- Γράφημα 4:** Απεικόνιση της % αναστολής του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. 54
- Γράφημα 5:** Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Vicia faba* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. 55
- Γράφημα 6:** Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Vicia faba* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. 56
- Γράφημα 7:** Επίδραση του κλάσματος Le B στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ($p<0,05$). 57
- Γράφημα 8:** Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le B στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ($p<0,05$). 58
- Γράφημα 9:** Επίδραση του κλάσματος Le E στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ($p<0,05$). 59
- Γράφημα 10:** Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le E στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ($p<0,05$). 60
- Γράφημα 11:** Επίδραση του κλάσματος Le N στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. 61

Γράφημα 12: Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le N στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. 62

Γράφημα 13: Επίδραση του κλάσματος Le O στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. 63

Γράφημα 14: Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le O στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. 64

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AP-1: activator protein-1
APAF-1: apoptotic protease-activating factor 1
ARE: antioxidant response element (στοιχείο 'αντιοξειδωτικής απόκρισης')
BLM: bleomycin (μπλεομυκίνη)
cAMP: cyclic adenosine monophosphate (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)
CAT: καταλάση
CBG: cytosolic b-glycosidase
CCl₃[•]: ρίζα του τριχλωρομεθυλίου
CDIs: αναστολείς των CDK κινασών
CDKs: κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη
COMT: Catechol-O-methyltransferase (κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση)
COX: κυκλοοξυγενάση
Cytc: κυτόχρωμα c
DBP: διβενζο[α,1]πυρένιο
DHA: δεϋδροασκορβικό οξύ
EGCG: epigallocatechin-3-gallate
ER: estrogen receptor (υποδοχέας των οιστρογόνων)
ERKs: extracellular signal-regulated protein kinases
ERRa: estrogen-related receptor a
G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase (αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης)
GPx: glutathione peroxidase (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης)
GR: glutathione reductase (ρεδουκτάση της γλουταθειόνης)
GSH: γλουταθειόνη
GSSG: οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης
GST: glutathione transferase (τρανσφεράση της γλουταθειόνης)
HDL: λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
HO₂[•]: ρίζα του υδροπεροξυλίου
hsp's: heat shock proteins (πρωτεΐνες θερμικού σοκ)
i-NOS: inducible nitric oxide synthase (επαγόμενη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου)
JNK: c-Jun N-terminal kinase (N-τελική κινάση της jun)
LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
LOOH: υδροϋπεροξείδια των λιπαρών οξέων
LOX: λιποοξυγενάση
LPH: lactase phlorizin hydrolase
MAPK: mitogen activated protein kinases
MMP-2: matrix-metalloproteinase 2 (μεταλλοπρωτεϊνάση της μήτρας)
NADPH: φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NF-kB: nuclear factor- kB
NMU: N-νιτροζο μεθυλουρία
NO[•]: ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου
¹O₂: μονήρης κατάσταση του οξυγόνου
O₂^{•-}: ανιόν του σούπεροξειδίου
OH[•]: ρίζα του υδροξυλίου
8-OHG[•]: 8-υδροξυγουανίνη
PIP₃: κινάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων
PKC: πρωτεϊνική κινάση C
PTK: πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης

PUFAs: polyunsaturated fatty acids (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)
QR: quinone reductase (ρεδουκτάση της κινόνης)
Rb: πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος
RO[•]: ρίζα του αλκοξυλίου
ROO[•]: ρίζα του υπεροξυλίου
ROS/RNS: reactive oxygen species/reactive nitrogen species (δραστικές μορφές οξυγόνου/δραστικές αζωτούχες ενώσεις)
SHBG: Sex Hormone-Binding Globulin (ορμονοδεσμευτική γλοβουλίνη)
SOD: superoxide dismutase (σουπεροξειδική δισμουτάση)
SULT: sulfotransferases (θειοτρανσφεράσες)
UDPG: UDP glucuronosyl transferase (UDP-γλυκορονοσυλ-τρανσφεράση)
VEGF: vascular endothelial growth factor (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae*. Οι καρποί τους, τα όσπρια, που καταναλώνονται ως τρόφιμα αποτελούν σημαντικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής και είναι πλούσια σε ουσίες που θεωρούνται ότι έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία. Οι πολυφαινόλες, όπως είναι τα φλαβονοειδή (κυρίως, οι προανθοκυανιδίνες και οι ισοφλαβόνες), τα λιγνάνια και τα φαινολικά οξέα, που περιέχονται στα όσπρια των ψυχανθών έχει βρεθεί ότι δρουν χημειοπροστατευτικά. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στα ψυχανθή δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δεν είναι πλήρως γνωστοί. Στα πλαίσια λοιπόν, γενικής μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών φυτών, με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Από ένα σύνολο ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae* επιλέχθηκαν τα φυτά *Lotus Edulis* και *Vicia faba*. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lotus edulis* και *Vicia faba* καθώς και τα κλάσματα καθαρών μορίων που προέκυψαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis* παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για την περαιτέρω μελέτη του μοριακού μηχανισμού της αντιοξειδωτικής τους δράσης, εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση τους στην επαγόμενη από οξειδωτικό παράγοντα (μπλεομυκίνη) μεταλλαξιγένεση σε βακτηριακά κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 με τη μέθοδο του Ames test. Συνολικά, μελετήθηκαν τα 2 μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των συγκεκριμένων φυτών και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis*. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lotus Edulis* και *Vicia faba* δεν επηρέασαν την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση. Ωστόσο, κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus Edulis* εμφάνισαν σημαντική αντιμεταλλαξιγόνος δράση. Οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα συγκεκριμένα καθαρά μόρια εκδηλώνουν την αντιμεταλλαξιγόνος δράση φαίνεται να σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες που απελευθερώνονται κατά την δράση της μπλεομυκίνης. Η ικανότητά τους αυτή τα καθιστά πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες και το φυτό *Lotus Edulis* σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ψυχανθή

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae* που αποτελεί ομάδα δικοτυλίδων φυτών και περιλαμβάνει πάνω από 18.000 είδη. Η συμβιωτική δέσμευση του αζώτου από τα βακτήρια γίνεται συνήθως σε ειδικές κατασκευές, τα φυμάτια, οι οποίες δημιουργούνται στα συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές και περιέχουν τα βακτήρια (*Γαλάτης Β. et al. 2003*). Από τα ψυχανθή καταναλώνονται ως τρόφιμα οι καρποί τους, όπως είναι η φακή, τα ρεβίθια, τα μπιζέλια, τα κουκιά, η σόγια, τα φασόλια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως όσπρια (pulses).

Τα όσπρια αποτελούν σημαντικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή πρόσληψη ελαιολάδου, φρούτων, λαχανικών, δημητριακών και ψαριού, από μέτρια κατανάλωση κρασιού καθώς και από μειωμένη κατανάλωση κρέατος, ζωϊκών και γαλακτοκομικών προϊόντων. Έρευνες απέδειξαν ότι η Μεσογειακή διατροφή σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και διαφόρων τύπων καρκίνου, γεγονός που αποδίδεται στην πλούσια περιεκτικότητά της σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ανόργανα στοιχεία, φυτικές ίνες και αντιοξειδωτικές ουσίες (*La Vecchia C. 2004, Vasilopoulou E. et al. 2005*).

Τα όσπρια θεωρείται ότι παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες, συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών παθήσεων, του διαβήτη τύπου 2, της παχυσαρκίας και του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επίσης αποτελούν σημαντική πηγή αμύλου, φυτικών ινών, ανόργανων στοιχείων, όπως Ca, Fe, K, Mg και Zn, βιταμινών καθώς και πρωτεϊνών (*Guillon F. and Champ M.M-J. 2002*). Την αφθονότερη κατηγορία πρωτεϊνών αποτελούν οι σφαιρίνες, πρωτεΐνες με αποθηκευτικό ρόλο, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή θρεπτική αξία, λόγω του αμινοξέος λυσίνης που περιέχουν. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι πρωτεΐνες παίζουν διάφορους βιο-δραστικούς ρόλους, αποτελώντας πρόδρομους βιολογικά δραστικών πεπτιδίων, συμμετέχοντας έτσι σε ποικίλες φυσιολογικές δραστηριότητες (*Marcello D. 2006*). Επίσης, τα ψυχανθή διαθέτουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, απομακρύνουν την κακή χοληστερόλη από το αίμα, βελτιώνοντας την αναλογία HDL και LDL χοληστερόλης και περιέχουν σημαντικές ποσότητες φυτοχημικών ουσιών, κυρίως πολυφαινολικών συστατικών, όπως είναι τα φλαβονοειδή, οι ισοφλαβόνες, τα φαινολικά οξέα και τα λυγνάνια, τα οποία δρουν χημειοπροστατευτικά (*Πίνακας 1*) (*Madar Z. and Stark A.H. 2002, Champ M.M-J. 2002*).

Πίνακας 1: Κύρια πολυφαινολικά συστατικά των οσπρίων (*Champ M.M-J. 2002*).

	Basic skeleton	Examples
Phenolic acids	C6-C1	Galic acid, syringic acid
Phenyl propanoids	C6-C3	Coumarins, hydroxycinnamic acids (caffeic, ferulic, sinapic)
Flavonoids	C6-C3-C6	Flavones (e.g. luteolin), flavonols (e.g. quercetin, kaempferol), flavanols, isoflavonoids (e.g. genistein, daidzein), proanthocyanidins (or condensed tannins)
Lignans, neolignans	(C6-C3) ₂	Secoisolariciresinol
Lignins	(C6-C3) _n	

Το πιο καλά μελετημένο ψυχανθές αποτελεί η σόγια, η οποία χαρακτηρίζεται από αντιαθηρωματική δραστηριότητα και από υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, οι οποίες προκαλούν up-regulation (αυξορύθμιση) των LDL-υποδοχέων καθώς και μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος (*Marcello D. 2006*). Επίσης, περιέχει σημαντική ποσότητα ισοφλαβονοειδών, τα οποία έχει βρεθεί ότι

έχουν δράση ανάλογη των οιστρογόνων, πιθανώς προστατεύοντας από ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Rochfort S. and Panozzo J. 2007).

Επιπλέον, τα ψυχανθή διαθέτουν εκτός από τις σημαντικές ποσότητες φαινολικών συστατικών και άλλα σημαντικά μη θρεπτικά συστατικά με βιολογική δράση (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Βασικά μη θρεπτικά συστατικά των οσπρίων και οι πιθανές ευεργετικές βιολογικές τους δράσεις (Champ M.M-J. 2002).

	Beneficial effects	Adverse effects	Amount in untreated pulses*	Main source(s)
Protease inhibitors	Anticarcinogenic (?)	↓ Carcinogenesis (?) and growth inhibition (in animals)	+++	Soya, GL, cereals
Amylase inhibitors	Potentially therapeutic in diabetes (?)	↓ Starch digestion	+++	Cereals, GL
Lectins	May help in obesity treatment (??), ↓ tumour growth (??)	Growth inhibition (in animals), ↓ nutrient absorption	++(+)	Beans
Phytates	Hypocholesterolaemic effect (?), anticarcinogenic (?)	↓ Bioavailability of minerals	++	Wheat bran, soya, GL
Oxalates		↓ Bioavailability of minerals	+	Spinach, rhubarb, beans
Phenolic compounds				
Flavonoids, isoflavones (phyto-oestrogens)	↓ Risk factors for menopause (CHD.) (?), ↓ risk of hormone-dependent cancer (?)	Infertility syndrome (in animals)	+	Soya, clover
Condensed tannins		Astringent taste, ↓ food intake (in animals)	++	Tea, sorghum, rapeseed, <i>Vicia faba</i>
Lignans (phyto-oestrogens)	↓ Risk factors for menopause (?)			Linseed
Lignins		↓ Fermentability of dietary fibres	+	Straw
Saponins	Hypocholesterolaemic effect (?), anticarcinogenic (?)	Bitter taste, ↓ food intake (in animals)	++(+)	Lucerne (alfalfa), ginseng
Alkaloids				Lupin

CHD, coronary heart disease; GL, grain legumes.

Οι αναστολείς ενζύμων είναι πρωτεΐνες και διακρίνονται στους αναστολείς πρωτεασών και στους αναστολείς αμυλασών. Έρευνες αποκάλυψαν την ύπαρξη θετικής συσχέτισης στην πρόσληψη αναστολέων πρωτεασών και στην εμφάνιση καρκίνου του παγκρέατος σε ζώα, ενώ *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι μπορούν να δράσουν και ως αντικαρκινικοί παράγοντες μέσω διαφόρων μηχανισμών, καταστέλλοντας τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων που επάγεται από την ιονίζουσα και UV- ακτινοβολία, τα χημικά καρκινογόνα και τις στεροειδείς ορμόνες. Επίσης, έρευνες σε υγιή και διαβητικά άτομα απέδειξαν μείωση των επιπέδων της μετα-γευματικής γλυκόζης, της ινσουλίνης, του C-πεπτιδίου και του γαστρικού ανασταλτικού πεπτιδίου, μετά από πρόσληψη αναστολέων αμυλάσης, καθιστώντας τους ενδεχομένως σημαντικούς παράγοντες στη θεραπευτική αντιμετώπιση του διαβήτη και της παχυσαρκίας (Champ M.M-J. 2002).

Τα ψυχανθή και κυρίως τα φασόλια αποτελούν σημαντική πηγή λεκτινών, οι οποίες μπορούν να δράσουν ως θεραπευτικοί παράγοντες διεγείροντας τη λειτουργία του εντέρου και βελτιώνοντας τη παχυσαρκία (Champ M.M-J. 2002).

Επίσης, το φυτικό οξύ (IP6) πιστεύεται ότι σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης του προκαλούμενου από σίδηρο καρκίνου του παχέος εντέρου, εξαιτίας της ικανότητάς του να δεσμεύει χημικά μέταλλα και κυρίως Zn, Ca, και Fe, ενώ παράλληλα προκαλεί μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων του ορού. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το φυτικό οξύ δρα ως αντιοξειδωτικό, αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξάνοντας την ανοσολογική απόκριση μέσω ενεργοποίησης των NK-κυττάρων (Champ M.M-J. 2002, Rochfort S. and Panozzo J. 2007).

Οι σαπωνίνες παρατηρήθηκε ότι προκαλούν μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος, είτε μέσω δέσμευσης με την διατροφική χοληστερόλη παρεμποδίζοντας την απορρόφηση της, είτε μέσω δέσμευσης με τα χολικά οξέα παρεμβαίνοντας στον εντεροηπατικό κύκλο και αυξάνοντας έτσι την έκκρισή τους. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι οι σαπωνίνες ίσως έχουν και αντικαρκινική δράση, επάγοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων μέσω των αποπτωτικών ενζύμων (AKT, Bcl, ERK1/2). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι αναστέλλουν κατά 2/3 την ανάπτυξη των αζοξυμεθάνιο-επαγόμενων προνεοπλαστικών βλαβών στο έντερο (*Champ M.M-J. 2002*).

Τέλος, τα αλκαλοειδή βρέθηκε ότι προκαλούν αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης, η οποία συμβαίνει μόνο παρουσία σχετικά υψηλών επιπέδων γλυκόζης, γεγονός που ίσως σχετίζεται με ρύθμιση του διαβήτη τύπου 2 (*Rochfort S. and Panozzo J. 2007*).

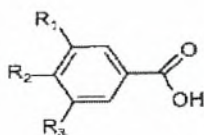
1.2. Πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες συνιστούν μία μεγάλη και ετερογενή κατηγορία χημικών ενώσεων, που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Πρόδρομος των πολυφαινολών είναι η φαινυλαλανίνη, η οποία προκύπτει από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό stress, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και τις δομικές ομάδες που δεσμεύονται σε αυτούς, διακρίνονται στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή, στα λιγνάνια και στα στυλβένια (*Manach C. et al. 2004*).

1.2.1. Φαινολικά οξέα

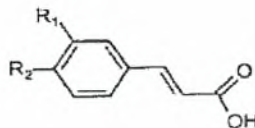
Διακρίνονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και σε παράγωγα του κινναμικού οξέος (Εικόνα 1). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα που περιλαμβάνουν το γαλλικό, το συριγγικό και το βανιλικό οξύ είναι συστατικά υδρολυόμενων ταννινών και είναι χαμηλού θρεπτικού ενδιαφέροντος, αφού η περιεκτικότητα των φυτών σε αυτά είναι μικρή με εξαίρεση τα κόκκινα φρούτα, τα κρεμμύδια, τα σκουρόχρωμα ραπανάκια και το τσάι. Τα υδροξυκινναμικά οξέα που περιλαμβάνουν το p-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ κυρίως απαντούν ως γλυκοσυλιωμένα παράγωγα ή εστέρες του κινικού, του σικιμικού και του ταρταρικού οξέος, ενώ σε υψηλή συγκέντρωση βρίσκονται στα εξωτερικά μέρη των ώριμων φρούτων. Το καφεϊκό οξύ μαζί με το φερουλικό που απαντά σε υψηλή ποσότητα στα δημητριακά, αντιπροσωπεύουν το 75-100% της συνολικής περιεκτικότητας των φρούτων σε υδροξυκινναμικά οξέα (*Manach C. et al. 2004*).

Hydroxybenzoic acids



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

Hydroxycinnamic acids

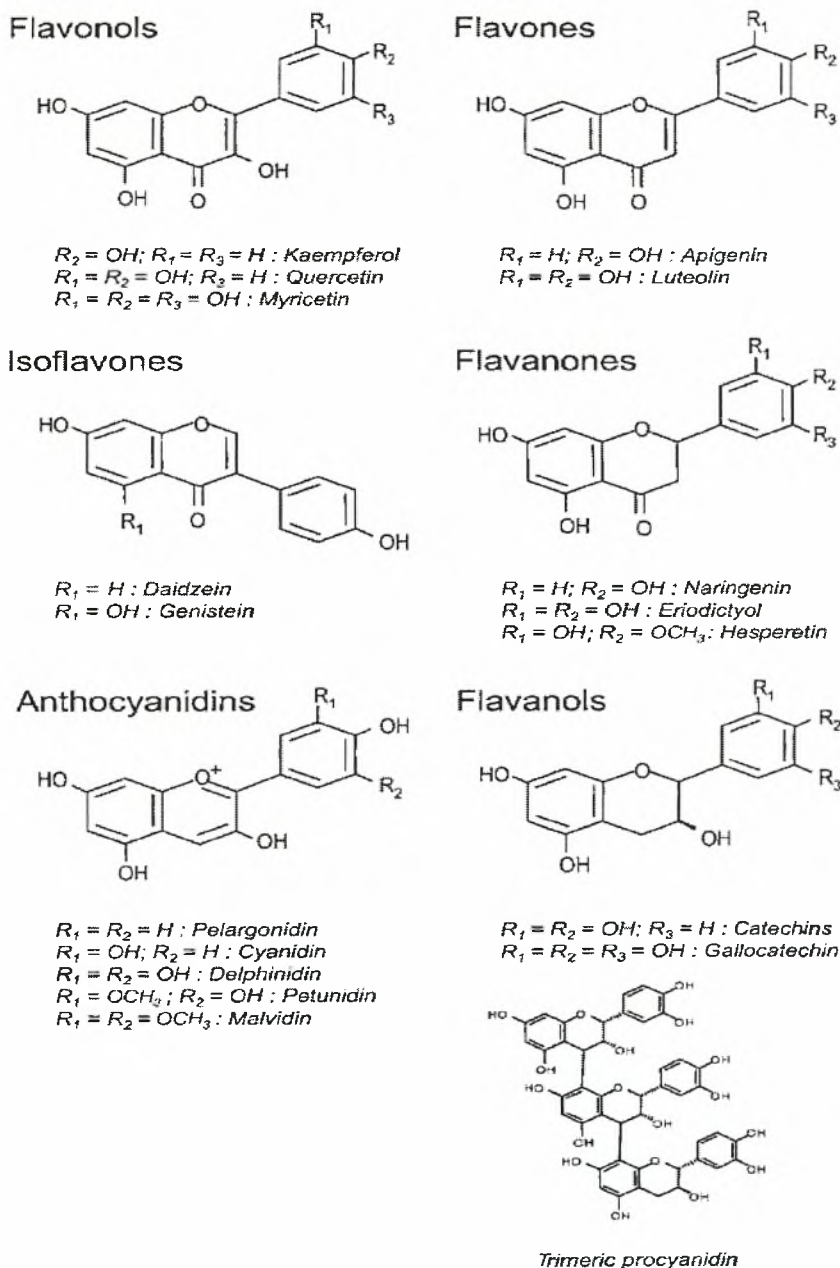


$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Εικόνα 1: Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων (*Manach C. et al. 2004*).

1.2.2. Φλαβονοειδή

Συνιστούν την πιο σημαντική και μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών. Η βασική δομή τους είναι αυτή του φαινυλβενζοπυρενίου (C6-C3-C6) (Εικόνα 2). Συγκεκριμένα, αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους μέσω 3 ατόμων άνθρακα, που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροδακτύλιο. Συνήθως απαντούν ως γλυκοσίδια και ανάλογα με τις δομικές ομάδες που περιέχουν οι δακτύλιοι και τον βαθμό κορεσμού του βενζο-γ-πυρενικού δακτυλίου διακρίνονται στις φλαβονόλες, στις φλαβόνες, στις ισοφλαβόνες, στις φλαβανόνες, στις ανθοκυανιδίνες και στις φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) (Manach C. et al. 2004, Carlo G.D. et al. 1999).



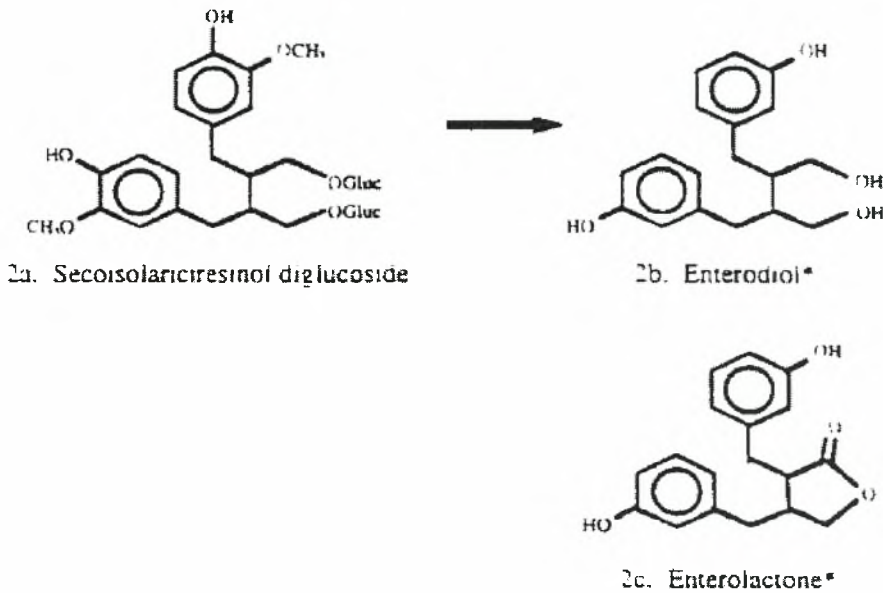
Εικόνα 2: Χημική δομή φλαβονοειδών (Manach C. et al. 2004).

- ✓ *Φλαβονόλες*: Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των φλαβονοειδών και οι κυριότεροι αντιπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη και η καιμπφερόλη. Βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή και συσσωρεύονται στους εξωτερικούς φυτικούς ιστούς (επιδερμίδα και φύλλα), γιατί η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (*Manach C. et al. 2004*).
- ✓ *Φλαβόνες*: Απαντούν λιγότερο συχνά από τις φλαβονόλες και αποτελούνται από γλυκοσίδια λουτεολίνης και απιγενίνης. Οι πιο σημαντικές πηγές φλαβονών είναι ο μαϊντανός και το σέλινο, ενώ και η επιδερμίδα των εσπεριδοειδών περιέχει υψηλή ποσότητα υδρόφοβων πολυμεθοξυλιωμένων φλαβονών (*Manach C. et al. 2004*).
- ✓ *Φλαβανόνες*: Περιέχονται στις ντομάτες, σε αρωματικά φυτά, όπως η μέντα και σε υψηλή συγκέντρωση στα εσπεριδοειδή, ενώ συνήθως είναι γλυκοσυλιωμένες με ένα δισακχαρίδιο στη θέση 7 (*Manach C. et al. 2004*).
- ✓ *Ισοφλαβόνες*: Διαθέτουν ΟΗ-ομάδες στις θέσεις 7 και 4' σε ανάλογη διαμόρφωση με αυτές που περιέχονται στην οιστραδιόλη, παρουσιάζοντας δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και κατ' επέκταση ψευδο-ορμονικές ιδιότητες, έχοντας την ικανότητα να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων. Απαντούν σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και κυρίως στη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντενζεΐνης και γενιστεΐνης (*Manach C. et al. 2004*).
- ✓ *Φλαβανόλες*: Υπάρχουν σε δύο μορφές: μονομερή μορφή (κατεχίνες) και πολυμερή μορφή (προανθοκυανιδίνες) και σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή δεν είναι γλυκοσυλιωμένες. Η γαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη και η EGCG (epigallocatechin-3-gallate) απαντούν στα ψυχανθή, στα σταφύλια και κυρίως στο τσάι (*Manach C. et al. 2004*). Οι προανθοκυανιδίνες γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες είναι υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή, που αποτελούνται από μονομερή φλαβαν-3-όλης. Η οξειδωτική συμπύκνωση συμβαίνει μεταξύ του ατόμου C4 του ετεροδακτυλίου και των ατόμων C6 ή C8 των γειτονικών ενώσεων (*Champ M.M.-J. 2002*). Είναι υπεύθυνες για τη στυφή γεύση των φρούτων, η οποία μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους, λόγω συνεχούς αύξησης της συμπύκνωσης των φαινολικών ουσιών (*Manach C. et al. 2004*).
- ✓ *Ανθοκυανίνες*: Είναι χρωστικές που υπάρχουν σε κοκκία στους επιδερμικούς ιστούς των φρούτων και των άνθεων και βρίσκονται σε διάφορες χημικές μορφές έγχρωμες και άχρωμες ανάλογα με το pH. Σταθεροποιούνται μέσω γλυκοσυλίωσης στη θέση 3, εστεροποίησης με διάφορα οργανικά και φαινολικά οξέα καθώς και μέσω σύνδεσης με άλλα φλαβονοειδή. Απαντούν στο κόκκινο κρασί, στα λαχανικά καθώς και στην επιδερμίδα και στη σάρκα ορισμένων φρούτων, όπως στις φράουλες και στα κεράσια (*Manach C. et al. 2004*).

1.2.3. Λιγνάνια

Είναι διφαινυλικές ενώσεις που περιέχουν μία 2,3-διβενζυλβουτάνιο δομή, η οποία σχηματίζεται από διμερισμό δύο καταλοίπων κινναμικού οξέος (Εικόνα 3) (*Yang C.S. et al. 2001*). Απαντούν κυρίως στο λιναρόσπορο καθώς και σε μικρότερες ποσότητες στα ψυχανθή, στα φύκια, στα δημητριακά, στα φρούτα και στα λαχανικά. Τα φυτικά λιγνάνια σεκοΐσολαρισρεσινόλη (secoisolariciresinol) και ματαιρεσινόλη (matairesinol)

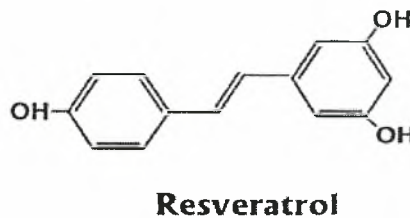
μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα στα λιγνάνια των θηλαστικών εντεροδιόλη (enterodiol) και εντερολακτόνη (enterolactone) (Manach C. et al. 2004).



Εικόνα 3: Χημική δομή της σεκοΐσολαρισεσινόλης και των παραγώγων της εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (Tham D.M. et al. 1998).

1.2.4. Στιλβένια

Αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα αιθενίου. Η ρεσβερατρόλη που αποτελεί το κυριότερο μέλος απαντά κυρίως στο κρασί και στα σταφύλια, και έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες (Εικόνα 4) (Fresco P. et al. 2006).



Εικόνα 4: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης (Manach C. et al. 2004).

1.2.5. Μεταβολισμός των πολυφαινολών

Γλυκοσίδια των φλαβονοειδών: Οι φλαβονόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβόνες και οι ανθοκυανίνες είναι γλυκοσυλιωμένες συνήθως με 1 ή και με 2 ή 3 κατάλοιπα γλυκόζης, ραμνόζης, γαλακτόζης, αραβινόζης, ξυλόζης και άλλων σακχάρων. Έτσι, το πρώτο βήμα του μεταβολισμού τους είναι η ενζυμική απομάκρυνση (γλυκοσιδάσες) του σακχάρου τους (υδρόφιλο τμήμα), η οποία είναι απαραίτητη για την παθητική τους διάχυση μέσω του τοιχώματος του λεπτού εντέρου. Οι γλυκοσιδάσες μπορεί να εντοπίζονται είτε στην ίδια την τροφή (ενδογενώς ή να έχουν προστεθεί κατά την επεξεργασία), είτε στα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα είτε μπορεί να εκκρίνονται από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Η έκφρασή τους είναι κυρίως ιστοειδική. Οι δύο κύριες ανθρώπινες γλυκοσιδάσες είναι η CBG (cytosolic b-glycosidase) και η LPH (lactase phlorizin hydrolase). Η CBG

απαντά σε πολλούς ιστούς και κυρίως στο ήπαρ και καταλύει την υδρόλυση αρκετών ξενοβιοτικών γλυκοσιδίων. Η LPH απαντά μόνο στο λεπτό έντερο και τα φυσιολογικά υποστρώματά της είναι τα γλυκοσυλ-κεραμίδια και τα λακτοσυλ-κεραμίδια. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι καταλύει και την υδρόλυση αρκετών γλυκοσιδίων των πολυφαινόλων, τα οποία δεν αποτελούν υποστρώματα για την CBG. Οι γλυκοσυλιωμένες πολυφαινόλες με γλυκόζη (αραβινόζη ή ξυλόζη) αποτελούν υποστρώματα για τις γλυκοσιδάσες, ενώ η ραμνόζη απομακρύνεται από τις α-ραμνοσιδάσες της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου (Scalbert A. and Williamson G. 2000).

Ακυλιωμένα φλαβονοειδή: Οι φλαβονόλες, όπως η επικατεχίνη είναι συνήθως ακυλιωμένες με γαλλικό οξύ και φαίνεται ότι διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και απορροφώνται χωρίς να είναι απαραίτητη η υδρόλυση ή η αποσύζευξη (Scalbert A. and Williamson G. 2000).

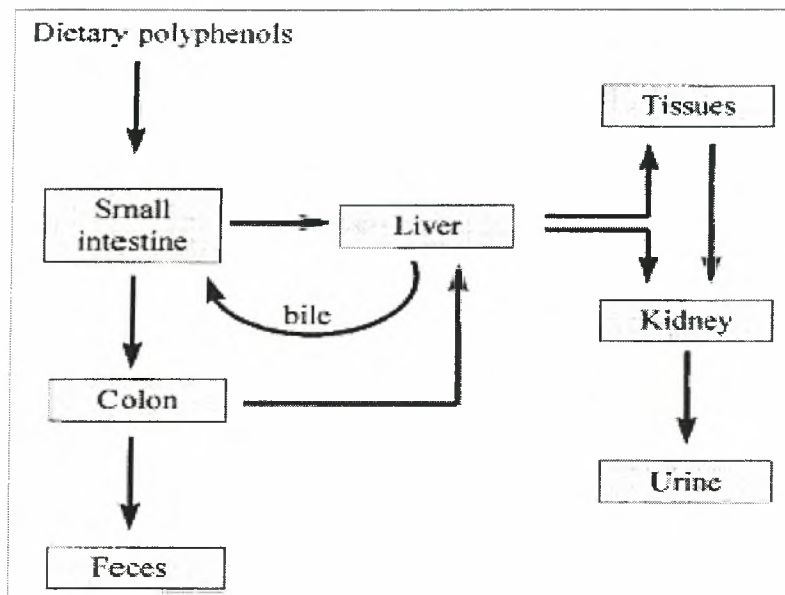
Εστέρες των φαινολικών οξέων: Τα υδροξυκιναμικά οξέα, όπως το φερουλικό και το καφεϊκό οξύ είναι συνήθως εστεροποιημένα με σάκχαρα, οργανικά οξέα, και λιπίδια. Είναι ενωμένα στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα και απαιτούν για την απελευθέρωσή τους τη δράση των ξυλανάσων και εστερασών της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου (Scalbert A. and Williamson G. 2000).

Προανθοκυανιδίνες: Λόγω του υψηλού μοριακού τους βάρους, τα πολυμερή προανθοκυανιδίνης πιθανόν απορροφώνται δύσκολα από το λεπτό έντερο (Scalbert A. and Williamson G. 2000).

Μετά την υδρόλυση για την απομάκρυνση των σακχάρων, οι ελεύθερες πολυφαινόλες υφίστανται αντιδράσεις σύζευξης (Φάση II του μεταβολισμού), όπως μεθυλίωση, θείωση και γλυκουρονιδίωση. Υψηλές δόσεις πολυφαινόλων μεταβολίζονται πρωταρχικά στο ήπαρ, ενώ μικρότερες δόσεις μεταβολίζονται κυρίως από τον εντερικό βλεννογόνο και το ήπαρ παίζει δευτερεύοντα ρόλο. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τις αντιδράσεις σύζευξης είναι η COMT (κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση) που καταλύει τη μεθυλίωση αρκετών πολυφαινόλων, η UDPG (UDP-γλυκορονοσυλ-τρανσφεράση), η οποία καταλύει τη σύζευξη των πολυφαινόλων με γλυκουρονικό οξύ και οι SULT (θειοτρανσφεράσες) (Scalbert A. and Williamson G. 2000).

Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται στο στομάχι ή στο λεπτό έντερο καταλήγουν στο παχύ έντερο, όπου η μικροχλωρίδα τις διασπά σε φαινολικά οξέα. Ακόμη, αυτές που έχουν απορροφηθεί, μεταβολιστεί στο ήπαρ και έχουν εκκριθεί στη χολή φτάνουν στο παχύ έντερο, αλλά με διαφορετική χημική δομή π.χ. ως γλυκουρονίδια (Εικόνα 5) (Scalbert A. and Williamson G. 2000). Επίσης, τα συζευγμένα με γλυκουρονικό παράγωγα της φάσης II εκκρίνονται μέσω της χολικής οδού στον δωδεκαδάκτυλο, όπου οι β-γλυκουρονιδάσες των εντερικών βακτηρίων διασπούν τη συζευγμένη μορφή των πολυφαινόλων, οι οποίες στην ελεύθερη μορφή τους επιστρέφουν στο ήπαρ, με αποτέλεσμα να εγκλωβίζονται μέσα στον εντεροηπατικό κύκλο και να απομακρύνονται με αργό ρυθμό (Manach C. et al. 2004).

Επιπλέον, οι πολυφαινόλες μπορούν να διαπεράσουν τους ιστούς, κυρίως αυτούς στους οποίους μεταβολίζονται, αλλά η συσσώρευσή τους σε ορισμένους ιστούς-στόχους είναι ακόμη υπό μελέτη. Τέλος, τα μεγάλου μεγέθους παράγωγα της φάσης II απομακρύνονται μέσω της χολικής οδού, ενώ τα μικρότερου μεγέθους μέσω της ουρικής οδού (Manach C. et al. 2004).



Εικόνα 5: Πιθανές οδοί για τις πολυφαινόλες που καταναλώνει ο άνθρωπος (Scalbert A. and Williamson G. 2000).

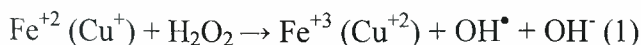
1.3. Ελεύθερες ρίζες - καρκινογένεση

1.3.1. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^{\bullet}), του υδροξυλίου (OH^{\bullet}), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\bullet}), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}), του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\bullet}) και του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\bullet}). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το O_2^{\bullet} , και το OH^{\bullet} . Στις ROS όμως εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξίδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$). Υπάρχουν αντίστοιχα και οι ενεργές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), όπως είναι το NO^{\bullet} , το NO_2^{\bullet} , και το $ONOO^{\bullet}$, το οποίο δεν αποτελεί ρίζα (Halliwell 2001).

Στις φυσιολογικές ενδογενείς διεργασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών ανήκει η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, όπου η διαρροή των ηλεκτρονίων προκαλεί την αναγωγή του O_2 σε ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^{\bullet}). Χαμηλότερα ποσά ROS σχηματίζονται από τα υπεροξειδισώματα, το σύστημα του κυτοχρώματος P450, και από τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα, που ενεργοποιούνται σε κατάσταση φλεγμονής. Στις εξωγενείς πηγές των ROS περιλαμβάνονται η ιονίζουσα ακτινοβολία και πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Karihtala P. and Soini Y. 2007).

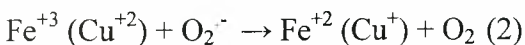
Η ρίζα OH^{\bullet} παράγεται *in vivo* μέσω της αντίδρασης Fenton (1) παρουσία ιόντων μετάλλου Fe, Cu, Co ή Ni.



Η ρίζα OH^{\bullet} είναι ιδιαίτερα δραστική και δρα κοντά στο σημείο σχηματισμού της, προκαλώντας βλάβες στις πρωτεΐνες, στους υδατάνθρακες, στα λιπίδια των μεμβρανών και

στο DNA, επάγοντας σπασίματα αλυσίδας και τροποποιήσεις βάσεων (Karihtala P. and Soini Y. 2007).

Το $O_2^{\bullet -}$ είναι σχετικά μία μη δραστική ελεύθερη ρίζα και παράγεται κυρίως κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και σε μικρότερη έκταση μέσω ορισμένων ενζύμων των φαγοκυττάρων. Όπως φαίνεται παρακάτω (2), το $O_2^{\bullet -}$ ανακυκλώνει περαιτέρω οξειδωμένα ιόντα μετάλλου, όπως είναι αυτά που παράγονται στην αντίδραση (1).



(Karihtala P. and Soini Y. 2007).

1.3.2. Καρκινογένεση

Η διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε κακοήθες ορίζεται ως καρκινογένεση. Η καρκινογένεση είναι σύνθετη, πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή διεργασία και χαρακτηρίζεται από μεγάλη λανθάνουσα περίοδο μέχρι την εμφάνιση των κακοήθων όγκων (Βαλαβανίδης Α. 2003).

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης φαίνεται να περιλαμβάνει την ανάπτυξη διαφόρων φαινοτυπικών αλλοιώσεων, όπως την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού ή της αναστολής πολλαπλασιασμού εξ'επαφής, την απώλεια της ικανότητας να επικοινωνεί με τα γειτονικά κύτταρα και την ικανότητα να διηθεί και να μεθίσταται. Η καρκινική μάζα είναι μονοκλωνικής προέλευσης, από ένα αρχικά εξαλλαγμένο καρκινικό κύτταρο. Ωστόσο, ο κλωνικός πολλαπλασιασμός κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής καρκινογένεσης, προκαλεί την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών φαινοτύπων μέσα στον όγκο, πιθανότατα μέσω επιπλέον γενετικών ή επιγενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες είναι ικανές και αναγκαίες για να μετατρέψουν ένα κύτταρο σε καρκινικό (Κουρέτας Δ., Βιοχημική τοξικολογία).

Τα στάδια τα οποία θεωρείται ότι ακολουθεί η καρκινογένεση είναι η **μύηση-έναρξη** (initiation), η **προαγωγή** (promotion) και η **πρόοδος** (progression). Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το πρώτο στάδιο της καρκινογενετικής διαδικασίας, μύηση-έναρξη, είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο-προγεννήτορα. Κάτω από την επίδραση ενός ή περισσότερων μεταλλαξιγόνων παραγόντων προκαλούνται μεταλλάξεις, πιθανότατα σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, δίνοντας γένεση σε ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης ή αλλιώς ένα κύτταρο που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων, από ό,τι κανονικά θα έκανε. Το στάδιο αυτό είναι μη αντιστρεπτό ενώ μόνο κάτω από κάποιες προϋποθέσεις μπορεί το κύτταρο σε επόμενο στάδιο να εξελιχθεί σε καρκινικό (Κουρέτας Δ., Βιοχημική τοξικολογία).

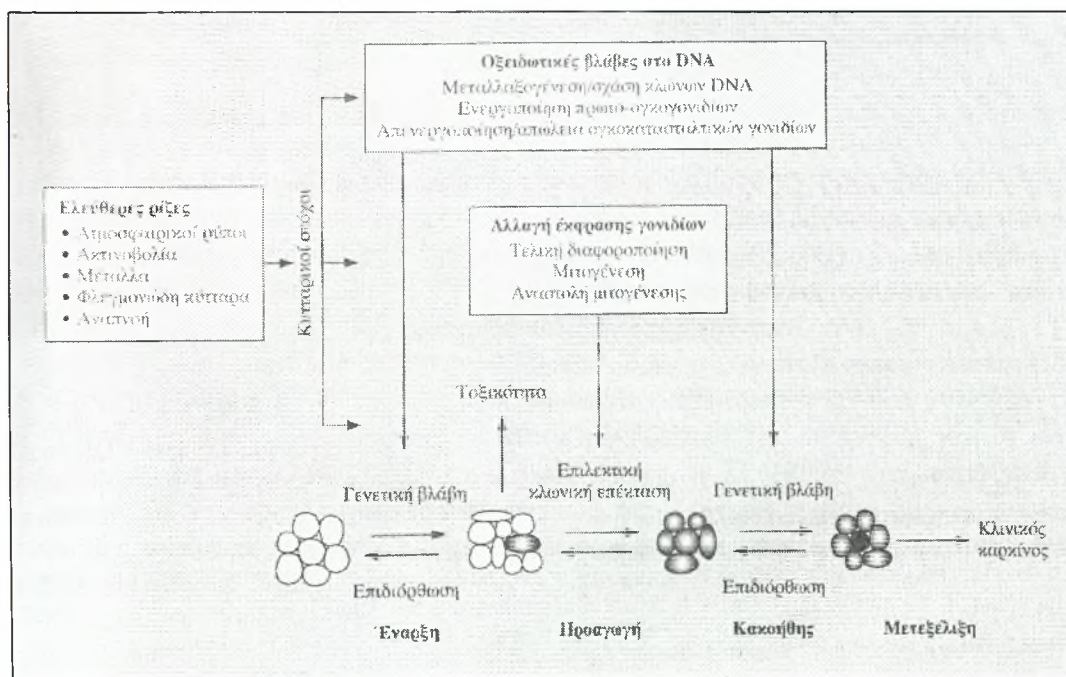
Το στάδιο της προαγωγής χαρακτηρίζεται από κλωνικό πολλαπλασιασμό των αρχικά μεταλλαγμένων-μυημένων κυττάρων, μέσω επίδρασης παραγόντων που προάγουν τη μίτωση (προαγωγείς). Αυτό το στάδιο είναι αντιστρεπτό, με την απόσυρση του μιτογόνου παράγοντα. Καθώς το μυημένο κύτταρο διαιρείται, όταν πλησιάζει στην κυτταρική διαίρεση που κανονικά θα πέθαινε π.χ. την 40^η και συνεχίζει στην 41^η, 42^η κλπ, προστίθενται γενωμικές βλάβες στα κύτταρα απογόνους οι οποίες κανονικά δεν θα γίνονταν, αφού τα κύτταρα θα πέθαιναν στην 40^η διαίρεση. Οι γενωμικές βλάβες είναι ραγδαίες μιας και η γενωμική αστάθεια μετά την κρίσιμη 40^η διαίρεση αυξάνεται δραματικά. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα, αποκτά μία κρίσιμη μετάλλαξη η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο (Κουρέτας Δ., Βιοχημική τοξικολογία).

Στο τρίτο στάδιο, το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο, μετατρέπεται σε ένα καρκινικό, ανεξάρτητο από προαγωγέα κύτταρο. Φαίνεται ότι κάτω από τη συνεχή μιτογόνο επίδραση του προαγωγέα, κάποιο κύτταρο εμφανίζει επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο. Τα κύτταρα που αποκτούν τον καρκινικό φαινότυπο έχουν χάσει τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους, την ικανότητα διαφοροποίησης τους, την ικανότητα να επικοινωνούν με γειτονικά κύτταρα ενώ έχουν την ικανότητα να διηθούνται και να μεθίστανται. Το στάδιο αυτό δεν είναι αντιστρεπτό αφού πρόκειται για μόνιμο μετασχηματισμό των κυττάρων. (Κουρέτας Δ. Βιοχημική τοξικολογία, Shureiqi I. et al. 2000).

1.3.3. Συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με την πρόκληση καρκινογένεσης

Οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται με την παθολογία πάνω από 100 ανθρώπινων ασθενειών, όπως είναι το αιμορραγικό σοκ, η κυστική ίνωση και η ελκώδης κολίτιδα. Παρόλα αυτά σε πολύ λίγες ασθένειες οι ROS αποτελούν την πρωταρχική αιτία της παθολογικής κατάστασης, όπως για παράδειγμα οι συνεχείς βλάβες στο DNA από ROS/RNS συμμετέχουν στην πρόκληση ορισμένων τύπων καρκίνου. Συχνότερα, η αυξημένη παραγωγή τους είναι το αποτέλεσμα της ασθένειας, την οποία και επιδεινώνουν, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας και του εμφυσήματος (Halliwell B. 2001).

Οι ROS έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν τόσο στο στάδιο έναρξης όσο και στο στάδιο προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας (Εικόνα 6). Στο αρχικό στάδιο, δρουν προκαλώντας βλάβες στο DNA, λιπιδική υπεροξείδωση, φλεγμονές λόγω ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων, οξείδωση πρωτεϊνών, υδατανθράκων και αναστολή ενζύμων, οι οποίες συνιστούν το αποκαλούμενο οξειδωτικό stress στους βιολογικούς οργανισμούς. Στο στάδιο προαγωγής, έχουν την ικανότητα να μιμηθούν τις βιοχημικές διεργασίες των κλασικών ουσιών-προαγωγών της καρκινογένεσης, οι οποίες ενεργοποιούν την παραγωγή ελευθέρων ριζών στους διάφορους τύπους κυττάρων, ενώ συγχρόνως καταστέλλουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Βαλαβανίδης Α. 2003).



Εικόνα 6: Πολυσταδιακή καρκινογένεση και ο ρόλος των ελευθέρων ριζών (Βαλαβανίδης Α. 2003).

Συγκεκριμένα, οι ROS/RNS (κυρίως η ρίζα OH^\bullet), μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο μόριο των νουκλεοπρωτεϊνών και του DNA με οξείδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση και απαμίνωση. Οι χημικές αυτές αλλοιώσεις είναι προσθήκες ή σχάσεις στις νουκλεοβάσεις, στο υδατανθρακικό τμήμα του DNA, αλλά και σε τμήματα εκτός της νουκλεοβάσης, μονοκλωνικές θραύσεις και σταυροσυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών (Βαλαβανίδης Α. 2003). Οι αντιδράσεις της ρίζας OH^\bullet με τις πουρινικές νουκλεοβάσεις (αδενίνη, γουανίνη) είναι προσθήκες στους άνθρακες σε θέσεις C4, C5 και C8 (Βαλαβανίδης Α. 2003). Παράδειγμα αποτελεί η αντίδραση της ρίζας OH^\bullet με τη γουανίνη, σχηματίζοντας την ρίζα 8-OHG $^\bullet$ (8-υδροξυγουανίνη), η οποία μπορεί να χάσει ένα ηλεκτρόνιο και να παράγει την οξειδωμένη βάση 8-OHG, που προκαλεί μετάλλαξη μεταστροφής από GC→TA (Halliwell B. 2001). Αλλαγή της γουανίνης με το πρόσθετο 8-OHG, επηρεάζει αναπόφευκτα τη μεθυλίωση των γειτονικών κυτοσινών, επιτρέποντας έτσι να ερμηνευτεί ο ρόλος των ROS κατά την οξειδωτική βλάβη και την ανώμαλη μεθυλίωση του DNA κατά την καρκινογένεση. Όλες αυτές οι βλάβες αποτελούν προκαρκινικές καταστάσεις που έχουν δυνητικά την ικανότητα να εξελιχθούν σε κακοήθεις νεοπλασίες (Βαλαβανίδης Α. 2003).

Η λιπιδική υπεροξείδωση έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την καρκινογένεση και με μία πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Περιγράφεται ως η οξειδωτική καταστροφή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με (PUFAs) με μία αυτοκαταλυόμενη μη ελεγχόμενη διεργασία μέσω ενεργών μορφών οξυγόνου, που οδηγεί αρχικά στο σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων λιπαρών οξέων (LOOH) και σε δευτερεύοντα προϊόντα που περιλαμβάνουν κυρίως αλδεϋδικές ενώσεις. Τη λιπιδική υπεροξείδωση μπορούν να εκκινήσουν οι ρίζες OH^\bullet , οι ρίζες υπεροξυλίου (ROO^\bullet) και οι ρίζες αλκοξυλίου (RO^\bullet), καθώς και οι σύμπλοκες ενώσεις σιδήρου με την απόσπαση ενός υδρογόνου. Οι άμεσες βλάβες από τη λιπιδική υπεροξείδωση περιλαμβάνουν μείωση της ρευστότητας των μεμβρανών, απώλεια ιονικής ομοιόστασης της μεμβράνης, απενεργοποίηση των μεμβρανικών αντλιών και μείωση της ενεργότητας των ενζύμων. Οι έμμεσες επιβλαβείς συνέπειές της είναι η παραγωγή αλδεϋδικών ενώσεων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση τοξικών, καρκινογόνων και μεταλλαξιγόνων ουσιών στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον (Βαλαβανίδης Α. 2003).

1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός οξειδωμένου υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell 2001). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας το σχηματισμό τους (Scalbert A. et al. 2005).

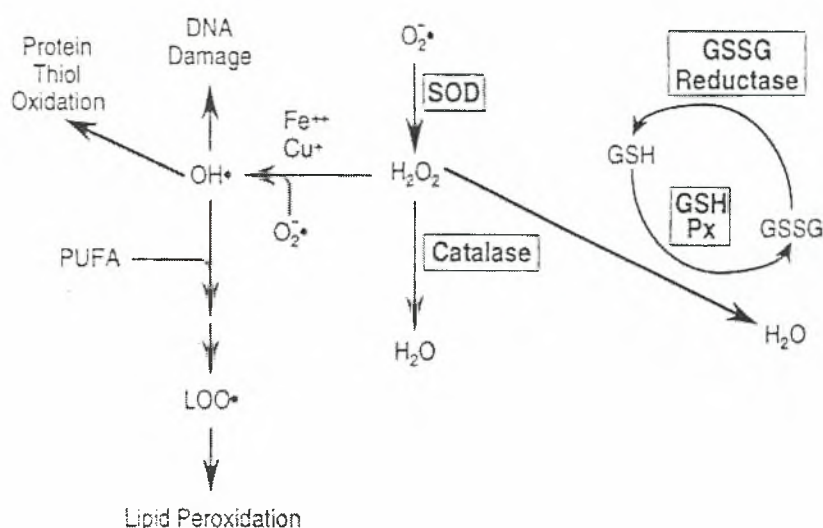
Η προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική δράση των ROS επιτυγχάνεται μέσω των αντιοξειδωτικών-αμυντικών μηχανισμών, οι οποίοι διακρίνονται: α) στα αντιοξειδωτικά ένζυμα, β) στα διαλυτά αντιοξειδωτικά, γ) στα αντιοξειδωτικά της διατροφής και δ) στους χηλικούς δεσμευτές μετάλλων (Mylonas C. and Kouretas D. 1999). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας, ενώ στη δεύτερη γραμμή άμυνας ανήκουν δευτερεύουσες ενζυμικές ουσίες και μικρού μοριακού βάρους βιταμίνες και αντιοξειδωτικές ουσίες (Βαλαβανίδης Α. 2003).

Αντιοξειδωτικά ένζυμα

- Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) απαντά σε 3 μορφές: τη κυτταροπλασματική μορφή (Cu-ZnSOD) τη μιτοχονδριακή (MnSOD), και σε μία

νέα μορφή που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και εντοπίζεται εξωκυτταρικά. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 .

- Η καταλάση (CAT) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$, εξουδετερώνοντας το H_2O_2 που με μεταλλικά ιόντα μπορεί να παράγει την εξαιρετικά δραστική ρίζα OH^{\bullet} . Η CAT βρίσκεται στα υπεροξειδισώματα και περιέχει αίμη. Είναι ιδιαίτερα άφθονη στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα.
- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι μία ομάδα κυτταροπλασματικών, μιτοχονδριακών και εξωκυττάρων ενζύμων, που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στην καρδιά, στους πνεύμονες και στον εγκέφαλο. Μετατρέπει τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων και το H_2O_2 σε H_2O και σταθερές αλκοόλες, μέσω οξείδωσης του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης σε GSSG (οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης). Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$ (Mylonas C. and Kouretas D. 1999).
- Η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) βρίσκεται στο ήπαρ και καταλύει την αντίδραση: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια.
- Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) καταλύει την αντίδραση: $G6PD + NADP^+ \rightarrow 6\text{-φωσφορογλυκολακτόνη} + NADPH + H^+$ και εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα (Εικόνα 7) (Βαλαβανίδης Α. 2003).



Εικόνα 7: Συμμετοχή των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Mylonas C. and Kouretas D. 1999).

Διαλυτά αντιοξειδωτικά

Παίζουν σημαντικό ρόλο στη κυκλοφορία του αίματος και στο εντερικό υγρό. Σε αυτά περιλαμβάνονται: η GSH (γλουταθειόνη), το ουρικό οξύ, η λευκοματίνη και διάφορες αιμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (π.χ. αιμοπηξίνη) (Mylonas C. and Kouretas D. 1999).

Αντιοξειδωτικά της διατροφής

- Οι πολυφαινόλες έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στη δραστικότητα του φαινολικού τμήματος του μορίου τους (Rice Evans C.A. et al. 1997).

- Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι συνένζυμο της υδροξυλάσης της προλίνης, η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση του κολλαγόνου και της β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης, η οποία μετατρέπει την ντοπαμίνη σε νοραδρεναλίνη. Παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ικανότητες, αντιδρώντας με ελεύθερες ρίζες και παράγοντας το δευδροασκορβικό οξύ (DHA):

$$AA + 2 H + 2 O_2^{\bullet} \rightarrow 2 H_2O_2 + DHA.$$
 Έρευνες δείχνουν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης C συνδυάζει αντιμεταλλαξιγόνο δράση, περιορισμό του οξειδωτικού stress και αντικαρκινική δράση.
- Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) δρα ως δεσμευτής των ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας από τη λιπιδική υπεροξείδωση.
- Το β-καροτένιο συμμετέχει στην απόσβεση της μονήρους κατάστασης του οξυγόνου (1O_2).
- Το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) παίζει σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες (Mylonas C. and Kouretas D. 1999).

Χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν διάφορες ενζυμικές και μη ενζυμικές πρωτεΐνες, όπως SOD (Cu/Fe), κυτοχρωμική οξειδάση (Cu), κυτοχρώματα (Se), φερριτίνη (Fe) και λακτοφερίνη (Fe). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες συμβάλλουν στον περιορισμό των οξειδωτικών καταστάσεων (Mylonas C. and Kouretas D. 1999)

1.5. Πολυφαινόλες και χημειοπροστασία

1.5.1. Κατηγορίες χημειοπροστατευτικών παραγόντων

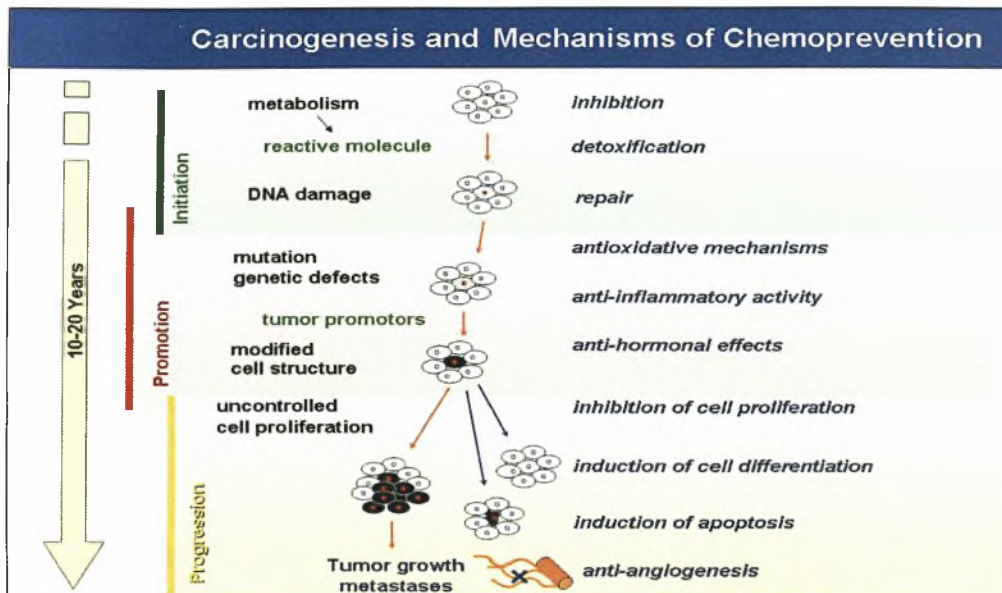
Επιδημιολογικές έρευνες απέδειξαν ότι είναι δυνατή η πρόληψη του καρκίνου καθώς και άλλων χρόνιων ασθενειών με παρόμοιους παθογενετικούς μηχανισμούς, όπως είναι το οξειδωτικό stress, η χρόνια φλεγμονή και η βλάβη του DNA. Μια προφανή προσέγγιση για την παρεμπόδιση του καρκίνου αποτελεί η μείωση ή η αποφυγή της ανθρώπινης έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα, μέσω ελέγχου του χώρου εργασίας και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής. Μία συμπληρωματική στρατηγική είναι η ενίσχυση της ανθεκτικότητας των ξενιστών στη δράση μεταλλαξιγόνων/καρκινογόνων και/ή η αναστολή της εξέλιξης μίας ασθένειας μέσω χημειοπροστατευτικών παραγόντων (De Flora S. and Ferguson L.R. 2005).

Ως χημειοπροφύλαξη από τον καρκίνο ορίζεται η παρεμπόδιση της επαγωγής ή η αναστολή ή η καθυστέρηση της εξέλιξης του καρκίνου, ή η αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας σε ένα προκαρκινικό στάδιο μέσω συνθετικών ή διαιτητικών ουσιών, όπως είναι μακροστοιχεία, μικροστοιχεία ή φυτοχημικές ουσίες (De Flora S. and Ferguson L.R. 2005).

Η χημειοπροστασία μπορεί να οργανωθεί σε τρία επίπεδα: α) στο πρωτογενές επίπεδο, όπου μειώνεται το ρίσκο εμφάνισης καρκίνου σε υγιή άτομα, β) στο δευτερογενές επίπεδο, όπου παρεμποδίζεται η ανάπτυξη καρκίνου σε άτομα που βρίσκονται ήδη σε προκαρκινικό στάδιο (π.χ. ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, δυσπλασία και λευκοπλασία) και γ) στο τριτογενές επίπεδο, που στοχεύει σε καρκινοπαθείς μετά τη θεραπεία, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη νέου όγκου ή την επανεμφάνισή του (Shukla Y. and Kumar Pal S. 2004).

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: α) στους παράγοντες παρεμπόδισης του σχηματισμού και της δράσης του καρκινογόνου

(blocking agents) και β) στους παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής αύξησης (suppressing agents) (Εικόνα 8) (Smith J.J. et al. 2005).



Εικόνα 8: Πολυσταδιακή καρκινογένεση και μηχανισμοί δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Παράγοντες παρεμπόδισης του σχηματισμού και της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents)

Συνιστούν κυρίως παράγοντες που εμποδίζουν την πρόκληση μεταλλάξεων στο DNA που αποτελεί βασική προϋπόθεση για το **στάδιο έναρξης** της καρκινογενετικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, οι κύριοι μηχανισμοί δράσης τους περιλαμβάνουν: **1)** αναστολή της μεταβολικής ενεργοποίησης των καρκινογόνων (Fresco D. et al. 2006, Shukla Y. and Kumar Pal S. 2004), **2)** αλλαγή στο προφίλ των μεταβολικών ενζύμων της φάσης I και II, ενισχύοντας τη δράση των ενζύμων της φάσης II που πραγματοποιούν αντιδράσεις σύζευξης, οι οποίες απενεργοποιούν το καρκινογόνο προάγοντας την έκκρισή του (Manson M.M. et al. 2000, Smith J.J. et al. 2005, Shukla Y. and Kumar Pal S. 2004), **3)** επαγωγή των ενζύμων αποκατάστασης των βλαβών στο DNA (Stoner G.D. et al. 1997) και **4)** εξουδετέρωση των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των **ελεύθερων ριζών**, οι οποίες προσβάλλουν βασικά κυτταρικά μόρια, όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες (Manson M.M. et al. 2000, Smith J.J. et al. 2005, Fresco D. et al. 2006).

Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής αύξησης (suppressing agents)

Δρουν στα στάδια της **προαγωγής/προόδου**, αναστέλλοντας τον μετασχηματισμό των προκαρκινικών κυττάρων σε κακοήθεις όγκους. Δεν έχουν καθοριστεί πλήρως και φαίνεται να περιλαμβάνουν: **1)** Τροποποίηση της οδού ‘μετάδοσης σήματος’ (signal transduction), **2)** ρύθμιση της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, **3)** αναστολή της δράσης των ογκογονιδίων, **4)** αναστολή του μεταβολισμού των πολυαμινών, **5)** επαγωγή της τελικής διαφοροποίησης, **6)** διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, **7)** επαγωγή της κυτταρικής επικοινωνίας, **8)** επαγωγή απόπτωσης, **9)** επιδιόρθωση της ανισορροπίας της μεθυλίωσης του DNA, **10)** αναστολή αγγειογένεσης, **11)** αναστολή

αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, 12) ενεργοποίηση των γονιδίων αντιμετάστασης και 13) αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (Κουρέτας Δ. Βιοχημική τοξικολογία, Smith J.J. et al. 2005).

1.5.2. Αντικαρκινική δράση των πολυφαινόλων

Οι πολυφαινόλες που προσλαμβάνονται με τη διατροφή και περιέχονται σε υψηλές ποσότητες στα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι, τα **όσπρια**, το κρασί, τον καφέ, το κακάο, τα δημητριακά και το ελαιόλαδο αποτελούν σημαντική κατηγορία φυτοχημικών ουσιών, η οποία έχει βρεθεί ότι επιδεικνύει αποτελεσματική χημειοπροστατευτική δράση.

Επιδημιολογικές, *in vivo* και *in vitro* έρευνες έδειξαν ότι η πρόσληψη φλαβονοειδών μέσω της διαίτας παρουσιάζει μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Μία πληθώρα επιστημονικών μελετών έδειξε ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέμβουν σε όλα τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας, είτε παρεμποδίζοντας το στάδιο έναρξης, είτε αναστρέφοντας το προκαρκινικό στάδιο (προαγωγή), είτε επιβραδύνοντας την εξέλιξη και το μετασχηματισμό των προκαρκινικών κυττάρων σε κακοήθεις όγκους (στάδιο προόδου) (Young-Joon Surh 2003).

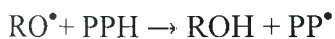
1.5.2.a. Παρέμβαση των πολυφαινόλων στο στάδιο έναρξης της καρκινογενετικής διαδικασίας

Από αρκετές μελέτες έχει προκύψει μία σειρά διαφορετικών μηχανισμών, μέσω των οποίων εκδηλώνεται η **αντιμεταλλαξιγόνος/χημειοπροστατευτική** δράση των πολυφαινόλων κυρίως στο **στάδιο έναρξης** της καρκινογενετικής διαδικασίας. Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί είναι οι παρακάτω:

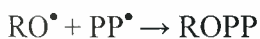
Αντιοξειδωτική δράση

Έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν **αντιοξειδωτικά** και ως **δεσμευτές/αδρανοποιητές των ελευθέρων ριζών**, περιορίζοντας την οξειδωτική καταστροφή του DNA και τη μεταλλαξιγένεση, που φαίνεται να σχετίζονται με την ανάπτυξη ορισμένων τύπων καρκίνου και άλλων νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Young-Joon Surh 2003).

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες δρουν ως δότες ατόμου H στις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλοντας την οξείδωση των λιπιδίων και άλλων βιολογικών μορίων



Η σχηματιζόμενη φαινόξυλο-ρίζα (PP^{\bullet}) είναι σχετικά σταθερή και δρα ως τερματιστής της αναπαραγόμενης/μεταδιδόμενης πορείας, αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες



Ακόμη, οι πολυφαινόλες, όπως το ταννικό οξύ έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με τα ιόντα μετάλλων, όπως Fe^{+2} και Cu^{+} , παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της ρίζας OH^{\bullet} , μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss (Ferguson L.R. 2001).

Τα φλαβονοειδή θεωρούνται δότες ηλεκτρονίου και όπως αποδείχτηκε *in vitro*, δρουν είτε δεσμεύοντας το ανιόν του σουπεροξειδίου, το 1O_2 και τις ρίζες υπεροξυλίου των λιπαρών οξέων είτε σταθεροποιώντας τις ελεύθερες ρίζες μέσω υδρογόνωσης ή

συμπλοκοποίησης με οξειδωτικά είδη. Επίσης, μελέτες απέδειξαν ότι οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες και πρόσφατα οι ανθοκυανίνες και οι προανθοκυανιδίνες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση μέσω δέσμευσης των ριζών οξυγόνου (Ren W. et al. 2003).

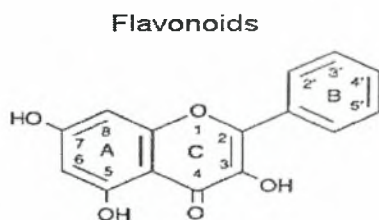
Ακόμη, ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά, επάγοντας είτε την έκφραση των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού, όπως είναι η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η ρεδοκτάση της κινόνης (QR), διευκολύνοντας έτσι την έκκριση διαφόρων οξειδωμένων μορίων, είτε των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως είναι η μεταλλοθειονίνη, μία μεταλλοδεσμευτική πρωτεΐνη με αντιοξειδωτική ικανότητα (Ferguson L.R. 2001). Το στοιχείο 'αντιοξειδωτικής απόκρισης' (ARE) που βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους από τα ξеноβιοτικά συμπεριλαμβανομένου και των πολυφαινολών (Fresco D. et al. 2006). Επιπλέον, μπορούν να αναστείλουν τη δράση των ενζύμων του Cyp450 (CYPs) ή ενζύμων, όπως είναι η κυκλοοξυγενάση και/ή η λιπooξυγενάση και η οξειδάση της ξανθίνης που προκαλούν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Ακόμη, η αλληλεπίδραση των φλαβονοειδών, όπως της κερκετίνης και της κατεχίνης με ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση. Τα φλαβονοειδή και άλλα πολυφαινολικά συστατικά βρέθηκε ότι ενδεχομένως αναστέλλουν είτε άμεσα είτε μέσω της αντιοξειδωτικής/προοξειδωτικής δράσης τους διάφορα στοιχεία στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των εικοσανοειδών (Ferguson L.R. 2001).

Τα φαινολικά οξέα και κυρίως τα υδροξυκιναμικά οξέα βρέθηκε ότι δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες αζώτου, προστατεύοντας από τη νιτροποίηση διάφορα βιολογικά μόρια. Οι κατεχίνες και κυρίως η επιγαλλοκατεχίνη παρατηρήθηκε ότι επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, αλληλεπιδρώντας με δραστικές μορφές οξυγόνου. Ακόμη, η κερκετίνη και η καιμπερόλη αύξησαν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της γλουταθειόνης και έδρασαν ως δεσμευτές των αλκυλο-περοξυ ριζών (Nichenametla S.N. et al. 2006).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της γενιστεΐνης ίσως ευθύνονται για την αντικαρκινική της δράση, όπως έδειξαν *in vivo* και *in vitro* μελετες όπου ανέστειλε το σχηματισμό του ανιόντος του σουπεροξειδίου στα κύτταρα HL-60 και αδρανοποίησε το προστιθέμενο H₂O₂ κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Tham D.M. et al. 1998).

Τα φλαβονοειδή έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τη σχέση δομής και αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Εικόνα 9). Γενικά, αυτή εξαρτάται από:

- ✓ την ορθο 3' 4' διϋδροξυ-ομάδα στον δακτύλιο B (π.χ. κατεχίνη, κερκετίνη)
- ✓ τις μετα 5,7-διϋδροξυ διευθετήσεις στον δακτύλιο A (π.χ. καιμπερόλη)
- ✓ τον 2,3 διπλό δεσμό σε συνδυασμό με την 4-κετο και 3-OH ομάδα στο δακτύλιο C για τη μετατόπιση του ηλεκτρονίου (π.χ. κερκετίνη). Παρόλα αυτά αλλαγές στη διευθέτηση των OH-ομάδων και υποκατάστασή τους από τα σάκχαρα μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών.
- ✓ Για τη δέσμευση των μεταλλικών ιόντων απαιτείται η παρουσία των ο-διφαινολικών ομάδων στις 3'4' διϋδροξυ-θέσεις στο δακτύλιο B και των κετολικών δομών 4-κετο, 3-OH, ή 4-κετο και 5-OH στο δακτύλιο C των φλαβονολών (Rice Evans C.A. et al. 1997).



Εικόνα 9: Γενική δομή των φλαβονοειδών (Rice Evans C.A. et al. 1997).

Παρεμπόδιση της μεταβολικής ενεργοποίησης του καρκινογόνου

Οι πολυφαινόλες εκτός από την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση, μπορούν να δράσουν χημειοπροστατευτικά στο στάδιο έναρξης της καρκινογενετικής διαδικασίας μέσω παρεμπόδισης της μεταβολικής ενεργοποίησης του καρκινογόνου. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δράση των ισοενζύμων CYP1A1 και CYP1A2, εμποδίζοντας τη μεταβολική ενεργοποίηση των καρκινογόνων και προστατεύοντας από την επαγόμενη κυτταρική βλάβη. Επίσης, ορισμένα φλαβονοειδή δρουν ως αναστολείς των CytP450 αρωματάσων, παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της οιστραδιόλης από τα ανδρογόνα και περιορίζοντας έτσι τη διεγερτική επίδραση των οιστρογόνων στην ανάπτυξη του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού (Ren W. et al. 2003).

Επιδιόρθωση του DNA

Οι πολυφαινόλες φαίνεται να περιορίζουν τον σχηματισμό των αρχικά μνημένων κυττάρων, δρώντας ως αντιμεταλλαξιγόνα, μέσω τροποποίησης της αντιγραφής του DNA ή/και της επιδιόρθωσης των επαγόμενων από τα μεταλλαξιγόνα βλαβών του DNA. Η βανιλίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τη μεταλλαξιγένεση, μέσω ενίσχυσης του recA συστήματος επιδιόρθωσης. Ακόμη, ορισμένες πολυφαινόλες ίσως επιδρούν στη δράση των DNA επιδιορθωτικών ενζύμων, μέσω τροποποίησης της γονιδιακής τους έκφρασης. Η μυρικετίνη ενίσχυσε τη γονιδιακή έκφραση της πολυμεράσης β, η οποία συμμετέχει στην ελεύθερη από λάθη επιδιόρθωση του DNA (Ferguson L.R. 2001).

Επίδραση στη δέσμευση των μεταλλαξιγόνων στο DNA

Στο στάδιο έναρξης, *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι το ελλαγικό οξύ, η γενιστεΐνη και σε μικρότερο βαθμό και η κουρκουμίνη ανέστειλαν την ομοιοπολική δέσμευση στο DNA του διβενζο[α,1]πυρενίου (DBP). Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι το ελλαγικό οξύ ανέστειλε την επαγόμενη από την N-νιτροσο μεθυλουρία (NMU) μεταλλαξιγένεση, εξαιτίας της παρεμπόδισης της μεθυλίωσης στην O6 θέση της γουανίνης, μέσω ενός διπλής συγγένειας μηχανισμού δέσμευσης (Ferguson L.R. 2001).

Παρεμπόδιση νιτροζοποίησης (nitrosylation)

Το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ παρατηρήθηκε ότι αναστέλλουν τον σχηματισμό των N-νιτροζο ενώσεων, δρώντας προστατευτικά έναντι της καρκινογένεσης (Ferguson L.R. 2001).

1.5.2.β. Παρέμβαση των πολυφαινολών στα στάδια προαγωγής και προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας

Οι πολυφαινόλες, όμως εκτός από την αντιμεταλλαξιγόνο/χημειοπροστατευτική δράση στο στάδιο έναρξης, μπορούν να παρέμβουν και στα **στάδια της προαγωγής και της προόδου** της καρκινογένεσης, δρώντας μέσω διαφορετικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν:

Αναστολή πολλαπλασιασμού

Τα περισσότερα φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την αναστολή, την αναστροφή ή την καθυστέρηση του συνεχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διάφορα είδη ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τα προοξειδωτικά ένζυμα, όπως είναι τα ένζυμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, οι κυκλοοξυγενάσες (COX) και οι λιποοξυγενάσες (LOX) επάγονται από διάφορους προαγωγείς του όγκου, όπως εστέρες της φορβόλης. Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την οξείδωση της ξανθίνης, τη κυκλοοξυγενάση ή τη λιποοξυγενάση, παρεμποδίζοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, ένα ένζυμο που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυαμινών και επάγεται από διάφορους προαγωγείς του όγκου, παρεμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση του DNA/πρωτεϊνών και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ακόμη, τα φλαβονοειδή δρουν ανασταλτικά έναντι των διακυτταρικών ενζύμων PTK (πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης), PKC (πρωτεϊνική κινάση C) και PIP₃ (κινάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων), τα οποία συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ren W. et al. 2003). Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η γενιστεΐνη δρα αναστέλλοντας ένζυμα που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό, όπως είναι η κινάση της τυροσίνης, η τοποϊσομεράση II και η κινάση της ιστιδίνης (Tham D.M. et al. 1998). Επιπλέον, ορισμένες πολυφαινόλες καταστέλλουν τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Activator protein-1), ο οποίος βρέθηκε υπερενεργοποιημένος σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές (Fresco D. et al. 2006). Ο AP-1 συνίσταται από ομο- ή ετερο- διμερή μεταξύ μελών των οικογενειών των πρωτεϊνών jun και fos και συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την προσαρμογή των κυττάρων (Young-Joon Surh 2003). Ακόμη, οι πολυφαινόλες μπορούν να καταστείλουν τα μεσολαβούμενα από τον αυξητικό παράγοντα μονοπάτια, παρεμβαίνοντας στην υπερέκφραση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, στην υψηλή παρουσία των αυξητικών παραγόντων και/ή στην αυξημένη δράση των PTK's, αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του όγκου (Fresco D. et al. 2006). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι καταστέλλουν τα μονοπάτια MAPKS (mitogen-activated kinases, ERK1/2, JNK, p38), τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων (Manson M.M. et al. 2000).

Παύση του κυτταρικού κύκλου

Ένας μεγάλος αριθμός καρκίνων έχει συσχετιστεί με υπερενεργοποίηση των CDK's (κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη), ως συνέπεια μεταλλάξεων στα CDK γονίδια ή στα γονίδια των CDI's (αναστολείς των CDK κινασών) (Ren W. et al. 2003). Τα φλαβονοειδή, όπως η γενιστεΐνη, η κερκετίνη, η ντενζεΐνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η καιμπερόλη, η απιγενίνη και η EGCG μπορούν να αναστείλουν διαφορετικές κυτταρικές σειρές σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου: G1, S, S/G2 και G2 είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Η EGCG έχει βρεθεί ότι άμεσα αναστέλλει τις CDK's, ενώ έμμεσα επάγει την έκφραση των γονιδίων p21 και p27 και αναστέλλει την έκφραση της κυκλίνης d1 και τη φωσφορυλίωση της Rb (Fresco D. et al. 2006). Ακόμη, ορισμένες πολυφαινόλες ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1, ο οποίος επάγει την έκφραση της p21, ενός CDK-αναστολέα, προκαλώντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S ή G2-M (Chi Chen and Ah-Ng Tony Kong 2005).

Επαγωγή απόπτωσης

Οι πολυφαινόλες δρουν χημειοπροστατευτικά ενεργοποιώντας την απόπτωση, κυρίως μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού. Σήματα που απελευθερώνονται από τα φλαβονοειδή ρυθμίζουν τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-2 και Bcl-x) ή τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bax και Bak), προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C (cytc) από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό έχει ως συνέπεια το σχηματισμό ενός αποπτωσώματος από το cytc, το APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) και την κασπάση-9, η οποία ενεργοποιεί περαιτέρω άλλες κασπάσες, όπως την κασπάση-3, 6 και 7 που αποικοδομούν ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, οδηγώντας σε μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων, τα οποία αποκτούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων. Ακόμη, οι πολυφαινόλες μπορούν να παρεμποδίσουν τα μεσολαβούμενα από τον αυξητικό παράγοντα αντιαποπτωτικά σήματα, αναστέλλοντας είτε τη δέσμευση των αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους, είτε το μονοπάτι PI3-K/Akt (*Chi Chen and Ah-Ng Tony Kong 2005*). Άλλοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απόπτωση είναι η αναστολή της DNA τοποϊσομεράσης I και II (*Ren W. et al. 2003*), η μείωση των ROS, η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, hsp's), η ενεργοποίηση των κινάσων JNK και η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB (nuclear factor- kB), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων c-myc, i-NOS και άλλων αντιαποπτωτικών γονιδίων (*Chi Chen and Ah-Ng Tony Kong 2005, Fresco D. et al. 2006*).

Επαγωγή διαφοροποίησης

Ορισμένα φλαβονοειδή βρέθηκε ότι επάγουν τη διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων καρκινικών κυτταρικών σειρών σε κύτταρα με ώριμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η επαγωγή της διαφοροποίησης ίσως οδηγεί σε περιορισμό των καρκινικών κυττάρων και σε αποκατάσταση της φυσιολογικής κυτταρικής ομοιόστασης. Για παράδειγμα, οι φλαβονόλες γενιστεΐνη, ντενζείνη και κερκετίνη παρατηρήθηκε ότι επάγουν τη διαφοροποίηση των HL-60 κυττάρων (καρκινική σειρά ανθρώπινης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας) σε μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα (*Ren W. et al. 2003*).

Αναστολή αγγειογένεσης

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών αφορά την αναστολή της αγγειογένεσης, η οποία παρατηρείται κατά την καρκινογένεση. Η δημιουργία νέων αγγείων από το προϋπάρχον μικροαγγειακό δίκτυο συμβάλλει στη διείσδυση και μετάσταση του όγκου και μεσολαβείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω τροποποίησης στον πολλαπλασιασμό και στη γονιδιακή έκφραση (*Fresco D. et al. 2006*). Η αναστολή της αγγειογένεσης οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Τα φλαβονοειδή βρέθηκε ότι μπορεί να παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης, όπως είναι η καταστροφή των αγγείων, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή ο σχηματισμός του αυλού (*Ren W. et al. 2003*). Η κερκετίνη είναι ικανή να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω μείωσης της έκφρασης και της δράσης της MMP-2 (matrix-metalloproteinase-2), η οποία αποικοδομεί τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, ώστε να αναδιοργανωθεί το τοίχωμα της αρτηρίας και να ξεκινήσει η διαδικασία της αγγειογένεσης. Ακόμη, τα φαινολικά οξέα έχει βρεθεί ότι εμποδίζουν την επαγόμενη από τον παράγοντα VEGF αγγειογένεση, παρεμβαίνοντας στην ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από τις ROS- Src κινάσης (*Fresco D. et al. 2006*).

Τροποποίηση της αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Τα φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, έναν μεμβρανικό μεταφορέα (ATP-binding cassette), οποίος αντλεί έξω από τα κύτταρα τα χορηγούμενα αντικαρκινικά φάρμακα και έτσι ευθύνεται για την χαμηλή απόδοση της χημειοθεραπείας (Ren W. et al. 2003).

1.5.2.γ. Αντικαρκινικές ιδιότητες των φυτοοιστρογόνων

Τα **φυτοοιστρογόνα**, τα οποία περιλαμβάνουν τις ισοφλαβόνες και τα λιγνάνια έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου. Μελέτες, έδειξαν ότι οι ισοφλαβόνες δεσμεύονται στην β-ισομορφή του υποδοχέα των οιστρογόνων (ERβ), η οποία σε αντίθεση με την α-ισομορφή (ERα) δεν προάγει τον πολλαπλασιασμό του επιθηλίου στο στήθος, προστατεύοντας από τον σχετιζόμενο με τα οιστρογόνα κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού (Champ M.M.-J. 2002, Barnes S. et al. 2000, Ferguson L.R. 2001). Επίσης, όπως παρατηρήθηκε από *in vitro* και *in vivo* μελέτες, οι ισοφλαβόνες ίσως προάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω down-regulation (μειορύθμισης) του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και ενεργοποιώντας την απόπτωση μέσω του μιτοχondριακού μονοπατιού, προστατεύοντας ενδεχομένως από καρκίνο του προστάτη, του παχέος εντέρου, του λαιμού και του εγκεφάλου (Champ M.M.-J. 2002). Επίσης, δίαιτα πλούσια σε φυτοοιστρογόνα ίσως μπορεί να προστατεύσει από καρκίνο του προστάτη, μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως μείωση των επιπέδων των ανδρογόνων, αύξηση της συγκέντρωσης της ορμονοδεσμευτικής γλοβουλίνης (Sex Hormone-Binding Globulin, SHBG), ανταγωνιστικής δέσμευσης των ορμονικών υποδοχέων και μείωση της παραγωγής της διϋδροτεστοστερόνης (Tham D.M. et al. 1998).

1.6. Λοιπές βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

1.6.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι δρουν στα αγγεία με τη μορφή της βιταμίνης Ρ και είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της αγγειακής διαπερατότητας. Επίσης, βρέθηκε ότι αυξάνουν την ανθεκτικότητα των τριχοειδών αγγείων, επιδρώντας πάνω στα αιμοπετάλια, στα λευκοκύτταρα και στα ένζυμα της πήξης του αίματος (Carlo G.D. et al. 1999).

Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν αντιαλλεργικές ιδιότητες, αναστέλλοντας τα ένζυμα cAMP φωσφοδιεστεράση και Ca^{+2} -ΑΤΡάση, που αυξάνουν την απελευθέρωση της ισταμίνης από τα βασεόφιλα και τα σιτευτικά κύτταρα. Τα υψηλά επίπεδα cAMP και τα χαμηλά επίπεδα του ενδοκυτταρικού Ca^{+2} , μειώνουν την απελευθέρωση της ισταμίνης από τα ενδοκυτταρικά κοκκία (Carlo G.D. et al. 1999).

In vitro και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή διαθέτουν και αντιφλεγμονώδη δράση, τροποποιώντας το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος των αιμοπεταλίων. Ορισμένα, όπως η μυρικετίνη και η κερκετίνη παρεμποδίζουν σε υψηλές συγκεντρώσεις τη δράση της κυκλοοξυγενάσης και της λιποοξυγενάσης (Carlo G.D. et al. 1999).

Επίσης, η κερκετίνη, η καιμπερόλη και η ναριγκίνη προστατεύουν τον γαστρικό βλεννογόνο από μία ποικιλία παραγόντων που προκαλούν έλκος. Ακόμη, τα φλαβονοειδή προστατεύουν από τον διαβήτη και παρουσιάζουν αντιϊικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η επίδρασή τους στο ανοσολογικό σύστημα εξαρτάται από την ικανότητά τους να αναστέλλουν το σχηματισμό των εικοσανοειδών και της ισταμίνης και να δρουν ως αδρανοποιητές των ελευθέρων ριζών (Carlo G.D. et al. 1999).

1.6.2. Φυτοοιστρογόνα

Τα φυτοοιστρογόνα έχει βρεθεί ότι δρουν προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, της οστεοπόρωσης και των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης (*Champ M.M.-J. 2000, Tham D.M. et al. 1998*). Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ισοφλαβόνες συμμετέχουν και στη θεραπεία μεταβολικών ασθενειών. Συγκεκριμένα, η γενιστεΐνη, η ντενζεΐνη και η βιοκανίνη Α έχει βρεθεί ότι αποτελούν αγωνιστές του υποδοχέα –ERRα (estrogen-related Receptor α), ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση της ομοιόστασης, αποτελώντας έτσι πιθανό στόχο για τη θεραπεία των μεταβολικών ασθενειών (*Champ M.M.-J. 2002*).

Λιγότερο μελετημένη είναι η πιθανή προστατευτική δράση των ισοφλαβονών έναντι των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Επιδημιολογικές έρευνες, έδειξαν ότι η γλυκίτεΐνη σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης άνοιας, λόγω μείωσης του σχηματισμού του β-αμυλοειδούς (*Champ M.M.-J. 2002*).

Τα φυτοοιστρογόνα της σόγιας βρέθηκε ότι προκαλούν στους άνδρες και στις γυναίκες μείωση των συγκεντρώσεων της LDL και της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος, ενώ στις γυναίκες αύξηση της HDL. Δύο μηχανισμοί για την υποχοληστερολεμική δράση των φυτοοιστρογόνων έχουν προταθεί: το up-regulation των LDL-υποδοχέων και/ή αναστολή σύνθεσης της ενδογενούς χοληστερόλης. Τα λιγνάνια ίσως επηρεάζουν την ομοιόσταση της χοληστερόλης, αναστέλλοντας το ένζυμο, υδροξυλάση της 7α-χοληστερόλης, το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό των χολικών οξέων από τη χοληστερόλη (*Tham D.M. et al. 1998*).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η γενιστεΐνη δρά αντιθρομβωτικά, αναστέλλοντας τη δράση της κινάσης της τυροσίνης. Συγκεκριμένα, μειώνει τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων της τυροσίνης των πρωτεϊνών στα αιμοπετάλια, προκαλώντας μείωση της ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η πιθανότητα ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης (*Tham D.M. et al. 1998*).

1.6.3. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα και κυρίως το καφεϊκό, το ισοφερουλικό και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ έχει βρεθεί ότι προκαλούν μείωση της γλυκόζης στο αίμα, μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν αναστολή της γλυκονογένεσης, αδρενεργική διέγερση πρόσληψης της γλυκόζης ή διέγερση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης από τα β-παγκρεατικά κύτταρα (*Scalbert A. et al. 2005*).

1.6.4. Προανθοκυανιδίνες

Οι προανθοκυανιδίνες ασκούν ευεργετική δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα μειώνοντας την LDL και αποτρέποντας την οξείδωσή της, ενώ παράλληλα περιορίζουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Επίσης, ασκούν χαλαρωτική δράση στα αγγεία (μειώνοντας έτσι την πίεση), ενώ αυξάνουν την ανθεκτικότητά τους, προστατεύοντας από θραύσεις, διαρροές και εκφυλίσεις. Ακόμη, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, παρουσιάζοντας αντιαλλεργικές και αντιπλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, βρέθηκε ότι υποστηρίζουν τη σύνθεση του κολλαγόνου και προστατεύουν από τη διάσπασή του, παρέχοντας έτσι ελαστικότητα στο δέρμα και προστασία από την πρόωρη γήρανση. Τέλος, βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικές σε περιπτώσεις μείωσης της ικανότητας συγκέντρωσης, λόγω της αντιοξειδωτικής προστασίας των νευροδιαβιβαστών και της βελτίωσης της εγκεφαλικής μικροκυκλοφορίας (*Ariga T. 1990*).

1.6.5. Κίνδυνοι που σχετίζονται με την υψηλή κατανάλωση πολυφαινόλων

Οι πολυφαινόλες, όμως εκτός από τις προστατευτικές/ευεργετικές τους επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία βρέθηκε ότι ασκούν και κάποιες δυσμενείς δράσεις όταν καταναλώνονται σε υψηλές ποσότητες. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν προ-οξειδωτική δράση και εμποδίζουν την απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου, μέσω σχηματισμού σταθερών χηλικών ενώσεων με τα ιόντα σιδήρου. Ακόμη, τα φυτοοιστρογόνα δρώντας ως αγωνιστές των υποδοχέων των οιστρογόνων ίσως διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Τέλος, τα φλαβονοειδή ίσως επηρεάζουν τη δραστηριότητα του θυρεοειδούς αδένα, εμφανίζοντας βρογχοκηλογόνο δράση (*Scalbert A. et al. 2005*).

1.7. Σκοπός

Στα πλαίσια γενικής μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών φυτών, με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Από ένα σύνολο ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae* επιλέχθηκαν τα φυτά *Lotus Edulis* και *Vicia faba* για περαιτέρω διερεύνηση των συστατικών τους και των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lotus edulis* και *Vicia faba* καθώς και τα κλάσματα καθαρών μορίων που προέκυψαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis* παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για την περαιτέρω μελέτη του μοριακού μηχανισμού αντιοξειδωτικής τους δράσης, εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους στην επαγόμενη από οξειδωτικό παράγοντα (μπλεομυκίνη) μεταλλαξιγένεση σε βακτηριακά κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 με τη μέθοδο του Ames test. Συνολικά, μελετήθηκαν τα 2 μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των συγκεκριμένων φυτών και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis*.

1.8. Lotus edulis και Vicia faba

1.8.1. Lotus edulis

Το γένος *Lotus* ανήκει στην οικογένεια φυτών *Leguminosae* και προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου. Ο καρπός του φυτού *Lotus edulis*, καταναλώνεται ως τρόφιμο ενώ το φυτό αναπτύσσει συμβιωτική σχέση με βακτήρια του εδάφους, τα οποία σχηματίζουν φυμάτια στις ρίζες του φυτού, όπου δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (Εικόνα 10) (www.pfaf.org). Όπως όλα τα ψυχανθή είναι πλούσιο σε φυτοχημικές ουσίες, σημαντική κατηγορία των οποίων αποτελούν οι πολυφαινόλες, όπως είναι τα φλαβονοειδή κυρίως οι προανθοκυανιδίνες (Sivakumaran S. et al. 2006) και οι ισοφλαβόνες, τα φαινολικά οξέα και τα λιγνάνια (Champ M.M-J. 2002).



A B
Εικόνα 10: *Lotus Edulis*: (A) καρπός και (B) φυτό

1.8.2. Vicia faba

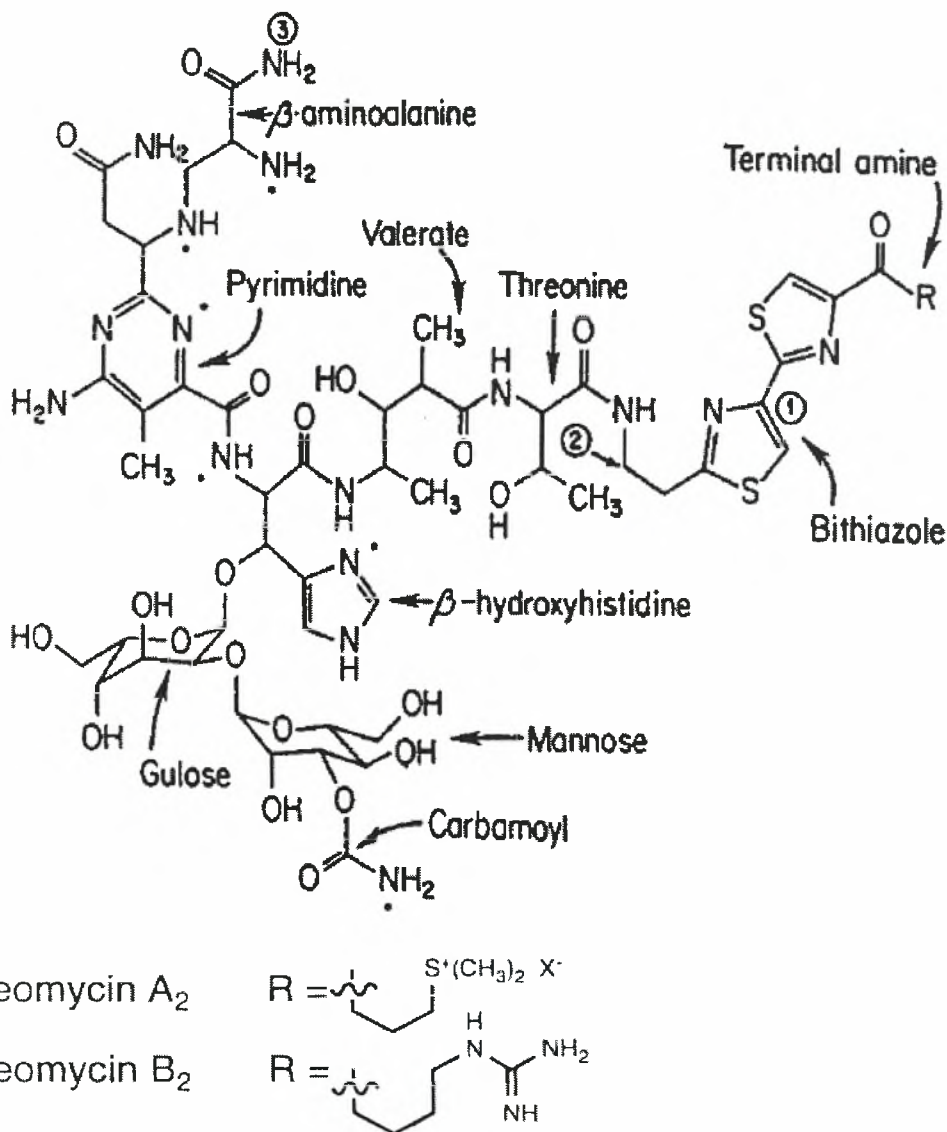
Το φυτό *Vicia faba* είναι ένα είδος ψυχανθούς της οικογένειας *Fabaceae* προερχόμενο από τη Β. Αφρική και τη Ν.Δ. Ασία και καλλιεργείται ευρέως σε όλες τις ψυχρές και εύκρατες περιοχές του Παλαιού Κόσμου. Τα σπέρματά του, τα γνωστά κουκιά, καταναλώνονται χλωρά ή ξερά, ενώ οι καρποί του μαγειρεύονται όσο είναι ακόμα χλωροί (Εικόνα 11) (www.Wikipedia.com). Τα σπέρματα εκτός από την υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, χαρακτηρίζονται και από υψηλές ποσότητες μη θρεπτικών συστατικών (π.χ. αναστολείς πρωτεασών και αμυλάσης), σημαντική κατηγορία των οποίων αποτελούν οι πολυφαινόλες, κυρίως φλαβονόλες και προανθοκυανιδίνες (Merghem R. et al. 2004).



Εικόνα 11: *Vicia faba* (καρποί και σπέρματα)

1.9. Μπλεομυκίνη (Bleomycin, BLM)

Οι μπλεομυκίνες αποτελούν μία οικογένεια σύνθετων αντιβιοτικών γλυκοπεπτιδίων που απομονώνονται από καλλιέργειες του *Streptomyces verticillus* και εμφανίζουν αντινεοπλασματικές ιδιότητες. Οι δύο κύριοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται κλινικά είναι η μπλεομυκίνη A2 και η μπλεομυκίνη B2. Η μπλεομυκίνη A2 χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νόσου Hodgkin, του μη- Hodgkin λεμφώματος, και των καρκίνων των όρχεων, του τραχήλου της μήτρας και του αυχένα. Είναι βασικό φάρμακο στη χημειοθεραπεία των καρκίνων των γεννητικών αδένων και η παράλειψή του από το θεραπευτικό σχήμα έχει σαν συνέπεια σημαντική μείωση του θεραπευτικού αποτελέσματος (Hecht S.M. 2000). Επίσης, η μπλεομυκίνη έχει μέγιστη δράση κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου G2 και M (Dorr R.T. 1992).



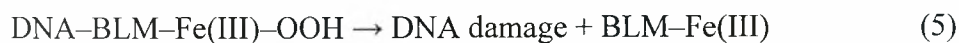
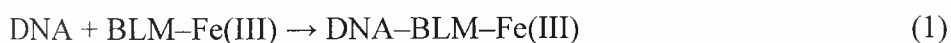
Εικόνα 12: Χημική δομή της μπλεομυκίνης (τύπος A2 και B2) (Burger R.M. 1998).

Η μπλεομυκίνη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 διαθέτει τρεις λειτουργικές περιοχές:

- Την μεταλλο-δεσμευτική περιοχή (metal-binding domain) (3): Μία ομάδα πέντε ατόμων αζώτου που τακτοποιούνται σε μία τετραγωνική-πυραμιδική διαμόρφωση, δεσμεύει τα δισθενή μεταλλικά ιόντα, όπως είναι ο σίδηρος (ιδιαίτερα δραστικός προσδέτης) και ο χαλκός (δεν είναι δραστικός προσδέτης). Το μοριακό οξυγόνο που δεσμεύεται από το σίδηρο μπορεί να παράγει τις ιδιαίτερα δραστικές ελεύθερες ρίζες και το Fe(III) (Dorr R.T. 1992).
- Την περιοχή δέσμευσης στο DNA (DNA-binding domain) (1,2): Οι δακτύλιοι βιθιαζόλης και οι COOH-τελικοί υποκαταστάτες εμπλέκονται στη δέσμευση του DNA. Συγκεκριμένα, η μπλεομυκίνη δεσμεύεται στις πλούσιες σε G-C θέσεις του DNA, μέσω της σύνδεσης του τριπεπτιδίου 'S' και της μερικής παρεμβολής των δακτυλίων βιθιαζόλης. (Hecht S.M. 2000, Dorr R.T. 1992).
- Την περιοχή των υδατανθράκων, η οποία είναι η λιγότερο καλά χαρακτηρισμένη και φαίνεται να συμμετέχει στην κυτταρική αναγνώριση από τη μπλεομυκίνη και ενδεχομένως στην κυτταρική πρόσληψη και συναρμογή του μεταλλικού ιόντος (Hecht S.M. 2000).

Μηχανισμός δράσης της μπλεομυκίνης

Ο μηχανισμός κυτταροτοξικότητας οφείλεται στην ικανότητα της μπλεομυκίνης να δεσμεύεται και να αποδομεί το DNA παρουσία Fe^{+2} , O_2 και ενός κατάλληλου αναγωγικού παράγοντα, ως συμπάροντες. Το σύμπλεγμα BLM-Fe(II)- O_2 μετατρέπεται στην 'ενεργοποιημένη μπλεομυκίνη' (DNA-BLM-Fe(III)-OOH), μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου που προέρχεται είτε από ένα άλλο σύμπλεγμα BLM-Fe(II), είτε από έναν κατάλληλο αναγωγικό παράγοντα. Η 'ενεργοποιημένη μπλεομυκίνη' διασπάται απελευθερώνοντας μία ελεύθερη ρίζα, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόκληση οξειδωτικής διάσπασης των αλυσίδων του DNA, ενώ παράλληλα η BLM-Fe(II) μετατρέπεται σε BLM-Fe(III) (Αντιδράσεις 1-5) (Sugihara N. et al. 2003).

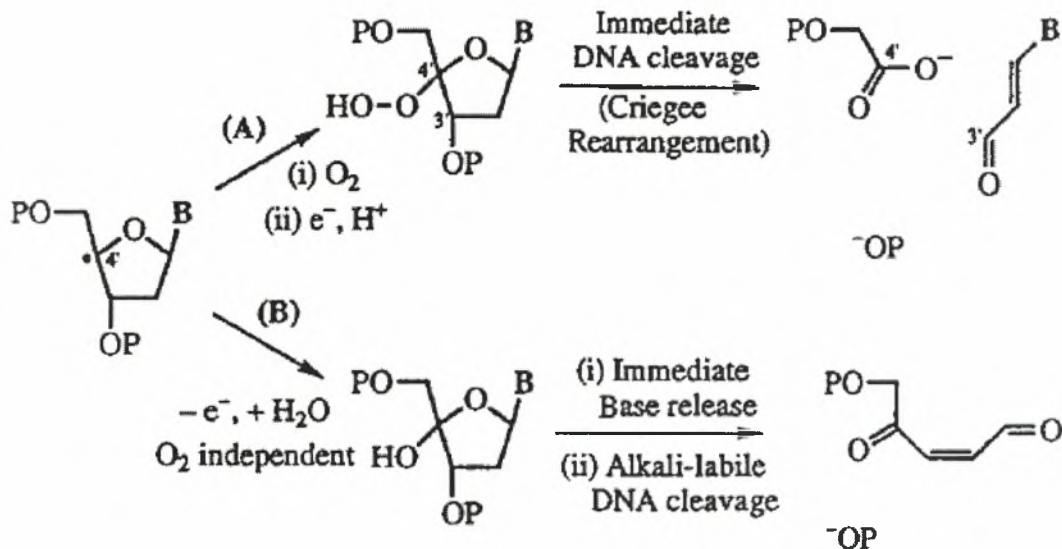


Οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται από το σύμπλεγμα Fe^{+2} -BLM- O_2 , δημιουργούν ένα σύμπλεγμα με τις έλικες του DNA, έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή τεμαχίων της απλής ή της διπλής έλικας του DNA, που αναφέρονται ως τεμάχια, ελλείμματα ή τμήματα του χρωμοσωμικού DNA (Page et al. 2000). Συγκεκριμένα οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες $O_2^{\bullet-}$ και OH^{\bullet} προκαλούν μονόκλιωνα σπασίματα στο DNA, στους 3'-4' δεσμούς της δεοξυριβόζης, παράγοντας ελεύθερα τεμάχια βάσεων (free base propenals) κυρίως της θυμίνης (Dorr R.T. 1992).

Έτσι παράγοντες που εμποδίζουν την δράση της μπλεομυκίνης μπορεί να σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες που απελευθερώνονται από τη διάσπαση της 'ενεργοποιημένης μπλεομυκίνης'.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη αποικοδόμηση του DNA, χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία του και συμβαίνει κυρίως σε ένα υποσύνολο από διαθέσιμες $-5'GT3'$ - και $-5'GC3'$ - αλληλουχίες (Long E.C. et al. 1990).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 13, δύο είδη προϊόντων σχηματίζονται όταν το σύμπλεγμα Fe BLM αποικοδομεί το DNA.



Εικόνα 13: Προϊόντα αποικοδόμησης του DNA από το σύμπλεγμα Fe BL (Burger R.M. 1998).

Η 'ενεργοποιημένη μπλεομυκίνη' απομακρύνει το άτομο του H από τον C4' της δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται η ενδιάμεση 4'-ρίζα, η οποία ανάλογα με τη παρουσία ή όχι του O_2 μπορεί να ακολουθήσει δύο μονοπάτια:

- Στο πρώτο μονοπάτι (A) η ενδιάμεση 4'-ρίζα αντιδρά με το O_2 , σχηματίζοντας την 4'ρίζα υπεροξυλίου, η οποία ανάγεται στο 4'υδροϋπεροξίδιο (Chen J. and Stubbe J.A. 2005). Το συγκεκριμένο προϊόν μετά από διάφορους χημικούς μετασχηματισμούς υφίσταται διάσπαση της αλυσίδας του DNA στους 3'-4' δεσμούς της δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός σχασμένου DNA με άκρα 3'-φωσφογλυκολικό/5'-φωσφορικό ($3'-PG/5'-P$). Επιπλέον, παράγονται νουκλεϊκές βάσεις που μαζί με τους άνθρακες 1-3 της δεοξυριβόζης οδηγούν στο σχηματισμό προϊόντων που χαρακτηρίζονται ως τεμάχια βάσεων (base propenals) (Burger R.M. 1998, Long E.C. et al. 1990, Hecht S.M. 2000).
- Το δεύτερο μονοπάτι (B) είναι ανεξάρτητο από το O_2 και περιλαμβάνει την οξείδωση της ενδιάμεσης 4'-ρίζας σε 4'καρβοκατιόν στο οποίο προστίθεται το H_2O (Chen J. and Stubbe J.A. 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την απελευθέρωση της βάσης και το σχηματισμό του άγλυκου προϊόντος δεοξυριβόζης, το οποίο οδηγεί στην ασταθή λόγω αλκαλίου διάσπαση του DNA (alkali-labile DNA cleavage) (Burger R.M. 1998, Long E.C. et al. 1990). Η ίδια διάσπαση μπορεί να επιτευχθεί και από τις αλκυλαμίνες και τις υδραζίνες (Hecht S.M. 2000).

Επίσης, βρέθηκε ότι η μπλεομυκίνη *in vitro* προκαλεί εκτός από μονόκλωνα σπασίματα και δίκλωνα, η αναλογία των οποίων εξαρτάται από την αλληλουχία του DNA. Τα δίκλωνα σπασίματα που συμβαίνουν συνήθως σε μικρότερη αναλογία, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την προκαλούμενη από τη μπλεομυκίνη κυτταροτοξικότητα., ενώ ο μηχανισμός επιδιόρθωσής τους δεν είναι ακόμη γνώστος (Stubble J. et al. 1996). Τα

δίκλιωνα σπασίματα του DNA πραγματοποιούνται μέσω του δεύτερου μονοπατιού και φαίνεται να απαιτούν επανενεργοποίηση της μπλεομυκίνης και αναγωγή της ρίζας υπεροξυλίου (*Chen J. and Stubbe J.A. 2005*).

Συνεπώς, η ενσωμάτωση του φαρμάκου εντός του DNA αποτελεί το αρχικό βήμα, πριν ο Fe^{+2} οξειδωθεί και το οξυγόνο αναχθεί προς τις ρίζες $\text{O}_2^{\bullet -}$ και OH^{\bullet} . Η διάσπαση του DNA λαμβάνει χώρα μετά την προσάρτηση του συμπλέγματος της μπλεομυκίνης και η διάσπαση της έλικας του απαιτεί O_2 (*Page et al. 2000*).

Φαρμακοκινητική

Οι μπλεομυκίνες απεκκρίνονται από τους νεφρούς. Είναι μεγάλα μόρια (κατιόντα) και διαπερνούν ελάχιστα τις κυτταρικές μεμβράνες συνδεδεμένες με μία μεμβρανική πρωτεΐνη. Οι εισερχόμενες μπλεομυκίνες είτε μετατίθενται προς τον πυρήνα είτε υδρολύονται από την υδρολάση της μπλεομυκίνης, που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών της κυστεΐνης. Το συγκεκριμένο ένζυμο που αντικαθιστά την τελική αμίνη με μία OH -ομάδα, αναστέλλοντας τη δέσμευση του μεταλλικού ιόντος και κατ' επέκταση την κυτταροτοξική δράση, είναι παρόν στα φυσιολογικά και κακοήθη κύτταρα, αλλά βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση στους πνεύμονες και στο δέρμα. Αυτό εξηγεί και την τοξικότητα της μπλεομυκίνης σε αυτούς τους δύο ιστούς. Η πνευμονική τοξικότητα αποτελεί το μείζον πρόβλημα και εκδηλώνεται ως υποξεία ή χρόνια διάμεση πνευμονία και σε ένα μεταγενέστερο στάδιο ως πνευμονική ίνωση (*Page et al. 2000*).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια

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

SIGMA (Η.Π.Α)

Θειικό Μαγνήσιο (Magnesium sulfate , $MgSO_4 \cdot H_2O$)

Φωσφορικό Αμμωνιακό Νάτριο (Sodium ammonium hydrogen phosphate, $Na_2NH_2PO_4 \cdot 4H_2O$)

L-Ιστιδίνη (L- Histidine)

Pancreas (Ισπανία)

Άγαρ (Agar bacteriological European type)

D(+)-Γλυκόζη (D(+)-Glucose)

Κιτρικό οξύ (Citric acid 1-hydrate)

Άνυδρο διβασικό φωσφορικό κάλιο (di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous, K_2HPO_4)

Χλωριούχο νάτριο (Sodium chloride, NaCl)

Merck (Γερμανία)

Nutrient Broth microbiology

Nippon Kayaku Co., Ltd (Τόκιο, Ιαπωνία)

Μπλεομυκίνη (Bleomycin)

2.1.2 Στελέχη *Salmonella*

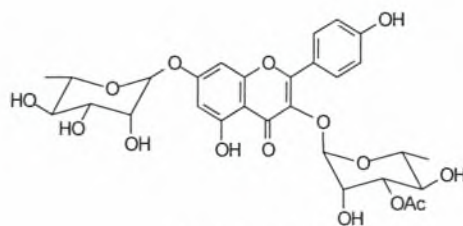
Χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102.

2.1.3 Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων

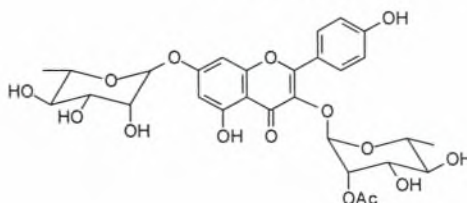
Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκε η δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus Edulis*, 4 κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από αυτό και του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Vicia faba* (Πίνακας 3). Τα κλάσματα που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus Edulis* αποτελούν μεμονωμένα φλαβονοειδή, συγκεκριμένα γλυκοσυλιωμένες μορφές καιμπερόλης (Εικόνα 14).

Πίνακας 3: Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων από τα φυτά *Lotus Edulis*.

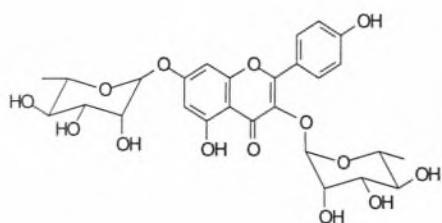
<u><i>Lotus Edulis</i></u>	<u><i>Vicia faba</i></u>
Μεθ. εκχύλισμα πόας	Μεθ. εκχύλισμα πόας
Le N	
Le E	
Le B	
Le O	



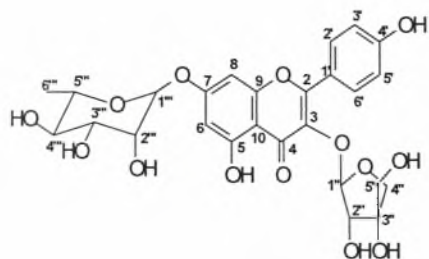
11a or Le E



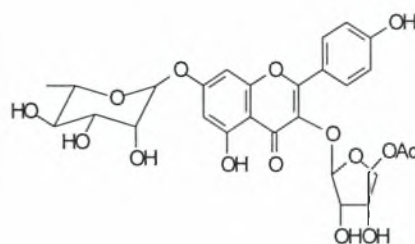
11b or Le E



7 or Le N



12 or Le O



13 or Le B

Εικόνα 14: Φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα του φυτού *L. edulis*. Ένωση 7 ή Le N: kaempferol 3,7-di-*O*-rhamnopyranosyl. Ένωση 11 ή Le E: a) kaempferol 3-*O*-(3-*O*-acetyl-rhamnopyranosyl)-7-*O*-rhamnopyranosyl ή και b) kaempferol 3-*O*-(2-*O*-acetyl-rhamnopyranosyl)-7-*O*-rhamnopyranosyl. Ένωση 12 ή Le O: kaempferol 3-*O*-ribofuranosyl-7-*O*-rhamnopyranosyl. Ένωση 13 ή Le B: kaempferol 3-*O*-(5-*O*-acetylripiosyl)-7-*O*-rhamnopyranosyl.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Δοκιμή του Ames (Ames Test)

2.2.1.a. Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμή του Ames που ανακαλύφθηκε από τον Ames και τους συνεργάτες του το 1973 αποτελεί μία απλή, γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη δοκιμασία για την ανίχνευση της μεταλλαξιγόνου, καρκινογόνου δράσης μίας ουσίας, συμπληρώνοντας επιδημιολογικές μελέτες και δοκιμασίες σε ζώα, οι οποίες είναι βραδύτερες, δυσκολότερες και πολύ πιο ακριβές. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση των βακτηριακών στελεχών *Salmonella typhimurium* (His⁻), τα οποία λόγω αυξότροφων μεταλλάξεων που φέρουν σε γονίδια του οπερονίου της ιστιδίνης, δεν έχουν την ικανότητα να κωδικοποιήσουν ένα από τα ένζυμα που χρειάζεται για τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο απουσία του συγκεκριμένου αμινοξέος (Berg J.M. et al. 2005). Αυτές οι μεταλλάξεις δρουν ως 'hot spots' για τα μεταλλαξιγόνα που προκαλούν βλάβη στο DNA μέσω διάφορων μηχανισμών. Όταν τα στελέχη-μάρτυρες *Salmonella* αναπτύσσονται σε άγαρ που περιέχει απειροελάχιστη ποσότητα ιστιδίνης, μόνο οι αυθόρμητα ανάστροφοι τύποι βακτηρίων (His⁺) σχηματίζουν ορατές αποικίες, ο αριθμός των οποίων ανά τριβλίο είναι σχετικά σταθερός (Πίνακας 4). Αντίθετα, η έκθεση της καλλιέργειας σε ένα χημικό μεταλλαξιγόνο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών νέων μεταλλάξεων, είτε στη θέση των προϋπαρχουσών μεταλλάξεων, είτε σε γειτονικά γονίδια. Ορισμένες από αυτές αναστρέφουν την αρχική μετάλλαξη, οδηγώντας στην επανάκτηση της ικανότητας των βακτηρίων να συνθέτουν ιστιδίνη και συνεπώς να σχηματίζουν αποικίες απουσία του αμινοξέος, ο αριθμός των οποίων ανά τριβλίο αυξάνεται συνήθως με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Moltermans K. and Zeiger E. 2000).

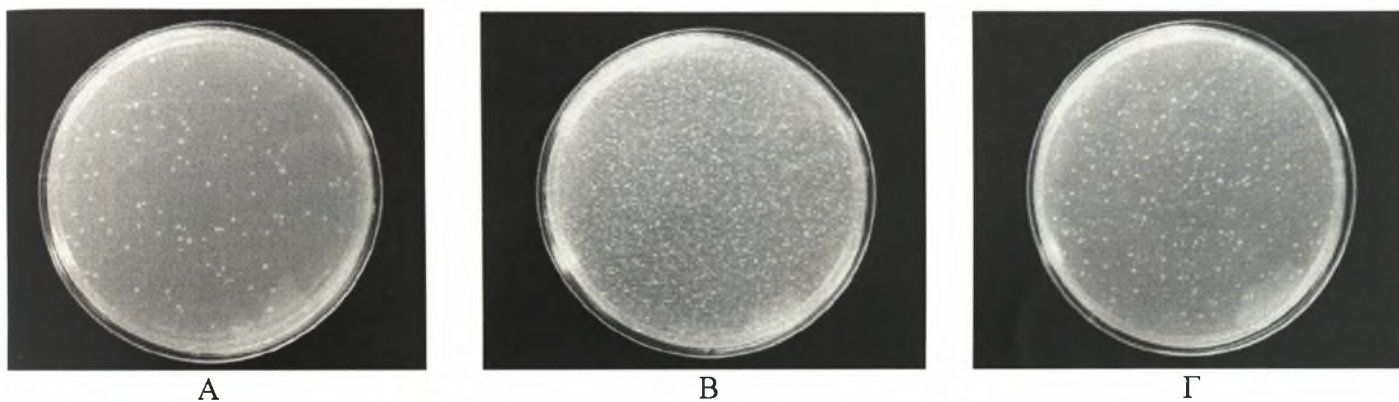
Πίνακας 4: Αριθμός αυθόρμητων (His⁺) αποικιών/τριβλίο σε βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium* (Moltermans K. and Zeiger E. 2000).

Στέλεχη <i>Salmonella typhimurium</i>	Αριθμός αυθόρμητων αποικιών/τριβλίο
TA97	75-200
TA98	20-50
TA100	75-200
TA102	100-300
TA104	200-300
TA1535	5-20
TA1537	5-20
TA1538	5-20

Ορισμένα πιθανά καρκινογόνα, όπως αρωματικές αμίνες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι βιολογικά αδρανείς και μετατρέπονται στη δραστική τους μορφή από ενζυμικά μεταβολικά οξειδωτικά συστήματα βασισμένα κυρίως στο CytP450 μέσα στο ήπαρ ή σε άλλους ιστούς των θηλαστικών. Τα βακτήρια στερούνται αυτά τα ένζυμα και επομένως χρειάζεται η προσθήκη στα τριβλία ελέγχου ενός εξωγενούς μεταβολικού συστήματος ενεργοποίησης, που συνήθως αποτελείται από ομογενοποίηση ήπατος αρουραίου (S-9 microsomal fraction), το οποίο προστίθεται στο άγαρ μαζί με NADP, MgCl₂, KCl, 6-φωσφορική γλυκόζη (S-9 mix) για την οξείδωση την εξαρτώμενη από NADPH (Maron D. and Ames B.N. 1983, Ames B.N. et al. 1975).

Αναγωγικά μεταβολικά συστήματα ενεργοποίησης *in vitro* χρησιμοποιούνται στην περίπτωση που οι χημικές ουσίες διαθέτουν αζω- και διαζω- ομάδες και είναι δύο ειδών: αυτά που βασίζονται σε ομογενοποίηση ήπατος παρουσία FMN (Prival M.J and Mitchell V.D. 1982) και αυτά που βασίζονται σε παρασκευές της εντερικής μικροχλωρίδας του αρουραίου (Reid T.M. et al. 1984).

Αν και η δοκιμασία Ames χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της μεταλλαξιγόνου δράσης χημικών ουσιών και φαρμάκων, ωστόσο η ιδιότητα αυτή των βακτηρίων να μην μπορούν να αναπτυχθούν απουσία ιστιδίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον έλεγχο της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης ορισμένων κυρίως φυτικών ουσιών ή εκχυλισμάτων (Grey C.E. and Adlercreutz P. 2003, Santana –Rios G. et al. 2001). Σε αυτή την περίπτωση, στις βακτηριακές καλλιέργειες επάγονται μεταλλάξεις μέσω ενός γνωστού μεταλλαξιγόνου παράγοντα και παρατηρείται η αναστολή της επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης από την εξεταζόμενη ουσία (**Ames antimutagenicity assay**) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Παρατήρηση της μεταλλαξιγόνου/αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μιας ουσίας. **A)** αρνητικό control (στελέχη *Salmonella*), **B)** θετικό control (μεταλλαξιγόνος παράγοντας), **Γ)** μεταλλαξιγόνος παράγοντας + αντιμεταλλαξιγόνος ουσία (Moltermans K. and Zeiger E. 2000).

2.2.1.β. Στελέχη *Salmonella*

Τα δύο κύρια χρησιμοποιούμενα στελέχη *Salmonella* είναι τα TA1535 και TA1538, από τα οποία μετά από ένθεση του πλασμιδίου pKM101 προκύπτουν τα αντίστοιχα ισογονιδιακά στελέχη: TA100, TA98 και **TA102**, TA104, TA97. Το πλασμίδιο pKM101 ενισχύει την επαγόμενη από χημικά και UV-ακτινοβολία μεταλλαξιγένεση μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού επιδιόρθωσης που έχει τάση για λάθη στο DNA (error-prone DNA repair pathway), αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ευαισθησία των βακτηρίων σε μεταλλαξιγόνες ουσίες. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη που είναι ένας κατάλληλος δείκτης για τον έλεγχο της παρουσίας του στο στέλεχος. Επίσης, η ευαισθησία αυτών των στελεχών ενισχύεται και από την παρουσία δύο επιπρόσθετων μεταλλάξεων. Η πρώτη είναι μία μετάλλαξη στα γονίδια *uvrB-bio*, η οποία προκαλεί την απαλοιφή του συστήματος επιδιόρθωσης με εκτομή (αυτή η μετάλλαξη απουσιάζει από το TA102), ενώ παράλληλα καθιστά όλα τα στελέχη εκτός από το TA102 αυξοτροφικά ως προς τη βιοτίνη. Όσον αφορά τη δεύτερη, πρόκειται για μία μετάλλαξη (*trfA*) που προκαλεί την απώλεια του φράγματος των λιποπολυσακχαριτών (LPS), γεγονός που καθιστά τα βακτήρια εύκολα διαπερατά σε μεγάλο μοριακού βάρους χημικές ουσίες. Μερικά από τα στελέχη-μάρτυρες αποκρίνονται σε αντικαταστάσεις ζευγών βάσεων, ενώ άλλα ανιχνεύουν απαλείψεις ή προσθήκες ζευγών βάσεων (μετατοπίσεις του πλαισίου ανάγνωσης) (Berg J.M. et al. 2005).

Το στέλεχος TA102 είναι ευαίσθητο σε μεταλλαξιγόνα που δρουν μέσω **οξειδωτικών μηχανισμών** (π.χ. μπλεομυκίνη) και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών που δρουν μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Stagos D. et al. 2005). Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει και παράγοντες που προκαλούν χιάσματα (cross-linking agents), όπως είναι η μιτομυκίνη C (Levin D.E. et al. 1982). Το στέλεχος TA102 διαθέτει εκτός από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις και μία μετάλλαξη hisG428 (TAA) στο γονίδιο hisG, η οποία μπορεί να αναστραφεί σε αγρίου τύπου κατάσταση μέσω μεταστροφών και μεταπτώσεων. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη βρίσκεται εξωχρωμοσωμικά πάνω σε πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδίου pAQ1 με σκοπό την ενίσχυση του αριθμού των θέσεων-στόχων του DNA (Moltermans K. and Zeiger E. 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος TA102 περιέχει AT ζεύγη βάσεων στην θέση μετάλλαξης hisG428 σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα στελέχη *Salmonella* που διαθέτουν GC ζεύγη βάσεων (Levin D.E. et al. 1982).

2.2.2. Πειραματική Διαδικασία

Η διαδικασία περιλαμβάνει: την προετοιμασία των τριβλίων GM Agar (στερεό θρεπτικό υπόστρωμα), την επιμόλυνση του υγρού θρεπτικού υλικού (Nutrient Broth) με βακτήρια (από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων που βρίσκεται στους -80°C), την προετοιμασία του top agar (υγρό θρεπτικό μέσο) και την προσθήκη σε αυτό της βακτηριακής καλλιέργειας, του μεταλλαξιγόνου παράγοντα (μπλεομυκίνη) και των υπό εξέταση ουσιών (εκχύλισμα και κλάσμα). Τέλος, ακολουθεί επίστρωση του top agar πάνω στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, επώαση των τριβλίων στους 37°C για 48h και καταμέτρηση των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο.

2.2.2.a. Προετοιμασία των τριβλίων GM Agar

Για την προετοιμασία των τριβλίων GM Agar ετοιμάζεται θρεπτικό μέσο το οποίο αναφέρεται ως glucose minimal agar medium (GM Agar) και περιέχει Vogel–Bonner medium E (VB Salt solution), glucose solution και agar. Οι όγκοι των διαλυμάτων που απαιτούνται παρουσιάζονται παρακάτω:

GM Agar τριβλία

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>ανά 1000ml</u>
Απεσταγμένο νερό	900 ml
Agar	15 g
VB salt solution	20 ml
Glucose solution (10% v/v)	50 ml

Αναλυτικά, η διαδικασία περιλαμβάνει:

- Προετοιμασία των διαλυμάτων:

I. Vogel –Bonner medium E

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>ανά 1000ml</u>
Απεσταγμένο νερό	650 ml
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot H_2O$)	10 g
Citric acid monohydrate	100 g
Potassium phosphate dibasic anhydrous (K_2HPO_4)	500 g
Sodium ammonium phosphate ($Na_2NH_2PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g

Οι χημικές ουσίες προστίθενται με τη σειρά που αναφέρονται. Κάθε ουσία διαλύεται με μαγνητικό αναδευτήρα σε ήπια θερμοκρασία και μετά προστίθεται η επόμενη. Στη συνέχεια, συμπληρώνεται ο όγκος στα 1000ml και ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος στους 120°C για 20 min.

II. Glucose solution (10% v/v)

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>ανά 1000ml</u>
Απεσταγμένο νερό	700 ml
Γλυκόζη	100 g

Η γλυκόζη διαλύεται με μαγνητικό αναδευτήρα σε ήπια θερμοκρασία μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια συμπληρώνεται ο όγκος στα 1000ml και ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος στους 120°C για 20 min.

III. GM Agar

Σε 900 ml απεσταγμένου νερού προστίθεται πρώτα το agar και ακολουθεί αποστείρωση στους 120°C για 20 min.

- Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης το διάλυμα GM Agar κρυώνει για 45min στο υδατόλουτρο.
- Το διάλυμα αλάτων VB Salt καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, γιατί είναι φωτοευαίσθητο και αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα γλυκόζης αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τα 45min με ασηπτικές συνθήκες γίνεται η προσθήκη πρώτα του VB Salt, γιατί σχηματίζει ίζημα και ακολουθεί ανάδευση. Τέλος προστίθεται το διάλυμα γλυκόζης και ακολουθεί ανάδευση.
- Κατανομή του διαλύματος 25ml ανά τριβλίο με ασηπτικές συνθήκες.
- Τα τριβλία αφήνονται να στεγνώσουν για τουλάχιστον 20 min και αποθηκεύονται ανεστραμμένα και καλυμμένα με διπλή μεμβράνη στους 4°C (όπου μπορούν να διατηρηθούν για 7 μέρες).

2.2.2.β. Ames antimutagenicity assay

Αναλυτικά, η διαδικασία περιλαμβάνει:

- Προετοιμασία του θρεπτικού υλικού Nutrient Broth για την ανάπτυξη της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>ανά 30ml</u>
Απεσταγμένο νερό	30 ml
Nutrient Broth	0.24 g

Ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος στους 120°C για 20 min και αποθήκευσή του στους 4°C.

- Τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού στους 37°C.
- Επιμόλυνση του θρεπτικού υλικού με 200μl κυττάρων TA102 που βρίσκονται στους -80°C.
- Ανάδευση και τοποθέτηση στον κλίβανο στους 37°C.
- Φωτομέτρηση στα 540nm, μέχρι η οπτική απορρόφηση να κυμαίνεται από 0,1-0,2 ($1,2 \times 10^9$ CFU/ml) [=εκθετική φάση των βακτηρίων].
- Ταυτόχρονα τα GM Agar τριβλία τοποθετούνται στους 37°C ανεστραμμένα και ελαφρώς ανοιχτά για να στεγνώσουν.
- Παράλληλα με την ανάπτυξη των κυττάρων προετοιμάζεται το top agar, το οποίο πρέπει να ετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος και περιέχει διάλυμα Histidine/biotin, agar, και sodium chloride. Η χρήση του διαλύματος Histidine/biotin (τα βακτηριακά στελέχη TA102 δεν απαιτούν για την ανάπτυξή τους την παρουσία βιοτίνης), μπορεί να παραταθεί έως και 2 βδομάδες διατηρημένο στους 4°C.

I. Top Agar

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>ανά 1000ml</u>
Απεσταγμένο νερό	900 ml
Agar	6g
Sodium chloride	6g
Histidine solution	50 ml

Πρώτα, γίνεται η προσθήκη του sodium chloride σε μικρότερο όγκο απεσταγμένου νερού και το διάλυμα αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα. Κατόπιν, ακολουθεί προσθήκη του agar και αποστείρωση του διαλύματος στους 120°C για 20 min.

II. Histidine solution (0.5mM)

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>ανά 1000ml</u>
Απεσταγμένο νερό	1000 ml
L-Histidine	96mg

Σε 1000ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 96mg ιστιδίνης. Το διάλυμα ογκομετρείται σε ογκομετρική φιάλη γιατί απαιτείται ακρίβεια στη συγκέντρωσή του. Ακολουθεί αποστείρωσή του στους 120°C για 20 min.

- Μετά την αποστείρωση το top agar τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 45°C. Σε αυτό το στάδιο η διατήρηση της θερμοκρασίας είναι σημαντική καθώς κάτω από τους 43 °C πήζει το agar, ενώ θερμοκρασίες πάνω από τους 48 °C δεν είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Το διάλυμα Histidine κρύνει σε θερμοκρασία δωματίου καλυμμένο με αλουμινόχαρτο.
- Προσθήκη στο top agar 50ml διαλύματος Histidine με ασηπτικές συνθήκες.
- Κατανομή του top agar ανά 2ml σε σωλήνες falcon που βρίσκονται στο υδατόλουτρο με ασηπτικές συνθήκες. Κάθε falcon αντιστοιχεί σε ένα τριβλίο και κάθε δείγμα ελέγχεται εις τριπλούν.
- Κάθε πείραμα περιελάμβανε τα εξής:
 - ✓ Τον αρνητικό μάρτυρα (μόνο τα βακτηριακά στελέχη TA102)
 - ✓ Τον θετικό μάρτυρα (βακτηριακά στελέχη TA102 και μπλεομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο).
 - ✓ Καλλιέργειες με την υπό εξέταση ουσία σε 3 διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις μαζί με μπλεομυκίνη σε τελική c=0.125μg/τριβλίο.
 - ✓ Καλλιέργειες με την υπό εξέταση ουσία μόνη της στην υψηλότερη συγκέντρωση απουσία μπλεομυκίνης, ώστε να ελεγχθεί για ενδεχόμενη μεταλλαξιγόνο δράση.
 - ✓ Τον δείκτη ισχυρής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης (βακτηριακά στελέχη TA102 με εκχύλισμα σταφυλιού Μανδηλαριάς σε τελική c=6mg/τριβλίο και μπλεομυκίνη σε τελική c=0.125μg/τριβλίο).

Ως δείκτης ισχυρής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Μανδηλαριάς σε τελική c=6mg/plate, το οποίο όπως ήταν γνωστό και από προηγούμενες μελέτες (*D. Stagos et al., 2006*) προκαλούσε αναστολή κατά περίπου 70% της μεταλλαξιγόνου δράσης της μπλεομυκίνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε μία από τις υπό εξέταση ουσίες πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα και το κάθε ένα ελεγχόταν εις τριπλούν.

- Όταν η απορρόφηση των κυττάρων φτάσει στο 0.1-0.2, τότε ξεκινά η προσθήκη των ουσιών στο top agar.
- Πρώτα, γίνεται η προσθήκη 50μl διαλύματος μπλεομυκίνης σε τελική c=0.125μg/τριβλίο στα αντίστοιχα δείγματα. Μετά ακολουθεί η προσθήκη 50μl των διαλυμάτων των αραιώσεων της εξεταζόμενης ουσίας στα αντίστοιχα δείγματα και τέλος προστίθενται 100μl καλλιέργειας βακτηρίων. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις: c₁=0.3mg/τριβλίο, c₂=3mg/τριβλίο και c₃=6mg/τριβλίο, ενώ τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Lotus edulis* σε τελικές συγκεντρώσεις: c₁=0.1mg/τριβλίο, c₂=0.5mg/τριβλίο και c₃=1mg/τριβλίο.
- Γρήγορη ανάδευση και απόχυση του top agar στο κάθε τριβλίο, ώστε να απλωθεί ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνειά του.
- Παραμονή των τριβλίων σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5min.
- Τοποθέτηση των τριβλίων στους 37 °C ανεστραμμένα για 48h.
- Μετά την παρέλευση των 48h, τα τριβλία ελέγχονται μικροσκοπικά για την πιθανή εμφάνιση κυτταροτοξικότητας και ακολουθεί η καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων (His⁺) αποικιών.

2.2.2.γ. Έλεγχος τοξικότητας

Η προσθήκη μικρής ποσότητας ιστιδίνης στο top agar επιτρέπει σε όλα τα βακτήρια να εκτελέσουν λίγες κυτταρικές διαιρέσεις (συνήθως 6-8), οι οποίες είναι ικανές να επιφέρουν μόνιμη μεταλλαξιγένεση (Moltermans K. and Zeiger E. 2000, Ames B.N. et al. 1975). Τα His⁺ βακτήρια που προϋπήρχαν σε μικρή ποσότητα στις παγωμένες stock καλλιέργειες (pre-existing His⁺), όπως επίσης και τα επαναμεταλλαγμένα His⁺ βακτήρια, τα οποία αναπτύσσονται στα τριβλία (plate revertants) συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται απουσία ιστιδίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό ορατών αποικιών. Εκτός από τις ορατές αποικίες στα τριβλία υπάρχουν και μικροαποικίες (background lawn), που σχηματίζονται από τα εξαρτώμενα από ιστιδίνη κύτταρα, τα οποία λόγω εξάντλησης της παρεχόμενης ιστιδίνης δεν έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν περισσότερες από 6-8 διαιρέσεις.

Μετά την επώαση των κυττάρων, κάθε τριβλίο ελέγχεται για την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας. Ο έλεγχος γίνεται με μικροσκοπική παρατήρηση (40x μεγέθυνση) της εμφάνισης των μη ορατών με γυμνό μάτι μικροαποικιών. Σε περίπτωση μη τοξικότητας, η πυκνότητα των αποικιών αυτών είναι μεγάλη. Αντίθετα, σε ήπια τοξικότητα παρατηρείται μείωση της πυκνότητας των μικροαποικιών που συνήθως συνοδεύεται και από κάποια μείωση στον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών, ενώ σε έντονη τοξικότητα τα βακτήρια δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν, με συνέπεια την πλήρη απουσία των μικροαποικιών. Περιστασιακά, είναι δυνατόν να εμφανιστούν και μη επαναμεταλλαγμένες αποικίες, οι οποίες ωστόσο είναι ορατές με γυμνό μάτι, αλλά μικρότερες από τις επαναμεταλλαγμένες (pinpoint colonies). Αυτού του είδους οι αποικίες σχηματίζονται εξαιτίας της έντονης τοξικότητας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα περισσότερη ποσότητα ιστιδίνης να είναι διαθέσιμη για τα His⁻ βακτήρια. Συνήθως αυτή η κατάσταση συνοδεύεται και από την πλήρη απουσία των μικροαποικιών.

2.2.2.δ. Υπολογισμός της % αναστολής/επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της % αναστολής (ή επαγωγής όταν το πρόσημο είναι αρνητικό) της μεταλλαξιγένεσης για την εξεταζόμενη ουσία με τη βοήθεια του τύπου:

$$\% \text{Αναστολή} = \frac{N_o - N}{N_o - N_{\text{control}}} \times 100$$

όπου

N_{control} : ο αριθμός των αποικιών/τριβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102)

N_o : ο αριθμός των αποικιών/τριβλίο στον θετικό μάρτυρα (TA102 & μπλεομυκίνη)

N : ο αριθμός των αποικιών/τριβλίο παρουσία του προς εξέταση παράγοντα και του μεταλλαξιγόνου παράγοντα (μπλεομυκίνη).

Το ποσοστό (%) επαγωγής μεταλλάξεων από τον μεταλλαξιγόνο παράγοντα δίνεται από τον τύπο:

$$\% \text{Επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης} = \frac{N_o - N_{\text{control}}}{N_o} \times 100.$$

2.2.2.ε. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

3. Αποτελέσματα

3.1. Επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 (Καμπύλη μπλεομυκίνης)

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης μπλεομυκίνης που θα χρησιμοποιούνταν για την επαγωγή μεταλλαξιγένεσης, πραγματοποιήθηκε πείραμα με 3 αυξανόμενες τελικές συγκεντρώσεις μπλεομυκίνης (0.125 μg/τριβλίο, 0.25 μg/τριβλίο, 0.5 μg/τριβλίο) και προέκυψε η καμπύλη της (Γράφημα 1). Όλες οι συγκεντρώσεις της μπλεομυκίνης έδωσαν στατιστικά σημαντική επαγωγή μεταλλάξεων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Πίνακας 5 και Γράφημα 2). Η συγκέντρωση της μπλεομυκίνης που επιλέχθηκε ήταν 0.125μg/τριβλίο καθώς οι μεγαλύτερες τιμές ήταν τοξικές για τα κύτταρα.

3.2. Επίδραση μεθανολικών εκχυλισμάτων πόας από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102

Τα 2 μεθανολικά εκχυλίσματα πόας από τα φυτά *Lotus edulis* (Πίνακες 6, 8 Γραφήματα 3, 4) και *Vicia faba* (Πίνακες 6, 9 Γραφήματα 5, 6) δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική επίδραση στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 0.3, 3 και 6mg/τριβλίο. Απουσία μπλεομυκίνης τα εκχυλίσματα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 6mg/τριβλίο δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στον αριθμό των αποικιών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα

3.3. Επίδραση κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102

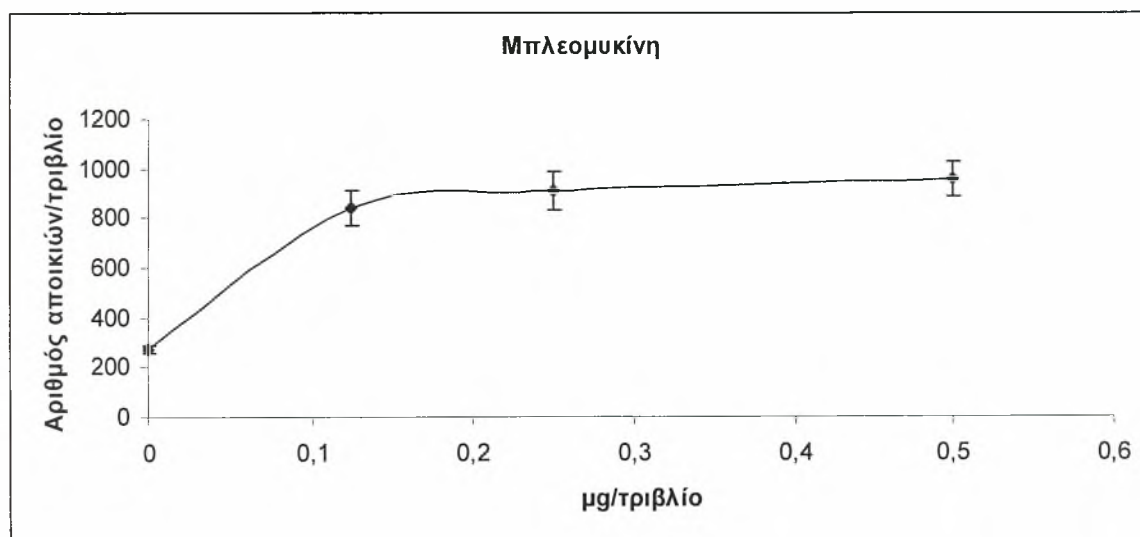
Από τα 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis* μόνο τα 2 (Le B και Le E) εμφάνισαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Συγκεκριμένα, το κλάσμα Le B που ήταν το πιο ισχυρό, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης κατά 18 %, 29 % και 39 % στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 0.1, 0.5 και 1mg/τριβλίο αντίστοιχα (Πίνακες 7, 10 Γραφήματα 7, 8). Το κλάσμα Le E παρουσίασε μικρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση, εκδηλώνοντας στατιστικά σημαντική αναστολή 31 % μόνο στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 1mg/τριβλίο (Πίνακες 7, 11 Γραφήματα 9, 10). Τα κλάσματα Le N (Πίνακες 7, 12 Γραφήματα 11, 12) και Le O (Πίνακες 7,13 Γραφήματα 13, 14) δεν επηρέασαν σε καμία συγκέντρωση την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση. Απουσία μπλεομυκίνης όλα τα κλάσματα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, 0.5mg/τριβλίο, δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στον αριθμό των αποικιών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα κλάσματα παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις (0.1, 0.5, 1 mg/τριβλίο) σε σχέση με αυτές που δοκιμάστηκε το αρχικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* (0.3, 3, 6 mg/τριβλίο). Επίσης, όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 14**, τα κλάσματα Le B και Le E αποτελούν ακετυλιωμένες μορφές των κλασμάτων Le N και Le O αντίστοιχα. Το γεγονός ότι μόνο τα Le B και Le E παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση δείχνει ότι η παρουσία της ακετυλομάδας επηρεάζει την δράση τους.

Πίνακας 5: Επαγόμενη από μπλεομυκίνη αύξηση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.

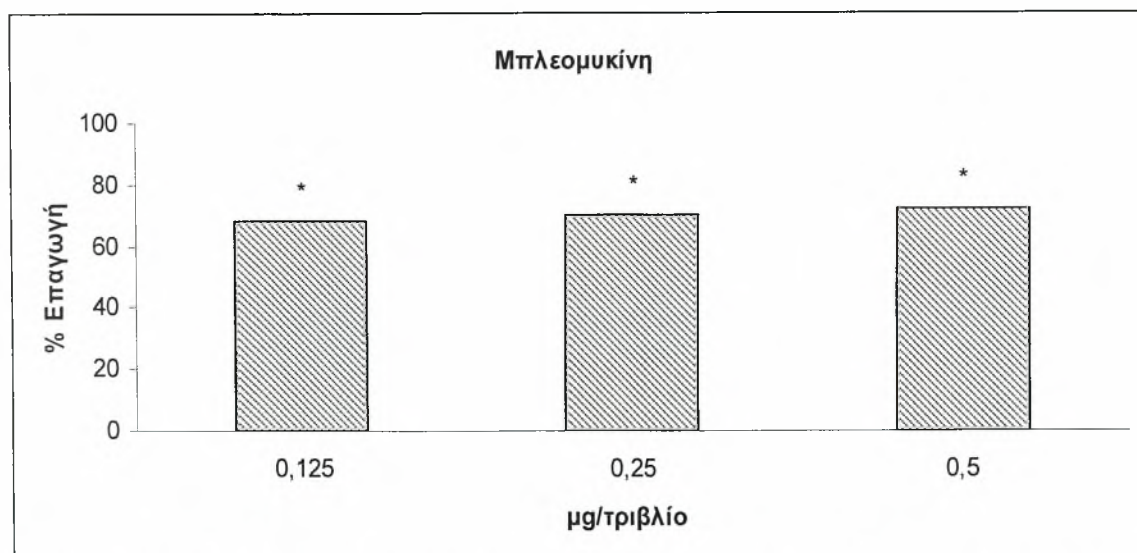
Συγκέντρωση μπλεομυκίνης (μg/τριβλίο)	Αριθμός αποικιών/τριβλίο ¹	% Επαγωγή
Αρνητικός μάρτυρας	272 ± 16	
0.125 μg/τριβλίο	842 ± 68*	68*
0.25 μg/τριβλίο	911 ± 80*	70*
0.5 μg/τριβλίο	959 ± 68*	72*

¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, που το καθένα ελεγχόταν εις τριπλούν.

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



Γράφημα 1: Καμπύλη μπλεομυκίνης. Οι τιμές είναι η μέση τιμή του αριθμού των αποικιών/τριβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στα σημεία της καμπύλης συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 2: Ποσοστά (%) επαγωγής μεταλλάξεων από τη μπλεομυκίνη σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (p<0,05).

3.4. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων των υπό εξέταση εκχυλισμάτων και κλασμάτων:

Πίνακας 6: Ποσοστά (%) αναστολής της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 από τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lotus edulis* και *Vicia faba*.

Φυτό	% Αναστολή		
	0.3 mg/τριβλίο	3 mg/τριβλίο	6 mg/τριβλίο
<i>Lotus edulis</i>	11	11	10
<i>Vicia faba</i>	NA	NA	NA

NA: Το εκχύλισμα δεν έχει καμία επίδραση στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση.

Πίνακας 7: Ποσοστά (%) αναστολής της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 από τα κλάσματα καθαρών μορίων του φυτού *Lotus edulis*.

Κλάσμα Συγκέντρωση (mg/τριβλίο)	% Αναστολή		
	0.1	0.5	1
Le B	18*	29*	39*
Le E	12	19	31*
Le N	1	2	12
Le O	7	8	13

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

3.5. Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων των υπό εξέταση εκχυλισμάτων και κλασμάτων:

Πίνακας 8: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

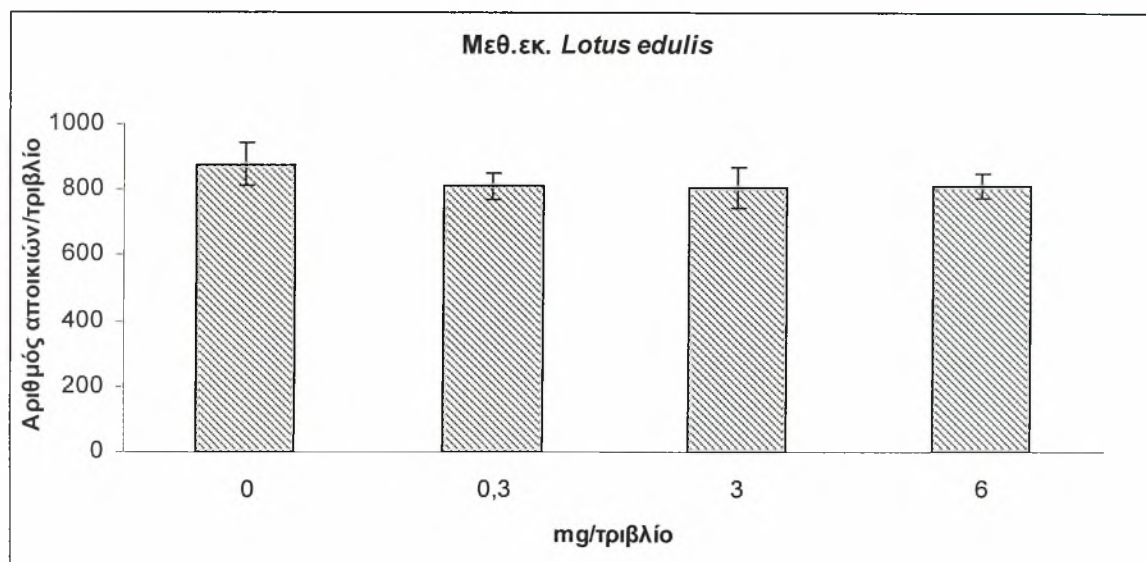
Καλλιέργεια	Αριθμός αποικιών/τριβλίο ¹	% Αναστολή	Αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο ³
Αρνητικός μάρτυρας	272 ± 14	-	-
Θετικός μάρτυρας(+BLM ²)	876 ± 65**	-	604
Εκχυλ. 0.3mg/τριβλίο(+BLM)	811 ± 41	11	539
Εκχυλ. 3mg/τριβλίο(+BLM)	808 ± 64	11	536
Εκχυλ. 6mg/τριβλίο(+BLM)	813 ± 39	10	541
Εκχυλ. 6mg/τριβλίο(-BLM)	257 ± 15	-	-

¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.

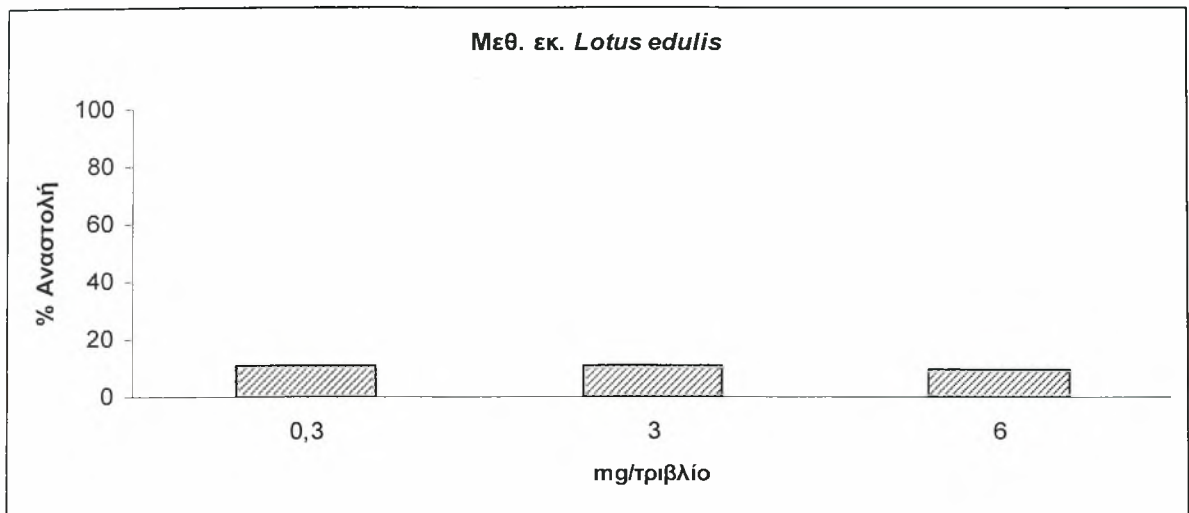
²Η μπλεομυκίνη έχει τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο.

³Ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο υπολογίζεται αφαιρώντας την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στον αρνητικό μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το εκχύλισμα.

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



Γράφημα 3: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 4: Απεικόνιση της % αναστολής του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus edulis* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Πίνακας 9: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Vicia faba* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Καλλιέργεια	Αριθμός ¹ αποικιών/τριβλίο	% Αναστολή	Αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο ³
Αρνητικός μάρτυρας	236 ± 21	-	-
Θετικός μάρτυρας(+BLM ²)	818 ± 24 ^{**}	-	582
Εκχυλ. 0.3mg/τριβλίο(+BLM)	804 ± 40	NA ⁴	568
Εκχυλ. 3mg/τριβλίο(+BLM)	843 ± 18	NA	607
Εκχυλ. 6mg/τριβλίο(+BLM)	806 ± 74	NA	570
Εκχυλ. 6mg/τριβλίο(-BLM)	271 ± 13	-	-

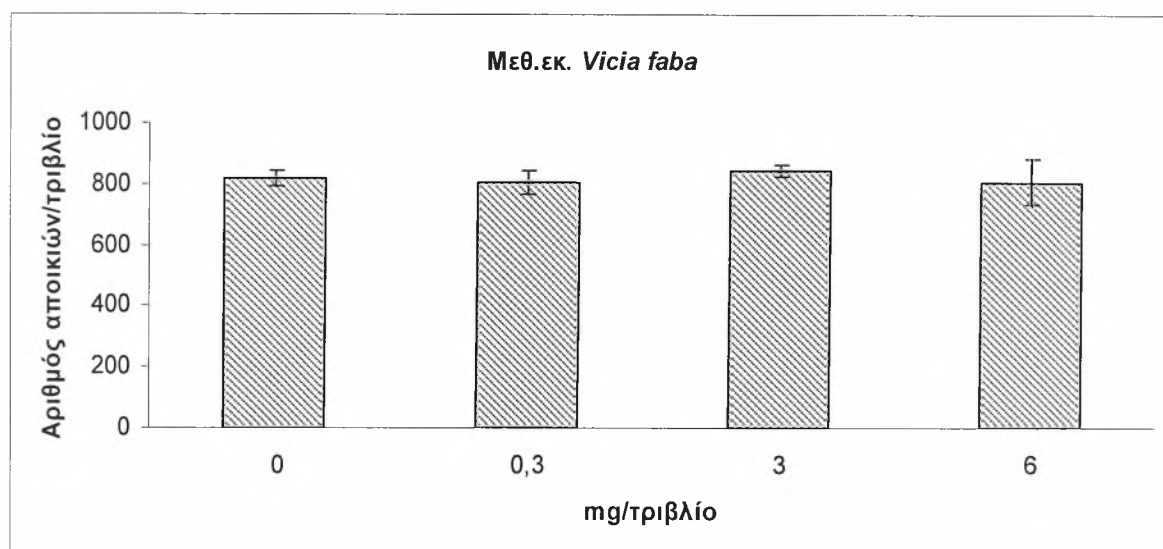
¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.

²Η μπλεομυκίνη έχει τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο.

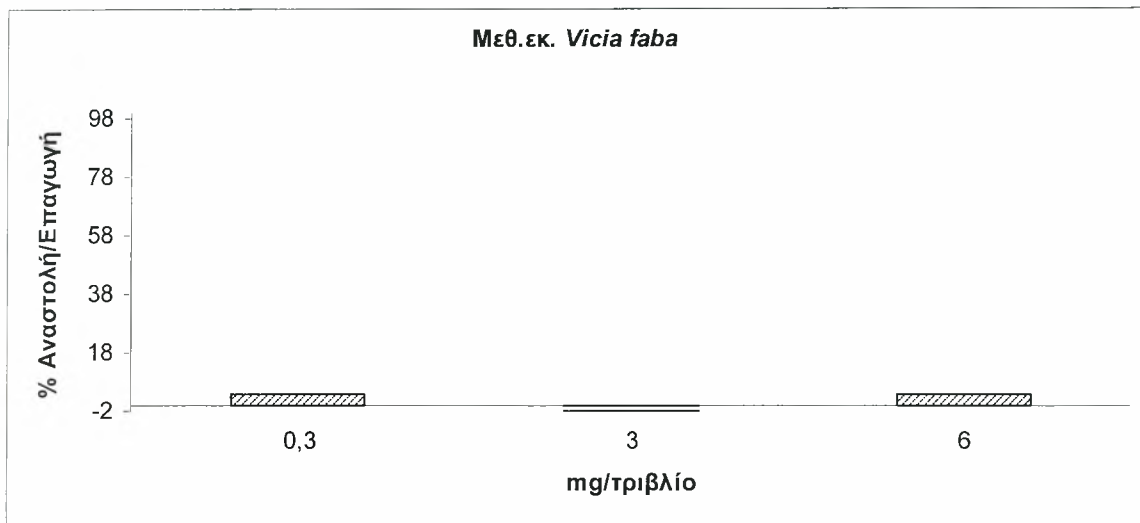
³Ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο υπολογίζεται αφαιρώντας την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στον αρνητικό μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το εκχύλισμα.

⁴NA: Το εκχύλισμα δεν έχει καμία επίδραση στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση.

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



Γράφημα 5: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Vicia faba* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 6: Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος πώας του φυτού *Vicia faba* στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Πίνακας 10: Επίδραση του κλάσματος Le B στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Καλλιέργεια	Αριθμός αποικιών/τριβλίο ¹	% Αναστολή	Αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο ³
Αρνητικός μάρτυρας	249 ± 15	-	-
Θετικός μάρτυρας (+BLM ²)	797 ± 52 ^{**}	-	548
Κλ.0.1mg/τριβλίο(82.5μM) (+BLM)	699 ± 49 [*]	18 [*]	450
Κλ.0.5mg/τριβλίο(412μM) (+BLM)	640 ± 44 [*]	29 [*]	391
Κλ.1mg/τριβλίο(825μM) (+BLM)	586 ± 90 [*]	39 [*]	337
Κλ.1mg/τριβλίο (825μM) (-BLM)	218 ± 29	-	-

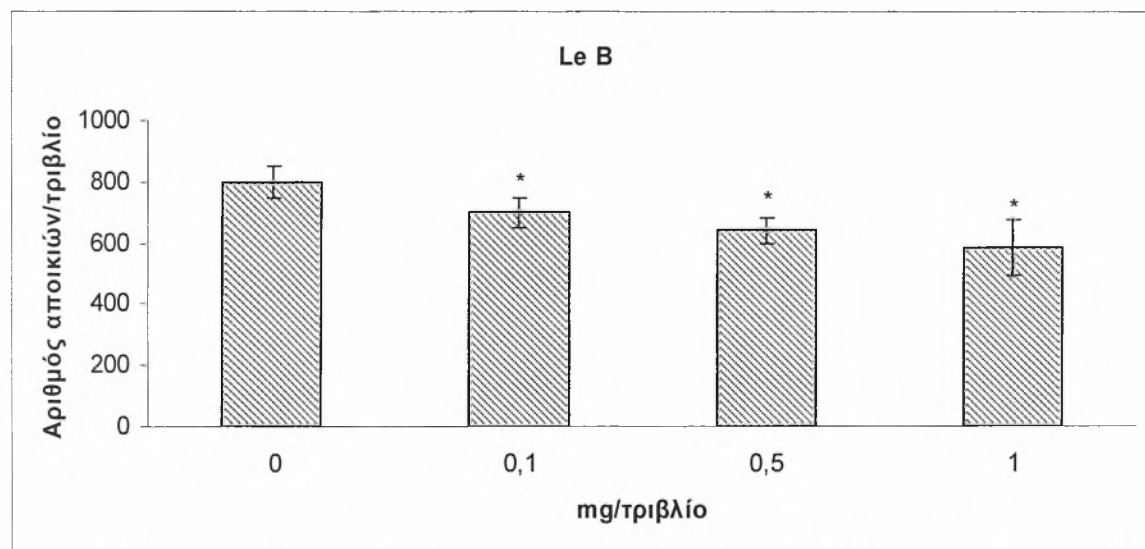
¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.

²Η μπλεομυκίνη έχει τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο.

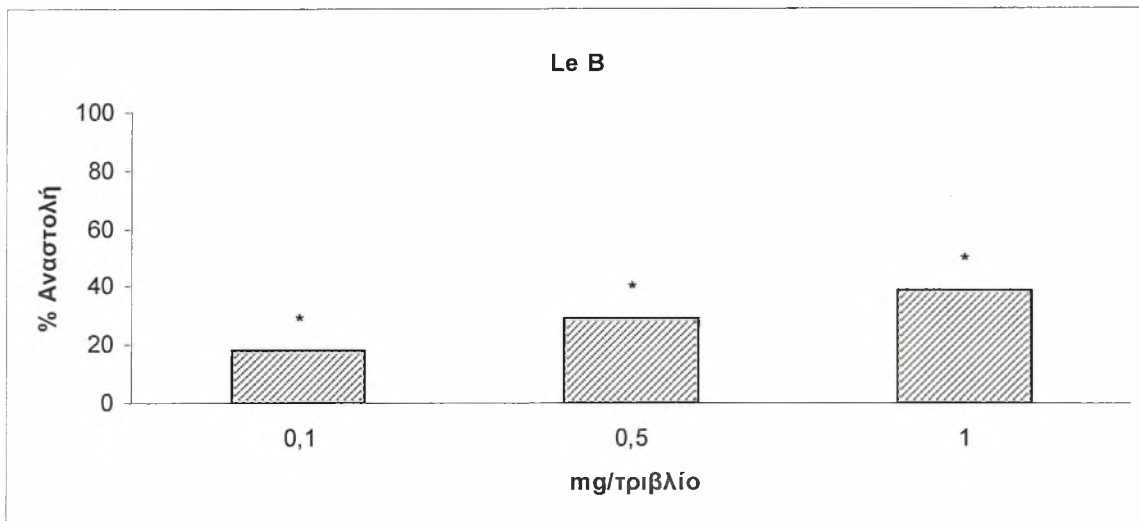
³Ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο υπολογίζεται αφαιρώντας την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στον αρνητικό μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το κλάσμα

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

^{**}Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (p<0,05).



Γράφημα 7: Επίδραση του κλάσματος Le B στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. * Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (p<0,05).



Γράφημα 8: Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le B στην επαγόμενη από μπερομυκίνη μεταλλαξίγνεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ($p < 0,05$).

Πίνακας 11: Επίδραση του κλάσματος Le E στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Καλλιέργεια	Αριθμός αποικιών/τριβλίο ¹	% Αναστολή	Αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο ³
Αρνητικός μάρτυρας	229 ± 31	-	-
Θετικός μάρτυρας (+BLM ²)	787 ± 97**	-	558
Κλ.0.1mg/τριβλίο(80.6μM) (+BLM)	722 ± 164	12	493
Κλ.0.5mg/τριβλίο(403μM) (+BLM)	679 ± 159	19	450
Κλ.1mg/τριβλίο(806μM) (+BLM)	611 ± 66*	31*	382
Κλ.1mg/τριβλίο(806μM) (-BLM)	217 ± 51	-	-

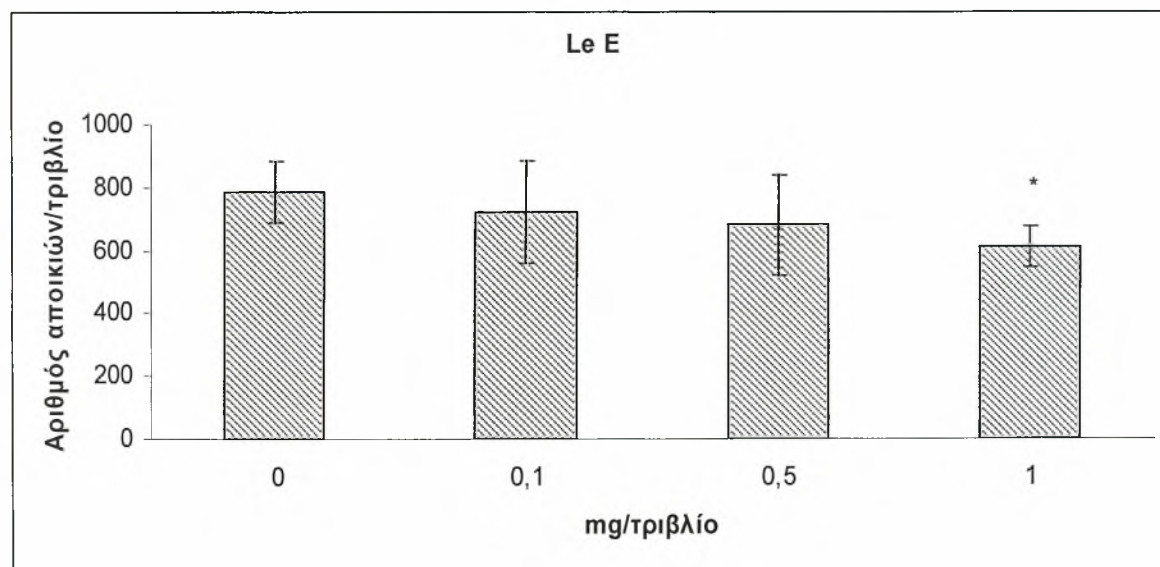
¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.

²Η μπλεομυκίνη έχει τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο.

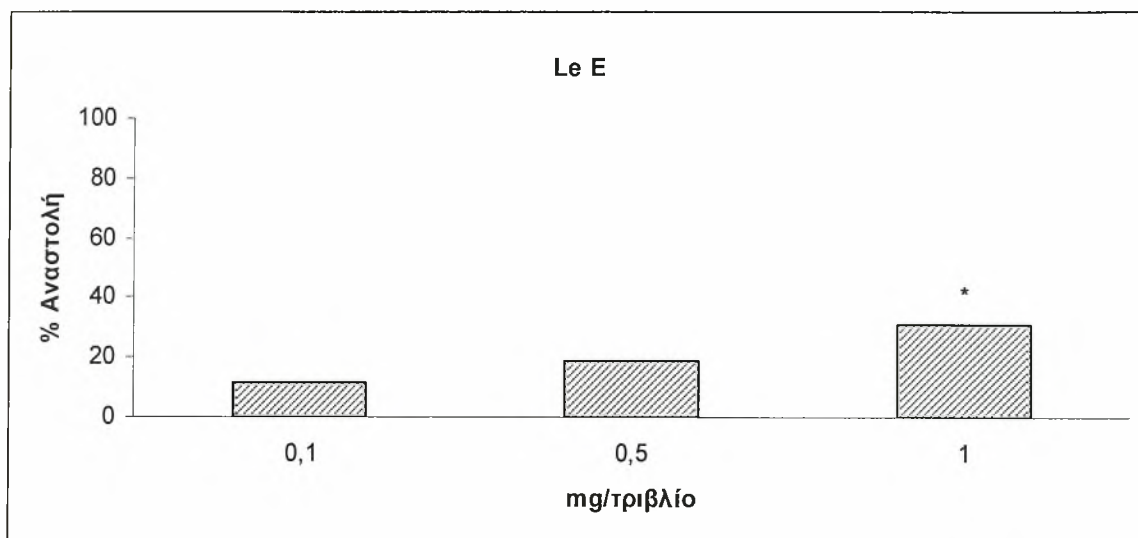
³Ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο υπολογίζεται αφαιρώντας την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στον αρνητικό μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το κλάσμα.

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

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



Γράφημα 9: Επίδραση του κλάσματος Le E στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (p<0,05).



Γράφημα 10: Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le E στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. *Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ($p < 0,05$).

Πίνακας 12: Επίδραση του κλάσματος Le N στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

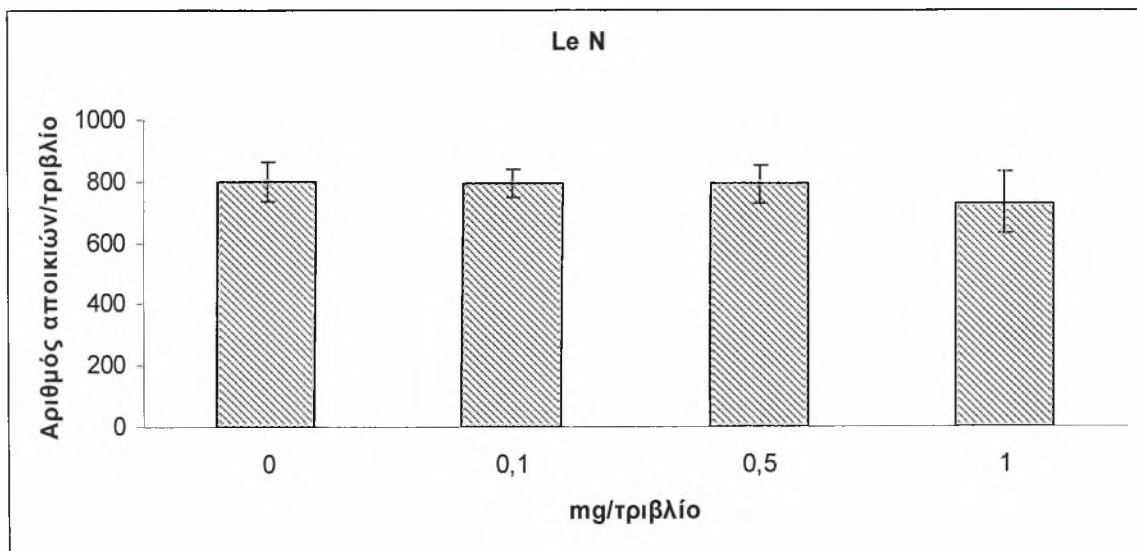
Καλλιέργεια	Αριθμός αποικιών/τριβλίο ¹	% Αναστολή	Αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο ³
Αρνητικός μάρτυρας	242 ± 27	-	-
Θετικός μάρτυρας (+BLM ²)	799 ± 66**	-	557
Κλ.0.1mg/τριβλίο(86μM) (+BLM)	793 ± 43	1	551
Κλ.0.5mg/τριβλίο(432μM) (+BLM)	789 ± 63	2	547
Κλ.1mg/τριβλίο(865μM) (+BLM)	730 ± 103	12	488
Κλ.1mg/τριβλίο(865μM) (-BLM)	230 ± 17	-	-

¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο.

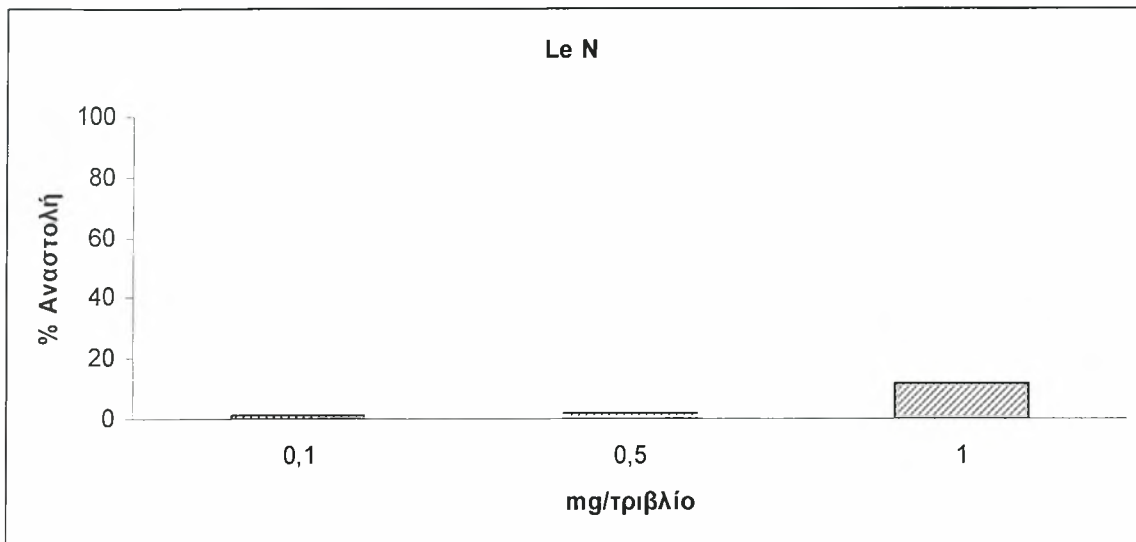
²Η μπλεομυκίνη έχει τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο.

³Ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο υπολογίζεται αφαιρώντας την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στον αρνητικό μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το κλάσμα.

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



Γράφημα 11: Επίδραση του κλάσματος Le N στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 12: Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le N στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Πίνακας 13: Επίδραση του κλάσματος Le O στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

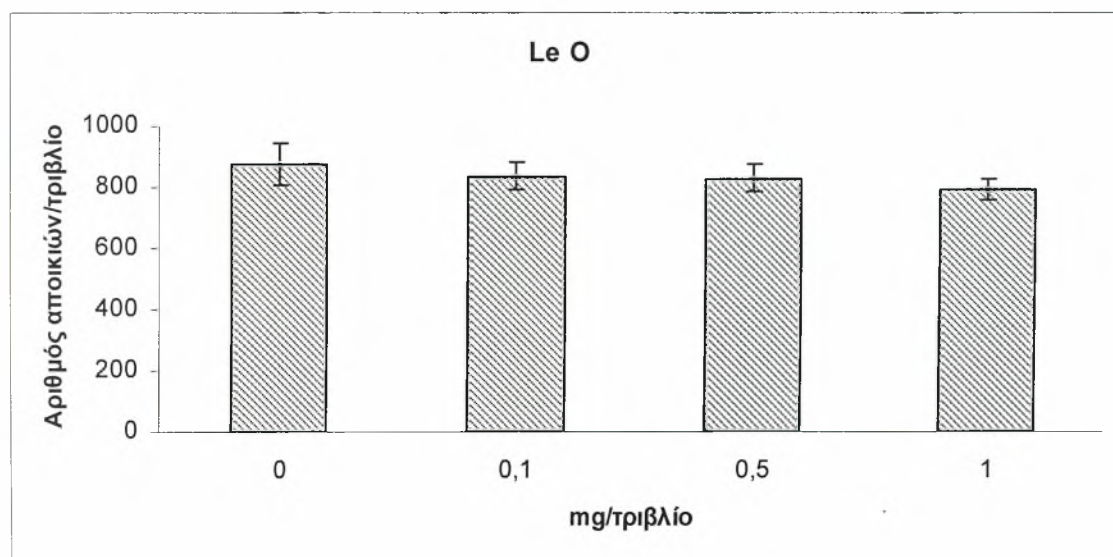
Καλλιέργεια	Αριθμός αποικιών/τριβλίο ¹	% Αναστολή	Αριθμός αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο ³
Αρνητικός μάρτυρας	252 ± 25	-	-
Θετικός μάρτυρας(+BLM ²)	878 ± 68**	-	626
Κλ.0.1mg/τριβλίο(88μM) (+BLM)	836 ± 46	7	584
Κλ.0.5mg/τριβλίο(443μM) (+BLM)	830 ± 46	8	578
Κλ.1mg/τριβλίο(883μM) (+BLM)	794 ± 34	13	542
Κλ.1mg/τριβλίο(883μM) (-BLM)	234 ± 12	-	-

¹Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των αποικιών/τριβλίο

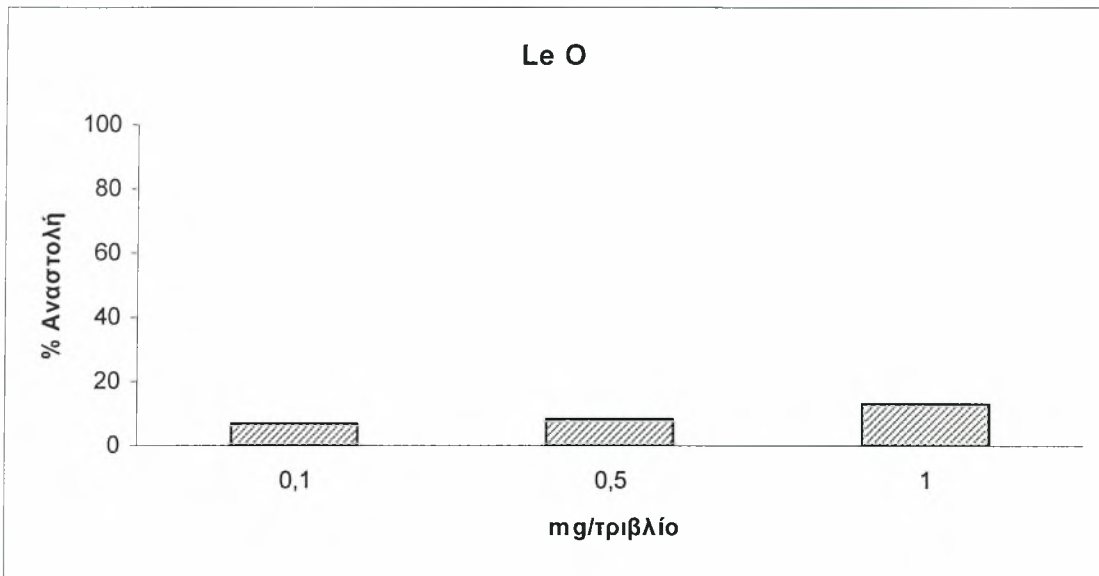
²Η μπλεομυκίνη έχει τελική συγκέντρωση 0.125μg/τριβλίο.

³Ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης/τριβλίο υπολογίζεται αφαιρώντας την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στον αρνητικό μάρτυρα από την μέση τιμή του αριθμού των αποικιών στα τριβλία που περιέχουν τη μπλεομυκίνη και/ή το κλάσμα.

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



Γράφημα 13: Επίδραση του κλάσματος Le O στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Γράφημα 14: Απεικόνιση της % αναστολής του κλάσματος Le O στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

4. Συζήτηση

Δεδομένου ότι το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, την καλύτερα υποσχόμενη στρατηγική για την πρόληψη του καρκίνου αποτελεί η χημειοπροστασία, η οποία ορίζεται ως η πρόληψη, αναστολή, ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με την χορήγηση συνθετικών ή διαιτητικών μέσων (Stoner G.D. et al. 1997). Αρκετές επιδημιολογικές και *in vivo* μελέτες απέδειξαν ότι η κατανάλωση τροφών, όπως είναι τα φρούτα, τα λαχανικά και τα ψυχανθή σχετίζεται με μειωμένη εμφάνιση πολλών μορφών καρκίνου (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα, του προστάτη, του παχέος εντέρου και του μαστού) (Nepka C. et al. 1999. Kelloff G.J et al. 2000. Kris-Ethelton P.M. et al. 2002).

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae*. Οι καρποί τους, τα όσπρια καταναλώνονται ως τρόφιμα και αποτελούν σημαντικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής (Rochfort S. and Panozzo J. 2007, Vasilopoulou E. et al. 2005). Εκτός από την υψηλή διατροφική τους αξία (πρωτεΐνες, άμυλο, φυτικές ίνες, ανόργανα στοιχεία και βιταμίνες) (Guillon F. and Champ M.M-J. 2002) περιέχουν και αρκετές φυτοχημικές ουσίες, σημαντική κατηγορία των οποίων αποτελούν οι πολυφαινόλες, όπως είναι τα φλαβονοειδή (κυρίως, οι προανθοκυανιδίνες και οι ισοφλαβόνες), τα λιγνάνια και τα φαινολικά οξέα, που έχει βρεθεί ότι δρουν χημειοπροστατευτικά (Champ M.M-J. 2002). Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στα ψυχανθή δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δεν είναι πλήρως γνωστοί.

Στα πλαίσια λοιπόν, γενικής μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών φυτών, με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Από ένα σύνολο ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae* επιλέχθηκαν τα φυτά *Lotus Edulis* και *Vicia faba*. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lotus edulis* και *Vicia faba* καθώς και τα κλάσματα καθαρών μορίων που προέκυψαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis* παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. et al. 2008). Για την περαιτέρω μελέτη του μοριακού μηχανισμού της αντιοξειδωτικής τους δράσης, εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους στην επαγόμενη από οξειδωτικό παράγοντα (μπλεομυκίνη) μεταλλαξιγένεση σε βακτηριακά κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 με τη μέθοδο του Ames test. Η μεταλλαξιγένεση της μπλεομυκίνης, εμπλέκει παραγωγή ROS, όπως είναι το $O_2^{\bullet-}$ και το OH^{\bullet} , οι οποίες επάγουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Dorr R.T 1992). Αναστολή της επαγόμενης μεταλλαξιγένεσης από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και κλάσματα δίνει δυνατότητα περαιτέρω μελέτης του μοριακού μηχανισμού της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Συνολικά, μελετήθηκαν τα 2 μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των συγκεκριμένων φυτών και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis*.

Όσον αφορά τα δύο μεθανολικά εκχυλίσματα πόας που μελετήθηκαν από τα φυτά *Lotus Edulis* και *Vicia faba*, κανένα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική επίδραση στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 0.3, 3 και 6mg/τριβλίο. Σε προηγούμενες μελέτες, μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα σταφυλιών Μανδηλαριάς που εξετάστηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις (0.3, 3 και 6mg/τριβλίο) παρατηρήθηκε ότι εμφάνισαν ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 (Stagos D. et al. 2006). Η διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων αυτών είναι πιθανόν υπεύθυνη για την διαφορετική συμπεριφορά τους. Η υψηλότερη περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σταφυλιών σε πολυφαινολικές ουσίες ενδεχομένως να ευθύνεται για την ισχυρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους.

Από τα 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πώας του φυτού *Lotus Edulis*, 2 από αυτά (Le B και Le E) παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση, σε αντίθεση με το αρχικό εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, το κλάσμα Le B που ήταν το πιο ισχυρό, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης κατά 18 %, 29 % και 39 % στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 0.1, 0.5 και 1mg/τριβλίο αντίστοιχα. Το κλάσμα Le E παρουσίασε μικρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση, εκδηλώνοντας στατιστικά σημαντική αναστολή 31 % μόνο στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκεντρωση, 1mg/τριβλίο. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα κλάσματα Le E και Le B παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις (0.1, 0.5, 1 mg/τριβλίο) σε σχέση με αυτές που δοκιμάστηκε το αρχικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* (0.3, 3, 6 mg/τριβλίο). Το γεγονός ότι τα κλάσματα είναι πιο ισχυρά από το αρχικό εκχύλισμα του φυτού δείχνει ότι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν ανάμεσα στα φλαβονοειδή μέσα στο εκχύλισμα μπορεί να επηρεάζουν τη δράση τους. Αυτό ίσως να οφείλεται στην ποικιλομορφία των ενώσεων που υπάρχουν μέσα στο εκχύλισμα και που μπορεί να επηρεάζουν την δράση των δραστικών τους μορίων καθώς και στο ότι τα μόρια δρουν διαφορετικά όταν βρίσκονται μόνο τους από ό,τι όταν βρίσκονται μέσα σε ένα εκχύλισμα. Παρόμοια, βρέθηκε ότι κλάσματα που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα σταφυλιών παρουσίασαν διαφορετικές δράσεις στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε σχέση με τα αρχικά τους εκχυλίσματα (Stagos D. et al. 2006).

Όπως φαίνεται και από την εικόνα 14, τα κλάσματα του φυτού *Lotus edulis* αποτελούνται από μεμονωμένες γλυκοσυλιωμένες μορφές της καιμπερόλης. Έτσι οι παρατηρούμενες διαφορές στη δράση των κλασμάτων οφείλονται ενδεχομένως στη διαφορετική δομή τους. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από την χημική τους δομή, τα κλάσματα Le E και Le B αποτελούν ακετυλιωμένες μορφές των κλασμάτων Le N και Le O αντίστοιχα. Το γεγονός ότι μόνο τα πρώτα παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση, δείχνει ότι η παρουσία της ακετυλομάδας είναι εκείνη που επηρεάζει τη δράση τους. Η ομάδα αυτή πιθανόν καθιστά τα μόρια Le E και Le B περισσότερο λιπόφιλα, με αποτέλεσμα να διαπερνούν πιο εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες, να εισέρχονται στα κύτταρα και να ασκούν τη δράση τους.

Με βάση το γεγονός ότι η μεταλλαξιγένεση της μπλεομυκίνης, εμπλέκει την παραγωγή ROS, όπως είναι οι ρίζες του $O_2^{\bullet -}$ και του OH^{\bullet} , οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα κλάσματα Le B και Le E εκδηλώνουν την αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους μπορεί να σχετίζονται με την αλληλεπίδρασή τους με αυτές τις ρίζες. Σε προηγούμενη μελέτη, βρέθηκε ότι αυτές οι γλυκοσυλιωμένες μορφές καιμπερόλης, των κλασμάτων Le B και Le E, παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα και ανέστειλαν την επαγόμενη από τις ρίζες OH^{\bullet} βλάβη στο DNA (Spanou C. et al. 2008). Ακόμη, παρόμοιες γλυκοσυλιωμένες μορφές καιμπερόλης παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, ωστόσο η δράση τους ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των αντίστοιχων μη γλυκοσυλιωμένων μορφών της (Burda S. and Oleszek W. 2001, Heim K.E. et al. 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι στον μηχανισμό δράσης της μπλεομυκίνης, εκτός από τις ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται και ιόντα Fe τα οποία δρουν ως συμπαραγόντες (Dorr R.T. 1992). Έχει βρεθεί ότι τα φλαβονοειδή δρουν αντιοξειδωτικά όχι μόνο αδρανοποιώντας αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες αλλά και δεσμεύοντας χηλικά τα ιόντα Fe^{+2} (Heim K.E. et al. 2002). Η καιμπερόλη είναι γνωστό ότι δεσμεύει χηλικά τα ιόντα Fe^{+2} , ωστόσο γλυκοσιδιά της δεν έχει βρεθεί ότι έχουν παρόμοιες ιδιότητες (Van Acker S. et al. 1996). Ωστόσο, η μελέτη του μοριακού μηχανισμού αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων καθαρών μορίων απαιτεί τη χρήση περισσότερων του ενός οξειδωτικών παραγόντων (π.χ. H_2O_2 και tBOOH) (Grey C.E. and Adlercreutz P. 2003, Edenharder R. and Grunhage D. 2003).

Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα φλαβονοειδή που βρίσκονται στα κλάσματα εμφάνισαν δράση σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις (~800μM), σε σχέση με άλλες πολυφαινόλες οι οποίες ήταν δραστικές απέναντι στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102 σε συγκεντρώσεις 100-500μM (Stagos D. et al. 2006).

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lotus Edulis* και *Vicia faba* δεν επηρέασαν την επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση. Ωστόσο, κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus Edulis* εμφάνισαν σημαντική αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα συγκεκριμένα καθαρά μόρια εκδηλώνουν την αντιμεταλλαξιγόνο δράση φαίνεται να σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες που απελευθερώνονται κατά την δράση της μπλεομυκίνης. Η ικανότητά τους αυτή τα καθιστά πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες και το φυτό *Lotus Edulis* σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* έρευνες, προκειμένου να διευκρινιστεί η δράση και ο μεταβολισμός τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E.(1975), Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Research*, **31**:347-364
- Ariga T.(1990), Radical Scavenging Action and its Mode in Procyanidins B-1 and B-3 from Azuki Beans to Peroxyl Radicals, *Agric. Biol. Chem.*, **54**(10):2499-2504
- Βαλαβανίδης Α.(2003), Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί καρκινογένεσης, Αθήνα: ΒΗΤΑ Ιατρικές εκδόσεις ΜΕΠΕ
- Barnes S., Boersma B., Patel R., Kirk M., Darley-Usmar V.M., Kim H., Xu J. (2000), Isoflavonoids and chronic disease:Mechanisms of action, *BioFactors*, **12**:209-215
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.(2005), Βιοχημεία τόμος ΙΙ, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Burda S., Oleszek W. (2001), Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, **49**:2774-2779
- Burger R.M.(1998), Cleavage of nucleic acids by bleomycin, *Chem. Rev.*, **98**:1153-1169
- Carlo G.D., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F.(1999), Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, **65**(4):337-353
- Champ M.M-J.(2002), Non-nutrient bioactive substances of pulses, *British Journal of Nutrition*, **88**:307s-319s
- Chen J., Stubbe J.A. (2005), Bleomycins: towards better therapeutics, *Nature Reviews Cancer*, **5**:102-112
- Chi Chen, Ah-Ng Tony Kong (2005), Dietary cancer-chemopreventive compounds:from signaling and gene expression to pharmacological effects,*TRENDS in pharmacological Sciences*, **26**(6):318-326
- De Flora S., Ferguson L.R.(2005), Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents, *Mutation Research*, **591**:8-15
- Dorr R.T (1992), Bleomycin pharmacology:mechanism of action and resistance and clinical pharmacokinetics, *Semin. Oncol.*, **19**:3-8
- Κουρέτας Δ., Βιοχημική τοξικολογία
- Edenharder R. , Grunhage D. (2003), Free radical-scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102, *Mutation Research*, **540**:1-18
- Ferguson L.R.(2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, **475**:89-111
- Fresco D., Borges F., Diniz C., Marques M.P.M.(2006), New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols, *Medicinal Research Reviews*, **26**(6):747-766
- Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.-Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α.(2003), Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Grey C.E., Adlercreutz P.(2003), Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in Salmonella typhimurium TA102, *Mutation Research*, **527**:27-36
- Guillon F., Champ M.M-J.(2002), Carbohydrate fractions of legumes:uses in human nutrition and potential for health, *British Journal of Nutrition*, **88**:293s-306s

- Halliwell B.(2001), Free radicals and other reactive species in disease, *Encyclopedia of life sciences*
- Hecht S.M.(2000), Bleomycin:New perspectives on the mechanism of action, *J. Nat. Prod.*, **63**:158-168
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.(2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutrition Biochemistry*, **13**:572-584
- Karihtala P., Soini Y.(2007), Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies, *APMIS*, **115**:81-103
- Kelloff G.J., Crowell J.A., Steele V.E., Lubet R.A., Malone W.A., Boone C.W., Kopelovich L., Hawk E., Lieberman R., Lawrence J.A., Ali I., Viner J.L., Sigman C.C (2000), Progress in cancer chemoprevention agents, *J. Nutr.*, **130**:467S-471S
- Kris-Ethelton P.M., Hecker K.D., Bonamone A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D.(2002), Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am. J. Med.* **113** (9B):71S-88S
- Κουρέτας Δ., Βιοχημική τοξικολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- La Vecchia C.(2004) Mediterranean diet and cancer, *Public Health Nutrition*, **7**(7):965-968
- Levin D.E., Hollstein M.C.Christman M.F., Schwiers E.A., Ames B.N.(1982), A new Salmonella tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**:7445-7449
- Long E.C., Hecht S.M., van der Marel G.A, van Boom J.H. (1990), Interaction of bleomycin with a methylated DNA oligonucleotide, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**:5272-5276
- Madar Z., Stark A.H.(2002), New legume sources as therapeutic agents, *British Journal of Nutrition*, **88**:287s-292s
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.(2004), Polyphenols:food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**:727-47
- Manson M.M., Gescher A., Hudson E.A., Plummer S.M., Squires M.S., Prigent S.A.(2000), Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents, *Toxicology letters*, **112-113**:499-505
- Marcello D.(2006), Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, **77**:67-82
- Maron D., Ames B.N.(1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**:173-215
- Merghem R., Jay M., Brun N., Voirin B.(2004), Qualitative analysis and HPLC isolation and identification of procyanidins from *Vicia faba*, *Phytochemical analysis*, **15**:95-99
- Mortermans K., Zeiger E.(2000), The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research*, **455**:29-60
- Mylonas C., Kouretas D.(1999), Lipid peroxidation and tissue damage, *in vivo*, **13**:295-310
- Nepka C., Sivridis E., Antonoglou O., Kotsaris A., Georgellis A., Taitzoglou I., Hytiroglou P., Ppadimitriou C., Zintzaras I., Kouretas D.(1999), Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid and administration in hepatoma-bearing C3H male mice, *Cancer Lett.*, **141**(1-2):57-62
- Nichenametla S.N., Taruscio T.G., Barney D.L., Exon J.H.(2006), A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**:161-183

- Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman (2000), *Φαρμακολογία*, Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Prival M.J., Mitchell V.D.(1982), Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9, *Mutation Research*, **97**:103-116
- Reid T.M., Morton K.C., Wang C.Y., King C.M.(1984), Mutagenesis of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems, *Environ. Mutagen.*, **6**:247-259
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L.(2003), Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, **23**(4):519-534
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Papanga G.(1997), Antioxidants Properties of phenolic compounds, *trends in plant science*, **2**(4)
- Rochfort S., Panozzo J.(2007), Phytochemicals for health the role of pulses, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**:7981-7994
- Santana-Rios G., Orner G.A., Amantana A., Provost C., Wu S.Y., Dashwood R.H.(2001), Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay, *Mutation Research*, **495**:61-74
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C.(2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**:287-306
- Scalbert A., Williamson G.(2000), Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition*, **130**:2073s-2085s
- Shukla Y., Kumar Pal S.(2004), Dietary cancer chemoprevention: An overview, *Int. J. Hum. Genet.*, **4**(4):265-276
- Shureiqi I., Reddy P., Brenner E.D.(2000), Chemoprevention: general perspective, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **33**:157-167
- Sivakumaran S., Rumball W., Lane G.A., Fraser K., Foo L.Y., Yu M., Meagher L.P. (2006), Variation of proanthocyanidins in Lotus species, *Journal of Chemical Ecology*, **32**(8):1797-1816
- Smith J.J., Tully P., Padberg R.M.(2005), Chemoprevention: a primary cancer prevention strategy, *Seminars in Oncology Nursing*, **21**(4):243-251
- Spanou C., Bourou G., Dervishi A., Aligiannis N., Angelis A., Komiotis D., Skaltsounis A.-L., Kouretas D.(2008), Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from greek legume plant extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**:6967-6976
- Stagos D., Karaberis E., Kouretas D.(2005), Assessment of antioxidant/anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *in vivo*, **19**:741-748
- Stagos D., Kazantzoglou G., Theofanidou D., Kakalopoulou G., Magiatis P., Mitaku S., Kouretas D.(2006), Activity of grape extracts from greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102, *Mutation Research*, **609**:165-175
- Stoner G.D., Morse M.A., Kelloff G.J.(1997), Perspective in cancer chemoprevention, *Environmental Health Perspectives*, **105**:945-954
- Stubbe J., Kozarich J.W., Wu W., Vanderwall D.E.(1996), Bleomycins: a structural model for specificity, binding and double strand cleavage, *Acc. Chem. Res.*, **29**:322-330
- Sugihara N., Kaneko A., Furuno K.(2003), Oxidation of flavonoids which promote DNA degradation induced by bleomycin-Fe complex, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(8):1108-1114

- Tham D.M., Gardner C.D., Haskell W.L.(1998), Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**(7):2223-2235
- Van Acker S., Van Den Berg D.-J., Tromp M., Griffioen D., Van Bennekom W., Van Der Vijgh W., Bast A.(1996), Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine*, **20**(3):331-342
- Vasilopoulou E., Georga K., Joergensen M.B., Naska A., Trichopoulou A.(2005), The antioxidant properties of greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu, *Curr. Med. Chem.-Immun., Endoc. & Metab. Agents*, **5**(1):33-45
- Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L.(2001), Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Ann. Rev. Nutr.*, **21**:381-406
- Young-Joon Surh (2003), Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nature Reviews Cancer*, **3**:768-780
- www.pfaf.org
- www.Wikipedia.com

