

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση φυτικών πολυφαινολών και εκχυλισμάτων των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου *Μανδηλαριά Σαντορίνης* και *Ασσύρτικο Σαντορίνης* στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξίγνεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102

ΚΑΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση φυτικών πολυφαινολών και εκχυλισμάτων των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου *Μανδηλαριά Σαντορίνης* και *Ασσύρτικο Σαντορίνης* στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102

ΚΑΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004



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

Αριθ. Εισ.: 4300/1

Ημερ. Εισ.: 24-02-2005

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΚΑΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087995

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ – ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ – ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ – ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και τη βοήθεια σε όποιες δυσκολίες συνάντησα.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Στάγκο Δημήτριο για την καθοδήγηση και τη βοήθεια κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γούναρη Ηλία και τον κ. Πανουτσιόπουλο Γιώργο για τη συμπαράσταση, το ενδιαφέρον και την καθοδήγησή τους σε όλο το διάστημα της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τη συμφοιτήτρια μου Θεοφανίδου Δήμητρα για την άψογη και ευχάριστη συνεργασία μας, αλλά και την ηθική υποστήριξη και συμπαράσταση κατά τη διάρκεια αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες	8
Περίληψη	9
1. Εισαγωγή	10
1.1. Γενικά	10
1.2. Χημική σύσταση του κρασιού	10
1.3. Χημική δομή των φυτικών πολυφαινολών	11
1.3.1 Φλαβονοειδή	11
1.3.2. Μη Φλαβονοειδή	11
1.4. Βιοσύνθεση πολυφαινολών	14
1.5. Μεταβολισμός πολυφαινολών	16
1.6. Βιολογική δράση πολυφαινολών	16
1.6.1. Αντιοξειδωτική δράση	17
1.6.2. Προ-οξειδωτική - Μεταλλαξιγόνος δράση	18
1.6.3. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση	20
1.7. Επικατεχίνη	20
1.8. Ρεσβερατρόλη	20
1.9. Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	22
1.10. Γαλλικό οξύ	22
1.11. Υπεροξειδίο του υδρογόνου	25
1.12. Σκοπός του πειράματος	26
2. Υλικά και μέθοδοι	27
2.1. Υλικά	27
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	27
2.1.2. Στελέχη <i>Salmonella</i>	27
2.1.3. Εκχυλίσματα	27
2.2. Μέθοδοι	28
2.2.1. Γενικά	28
2.2.2. Πειραματική διαδικασία	29
3. Αποτελέσματα	33
3.1. Επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	33
3.2. Επίδραση των διαλυτών στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	33
3.3. Επίδραση των υπό εξέταση ουσιών στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	33
4. Συζήτηση	57
4.1. Συμπεράσματα	59
5. Βιβλιογραφία	61

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Μορφή βενζοϊκού δακτυλίου	11
Εικόνα 1.2. Χημική δομή φλαβονοειδών και υδροξυκινναμικών οξέων	12
Εικόνα 1.3. Χημική δομή της οικογένειας των φλαβονοειδών	13
Εικόνα 1.4. Βιοσύνθεση των πολυφαινολών	14
Εικόνα 1.5. Βιοσύνθεση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης	15
Εικόνα 1.6. Μια πολυφαινόλη, ανάλογα τη μορφή της, μπορεί να έχει αντιοξειδωτική ή προ-οξειδωτική δράση	19
Εικόνα 1.7. Μοριακοί μηχανισμοί της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών	19
Εικόνα 1.8. Μηχανισμοί της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολών σε συγκεκριμένα όργανα	21
Εικόνα 1.9. Χημική δομή της <i>trans</i> - και <i>cis</i> -ρεσβερατρόλης, της επικατεχίνης, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και του γαλλικού οξέος	23
Εικόνα 1.10. Πιθανός μηχανισμός της προ-οξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος παρουσία μετάλλων (Fe^{3+} ή Cu^{2+})	24
Εικόνα 3.1. Μεταλλαξιγένεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	34
Εικόνα 3.2. Επίδραση του DMSO στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	35
Εικόνα 3.3. Επίδραση της μεθανόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	36
Εικόνα 3.4. Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	37
Εικόνα 3.5. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	38
Εικόνα 3.6. Επίδραση της επικατεχίνης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	39
Εικόνα 3.7. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της επικατεχίνης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	40
Εικόνα 3.8. Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	41
Εικόνα 3.9. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	42
Εικόνα 3.10. Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	43
Εικόνα 3.11. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	44
Εικόνα 3.12. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	45
Εικόνα 3.13. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	46

Εικόνα 3.14. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	47
Εικόνα 3.15. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	48
Εικόνα 3.16. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	49
Εικόνα 3.17. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	50
Εικόνα 3.18. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	51
Εικόνα 3.19. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	52
Εικόνα 3.20. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	53
Εικόνα 3.21. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	54
Εικόνα 3.22. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	55
Εικόνα 3.23. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	56

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Οι ομάδες των φλαβονοειδών και οι κύριες διατροφικές πηγές τους	12
Πίνακας 2.1. Κατανομή t	32
Πίνακας 3.1. Επίδραση του DMSO στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	35
Πίνακας 3.2. Επίδραση της μεθανόλης στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	36
Πίνακας 3.3. Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	37
Πίνακας 3.4. Επίδραση της επικατεχίνης στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	39
Πίνακας 3.5. Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	41
Πίνακας 3.6. Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	43
Πίνακας 3.7. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	45
Πίνακας 3.8. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	47
Πίνακας 3.9. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	49
Πίνακας 3.10. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	51
Πίνακας 3.11. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	53
Πίνακας 3.12. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	55
Πίνακας 4.1. Σύσταση σε πολυφαινόλες του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα	60
Πίνακας 4.2. Σύσταση σε πολυφαινόλες του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα	60

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CAT: καταλάσες
COX: κυκλοοξυγενάση
DMSO: διμέθυλο-σουλφοξείδιο
Gpx: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
iNOS: συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
LCAT: λεκιθίνο-χοληστερόλο-ακυλοτρανσφεράση
LDL: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
LOX: λιποοξυγενάση
NMU: N-νιτροσο μεθυλουρία
PIP3: κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης
PKC: πρωτεϊνική κινάση C
PTK: κινάση τυροσίνης
ROS: δραστικές μορφές οξυγόνου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα σταφύλια περιέχουν ορισμένες πολυφαινόλες, οι οποίες πιστεύεται ότι δρουν χημειοπροστατευτικά έναντι της εκδήλωσης διαφόρων ασθενειών, όπως σε καρδιαγγειακές παθήσεις και σε διάφορες μορφές καρκίνου, λόγω των ανιμεταλαξιγόνων, αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονώδων και οιστρογονικών ιδιοτήτων τους. Στην παρούσα μελέτη έγινε μία προσπάθεια ανεύρεσης των πιθανών μηχανισμών της χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων σταφυλιών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση τεσσάρων φυτικών πολυφαινολών (επικατεχίνη, ρεσβερατρόλη, γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ), υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου *Μανδηλαριά Σαντορίνης* (κόκκινα σταφύλια) και *Ασσύρτικο Σαντορίνης* (άσπρα σταφύλια) και μεθανολικών κλασμάτων από τα εκχυλίσματα της ποικιλίας *Μανδηλαριά*, στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξίγνεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα ανέστειλαν τη μεταλλαξιγόνο δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, πιθανώς μέσω της δέσμευσης σιδήρου ή της δέσμευσης και απομάκρυνσης ενεργών ριζών $\text{OH}\cdot$, παρουσίασαν δηλαδή αντιοξειδωτική δράση, η οποία μπορεί να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους εκδηλώνονται οι χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινολών. Αντίθετα, η ρεσβερατρόλη, τα υδατικά εκχυλίσματα και τα κλάσματα εκδήλωσαν προ-οξειδωτική δράση, η οποία μπορεί να εξηγήσει την επαγόμενη από πολυφαινόλες απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Τα σταφύλια, φρούτα της οικογένειας Vitaceae, καταναλώνονται από τα αρχαία χρόνια και καλλιεργούνται σχεδόν σε όλο τον κόσμο, αλλά κυρίως στην Ευρώπη, στην Αυστραλία, στη Ν. Αφρική, στη Ν. Αμερική και στην Καλιφόρνια. Τα είδη *Vitis vinifera* (ευρωπαϊκό), *Vitis labruscana* και *Vitis rotundifolia* (μοσχάτο) είναι τα πιο δημοφιλή και προτιμώνται για την παραγωγή κρασιού (Mazza, 1995), το οποίο φαίνεται ότι εκτός της γευστικής ικανοποίησης, παρέχει πρόσθετα οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό.

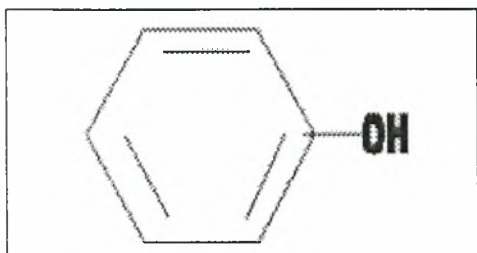
Το 1979, επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στη μείωση των θανάτων από καρδιακές παθήσεις και στην κατανάλωση κρασιού (Leger et al, 1979). Το 1992, το ενδιαφέρον κέρδισε το λεγόμενο «Γαλλικό Παράδοξο», σύμφωνα με το οποίο στη Γαλλία τα ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο ήταν χαμηλότερα από ότι σε άλλες βιομηχανικές χώρες, αν και η κατανάλωση κορεσμένων λιπών κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα. Ύστερα από διεξοδικές μελέτες βρέθηκε ότι αιτία του φαινομένου στη Γαλλία ήταν η υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού (Renaud & Lorgeril, 1992). Αργότερα,δείχθηκε ότι αυτή η καρδιοπροστατευτική δράση του κρασιού οφείλεται στις περιεχόμενες φαινόλες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τις αντιδράσεις βιολογικής οξειδωσης, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη σύνθεση των εικοσανοειδών (Soleas et al, 1997).

1.2. Χημική σύσταση του κρασιού

Αν και έχουν αναγνωρισθεί περισσότερες από 500 ουσίες στο κρασί, μέρος της σύστασής του παραμένει ανεξιχνίαστο. Οι αρωματικές ουσίες που παράγονται από τα σταφύλια αποτελούν την μειοψηφία (συνολικά 0,8-1,2 gr/L) και συνεισφέρουν στο άρωμα και την αισθητική του κρασιού. Η γεύση του κρασιού εξαρτάται από τα προϊόντα της ζύμωσης όπως το νερό, η αιθανόλη, τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη, που η συγκέντρωσή τους ανέρχεται πάνω από 100 mg/L (Soleas et al, 1997).

Σημαντικό συστατικό του κρασιού είναι οι πολυφαινόλες, οι οποίες είναι σημαντικές για την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του κρασιού, καθώς επηρεάζουν το χρώμα, το άρωμα, τη γεύση, την ωρίμανση και τις αντιμικροβιακές ιδιότητές του. Πηγή τους είναι ο μίσχος της αμπέλου, η φλούδα και οι σπόροι των σταφυλιών, γι' αυτό και το κόκκινο κρασί έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα πολυφαινολών από ότι το λευκό, κατά την παρασκευή του οποίου τα στερεά κατάλοιπα απομακρύνονται και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή φαρμάκων και καλλυντικών (van de Wiel et al, 2001. Alonso et al, 2002).

1.3. Χημική δομή των φυτικών πολυφαινολών



Εικόνα 1.1. Μορφή βενζοϊκού δακτυλίου

Οι πολυφαινόλες αποτελούνται από έναν ή περισσότερους βενζοϊκούς δακτυλίους, στους οποίους φέρουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες (εικ.1.1). Πρόκειται για ουσίες με πολυλειτουργικό χαρακτήρα, που διαμορφώνεται ανάλογα με τη δομή το βαθμό ακυλίωσης και/ή γλυκοσυλίωσης,

τη σύνδεση με άλλες πολυφαινόλες και το βαθμό πολυμερισμού τους. Πολλές έχουν αντιμεταλλαξιγόνες, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις ή οιστρογονικές ιδιότητες, που πιθανόν είναι σημαντικές για την πρόληψη ασθενειών, ενώ κάποιες άλλες έχουν μεταλλαξιγόνο και προ-οξειδωτική δράση (Ferguson, 2001). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στα φλαβονοειδή και στα μη φλαβονοειδή.

1.3.1. Φλαβονοειδή

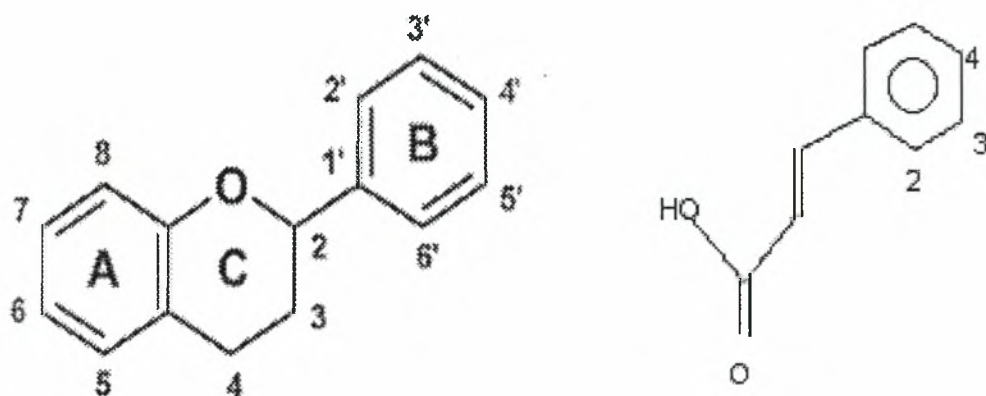
Τα φλαβονοειδή είναι η πιο καλά μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και ίσως και η πιο σημαντική. Η βασική δομή τους είναι αυτή του φαινυλβενζοπυρενίου ($C_6-C_3-C_6$) (εικ.1.2). Διακρίνονται σε φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβονόνες, διυδροφλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες και χαλκόνες (εικ.1.3 και πιν.1.1) (Cook & Samman, 1996). Παράγονται στη φλούδα και στους σπόρους των φρούτων και βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε συνδεδεμένα με σάκχαρα ή άλλες πολυφαινόλες. Στο κόκκινο κρασί αποτελούν το >85% των πολυφαινολών (>1000 mg/L), ενώ στο λευκό <20% (<50 mg/L) (Soleas et al, 1997).

Τα φλαβονοειδή συναντώνται ως μονομερή, διμερή ή ολιγομερή. Παράδειγμα μονομερών αποτελούν οι ανθοκυανίνες, των οποίων το μοριακό βάρος είναι οχταπλάσιο από αυτό των φλαβονών. Οι πολυμερείς ενώσεις των φλαβονοειδών ονομάζονται ταννίνες και διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (προανθοκυανιδίνες) και σε ικανές να υδρολυθούν (Cook & Samman, 1996).

1.3.2. Μη Φλαβονοειδή

Στα μη φλαβονοειδή ανήκουν τα φαινολικά (ή υδροξυβενζοϊκά) οξέα, όπως το γαλλικό και τα υδροξυκιναμικά οξέα, όπως το φερουλικό, το κουμαρικό κ.α. (εικ.1.2). Η γενική δομή τους είναι ο C_6-C_1 και C_6-C_3 βενζοϊκός δακτύλιος αντίστοιχα. Παράγονται στα κύτταρα των σταφυλιών, συνήθως ως εστέρες σακχάρων, οργανικών οξέων και αλκοολών (Soleas et al, 1997). Η συγκέντρωσή τους στο κόκκινο κρασί είναι >95 mg/L και >10 mg/L αντίστοιχα και στο λευκό 7 mg/L και <1 mg/L (Frankel et al, 1995).

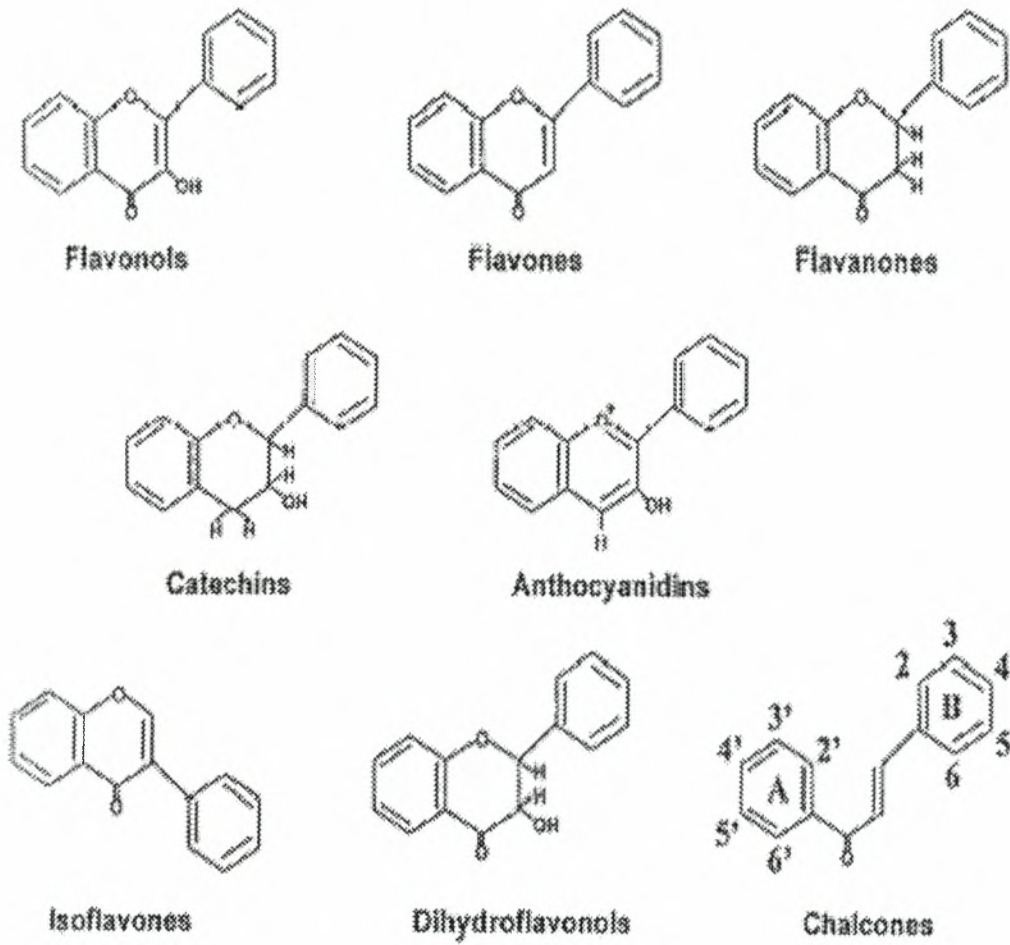
Στα μη φλαβονοειδή κατατάσσονται και τα στυλβένια, τα οποία φέρουν δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με μία μεθυλική γέφυρα. Περιλαμβάνουν μία σειρά ουσιών που διαφέρουν στον αριθμό και στη θέση των υδροξυλομάδων, που μπορεί είτε να υποκαθίστανται με σάκχαρα, μεθύλια και μεθοξύλια είτε να σχηματίζουν διμερή, τριμερή ή μεγαλύτερα πολυμερή (Soleas et al, 1997). Το πιο μελετημένο στυλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη.



Εικόνα 1.2: Χημική δομή φλαβονοειδών (αριστερά) και υδροξυκινναμικών οξέων (δεξιά) (Yilmaz & Toledo, 2004).

Πίνακας 2.1. Οι ομάδες των φλαβονοειδών και οι κύριες διατροφικές πηγές τους (Ren et al, 2003).

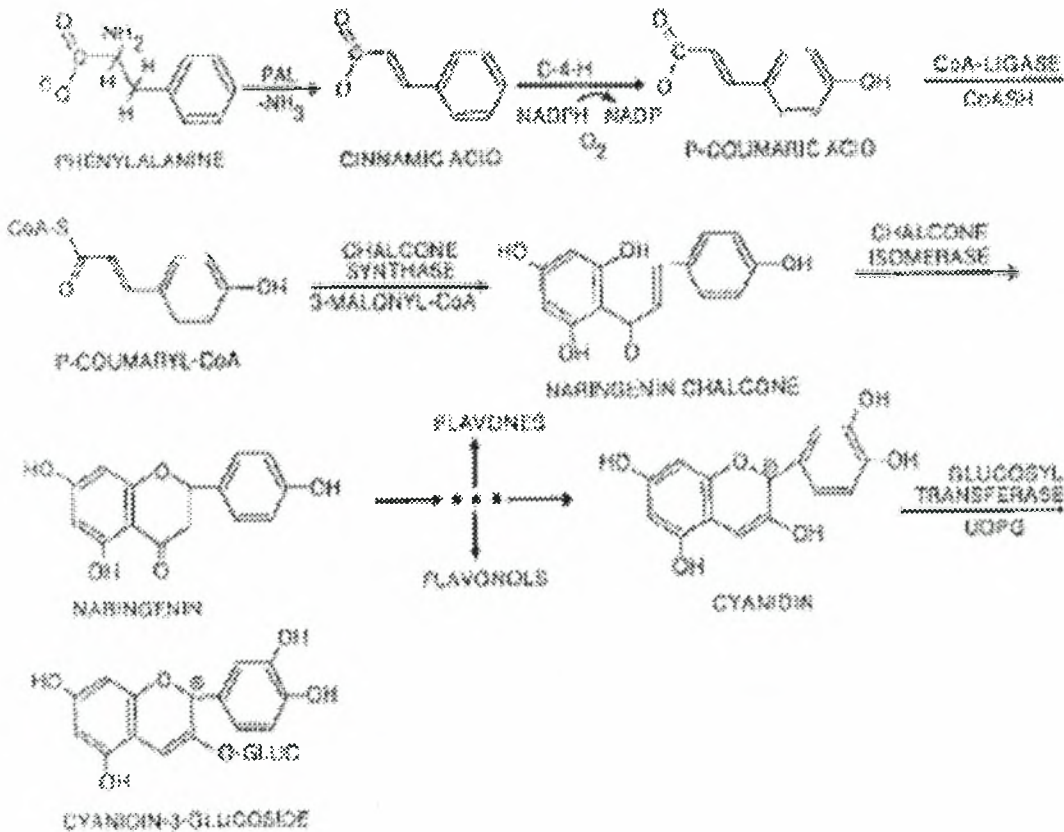
Ομάδα	Μέλη ομάδας	Κύριες διατροφικές πηγές
Φλαβόνες	Απιγενίνη, λουτεολίνη, χρυσίνη	Μαϊντανός, θυμάρι
Ισοφλαβόνες	Γλυκιτεΐνη, γενιστεΐνη	Σόγια
Φλαβονόλες	Κερκετίνη, ρουτίνη, μυρικετίνη, καμπερόλη	Κρεμμύδια, κόκκινο κρασί, τσάι, κεράσια, μήλα, ντομάτες
Φλαβανόλες	Κατεχίνη, επικατεχίνη	Μήλα, τσάι, σταφύλια
Φλαβονόνες	Εσπεριδίνη, ναριγκενίνη	Πορτοκάλια, γκρεϊπφρούιτ
Φλαβανονόλες	Ταξιφολίνη	Λεμόνια



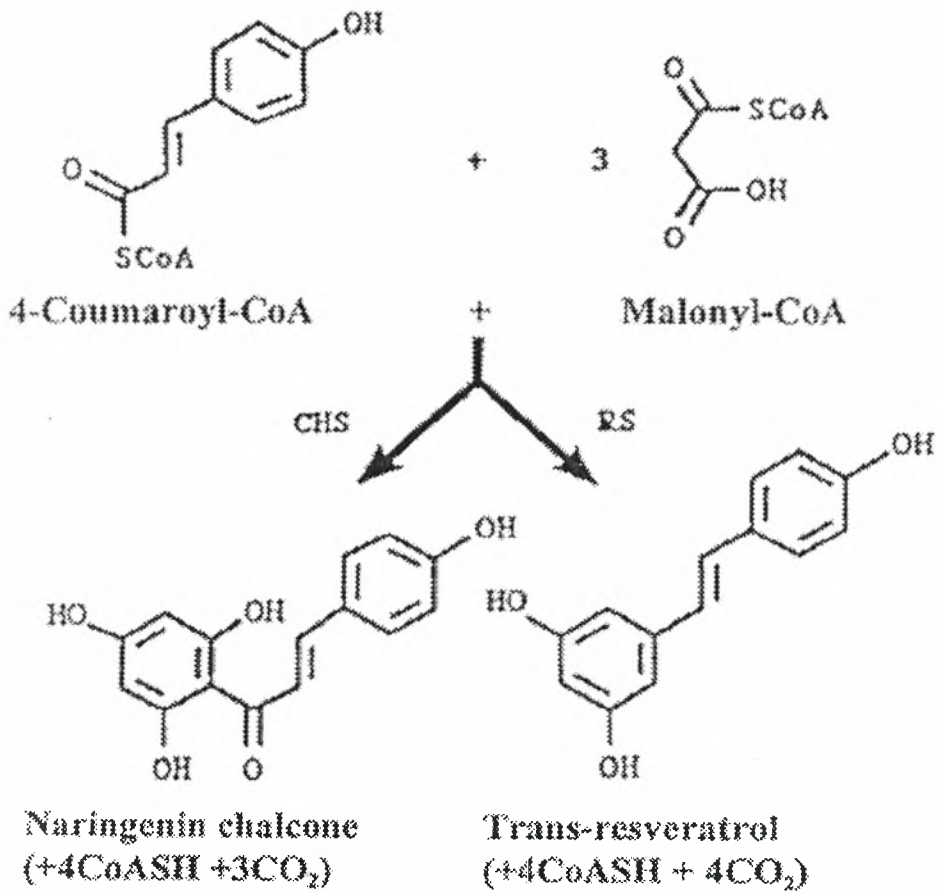
Εικόνα 1.3. Χημική δομή της οικογένειας των φλαβονοειδών (Cook & Samman, 1996).

1.4. Βιοσύνθεση πολυφαινολών

Αφετηρία της σύνθεσης των πολυφαινολών είναι η φαινυλαλανίνη, από την οποία, παρουσία της λυάσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας προκύπτει το κινναμικό οξύ (εικ. 1.4). Το κινναμικό οξύ (πηγή των υδροξυκινναμικών οξέων), μέσω μιας υδροξυλάσης μετατρέπεται σε *p*-κουμμαρικό οξύ και αυτό σε *p*-κουμαρυλ-CoA (μέσω του ενζύμου 4-κουμαράση:CoA-λιγάση). Το μόριο αυτό, παρουσία συνθάσης της χαλκόνης, συμπυκνώνεται με τρία μόρια μαλονυλ-CoA, ώστε να σχηματιστεί μία χαλκόνη από την οποία θα προκύψουν οι φλαβόνες, φλαβονόλες και ανθοκυανιδίνες. Από την συμπύκνωση του *p*-κουμαρυλ-CoA με τρία μόρια μαλονυλ-CoA παράγεται και η *trans*-ρεσβερατρόλη (εικ. 1.5.) (Soleas *et al*, 1997).



Εικόνα 1.4. Βιοσύνθεση των πολυφαινολών (Soleas *et al*, 1997).



Εικόνα 1.5. Βιοσύνθεση της *trans*-ρεσβερατρόλης (Soleas *et al*, 1997).

1.5. Μεταβολισμός πολυφαινολών

Οι περισσότερες πολυφαινόλες υπάρχουν στα τρόφιμα πολυμερισμένες ή γλυκοσυλιωμένες. Η πιο συνηθισμένη μονάδα γλυκοσυλίωσης είναι η γλυκόζη, αλλά συναντώνται και η γαλακτόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη. Ο δεσμός, που συνδέει την πολυφαινόλη με το σάκχαρο είναι ανθεκτικός στα παγκρεατικά ένζυμα του στομάχου, αλλά υδρολύεται στο λεπτό έντερο από τις β-ενδογλυκοσιδάσες. Αντίστοιχα, οι πολυμερισμένες πολυφαινόλες, πριν απορροφηθούν, διασπώνται στο στομάχι σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους (*Heim et al, 2002*).

Μετά την απορρόφησή τους οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται από τα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών φάσης II, με αποτέλεσμα τη σύνδεσή τους με γλυκουρονικό,θειικές και μεθυλικές ομάδες στο ήπαρ και στο λεπτό έντερο. Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται φτάνουν στο παχύ έντερο, όπου ένζυμα της εντερικής χλωρίδας τις διασπούν σε απλούστερα φαινολικά οξέα, τα οποία απορροφώνται και μεταβολίζονται στο ήπαρ (*Spencer et al, 2004. Kroon et al, 2004*).

Καθώς φαίνεται, λόγω του μεταβολισμού τους οι πολυφαινόλες φτάνουν στο πλάσμα υποκατεστημένες. Εδώ γεννάται το ερώτημα κατά πόσο οι πολυφαινόλες διατηρούν τις βιολογικές τους ιδιότητες μετά την υποκατάσταση. Η απάντηση μάλλον είναι περίπλοκη, αφού άλλες έρευνες δίνουν θετική και άλλες αρνητική απάντηση.

1.6. Βιολογική δράση πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες έχουν ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων. Πολλές έχουν αντιμεταλλαξιγόνες, αντιοξειδωτικές ή αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ κάποιες άλλες έχουν μεταλλαξιγόνο και προ-οξειδωτική δράση. Οι περισσότερες πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην αναστολή ή την αναστροφή της καρκινογένεσης (*Gerhäuser et al, 2003; Smith et al, 2001*), καθώς είναι σε θέση να επηρεάσουν όλα τα στάδια της χημικής καρκινογένεσης (*Caterall et al, 2000*).

1. *Στάδιο έναρξης:* Αναστολή ενεργοποίησης των χημικών καρκινογόνων και μετατροπή τους σε ανενεργά παράγωγα, είτε τροποποιώντας τα ενδιάμεσα προϊόντα είτε επάγοντας τη σύνδεσή τους με ουσίες αποτοξίνωσης, όπως η γλουταθειόνη.
2. *Στάδιο προαγωγής:* Αναστολή των κυκλοοξυγενασών (COX) και των λιποοξυγενασών (LOX), οι οποίες επάγουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, που θεωρούνται σημαντικές στην εξέλιξη αυτού του σταδίου. Αναστολή ενζύμων, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η κινάση τυροσίνης (PTK) και η κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης (PIP₃), που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος και επάγουν τον πολλαπλασιασμό (*Ren et al, 2003*).
3. *Στάδιο προόδου:* Αναστολή της ανάπτυξης και της μετάστασης του όγκου, μέσω επαγωγής της απόπτωσης ή πρόκλησης τοξικότητας στα μιτοχόνδρια (επαγωγή μιτοχονδριακής απόπτωσης) (*Galati και O' Brien, 2004*). Ο μηχανισμός φαίνεται να είναι πολύπλοκος και να περιλαμβάνει την έκκριση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3, την αναστολή των DNA τοποϊσομερασών I/II (*Wang et al, 1999*), τη μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου (*Lee et al, 2002*) και τη ρύθμιση της έκφρασης των heat shock πρωτεϊνών (*Rong et al, 2000*).

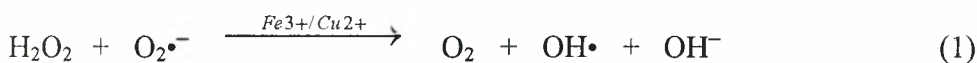
Οι ισοφλαβόνες και τα στυλβένια έχουν προταθεί ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες για καρκίνους που σχετίζονται με ορμόνες, όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη (*Aziz et al, 2003*). Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να

συνδέονται με τον οιστρογονικό υποδοχέα (*Galati και O' Brien, 2004*). Για παράδειγμα, η ρεσβερατρόλη δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα (*Gehm et al, 2004*).

1.6.1. Αντιοξειδωτική δράση

Ο όρος αντιοξειδωτικά αναφέρεται στις ουσίες που έχουν την ικανότητα να μειώνουν το σχηματισμό και τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), δηλαδή των ριζών που φέρουν ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο, όπως το υδροξύλιο (OH•) και το σουπεροξειδίο (O₂•⁻), και των παραγώγων του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και το υποχλωριώδες (HOCl). Οι ρίζες αυτές μπορεί να σχηματίζονται *in vivo* είτε από την επίδραση εξωγενών παραγόντων π.χ. από την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία που οδηγεί στη διάσπαση του νερού σε OH• και H•, είτε από αντιδράσεις του μεταβολισμού, κυρίως από αυτές που γίνονται στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι απαραίτητες στον οργανισμό, επειδή συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος και παράγονται από τα φαγοκύτταρα για την καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών (*Halliwell, 2001*). Όμως, οι μορφές αυτές οξυγόνου μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιολογικά μακρομόρια, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, προκαλώντας τους βλάβες. Έτσι, μία ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή και στην απομάκρυνση τους οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, το οποίο πιστεύεται ότι είναι αιτιολογικός παράγοντας για διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως σε ορισμένες μορφές καρκίνου, στην αθηροσκλήρωση, στη γήρανση και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Alzheimer και Parkinson) (*Alonso et al, 2002. Cavalcante et al, 2003*).

Ο μηχανισμός σχηματισμού των ελευθέρων ριζών μπορεί να είναι ενζυμικός, όπως με τη μεσολάβηση οξειδασών και ρεδοκτασών ή μη ενζυμικός με τη διεξαγωγή της αντίδρασης Haber-Weiss (1) και της αντίδρασης Fenton (2) παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων (π.χ. Fe²⁺, Cu⁺) (*Lopes et al, 1999*).



Οι πολυφαινόλες μπορούν να μεσολαθήσουν και στους δύο μηχανισμούς, αναστέλλοντας το ένζυμο και δεσμεύοντας τα ιόντα των μετάλλων αντίστοιχα (*van Acker et al, 1996*). Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων μπορεί να οφείλεται στην επαγωγή των μεταβολικών ενζύμων φάσης II, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης, που ενεργοποιεί την απέκκριση των οξειδωμένων ουσιών.

Σημαντικό στοιχείο της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων είναι η δέσμευση και η απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών, που επιτυγχάνεται είτε με τη σύνδεση τους είτε με την παραχώρηση ενός ατόμου υδρογόνου, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (*Ferguson, 2001*):



Όπου: RO• η ελεύθερη ρίζα

PPH η πολυφαινόλη

ROH το σταθερό προϊόν της ρίζας

PP• η πολυφαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που προκύπτει είναι σχετικά σταθερή και μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες, σχηματίζοντας σταθερά προϊόντα:



Όπου: ROPP το σταθερό προϊόν της αντίδρασης

Η αποτελεσματικότητα των πολυφαινόλων έναντι των ελευθέρων ριζών οξυγόνου εξαρτάται σημαντικά από τη δομή τους. Ειδικότερα, για τα φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι η ύπαρξη κατεχολικής (3'-4'-OH) ή πυρογαλλολικής (3'-4'-5'-OH) ομάδας στο δακτύλιο B διευκολύνει τη μετακίνηση ηλεκτρονίων και ταυτόχρονα συντελεί στο σχηματισμό σταθερών ριζικών παραγώγων. Ακόμη, ο συνδυασμός 2,3-διπλού δεσμού με την 4-όξο θέση στο C δακτύλιο βοηθά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το δακτύλιο B, πρόσθετη παρουσία 3- και 5-OH ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση (Middleton και Kandaswami, 1992. van Acker et al, 1996).

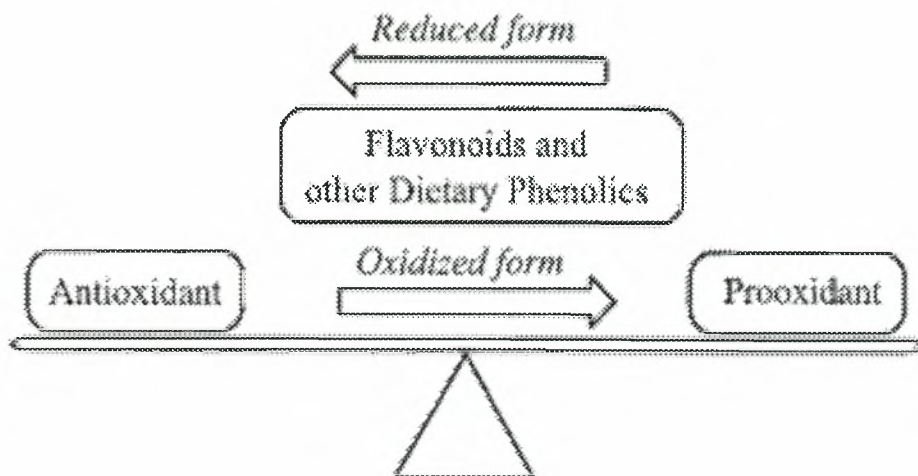
Σε αντίθεση με τα παραπάνω, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι πολυφαινόλες δεν μπορούν *in vivo* να δράσουν ως αντιοξειδωτικά, εξαιτίας της παρουσίας των ενδογενών αντιοξειδωτικών σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Μπορούν όμως να επηρεάσουν την κυτταρική λειτουργία, αναστέλλοντας ή ενεργοποιώντας σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος (π.χ. πρωτεϊνική κινάση C, κινάσες τυροσίνης κ.α.) (Galati και O' Brien, 2004).

1.6.2. Προ-οξειδωτική - Μεταλλαξιγόνος δράση

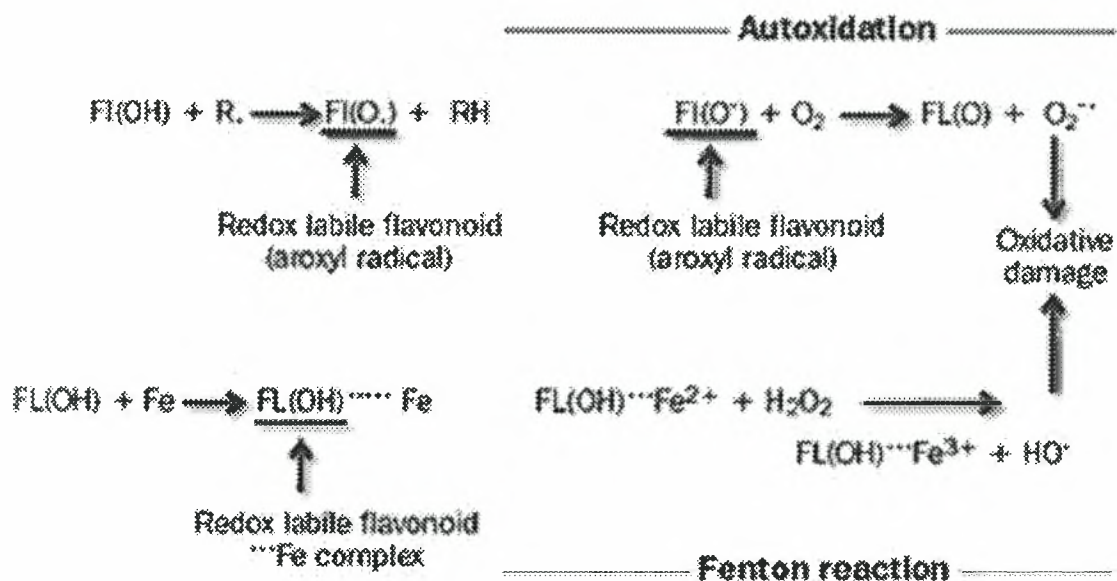
Οι πολυφαινόλες, εκτός από αντιοξειδωτική δράση, μπορεί να έχουν και προ-οξειδωτική, ανάλογα τη μορφή που έχουν στα κύτταρα και τις συνθήκες που επικρατούν σε αυτά (εικ.1.6) (Laughton et al, 1989. Galati και O' Brien, 2004). Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή με κατεχολική ομάδα στο δακτύλιο B, οξειδώνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία υπεροξειδάσης και σχηματίζεται μία ημικινόνη και μία κινόνη, οι οποίες μπορούν να συνδεθούν με κυτταρικά μακρομόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Awad et al, 2001). Ο Hanasaki και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι φλαβονοειδή με πολλές υδροξυλικές ομάδες, κυρίως στο δακτύλιο B, αυξάνουν την παραγωγή ενεργών ριζών OH• και φλαβονοειδή με πυρογαλλολικό δακτύλιο B, όπως η μυρικετίνη, προάγουν την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο μέσω της αντίδρασης Fenton δημιουργεί ενεργές ρίζες OH•. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι φλαβόνες με 2,3-διπλό δεσμό και 4-όξο θέση στο C δακτύλιο προάγουν το σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου. Όπως φαίνεται, οι ίδιες δομές άλλοτε ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση και άλλοτε την προ-οξειδωτική (Heim et al, 2002).

Στην εικόνα 1.7 φαίνονται δύο μηχανισμοί της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών. Στον πρώτο, η αροξυλική ρίζα, που παράγεται από ένα φλαβονοειδές, είναι οξειδοαναγωγικά ασταθής και γι' αυτό αυτοοξειδώνεται, οδηγώντας στην παραγωγή ενεργών ριζών $\text{O}_2^{\bullet-}$, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη. Στο δεύτερο, ένα οξειδοαναγωγικά ασταθές σύμπλοκο φλαβονοειδούς και σιδήρου μπορεί να συμμετάσχει σε μία αντίδραση Fenton, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργών ριζών OH•.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι μερικές πολυφαινόλες προκαλούν έντονη μεταλλαξιγονικότητα σε βακτήρια, μέσω της απευθείας σύνδεσής τους στο DNA (Ferguson, 2001).



Εικόνα 1.6. Μια πολυφαινόλη, ανάλογα τη μορφή της, μπορεί να έχει αντιοξειδωτική ή προ-οξειδωτική δράση (Galati και O' Brien, 2004).



Εικόνα 1.7. Μοριακοί μηχανισμοί της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών.

1.6.3. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση

Αρκετές πολυφαινόλες έχουν βρεθεί άλλοτε να δρουν σαν αντιμεταλλαξιγόνα και άλλοτε όχι, ανάλογα με τη θέση δράσης και τη χρονική στιγμή, κατά την οποία δρουν – πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την έκθεση στο μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Από αρκετές μελέτες έχει προκύψει μία σειρά διαφορετικών μηχανισμών, μέσω των οποίων εκδηλώνεται η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών (εικ.1.8). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν:

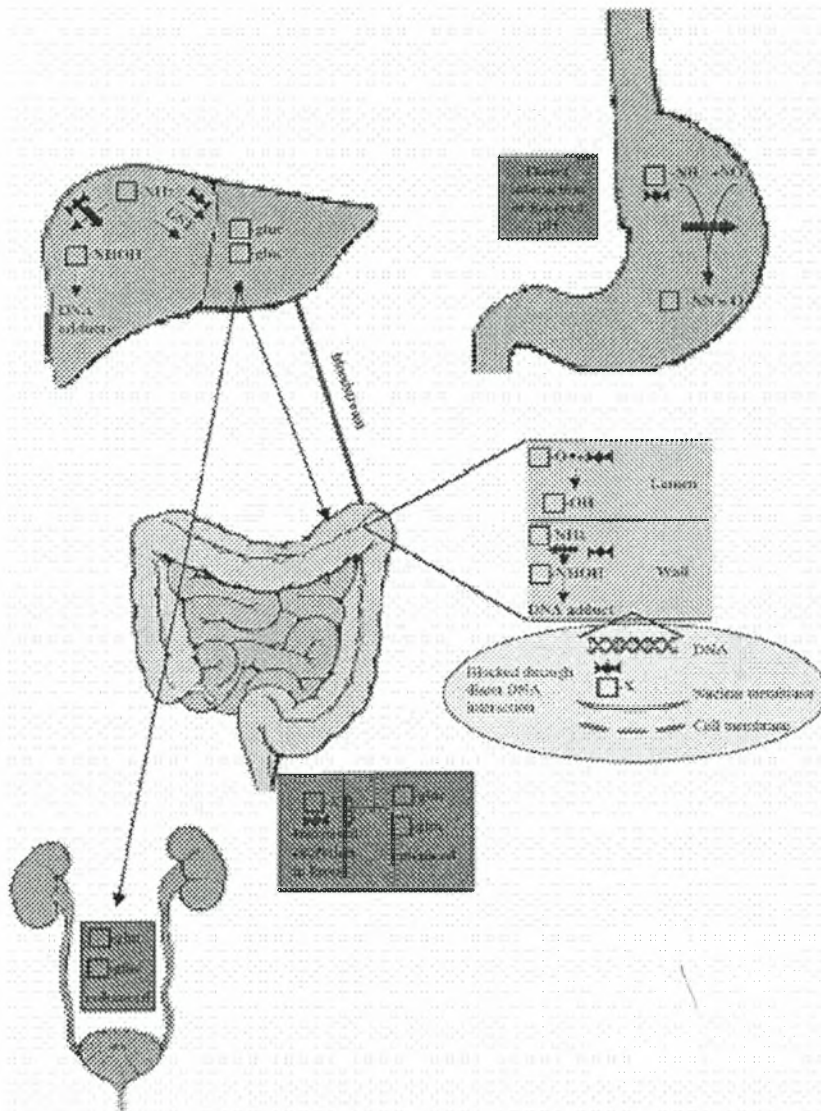
1. Επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, μέσω επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων των ενζύμων επιδιόρθωσης. Για παράδειγμα, σε ηπατοκύτταρα που είχαν εκτεθεί σε ένα άλας σιδήρου, η μυρικετίνη, ένα φλαβονοειδές, ανέστειλε τις μεταλλάξεις, επάγοντας την έκφραση της DNA πολυμεράσης (Ferguson, 2001).
2. Αναστολή της δράσης των μεταλλαξιγόνων, είτε μέσω αναστολής της ενεργοποίησης τους από τα μεταβολικά ένζυμα φάσης I (ένζυμα του κυτοχρώματος P450) είτε μέσω επαγωγής της απέκκρισής τους από τα ένζυμα φάσης II, τα οποία διευκολύνουν τη σύνδεση των ουσιών αυτών με ενδογενή ligands, όπως η γλουταθειόνη, το γλυκουρονικό, το οξικό και το θειικό οξύ. Για παράδειγμα, η ρεσβερατρόλη είναι ειδικός αναστολέας του ενζύμου CYP1A1 (Schwarz και Roots, 2003).
3. Αναστολή της σύνδεσης των μεταλλαξιγόνων στο DNA, μέσω δέσμευσής τους ή μέσω σύνδεσης της πολυφαινόλης στο DNA. Για παράδειγμα, το ελλαγικό οξύ βρέθηκε να αναστέλλει τη μεταλλαξιγόνο δράση της N-νιτροσο μεθυλουρίας (NMU), λόγω μεγαλύτερης συγγένειας για σύνδεση με το DNA (Dixit και Gold, 1986).

1.7. Επικατεχίνη

Η επικατεχίνη ($C_{15}H_{14}O_6$) είναι μία φλαβανόλη και συναντάται ως μονομερές ή oligομερές στο πράσινο τσάι, στο κόκκινο κρασί, στο κακάο και σε πολλά φρούτα, κυρίως στα μήλα (εικ.1.9). Πιστεύεται ότι συνεισφέρει στις αντικαρκινικές ιδιότητες του τσαγιού, μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης της και μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης των καρκινογόνων ουσιών (Caterall et al, 2000). Σημαντική είναι η καρδιοπροστατευτική δράση της επικατεχίνης, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της προστασίας των λιπιδίων από υπεροξειδωση (Valls-Bellés et al, 2004) και μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (Neiva et al, 1999). Πρόσφατες κυτταρικές μελέτες έδειξαν ότι η επικατεχίνη μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά, αναστέλλοντας το θάνατο των νευρικών κυττάρων, που επάγεται από οξειδωμένες LDL (Mohsen et al, 2002). Πρόσθετες ιδιότητές της είναι η αναστολή της α-αμυλάσης και η μίμηση της δράσης της ινσουλίνης (Rizvi & Zaid, 2001). Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι η επικατεχίνη μπορεί να δρα προ-οξειδωτικά δημιουργώντας δραστικές μορφές οξυγόνου ($O_2^{\bullet-}$ και OH^{\bullet}) και παρουσία ιόντων χαλκού να προκαλεί οξειδωτική βλάβη στο DNA (Azam et al, 2004).

1.8. Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη (3,4',5-τριυδροξυ-στυλβένιο, $C_{14}H_{12}O_3$) ανήκει στα στυλβένια και παράγεται στην επιδερμίδα των φύλλων και στη φλούδα των σταφυλιών σε περίπτωση μόλυνσης. Συναντάται σε δύο ισομορφές τις *cis* και *trans* (εικ.1.9), από τις οποίες η *cis*-ισομορφή δεν έχει ανιχνευτεί ποτέ σε εκχύλισμα



Εικόνα 1.8. Μηχανισμοί της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολών σε συγκεκριμένα όργανα. \blacklozenge πολυφαινόλη, $(\square-NH)$ αμίνη, $(\square-NH_2)$ αρυλαμίνη, $(\square-O)$ ελεύθερη ρίζα, $(\square-gluc)$ καρκινογόνο-γλυκουρονικό, $(\square-X)$ καρκινογόνο, $(\square-NN=O)$ νιτροζαμίνη, $(\square-NHOH)$ ενεργοποιημένη αρυλαμίνη, $(\square-OH)$ ανενεργή ρίζα (Ferguson, 2001).

σταφυλιών. Αντίθετα η *trans*-ισομορφή αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού, με συγκέντρωση να κυμαίνεται από 0,1 με 15 mg/L (Frémont, 2000).

Μία σημαντική ιδιότητα της ρεσβερατρόλης είναι η αναστολή και των τριών σταδίων της καρκινογένεσης. Επίσης, έχει βρεθεί να αναστέλλει την οξειδωση των LDL και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και να ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και τη σύνθεση των τριγλυκεριδίων. Σε αρκετές μελέτες έχει διαπιστωθεί η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης και αντιική της δράση, ενώ έχει αναφερθεί ότι αποτελεί νευρο- και καρδιοπροστατευτικό παράγοντα (Martín et al, 2004).

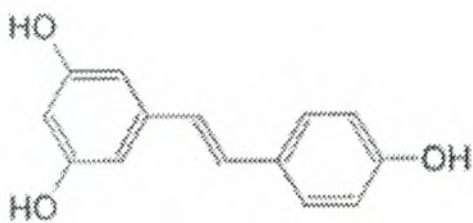
Ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι γνωστός. Παρόλα αυτά, η διακοπή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος μέσω της αναστολής της κυκλοοξυγενάσης-1 και της υδροξυπεροξειδάσης, καθώς και η αναστολή της μεταγραφής της κυκλοοξυγενάσης-2 και της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), που επιτυγχάνει η ρεσβερατρόλη, είναι σημαντικά βήματα για τη διεκπεραίωση των παραπάνω λειτουργιών (Aziz et al, 2003).

1.9. Πρωτοκατεχοϊκό οξύ

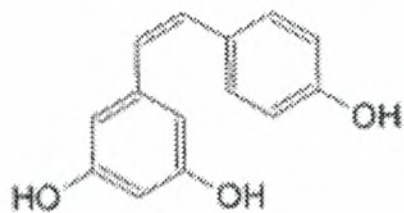
Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, C₇H₆O₄) είναι ένα απλό φαιολικό οξύ (εικ.1.9), που αποτελεί συστατικό των σταφυλιών, των μήλων, του πράσινου και μαύρου τσαγιού. Αν και δεν ανήκει στις δημοφιλείς πολυφαινόλες, αρκετά είναι γνωστά για το βιολογικό ρόλο του. Σε *in vivo* πειράματα βρέθηκε να αναστέλλει την καρκινογόνο δράση των νιτροζαμινών και άλλων αμινο-παραγώγων (Mikstacka et al, 2002) και να μειώνει τη συγκέντρωση της χοληστερόλης του ορού, μέσω της αύξησης του LDL-υποδοχέα, της απολιποπρωτεΐνης E και του ενζύμου LCAT (Tamura et al, 2004). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί χρονο- και δοσοεξαρτώμενη αναστολή της αύξησης καρκινικών κυττάρων και μάλιστα σε μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτή των βιολογικών υγρών ύστερα από πέψη τροφών πλούσιων σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Kampa et al, 2004).

1.10. Γαλλικό οξύ

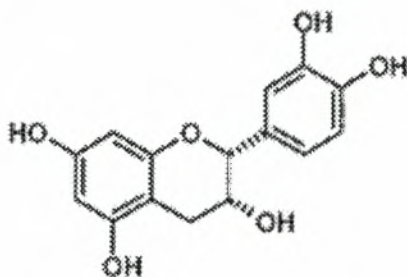
Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ, C₇H₆O₅) ανήκει στην κατηγορία των φαιολικών οξέων και περιέχεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά (εικ.1.9). Αν και έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του, πειράματα έδειξαν ότι σε μικρές συγκεντρώσεις, σε ορισμένους τύπους κυττάρων μπορεί να δρα ως προ-οξειδωτικό, λόγω της ασθενούς σύνδεσης μετάλλων και της ταυτόχρονης παραχώρησης ηλεκτρονίων (reducing ability) (Yen et al, 2002). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το γαλλικό οξύ επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας οξειδωτική βλάβη παρουσία Fe³⁺ ή Cu²⁺, μέσω της αυτό-οξειδωσής του και της παραγωγής ελευθέρων ριζών (εικ.1.10) (Kobayashi et al, 2004).



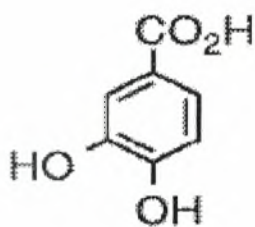
trans-ρεσβερατρόλη



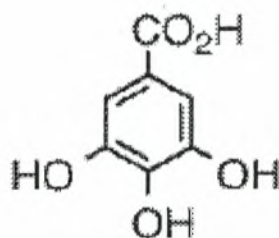
cis-ρεσβερατρόλη



Επικατεχίνη

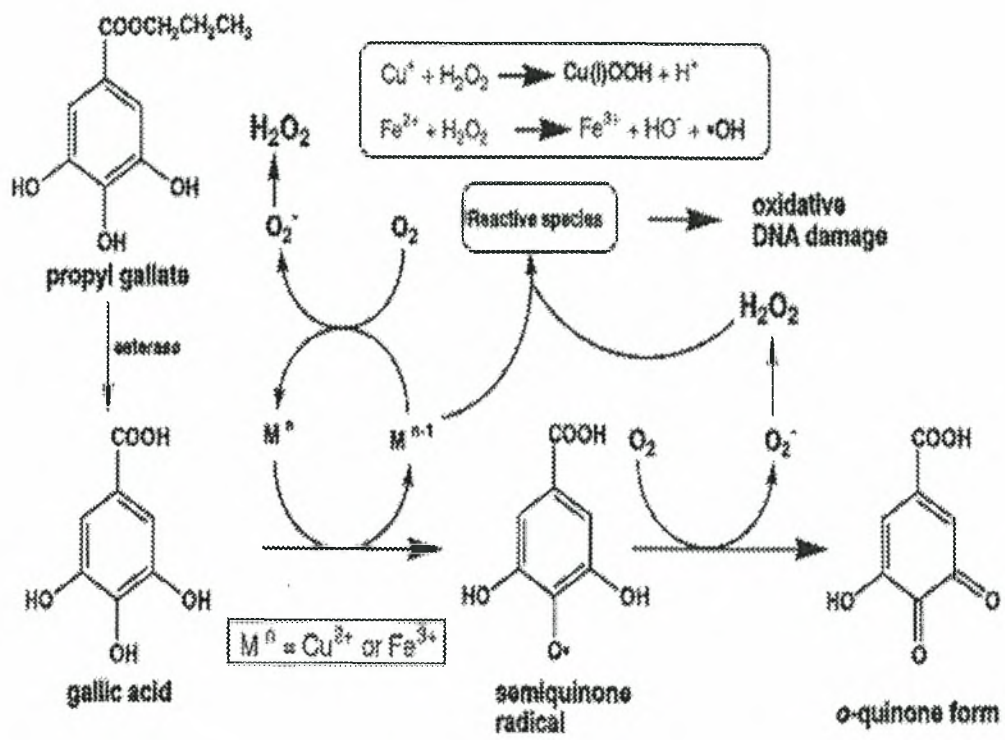


Πρωτοκατεχοϊκό οξύ



Γαλλικό οξύ

Εικόνα 1.9. Χημική δομή της *trans*- και *cis*-ρεσβερατρόλης, της επικατεχίνης, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και του γαλλικού οξέος (Aziz *et al*, 2003. Yilmaz & Toledo, 2004. Kambourakis & Frost, 2000)



Εικόνα 1.10. Πιθανός μηχανισμός της προ-οξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος παρουσία μετάλλων (Fe^{3+} ή Cu^{2+}) (Kobayashi et al, 2004).

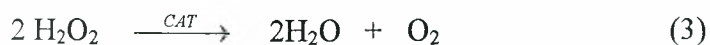
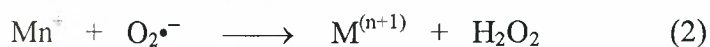
1.11. Υπεροξειδίο του υδρογόνου

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου ανακαλύφθηκε το 1818 από τον L.J. Thenard. Μοιάζει με το νερό στη μοριακή δομή και διαχέεται εύκολα μέσα και ανάμεσα στα κύτταρα, όπου μπορεί να παραχθεί παρουσία $O_2^{\bullet-}$ από τη δράση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD - αντίδραση 1) ή από την αυτό-οξειδωση των μετάλλων (αντίδραση 2). Σε *in vitro* πειράματα, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια και στα μικροσωμάτια και αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Ορισμένα οξειδωτικά ένζυμα, όπως η οξειδάση της γλυκόζης, η οξειδάση της ξανθίνης και οι οξειδάσες των αμινοξέων, παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, χωρίς τη μεσολάβηση $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να συμμετέχει σε σημαντικές μεταβολικές λειτουργίες, λόγω της δυνατότητάς του να επηρεάζει τη δράση ενζύμων (π.χ. φωσφατάσες, κινάσες) και μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεϋδης, ένα ένζυμο του μονοπατιού της γλυκόλυσης, αναστέλλεται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, μέσω της οξειδωσης σουλφυδρικών ομάδων (-SH), με αποτέλεσμα τη μείωση του ATP. Επίσης, χρησιμοποιείται από την υπεροξειδάση του θυρεοειδούς για το σχηματισμό των θυρεοειδικών ορμονών και από τον TNF α (Tumor Necrosis Factor α) για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B (Nuclear Factor κ B), ενώ η βιταμίνη C αντιμετωπίζει τις μολύνσεις, μέσω της ενεργοποίησης της παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια επάγει την παραγωγή των προσταγλανδινών (Halliwell, 2001).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου απομακρύνεται από τα κύτταρα μέσω της δράσης δύο τύπων ενζύμων: τις καταλάσες (CAT-αντίδραση 3), που δρουν κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα και τις υπεροξειδάσες (αντίδραση 4), με βασικό εκπρόσωπο την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Gpx-αντίδραση 5), που δρα κυρίως στο ήπαρ και στον εγκέφαλο (Halliwell & Gutteridge, 1989).

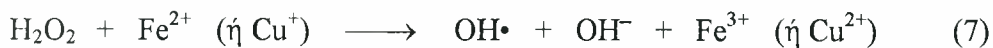
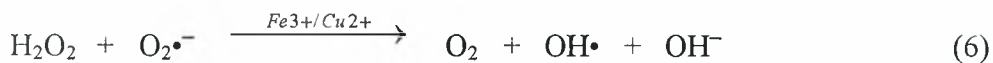
Από μόνο του το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι πολύ ενεργό, σε συνδυασμό όμως με ιόντα σιδήρου ή χαλκού μπορεί, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (αντίδραση 6) ή της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 7), να παράγει ενεργές ρίζες OH^{\bullet} , οι οποίες προκαλούν χρωμοσωμικές αλλαγές μέσω οξειδωτικής βλάβης των βάσεων ή μέσω ρήξης των κλώνων του DNA (Grey & Adlercreutz, 2003). Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας, το υπεροξειδίο του υδρογόνου επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως μεταλλαξιγόνο στα πειράματά μας. Οι εξεταζόμενες ουσίες θα μπορούσαν να αναστείλουν τη μεταλλαξιγένεση, μόνο αν έχουν την ικανότητα να δράσουν ως εκκαθαριστές των ενεργών ριζών OH^{\bullet} ή ως δεσμευτές των μεταβατικών μετάλλων (Ferguson, 2001).



Όπου: SH_2 το υπόστρωμα που θα οξειδωθεί.



Όπου: GSH και GSSG η γλουταθειόνη πριν και μετά την οξείδωση.



1.12. Σκοπός του πειράματος

Στην παρούσα μελέτη έγινε μία προσπάθεια ανεύρεσης των πιθανών μηχανισμών της χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολών και των εκχυλισμάτων σταφυλιών. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η επίδραση εκχυλισμάτων και κλασμάτων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου, καθώς και καθαρών πολυφαινολών στη μεταλλαξιγένεση, προκαλούμενη από οξειδωτικές βλάβες, σε βακτήρια. Η ενδεχόμενη αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εξεταζόμενων ουσιών είναι σημαντική, επειδή πρόκειται για φυτικά συστατικά, που μπορούν να προσληφθούν μέσω της διατροφής και να δράσουν ενάντια στη μεταλλαξιγένεση των ελευθέρων ριζών, οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως σε ορισμένες μορφές καρκίνου, στην αθηροσκλήρωση, στη γήρανση και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

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

SIGMA (Η.Π.Α.)

Επικατεχίνη
Ρεσβερατρόλη
Γαλλικό οξύ
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ
Φωσφορικό αμμωνικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
Θειικό μαγνήσιο ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
Ιστιδίνη και βιοτίνη
DMSO

Merck (Γερμανία)

Nutrient broth N₀ 2
Υπεροξειδίο του υδρογόνου 30%

Panreac (Ισπανία)

Άγαρ
Ανυδρο διβασικό φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4)
Κιτρικό οξύ
Γλυκόζη
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
Μεθανόλη

2.1.2. Στελέχη *Salmonella*

Χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium* TA102. Διατηρήθηκαν στους -80°C διαλυμένα σε γλυκερόλη.

2.1.3. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα απομονώθηκαν από δύο ποικιλίες αμπέλου – *Μανδηλαριά Σαντορίνης* (κόκκινα σταφύλια) και *Ασσύρτικο Σαντορίνης* (άσπρα σταφύλια) – στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εκχυλίσματα και κλάσματα:

- Υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς
- Μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς
- Υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου
- Μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικου

- Μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς
- Μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς

2.2. Μέθοδοι

Δοκιμή του Ames

2.2.1. Γενικά

Ο Bruce Ames και οι συνεργάτες του, το 1975, επινόησαν μία δοκιμασία μικρής διάρκειας (short term) για τον έλεγχο της μεταλλαξιγόνου δράσης μίας ουσίας. Η δοκιμασία αυτή, που ονομάστηκε Ames Test, χρησιμοποιεί στελέχη *Salmonella typhimurium*, τα οποία λόγω μεταλλάξεων δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν το απαραίτητο αμινοξύ, ιστιδίνη και γι' αυτό η ανάπτυξή τους δεν είναι εφικτή σε άγαρ που δεν περιέχει ιστιδίνη. Η έκθεση της καλλιέργειας σε ένα χημικό μεταλλαξιγόνο συντελεί στη δημιουργία επαναμεταλλάξεων στο DNA, μερικές από τις οποίες θα οδηγήσουν στην επανάκτηση της ικανότητας των βακτηρίων να συνθέτουν ιστιδίνη, άρα και της ικανότητας να αυξάνονται απουσία ιστιδίνης και να σχηματίζουν αποικίες.

Τα πιο συνηθισμένα στελέχη *Salmonella* είναι τα TA98, TA100, TA102, TA1535 και TA1538, καθένα από τα οποία φέρει μεταλλάξεις στο οπερόνιο της ιστιδίνης, αλλά και επιπρόσθετες μεταλλάξεις που τα καθιστούν πιο ευαίσθητα στα χημικά μεταλλαξιγόνα (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι το TA102, επειδή είναι ευαίσθητο σε μεταλλαξιγόνα, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που δρουν μέσω του οξειδωτικών μηχανισμών (Levin et al, 1982). Το στέλεχος αυτό, όπως και όλα τα υπόλοιπα, φέρει μία μετάλλαξη (*rfa*), που ευθύνεται για το σχηματισμό ελαττωματικού στρώματος λιποπολυσακχαριτών (LPS), γεγονός που καθιστά τα βακτήρια περισσότερο διαπερατά από χημικές ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους. Επιπλέον, έχει γίνει εισαγωγή του πλασμιδίου pKM101, το οποίο αφενός ενισχύει τη χημική και την επαγόμενη από υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλαξιγένεση, μέσω επαγωγής του ευαίσθητου σε λάθη μονοπατιού επιδιόρθωσης του μη ομόλογου ανασυνδυασμού, αφετέρου παρέχει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, έναν κατάλληλο δείκτη για τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου στο στέλεχος. Τέλος, έχει εισαχθεί μία μετάλλαξη λήξης, η *hisG-428*, στο γονίδιο *hisG*. Πρόκειται για μία μετάλλαξη ευαίσθητη σε επαναμεταλλάξεις, γι' αυτό βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδίου pAQ1 (αύξηση της πιθανότητας για επαναμετάλλαξη του γονιδίου), το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, έναν δείκτη για την ανίχνευσή του (Grey & Adlercreutz, 2003. Mortelmans & Zeiger, 2000).

Αν και η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της μεταλλαξιγόνου δράσης χημικών ουσιών και φαρμάκων, στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης ορισμένων πολυφαινολών, εκχυλισμάτων και κλασμάτων σταφυλιών από ελληνικές ποικιλίες. Για το σκοπό αυτό, καλλιέργειες κυττάρων *Salmonella* εκτίθενται σε ένα χημικό μεταλλαξιγόνο, το οποίο αυξάνει τον αριθμό των αποικιών επαναμετάλλαξης (revertant colonies), συγκριτικά με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονται απουσία μεταλλαξιγόνου. Σε άλλες καλλιέργειες, εκτός της πρώτης ουσίας, προστίθεται και η εξεταζόμενη ουσία. Αν ο αριθμός των αποικιών επαναμετάλλαξης είναι μικρότερος από ότι στις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο το μεταλλαξιγόνο

παράγοντα και η μείωση είναι στατιστικώς σημαντική, τότε η υπό εξέταση ουσία έχει αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία GM agar, θρεπτικού υλικού και top agar.

Αρχικά, ετοιμάζεται το θρεπτικό μέσο, το οποίο αναφέρεται ως glucose minimal agar medium (GM agar) και περιέχει Vogel-Bonner medium E, γλυκόζη και άγαρ. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Παρασκευή του διαλύματος Vogel-Bonner. Προσθήκη σε δοχείο φύλαξης 2-1 650 ml ζεστό (50°C) απεσταγμένο νερό (για διάλυμα 1000 ml), 10 g θειικό μαγνήσιο, 100 g κιτρικό οξύ, 500 g άνυδρο διβασικό φωσφορικό κάλιο και 175 g φωσφορικό αμμωνικό νάτριο. Κάθε ουσία διαλύεται με μαγνητικό αναδευτήρα και έπειτα προστίθεται η επόμενη. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 30 min και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Παρασκευή διαλύματος γλυκόζης 10%v/v. Αποστείρωση του διαλύματος σε αυτόκαυστο στους 121°C για 30min και αποθήκευση στους 4°C.
- Προσθήκη σε δοχείο φύλαξης 3-1, 900 ml απεσταγμένο νερό και 15 g άγαρ (για διάλυμα 1000 ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 30 min και αφήνεται να κρυώσει για 45 min σε υδατόλουτρο στους 65°C. Ακολούθως, προστίθενται 20 ml διαλύματος Vogel-Bonner, γίνεται έντονη ανάδευση, προστίθενται 50 ml διαλύματος γλυκόζης και γίνεται πάλι έντονη ανάδευση. Το θρεπτικό μέσο μοιράζεται στα τριβλία (25 ml/τριβλίο) και όταν αυτό στερεοποιηθεί, τα τριβλία φυλάσσονται στους 4°C.

Επόμενο βήμα είναι η παρασκευή του θρεπτικού υλικού, κατά την οποία 0,24 g nutrient broth διαλύονται σε 30 ml απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min και αφήνεται να κρυώσει στο σκοτάδι.

Παράλληλα, προετοιμάζεται διάλυμα ιστιδίνης/βιοτίνης (0,5 mM), με προσθήκη 124 mg D-βιοτίνης και 96 mg L-ιστιδίνης σε 1000 ml ζεστό απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min και διατηρείται στους 4°C. Ακολουθεί παρασκευή του top agar, κατά την οποία 6 g άγαρ και 6 g NaCl διαλύονται υπό ανάδευση και θερμότητα σε 900 ml απεσταγμένο νερό. Μετά, προστίθενται 100 ml διαλύματος ιστιδίνης/βιοτίνης και γίνεται αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 30 min.

Καλλιέργεια κυττάρων *S. typhimurium* TA 102

300 μl από το απόθεμα του στελέχους *Salmonella* TA102 προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και η καλλιέργεια εισάγεται σε επωαστήρα στους 37°C για 6-8 ώρες και φωτομετρείται στα 540 nm μέχρι η απορρόφηση να κυμαίνεται από 0,1-0,2 (1-2X10⁹ CFU/ml).

Κανονική μέθοδος κατά Ames

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml, τόσοι όσες είναι οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 43-48°C και σε αυτούς προστίθενται 2 ml top agar, 50 μl υπεροξείδιο του υδρογόνου (50 μg/ml), 50 μl της υπό εξέταση ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις και 100 μl καλλιέργειας *Salmonella*. Σε αυτό το στάδιο η διατήρηση της θερμοκρασίας είναι σημαντική, καθώς κάτω από τους 43°C πήζει το άγαρ και πάνω από τους 48°C σκοτώνονται τα κύτταρα. Το περιεχόμενο των σωλήνων αναμιγνύεται ήπια σε vortex και απλώνεται στην επιφάνεια των GM agar τριβλίων. Μόλις στερεοποιείται, τα τριβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα, σε επωαστήρα στους 37°C για 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, γίνεται καταμέτρηση των αποικιών επαναμετάλλαξης του κάθε τριβλίου.

Πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε ουσία έγιναν δύο πειράματα, σε καθένα από τα οποία ετοιμάστηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούταν ένας αρνητικός μάρτυρας (καλλιέργειες χωρίς προσθήκη ουσιών) και ένας θετικός μάρτυρας (καλλιέργειες με προσθήκη μόνο υπεροξειδίου του υδρογόνου).

Έλεγχος τοξικότητας

Πριν τη μέτρηση των αποικιών, γίνεται έλεγχος τοξικότητας, μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης (40x) της εμφάνισης των μη ορατών με γυμνό μάτι αποικιών (background lawn), οι οποίες λόγω έλλειψης ιστιδίνης, δεν έχουν την ικανότητα να πραγματοποιήσουν περισσότερες από έξι με οχτώ διαιρέσεις. Σε περίπτωση μη τοξικότητας η πυκνότητα των αποικιών αυτών είναι τόσο μεγάλη, ώστε να σχηματίζεται ένα λεπτό στρώμα. Αντίθετα, σε ήπια τοξικότητα, οι αποικίες μικραίνουν σε μέγεθος και αριθμό, ενώ σε έντονη τοξικότητα απουσιάζουν. Σε αυτή την περίπτωση, η τοξικότητα μπορεί να διαπιστωθεί και με γυμνό μάτι, καθώς και οι αποικίες επαναμετάλλαξης μειώνονται και λεπταίνουν.

Υπολογισμός της % αναστολής της μεταλλαξιγένεσης

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

$$\% \text{ Αναστολή} = \left[\frac{\text{αριθμός αποικιών θετικού μάρτυρα} - \text{αριθμός αποικιών καλλιέργειας με H}_2\text{O}_2 \text{ και εξεταζόμενη ουσία}}{\text{αριθμός αποικιών θετικού μάρτυρα} - \text{αριθμός αποικιών αρνητικού μάρτυρα}} \right] \times 100$$

Στατιστική Ανάλυση

Σκοπός της στατιστικής ανάλυσης είναι η αξιολόγηση της διαφοράς ανάμεσα στη μέση τιμή του αριθμού αποικιών των καλλιεργειών που περιείχαν τις εξεταζόμενες ουσίες και τη μέση τιμή των αποικιών των θετικών μαρτύρων. Χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος κατάλληλη για τη σύγκριση μέσων τιμών, το Student's t-test, κατά το οποίο υπολογίζεται ένα διάστημα εμπιστοσύνης (Δ.Ε.) μεταξύ των μέσων τιμών. Αν το Δ.Ε. περιέχει το μηδέν, η διαφορά των μέσων τιμών δεν είναι στατιστικά σημαντική, ενώ αν δεν το περιέχει η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Ο υπολογισμός του Δ.Ε. γίνεται με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

$$\Delta.E. = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \pm t_{(1-\alpha/2)} X \sqrt{\frac{S_p^2}{n_1} + \frac{S_p^2}{n_2}}$$

Όπου \bar{x}_1 και \bar{x}_2 : οι μέσες τιμές

α : % πιθανότητα η διαφορά μεταξύ των δύο μέσων τιμών να είναι στατιστικά σημαντική. Για 95% στατιστικά σημαντική διαφορά $\alpha=0,05$

$t_{(1-\alpha/2)}$: το κριτήριο της t-κατανομής. Υπολογίζεται από την καταχωρημένη τιμή του t στον πίνακα 2.1 για βαθμούς ελευθερίας $df = n_1+n_2-2$

n_1 και n_2 : οι αριθμοί των δειγμάτων

$s_p^2 = [(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2] / (n_1+n_2-2)$,
όπου s_1 και s_2 οι τυπικές αποκλίσεις των αντίστοιχων μέσων τιμών.

Πίνακας 2.1. Κατανομή t.

d.f.	t _{.90}	t _{.95}	t _{.975}	t _{.99}	t _{.995}
1	3.078	6.3138	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.9200	4.3027	6.965	9.9248
3	1.638	2.3534	3.1825	4.541	5.8409
4	1.533	2.1318	2.7764	3.747	4.6041
5	1.476	2.0150	2.5706	3.365	4.0321
6	1.440	1.9432	2.4469	3.143	3.7074
7	1.415	1.8946	2.3646	2.998	3.4995
8	1.397	1.8595	2.3060	2.896	3.3554
9	1.383	1.8331	2.2622	2.821	3.2498
10	1.372	1.8125	2.2281	2.764	3.1693
11	1.363	1.7959	2.2010	2.718	3.1058
12	1.356	1.7823	2.1788	2.681	3.0545
13	1.350	1.7709	2.1604	2.650	3.0123
14	1.345	1.7613	2.1448	2.624	2.9768
15	1.341	1.7530	2.1315	2.602	2.9467
16	1.337	1.7459	2.1199	2.583	2.9208
17	1.333	1.7396	2.1098	2.567	2.8982
18	1.330	1.7341	2.1009	2.552	2.8784
19	1.328	1.7291	2.0930	2.539	2.8609
20	1.325	1.7247	2.0860	2.528	2.8453
21	1.323	1.7207	2.0796	2.518	2.8314
22	1.321	1.7171	2.0739	2.508	2.8188
23	1.319	1.7139	2.0687	2.500	2.8073
24	1.318	1.7109	2.0639	2.492	2.7969
25	1.316	1.7081	2.0595	2.485	2.7874
26	1.315	1.7056	2.0555	2.479	2.7787
27	1.314	1.7033	2.0518	2.473	2.7707
28	1.313	1.7011	2.0484	2.467	2.7633
29	1.311	1.6991	2.0452	2.462	2.7564
30	1.310	1.6973	2.0423	2.457	2.7500
35	1.3062	1.6896	2.0301	2.438	2.7239
40	1.3031	1.6839	2.0211	2.423	2.7045
45	1.3007	1.6794	2.0141	2.412	2.6896
50	1.2987	1.6759	2.0086	2.403	2.6778
60	1.2959	1.6707	2.0003	2.390	2.6603
70	1.2938	1.6669	1.9945	2.381	2.6480
80	1.2922	1.6641	1.9901	2.374	2.6388
90	1.2910	1.6620	1.9867	2.368	2.6316
100	1.2901	1.6602	1.9840	2.364	2.6260
120	1.2887	1.6577	1.9799	2.358	2.6175
140	1.2876	1.6558	1.9771	2.353	2.6114
160	1.2869	1.6545	1.9749	2.350	2.6070
180	1.2863	1.6534	1.9733	2.347	2.6035
200	1.2858	1.6525	1.9719	2.345	2.6006
∞	1.282	1.645	1.96	2.326	2.576

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου, πραγματοποιήθηκε τεστ με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (17, 34, 51, 102, 153 και 204 μg/τριβλίο) και προέκυψε η καμπύλη της εικόνας 3.1. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν τα 100 μg/τριβλίο, καθώς οι μεγαλύτερες τιμές ήταν τοξικές για τα κύτταρα και οι μικρότερες δεν έδιναν αρκετά μεγάλο αριθμό αποικιών επαναμετάλλαξης.

3.2. Επίδραση των διαλυτών στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

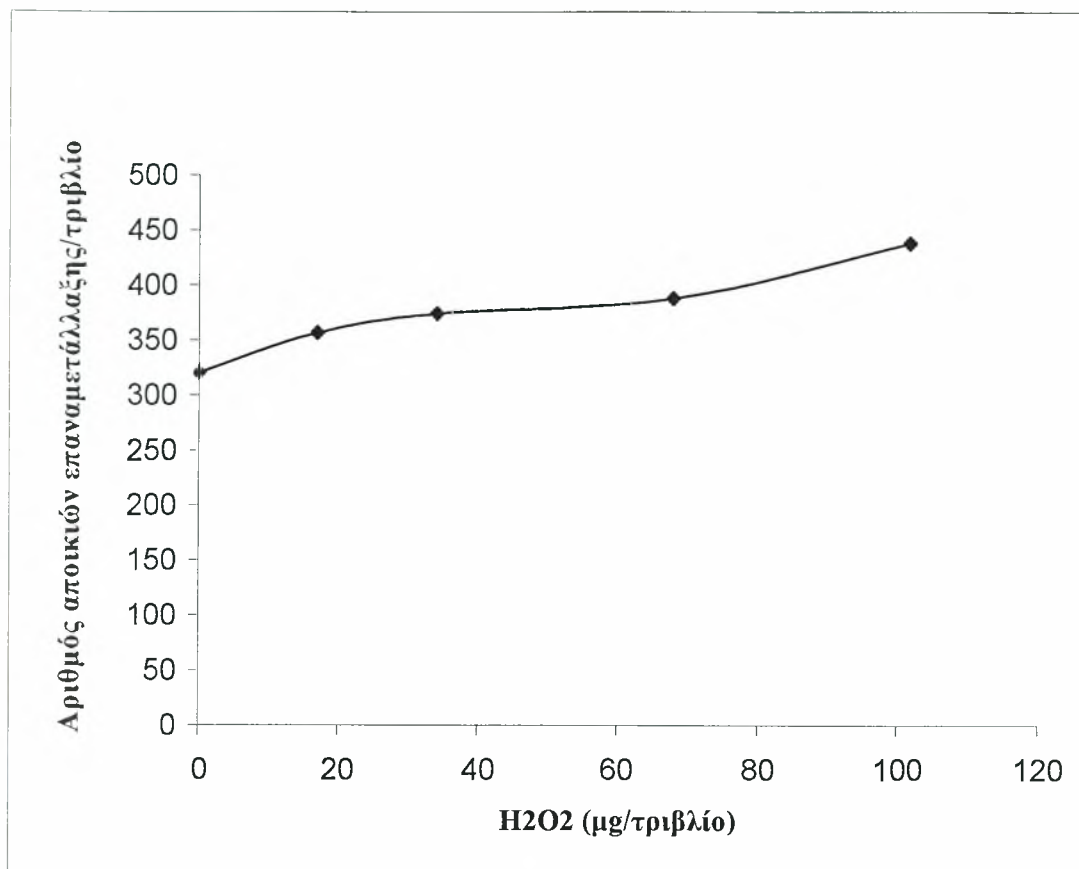
Λόγω της μικρής υδατοδιαλυτότητας ορισμένων πολυφαινόλων, χρειάστηκε να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες το DMSO και η μεθανόλη, τα οποία όμως από μόνα τους αποτελούν εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (scavengers) και έτσι μπορεί να καλύπτουν την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων (*van Acker et al, 1996*). Για να αποφευχθεί η λήψη λανθασμένων συμπερασμάτων, έγινε έλεγχος της δράσης των δύο διαλυτών σε ξεχωριστά τεστ και βρέθηκε ότι αμφότεροι, στις μέγιστες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0,6% για το DMSO και 2,5% για τη μεθανόλη) δεν επηρέαζαν τη μεταλλαξιγόνο δράση του H₂O₂ (πιν. 3.1 & 3.2, εικ. 3.2 & 3.3).

3.3. Επίδραση των υπό εξέταση ουσιών στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Από τις τέσσερις πολυφαινόλες που εξετάστηκαν, η ρεσβερατρόλη στη συγκέντρωση των 100 μM, αύξησε τον αριθμό των αποικιών επαναμετάλλαξης κατά 60% (p<0,05) (πιν. 3.3, εικ. 3.4 & 3.5). Αντίθετα, η επικατεχίνη (πιν.3.4, εικ. 3.6 & 3.7), το γαλλικό (πιν. 3.5, εικ. 3.8 & 3.9) και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (πιν. 3.6, εικ. 3.10 & 3.11) δεν επηρέασαν την μεταλλαξιγονικότητα του H₂O₂.

Παράλληλα, από τα εκχυλίσματα, τα υδατικά εκδήλωσαν μεταλλαξιγόνο δράση, ενώ τα μεθανολικά αντιμεταλλαξιγόνο. Πιο συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου, σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε επαγωγή 34, 75 και 83% αντίστοιχα (πιν. 3.7, εικ. 3.12 & 3.13), ενώ το μεθανολικό σε συγκεντρώσεις 0,15, 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε αναστολή 39, 37, 67 και 82% αντίστοιχα (πιν. 3.8, 3.14 & 3.15). Το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς, σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε επαγωγή 51, 85 και 116% αντίστοιχα (πιν. 3.9, εικ. 3.16 & 3.17), ενώ το μεθανολικό στις ίδιες συγκεντρώσεις έδωσε αναστολή 28, 37 και 79% (πιν. 3.10, εικ. 3.18 & 3.19).

Τέλος, τα δύο κλάσματα αύξησαν τον αριθμό των αποικιών επαναμετάλλαξης. Ειδικότερα, το μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 1,5 mg/ml σημείωσε αύξηση 71% (πιν. 3.11, εικ. 3.20 & 3.21) και το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 0,15 και 1,5 mg/ml σημείωσε αύξηση 45 και 123% αντίστοιχα (πιν. 3.12, εικ. 3.22 & 3.23).



Εικόνα 3.1. Μεταλλαξιγένεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

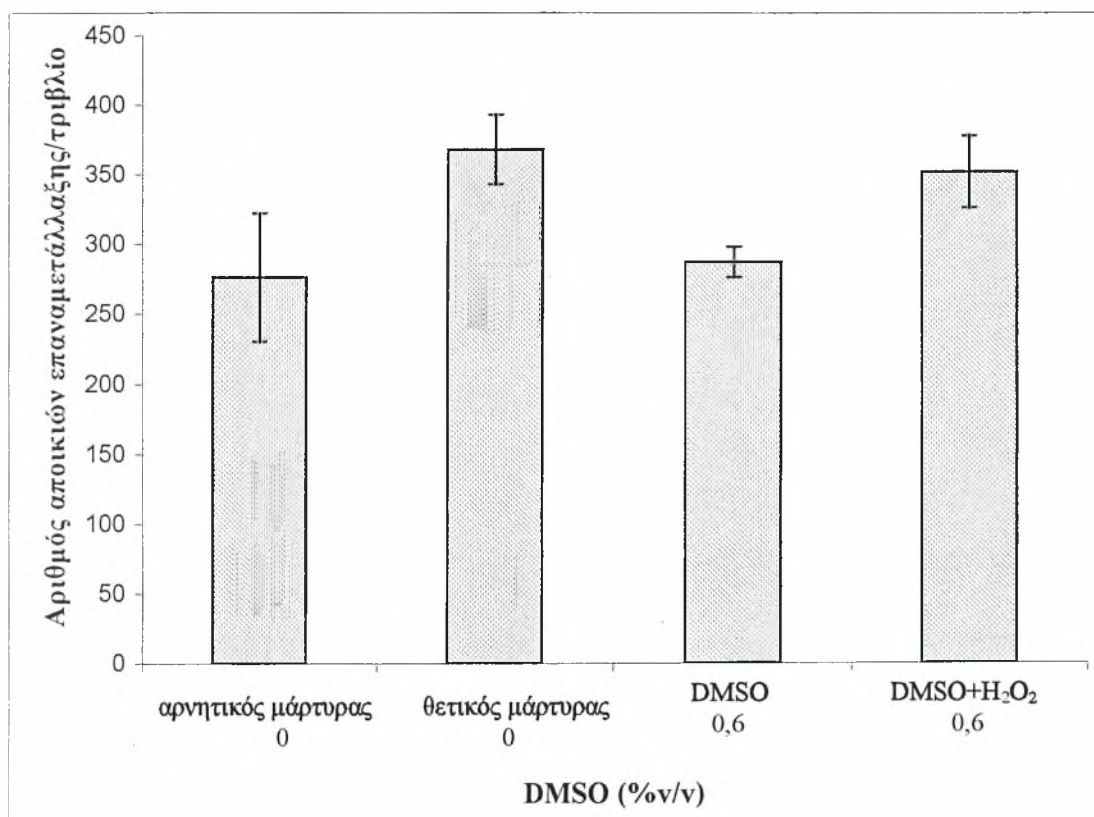
Πίνακας 3.1. Επίδραση του DMSO στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	276±46		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	368±25		
0,6% v/v DMSO	287±11	-	4**
0,6% v/v DMSO+ H ₂ O ₂	352±26	17**	-

¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

** Η τιμή είναι στατιστικά μη σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.2. Επίδραση του DMSO στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.

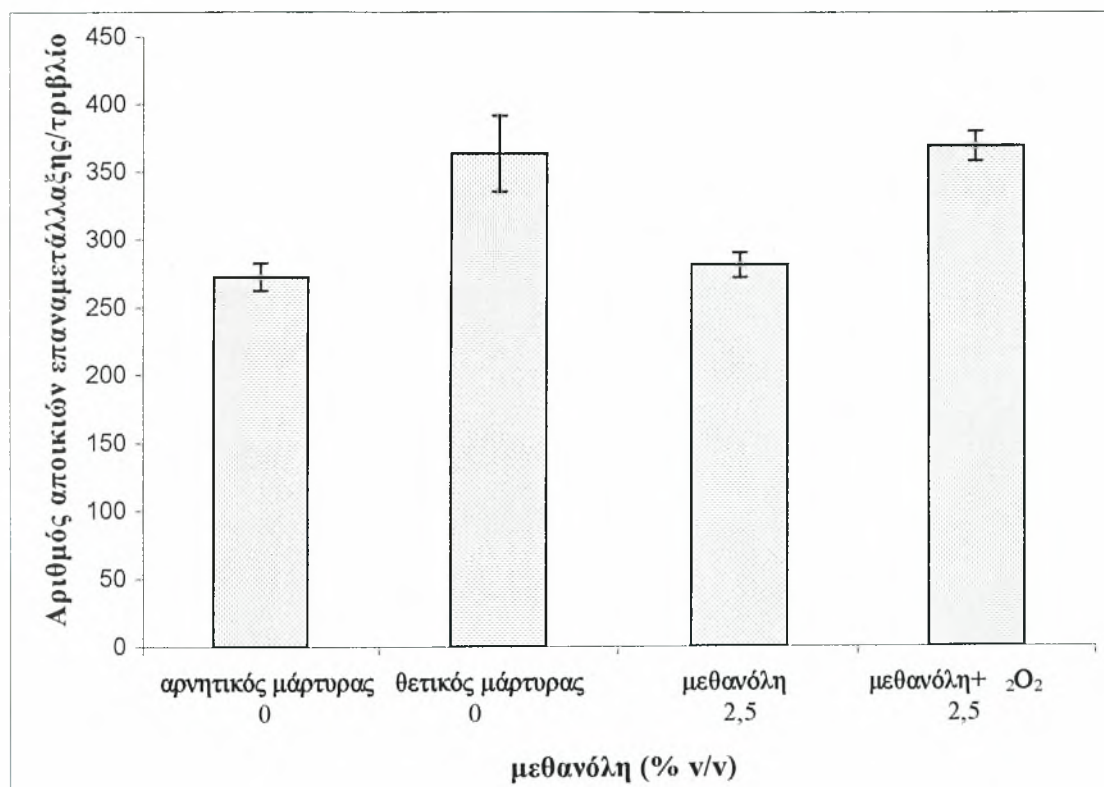
Πίνακας 3.2. Επίδραση της μεθανόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	272±10		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	363±28		
2,5% v/v μεθανόλη	281±9	-	3**
2,5% v/v μεθανόλη+ H ₂ O ₂	369±11	-	7**

¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

** Η τιμή είναι στατιστικά μη σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.3. Επίδραση της μεθανόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml. Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.

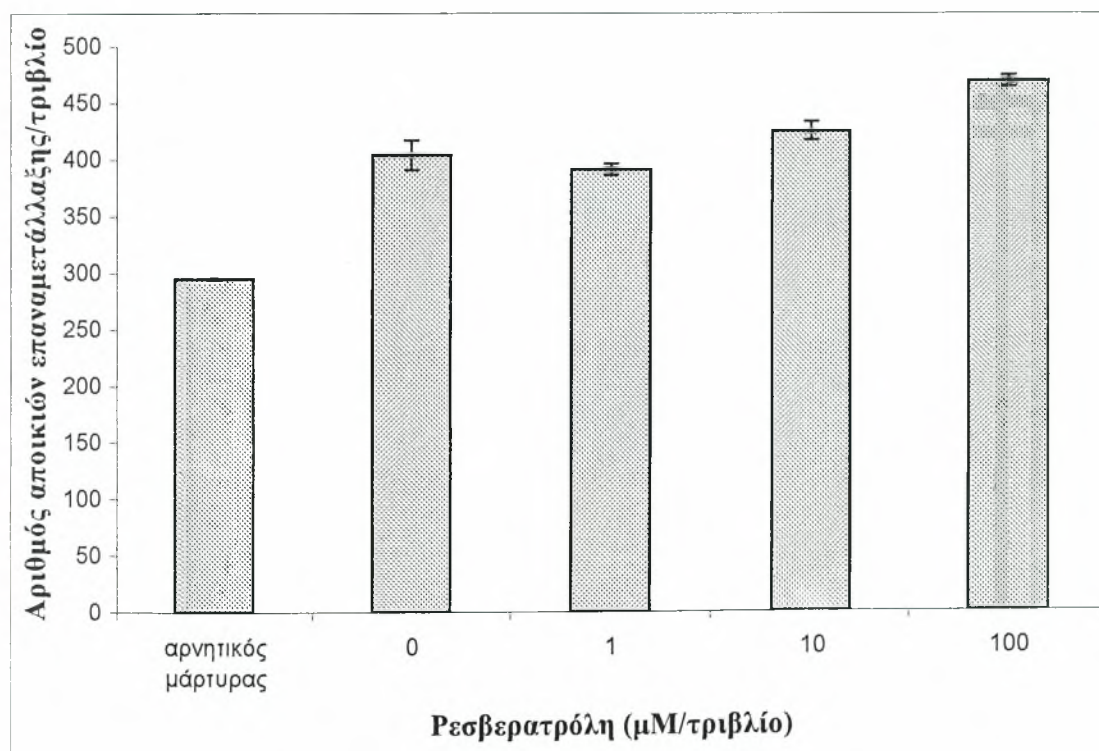
Πίνακας 3.3. Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	295±1		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	404±13		
500μM ρεσβερατρόλη	295±5	-	-
1μM ρεσβερατρ+H ₂ O ₂	391±5	12	-
10μM ρεσβερατρ+H ₂ O ₂	425±8	-	19
100μM ρεσβερατρ+H ₂ O ₂	469±5	-	60*
500μM ρεσβερατρ+H ₂ O ₂	τοξικότητα	-	-

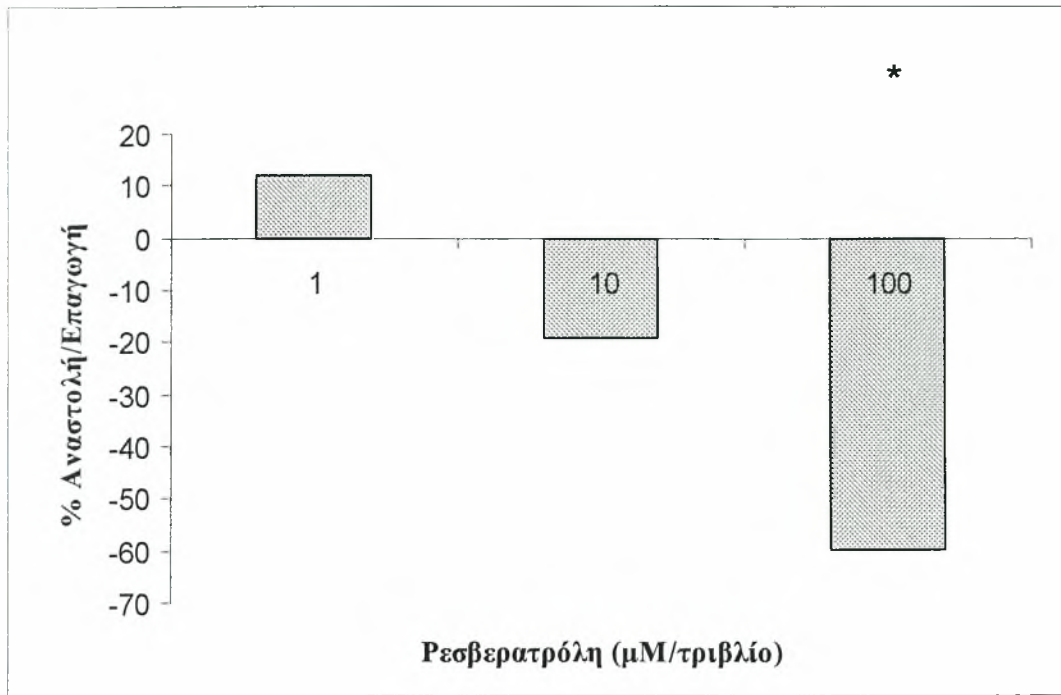
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από της τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.4. Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές της ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.5. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

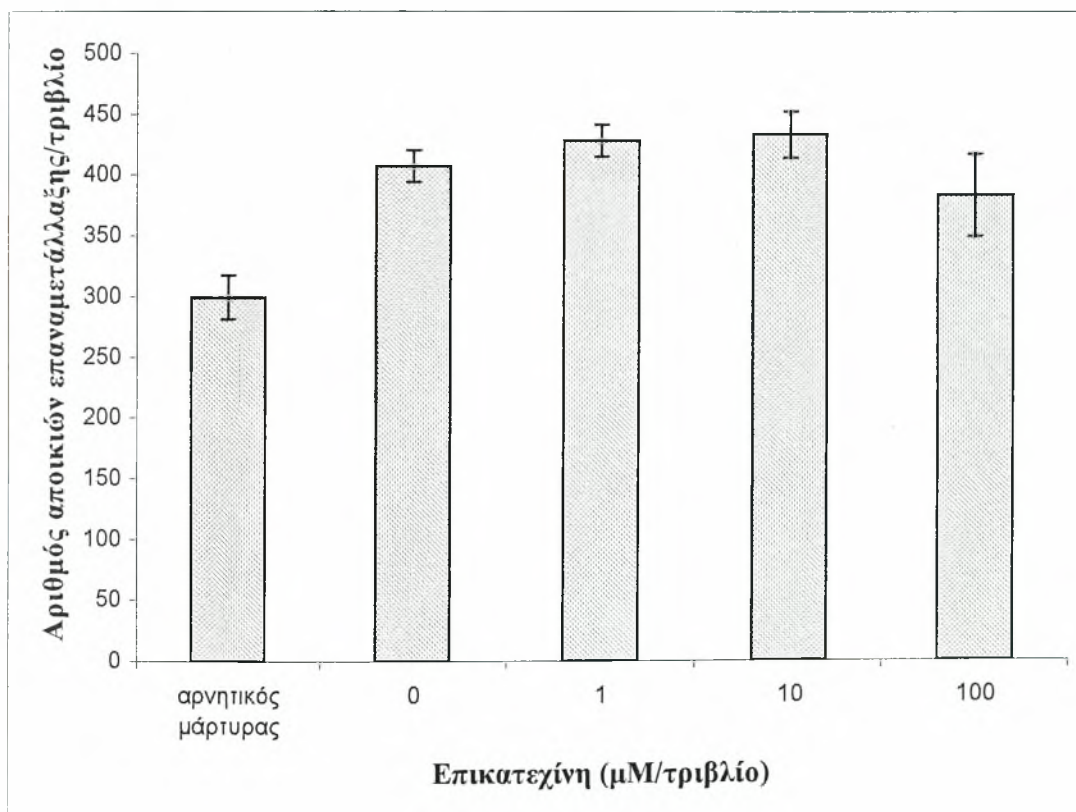
Πίνακας 3.4. Επίδραση της επικατεχίνης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	299±18		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	407±13		
500μM επικατεχίνη	302±11	-	1**
1μM επικατεχίνη+H ₂ O ₂	428±13	-	19**
10μM επικατεχίνη+H ₂ O ₂	433±19	-	24**
100μM επικατεχίνη+H ₂ O ₂	383±34	22**	-

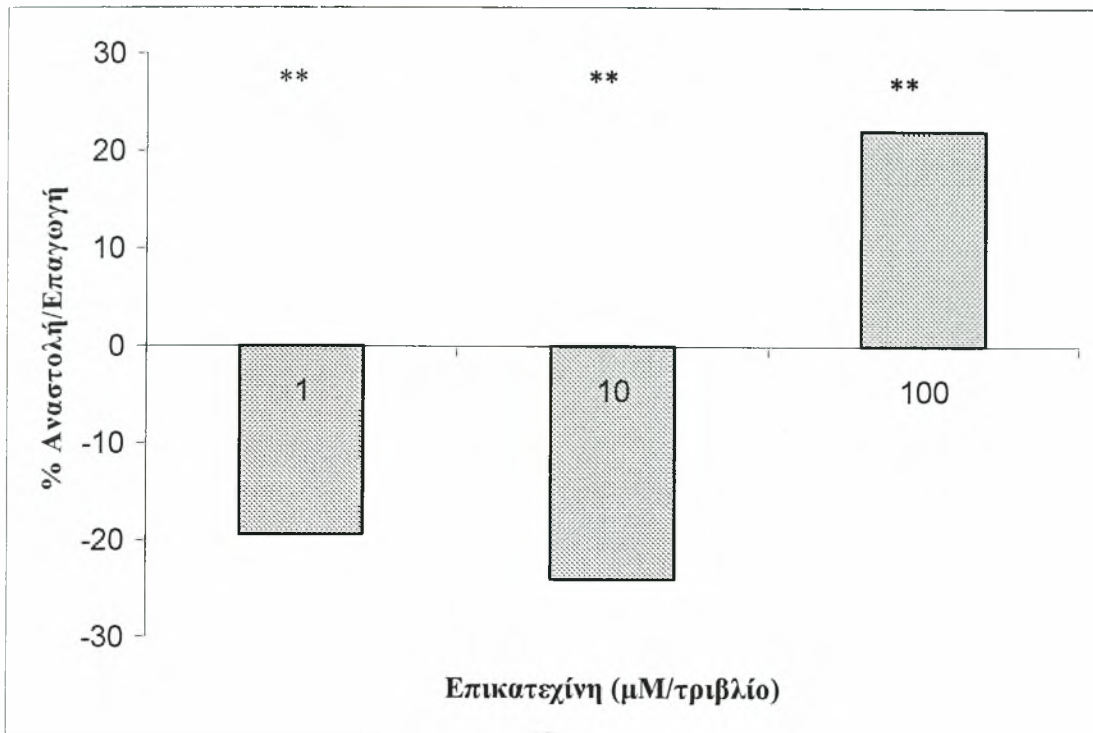
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

** Η τιμή είναι στατιστικά μη σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.6. Επίδραση της επικατεχίνης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.7. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της επικατεχίνης στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης. ** Τιμή στατιστικά μη σημαντική ($p < 0,05$).

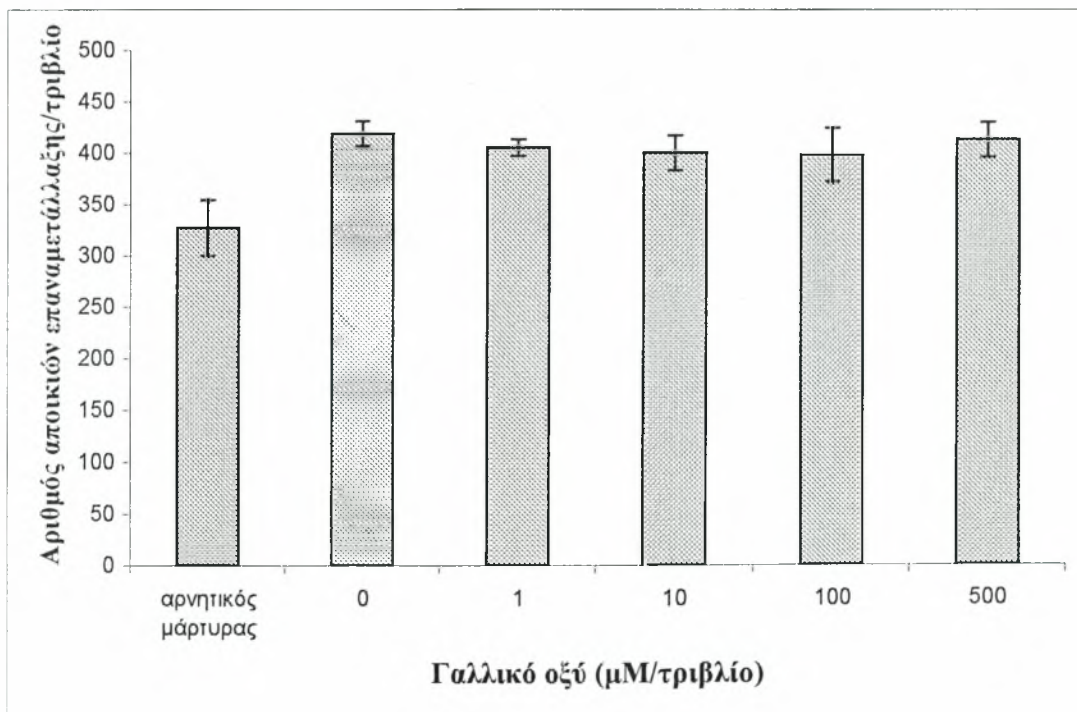
Πίνακας 3.5. Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	327±27		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	419±12		
500μM γαλλικό οξύ	322±24	2**	-
1μM γαλ οξύ+H ₂ O ₂	405±8	15**	-
10μM γαλ οξύ+H ₂ O ₂	400±17	21**	-
100μM γαλ οξύ+H ₂ O ₂	398±26	23**	-
500μM γαλ οξύ+H ₂ O ₂	413±17	7**	-

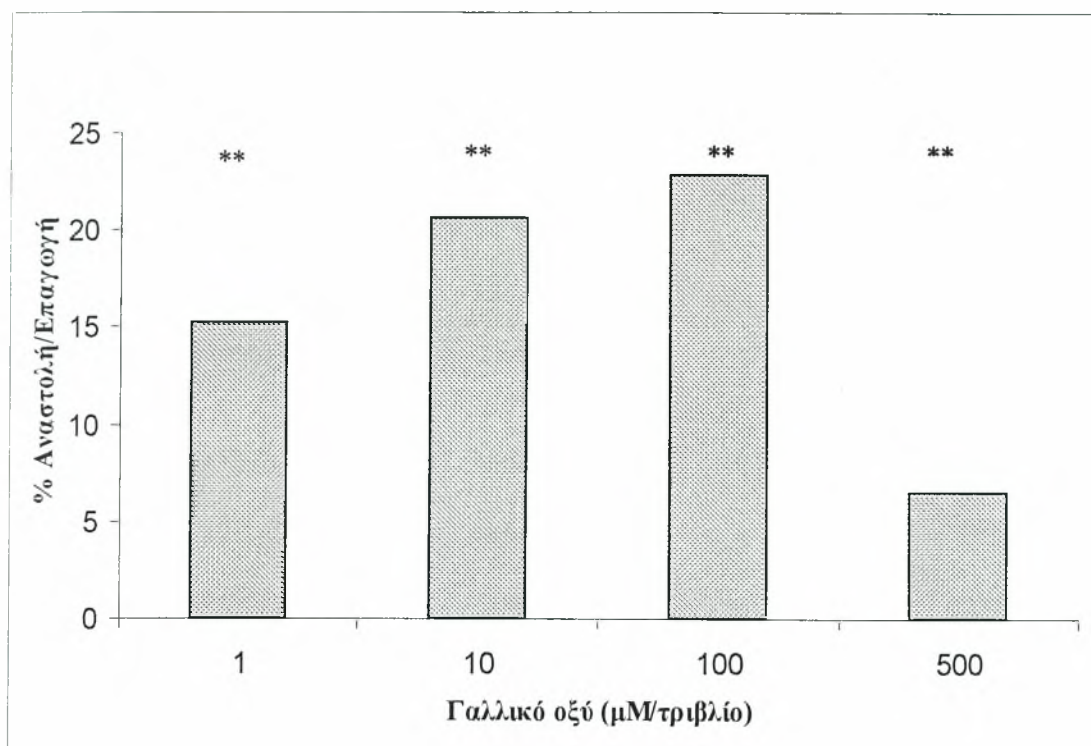
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από της τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

** Η τιμή είναι στατιστικά μη σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.8. Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές της ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.9. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξίγνεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.
 ** Τιμή στατιστικά μη σημαντική ($p < 0,05$).

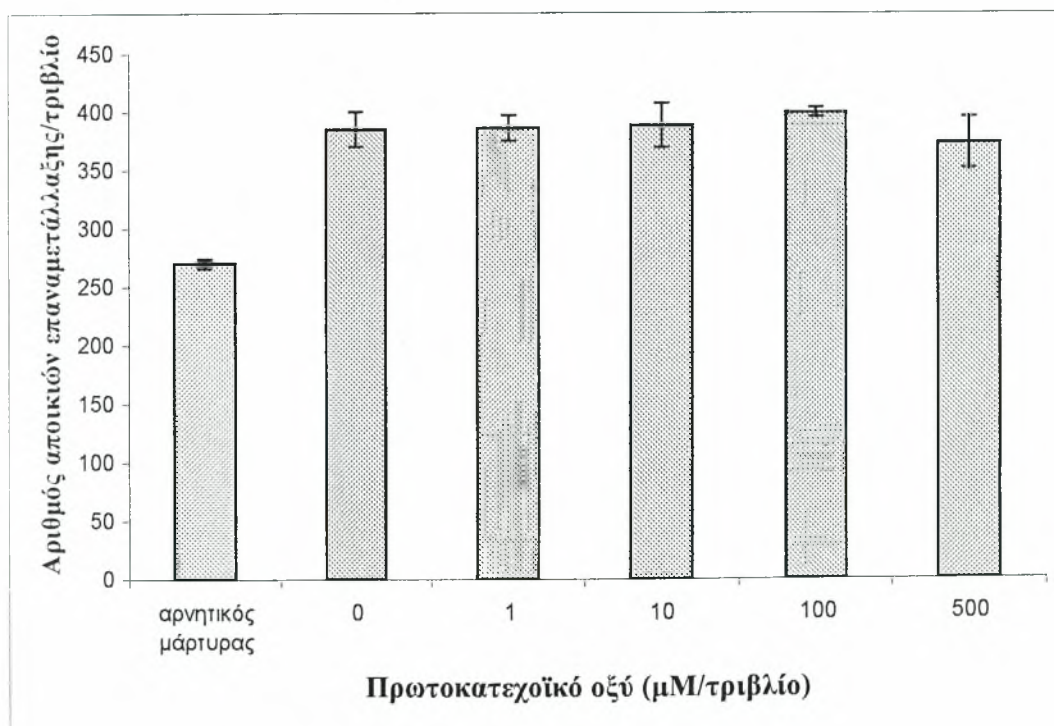
Πίνακας 3.6. Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	270±4		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	385±15		5**
500μM πρωτοκατεχοϊκό οξύ	284±9	-	
1μM πρωτ οξύ+H ₂ O ₂	386±11	-	1**
10μM πρωτ οξύ+H ₂ O ₂	388±19	-	3**
100μM πρωτ οξύ+H ₂ O ₂	399±4	-	12**
500μM πρωτ οξύ+H ₂ O ₂	373±22	10**	-

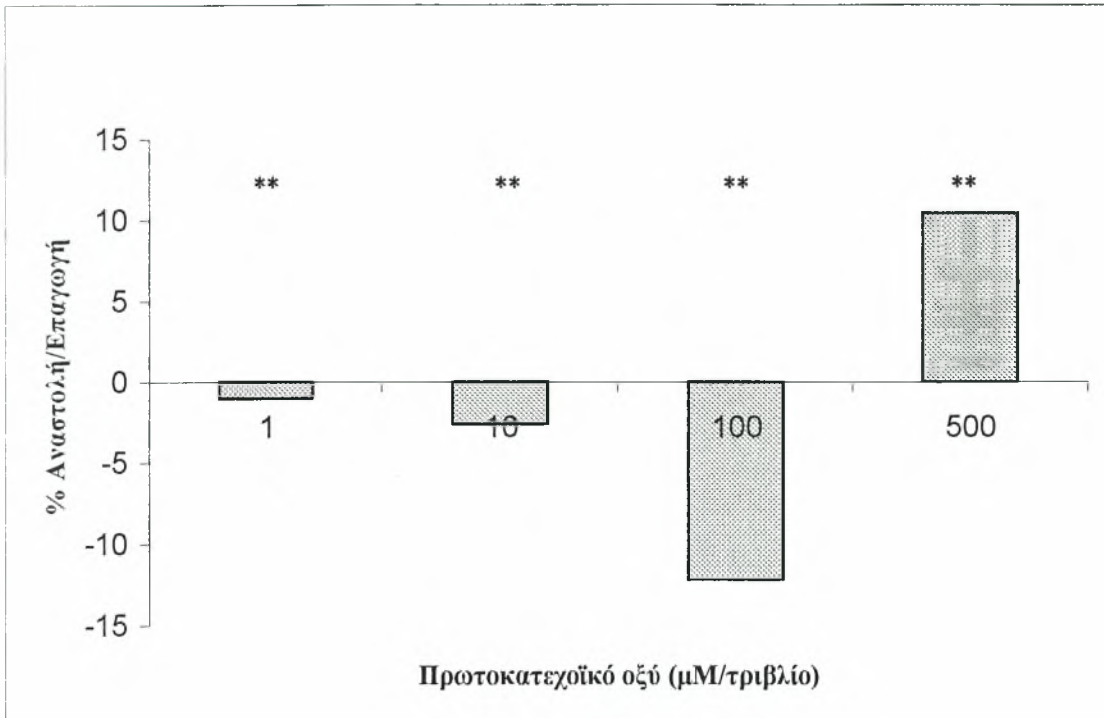
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

** Η τιμή είναι στατιστικά μη σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.10. Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.11. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξίγνεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξίγνεσης. ** Τιμή στατιστικά μη σημαντική ($p < 0,05$).

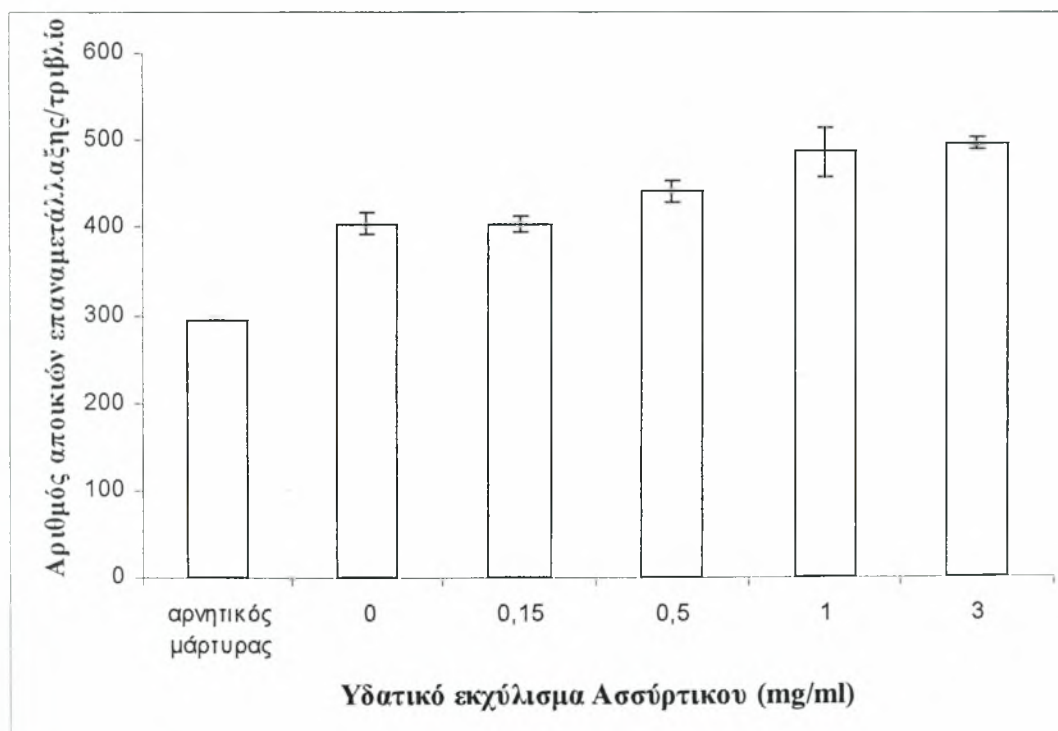
Πίνακας 3.7. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	295±1		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	404±13		
3 mg/ml εκχύλισμα	285±14	3	-
0,15 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	402±9	2	-
0,5 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	441±12	-	34*
1 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	486±28	-	75*
3 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	495±7	-	83*

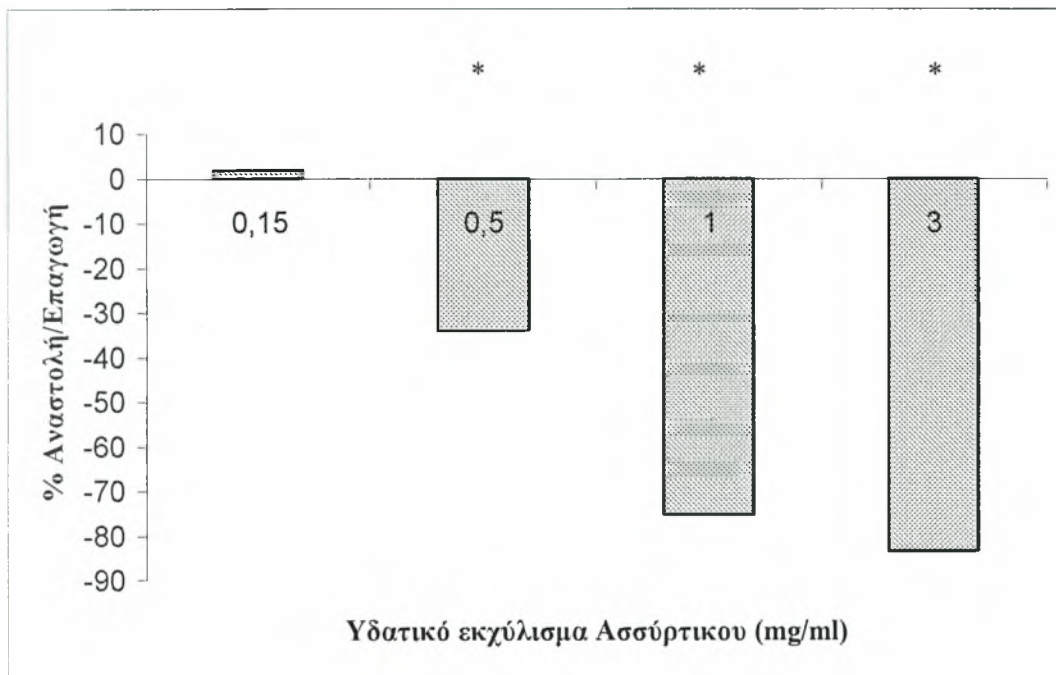
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.12. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.13. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Ασπύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξικένησης. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

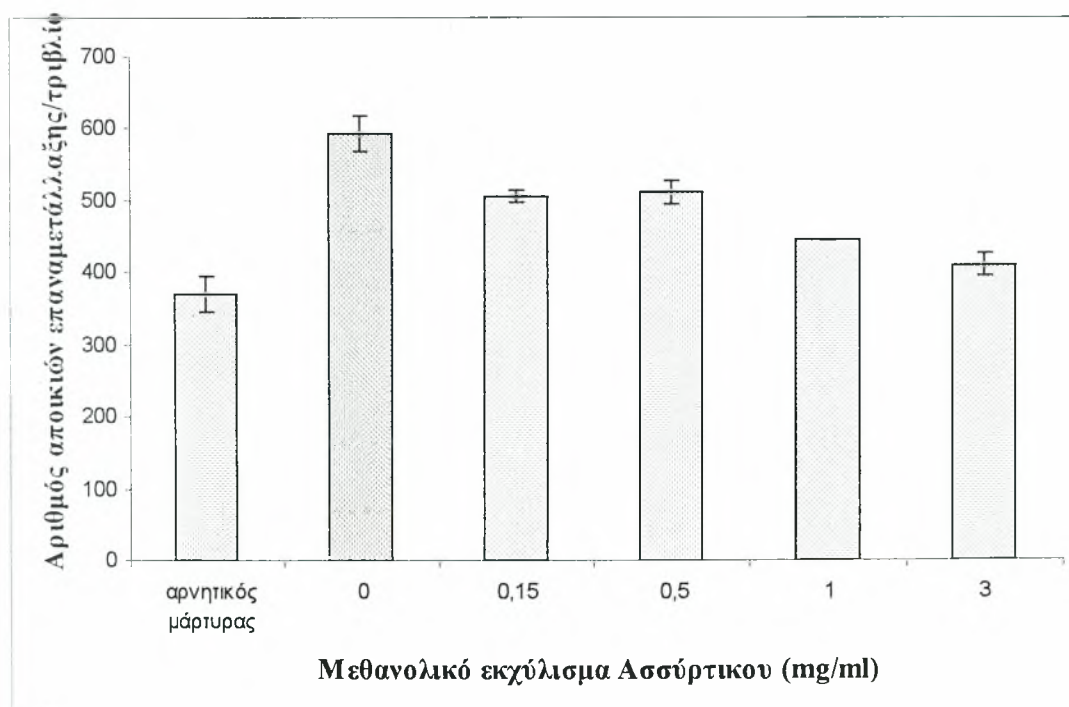
Πίνακας 3.8. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	370±24		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	593±26		
3mg/ml εκχύλισμα	384±17	-	4
0,15 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	506±8	39*	-
0,5 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	510±16	37*	-
1 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	444±2	67*	-
3 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	410±15	82*	-

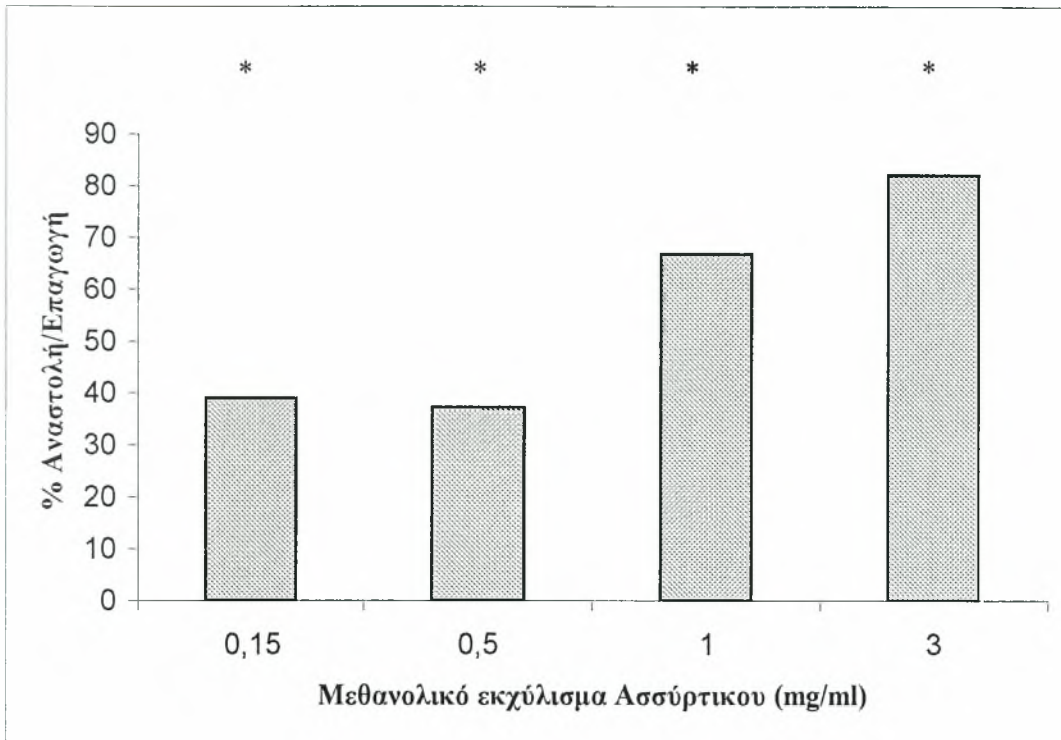
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.14. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.15. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

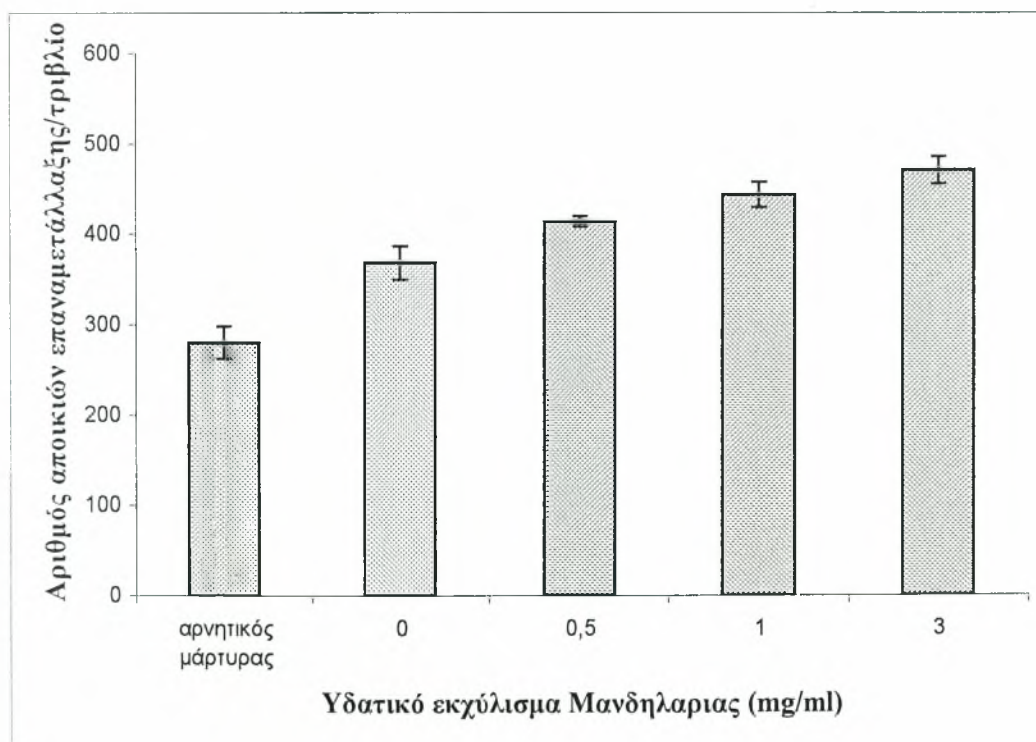
Πίνακας 3.9. Επίδραση του υδατικού εκχύλισματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	280±18		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	368±18		
3mg/ml εκχύλισμα	277±10	1	-
0,5 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	41±36	-	51*
1 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	443±14	-	85*
3 mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	470±15	-	116*

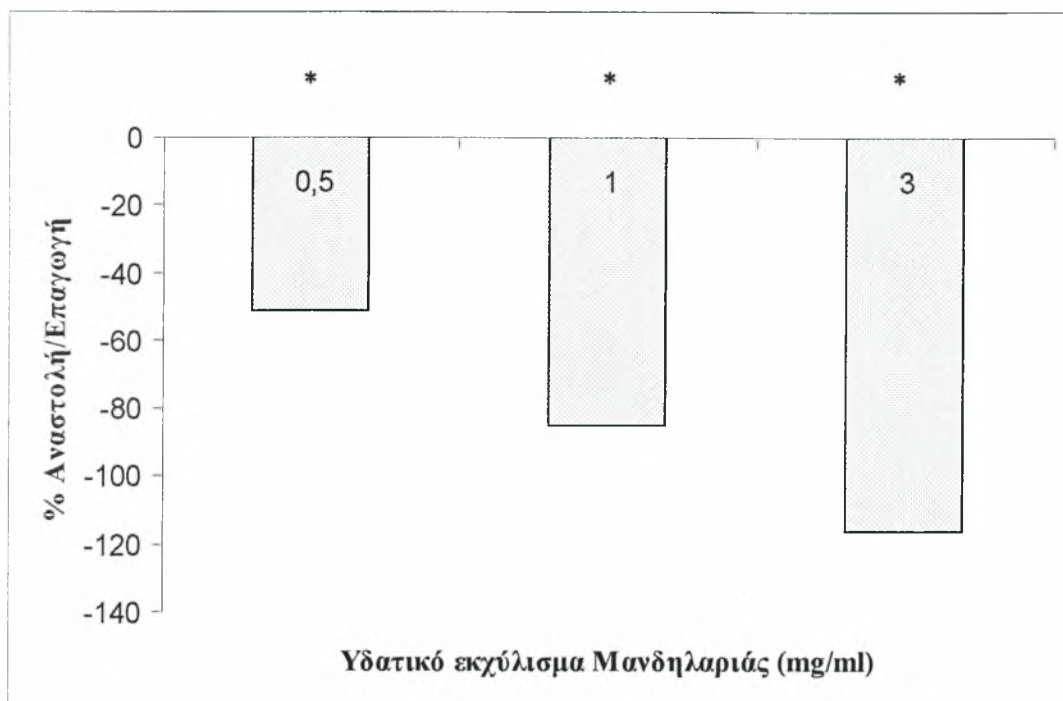
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.16. Επίδραση του υδατικού εκχύλισματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.17. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

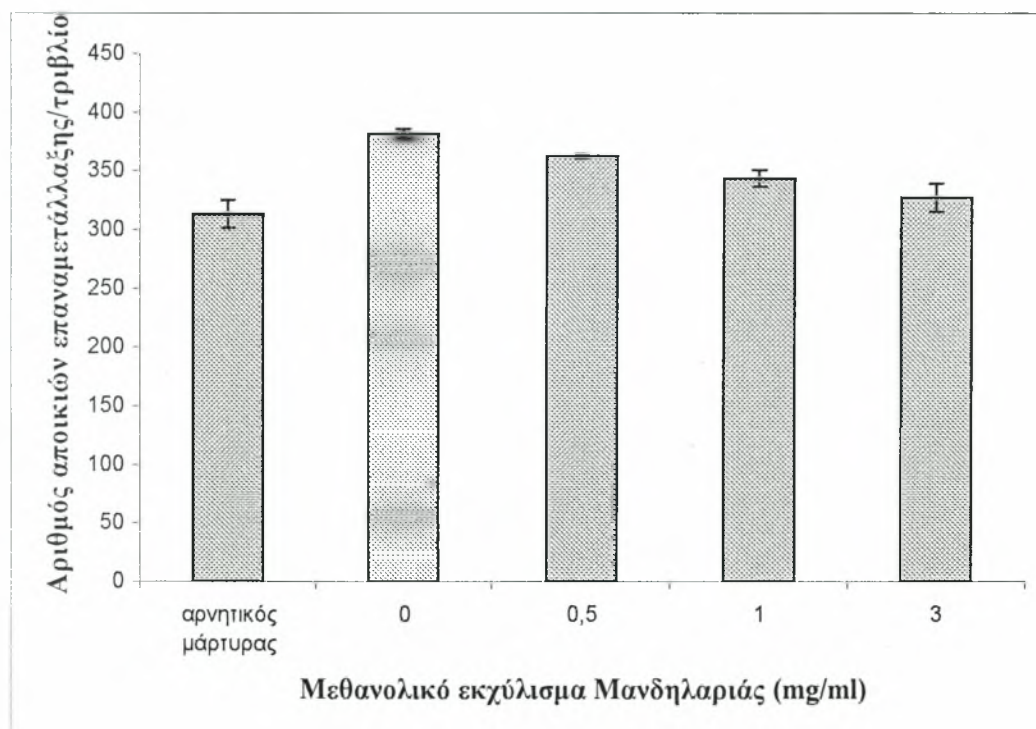
Πίνακας 3.10. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	313±12		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	381±4		
3mg/ml εκχύλισμα	318±26	-	2
0,5mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	362±2	28*	-
1mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	343±7	56*	-
3mg/ml εκχ+H ₂ O ₂	327±12	79*	-

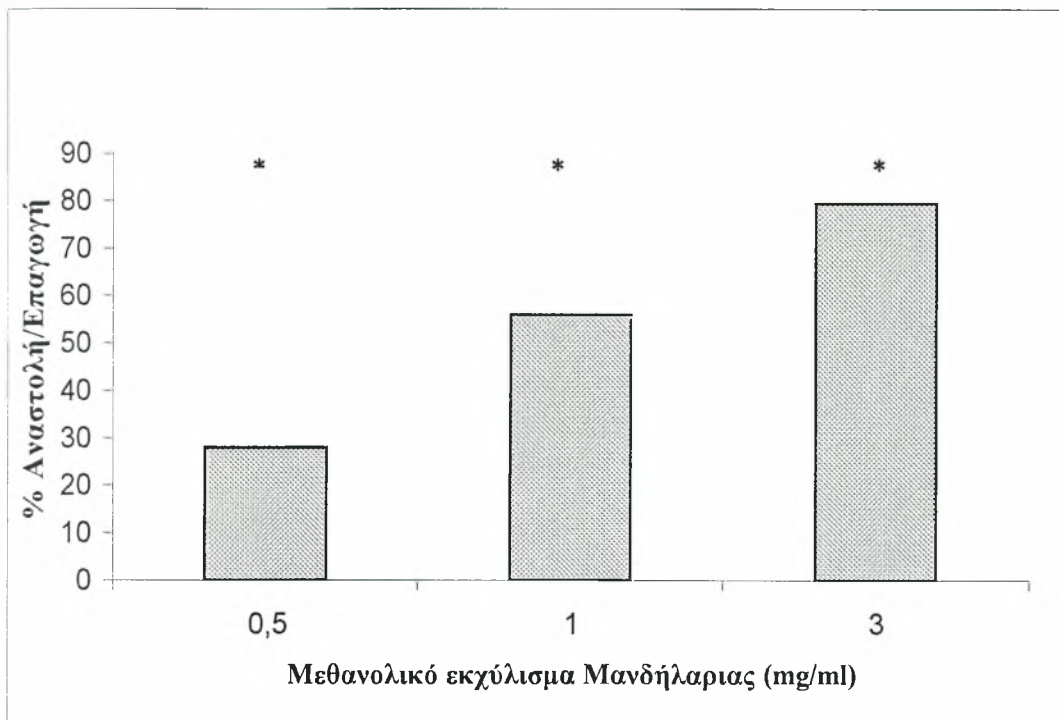
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

*Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.18. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.19. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδήλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

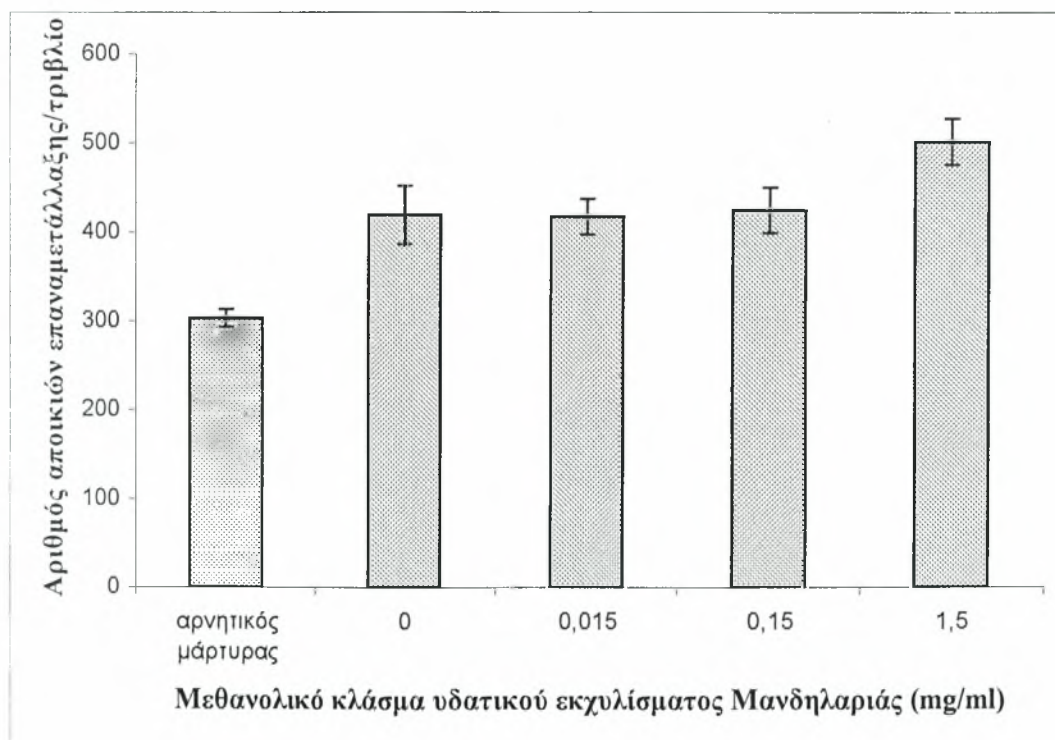
Πίνακας 3.11. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	303±10		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	419±33		
1,5mg/ml κλάσμα	323±27	-	7
0,015mg/ml κλάσμα+H ₂ O ₂	417±20	2	-
0,15mg/ml κλάσμα+H ₂ O ₂	424±26	-	4
1,5mg/ml κλάσμα+H ₂ O ₂	501±26	-	71*

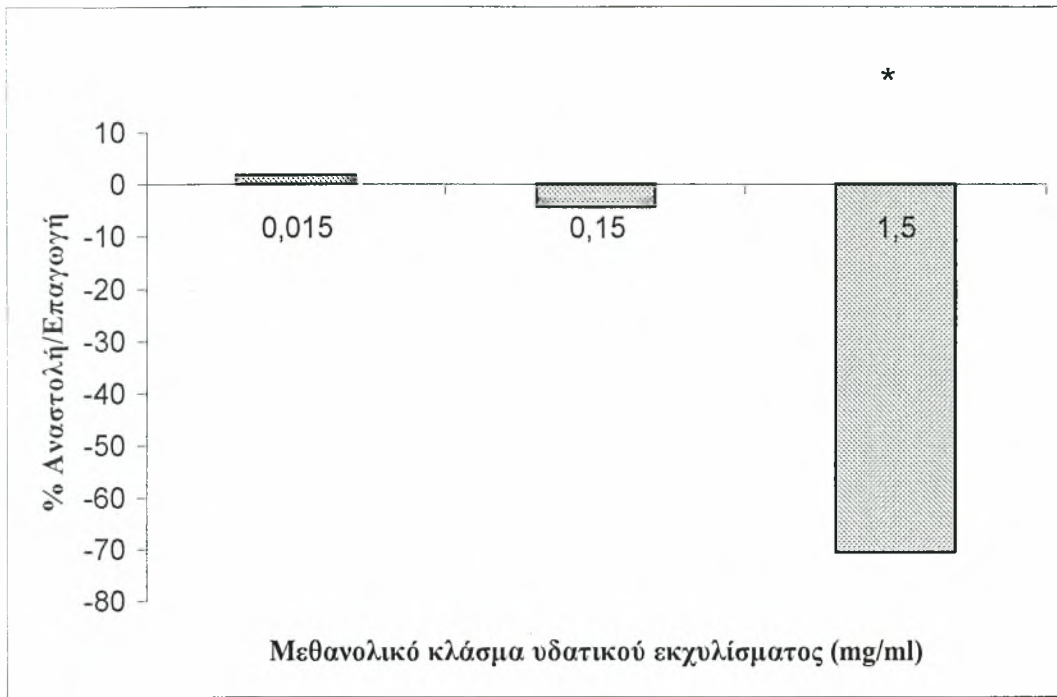
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.20. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.21. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

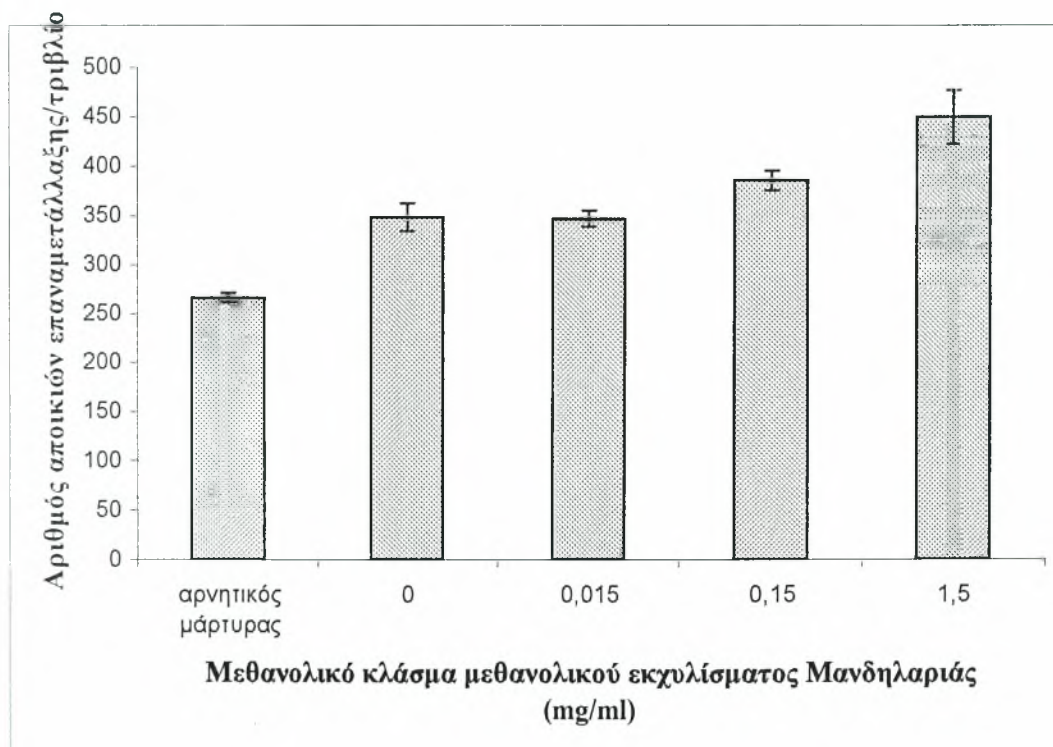
Πίνακας 3.12. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αποικίες επαναμετάλλαξης ¹	% αναστολή	% επαγωγή
αρνητικός μάρτυρας	266±5		
θετικός μάρτυρας-H ₂ O ₂ ²	348±14		
1,5mg/ml κλάσμα	275±11	-	3
0,015mg/ml κλάσμα+H ₂ O ₂	346±8	2	-
0,15mg/ml κλάσμα+H ₂ O ₂	385±10	-	45*
1,5mg/ml κλάσμα+H ₂ O ₂	449±27	-	123*

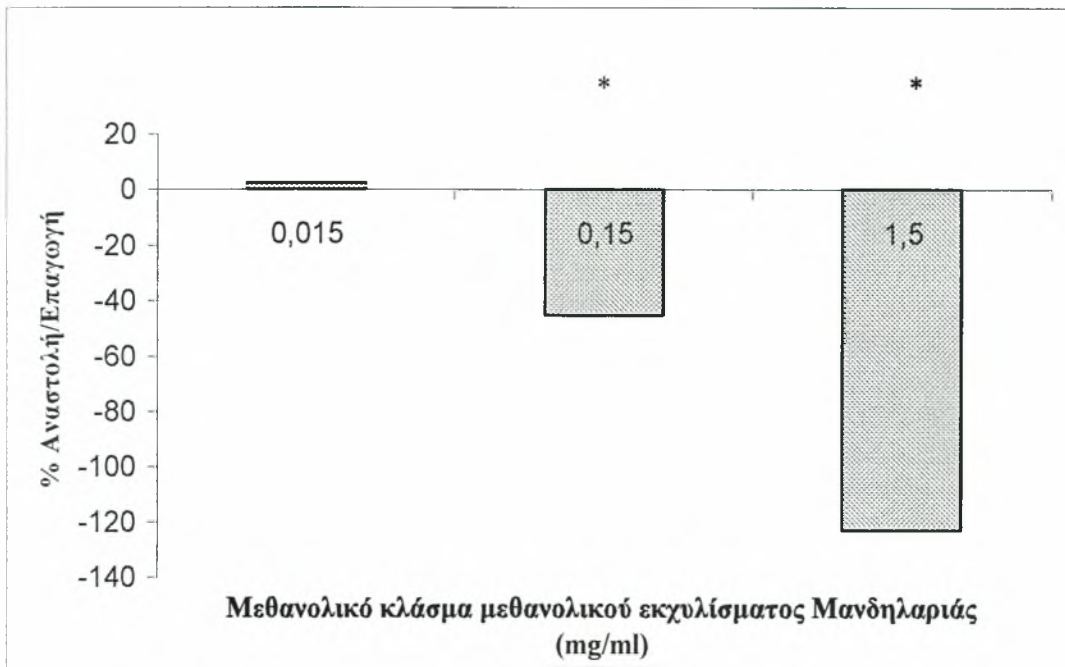
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Η μέση τιμή προκύπτει από τις τιμές δύο πειραμάτων, στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

² Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml.

* Η τιμή είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Εικόνα 3.22. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση του H₂O₂ είναι 50 μg/ml (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα). Οι τιμές είναι η μέση τιμή των αριθμών των αποικιών επαναμετάλλαξης. Οι γραμμές στις ράβδους συμβολίζουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.23. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το φαινόμενο του «Γαλλικού Παραδόξου» έδωσε έναυσμα σε πολλούς ερευνητές να ασχοληθούν με τις πολυφαινόλες, που περιέχονται στο κρασί, καθώς έχει αποδειχτεί από αρκετές μελέτες ότι έχουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες που είναι ωφέλιμες για την ανθρώπινη υγεία (Stoner & Mukhtar, 1995. Ferguson, 2001. Caterall et al, 2000). Σε μία πολλή πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου παρουσίαζαν αντιοξειδωτική δράση (Guendez et al, 2005), ενώ παλιότερα είχε βρεθεί ότι εκχυλίσματα σταφυλιών ανέστειλαν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων μαστού, πνεύμονα και εντέρου (Ye et al, 1999). Η χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων έχει εξηγηθεί με διάφορους βιοχημικούς μηχανισμούς, όπως είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω τροποποίησης των μονοπατιών μεταγωγής του σήματος (Agarwal et al, 2000) και η αναστολή ενζύμων, π.χ. η τοποϊσομεράση I (Stagos et al, υπό δημοσίευση).

Στην παρούσα μελέτη επιδιώχθηκε η ανίχνευση ενός ακόμη μηχανισμού της χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε το ενδεχόμενο, τα εκχυλίσματα, τα κλάσματα και οι πολυφαινόλες των ποικιλιών αμπέλου Μανδηλαριά και Ασσύρτικο Σαντορίνης να έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι μία ουσία που παράγεται στον ανθρώπινο οργανισμό, μέσω της δράσης διαφόρων ενζύμων, όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η δισμουτάση του υπεροξειδίου καθώς και από την αυτοοξειδωση ξενοβιοτικών ουσιών (Halliwell & Gutteridge, 1998). Από μόνο του το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι πολύ ενεργό, σε συνδυασμό όμως με ιόντα σιδήρου ή χαλκού μπορεί, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss (αντίδραση 6) ή της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 7), να παράγει ενεργές ρίζες $\text{OH}\cdot$, οι οποίες προκαλούν χρωμοσωμικές αλλαγές μέσω οξειδωτικής βλάβης των βάσεων ή μέσω ρήξης των κλώνων του DNA (Grey & Adlercreutz, 2003). Συνεπώς, η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εξεταζόμενων ουσιών θα ήταν ιδιαίτερης σημασίας, λόγω της προστασίας από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, που προκαλούνται μέσω ελευθέρων ριζών.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα αναστέλλουν την επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε αναστολή 28, 56 και 79% αντίστοιχα και το μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικου σε συγκεντρώσεις 0,15, 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε αναστολή 39, 37, 67 και 82% αντίστοιχα.

Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων μπορεί να εξηγηθεί μέσω δύο μηχανισμών. Οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα είτε να δεσμεύουν το σίδηρο οπότε αναστέλλεται η αντίδραση Fenton (ενότητα 1.11) είτε να δρουν ως εκκαθαριστές των ενεργών ριζών $\text{OH}\cdot$ (το υπεροξειδίο του υδρογόνου προκαλεί μεταλλάξεις μέσω παραγωγής $\text{OH}\cdot$, παρουσία σιδήρου). Επομένως, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών πιθανόν αποτελεί άλλο ένα μηχανισμό της χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

Αντίθετα, η ρεσβερατρόλη, τα υδατικά εκχυλίσματα και τα κλάσματα ενίσχυσαν την επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Συγκεκριμένα, η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 100 μM έδωσε επαγωγή 60%, το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε επαγωγή 51, 85 και 116% αντίστοιχα, το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 3 mg/ml έδωσε

επαγωγή 34, 75 και 83% αντίστοιχα, το μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 1,5 mg/ml έδωσε επαγωγή 71% και το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 0,15 και 1,5 mg/ml έδωσε επαγωγή 45 και 123% αντίστοιχα.

Η προ-οξειδωτική δράση των παραπάνω δειγμάτων μπορεί να οφείλεται και πάλι στις χηλικές ιδιότητες των πολυφαινόλων, με τη διαφορά ότι το σύμπλοκο πολυφαινόλης – σιδήρου είναι οξειδοαναγωγικά ασταθές, οπότε είναι δυνατή η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω της αντίδρασης Fenton, και η συνεπαγόμενη παραγωγή ενεργών ριζών $\text{OH}\cdot$ (Chan et al, 1999). Μία ακόμη πιθανή εξήγηση της προ-οξειδωτικής δράσης βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων πολυφαινόλων να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, ο οποίος όπως έχει αναφερθεί είναι απαραίτητος για τη μεταλλαξιγόνο δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της αντίδρασης Fenton (Halliwell & Gutteridge, 1998). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ορισμένες πολυφαινόλες προκαλούν βλάβες στο DNA δημιουργώντας σπασίματα στους κλώνους του παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων (Hayakawa et al, 1999. Stagos et al, υπό δημοσίευση). Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινόλων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη χημειοθεραπεία του καρκίνου, καθώς μέσω αυτής επάγεται η απόπτωση καρκινικών κυττάρων (Sun et al, 2004).

Τα αποτελέσματα δημιουργούν μία αντίφαση ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων και την προ-οξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων. Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί στην περίπτωση αυτή είναι σύνθετη. Καταρχάς, τα εκχυλίσματα δεν έχουν την ίδια σύσταση σε πολυφαινόλες. Από τη σύσταση των μεθανολικών εκχυλισμάτων, που παρουσιάζονται στους πίνακες 4.1 και 4.2 (η σύσταση των υδατικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων δεν είναι γνωστή), φαίνεται ότι η συγκέντρωση των πολυφαινόλων με αντιοξειδωτική/αντιμεταλλαξιγόνο δράση είναι μεγαλύτερη από αυτή των πολυφαινόλων με προ-οξειδωτική δράση. Άρα στο αθροιστικό αποτέλεσμα υπερισχύει η αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, στο μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου η συγκέντρωση της κατεχίνης, του *p*-κουμαρικού οξέος και του φερουλικού οξέος, που σύμφωνα με μελέτες άλλων ερευνητών έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη μεταλλαξιγόνο δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (van Acker et al, 1996. Nakayama, 1994. Geetha et al, 2004. Ferguson et al, 2003), είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης, που σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δρα προ-οξειδωτικά. Αντίστοιχα, στο μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς η συγκέντρωση της κερκετίνης, για την οποία επίσης έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη μεταλλαξιγόνο δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Grey & Adlercreutz, 2003. Nakayama, 1994) και των τριών παραπάνω πολυφαινόλων είναι μεγαλύτερη από αυτή της ρεσβερατρόλης. Αντιθέτως, στα υδατικά εκχυλίσματα και στα κλάσματα, που ενίσχυσαν τη μεταλλαξιγόνο δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ίσως να επικρατούν οι πολυφαινόλες με προ-οξειδωτική δράση. Ακόμη, οι πολυφαινόλες μπορεί να αλληλεπιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με άλλα συστατικά των εκχυλισμάτων, ώστε η τελική δράση του εκχυλίσματος να οφείλεται στη συνισταμένη πολλών συστατικών.

4.1. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι δύο ποικιλίες αμπέλου, που χρησιμοποιήθηκαν κρύβουν μία πιθανή αντικαρκινική δράση. Ως αντιοξειδωτικά θα μπορούσαν να αναστείλουν τη βλάβη του DNA από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου, που είναι μία βασική αιτία καρκινογένεσης, αλλά και άλλων ασθενειών. Ως προ-οξειδωτικά θα μπορούσαν να προκαλέσουν διακοπή της ανάπτυξης και επαγωγή της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά η χρήση των εκχυλισμάτων και των πολυφαινόλων των σταφυλιών ως αντικαρκινικά, απαιτεί επιπλέον πειράματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ώστε να διευκρινιστεί η δράση και ο μεταβολισμός τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

Πίνακας 4.1. Σύσταση σε πολυφαινόλες του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

	3 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,15 mg/ml
γαλλικό οξύ (μM)	26	8,7	4,3	1,3
επικατεχίνη (μM)	7	2,3	1,2	0,36
κατεχίνη (μM)	16	5,3	2,7	0,8
p-κουμαρικό οξύ (μM)	0,3	0,1	0,05	0,015
φερουλικό οξύ (μM)	0,22	0,07	0,035	0,01
ρεσβερατρόλη (μM)	2,5	0,83	0,42	0,12
σύνολο (μM)	52,02	17,34	8,67	2,605

Πίνακας 4.2. Σύσταση σε πολυφαινόλες του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

	3 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml
γαλλικό οξύ (μM)	288	96	48
επικατεχίνη (μM)	48	16	8
κατεχίνη (μM)	60	20	10
p-κουμαρικό οξύ (μM)	10	3,3	1,65
φερουλικό οξύ (μM)	2,63	0,88	0,44
ρεσβερατρόλη (μM)	10	3,3	1,65
ρουτίνη(μM)	1,4	0,47	0,23
κερκετίνη(μM)	20	6,67	3,33
σιρινγκικό οξύ(μM)	136	45,33	22,67
σύνολο(μM)	576,03	191,95	95,97

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agarwal C., Sharma Y., Zhao J., Agarwal R. (2000). A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen activated protein kinase activation and inducing G1 arrest and differentiation. *Clinical Cancer Research* 6: 2921-2930.

Alonso AM., Guillén DA., Barroso CG., Puertas B., García A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5832-5836.

A. van de Wiel, PHM. van Golde, HCh. Hart. (2001). Blessings of the grape. *European Journal of Internal Medicine* 12: 484-489.

Awad HM., Boersma MG., Boernen S., van Bladeren PJ., Vervoort J., Rietjens IMCM. (2001). Structure activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol.* 14(4):398-408.

Azam S., Hadi N., Khan NU., Hadi SM. (2004). Pro-oxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in vitro* 18: 555-561.

Aziz MH., Kumar R., Ahmad N. (2003). Cancer chemoprevention by resveratrol: *In vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms (Review). *International Journal of Oncology* 23:17-28.

Caterall F., Souquet J., Cheynier V., Pasqual-Teresa S., Santos-Buelga C., Clifford MN., Ioannides C. (2000). Differential modulation of the genotoxicity of food carcinogens by naturally occurring monomeric and dimeric polyphenolics. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:86-98.

Cavalcante AAM., Rubensam G., Picada JN., da Silva EG., Moreira JCF., Henriques JAP. (2003). Mutagenicity, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41: 360-369.

Chan T., Galati G., O' Brien P. (1999). Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chemico – Biological Interactions* 122: 15-25.

Cook and Samman S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* 7: 66-76.

Dixit R., Gold B. (1986). Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8039-8043.

Ferguson LR. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475: 89-111.

Ferguson LR., Lim IF., Pearson AE., Ralph J., Harris PJ. (2003). Bacterial antimutagenesis by hydrocinnamic acids from plant cell walls. *Mutation Research* 542: 49-58.

Frankel E., Waterhouse A., Teissedre P. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 890-894.

Frémont L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* 66(8): 663-673.

Galati G., O' Brien P. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine* 37(3): 287-303.

Geetha T., Garg A., Chorpa K., Kaur IP. (2004). Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research* 556: 65-74.

Gehm BD., Levenson AS., Liu H., Lee EJ., Amundsen B., Cushman M., Jordan VC., Jameson JL. (2004). Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular biology* 88: 223-234.

Gerhäuser C., Klimo K., Heiss E., Neumann I., Gamal-Eldeen A., Knauff J., Liu G., Sitthimonchai S., Frank N. (2003). Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* (523-524): 163-172.

Grey CE, Adlercreutz P. (2003). Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research* 527: 27-36.

Guendez R., Kallithraka S., Makris DP., Kefalas P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry* 89: 1-9.

Halliwell B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences*.

Halliwell B. and Gutteridge JMC. (1998). Free Radicals in Biology and medicine. Oxford University Press, UK.

Hayakawa FK., Hoshimo T., Ando T. (1999). DNA cleavage activities of (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate with various kind of metal ions. *Biosc. Biotech. Bioch.* 63: 1654-1656.

Heim KE., Tagliaferro AR., Bobilya DJ. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-584

Kambourakis S., Frost JW. (2000). Synthesis of gallic acid: Cu²⁺ - mediated oxidation of 3-dehydroshikimic acid. *Journal of Organic Chemistry* 65: 6904-6909.

Kampa M., Alexaki VI., Notas G., Nifli AP., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtzoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast cancer Research* 6(2).

Kobayashi H., Oikawa S., Hirakawa K., Kawanishi S. (2004). Metal mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutation Research* 558: 111-120.

Kroon PA., Clifford MN., Crozier A., Day AJ., Donovan JL., Manach C., Williamson G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *American Journal of Clinical Nutrition* 80:15-21.

Laughton MJ., Halliwell B., Evans PJ., Hoult JRS. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology* 38: 2859-2865.

Lee WR, Shen SC., Lin HY., Hou WC., Yang LL., Chen YC. (2002). Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase-3, and Ca²⁺ dependent endonuclease. *Biochemical Pharmacology* 63: 225-236.

Levin DE., Hollstein M., Christman MF., Schwiers EA., Ames BN. (1982). A new Salmonella tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7445-7449.

Lopes GK., Schulman HM., Hermes-Lima M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 142-152.

Martín AR., Villegas I., la Casa C., de la Lastra CA. (2004). Resveratrol, a polyphenol found in grapes suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochemical Pharmacology* 67:1399-1410.

Mazza G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 35(4): 341-71.

Middleton E., Kandaswami C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* 43 (6): 1167-1179).

Miksttacka R., Gnojkowski J., Baer-Dubowska W. (2002). Effect of natural phenols on the catalytic activity of cytochrome P450 2E1. *Acta Biochimica Polonica* 49(4): 917-925.

Mohsen MMA., Kuhnle G., Rechner A., Schroeter H., Rose S., Jenner P., Rice-Evans CA. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (12): 1693-1702.

- Mortelmans K., Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455: 29-60.
- Nakayama T. (1994). Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Research* 54: 1991-1993.
- Neiva TJ. et al. (1999). Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother Res* 1999 13(7):597-600.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews* 23(4): 519-534.
- Renaud S, de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 339(8808):1523-6.
- Rizvi SI., Zaid MA. (2001). Insulin-like effect of (-)epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(9):776-778.
- Rong Y., Yang EB., Zhang K., Mack P. (2000). Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer research* 20: 4339-4345.
- Schwarch D., Roots I. (2003). In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303: 902-907.
- Smith WA., Freeman JW., Gupta RC. (2001). Effect of chemopreventive agents on DNA adduction induced by the potent mammary carcinogen dibenzo(*a,l*)pyrene in the human breast cells MCF-7. *Mutation Research* (480-481): 97-108.
- Soleas GJ., Diamandis EP., Goldberg DM. (1997). Wine as a biological fluid: History, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11: 287-313.
- Spencer JPE., Abd El Mohsen MM., Rice-Evans C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 423:148-161.
- St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1(8124):1017-1020.
- Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S., Anagnostopoulos C., Kouretas D. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mytomycin C and topoisomerase I nicking of DNA: (υπό δημοσίευση).
- Stoner GD, Muchtar H. (1995). Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 22: 169-180.

- Sun S., Hail N., Lotan R. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of National Cancer Institute* 96: 662-672.
- Tamura A., Fukushima M., Shimada K., Han KH., Sekikawa M., Watanabe S., Nakano M., Matsumoto M., Chiji H. (2004). Cholesterol Metabolism in Rat Is Affected by Protocatechuic Acid. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 50(1).
- Valls-Bellés V., González P., Muñiz P. (2004). Epicatechin effect on oxidative damage induced by *tert*-BOOH in isolated hepatocytes of fasted rats. *Process Biochemistry* 39: 1525-1531.
- Van Acker SABE., van den Berg D., Tromp MNJL., Griffioen DH., van Bennekom WP., van der Vijgh WJF., Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 20(3): 331-342.
- Wang I-K., Lin-Shiau S-Y., Lin J-K. (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *European Journal of cancer* 35(10): 1517-1525.
- Ye X., Krohn RL., Lui W., Joshi SS., Kuszynskic A., Mc Ginn TR., Bagchi M., Rheuss HG., Stohs SF., Bagchi D. (1999). The cytotoxic effects of novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol. Cell Biochem.* 196: 99-108.
- Yen GC., Duh PD., Tsai HL. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* 79: 307-313.
- Yilmaz Y., Toledo RT. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15: 422-433.