

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας: Τοξικολογία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**"Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και γενοτοξικής/ αντιγενοτοξικής  
δράσης επιφανειοδραστικών παραγόντων απομονωμένων από  
θαλάσσια βακτήρια"**

Από την

ΜΑΝΤΕΛΑ ΜΑΡΙΑ-ΕΙΡΗΝΗ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αγλαΐα Παππά, Αναπληρώτρια  
Καθηγήτρια Μοριακής Φυσιολογίας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και  
Γενετικής

Αλεξανδρούπολη 2019

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, η οποία υλοποιήθηκε στο Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στη διεκπεραίωση της.

Αρχικά, ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Παππά Αγλαΐα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Φυσιολογίας, για την συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο, καθώς και για την ευκαιρία που μου πρόσφερε ώστε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω, στους μεταδιδακτορικούς ερευνητές, Ανεστόπουλο Ιωάννη και Βουλγαρίδου Γεωργία-Περσεφόνη, για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση και τον χρόνο που διέθεσαν στην προσπάθεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται.

Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, κυρίως τον Κλάβαρη Αριέλ και την Κιούση Δέσποινα, που με την συμπαράσταση, την βοήθεια και τα αστεία τους, με βοήθησαν να ολοκληρώσω την εργασία μου περνώντας ευχάριστο και ποιοτικό χρόνο στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους φίλους μου, στην οικογένεια μου, Στέφανο, Βάσω και Κωνσταντίνα και στον αγαπημένο μου φίλο Δημήτρη που όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου και μου συμπαραστέκονται με απεριόριστη αγάπη και κατανόηση σε κάθε απόφαση που παίρνω. Σας ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου.

Με εκτίμηση, Μαντέλα Μαρία-Ειρήνη

## **Τριμελής Επιτροπή**

**Παππά Αγλαΐα (επιβλέπουσα):** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Φυσιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης.

**Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών- Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Γαλάνης Αλέξης:** Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης.

# Πίνακας περιεχομένων

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	2
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
<b>1.1 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - SURFACE-ACTIVE AGENTS (SAs)</b> 9	
1.1.1 BIO-SURFACTANTS AND BIO-EMULSIFIERS .....	9
1.1.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	10
<b>1.1.2.1 ΧΑΜΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ- LOW-MOLECULAR-WEIGHT SURFACTANTS (LMW)</b> .....	10
<b>1.1.2.2 ΥΨΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ- HIGH- MOLECULAR WEIGHT SURFACTANTS (HMW)</b> ....	12
1.1.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟ- ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ .....	13
1.1.4 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟ-ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ .....	14
1.1.5 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	15
1.1.6 ΤΟΜΕΙΣ ΔΥΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	16
<b>1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – OXIDATIVE STRESS (OS)</b> .....	20
1.2.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ- Reactive oxygen species (ROS) & Reactive Nitrogen species (RNS) .....	20
<b>1.2.1.1 Reactive oxygen species (ROS)</b> .....	21
<b>1.2.1.2 Reactive Nitrogen Species (RNS)</b> .....	23
1.2.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ .....	23
1.2.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ROS .....	24
1.2.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ .....	25
<b>1.2.4.1 ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ</b> .....	26
<b>1.2.4.2 ΜΗ-ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ</b> .....	27

<b>1.3 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (UV)</b> .....	28
1.3.1 ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΗΛΙΑΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.....	28
1.3.2 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	29
1.3.3 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΤΥΠΟΥ Β (UVB) .....	31
<b>1.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA</b> .....	32
1.4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ FENTON ΚΑΙ HABER-WEISS.....	32
1.4.2 ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ .....	33
1.4.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ΓΙΑ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΟ DNA .....	34
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	37
2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A375 .....	38
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ DPPH ΚΑΙ ABTS.....	38
<b>2.2.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ DPPH</b> .....	38
<b>2.2.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ABTS</b> .....	41
2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) ‘Η ΜΕΘΟΔΟΣ Comet .....	43
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	49
<b>3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ</b> .....	49
<b>3.1.1 Δοκιμασία ABTS</b> .....	49
<b>3.1.2 Δοκιμασία DPPH</b> .....	51
<b>3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ COMET</b> .....	54
<b>3.2.1 Alkaline Comet Assay</b> .....	54
<b>3.2.2 Neutral Comet Assay</b> .....	61
..... <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	68
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	69
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	75

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος Horizon 2020, βάσει της συμφωνίας επιχορήγησης MARISURF. Στην παρούσα ερευνητική εργασία εκτιμήθηκε η μεταλλαξιογόνος/αντι-μεταλλαξιογόνος δράση και η αντιοξειδωτική ικανότητα επιφανειοδραστικών παραγόντων προερχόμενων από βακτηριακά στελέχη θαλάσσιας προέλευσης. Η επιλογή των στελεχών συνολικά πραγματοποιήθηκε μετά από μια διαδικασία που βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες τους όπως είναι το άφρισμα (foaming), η γαλακτωματοποίηση (emulsification) και η πηκτωματοποίηση (gelling). Μετά την διαδικασία επιλογής που πραγματοποιήθηκε από άλλες ομάδες του προγράμματος, το ενδιαφέρον κέντρισαν τέσσερα υποσχόμενα στελέχη, των οποίων οι συνθήκες καλλιέργειάς βελτιστοποιήθηκαν και οι παράγοντες A, B, C, D υποβλήθηκαν σε περαιτέρω μελέτη. Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος επικεντρωθήκαμε στο βιο-πολυμερές D. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική comet assay, για τον έλεγχο της πιθανής μεταλλαξιογόνου ή αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του παράγοντα, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, που επάγεται από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή UV ακτινοβολία, στην κυτταρική σειρά A375. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το πολυμερές D δεν παρουσιάζει σημαντική μεταλλαξιογόνο/ αντιμεταλλαξιογόνο δράση. Όπως προέκυψε από τις δοκιμασίες 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) και 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), ο παράγοντας χαρακτηρίζεται από χαμηλή αντιοξειδωτική δράση. Η παρούσα μελέτη, στα πλαίσια του προγράμματος, συμβάλλει στον χαρακτηρισμό καινοτόμων βιοδραστικών μορίων από μία μοναδική συλλογή βακτηρίων θαλάσσιας προέλευσης, στοχεύοντας στην παραγωγή φυσικών και φιλικών προς το περιβάλλον επιφανειοδραστικών παραγόντων με σκοπό την αντικατάσταση των συνθετικά παραγόμενων ενώσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε πλήθος εμπορικών εφαρμογών.

Λέξεις Κλειδιά: Βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες, Θαλάσσια Βακτήρια, Αντιοξειδωτική δράση, Μεταλλαξιογόνος δράση, Αντιμεταλλαξιογόνος δράση

## ABSTRACT

This thesis was conducted under the European Horizon 2020 programme under the MARISURF Grant Agreement. In this study, the mutagenic / anti-mutagenic and antioxidant properties of surfactants derived from bacterial strains of marine origin were evaluated. The selection of the strains as a whole was carried out after a process based on their various properties such as foaming, emulsification and gelling. Following the selection process carried out by other program groups, our team was interested in four promising strains whose cultivation conditions were optimized and factors A, B, C, D underwent a further study. In this specific research project, we focused on biopolymer D. The comet assay technique was used to test the potential mutagenic or anti-mutagenic activity of the agent under oxidative stress conditions induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or UV radiation in cell line A375. The results showed that polymer D exhibits no significant mutagenic/antimutagenic activity. The agent is also characterized by low antioxidant activity as determined by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assays. The present study, within the framework of the program, contributes to the characterization of novel bioactive molecules from a unique collection of marine bacteria, aiming at the production of natural and environmentally friendly surfactants in order to replace the synthetically produced compounds currently used in many commercial applications.

Key-Words: Biosurfactants, Marine Bacteria, Antioxidant activity, Mutagenic Activity, Antimutagenic Activity

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι αμφίφυλες χημικές ενώσεις, καθώς σχηματίζονται από μοριακές δομές, οι οποίες είναι τόσο υδρόφοβες, όσο και υδρόφιλες. Χαρακτηρίζονται από σημαντικές ιδιότητες, όπως είναι η ικανότητα δημιουργίας γαλακτωμάτων και η τάση να διανέμονται κατά τη διεπαφή μεταξύ δύο φάσεων διαφορετικής πολικότητας, για παράδειγμα τα έλαια και το νερό ή ο αέρας και το νερό, μειώνοντας την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Οι ιδιότητες αυτές των επιφανειοδραστικών παραγόντων τους συνιστά μία από τις σημαντικότερες τάξεις χημικών ενώσεων με πλήθος εφαρμογών στην ιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων.

Οι περισσότεροι επιφανειοδραστικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι συνθετικής προέλευσης και έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν τοξικότητα και χαμηλά επίπεδα βιοαποικοδόμησης. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει η αναζήτηση εναλλακτικών-φιλικών προς το περιβάλλον βιοεπιφανειοδραστικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν έναντι των συνθετικών μορίων, όπως για παράδειγμα η βιοαποικοδόμηση, το προφίλ χαμηλής τοξικότητας, η αντοχή σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH και η δυνατότητα παραγωγής τους από ανανεώσιμες πηγές φυσικής προέλευσης.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας, στα πλαίσια του προγράμματος, είναι η εκτίμηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού και της μεταλλαξιογόνου/ αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης ενός βιοδραστικού μορίου, από μια μοναδική συλλογή βακτηρίων θαλάσσιας προέλευσης, με σκοπό να συμβάλλει στην παραγωγή φυσικών και φιλικών προς το περιβάλλον επιφανειοδραστικών παραγόντων για την αντικατάσταση των συνθετικά παραγόμενων ενώσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε πλήθος εμπορικών εφαρμογών.



## **1.1 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - SURFACE-ACTIVE AGENTS (SAs)**

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι στοιχεία της εξωκυτταρικής επιφάνειας, που παράγονται από μύκητες, βακτήρια και ζύμη. Συνήθως είναι πολύπλοκα μόρια, και περιλαμβάνουν δομές όπως γλυκοπεπτίδια, πολυσακχαρίτες, πρωτεϊνικά σύμπλοκα, λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια. Οι παράγοντες αυτοί έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων τους, όπως για παράδειγμα η βιοαποικοδόμηση, το προφίλ χαμηλής τοξικότητας και η δυνατότητα παραγωγής τους από ανανεώσιμα και φθηνά υποστρώματα. [8] Αυτές οι ιδιότητές τους έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, η οποία διεξάγει πλήθος μελετών στοχεύοντας στην παραγωγή φυσικών και φιλικών προς το περιβάλλον επιφανειοδραστικών παραγόντων με σκοπό την αντικατάσταση των συνθετικά παραγόμενων ενώσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε πλήθος εμπορικών εφαρμογών.

### **1.1.1 BIO-SURFACTANTS AND BIO-EMULSIFIERS**

Οι βιο-γαλακτοματοποιητές και οι βιο-πολυμερικές επιφανειοδραστικές ουσίες, είναι επιφανειοδραστικοί παράγοντες που παράγονται από βιολογικά συστήματα, για παράδειγμα από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς. Οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες προέρχονται από φυτά και ζώα και απαιτούνται μεγάλες ποσότητες αυτών για να επιτευχθεί η μέγιστη λειτουργικότητά τους. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες που παράγονται από μικροβιακές πηγές φαίνεται να προσφέρουν μία καλή εναλλακτική σε σχέση με τις προηγούμενες πηγές, εφόσον έχει αποδειχθεί πως προσφέρουν βελτιωμένες ιδιότητες, όπως η σταθερότητα και η καλύτερη ανοχή σε μεγάλο εύρος ακραίων συνθηκών θερμοκρασίας, pH και αλατότητας.

Με σκοπό, λοιπόν, την εκμετάλλευση των δυνητικών βιοτεχνολογικών χρήσεων των βακτηριακών στελεχών που παράγουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες, η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας για την ανάπτυξή τους, είναι ένα σημαντικό αρχικό βήμα για την μεγιστοποίηση της απόδοσης αυτών των τύπων ενώσεων. Επιπλέον, με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλο βαθμό βελτίωση της λειτουργικότητας τους. Διάφορες πηγές δείχνουν πως οι αβιοτικές παράμετροι, όπως θερμοκρασία, pH,

αλατότητα, και οι διαφορετικές θρεπτικές συνθήκες επηρεάζουν τις αποδόσεις παραγωγής και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. [15] Βέβαια, ο χειρισμός των συνθηκών της καλλιέργειας μπορεί να μην είναι αρκετός για την αύξηση των αποδόσεων. Ορισμένα μικροβιακά στελέχη φαίνεται πως δεν παράγουν επιφανειοδραστικούς παράγοντες σε επαρκείς ποσότητες και γι' αυτό το λόγο πολλές φορές απορρίπτονται ως υποψήφιοι για βιοτεχνολογική ανάπτυξη.

Μία μέθοδος που σχετίζεται με την αύξηση παραγωγής των SAs για εμπορική χρήση, αφορά τον σχεδιασμό νέων τεχνικών για την επιλεκτική προσαρμογή της παραγωγής αυτών των χημικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα η χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA για την μαζική έκφραση τους *in vitro* σε εναλλακτικά συστήματα ξενιστών. Αν και τέτοιου είδους μέθοδοι είναι πολύ ελπιδοφόρες για την ενίσχυση των αποδόσεων παραγωγής και λειτουργικότητας του τελικού προϊόντος, παραδοσιακές μέθοδοι διαλογής από φυσικά περιβάλλοντα αποτελούν ένα αξιόπιστο εργαλείο για την ανακάλυψη νέων SAs για εμπορική εκμετάλλευση. [16,17]

## **1.1.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι αμφίφυλες χημικές ενώσεις. Σχηματίζονται από μοριακές δομές, οι οποίες είναι τόσο υδρόφοβες, όσο και υδρόφιλες, και έχουν την τάση να διανέμονται κατά τη διεπαφή μεταξύ δύο φάσεων διαφορετικής πολικότητας, όπως για παράδειγμα μεταξύ ελαίου και νερού, μειώνοντας τη επιφανειακή τάση. Οι παράγοντες αυτοί κατηγοριοποιούνται βάσει του μοριακού τους βάρους, των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους και του τρόπου δράσης τους.

### **1.1.2.1 ΧΑΜΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ- LOW-MOLECULAR-WEIGHT SURFACTANTS (LMW)**

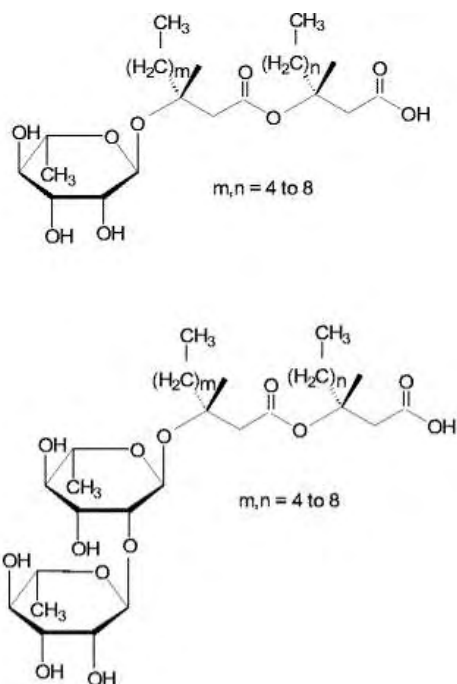
Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) έχουν την ιδιότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση κατά τη διάρκεια διεπαφών αέρα/νερού και την διεπιφανειακή τάση στις διεπαφές πετρελαίου/νερού. Στη συγκεκριμένη κατηγορία, περιλαμβάνονται τα γλυκολιπίδια και τα λιποπεπτίδια. Οι καλύτερα μελετημένοι

γλυκολιπιδικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι τα ραμνολιπίδια και τα σοφορολιπίδια.

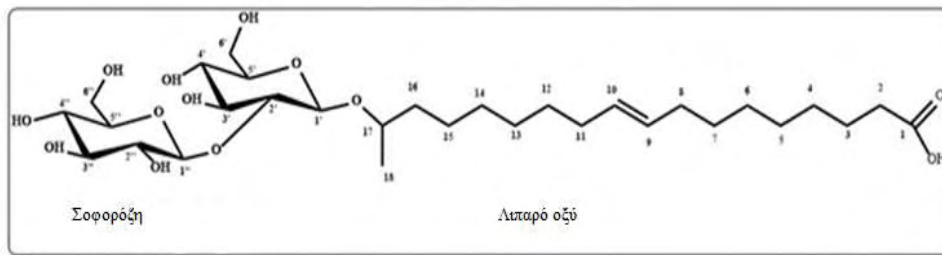
Τα ραμνολιπίδια αποτελούνται από ένα γλυκονικό μέρος που συνήθως περιέχει μία ή δύο ραμνόζες και ένα λιπιδιακό μέρος που περιέχει ένα ή δύο υδροξυ-λιπαρά οξέα. Το *Pseudomonas aeruginosa* είναι το πρώτο βακτήριο που αναφέρθηκε να παράγει ραμνολιπίδια. Η χρήση για μαζική παραγωγή περιορίζεται λόγω του γεγονότος ότι το *P. aeruginosa* είναι ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου και γίνονται προσπάθειες να μεταφερθούν τα γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή ραμνολιπιδίων σε μη παθογόνα *Pseudomonas*. [10]

Τα σοφορολιπίδια αποτελούνται από ένα διμερές σοφορόζης ενωμένο με μακρά αλυσίδα υδροξυ-λιπαρού οξέος. Παράγονται κυρίως από ζύμες του γένους *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum*, *T. Apicola* και μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες με υποστρώματα λάδι και γλυκόζη. [11]

Οι δομές των δύο αυτών κατηγοριών φαίνονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 1, Εικόνα 2):



**Εικόνα 1: Χημική δομή ραμνολιπιδίου. Μονο-ραμνολιπίδιο (Επάνω), Δι-ραμνολιπίδιο (Κάτω)**  
(Προσαρμογή από: Gloria Soberón- Chávez et al., 2005, *Production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718-725)



**Εικόνα 2: Γενική δομή σοφορολιπιδίου.** (Προσαρμογή από: Marcos Roberto de Oliveira et al., 2015, *Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications, International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 6(2), 161-174)

### 1.1.2.2 ΥΨΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ- HIGH- MOLECULAR WEIGHT SURFACTANTS (HMW)

Διάφοροι τύποι βακτηριακών ειδών παράγουν εξωκυτταρικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες που αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες, λιποπρωτεΐνες ή σύνθετα συμπλέγματα των παραπάνω βιοπολυμερών. Οι ουσίες αυτές που συνήθως αναφέρονται με τον όρο γαλακτωματοποιητές, έχουν τη δυνατότητα να διευκολύνουν το σχηματισμό γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (O/W) ή νερού σε έλαιο (W/O).

Ένας γαλακτωματοποιητής είναι αποτελεσματικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.01-0.001%), με αποτέλεσμα να παρατηρούμε ποσοστό γαλακτωματοποιητή-υδρογονάνθρακα 1:100 έως 1:1000. Επίσης, διαθέτει σημαντική ειδικότητα υποστρώματος και δημιουργεί γαλακτώματα σε όλα τα μείγματα που περιλαμβάνουν αλειφατικές και αρωματικές ενώσεις.

Ένα παράδειγμα αυτής της κατηγορίας βιοπολυμερών είναι το αραβικό καουτσούκ. Το συγκεκριμένο βιοπολυμερές χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα βιοτεχνολογικών και βιομηχανικών εφαρμογών, όπως τα προϊόντα καθαρισμού, τα ποτά, τα φαρμακευτικά και κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα. [12,13,14]

### 1.1.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟ-ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται από μία σειρά φυσικοχημικών ιδιοτήτων, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες επιλογής μικροοργανισμών και αξιολόγησης της απόδοσής τους για την παραγωγή αυτών των παραγόντων. Η μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων τους αποτελεί σημείο αυξανόμενου ενδιαφέροντος λόγω των δυνητικών βιομηχανικών εφαρμογών των επιφανειοδραστικών ουσιών. Οι κύριες ιδιότητες τους αναφέρονται στη συνέχεια:

- *Μείωση της επιφανειακής τάσης:* η μείωση της επιφανειακής τάσης του νερού είναι από τις κυριότερες ιδιότητες των βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων. Ένας αποτελεσματικός παράγοντας έχει την ικανότητα να μειώνει την επιφανειακή τάση μεταξύ νερού και αέρα σε πολύ μεγάλο ποσοστό, από τα 72 mN/m σε λιγότερο από 30 mN/m. Επιπλέον, όταν μονομερή του παράγοντα προστίθενται σε διάλυμα ελαίου-νερού, η επιφανειακή τάση μπορεί να μειωθεί έως ότου ο παράγοντας φθάσει στη CMC (critical micelle concentration). Ως CMC ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για την έναρξη σχηματισμού μικκυλίων και δεν παρατηρείται επιπρόσθετη μείωση της επιφανειακής τάσης όταν ο παράγοντας αρχίσει να ξεπερνά αυτή την συγκέντρωση.
- *Γαλακτωματοποίηση:* η ικανότητα σχηματισμού γαλακτωμάτων χαρακτηρίζεται ως μια σημαντική λειτουργία των βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων. Οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες υψηλού μοριακού βάρους είναι καλύτεροι γαλακτωματοποιητές από αυτούς με χαμηλό μοριακό βάρος και ονομάζονται βιο-γαλακτωματοποιητές. Η κύρια ιδιότητα τους είναι ο σχηματισμός και η σταθεροποίηση γαλακτωμάτων νερού σε έλαιο ή ελαίου σε νερό (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.1.2.2). Έχει αποδειχθεί ότι δεν έχουν αποτελεσματικές απορρυπαντικές ιδιότητες και δεν μειώνουν αξιοσημείωτα την επιφανειακή τάση. Συνήθως, οι πολυμερικές ενώσεις είναι πιο αποτελεσματικές στην δημιουργία σταθερών γαλακτωμάτων. Η ιδιότητα της δημιουργίας γαλακτωμάτων ελαίου/νερού φαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη στην βιομηχανία των τροφίμων και των καλλυντικών.
- *Αντιπροσκολλητικοί παράγοντες και σχηματισμός βιοφίλμ:* Μπορούμε να περιγράψουμε ως βιοφίλμ μία ομάδα βακτηρίων που έχουν αποικισθεί σε

οποιαδήποτε επιφάνεια, δηλαδή ένα στρώμα προσκολλημένων στην επιφάνεια βακτηρίων περικυκλωμένο από μια μήτρα εξωτερικού πολυσακχαρίτη. Η βακτηριακή προσκόλληση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν εξωκυτταρικές δομές, κυρίως πολυμερικές ενώσεις, που βοηθούν τα κύτταρα να προσκολληθούν στις επιφάνειες. Αυτές οι βιο-επιφανειοδραστικές ενώσεις χρησιμοποιούν διάφορους τύπους αλληλεπιδράσεων, όπως οι δεσμοί υδρογόνου, με σκοπό να δημιουργήσουν ιεραρχικά διατεταγμένες δομές. Οι δομές αυτές είναι καλά καθορισμένες και περιγράφονται ως μοριακά συγκροτήματα με διαμορφώσεις σπόγγου, κυβικές και εξαγωνικές διαμορφώσεις και διατάξεις στρωμάτων. Τα βιοφίλμ αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τα τρόφιμα καθώς αποτελούν πηγή μόλυνσης. Τα βιο-επιφανειοδραστικά μόρια φαίνεται πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μεταβολή της υδροφοβικότητας της επιφάνειας, με αποτέλεσμα τη μείωση πρόσφυσης μικροβίων στην επιφάνεια. [<sup>48,49,59</sup>]

#### **1.1.4 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟ-ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

Στην πλειονότητα των βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων τα χαρακτηριστικά είναι κοινά, αν και συναντάται ποικιλομορφία στην χημική σύνθεση και τις ιδιότητές τους. Οι ιδιότητες λοιπόν των παραγόντων είναι εξαιρετικά σημαντικές και τους προσδίδουν πλήθος πλεονεκτημάτων σε σχέση με τους συνθετικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία.

Αρχικά, οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες προκαλούν μείωση της επιφανειακής και διεπιφανειακής τάσης σε μεγαλύτερο ποσοστό απ' ό τι τα αντίστοιχα συνθετικά μόρια, με αποτέλεσμα να θεωρούνται περισσότερο αποτελεσματικοί. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από ανοχή σε διακυμάνσεις θερμοκρασίας, pH και ιονικής ισχύος καθώς προέρχονται από βακτήρια που αναπτύσσονται σε εξαιρετικά ακραίες συνθήκες των παραπάνω παραμέτρων. Ακόμη, οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες μπορούν να παραχθούν από μεγάλο εύρος διαθέσιμων πρώτων υλών.

Μια σημαντική ιδιότητα των βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων είναι η βιοδιασπασιμότητα, δηλαδή η αποικοδόμηση τους από βακτήρια και μικροοργανισμούς

τόσο στο νερό, όσο και στο έδαφος. Αυτή η ιδιότητα τους καθιστά χρήσιμους σε διαδικασίες βιοαποκατάστασης και επεξεργασίας αποβλήτων. Επιπροσθέτως, το γεγονός πως η δράση τους είναι εξαιρετικά ακριβής, λόγω των ιδιαίτερων λειτουργικών τους μονάδων, είναι σημαντικό καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αποτοξίνωση συγκεκριμένων ρύπων. Τέλος, τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται είτε ως μη τοξικά είτε ως χαμηλής τοξικότητας μόρια σε σχέση με τα συνθετικά και διαθέτουν ιδιότητες αφομοίωσης, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η χρήση τους σε τομείς, όπως τα τρόφιμα, τα καλλυντικά και τα φαρμακευτικά προϊόντα. [12,59]

### **1.1.5 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ**

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες και γαλακτωματοποιητές συναντώνται ως διαμεσολαβητές σε πολλά προϊόντα της καθημερινής ζωής. Επομένως, διαθέτουν διάφορες δράσεις ως χημικά σε προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην γεωργία, στον τομέα των καλλυντικών και της υγείας, καθώς και στη βιομηχανία των τροφίμων και των ποτών. Το μεγαλύτερο ποσοστό σύνθεσης τέτοιου είδους μορίων πραγματοποιείται κυρίως μέσω οργανο-χημικής σύνθεσης, η οποία όμως εγείρει ερωτήματα περιβαλλοντικού τύπου, όπως για παράδειγμα ο χαμηλός ρυθμός βιοαποικοδόμησης και η υψηλή τοξικότητα σε επίπεδο υδρόβιας ζωής. Επομένως, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη υιοθέτησης φυσικών συστατικών που δεν θα σχετίζονται με κινδύνους για τους καταναλωτές και το περιβάλλον γενικότερα.

Μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για παραγωγή νέων τύπων επιφανειοδραστικών μορίων για εμπορική εκμετάλλευση είναι τα θαλάσσια βακτήρια. Οικολογικά, οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες από θαλάσσια βακτήρια, παίζουν σημαντικό ρόλο σε σημαντικές λειτουργίες στο θαλάσσιο περιβάλλον. Μπορούν να εμπλακούν σε μικροβιακή προσκόλληση σε στερεές επιφάνειες και σχηματισμό βιοφίλμ, βοηθούν στη γαλακτωματοποίηση ελαίων και την ενίσχυση της βιοαποικοδόμησης και μεσολαβούν στην τύχη των βαρέων μετάλλων και των ιχνοστοιχείων μετάλλων. Εφόσον, οι συγκεκριμένοι SAs έχουν τόσο ευρύ φάσμα δραστηριότητας, μπορούμε εύκολα να κατανοήσουμε τόσο το γεγονός ότι διαθέτουν πολύπλοκη χημική σύσταση, όσο και το γεγονός πως υπάρχουν ποικίλες βακτηριακές γενεές που τα παράγουν.

Η έρευνά μας βασίζεται στην προσπάθεια που πραγματοποιήθηκε για τη δημιουργία συλλογής βακτηριακών στελεχών (συλλογή στελεχών HWU) που έχουν απομονωθεί από συγκεκριμένη θέση στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπως οι επιφάνειες των μικροφυκών (ευκαρυωτικό φυτοπλαγκτόν). Τα στελέχη που επιλέχθηκαν έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε πετρελαιοκηλίδες και να αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου. Τα στελέχη αυτά που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες γνωρίζουμε ότι σχετίζονται συνήθως με την παραγωγή βιο-επιφανειοδραστικών ουσιών και βιο-γαλακτωματοποιητών, πράγμα που μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην ανακάλυψη νέων τύπων μορίων για εμπορική εκμετάλλευση. [18,19]

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των βιοπολυμερών που απελευθερώνονται από τα θαλάσσια βακτήρια είναι η υψηλή περιεκτικότητά τους σε ουρονικά οξέα. Αυτή η ιδιότητα έχει βρεθεί σε βακτήρια που αποικοδομούν υδρογονάνθρακες και απομονώνονται από θαλάσσια μικροφύκη, όπως αυτά που συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος της συλλογής βακτηριακών στελεχών HWU. Υπάρχουν ενδείξεις πως αυτή η ιδιότητα σχετίζεται με την ικανότητα των βιοπολυμερών να διασυνδέονται με υδρόφοβα χημικά, όπως τα έλαια τροφίμων και πετροχημικών υδρογονανθράκων. [20]

## **1.1.6 ΤΟΜΕΙΣ ΔΥΝΗΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

- *Βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες και αποικοδόμηση υδρογονανθράκων:*

Η ρύπανση από πετρέλαιο τόσο στο χερσαίο όσο και στο υδάτινο περιβάλλον είναι ένα φαινόμενο που προκαλεί σοβαρές οικολογικές επιπτώσεις. Οι παραδοσιακές διαδικασίες επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται με σκοπό τον καθαρισμό των μολυσμένων περιοχών έχουν περιορισμένες εφαρμογές και δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές. Οι μέθοδοι φυσικής συλλογής του πετρελαίου (π.χ. προσροφητικά) ανακτούν ελάχιστη ποσότητα του προς απομάκρυνση πετρελαίου και η χρήση χημικών επιφανειοδραστικών παραγόντων ως μέσα αποκατάστασης δεν υιοθετούνται λόγω των τοξικών επιπτώσεων στο ήδη μολυσμένο περιβάλλον.



Στα θαλάσσια περιβάλλοντα όπου υπάρχει μόλυνση με πετρέλαιο, παρατηρείται πως το σύνολο του μικροβιακού πληθυσμού αποτελείται από υδρογονανθρακικά βακτήρια. Μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του πετρελαίου έχουν υιοθετήσει διαφορετικές στρατηγικές με σκοπό να ενισχύσουν την βιοδιαθεσιμότητα και να εξασφαλίσουν πρόσβαση σε υδροφοβικές ενώσεις. Μερικές από τις διαθέσιμες στρατηγικές που έχουν αναπτύξει είναι: η διαλυτοποίηση μέσω βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων, η άμεση πρόσβαση στις κηλίδες ελαίου και η πρόσβαση με τη μεσολάβηση βιοφίλμ.

Έχει παρατηρηθεί πως η παραγωγή των βιο-γαλακτωματοποιητών και των βιο-πολυμερών ενέχεται και στις τρεις προαναφερόμενες στρατηγικές, σε βαθμούς που ποικίλουν. Όπως προαναφέρθηκε, η δομή των επιφανειοδραστικών παραγόντων αφορά την συνύπαρξη ενός υδρόφιλου (σακχάρου ή πεπτιδίου) και των υδρόφοβων περιοχών (αλυσίδες λιπαρών οξέων) στο ίδιο μόριο. Αυτό τους επιτρέπει να καταλαμβάνουν τις διεπαφές σε συστήματα μικτής φάσης, όπως έλαιο/νερό, αέρας/νερό, και να μεταβάλλουν τις δυνάμεις που διέπουν τις συνθήκες ισορροπίας. Συνεπώς, σε αυτό οφείλεται το μεγάλο φάσμα των δραστηριοτήτων τους που περιλαμβάνουν: την γαλακτωματοποίηση, τη διασπορά, τη διαλυτοποίηση και τον αφρισμό. [<sup>22,23,24</sup>]

- ο *Βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες και βελτιωμένη μικροβιακή ανάκτηση πετρελαίου (MEOR):*

Στη βιομηχανία του πετρελαίου χρησιμοποιούνται βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες, όπως οι γαλακτωματοποιητές και οι παράγοντες ανάκτησης πετρελαίου. Η τεχνική MEOR (Microbial enhanced oil recovery) είναι μια από τις τεχνικές βελτιωμένης ανάκτησης πετρελαίου στην οποία χρησιμοποιούνται βακτήρια και τα υποπροϊόντα τους όπως οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες για να αποδεσμευθεί το ακατέργαστο πετρέλαιο από κάποιο υπόστρωμα δέσμευσης, κυρίως από δεξαμενές. [<sup>25</sup>]

Στην περίπτωση παραγωγής πετρελαίου συναντώνται εμπόδια που δεν επιτρέπουν την σωστή ανάκτηση του πετρελαίου. Σημαντικός παράγοντας είναι το υψηλό ιξώδες του πετρελαίου που καθιστά δύσκολη την κίνηση εκτός της δεξαμενής. Επιπλέον, οι υψηλές ενδιάμεσες τάσεις μεταξύ ελαίου και νερού οδηγούν σε υψηλές τριχοειδείς δυνάμεις που συγκρατούν το πετρέλαιο δεσμευμένο στο υπόστρωμα. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση πετρελαίου δεν επιτρέπουν την ολοκλήρωση της διαδικασίας ανάκτησης με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας.

Η διαδικασία MEOR επιτρέπει ανάκτηση έως 10% περισσότερου πετρελαίου. Κατά τη διάρκεια της χρησιμοποιούνται βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες που επιτρέπουν την ανάκτηση υπολειμμάτων πετρελαίου που παρεμποδίζεται από την χαμηλή διαπερατότητα ορισμένων δεξαμενών ή του υψηλού ιξώδους. Αυτοί οι παράγοντες λειτουργούν ως απορρυπαντικά, βοηθώντας το έλαιο να κινείται με μεγαλύτερη ευκολία ώστε να μπορεί να περάσει πιο εύκολα από τη δεξαμενή.

Μέσω της παραπάνω διαδικασίας και της χρήσης βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων, επιτυγχάνεται μείωση των χημικών ουσιών κατά τη διάρκεια γεωτρήσεων πετρελαίου. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από πολλά περιβαλλοντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα. [<sup>18</sup>]

ο *Αντιμικροβιακοί και Αντιρρυπαντικοί παράγοντες:*

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες που προέρχονται από θαλάσσια βακτήρια χαρακτηρίζονται από σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Έχουν αναγνωριστεί σε αυτούς τους παράγοντες ιδιότητες όπως, η αντιμικροβιακή τους δράση, η ανασταλτική δραστηριότητα έναντι gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων και μυκήτων.

Ένας επιφανειοδραστικός παράγοντας που έχει καθαριστεί εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό αντιμικροβιακής δράσης, γεγονός που σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα δράσης του (βακτήρια και μύκητες), δείχνει την πιθανή εφαρμογή του ως αντιμικροβιακού παράγοντα σε ιατρικές και οικιακές απολυμαντικές εφαρμογές.

Μία εξίσου σημαντική ιδιότητα που έχει προκύψει από πειράματα είναι ο σημαντικός ρόλος που παίζουν οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες στον σχηματισμό βιοφίλμ και ιδιαίτερα στην προσκόλληση και αποσύνδεση των κυττάρων. Μελέτες έδειξαν σημαντικές αντιπροσκολλητικές και βιοσυσσωρευτικές δραστηριότητες ενός παράγοντα που απομονώθηκε από θαλάσσιο στέλεχος. Άλλες μελέτες ανέδειξαν αφαίρεση βιοφίλμ από γυάλινες επιφάνειες μέσω χρήσης παραγόντων που απομονώθηκαν από θαλάσσια βακτήρια, γεγονός που δείχνει πως ο παράγοντας αυτός θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δυνητικός παράγοντας για την αποκόλληση βιομάζας. [<sup>18, 26, 27</sup>]

ο *Βιο- επιφανειοδραστικοί παράγοντες σε ιατρικές/ θεραπευτικές εφαρμογές:*

Οι ιδιότητες των βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων από θαλάσσια βακτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω, καθιστά αυτά τα μόρια σημαντικά σχετικά με την καταπολέμηση ασθενειών και πολλά υποσχόμενα για χρήση τους ως θεραπευτικοί

παράγοντες. Επιπλέον, η αντιπροσκολλητική τους ιδιότητα έναντι παθογόνων υποδεικνύει την χρησιμότητά τους ως παράγοντες επίστρωσης για ιατρικά υλικά, με σκοπό να μειωθεί ο μεγάλος αριθμός νοσοκομειακών μολύνσεων χωρίς τη χρήση συνθετικών φαρμάκων και χημικών ουσιών. [18]

## 1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ – OXIDATIVE STRESS (OS)

Ο αερόβιος μεταβολισμός που πραγματοποιείται σε όλα τα αερόβια είδη περιλαμβάνει την χρήση οξυγόνου για την αποτελεσματική έκλυση ενέργειας και σχετίζεται με την παραγωγή προ-οξειδωτικών μορίων (δραστικές ελεύθερες ρίζες). Με σκοπό να επιτευχθεί η διατήρηση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης σε ένα υγιές σώμα, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων. Μια διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ των παραγόντων αυτών, όπως είναι για παράδειγμα η υπερπαραγωγή των προ-οξειδωτικών μορίων σε σχέση με τα αντιοξειδωτικά, προκαλεί μία κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες (OS).

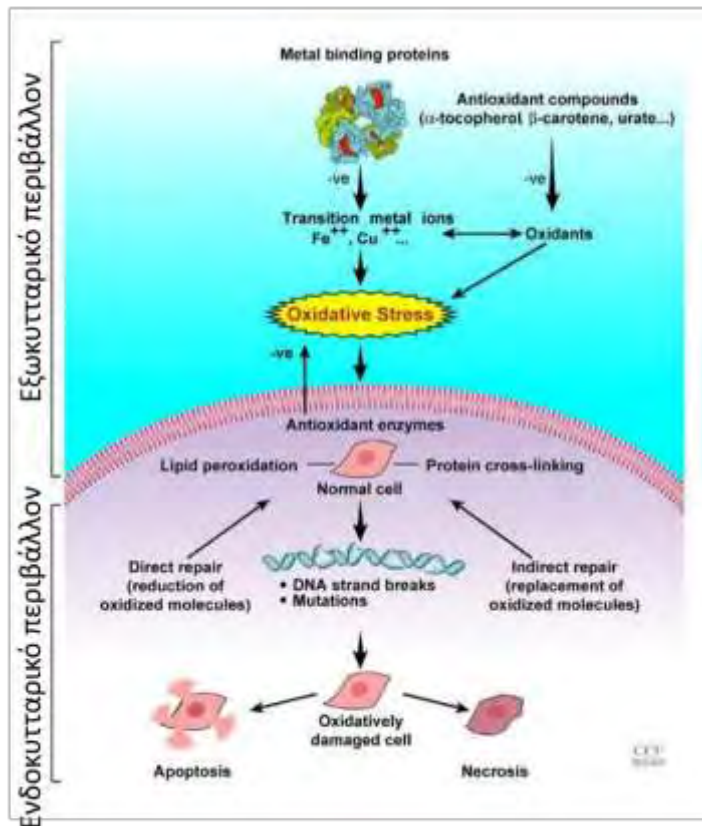
Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μία "κατάσταση στην οποία η παραγωγή ελευθέρων δραστικών ριζών υπερβαίνει τα αντιοξειδωτικά βιολογικά συστήματα απενεργοποίησης των τοξικών αυτών μορίων, που διαθέτει ο οργανισμός με αποτέλεσμα την απώλεια ισορροπίας μεταξύ τους." Η κατάσταση αυτή προκαλεί σοβαρές καταστροφές στην ανάπτυξη του κυττάρου και στην δομή του DNA και μπορεί να έχει επιπτώσεις στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος.

Στον άνθρωπο, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε μια πλειάδα καταστάσεων παθολογικών και όχι μόνο. Αρχικά, συμβάλλει στην ιστική βλάβη που προέρχεται μετά από ακτινοβολία και υπεροξία. Πιθανολογείται, χωρίς να έχει αποδειχθεί, ότι είναι σημαντικό σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως οι νόσοι Parkinson και Alzheimer, η νόσος Huntington και η νόσος Lou Gehrig. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται ακόμα να συνδέεται με συγκεκριμένες καρδιαγγειακές νόσους, όπως αθηροσκλήρωση και καρδιακή ανεπάρκεια. [1]

### 1.2.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ- Reactive oxygen species (ROS) & Reactive Nitrogen species (RNS)

Ένα άτομο αποτελείται από ένα κεντρικό πυρήνα με ζεύγη ηλεκτρονίων να περιστρέφονται γύρω από αυτόν. Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται άτομα ή μόρια τα οποία διαθέτουν μη συζευγμένα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς και πολύ δραστικές δομές, καθώς τα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια τους τείνουν να σχηματίσουν ζεύγη με άλλα ηλεκτρόνια. Καταφέρνουν να σταθεροποιηθούν αποκτώντας ηλεκτρόνια

μέσω της οξείδωσης μακρομορίων όπως τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες ή οποιοδήποτε κοντινό μόριο, με αποτέλεσμα να προκαλούν έναν καταρράκτη αντιδράσεων που καταλήγει σε κυτταρική βλάβη και νόσο (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3: Μηχανισμοί οξειδωτικού στρες που προκαλούν κυτταρική καταστροφή.** (Προσαρμογή από: Ashok Agarwal et al., 2005, *Role of oxidative stress in female reproduction, Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(28))

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες ελεύθερων ριζών: Reactive oxygen species (ROS) και Reactive Nitrogen species (RNS). [1]

### 1.2.1.1 Reactive oxygen species (ROS)

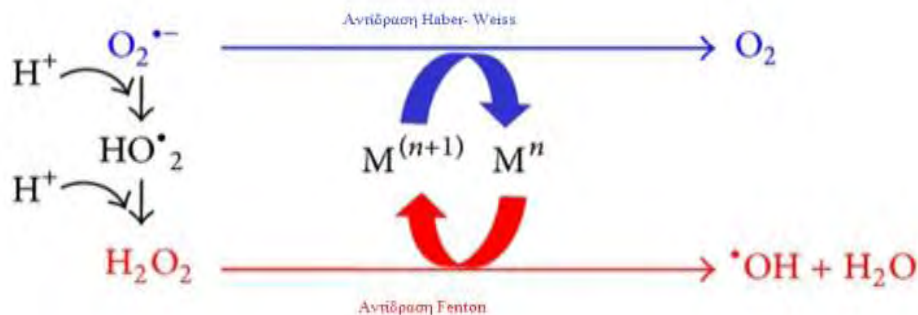
Τα ROS, είναι η κύρια κατηγορία δραστικών ειδών που παράγονται από μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) μέσω χημικών μεταπτώσεων. Στη συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνονται: τα ανιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και το οξείδιο του υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ) και του νιτρικού ( $NO^\cdot$ ). Οι κύριες, μη ελεύθερες οξειδωτικές ουσίες είναι: το υπεροξείδιο του

υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $\text{HOCl}$ ) και το ελεύθερο οξυγόνο ( $-\text{O}^2$ ). Οι ουσίες αυτές μπορούν να διατηρηθούν για αρκετή ώρα προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή σε βιομόρια.

Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι αντιδράσεων στις οποίες ενέχονται οι ελεύθερες ρίζες:

1. Απόσπαση υδρογόνου: σε αυτό τον τύπο αντίδρασης η ρίζα αντιδρά με ένα μόριο το οποίο φέρει ελεύθερο άτομο υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο, η ρίζα σταθεροποιείται, ενώ η ένωση-δότης υδρογόνου μετατρέπεται σε νέα ρίζα.
2. Αντίδραση προσθήκης: Η ελεύθερη ρίζα προσδένεται σε μια άλλη αρχικά ανενεργή ένωση και δημιουργούν από κοινού μια νέα ρίζα.
3. Αντίδραση τερματισμού: Δύο ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένα σταθερό παράγωγο.
4. Δύο ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους: η μια προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στην άλλη, ώστε να σχηματισθούν δύο διαφορετικά αλλά σταθερά μόρια. [<sup>43</sup>]

Τα ROS μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες από μακροφάγα και ουδετερόφιλα ή άλλους τύπους κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα ανιόντα υπεροξειδίου σχηματίζονται όταν ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η οξειδοαναγωγή των ανιόντων υπεροξειδίου καταλήγει στον σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, υπό την επίδραση του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Τα ανιόντα υπεροξειδίου είναι πολύ δραστικά και έχουν την δυνατότητα τροποποίησης πουρινών και πυριμιδινών με αποτέλεσμα την διάσπαση της αλυσίδας του RNA, που έχει ως συνέπεια την βλάβη του DNA. Μερικές ενζυμικές αντιδράσεις προκαλούν την παραγωγή ελεύθερων ριζών σε μεγάλο βαθμό. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) μπορεί να αντιδράσει με μέταλλα όπως  $\text{Fe}^{2+}$  και  $\text{Cu}^{2+}$  σχηματίζοντας σιδηρούχα και χαλκούχα ιόντα, με αποτέλεσμα να παράγονται ρίζες υπεροξειδίου (Αντιδράσεις Fenton και Haber–Weiss) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4: Αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss.** (Προσαρμογή από: Ayala Antonio et al., 2014, *Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*)

### 1.2.1.2 Reactive Nitrogen Species (RNS)

Το οξειδίο του νιτρικού (-NO) σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής μετατροπής της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη, με την μεσολάβηση του ενζύμου συνθάση του νιτρικού (NOS). Μέσω ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου, το NO, που είναι μία δραστική ελεύθερη ρίζα, προκαλεί βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεοτίδια. Ακόμη, οδηγεί σε καταστροφή κυττάρων και ιστών σε συνδυασμό με άλλες ουσίες-μεσολαβητές της φλεγμονής. Φυσιολογικά το NO δρα ως ρυθμιστής πολλών διεργασιών, αλλά σε περίσσεια μπορεί να έχει τοξική δράση. Τα RNS φαίνεται πως δεν είναι τόσο σημαντικά όσο τα ROS σε σχέση με την πρόκληση καταστροφής. [2,3]

### 1.2.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ

Οποιαδήποτε οξειδωτική ρίζα αποτελεί παράγοντα οξειδωτικού στρες. Μερικές, όπως οι υδροξυλικές, είναι ιδιαίτερα ενεργείς με μικρούς χρόνους ημίσειας ζωής ενώ άλλες, όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, έχουν μικρότερη δραστικότητα αλλά μεγαλύτερη διάρκεια δράσης. Επακόλουθο του μεγαλύτερου χρόνου ζωής είναι η ικανότητα διάχυσης σε μεγαλύτερη απόσταση, που επιτρέπει στα ROS να προκαλέσουν βλάβη μακρύτερα από τον τόπο παραγωγής τους. Οξειδωτική βλάβη μπορούν να υποστούν πολλές κατηγορίες μορίων όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες. Αυτό συνεπάγεται ότι οι πρωτεΐνες (δομικές ή κυτταροπλασματικές), οι μεμβράνες (κυτταρικές, πυρηνικές ή μιτοχονδριακές) και τα υδατανθρακικά σύμπλοκα μπορούν να επηρεαστούν από το οξειδωτικό στρες.

Εκτιμάται ότι τα ROS είναι υπεύθυνα για μεγάλο αριθμό μετατροπών βάσεων του DNA ανά κύτταρο, ανά ημέρα. Η οξειδωση ή η μεθυλίωση των βάσεων θεωρείται ότι έχει τις σημαντικότερες φαινοτυπικές επιπτώσεις. Το μιτοχονδριακό DNA φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα επιρρεπές, αφ' ενός λόγω της εγγύτητάς του στην παραγωγή ROS και αφ' ετέρου επειδή η επισκευή του είναι περιορισμένη. Τα τελομερή, δηλαδή οι κεφαλές (άκρα) των χρωμοσωμάτων, που άλλωστε είναι και τα πλέον σημαντικά στοιχεία για τη σταθερότητα του γονιδιακού υλικού, είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην επίθεση των ROS, ενώ η επιταχυνόμενη σμίκρυνση των τελομερών, που προέρχεται από το οξειδωτικό στρες, μπορεί να επισπεύσει τη γήρανση.

Η οξειδωση των πρωτεϊνών προκαλεί αντιστρεπτές δισουλφιδικές γέφυρες, αλλάζει τη στροφή τους στο χώρο και, τελικά, επηρεάζει τη λειτουργία τους. Το μέγεθος της καταστροφής των πρωτεϊνών θα εξαρτηθεί από τη θέση της πρωτεΐνης σε σχέση με τον τόπο παραγωγής ROS, αλλά και από τη σύστασή και τη δομή τους. Μερικά αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η κυστεΐνη, είναι πολύ πιο επιρρεπή από άλλα. Γενικά, όμως, τα ROS μπορεί να αλλάξουν τόσο τη δευτεροταγή όσο και την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

Η καταστροφή των λιπιδίων είναι επίσης σημαντική, επειδή μπορεί να έχει συνέπειες στη λειτουργία και στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) είναι πολύ λιγότερο ανθεκτικά στην οξειδωση σε σχέση με τα μονοακόρεστα ή τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, ώστε η ποικιλία σε PUFA στις μεμβράνες, είναι δυνατόν να επηρεάσει και την αναλογία της οξειδωτικής καταστροφής. Παράλληλα, η οξειδωση των λιπών μπορεί να έχει και άλλες συνέπειες, καθώς η υπεροξειδάση των λιπών εμπλέκεται σε πολλές ενδιάμεσες μεταβολικές αντιδράσεις και αυτό έμμεσα ενδεχομένως να βλάψει τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες. [2,5]

### **1.2.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ROS**

Ένα μεγάλο ποσοστό μελετών έχουν δείξει πως οι ενεργές μορφές οξυγόνου ενέχονται σε διαδικασίες που οδηγούν σε βλαβερά αποτελέσματα για τα κύτταρα. Παρ' όλα αυτά σε αρκετές περιπτώσεις φαίνεται πως οι ROS παρουσιάζουν ευεργετική δράση για τον οργανισμό. Έχει αποδειχθεί πως η συσσώρευση τέτοιου είδους ενώσεων λόγω της λανθασμένης ή μειωμένης στόχευσής τους από τους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς, είναι αυτή που μπορεί να προκαλέσει το οξειδωτικό στρες και να συμβάλλει στην εμφάνιση

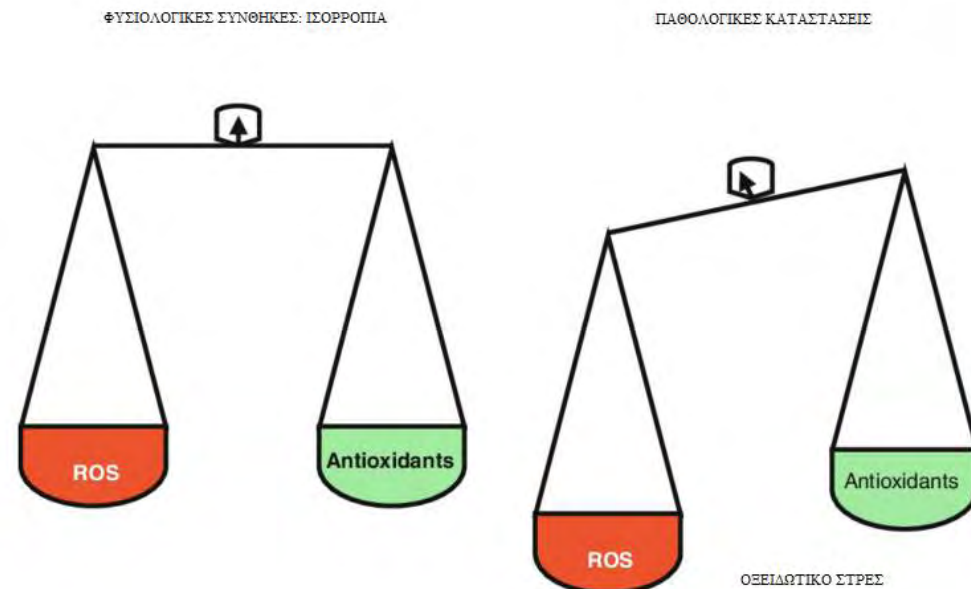


παθολογικών καταστάσεων. Οι ROS ενέχονται σε πλήθος φυσιολογικών διεργασιών του κυττάρου και επομένως του οργανισμού που είναι απαραίτητες για την επιβίωσή. Αρχικά, οι ROS εμπλέκονται στο ανοσολογικό σύστημα, τόσο στις έμφυτες, όσο και στις επίκτητες απαντήσεις. Τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού έχουν την ιδιότητα να πυροδοτούν υπερπαραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου με σκοπό να δημιουργήσουν μία πρώτη γραμμή άμυνας έναντι παθογόνων. Επιπλέον, οι ROS εμπλέκονται στη γονιδιωματική σταθερότητα, στην ρύθμιση της μεταγραφής και στους μηχανισμούς κυτταρικής μετάδοσης σήματος. Σε έρευνες έχει αναδειχθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση ως ρυθμιστικός παράγοντας για τη γονιδιωματική σταθερότητα και μεταγραφή. Οι ενεργές ενώσεις φαίνεται πως δρουν ως ρυθμιστές σε διάφορες καταστάσεις, όπως η τροποποίηση ιστονών, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η αυτοφαγία. Γενικότερα, γίνεται αντιληπτό ότι η συγκέντρωση των ενεργών ενώσεων είναι αυτή που αποτελεί το κλειδί για τη δράση τους. Ακόμη, αποτελούν σημαντικό στοιχείο ρύθμισης της φυσιολογίας και του μεταβολισμού των κυττάρων, επάγοντας προσαρμοστικές απαντήσεις στο στρες ή στο μικροπεριβάλλον. Παράδειγμα αποτελούν οι σκελετικοί μύες, για τους οποίους έρευνες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί όταν συναντάται υπερβολική ποσότητα οξειδωτικών ενώσεων, η οποία υπερβαίνει τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του μυ. Πάραυτα, οι ROS σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις μπορούν να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια στη ρύθμιση της πρόσληψης γλυκόζης κατά τη συστολή. Συμπερασματικά, πρέπει να τονιστεί πως οι ROS όταν βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα μπορούν να προκαλέσουν καταστροφικές αλλοιώσεις στα κύτταρα, ενώ σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις φαίνεται να παίζουν ρόλο σε φυσιολογικές ρυθμιστικές λειτουργίες. [<sup>43,44,45</sup>]

#### **1.2.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν μια σειρά αντιοξειδωτικών μηχανισμών με σκοπό να προστατευθούν από την οξειδωτική καταστροφή. Μόρια γνωστά ως αντιοξειδωτικά, μετατρέπουν τα ROS σε H<sub>2</sub>O για την πρόληψη της υπερπαραγωγής τους με σκοπό την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Όπως προαναφέρθηκε, οι ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα εάν το ισοζύγιο οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων διαταραχθεί και προκληθεί υπερβολική αποτοξίνωση ή ελάχιστη παραγωγή ROS, το γεγονός αυτό θα επηρεάσει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Από

την άλλη μεριά, η υπερβολική παραγωγή ROS ή η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα θα προκαλέσει ευρεία κυτταρική βλάβη και μπορεί να οδηγήσει σε γήρανση και κυτταρικό θάνατο.



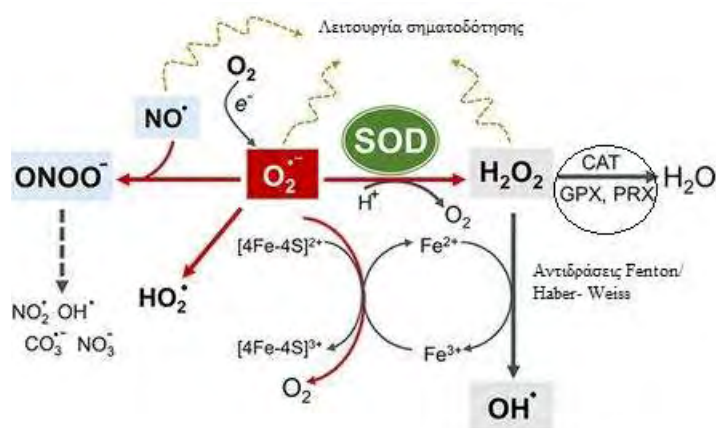
*Εικόνα 5: Ισορροπία μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών και παθολογικές καταστάσεις. (Προσαρμογή από: Francisco J. Corpas, 2015, Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells, Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress, 1-22)*

Υπάρχουν δύο τύποι αντιοξειδωτικών στο ανθρώπινο σώμα: τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

#### 1.2.4.1 ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά τα οποία είναι γνωστά ως φυσικά αντιοξειδωτικά, παράγονται από τους αερόβιους οργανισμούς με σκοπό να ελαττώσουν την οξειδωτική καταστροφή. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι: οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SOD), οι καταλάσες (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX). Η πρώτη κατηγορία ενέχεται στην απόσβεση ριζών  $O_2^-$  μετατρέποντάς το σε  $H_2O_2$  και η δεύτερη και τρίτη κατηγορία στην απόσβεση  $H_2O_2$  μετατρέποντάς το σε νερό και οξυγόνο.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις που καταλύουν οι 3 κατηγορίες ενζύμων που προαναφέρθηκαν φαίνονται στην Εικόνα 6:



**Εικόνα 6:** Αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα SOD, CAT και GPX. (Προσαρμογή από: Ying Wang *et al.*, 2018, *Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling*, *Journal of Cell Biology*, 2017(6), 1915-1928)

#### 1.2.4.2 ΜΗ-ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι γνωστά ως συνθετικά αντιοξειδωτικά. Αλληλεπιδρούν άμεσα με οξειδωτικούς παράγοντες και εξουδετερώνουν την υπερβολική παραγωγή τους, προλαμβάνοντας με αυτό τον τρόπο την καταστροφή της κυτταρικής δομής. Στη συγκεκριμένη κατηγορία αντιοξειδωτικών περιλαμβάνονται οι βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ) και E (α-τοκοφερόλη), οι οποίες είναι ανθρώπινες βιταμίνες, γεγονός που δείχνει την ζωτική τους σημασία για την διατήρηση της υγείας. Άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά συστατικά είναι το ουρικό οξύ, τα καροτενοειδή, η γλουταθειόνη, οι φαινολικές ενώσεις, οι πολυαμίνες κ.ά, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στους *in vivo* αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. [3,6,7]

## 1.3 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (UV)

### 1.3.1 ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΗΛΙΑΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Η περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με μήκη κύματος από 200 έως 400 nm ορίζεται ως το υπεριώδες φως. Αυτή η περιοχή χωρίζεται σε 3 μήκη κύματος ή ζώνες: UVC περίπου 200-280 nm, UVB περίπου 280-320 nm και UVA περίπου 320-400 nm. Πειράματα έχουν δείξει πως η ακτινοβολία UVC μπορεί να έχει τις μεγαλύτερες βιολογικές ζημιές χωρίς αυτό να σημαίνει βέβαια πως και οι υπόλοιποι τύποι ακτινοβολίας δεν είναι το ίδιο βλαβεροί.

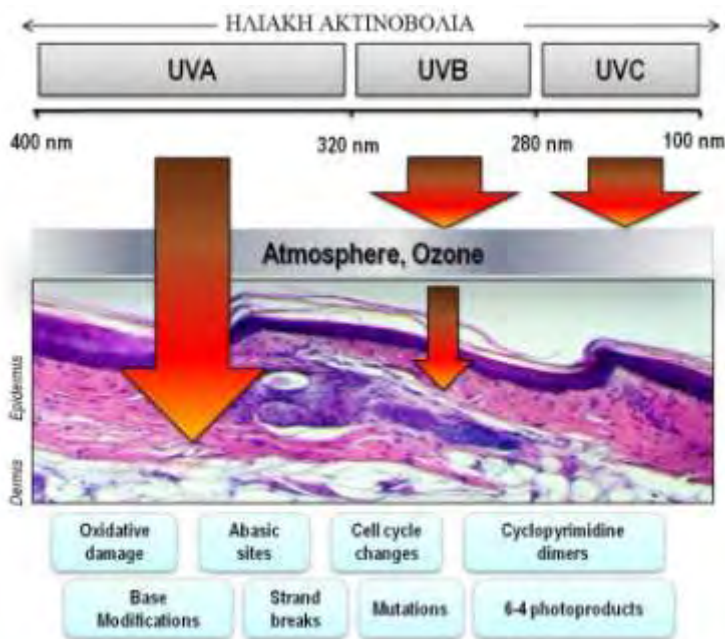
Η ηλιακή ακτινοβολία αποτελεί βασική πηγή έκθεσης του ανθρώπου στην υπεριώδη ακτινοβολία και η υπερέκθεση σε αυτή χωρίς προστασία εμπλέκεται στη μεταλλαξιγένεση και σε διάφορους τύπους καρκίνου του δέρματος. Η ηλιακή ακτινοβολία περιέχει και τις τρεις μορφές υπεριώδους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παρ' όλα αυτά είναι γνωστό πως τα μήκη κύματος κάτω από τα 295 nm, δηλαδή η περιοχή UVC, απορροφάτε από την ανώτερη ατμόσφαιρα και δεν φτάνει στην επιφάνεια της γης.

Η έκθεση του ανθρώπου στην ακτινοβολία διαφέρει από άτομο σε άτομο και εξαρτάται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ισχύς της μεταβάλλεται από τους εξής παράγοντες:

- την ώρα της ημέρας: είναι ισχυρότερη όταν ο ήλιος βρίσκεται στο υψηλότερο σημείο στον ουρανό
- το γεωγραφικό πλάτος: είναι ισχυρότερη στον ισημερινό, καθώς σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη ο ήλιος είναι χαμηλότερος στον ουρανό με αποτέλεσμα χαμηλότερα επίπεδα UV
- το υψόμετρο: η ένταση αυξάνεται καθώς αυξάνεται το υψόμετρο
- τις συνθήκες καιρού: μείωση της ακτινοβολίας λόγω απορρόφησης ενός μέρους της από τα σύννεφα
- την αντανάκλαση: λόγω των διάφορων επιφανειών στις οποίες αντανάκλαται η ακτινοβολία το ποσοστό αντανάκλασής της μπορεί να φτάσει έως 90% ανάλογα με την επιφάνεια. [38]

### 1.3.2 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ευρέως γνωστό πως αλληλεπιδρά με τα κύτταρα των θηλαστικών με περίπλοκο τρόπο και μπορεί να προκαλέσει ή να επιδεινώσει πλήθος ασθενειών. Μελέτες έχουν δείξει πως τα παραπάνω αποτελέσματα ξεκινούν από κυτταρική βλάβη με κύριους στόχους τις πρωτεΐνες και το DNA, και φαίνεται πως το DNA είναι το κύριο χρωμοφόρο. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί ενέχονται στην καταστροφή: η άμεση απορρόφηση του προσπίπτοντος φωτός από τα κυτταρικά συστατικά, η οποία μετέπειτα προκαλεί μια σειρά χημικών αντιδράσεων, και ο μηχανισμός φωτοευαισθητοποίησης μέσω του οποίου το φως απορροφάτε από ενδογενείς ή εξωγενείς ευαισθητοποιητές. [31]



Εικόνα 7: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας. (Προσαρμογή από: John D' Orazio et al., 2013, UV Radiation and the Skin, International Journal of Molecular Sciences, 14(6), 12222–12248)

Η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει πλήθος δυσμενών επιδράσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα αποτελέσματά της έχουν μελετηθεί λεπτομερώς *in vitro*, τόσο σε πειραματόζωα, όσο και στον ίδιο τον άνθρωπο. Ως γνωστόν, η υπέρμετρη υπεριώδης

έκθεση έχει μεταλλαξιογόνες ιδιότητες και έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση οφθαλμολογικών ασθενειών καθώς και καρκίνου του δέρματος. Έχει αποδειχθεί πως είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση βασικοκυτταρικού και ακανθοκυτταρικού τύπου καρκίνου του δέρματος, ενώ υπάρχουν στοιχεία που τη συνδέουν και με το μελάνωμα. [33,34] Ο κύριος τύπος ακτινοβολίας που είναι υπεύθυνος για αυτή την κατάσταση φαίνεται πως είναι το φάσμα της UVB ακτινοβολίας, αφού διαθέτει μεταλλαξιογόνες ιδιότητες.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν δύο διακριτοί μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να προκληθεί βιολογική καταστροφή από UV ακτινοβολία. Ο πρώτος μηχανισμός ενέχει την άμεση απορρόφηση των υπεριωδών φωτονίων από τις πρωτεΐνες ή το DNA, γεγονός που οδηγεί σε φωτοεπαγόμενες αντιδράσεις. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την πρόκληση διεργασιών φωτοευαισθητοποίησης μέσω της απορρόφησης των φωτονίων από ενδογενείς ή εξωγενείς ευαισθητοποιητές. Ο επαγόμενος ευαισθητοποιητής έχει την ικανότητα είτε να μην οδηγήσει σε κάποια βλάβη, είτε να καταστρέψει κάποιο άλλο κυτταρικό υλικό. [31]

Τα δύο κύρια μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι ευαισθητοποιητές και μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρική βλάβη ονομάζονται Τύπος I και Τύπος II. Η βλάβη τύπου I περιλαμβάνει οξείδωση ηλεκτρονίων ή αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από κυτταρικούς στόχους, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Ο μηχανισμός τύπου II περιλαμβάνει μεταφορά ενέργειας από το μόριο που είχε αρχικά απορροφήσει το υπεριώδες φως (δηλαδή τον ευαισθητοποιητή) στο μοριακό οξυγόνο. Μετά από ακτινοβολία με UV ακτινοβολία ανιχνεύονται στο DNA πυριμιδινικά προϊόντα, καθώς αυτός ο τύπος βάσεων απορροφά κοντά στην ζώνη UV περισσότερο από τις βάσεις πουρίνης. Τα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν διμερή τα οποία μπορεί να είναι διμερή κυκλοβουτανίου- πυριμιδίνης ή διμερή πυριμιδίνης (6-4) – πυριμιδονίνης. Αυτά τα είδη διμερών εμπλέκονται στη μεταλλαξιγένεση η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα μεταβολών CC -> TT και C -> T. Επιπλέον, η καταστροφή που προκαλεί στο DNA η υπεριώδης ακτινοβολία οδηγεί σε δημιουργία φωτοπροϊόντων τόσο από βάσεις πυριμιδίνης, όσο και από βάσεις πουρίνης. Σε οξεία έκθεση υπάρχει η ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών που προκαλούν αυτά τα παράγωγα. Παρ' όλα αυτά εσφαλμένη επιδιόρθωση ή μακροχρόνια συσσώρευσή τους οδηγεί σε απόπτωση ή σε μεταλλάξεις των επιδερμικών κυττάρων με αποτέλεσμα την εμφάνιση νεοπλασίας. [31,35,39]

### 1.3.3 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΤΥΠΟΥ Β (UVB)

Η υπεριώδης ακτινοβολία ευθύνεται για την εμφάνιση των πιο συχνών προβλημάτων λόγω της ηλιακής έκθεσης, όπως το ερύθημα, το έγκαυμα και η φλεγμονή. Τα μήκη κύματος που διαμεσολαβούν αυτές τις διαδικασίες ανήκουν στην UVB ακτινοβολία.

Όσον αφορά την εμφάνιση ερυθήματος, προκαλείται από αγγειοδιαστολή που υφίστανται τα σημεία έκθεσης, η οποία έχει ως συνέπεια την αύξηση του όγκου αίματος που κυκλοφορεί στην περιοχή. Η φλεγμονή, συχνά μπορεί να προέρχεται από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος, αλλά και η συσσώρευση βλαβών του DNA ύστερα από χρόνια έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε αυτό το αποτέλεσμα. Η UVB έχει την ιδιότητα να ενεργοποιεί προφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως είναι ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες, ενώ παράλληλα επάγει τη δράση της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2). Ακόμη, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία επάγει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο εμπλέκεται σε διάφορες φλεγμονώδεις ανωμαλίες. [<sup>37,40,41</sup>]

Η περιοχή της UVB ακτινοβολίας θεωρείται η σπουδαιότερη πηγή οξειδωτικού στρες για την ανθρώπινη επιδερμίδα. Η οξειδωτική βλάβη εμπλέκεται στους μηχανισμούς εμφάνισης του εγκαύματος, της φλεγμονής και της φωτοκαρκινογένεσης. Ορισμένες μελέτες έδειξαν πως οι ROS παράγονται έμμεσα ύστερα από την ενεργοποίηση μικρών μορίων, όπως η ριβοφλαβίνη, η τρυπτοφάνη και η πορφυρίνη και πως η υπερπαραγωγή τους επάγεται από την υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών κατά τη χρόνια έκθεση στο φάσμα της UVB. Η ανεξέλεγκτη απελευθέρωση των ROS οδηγεί σε πλήθος καταστροφικών αποτελεσμάτων, όπως είναι οι βλάβες του DNA που οδηγούν στον καρκίνο. Είναι γνωστό πως λόγω της έκθεσης στην UVB ακτινοβολία μειώνεται η συγκέντρωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών του οργανισμού και ως μακροχρόνιο μπορεί να χαρακτηριστεί η μειωμένη έκφραση των γονιδίων τους. [<sup>34,42</sup>]

## 1.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ FENTON ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως προαναφέρθηκε, είναι μέρος του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παράγονται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Γνωρίζουμε πως είναι μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να δημιουργήσουν βλάβη σε κυτταρικές δομές όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την αλλαγή των λειτουργιών τους. Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών με επακόλουθη αύξηση των οξειδωτικών μορίων χαρακτηρίζεται ως ‘οξειδωτικό στρες’. Για να μεταβάλλει αυτή την κατάσταση και να μειώσει τις επιβλαβείς επιδράσεις των ROS, ο οργανισμός διαθέτει ένα σύστημα ρύθμισης των οξειδοαναγωγικών διαδικασιών, που αποτελούνται από ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά συστήματα, ενζυμικά και μη-ενζυμικά.

### 1.4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ FENTON ΚΑΙ HABER-WEISS

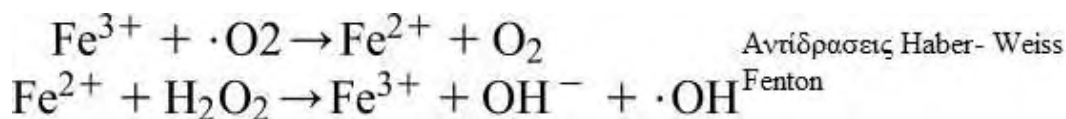
Γνωρίζουμε πως οι ενεργές μορφές οξυγόνου σχηματίζονται ενδογενώς ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Οι τρεις κύριες κατηγορίες ROS είναι το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $\bullet OH$ ) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).

Κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες στα μιτοχόνδρια που είναι το σημείο παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου. Τα ηλεκτρόνια τα οποία φυσιολογικά μεταφέρονται από την μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αποσπώνται από το σύστημα και παράγουν σουπεροξείδιο. Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες, SOD, περιέχουν Mn και είναι τα κύρια ένζυμα τα οποία μεσολαβούν στην μετατροπή του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επιπλέον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παράγεται με την μεσολάβηση ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η οξειδάση NAD(P)H, καθώς και στα υπεροξυσώματα μέσω μεταβολικών αντιδράσεων στις οποίες καταναλώνεται μοριακό οξυγόνο.

Στον κύκλο οξειδοαναγωγής για την μετατροπή του  $H_2O_2$  σε ρίζα υδροξυλίου συναντώνται σε αφθονία χαμηλού μοριακού βάρους σίδηρος ( $Fe^{2+}$ ) και προσδότες σιδήρου που διευκολύνουν την οξειδοαναγωγική διαδικασία. Έτσι μέσω των



αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss, παρατηρούμε αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από άλατα σιδήρου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία συνεχής ροή •OH και να πραγματοποιείται αναγωγή του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή. Κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες στα μιτοχόνδρια οι οποίες ευνοούν την αντίδραση Fenton και κατ'έκταση την οξείδωση του τρισθενούς σιδήρου από το σουπεροξείδιο, η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βιολογικές βλάβες. [46,47]

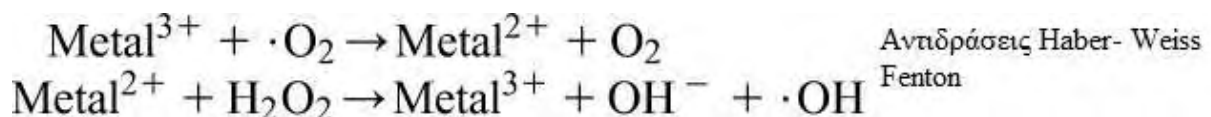


**Εικόνα 8: Αντιδράσεις Haber-Weiss και Fenton παρουσία μετάλλων μετάδοσης και συγκεκριμένα  $\text{Fe}^{3+}$ .** (Προσαρμογή από: Esra Birben et al., 2012, *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*, World Allergy Organization Journal, 5(1), 9-19)

#### 1.4.2 ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Η δημιουργία οξειδωτικών ενώσεων μπορεί να πραγματοποιείται τόσο μέσω ενδογενών μηχανισμών του οργανισμού, όσο και μέσω αντιδράσεων του οργανισμού επαγόμενων από εξωτερικά ερεθίσματα. Παράδειγμα αποτελούν τα ιόντα βαρέων μετάλλων, όπως είναι ο σίδηρος, ο χαλκός, ο υδράργυρος, που μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου. Οι ROS με τη σειρά τους ενέχονται σε κυτταρική βλάβη μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και της αντίδρασης με το γενετικό υλικό και τις πυρηνικές πρωτεΐνες.

Η αντίδραση Fenton που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, είναι ένα από τους κύριους μηχανισμούς στους οποίους ενέχονται τα μέταλλα. Γνωρίζουμε πως το σουπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με μέταλλα μετάπτωσης για να σχηματίσουν ρίζες υδροξυλίου.



**Εικόνα 9: Μέταλλα μετάπτωσης και αντιδράσεις Haber-Weiss/ Fenton.** (Προσαρμογή από: Esra Birben et al., 2012, *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*, World Allergy Organization Journal, 5(1), 9-19)

Εκτός από τις παραπάνω αντιδράσεις υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων ιόντα μετάλλων μπορούν να αντιδρούν απευθείας με μόρια του κυττάρου. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελευθέρων ριζών όπως είναι οι ρίζες θειόλης, καθώς και η διέγερση των οδών σηματοδότησης των κυττάρων. Σε αυτές τις περιπτώσεις το σουπεροξειδίο μετατρέπεται σε  $H_2O_2$  και έχουμε ακόμη περισσότερη παραγωγή ριζών οξυγόνου. Ένα παράδειγμα αποτελεί ο αρσενίτης που ενεργοποιεί συστήματα παραγωγής ριζών στα κύτταρα και προκαλεί έμμεσο σχηματισμό ROS.

Επιπλέον, ένα πολύ τοξικό στοιχείο το οποίο μπορεί να προκαλέσει παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου αποτελεί το αρσενικό. Το στοιχείο αυτό ενέχεται στην παραγωγή μεγάλου αριθμού ROS, όπως το  $H_2O_2$ , το σουπεροξειδίο και η ρίζα υπεροξυλίου ( $ROO\bullet$ ). Οι ενώσεις αρσενικού έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, ειδικότερα αυτά που είναι εξαρτώμενα από τη γλουταθειόνη, με αποτέλεσμα να παρατηρείται συσσώρευση οξειδωτικών μορίων. Άλλο παράδειγμα στοιχείου που εμπλέκεται στην απενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι ο μόλυβδος, καθώς μπορεί να προκαλέσει αναστολή της GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης), γεγονός που επηρεάζει τις θειόλες των ιστών.

Τέλος, οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν μέταλλα και ευθύνονται για τον σχηματισμό ROS, μπορούν να προκαλούν μεταλλάξεις μέσω της τροποποίησης βάσεων DNA, γεγονός που ευθύνεται για αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης. [<sup>46,50</sup>]

### **1.4.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ $H_2O_2$ ΓΙΑ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΟ DNA**

Όταν αναφερόμαστε στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, γνωρίζουμε πως το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τους. Το  $H_2O_2$  διαχέεται ελεύθερα μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και αλληλεπιδρά με τον σίδηρο (αντίδραση Fenton) προκαλώντας το σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου. Ο συγκεκριμένος τύπος ρίζας είναι πολύ επιθετικός και η συσσώρευση του μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο κύτταρο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παίζει σημαντικό ρόλο στις οδούς μεταγωγής σήματος του κυττάρου. Μέσω τροποποιήσεων ενεργοποιείται μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων, την πρόκληση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Ακόμη,

έρευνες έχουν δείξει πως βλάπτει το DNA και ελέγχει την κυτταρική απόπτωση και νέκρωση.

Έρευνες έχουν δείξει πως όταν το  $H_2O_2$  χρησιμοποιείται για εξωγενείς επιδράσεις σε κύτταρα, έχει διττό ρόλο. Από την μια πλευρά, έχει την ιδιότητα να προάγει την απόπτωση μέσω επαγωγής κινασών τυροσίνης που εμπλέκονται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια σχετικά με την απόπτωση. Από την άλλη πλευρά, μιμείται τις επιδράσεις αυξητικών παραγόντων στην ανάπτυξη των κυττάρων. Φαίνεται πως η εξωγενής χορήγηση υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλεί γεγονότα απόπτωσης ή κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρόμοια με εκείνα που προκαλεί ένας παράγοντας νέκρωσης ή ανάπτυξης αντίστοιχα. Σε πολλές έρευνες χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη ένωση για να διερευνηθούν οι κυτταρικές οδοί σηματοδότησης. [<sup>50,51,52</sup>]

## Σκοπός της εργασίας

Οι βιο-επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι αμφίφυλες χημικές ενώσεις, καθώς σχηματίζονται από μοριακές δομές, οι οποίες είναι τόσο υδρόφοβες, όσο και υδρόφιλες. Χαρακτηρίζονται από σημαντικές ιδιότητες οι οποίες τους συνιστά μία από τις σημαντικότερες τάξεις χημικών ενώσεων με πλήθος εφαρμογών στην ιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Οι περισσότεροι είναι συνθετικής προέλευσης και έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν τοξικότητα και χαμηλά επίπεδα βιο-αποικοδόμησης. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει η αναζήτηση εναλλακτικών-φιλικών προς το περιβάλλον βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν έναντι των συνθετικών μορίων, όπως για παράδειγμα η βιοαποικοδόμηση, το προφίλ χαμηλής τοξικότητας, η αντοχή σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH και η δυνατότητα παραγωγής τους από ανανεώσιμες πηγές φυσικής προέλευσης.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας, είναι η εκτίμηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού και της μεταλλαξιογόνου και αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης, έναντι των γενοτοξικών παραγόντων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και UVB, ενός βιοπολυμερούς (βιοπολυμερές D) από μια μοναδική συλλογή βακτηρίων θαλάσσιας προέλευσης, με σκοπό να συμβάλει στην παραγωγή φυσικών και φιλικών προς το περιβάλλον επιφανειοδραστικών παραγόντων για την αντικατάσταση των συνθετικά παραγόμενων ενώσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα σε πλήθος εμπορικών εφαρμογών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το *in vitro* πειραματικό μοντέλο A375 ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων μελανώματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη συγκεκριμένη ενότητα της εργασίας αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής και μεταλλαξιόγону/ αντι-μεταλλαξιόγону δράσης του βιο- επιφανειοδραστικού παράγοντα που μελετήθηκε.

Το βιοπολυμερές που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη προέκυψε από αντικείμενο έρευνας του ευρωπαϊκού προγράμματος Horizon 2020 MARISURF (grant no 635340) που είναι σε εξέλιξη με σκοπό την ανακάλυψη νέων επιφανειοδραστικών παραγόντων θαλάσσιας προέλευσης. Απομονώθηκαν διάφορα πολυμερή από στελέχη μίας μοναδικής συλλογής βακτηρίων θαλάσσιας προέλευσης που έχουν την ικανότητα να βιοαποικοδομούν υδρογονάνθρακες (διατέθηκε προς μελέτη από τον Dr. T. Gutierrez, Heriot Watt University), και επιλέχθηκαν βάσει του λειτουργικού χαρακτηρισμού τους για εμφάνιση ιδιοτήτων όπως: α) προσδιορισμός της επιφανειακής τάσης, β) ικανότητα αφρίσματος, γ) ικανότητα γαλακτωματοποίησης και δ) ικανότητα πηκτωματοποίησης. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το απομονωμένο βιο- πολυμερές D που προέκυψε από αυτή τη διαδικασία επιλογής. Το βιο- πολυμερές D προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *Halomonas sp.* Οι λειτουργικές του ιδιότητες χαρακτηρίστηκαν από τις ερευνητικές ομάδες των Drs S. Euston & T. Gutierrez (Heriot Watt University, UK) και συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Λειτουργικές ιδιότητες	D ( <i>Halomonas sp</i> )
Επιφανειακή τάση	ΝΑΙ
Αφρισμός	ΝΑΙ
Γαλακτωματοποίηση	ΝΑΙ
Πηκτωματοποίηση	ΝΑΙ

## **2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A375**

### **Υλικά**

- Θρεπτικό μέσο DMEM High Glucose
- Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (w/v)
- 1% (w/v) Penicillin Streptomycin Solution (Pen Strep)
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Τρυψίνη

### **Πειραματική Διαδικασία**

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μας είναι η A375, κυτταρική σειρά ανθρώπινου μελανώματος. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας παρουσία θρεπτικού High Glucose που περιείχε 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS) και σαν αντιβιοτικά διάλυμα 1% (w/v) penicillin streptomycin solution (Pen Strep). Τα κύτταρα επώασθησαν σε επωαστήρα με 5% CO<sub>2</sub> και 37°C.

## **2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ DPPH ΚΑΙ ABTS**

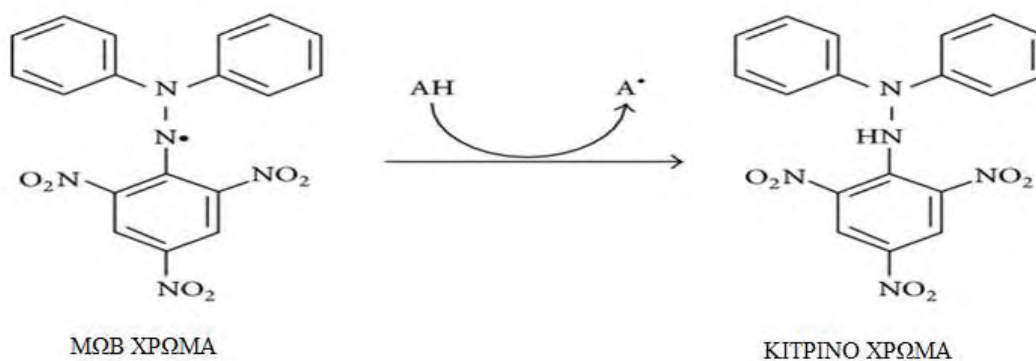
Οι αντιοξειδωτικές δοκιμασίες είναι μέθοδοι μέσω των οποίων μπορεί να προσδιοριστεί κατά πόσο μία ουσία έχει αντιοξειδωτική δράση. Χρησιμοποιείται μία ελεύθερη ρίζα της οποίας μελετάται η μείωση λόγω της εξουδετέρωσης της από την προς μελέτη ουσία εάν αυτή έχει αντιοξειδωτική δράση. Η μέτρηση πραγματοποιείται μέσω φασματοφωτομέτρου. Στην προκειμένη περίπτωση για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της ουσίας μας χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες DPPH και ABTS.

### **2.2.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ DPPH**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με αντιοξειδωτικά μόρια και να ανάγεται (αδρανοποιείται). Η αναγωγή της ρίζας μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω της προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου. Το οργανικό διάλυμα της ρίζας έχει έντονο ιώδες χρώμα και χαρακτηρίζεται από μία ζώνη απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης στα 517 nm. Όταν

ένα διάλυμα DPPH αναμειγνύεται με αυτό ενός αντιοξειδωτικού μορίου που μπορεί να προσφέρει ένα άτομο υδρογόνου, τότε αυτό προκαλεί την απώλεια αυτού του ιώδους χρώματος.



*Εικόνα 10: Αρχή ανάλυσης της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. (Προσαρμογή από: José Teixeira et al., 2013, Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview, BioMed Research International)*

Με σκοπό να αξιολογηθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό παρακολουθείται η αλλαγή στην οπτική πυκνότητα της ρίζας DPPH. Το ποσοστό απορρόφησης της ρίζας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολής της ρίζας DPPH} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

όπου  $A_{\text{control}}$ : η απορρόφηση του μάρτυρα και  $A_{\text{sample}}$ : η απορρόφηση του δείγματος

### Υλικά

- Διάλυμα stock DPPH συγκέντρωσης 10 mM
- Διάλυμα 80% MEOH
- Πιάτο ELISA 96 θέσεων
- ddH<sub>2</sub>O

### Πειραματική Διαδικασία

Οι χειρισμοί πραγματοποιούνται στο σκοτάδι μέχρι το τέλος της διαδικασίας καθώς η ελεύθερη ρίζα είναι φωτοευαίσθητη.

- Προετοιμασία διαλύματος DPPH

Η συγκέντρωση του stock DPPH είναι 10 mM, ενώ η συγκέντρωση του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα πρέπει να είναι 300  $\mu$ M. Για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης θα χρειαστούν ~14 ml, αφού θα χρησιμοποιηθούν 70 θέσεις στο πιάτο ELISA με 0,2 ml στην κάθε θέση και καταλήγουμε πως 0,42 ml DPPH θα αραιωθούν σε 13,6 ml διαλύματος MEOH 80%.

ο Προετοιμασία δειγμάτων

Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της ουσίας που εξετάζεται είναι: 1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml και 0,05 mg/ml. Αρχικά, φτιάχνεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση C = 1mg/ml. Οι υπολογισμοί για να δημιουργηθούν τα διαλύματα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις γίνονται με διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από το διάλυμα με την μικρότερη συγκέντρωση. Με βάσει τους υπολογισμούς καταλήγουμε:

*Πίνακας 1: Προετοιμασία συγκεντρώσεων διαλυμάτων του πολυμερούς για την δοκιμασία DPPH.*

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων (mg/ml)	Προς μελέτη πολυμερές (gr)	Ποσότητα προηγούμενου διαλύματος (ml)	Όγκος ddH <sub>2</sub> O (ml)
1 mg/ml	0,001 gr	-	1 ml
0,8 mg/ml		0,8 ml	0,2 ml
0,6 mg/ml		0,75 ml	0,25 ml
0,4 mg/ml		0,6 ml	0,3 ml
0,2 mg/ml		0,2 ml	0,2 ml
0,1 mg/ml		0,2 ml	0,2 ml
0,05 mg/ml		0,2 ml	0,2 ml

Για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν 3 θέσεις για τη ρίζα DPPH, 6 θέσεις για μάρτυρες και 6 θέσεις για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης. Για τις θέσεις των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O + 190  $\mu$ l αραιωμένου διαλύματος DPPH και για τις θέσεις με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν 10  $\mu$ l ουσίας από την κάθε συγκέντρωση + 190  $\mu$ l DPPH.

ο Ανάλυση δειγμάτων

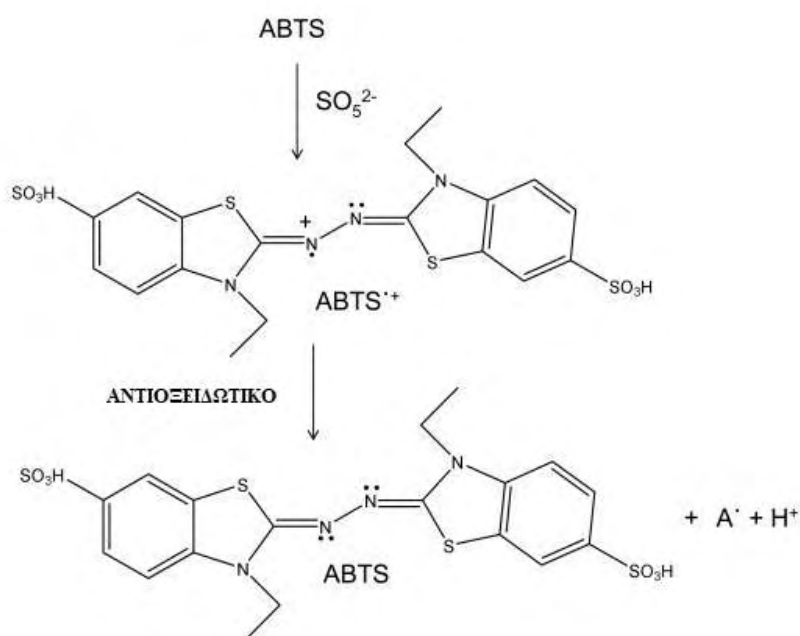
Το 96 θέσεων πιάτο ELISA διατηρήθηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Στη συνέχεια φωτομετρήθηκε με συσκευή TECAN στα 492 nm.



## 2.2.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ABTS

### Αρχή της μεθόδου

Το ABTS είναι μια χημική ένωση η οποία οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$ . Για να μετατραπεί στην δραστική της μορφή απαιτείται επώαση με υπερθειικό κάλιο (potassium persulfate). Το κατιόν έχει γαλαζοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 734 nm. Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού η ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  ανάγεται και αποχρωματίζεται. Με φασματοφωτομετρία μπορεί να προσδιοριστεί η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



**Εικόνα 11:** Μηχανισμός οξείδωσης του ABTS και επακόλουθης προσθήκης αντιοξειδωτικού. (Προσαρμογή από: Andrea Brizzolari et al., 2016, Evaluation of the antioxidant activity and capacity of some natural  $N^6$ -substituted adenine derivatives (cytokinins) by fluorimetric and spectrophotometric assays, *Journal of Chromatography B*, 1019, 164-168)

Το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολής της ρίζας ABTS} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

όπου  $A_{\text{control}}$ : η απορρόφηση του μάρτυρα και  $A_{\text{sample}}$ : η απορρόφηση του δείγματος.

## Υλικά

- Διάλυμα stock ABTS συγκέντρωσης 7,4 mM
- Διάλυμα EtOH
- Πιάτο ELISA 96 θέσεων
- ddH<sub>2</sub>O

## Πειραματική Διαδικασία

Οι χειρισμοί πραγματοποιούνται στο σκοτάδι μέχρι το τέλος της διαδικασίας καθώς η ελεύθερη ρίζα είναι φωτοευαίσθητη.

### ο Προετοιμασία διαλύματος ABTS

Η συγκέντρωση του stock ABTS είναι 7,4 mM, ενώ η συγκέντρωση του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα πρέπει να είναι 150 μM. Για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης θα χρειαστούν ~14 ml, αφού θα χρησιμοποιηθούν 70 θέσεις στο πιάτο ELISA με 0,2 ml στην κάθε θέση και καταλήξαμε πως 0,28 ml ABTS θα αραιωθούν σε 13,7 ml διαλύματος EtOH.

### ο Προετοιμασία δειγμάτων

Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων της ουσίας που εξετάζεται είναι: 1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml και 0,05 mg/ml. Αρχικά, φτιάχνεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση  $C = 1 \text{ mg/ml}$ . Οι υπολογισμοί για να δημιουργηθούν τα διαλύματα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις γίνονται με διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας από το διάλυμα με την μικρότερη συγκέντρωση. Με βάσει τους υπολογισμούς καταλήγουμε:

Πίνακας 2: Προετοιμασία συγκεντρώσεων διαλυμάτων του πολυμερούς για την δοκιμασία ABTS.

Συγκεντρώσεις διαλυμάτων (mg/ml)	Προς μελέτη πολυμερές (gr)	Ποσότητα προηγούμενου διαλύματος (ml)	Όγκος ddH <sub>2</sub> O (ml)
1 mg/ml	0,001 gr	-	1 ml
0,8 mg/ml		0,8 ml	0,2 ml
0,6 mg/ml		0,75 ml	0,25 ml
0,4 mg/ml		0,6 ml	0,3 ml
0,2 mg/ml		0,2 ml	0,2 ml
0,1 mg/ml		0,2 ml	0,2 ml
0,05 mg/ml		0,2 ml	0,2 ml

Για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν 3 θέσεις για τη ρίζα ABTS, 6 θέσεις για μάρτυρες και 6 θέσεις για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης. Για τις θέσεις των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν 10 μl ddH<sub>2</sub>O + 190 μl αραιωμένου διαλύματος ABTS και για τις θέσεις με σκοπό τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν 10 μl ουσίας από την κάθε συγκέντρωση + 190 μl ABTS.

ο Ανάλυση δειγμάτων

Το 96 θέσεων πιάτο ELISA διατηρήθηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Στη συνέχεια φασματοφωτομετρήθηκε στα 794 nm.

## 2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) ‘Η ΜΕΘΟΔΟΣ Comet

### Αρχή της μεθόδου

Είναι μία τεχνική μέσω της οποίας ανιχνεύεται η καταστροφή του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, μέσω της χρήσης ηλεκτροφόρησης και μικροσκοπίας φθορισμού. Βασίζεται στην ανίχνευση θραύσεων στην μία ή και στις δύο έλικες του DNA, στην πρώτη περίπτωση όταν χρησιμοποιούνται αλκαλικές συνθήκες και στη δεύτερη περίπτωση όταν πρόκειται για ουδέτερες συνθήκες. Η καταστροφή γίνεται εμφανής ύστερα από παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού, στο οποίο τα κύτταρα εμφανίζονται σαν ‘κομήτες’, όπου στο ένα μέρος τους περιλαμβάνεται το DNA υψηλού

μοριακού βάρους και στην “ουρά” τους τα αρχικά άκρα των μεταναστευτικών θραυσμάτων. Η ανάλυση του μήκους της “ουράς”, ο τρόπος κατανομής του DNA καθώς και το ποσοστό του DNA που περιέχεται σε αυτή, είναι ένα μέτρο ένδειξης της καταστροφής που έχει υποστεί το κύτταρο.

### **Υλικά**

- Τρυβλία 60 mm
- Τρυψίνη
- Χαμηλής τήξης gel αγαρόζης 1%
- Phosphate buffered saline (PBS)
- 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0)
- 5 M διάλυμα stock NaOH
- Φθορίζουσα χρωστική DNA: Propidium iodide
- Αλκαλικό διάλυμα λύσης κυττάρων για ανίχνευση θραύσεων στη μία αλυσίδα: 1.2 M NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% sodium lauryl sarcosinate, 0.26 M NaOH
- Αλκαλικό διάλυμα έκπλυσης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 0.03 M NaOH, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA
- Ουδέτερο διάλυμα λύσης κυττάρων για ανίχνευση θραύσεων και στις δύο έλικες: 2% sarkosyl, 0.5M Na<sub>2</sub>EDTA
- Ουδέτερο διάλυμα έκπλυσης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 90 mM Tris buffer, 90 mM boric acid, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA

### **Πειραματική Διαδικασία<sup>60</sup>**

Η διαδικασία του Comet assay πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στη συνέχεια:

#### ο Επίστρωση κυττάρων

Για την μέθοδο comet assay χρησιμοποιούμε τρυβλία 60mm και επιστρώνουμε σε αυτά κύτταρα με τη χρήση διαλυμάτων τρυψίνης, PBS και του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Για τη διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα γίνεται βαφή τους με Trypan blue, μετριέται ο αριθμός των κυττάρων στο μικροσκόπιο και καταγράφεται ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται ως “φωτεινά” ενώ τα νεκρά χρωματίζονται μπλε.

Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ ml) υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$N/4 \times 2 \times 10^4 \text{ cells/ml}$$

όπου N ο μέσος όρος των κυττάρων που μετρήθηκαν, 4 το πάχος της καλυπτρίδας του αιμοκυτταρόμετρου, 2 η αραιώση. Ανάλογα με το πόσα κύτταρα θέλω να χρησιμοποιήσω από το αρχικό εναιώρημα βρίσκω και την ποσότητα του θρεπτικού υλικού που θα χρειαστεί.

- Προετοιμασία αγαρόζης και επεξεργασία των αντικειμενοφόρων πλακών (slides)

Χρησιμοποιώ υδατόλουτρο το οποίο είναι ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 40°C. Η αγαρόζη που θα χρησιμοποιήσω θέλω να είναι 1% w/v. Με σκοπό να βελτιώσουμε την προσκόλληση της αγαρόζης στα slides τα εμβαπτίσαμε στην λιωμένη αγαρόζη που προετοιμάσαμε, κρατώντας την μία μεριά καθαρή. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα λεπτό στρώμα αγαρόζης, το οποίο βοηθάει μετέπειτα στην καλύτερη προσκόλληση του επόμενου στρώματος που θα περιέχει αγαρόζη και δείγμα.

- Προετοιμασία των δειγμάτων

Η προετοιμασία των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν ως δείγματα για ανάλυση στο μικροσκόπιο πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής. Αφαιρούμε τα τρυβλία με τα κύτταρα από τον επωαστήρα με 5% CO<sub>2</sub> και 37°C και τα προετοιμάζουμε κατάλληλα για τις επιδράσεις με τους μεταλλαξιογόνους παράγοντες.

- Επιδράσεις στα κύτταρα

Με σκοπό να ελεγχθεί η μεταλλαξιογόνος/ αντι-μεταλλαξιογόνος δράση του πολυμερούς που χρησιμοποιούμε στα πειράματά μας, τα κύτταρα προ- επωάζονται με το πολυμερές και στη συνέχεια επιδρούμε με παράγοντες γνωστούς από την βιβλιογραφία για την πρόκληση βλάβης στα κύτταρα, που είναι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και η ακτινοβολία UVB. Τα κύτταρα πριν τις επιδράσεις με τους επιβλαβείς παράγοντες, επωάστηκαν με το πολυμερές για διάφορες χρονικές περιόδους, για 24,48 και 72 ώρες. Στα τρυβλία που θα χρησιμοποιηθούν ως controls δεν προστίθεται καθόλου το πολυμερές που θα ελεγχθεί.

Η ποσότητα του πολυμερούς που χρησιμοποιείται για τις επιδράσεις στα κύτταρα είναι 0,5 mg/ml. Με σκοπό να φτιάξουμε το διάλυμα του πολυμερούς που χρειαζόμαστε, ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία:

- Ζυγίζουμε 5,5 mg (0,0055 gr) του πολυμερούς και το διαλύουμε σε 9,79 ml θρεπτικού χωρίς pen/ strep και χωρίς FBS.
- Το περνάμε από φίλτρο 0,22 μm σε καθαρό falcon.
- Προσθέτουμε σε αυτό 110 μl pen/strep και 1,1 ml FBS.

Επιλέγουμε τα τρυβλία στα οποία θα γίνουν οι επιδράσεις με το πολυμερές, αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο και προσθέτουμε θρεπτικό με το πολυμερές, που προετοιμάστηκε προηγουμένως. Στα υπόλοιπα προσθέτουμε θρεπτικό μέσο χωρίς τον παράγοντα. Τα τρυβλία επωάζονται για 24, 48 και 72 ώρες.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι επιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με τους μεταλλαξιογόνους παράγοντες, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και την ακτινοβολία UVB, τόσο κάτω από αλκαλικές συνθήκες (alkaline comet), όσο και κάτω από ουδέτερες συνθήκες (neutral comet):

Πίνακας 3: Γενοτοξικοί παράγοντες και πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Γενοτοξικός παράγοντας	Συγκέντρωση διαλύματος H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	Ένταση ακτινοβολίας (mJ/cm <sup>2</sup> )	Χρόνος επώασης (min)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 μM (Alkaline) 15 μM (Neutral)	-	15 min (Alkaline) 20 min (Neutral)
UVB	-	22 mJ/cm <sup>2</sup> (Alkaline) 44 mJ/cm <sup>2</sup> (Neutral)	-

Οι συνθήκες που ελέγχονται είναι: τα διαλύματα μάρτυρες τα οποία περιέχουν μόνο κύτταρα, τα διαλύματα στα οποία έχουν γίνει μόνο επιδράσεις με τα μεταλλαξιογόνα και δεν περιέχουν το πολυμερές, τα διαλύματα στα οποία έχει προστεθεί το πολυμερές αλλά δεν γίνονται επιδράσεις με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και UVB, τα διαλύματα που περιέχουν το πολυμερές και έχει γίνει επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και με UVB. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιούνται 0.4 ml των κυττάρων από το αντίστοιχο falcon και αναμειγνύονται με 1.2 ml 1% gel αγαρόζης σε θερμοκρασία 40°C και 1.2 ml του μείγματος τοποθετείτε στην επιφάνεια του ήδη

καλυμμένου slide με το λεπτό στρώμα αγαρόζης. Αφήνουμε το gel να σταθεροποιηθεί και στη συνέχεια τοποθετούμε τα slides στο διάλυμα λύσης.

- Λύση των κυττάρων και ηλεκτροφόρηση

Ανάλογα με τις συνθήκες της μεθόδου που χρησιμοποιούμε, η λύση και ηλεκτροφόρηση μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε σε αλκαλικές είτε σε ουδέτερες συνθήκες.

Στην 1<sup>η</sup> περίπτωση, τα slides τοποθετούνται με προσοχή σε 50 ml αλκαλικού διαλύματος λύσης, και παραμένουν σκεπασμένα σε θερμοκρασία 4°C για 1 ώρα, με σκοπό να διαχωριστούν οι δύο έλικες του DNA. Εφόσον περάσει αυτή η χρονική περίοδος τα slides τοποθετούνται σε 100 ml αλκαλικού διαλύματος πλύσης για 20 min. Η πλύση με το αλκαλικό διάλυμα πραγματοποιείται 2 φορές.

Στην περίπτωση του comet assay σε ουδέτερες συνθήκες, τα slides τοποθετούνται στο ουδέτερο διάλυμα λύσης overnight (18-20 h) μέσα σε επωαστήρα στους 37°C, και οι πλύσεις με το ουδέτερο διάλυμα διαρκούν 30 min.

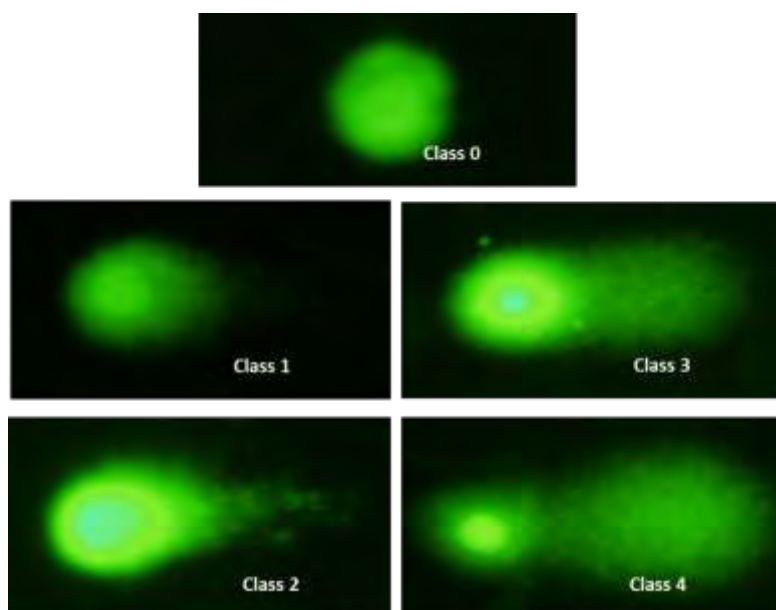
Αφού ολοκληρωθούν οι πλύσεις, και στις δύο περιπτώσεις, ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή ρυθμίζεται στα 13 Volt για 25 min και ταυτόχρονα πρέπει τα mA να διατηρούνται σταθερά σε 24-26 mA. Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση κάνω πλύση των πλακών σε 400 ml ddH<sub>2</sub>O.

- Χρώση των slides

Κάθε αντικειμενοφόρος βάφεται με διάλυμα propidium iodide 10 µg/ml και διατηρούνται στο σκοτάδι για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού περάσει η επώαση με τη χρωστική, τα slides ξεπλένονται σε 400 ml ddH<sub>2</sub>O.

- Ανάλυση των slides

Η ανάλυση των slides πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Για την εκτίμηση της καταστροφής του DNA, 100 κομήτες για κάθε slide βαθμολογούνται στις τάξεις 0, 1, 2, 3 και 4 ανάλογα με το μέγεθος της καταστροφής που φαίνεται στην "ουρά" του κομήτη. Η κατηγοριοποίηση της έκτασης της καταστροφής σε κάθε κύτταρο πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψιν το μέγεθος και την ακεραιότητα της "κεφαλής" του κομήτη, το μήκος και την πυκνότητα της "ουράς" και την αναλογία κεφαλής-ουράς. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται χαρακτηριστικές απεικονίσεις κομητών κάθε τάξης, βάσει των οποίων έγιναν οι αναλύσεις:



*Εικόνα 12: Ταξινόμηση των κομητών σε τάξεις 0 έως 4 ανάλογα με την καταστροφή του DNA.*

Η τάξη 0 αντιστοιχεί σε άθικτους πυρήνες κυττάρων χωρίς σημαντικές βλάβες, ενώ η τάξη 4 περιλάμβανε κύτταρα με την μεγαλύτερη καταστροφή στο DNA.

Τα επίπεδα βλαβών του DNA εκτιμώνται σε αυθαίρετες μονάδες (AU) πολλαπλασιάζοντας το νούμερο των κυττάρων με την αντίστοιχη τάξη που παρατηρείται σε κάθε συνθήκη. Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι ο ακόλουθος : [(0 x αριθμός των κυττάρων της τάξης 0) + (1 x αριθμός των κυττάρων της τάξης 1) + (2 x αριθμός των κυττάρων της τάξης 2) + (3 x αριθμός των κυττάρων της τάξης 3) + (4 x αριθμός των κυττάρων της τάξης 4)]. [<sup>83</sup>] Τα τελικά αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια μεταβολής (fold-change) των βασικών επιπέδων DNA βλαβών στα κύτταρα-μάρτυρες.

### **Στατιστική Ανάλυση**

Τα διαγράμματα κατασκευάστηκαν μετά από ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SigmaPlot version 11. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SD. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism και οι στατιστικές διαφορές αναλύθηκαν μέσω του 2-tailed Student's t-test. Τιμές  $P > 0,05$  δεν θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

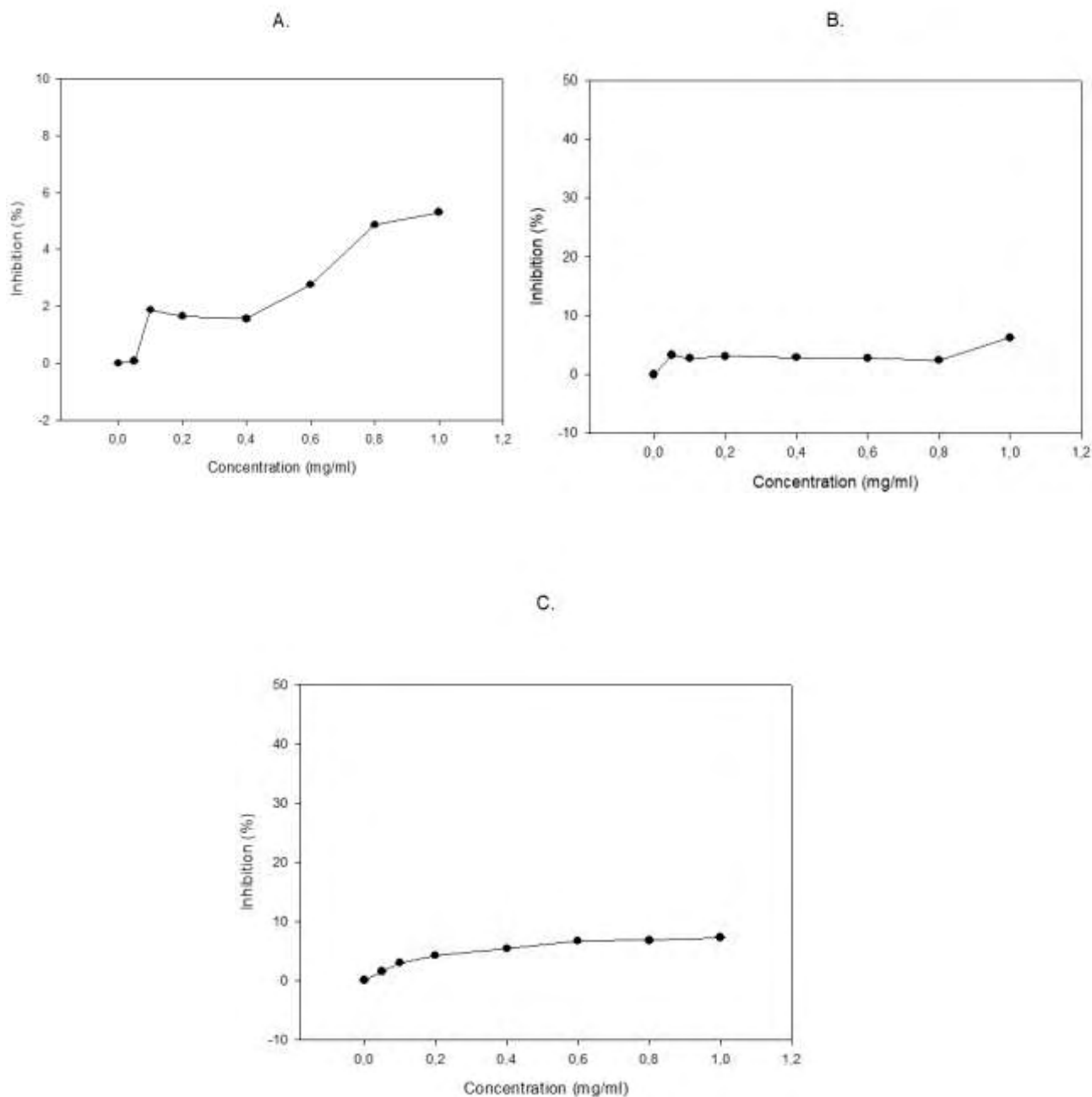


## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

#### **3.1.1 Δοκιμασία ABTS**

Για το πολυμερές που μελετάμε εξετάστηκε το ποσοστό (%) εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS (% αναστολή) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πολυμερούς (0,05 - 1 mg/ml). Στην Εικόνα 13, παρουσιάζονται 3 διαφορετικές δοκιμασίες ABTS, (A – C). Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, τα ποσοστά αναστολής της δραστικής ρίζας ABTS κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα ακόμα και αν αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυμερούς.



**Εικόνα 13:** Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας του βιοπολυμερούς *D* χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *ABTS*. Διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,05 - 1 mg/ml) του πολυμερούς *D* επώαστηκαν με το αντιδραστήριο *ABTS* για 15 λεπτά και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 794 nm. Απεικονίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του πολυμερούς σε σχέση με την συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές επαναλήψεις (A-C).

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) αναστολής της ρίζας *ABTS*, όπως προκύπτουν από τα διαγράμματα A-C της εικόνας 13, για τη μέγιστη συγκέντρωση του

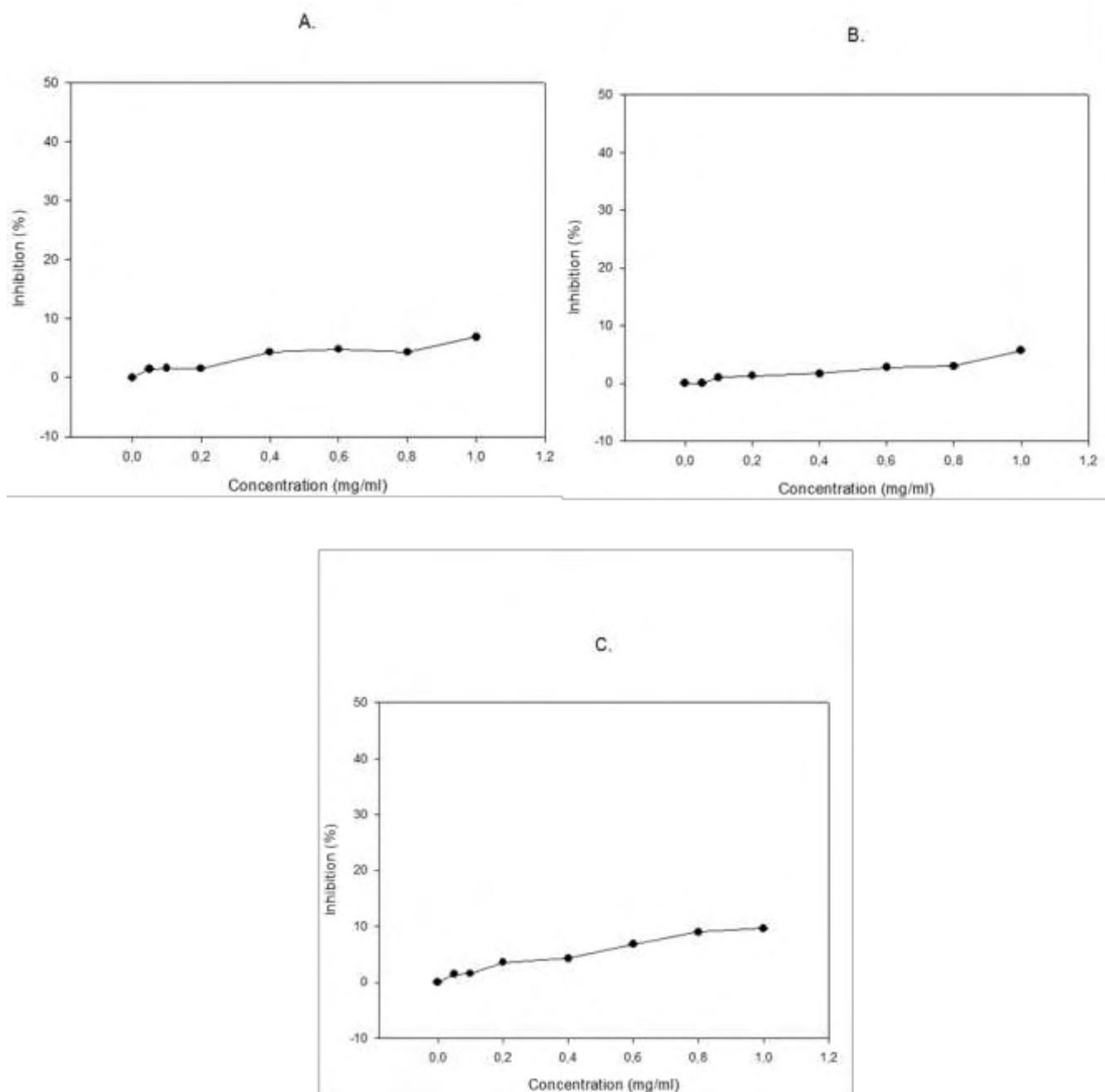
πολυμερούς D (1 mg/ml). Όπως προκύπτει, ο μέσος όρος της % αναστολής της ρίζας ABTS κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα ( $6,3 \pm 0,98$  %) συμπεραίνοντας, πως το πολυμερές D δεν παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση την ανασταλτική του δράση στη ρίζα ABTS.

Πίνακας 4: Αντιοξειδωτική ικανότητα του πολυμερούς με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα ABTS στη μέγιστη  $C = 1$  mg/ml.

	Inhibition at 1mg/ml (%)
A.	$5,31 \pm 0,043$
B.	$6,29 \pm 0,013$
C.	$7,27 \pm 0,029$
Average	$6,3 \pm 0,98$

### 3.1.2 Δοκιμασία DPPH

Όπως και στην προηγούμενη δοκιμασία, εξετάζεται το ποσοστό (%) της δραστηριότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH (% αναστολή) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πολυμερούς D (0,05 - 1 mg/ml). Στην Εικόνα 14, παρουσιάζονται 3 διαφορετικές δοκιμασίες DPPH (A-C).



**Εικόνα 14:** Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας του βιοπολυμερούς *D* χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία DPPH. Διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,05 - 1 mg/ml) του πολυμερούς *D* επωάστηκαν με το αντιδραστήριο DPPH για 15 λεπτά και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 492 nm. Απεικονίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του πολυμερούς σε σχέση με την συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές επαναλήψεις (A-C).

Στον πίνακα 5, παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) αναστολής της ρίζας DPPH, όπως προκύπτουν από τα διαγράμματα A-C της εικόνας 14 για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση

πολυμερούς D (1 mg/ml). Η μέγιστη συγκέντρωση του πολυμερούς D προκάλεσε κατά μέσο όρο  $7,4 \pm 2,03$  (%) αναστολή της ρίζας DPPH εκτιμώντας, πως το πολυμερές δεν παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση με βάση το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH.

Πίνακας 5: Αντιοξειδωτική ικανότητα του πολυμερούς με βάση την ανασταλτική επίδραση που ασκεί στην ελεύθερη ρίζα DPPH στη μέγιστη C = 1 mg/ml.

	Inhibition at 1mg/ml (%)
A.	$6,9 \pm 0,065$
B.	$5,66 \pm 0,03$
C.	$9,64 \pm 0,048$
Average	$7,4 \pm 2,03$

Τα αποτελέσματα και των δυο αντιοξειδωτικών δοκιμασιών, φαίνεται να επιβεβαιώνονται μεταξύ τους, καθώς το πολυμερές στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που ελέγχθηκε δεν άγγιξε υψηλά ποσοστά αναστολής των δραστικών ριζών, ABTS και DPPH. Επομένως, καταλήγουμε πως το βιοπολυμερές D δεν παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα.

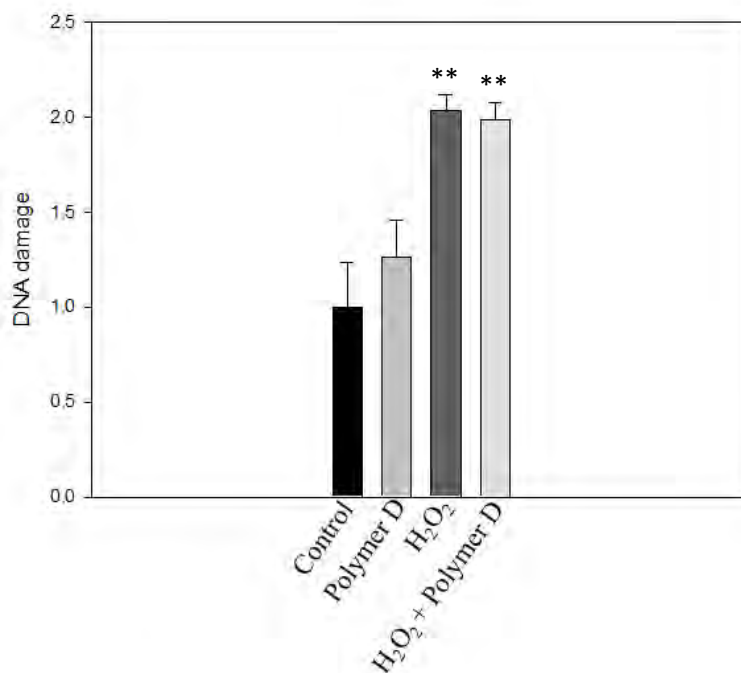
## 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ COMET

Η μέθοδος Comet χρησιμοποιείται με σκοπό να ελεγχθεί η μεταλλαξιογόνος/ αντι-μεταλλαξιογόνος δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε επώαση με το απομονωμένο πολυμερές D για τρεις χρονικές περιόδους, 24h, 48h και 72h, πριν γίνει η επαγωγή οξειδωτικού στρες, είτε με επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, είτε με επίδραση UV ακτινοβολίας. Σε όλα τα διαγράμματα, η έκταση της καταστροφής του DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού στρες παρουσιάζεται ως πολλαπλάσιο των βαθμολογημένων AU (arbitrary units) που αντιστοιχούν σε επίπεδα DNA βλαβών, που ανιχνεύονται φυσιολογικά στα κύτταρα-μάρτυρες.

### 3.2.1 Alkaline Comet Assay

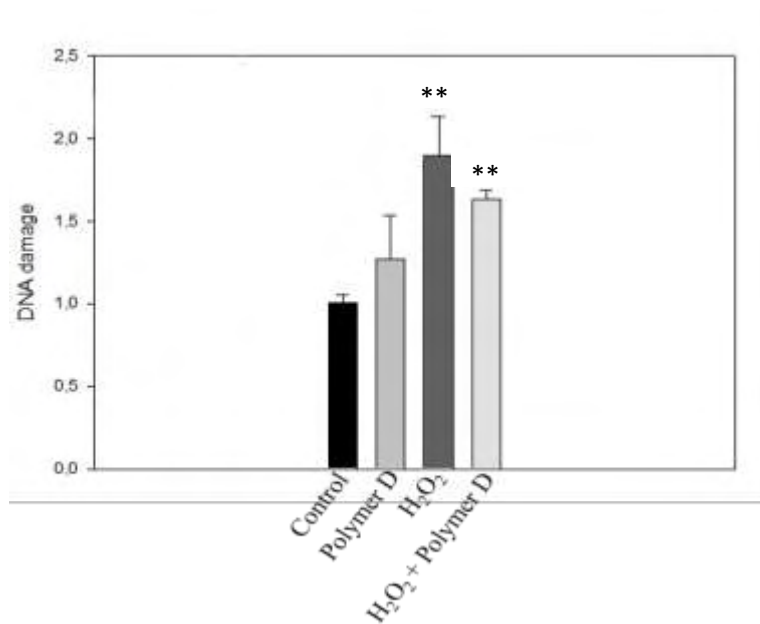
Με τη μέθοδο comet στην οποία χρησιμοποιούνται αλκαλικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των DNA βλαβών, που προκύπτουν από θραύσεις στην μία μόνο έλικα του DNA (single strand breaks) ή και στις δύο έλικες (double-strand breaks). Ύστερα από ανάλυση των κομητών στο μικροσκόπιο φθορισμού προκύπτουν τα αποτελέσματα που συνοψίζονται παρακάτω.

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου comet, και περιλαμβάνονται συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml για 24 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 5 μM για 15 min. Φαίνεται πως όταν επιδρούμε με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με το πολυμερές προκαλείται σημαντική καταστροφή του DNA σε σχέση με το control. Στα κύτταρα που επώασθηκαν με το πολυμερές D και στη συνέχεια πραγματοποιείται επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρατηρούμε μικρή μείωση στην βλάβη των πυρήνων συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν επώασθηκαν με το πολυμερές D, η οποία είναι όμως μη στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Εικόνα 15:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς **D** έναντι  $H_2O_2$  σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική *alkaline comet assay*. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 24 h με το πολυμερές **D** συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με διάλυμα  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 5  $\mu$ M. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\* $P < 0.05$  (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

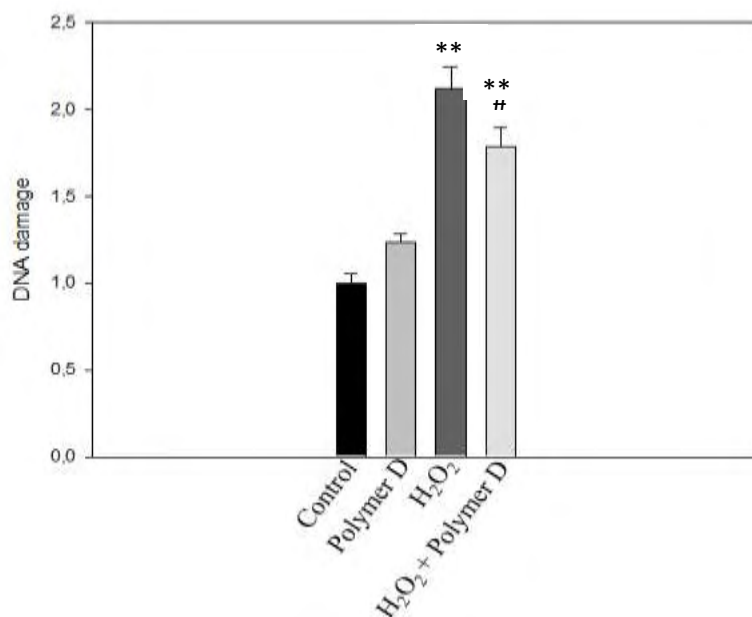
Στην Εικόνα 16 περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα του comet assay, για το οποίο πραγματοποιήθηκε προ-επώαση των κυττάρων A375 με το πολυμερές **D** για 48 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με διάλυμα  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 5  $\mu$ M για 15 min. Φαίνεται πως στα κύτταρα που επώαστηκαν με το πολυμερές όταν επιδρούμε με διάλυμα  $H_2O_2$  μειώνεται η καταστροφή του DNA, σε σχέση με την βλάβη που παρατηρείται όταν τα κύτταρα δεν έχουν επωαστεί με το πολυμερές, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα του  $H_2O_2$ .



**Εικόνα 16:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς **D** έναντι  $H_2O_2$  σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική *alkaline comet assay*. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 48 h με το πολυμερές **D** συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με διάλυμα  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 5  $\mu$ M. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\* $P < 0.05$  (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

Τέλος, στην Εικόνα 17 περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα του comet assay, για το οποίο πραγματοποιήθηκε προ-επώαση των κυττάρων A375 με το πολυμερές για 72 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με διάλυμα  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 5  $\mu$ M για 15 min. Στην προκειμένη περίπτωση, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα βλαβών στο DNA στα κύτταρα που είχαν προ-επαστεί με το πολυμερές σε σχέση με τα επίπεδα βλαβών που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα που δέχτηκαν μόνο την επίδραση του  $H_2O_2$ .





**Εικόνα 17:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιόγону δράσης του πολυμερούς D έναντι H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική alkaline comet assay. Προ-επόαση κυττάρων A375 για 72 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 5 μM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες), #P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα που δέχτηκαν επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Στον πίνακα 6, παρουσιάζονται τα επίπεδα των DNA βλαβών συγκεντρωτικά για κάθε συνθήκη των παραπάνω διαγραμμάτων που απεικονίζονται στις εικόνες 15-17. Σε γενικές γραμμές συμπεραίνουμε, πως κάτω από τις συνθήκες που εξετάσθηκε το πολυμερές D δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή αντι-μεταλλαξιόγону δράση.

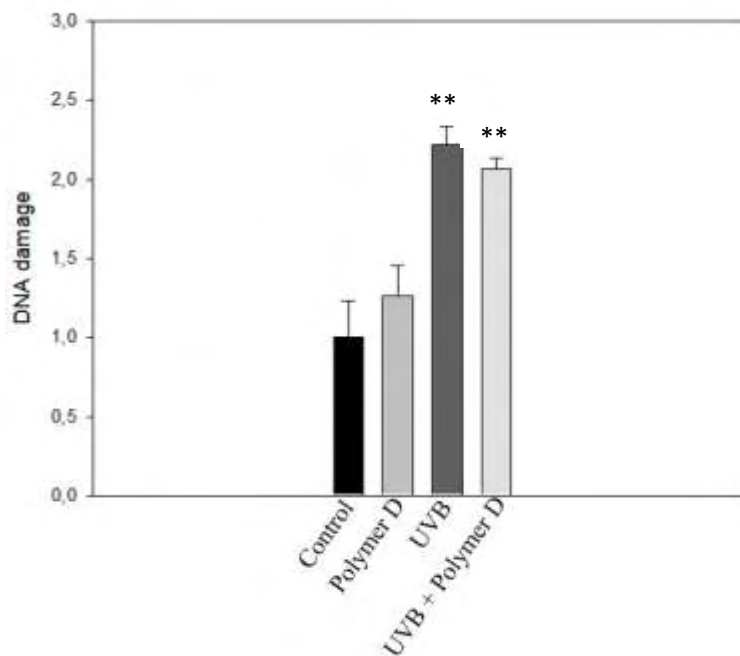
**Πίνακας 6:** Επίπεδα DNA βλαβών (AU) για κάθε συνθήκη της μεθόδου alkaline comet assay.

	24h			48h			72h		
	0,5 mg/ml Polymer D	5 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	5 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	5 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mg/ml Polymer D
DNA damage (AU) (fold DNA damage of control)	1,26 ± 0,19	2,04 ± 0,08**	1,99 ± 0,09**	1,27 ± 0,26	1,89 ± 0,24**	1,63 ± 0,05**	1,24 ± 0,05	2,12 ± 0,12**	1,78 ± 0,11**,#

\*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες),

##P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα που δέχτηκαν επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

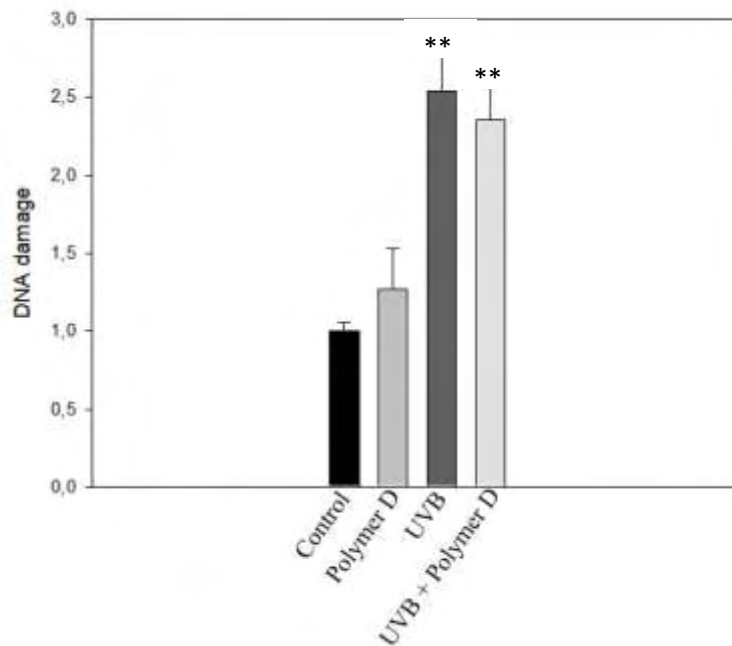
Στην Εικόνα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του comet assay, στο οποίο περιλαμβάνονται συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές για 24 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με ακτινοβολία UVB στα 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Φαίνεται πως η UVB όταν επιδρά στα κύτταρα που δεν έχουν επωασθεί με το πολυμερές D προκαλεί σημαντική καταστροφή του DNA σε σχέση με το control. Όταν επιδρούμε με UVB στα κύτταρα που επώαστηκαν με το πολυμερές παρατηρείται μείωση στην βλάβη των πυρήνων, μη στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την ομάδα του UVB.



**Εικόνα 18:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς D έναντι ακτινοβολίας UVB σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική alkaline comet assay. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 24 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με UVB στα 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

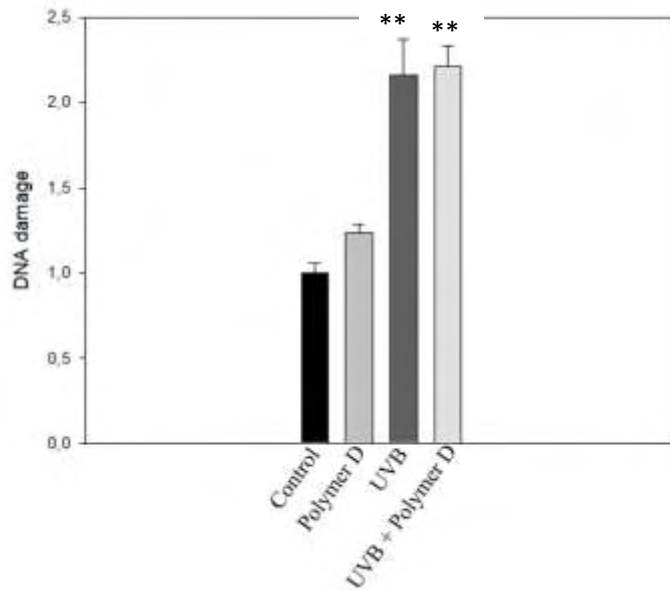
Στην Εικόνα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του comet assay, στο οποίο περιλαμβάνονται συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές για 48 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με ακτινοβολία UVB στα 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση, πως όταν επιδρούμε με UVB στα κύτταρα που δεν

έχουν επωαστεί με το πολυμερές D προκαλείται σημαντική καταστροφή του DNA σε σχέση με το control. Επιπλέον, μετά από επίδραση με UVB στα κύτταρα που επώασθηκαν με το πολυμερές παρατηρείται μικρή μείωση της βλάβης σε σχέση με την ομάδα του UVB.



**Εικόνα 19:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς D έναντι ακτινοβολίας UVB σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική alkaline comet assay. Προ-επάωση κυττάρων A375 για 48 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με UVB στα 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

Στην τελευταία περίπτωση comet assay, ενέχονται συνθήκες προ-επάωσης των κυττάρων A375 με το πολυμερές D για 72 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με ακτινοβολία UVB στα 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Η επίδραση της ακτινοβολίας στα επωασμένα με το πολυμερές κύτταρα προκάλεσε παρόμοια επίπεδα βλαβών στο DNA με την ομάδα του UVB.



**Εικόνα 20:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιόγону δράσης του πολυμερούς **D** έναντι ακτινοβολίας **UVB** σε **A375** κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική **alkaline comet assay**. Προ-επώαση κυττάρων **A375** για 72 h με το πολυμερές **D** συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με **UVB** στα 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\**P*<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα επίπεδα των DNA βλαβών, όπως προκύπτουν από τα διαγράμματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω και μέσω του οποίου οδηγούμαστε στα αποτελέσματα που αναφέραμε. Φαίνεται πως στα κύτταρα που επώασθηκαν με το πολυμερές **D**, αν και παρατηρούνται βλάβες στο DNA, αυτή είναι κοντά στα βασικά επίπεδα βλαβών, που παρατηρούνται στους μάρτυρες και δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στις περιπτώσεις επώασης των κυττάρων με το πολυμερές **D** για 24 και 48 ώρες πριν την επίδραση με την ακτινοβολία, οι βλάβες στο DNA μειώνονται σε σχέση με τις βλάβες που παρατηρούνται χωρίς προ-επώαση με το πολυμερές, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 7: Επίπεδα DNA βλαβών (AU) για κάθε συνθήκη της μεθόδου alkaline comet assay.

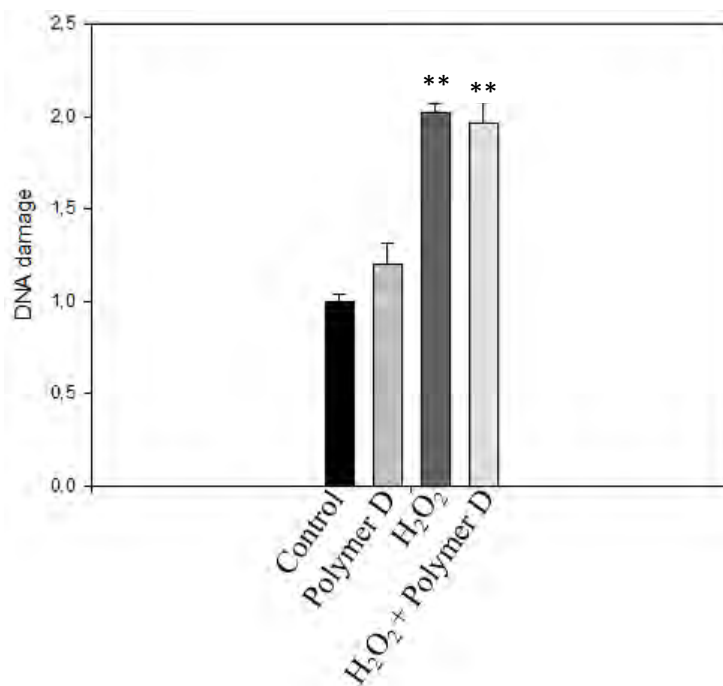
	24h			48h			72h		
	0,5 mg/ml Polymer D	22mJ/cm <sup>2</sup>	22mJ/cm <sup>2</sup> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	22mJ/cm <sup>2</sup>	22mJ/cm <sup>2</sup> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	22mJ/cm <sup>2</sup>	22mJ/cm <sup>2</sup> + 0,5 mg/ml Polymer D
DNA damage (AU) (fold-DNA damage of control)	1,26 ± 0,19	2,21 ± 0,12**	2,06 ± 0,07**	1,27 ± 0,26	2,54 ± 0,23**	2,35 ± 0,2**	1,24 ± 0,05	2,12 ± 0,21**	2,159 ± 0,12**

\*\* $P < 0.05$  (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες)

### 3.2.2 Neutral Comet Assay

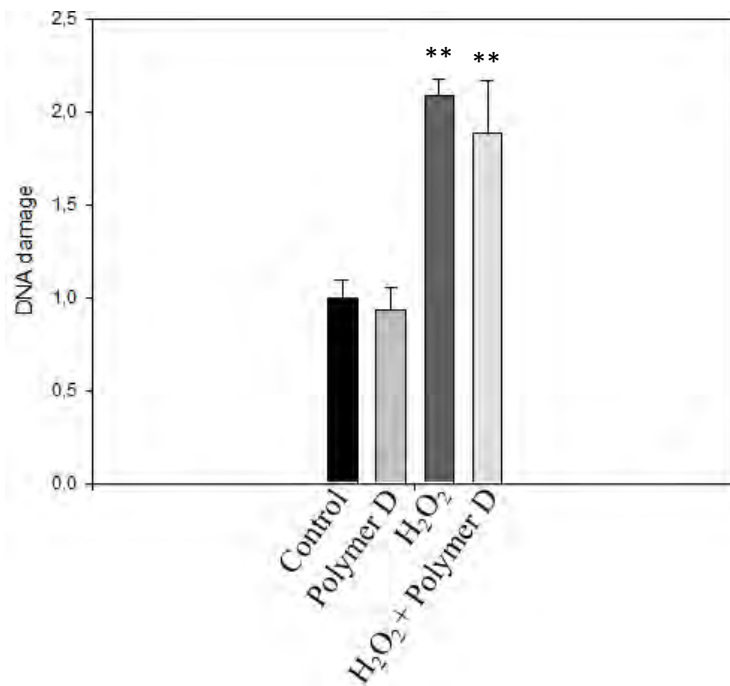
Στη μέθοδο neutral comet, χρησιμοποιούνται ουδέτερες συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος και ελέγχεται η καταστροφή του DNA η οποία προκύπτει από θραύσεις και στις δύο έλικες του DNA (double-strand breaks). Ύστερα από ανάλυση των κομητών στο μικροσκόπιο φθορισμού προκύπτουν τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

Στην Εικόνα 21 φαίνονται τα αποτελέσματα του comet assay, στο οποίο περιλαμβάνονται συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές D για 24 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 15 μM για 20 min. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί σημαντική καταστροφή του DNA. Προ-επώαση με το πολυμερές D προκαλεί μικρή μείωση των DNA βλαβών, χωρίς να είναι όμως στατιστικά σημαντική.



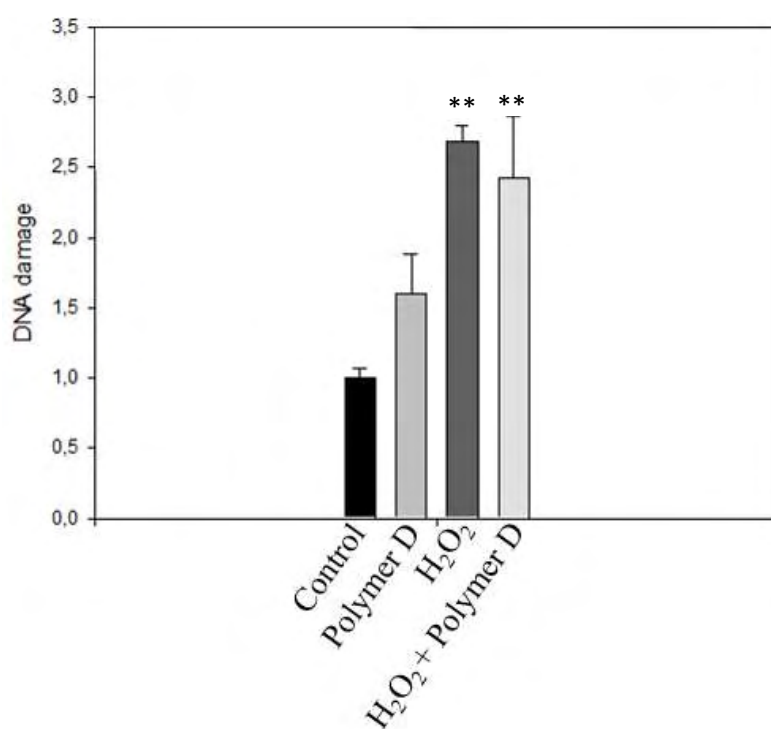
**Εικόνα 21:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιόγону δράσης του πολυμερούς D έναντι H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική neutral comet assay. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 24 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 15 μM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

Στην Εικόνα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου comet, στην οποία περιλαμβάνονται συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές D για 48 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 15μM για 20 min. Παρατηρούμε πως και σε αυτή την περίπτωση, επίδραση με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με το πολυμερές προκαλεί καταστροφή του DNA σε σημαντικό βαθμό. Προ-επώαση με το πολυμερές D οδηγεί σε μείωση των DNA βλαβών που επάγονται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική.



**Εικόνα 22:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς D έναντι H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική neutral comet assay. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 48 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 15 μM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

Τέλος, παρουσιάζονται στην Εικόνα 23 τα αποτελέσματα για συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές D για 72 ώρες, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 15 μM για 20 min. Και σε αυτή την περίπτωση, στην επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα κύτταρα που επώαστηκαν με το πολυμερές, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά μειωμένος βαθμός καταστροφής σε σχέση με την επίδραση σε κύτταρα που δεν προ-επώαστηκαν με αυτό πριν την επίδραση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Εικόνα 23:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιόγνου δράσης του πολυμερούς D έναντι H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική neutral comet assay. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 72 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 15 μM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα επίπεδα των DNA βλαβών, όπως προκύπτουν από τα διαγράμματα που απεικονίζονται στις εικόνες 21-23.

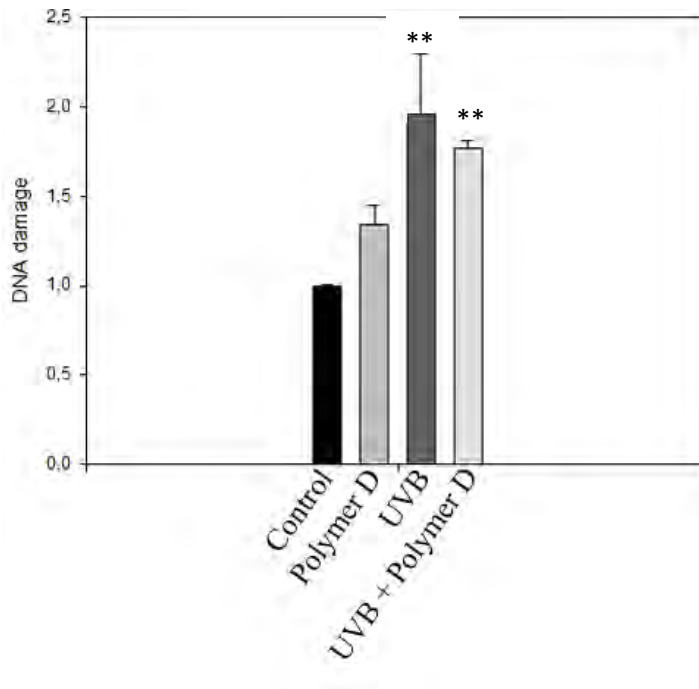
**Πίνακας 8:** Επίπεδα DNA βλαβών για κάθε συνθήκη της μεθόδου neutral comet assay.

	24h			48h			72h		
	0,5 mg/ml Polymer D	15 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	15 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	15 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mg/ml Polymer D
DNA damage (AU) (fold-DNA damage of control)	1,19 ± 0,11	2,01 ± 0,05**	1,96 ± 0,10**	0,93 ± 0,12	2,08 ± 0,09**	1,88 ± 0,28**	1,59 ± 0,28	2,68 ± 0,10**	2,42 ± 0,43**

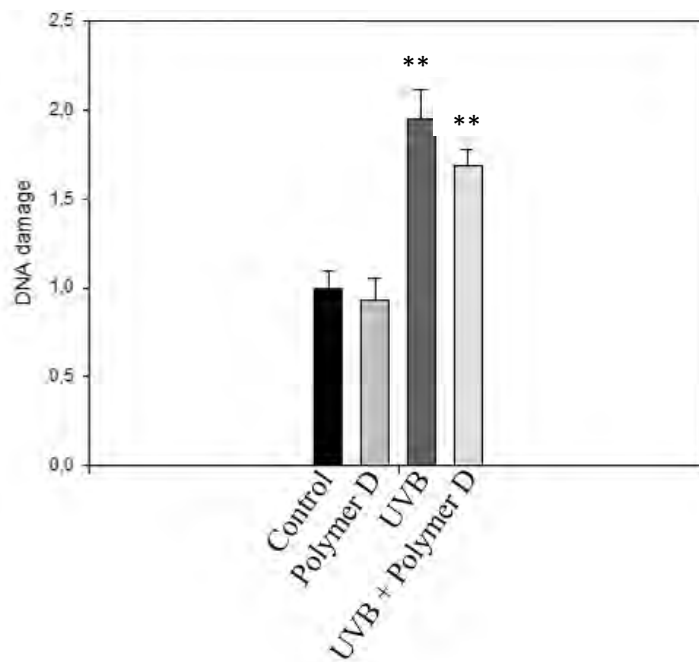
\*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες)



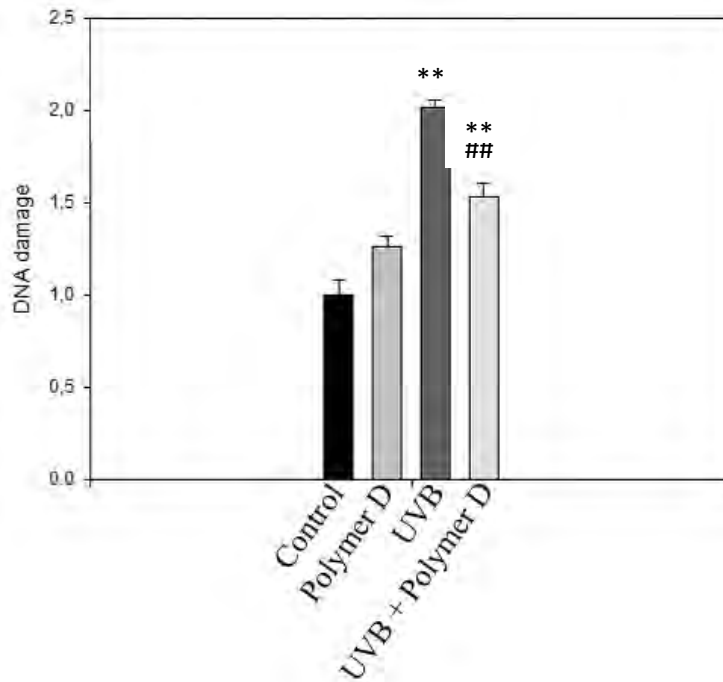
Στις Εικόνες 24, 25 και 26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του neutral comet assay, στο οποίο περιλαμβάνονται συνθήκες προ-επώασης των κυττάρων A375 με το πολυμερές D για 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, με επακόλουθη επίδραση στα κύτταρα με ακτινοβολία UVB στα 44 mJ/cm<sup>2</sup>. Σε όλες τις περιπτώσεις, φαίνεται πως όταν επιδρούμε με UVB στα κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με το πολυμερές D, η καταστροφή του DNA είναι σημαντικά υψηλή. Αντίθετα, όταν επιδρούμε με ακτινοβολία UVB στα κύτταρα που προ-επώαστηκαν με το πολυμερές D, ο βαθμός της καταστροφής μειώνεται με τον μικρότερο βαθμό καταστροφής να παρατηρείται στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με το πολυμερές για 72 ώρες.



**Εικόνα 24:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς D έναντι ακτινοβολίας UVB σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική neutral comet assay. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 24 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με UVB στα 44 mJ/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες).



**Εικόνα 25:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιόγону δράσης του πολυμερούς D έναντι ακτινοβολίας UVB σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική neutral comet assay. Προ-επάση κυττάρων A375 για 48 h με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με UVB στα 44 mJ/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες)



**Εικόνα 26:** Εκτίμηση της αντι-μεταλλαξιογόνου δράσης του πολυμερούς D έναντι ακτινοβολίας UVB σε A375 κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνική neutral comet assay. Προ-επώαση κυττάρων A375 για 72 ώρες με το πολυμερές D συγκέντρωσης 0,5 mg/ml και επακόλουθη επίδραση με UVB στα 44 mJ/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (αριθμός επαναλήψεων = 3). \*\*P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες), ##P<0.05 (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα που δέχτηκαν επίδραση UVB).

Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου Neutral Comet, παρατηρείται καταστροφή του DNA στα κύτταρα που επώαστηκαν με το πολυμερές και δεν πραγματοποιήθηκε καμία άλλη επίδραση, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των DNA βλαβών, όπως προκύπτουν από τα διαγράμματα, που απεικονίζονται στις εικόνες 24-26.

Πίνακας 9: Επίπεδα DNA βλαβών (AU) για κάθε συνθήκη της μεθόδου neutral comet assay.

	24h			48h			72h		
	0,5 mg/ml Polymer D	44 mJ/cm <sup>2</sup>	44 mJ/cm <sup>2</sup> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,5 mg/ml Polymer D	44 mJ/cm <sup>2</sup>	44 mJ/cm <sup>2</sup> + 0,5 mg/ml Polymer D	0,25 mg/ml Polymer D	44 mJ/cm <sup>2</sup>	44 mJ/cm <sup>2</sup> + 0,5 mg/ml Polymer D
DNA damage (AU) (fold-DNA damage of control)	1,33 ± 0,11	1,95 ± 0,33**	1,76 ± 0,04**	0,93 ± 0,15	1,94 ± 0,16**	1,68 ± 0,09**	1,26 ± 0,05	2,01 ± 0,04**	1,53 ± 0,07**,#

\*\* $P < 0.05$  (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες)

## $P < 0.05$  (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τα κύτταρα που δέχτηκαν επίδραση UVB)

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν συμπεραίνουμε πως το πολυμερές D, σε γενικές γραμμές, δεν εμφανίζει σημαντική μεταλλαξιογόνο ή αντιμεταλλαξιογόνο δράση. Παρόλα αυτά, κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (προ-επώαση για 72 ώρες και έκθεση σε υπεροξείδιο ή UVB), παρατηρήθηκε μικρή προστασία έναντι των οξειδωτικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, που θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι αμφίφυλες χημικές ενώσεις, καθώς σχηματίζονται από μοριακές δομές, οι οποίες είναι τόσο υδρόφοβες, όσο και υδρόφιλες. Χαρακτηρίζονται από σημαντικές ιδιότητες, όπως είναι η ικανότητα δημιουργίας γαλακτωμάτων και η τάση να διανέμονται κατά τη διεπαφή μεταξύ δύο φάσεων διαφορετικής πολικότητας, για παράδειγμα τα έλαια και το νερό ή ο αέρας και το νερό, μειώνοντας την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Οι ιδιότητες αυτές των επιφανειοδραστικών παραγόντων τους συνιστά μία από τις σημαντικότερες τάξεις χημικών ενώσεων με πλήθος εφαρμογών στην ιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Στις μέρες μας, οι περισσότεροι επιφανειοδραστικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι συνθετικής προέλευσης. Έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα βιοαποικοδόμησης και χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλά ποσοστά τοξικότητας. Επομένως, η επιστημονική κοινότητα διεξάγει πλήθος μελετών στοχεύοντας στην παραγωγή φυσικών και φιλικών προς το περιβάλλον επιφανειοδραστικών παραγόντων.

Στην παρούσα εργασία, η οποία αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου ευρωπαϊκού προγράμματος (MARISURF Horizon 2020) με στόχο την ανακάλυψη νέων βιολογικά παραγόμενων επιφανειοδραστικών παραγόντων από το θαλάσσιο περιβάλλον, εκτιμήθηκε η πιθανή αντιοξειδωτική, μεταλλαξιγόνο και αντί-μεταλλαξιγόνο δράση ενός βιοπολυμερούς που απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *Halomonas sp.* και ονομάστηκε πολυμερές D. Το βιοπολυμερές αυτό, απομονώθηκε από μία μοναδική συλλογή βακτηρίων θαλάσσιας προέλευσης και εμφάνισε σημαντικές ιδιότητες όπως του αφρίσματος, της γαλακτωματοποίησης και πηκτωματοποίησης, χαρακτηριστικά που το κατατάσσει ως ένα πιθανό νέο βιοεπιφανειοδραστικό παράγοντα.

Στο πρώτο μέρος της έρευνας, ελέγχθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του βιοπολυμερούς D που προέρχεται από το βακτηριακό στέλεχος *Halomonas sp.* Γι' αυτό τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι: η δοκιμασία ABTS και η δοκιμασία DPPH. Για το πολυμερές εξετάστηκε το ποσοστό (%) της δραστηριότητας εξουδετέρωσης των δραστικών ριζών ABTS και DPPH (% αναστολή) σε διάφορες

συγκεντρώσεις διαλυμάτων του πολυμερούς. Και στις δύο δοκιμασίες η αύξηση των συγκεντρώσεων του πολυμερούς, αύξησε το ποσοστό αναστολής της ρίζας. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο δοκιμασιών (πίνακες 4 και 5) για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του διαλύματος του πολυμερούς D, C = 1 mg/ml, παρατηρούμε υψηλότερο μέσο όρο του ποσοστού αναστολής της ρίζας DPPH. Όμως, σε καμία από τις δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό αναστολής των ριζών ABTS και DPPH. Συμπεραίνουμε, λοιπόν πως το πολυμερές δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Σε σύγκριση με άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πολυμερικές ενώσεις οι οποίες έχουν απομονωθεί από θαλάσσια βακτήρια, η αντιοξειδωτική δράση του πολυμερούς που ελέγχθηκε είναι χαμηλή. Στην μελέτη των Shuhong Ye et al. (2012), στην οποία απομονώθηκε πολυσακχαρίτης της εξωτερικής επιφάνειας θαλάσσιου στελέχους *Pseudomonas PF-6* και ελέγχθηκε για την αντιοξειδωτική του δράση με τρεις μεθόδους- δέσμευση των ριζών DPPH·, ·OH and -O<sup>2-</sup>. Φαίνεται πως η ένωση εξουδετερώνει και τους τρεις τύπους ριζών, με ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης των δύο τελευταίων τύπων δραστικών ριζών, και η δραστηριότητα της αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης. Ακόμη, μια άλλη μελέτη των Ratana Chaiklahan et al. (2013) που έχει πραγματοποιηθεί σε πολυσακχαρίτη της εξωτερικής επιφάνειας του γένους *Spirulina sp.*, έδειξε πως η ικανότητα του πολυσακχαρίτη να εξουδετερώνει τη ρίζα DPPH·, ήταν μεγαλύτερη σε υψηλή θερμοκρασία (90°C). Στην έρευνα των Sokolova et al. (2011), ελέγχονται για την αντιοξειδωτική τους δράση πολυσακχαρίτες του εξωτερικού τοιχώματος κόκκινων φυκιών οι οποίοι διαφέρουν δομικά. Όλοι οι τύποι που ελέγχθηκαν παρουσίασαν μέτρια κατασταλτική δράση των ριζών υδροξυλίου, ενώ φάνηκε πως είχαν παρόμοια ανασταλτική δράση ή λίγο υψηλότερη από αυτή του μάρτυρα όσον αφορά τις ρίζες ανιόντων σουπεροξειδίου. Από τις έρευνες των Ratana Chaiklahan et al. (2013) και Sokolova et al. (2011), προκύπτει πως η αντιοξειδωτική δράση των εξεταζόμενων πολυμερικών ενώσεων σε κάθε έρευνα κυμαίνεται σε μέτρια επίπεδα, καθώς εμφανίζουν ανασταλτική δράση των δραστικών ριζών σε ποσοστά ~30% , ενώ συμπεραίνουμε πως ο πολυσακχαρίτης της εξωτερικής επιφάνειας θαλάσσιου στελέχους *Pseudomonas PF-6* έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό μετά από περαιτέρω μελέτες της δομής και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης, ελέγχθηκε η πιθανή μεταλλαξιγόνο/ αντι-μεταλλαξιγόνο δράση του πολυμερούς, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, που επάγεται από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή UVB ακτινοβολία, στην κυτταρική σειρά A375, κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική comet, μέσω της οποίας ανιχνεύεται η καταστροφή του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, μέσω της χρήσης ηλεκτροφόρησης και μικροσκοπίας φθορισμού. Βασίζεται στην ανίχνευση θραύσεων στην μία ή και στις δύο έλικες του DNA, όταν χρησιμοποιούνται είτε αλκαλικές συνθήκες, είτε ουδέτερες συνθήκες.

Η τεχνική comet είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη σε πειράματα ανίχνευσης διάφορων τύπων βλαβών του DNA καθώς και επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού όταν πρόκειται για μεμονωμένα κύτταρα. Μερικά παραδείγματα είναι η χρήση της μεθόδου στην ανίχνευση καταστροφής του DNA σε δείγματα σπέρματος για το συσχετισμό τους με την γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου (I. D. Morris et al. 2002), η χρήση στους τομείς της ογκολογίας και της ραδιοβιολογίας όπου μετριούνται διάφοροι τύποι καταστροφής σε κύτταρα που εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία (P. L. Olive, 1999) και η χρήση στον έλεγχο καταστροφής του DNA από τροποποιητικούς παράγοντες και παράγοντες οξειδωτικού στρες σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (D. Anderson et al. 1994). Σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται η χρήση της τεχνικής alkaline comet σε *in vivo* δοκιμασίες γενοτοξικότητας ουσιών, όπως χημικά και φάρμακα, ως δεύτερο στάδιο μελετών μετά από εύρεση θετικών *in vitro* αποτελεσμάτων, ενώ αξιολογούνται τα θετικά και αρνητικά αποτελέσματα της τεχνικής αυτής και πως μπορεί περαιτέρω να αξιοποιηθεί σε πρακτικές εφαρμογές στις διαδικασίες ταυτοποίησης και αξιολόγησης κινδύνου (Brendler- Schwaab et al. (2005). Η τεχνική επίσης αξιοποιείται και για την εκτίμηση οικοτοξικότητας σε υδάτινα περιβάλλοντα μελετώντας την ανίχνευση ειδικών θραύσεων του DNA σε υδρόβιους οργανισμούς (Lee et al. (2003).

Τα αποτελέσματα, της τεχνικής comet, κάτω από αλκαλικές ή ουδέτερες συνθήκες έδειξαν πως το πολυμερές που μελετήθηκε, δεν παρουσιάζει σημαντική μεταλλαξιγόνο δράση όταν τα κύτταρα επωάζονται με αυτό για 24, 48 και 72 ώρες. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου comet σε αλκαλικές και σε ουδέτερες συνθήκες, όταν πρόκειται για προ-επάση με το πολυμερές D για 24, 48 και 72 ώρες, στην περίπτωση επίδρασης με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, παρατηρούμε πως οι τιμές των διπλών σχάσεων του DNA είναι υψηλότερες. Στην περίπτωση επίδρασης με την ακτινοβολία

UVB στα κύτταρα που έχουν προ-επωασθεί με το βιοπολυμερές για 24, 48 και 72 ώρες, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών συνθηκών (αλκαλικές και ουδέτερες), παρατηρούμε υψηλότερες ολικές βλάβες (μονές και διπλές σχάσεις) στο DNA. Να σημειωθεί πως και στις δύο περιπτώσεις, όταν τα κύτταρα επωάζονται με το πολυμερές για τις παραπάνω χρονικές στιγμές και στη συνέχεια πραγματοποιείται η επίδραση με τους παράγοντες οξειδωτικού στρες, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και UVB, φαίνεται πως μειώνεται τις περισσότερες φορές η έκταση των επαγόμενων βλαβών στο DNA, στοιχείο που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω με έλεγχο περισσότερων επαναλήψεων και διαφορετικών συνθηκών και συγκεντρώσεων για το υπό μελέτη βιοπολυμερές για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τη πιθανή αντιμεταλλαξιογόνο δράση του.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για την εκτίμηση της μεταλλαξιογόνου ή αντιμεταλλαξιογόνου δράσης τέτοιων βιο-πολυμερικών ενώσεων. Για παράδειγμα, στην έρευνα των Nantes et al. (2014), αξιολογήθηκε η μεταλλαξιογόνος και αντιμεταλλαξιογόνος δράση ενός θειωμένου πολυσακχαρίτη που απομονώθηκε από το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα κόκκινων φυκιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο πολυσακχαρίτης δεν είναι μεταλλαξιογόνος, αλλά έχει την ιδιότητα να παρεμβαίνει σε διαδικασίες που σχετίζονται με την προσρόφηση ουσιών που είναι τοξικοί για το DNA και με την ενεργοποίηση των συστημάτων επιδιόρθωσης του DNA. Σε μια άλλη μελέτη, διερευνήθηκαν οι γενετοξικές επιδράσεις της φουκοειδίνης, ενός πολυσακχαρίτη που παράγεται από συγκεκριμένα είδη φυκιών με την χρήση των τεχνικών Ames test και μικροπυρήνων και διαπιστώθηκε πως η συγκεκριμένη ένωση δεν παρουσιάζει σημαντικές γενετοξικές ιδιότητες βάσει των συνθηκών στις οποίες ελέγχθηκε (Kui- Jin Kim et al. (2010). Οι Salah et al. (2015), ελέγξαν τη χιτίνη, ένα βιοπολυμερές που χρησιμοποιείται ευρέως, για τις επιδράσεις της σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η χιτίνη και τα παράγωγα της δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και πως η αναστολή είναι δόσοεξαρτώμενη. Στη μελέτη των Soo-Jin Heo et al. (2009), εξετάστηκαν τρία είδη φλοροταννινών από θαλάσσια φύκια και διερευνήθηκε η ανασταλτική δράση τους στην μελανογένεση και η προστατευτική δράση τους έναντι οξειδωτικού στρες που προκαλείται από UVB ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα είδη είχαν ανασταλτική δράση στη σύνθεση μελανίνης και βρέθηκε πως μετά την προσθήκη των ταννινών η ποσότητα ενεργών μορφών οξυγόνου μειώνεται ενδοκυτταρικά.



Λιγότερο εκτεταμένες είναι οι μελέτες για την πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση βιο-επιφανειοδραστικών παραγόντων. Γλυκολίδια και λιπίδια μαννοζυλοερυθριτόλης μικροβιακής προέλευσης βρέθηκε να έχουν σημαντική κυτταροπροστατευτική δράση (Takahashi et. al. 2012), ενώ σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα συνδέθηκε με ένα αποπονωμένο λιποπεπτίδιο (Jemil et. al. 2017, Kiran et. al. 2017). Επιπλέον, υπάρχουν επίσης, περιορισμένες μελέτες που υποδεικνύουν ότι ορισμένοι τέτοιοι βιοεπιφανειοδραστικοί παράγοντες συνδέονται και με αντικαρκινική δράση, μέσω καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγής του αποπτωτικού θανάτου (Zhao et. al. 1999, Takeuchi et. al. 2010).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε το βακτηριακό πολυμερές D, που απομονώθηκε από τη συλλογή βακτηρίων θαλάσσιας προέλευσης του HWU στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Horizon 2020 – MARISURF ως προς τις βιολογικές του δράσεις. Το βιοπολυμερές D δεν παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα (δοκιμασίες ABTS και DPPH) και δεν εμφάνισε σημαντική μεταλλαξιογόνο δράση. Από την άλλη, πιθανώς να σχετίζεται με πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση, καθώς παρουσίασε σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντική αντι-μεταλλαξιογόνο δράση έναντι των γενοτοξικών παραγόντων (ακτινοβολίας UVB ή/και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) σε A375 κύτταρα κάτω από τις συνθήκες που μελετήθηκε. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες χρήζουν απαραίτητες για την ολοκλήρωση του τοξικολογικού προφίλ του συγκεκριμένου βιοπολυμερούς, την ταυτοποίηση της χημικής δομής του και την περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών του δράσεων για την ολοκληρωμένη εκτίμηση της πιθανής αξιοποίησής του.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτέλεσε μέρος του Ευρωπαϊκού προγράμματος MARISURF (Horizon 2020, grant no 635340).



Marisurf

Funded by the European Union Framework Programme for research and innovation, Horizon 2020 under grant agreement No 635340 MARISURF



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Toshikazu Yoshikawa and Yuji Naito, (2002), What Is Oxidative Stress? *JMAJ*, 45(7), 271–276.
- [2] Aristidis S. Veskokoukis, Aristidis M. Tsatsakis and Dimitrios Kouretas, (2012), Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration, *Cell Stress and Chaperones*, 17, 11-21.
- [3] Ashok Agarwal, Sajal Gupta and Rakesh K Sharma, (2005), Role of oxidative stress in female reproduction, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3:28.
- [4] Antonio Ayala, Mario F. Muñoz and Sandro Argüelles, (2014), Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 6:360438.
- [5] Barry Halliwell, (2006), Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life, *Plant Physiology*, 141(2), 312–322.
- [6] David Costantini, (2014), Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology: A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches, Springer.
- [7] Kelvin J. A. Davies, (2008), Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems, *IUBMB Life*, 50, 279–289.
- [8] Banat Ibrahim, Thavasi R. and Jayalakshmi S., (2011), Biosurfactants from marine bacterial isolates, in Current Research, Technology and Education Topics, *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (1367-1373), Spain.
- [9] Ibrahim M. Banat, Andrea Franzetti, Isabella Gandolfi, Giuseppina Bestetti, Maria G. Martinotti, Letizia Fracchia, Thomas J. Smyth, Roger Marchant, (2010), Microbial biosurfactants production, applications and future potential, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427–444.

- [10] Kamaljeet K. Sekhon Randhawa, Pattanathu K. S. M. Rahman, (2014), Rhamnolipid biosurfactants- past, present, and future scenario of global market, *Frontiers in Microbiology*, 5, 454.
- [11] Marcos Roberto de Oliveira, Agnes Magri, Cristiani Baldo, Doumit Camilios-Neto, Tamires Minucelli, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, (2015), Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 6(2), 161-174.
- [12] Raquel D Rufino, Leonie Sarubbo, (2014), Biosurfactants: Classification, Properties and Environmental Applications, in *Biotechnology, Biodegradation and Bioremediation*, 11, STUDIUM PRESS, LLC.
- [13] Eliora Z. Ron, Eugene Rosenberg, (2001), Natural roles of biosurfactants, *Environmental Microbiology*, 3(4), 229-236.
- [14] Karina Salek, Tony Gutierrez, (2016), Surface-active biopolymers from marine bacteria for potential biotechnological applications, *AIMS Microbiology*, 2(2), 92-107.
- [15] Carlos A. Arias, Hans Brix, Cabello A., Johansen N. H., (2003), Removal of indicator bacteria from municipal wastewater in an experimental two-stage vertical flow constructed wetland system, *Water Science & Technology*, 48(5), 35-41.
- [16] Randhir S Makkar, Swaranjit S Cameotra, Ibrahim M Banat, (2011), Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production, *AMB Express*, 1(1), 5.
- [17] Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade BA, (2010), Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127-44.
- [18] Thavasi Renga Thavasi and Ibrahim M Banat, (2014), Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Sources, *Biosurfactants*, 5, 125-146, CRC Press.
- [19] Renga Thavasi Thavasi, Shilpy Sharma, Singaram Jayalakshmi, (2011), Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria, *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, S1:001.

- [20] Carol Mancuso Nichols, Sandrine Garon Lardière, Bowman JP, Nichols PD, AE Gibson J, Guézennec J., (2005), Chemical Characterization of Exopolysaccharides from Antarctic Marine Bacteria, *Microbial Ecology*, 49 (4), 578–589.
- [21] Chibuzo Uzoigwe, J. Grant Burgess, Christopher J. Ennis, Pattanathu K. S. M. Rahman, (2015), Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches, *Frontiers in Microbiology*, 6:245.
- [22] Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN, (2007), Obligate oil-degrading marine bacteria, *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257-266.
- [23] Desai JD, Banat IM, (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.
- [24] Thavasi Renga Thavasi, Ibrahim M Banat, Singaram Jayalakshmi, (2011), Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Bioresource Technology*, 102(2), 772-778.
- [25] Roger Marchant, Ibrahim M. Banat, (2012), Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation, *Trends in Biotechnology*, 30(11), 558-565.
- [26] Palashpriya Das, S. Mukherjee, Ramkrishna Sen, (2009), Antiadhesive action of a marine microbial surfactant, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 71(2), 183-186.
- [27] Dusane DH, Pawar VS, Nancharaiah YV, Venugopalan VP, Kumar AR, Zinjarde SS, (2011), Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27(6), 645-654.
- [28] Alam MN., Bristi NJ., Rafiquzzaman M., (2013), Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152.
- [29] Sagar B. Kedare, R. P. Singh, (2011), Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
- [30] Anna Apostolou, Dimitrios Stagos, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis

- AM, Kouretas D., (2013), Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts, *Food and Chemical Toxicology*, 61, 60-68.
- [31] Pattison DI and Davies MJ, (2006), Actions of ultraviolet light on cellular structures, *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, (96), 131-157.
- [32] Yu Jae Hyun, Mei Jing Piao, Mi Hee Ko, (2013), Photoprotective effect of *Undaria crenata* against ultraviolet B-induced damage to keratinocytes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 256-264.
- [33] von Thaler AK, Kamenisch Y, Berneburg M., (2010), The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis, *Experimental Dermatology*, 19(2), 81-88.
- [34] Yin Y, Li W, Son YO, Sun L, Lu J, Kim D, Wang X, Yao H, Wang L, Pratheeshkumar P, Hitron AJ, Luo J, Gao N, Shi X, Zhang Z., (2013), Quercitrin protects skin from UVB induced oxidative damage, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(2), 89-99.
- [35] Ikehata H., Ono T., (2011), The mechanisms of UV mutagenesis, *Journal of Radiation Research*, 52(2), 115-125.
- [36] Baier J, Maisch T, Maier M, Landthaler M, Bäuml W., (2007), Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin, *Journal of Investigative Dermatology*, 127(6), 1498-1506.
- [37] Marchitti SA, Chen Y, Thompson DC, Vasiliou V., (2011), Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes, *Eye Contact Lens.*, 37(4), 206-13.
- [38] Charlotte Young, (2009), Solar ultraviolet radiation and skin cancer, *Occupational Medicine*, 59(2), 82-88.
- [39] Sophie J. Balk, (2011), Ultraviolet Radiation: A Hazard to Children and Adolescents, *Pediatrics*, 127(3).
- [40] Lee C., Park GH, Ahn EM, Park CI, Jang JH., (2013), *Sargassum fulvellum* Protects HaCaT Cells and BALB/c Mice from UVB Induced Proinflammatory Responses, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

- [41] Jean Krutmann, Akimichi Morita, Jin Ho Chung, (2012), Sun Exposure: What Molecular Photodermatology Tells Us About Its Good and Bad Sides, *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 976–984.
- [42] Svobodová AR., Galandáková A, Sianská J, Doležal D, Ulrichová J, Vostálová J., (2011), Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress related biomarker in skin, liver and blood of hairless mice, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(4), 471-479.
- [43] Wu D, Cederbaum AI., (2003), Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Res Health*, 27(4), 277-284.
- [44] Alfadda AA, Sallam RM., (2012), Reactive oxygen species in health and disease, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012:936486.
- [45] Bickers DR, Athar M., (2006), Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), 2565-2575.
- [46] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, (2012), Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- [47] Carin Thomas, Melissa M. Mackey, Amy A. Diaz, David P. Cox, (2009), Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation, *Redox Report*, 14(3), 102-108.
- [48] M.L. Kalmokoff, J.W. Austin, X.-D. Wan, G. Sanders, S. Banerjee, J.M. Farber, (2001), Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions, *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 725-734.
- [49] S. Vijayakumar, V.Saravanan, (2015), Biosurfactants-Types, Sources and Applications, *Research Journal of Microbiology*, 10(5), 181-192.
- [50] Stephen S.Leonard, Gabriel K.Harris, Xianglin Shi, (2004), Metal-induced oxidative stress and signal transduction, *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1921-1942.
- [51] Jin N, Hatton ND, Harrington MA, Xia X, Larsen SA, Rhoades RH, (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced egr-1, fra-1, and c-jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 29(8), 736-746.

- [52] Barbouti A., Doulias PT, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D, (2002), DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 691-702.
- [53] C.D.Cunha, M.do Rosário, A.S.Rosado, S.G.F.Leite, (2004), *Serratia* sp. SVGG16: A promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline, *Process Biochemistry*, 39(12), 2277-2282.
- [54] Nitschke, M., S.G.V.A.O.Costa, (2007), Biosurfactants in food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259.
- [55] Makkar RS, Rockne KJ, (2003), Comparison of Synthetic Surfactants And Biosurfactants In Enhancing Biodegradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10), 2280-2292.
- [56] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, (1995), Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Journal of Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [57] Sagar B. Kedare, R. P. Singh, (2011), Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- [58] Peggy L Olive & Judit P Banáth, (2006), The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, *Nature Protocols*, 1(1), 23-29.
- [59] Letizia Fracchia, Massimo Cavallo, Maria Giovanna Martinotti, Ibrahim M. Banat, Biomedical Science, Engineering and Technology, (2012), Biosurfactants and Bioemulsifiers, Biomedical and Related Applications - Present Status and Future Potentials.
- [60] Satoshi Takamatsu, Tyler W. Hodges, Ira Rajbhandari, William H. Gerwick, Mark T. Hamann, Dale G. Nagle, (2003), Marine Natural Products as Novel Antioxidant Prototypes, *Journal of Natural Products*, 66(5), 605-608.
- [61] Hanan M. Khairy, Mohamed A.El-Sheikh, (2015), Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 623-630.
- [62] A.M.O'Sullivan, Y.C.O'Callaghan, M.N.O'Grady, B. Queguineur, D.Hanniffy, D.J.Troy, J.P. Kerry, N.M.O'Brien, (2011), In vitro and cellular



- antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland, *Food Chemistry*, 126(3), 1064-1070.
- [63] Dai-Hung Ngo, Se-Kwon Kim, (2013), Marine Bioactive Peptides as Potential Antioxidants, *Current Protein and Peptide Science*, 14, 189-198.
- [64] Wael A. Al-Zereini, (2014), Bioactive Crude Extracts from Four Bacterial Isolates of Marine Sediments from Red Sea, Gulf of Aqaba, *Jordan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 133-137.
- [65] Shuhong Ye, Feng Liu, Jihui Wang, HanWang, Meiping Zhang, (2012), Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas PF-6*, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 764-770.
- [66] Ratana Chaiklahan, Nattayaporn Chirasuwan, Panya Triratana, Veara Loha, Suvit Tia, Boosya Bunnag, (2013), Polysaccharide extraction from *Spirulina sp.* and its antioxidant capacity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 73-78.
- [67] E. V. Sokolova, A. O. Barabanova, V. A. Homenko, T. F. Solov'eva, R. N. Bogdanovich, I. M. Yermak, (2011), In Vitro and Ex Vivo Studies of Antioxidant Activity of Carrageenans, Sulfated Polysaccharides from Red Algae, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 150(4), 426-428.
- [68] Nantes CI, Pesarini JR, Mauro MO, Monreal AC, Ramires AD, Oliveira RJ, (2014), Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of carrageenan fiber in cultured meristematic cells of *Allium cepa*, *Genetic and Molecular Research*, 13(4), 9523-9532.
- [69] Kui-Jin Kim, Ok-Hwan Lee, Boo-Yong Lee, (2010), Genotoxicity studies on fucoidan from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*, *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1101-1104.
- [70] R. Salah, M. Bouhenna, R. Bakour, N. Drouiche, N. Abdi, H. Grib, H. Lounici, N. Mameri, (2015), Effects of chitin and its derivatives on human cancer cells lines, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20).
- [71] Heo SJ, Ko SC, Cha SH, Kang DH, Park HS, Choi YU, Kim D, Jung WK, Jeon YJ., (2009), Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation, *Toxicology in vitro*, 23(6), 1123-1130.

- [72] Morris ID., Ilott S., Dixon L., Brison DR., (2002), The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development, *Human Reproduction*, 17(4), 990-998.
- [73] P. L. Olive, (1999), DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology, *International Journal of Radiation Biology*, 75(4), 395-405.
- [74] D. Anderson, T.-W. Yu, B.J. Phillips, P. Schmezer, (1994), The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay, *Mutation Research* 307, 261-271.
- [75] Susanne Brendler-Schwaab, Andreas Hartmann, Stefan Pfuhler, Günter Speit, (2005), The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, 20(4), 245–254.
- [76] Richard F. Lee, Scott Steinert, (2003), Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1), 43-64.
- [77] Soo-Jin Heo, Seok-Chun Ko, Seon-Heui Cha, Do-Hyung Kang, Heung-Sik Park, Young-Ung Choi, Daekyung Kim, Won-Kyo Jung, You-Jin Jeon, (2009), Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation, *Toxicology in vitro*, 23(6), 1123-1130.
- [78] Takahashi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D., (2012), Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, Show Antioxidant and Protective Effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Cultured Human Skin Fibroblasts, *Journal of Oleo Science*, 61(8), 457–464.
- [79] Jemil, N., Ben Ayed, H., Manresa, A., Nasri, M., & Hmidet, N., (2017), Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1, *BMC Microbiology*, 17(1).
- [80] Kiran G. S., Priyadharsini S., Sajayan A., Priyadharsini G. B., Poullose N., Selvin J., (2017), Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine

*Nesterenkonia sp.* and Its Application in Food Industry, *Frontiers in Microbiology*, 8.

- [81] Zhao X, Wakamatsu Y, Shibahara M, Nomura N, Geltinger C, Nakahara T, Murata T, Yokoyama KK, (1999), Mannosylerythritol Lipid Is a Potent Inducer of Apoptosis and Differentiation of Mouse Melanoma Cells in Culture, *Cancer Research*, 59(2), 482.
- [82] Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, Kimura S, Nakagawa Y, Tanaka R, Yao H, Nagao R, Hayashi Y, Hirai H, Maekawa T, (2010), Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Cancer Science*, 102(3), 591–596.
- [83] Panayiotidis M., Galaris D., Tsolas O., (1999), Glucose oxidase-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces Ca<sup>2+</sup>-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes, *Free Radic Biol Med.*, 26(5-6), 548-56.