

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαργαρίτη Μαρία

**Επίδραση φυτικών πολυφαινολών και εκχυλισμάτων της
ελληνικής ποικιλίας αμπέλου *Μανδηλαριά Σαντορίνης*
στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C μεταλλαξιγένεση
σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα**



Λάρισα 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαργαρίτη Μαρία

Επίδραση φυτικών πολυφαινολών και εκχυλισμάτων της
ελληνικής ποικιλίας αμπέλου *Μανδηλαριά Σαντορίνης*
στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C μεταλλαξιγένεση
σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα



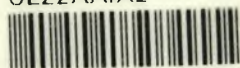
Λάρισα 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4427/1
Ημερ. Εισ.: 19-09-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΜΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087895

Ευχαριστίες

Νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την τιμή που μου έκανε, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για την προθυμία του να με συμβουλευτεί και να με καθοδηγήσει καθ' όλη τη διάρκεια αυτής.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα, την υπομονή με την οποία με αντιμετώπισε, καθώς και τη συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωσταρόπουλο Ιάσονα για τις χρήσιμες επιστημονικές του συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, πρέπει να ευχαριστήσω τη συμφοιτήριά μου Σπανού Χρυσούλα για την άψογη και ευχάριστη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου, αλλά και την καλή μου φίλη Γκούγκουρα Σοφία για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Μαρία Ε. Μαργαρίτη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Περιεχόμενα εικόνων	5
Περιεχόμενα πινάκων	7
Συντομογραφίες	8
Περίληψη	9
1. Εισαγωγή	10
1.1. Γενικά	10
1.1.α. Ιδιότητες και χημική σύσταση κρασιού-σταφυλιών	10
1.2. Πολυφαινόλες	11
1.2.α. Γενικά	11
1.2.β. Περιεκτικότητα του κρασιού σε πολυφαινόλες	12
1.2.γ. Χημική δομή των πολυφαινολών	13
1.2.δ. Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών	16
1.2.ε. Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών	18
1.2.στ. Μεταβολισμός των πολυφαινολών	19
1.3. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών	22
1.3.α. Γενικά: Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες	22
1.3.β. Αντιοξειδωτική-Καρδιοπροστατευτική δράση	24
1.3.γ. Χημειοπροστατευτική-Αντικαρκινική δράση	27
1.3.δ. Προοξειδωτική δράση	30
1.4. Γαλλικό οξύ	32
1.5. Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	33
1.6. Κερκετίνη	34
1.7. Ρουτίνη	35
1.8. Μεθανολικά-Υδατικά εκχυλίσματα Μανδηλαριάς	36
1.9. Μιτομυκίνη C	37
1.10. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας	39
2. Υλικά και μέθοδοι	40
2.1. Υλικά	40
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	40
2.1.2. Κύτταρα	41
2.1.3. Ουσίες και εκχυλίσματα σταφυλιών	41
2.2. Μέθοδοι	41
2.2.1. Χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister chromatid exchanges ή SCEs)	41
2.2.1.α. Γενικά	41
2.2.1.β. Η μέθοδος	42
2.2.1.γ. Εφαρμογές των χρωματιδιακών ανταλλαγών	43
2.2.2. Πειραματική διαδικασία	46
2.2.2.α. Καλλιεργητικά Υλικά και χημικά αντιδραστήρια	46
2.2.2.β. Εξοπλισμός και όργανα	47
2.2.2.γ. Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων	47
2.2.2.δ. Απομόνωση των λεμφοκυττάρων (διαδικασία πλύσεων)	48
2.2.2.ε. Χρώση των παρασκευασμάτων των αντικειμενοφόρων πλακών κατά Fluorescence Plus Giemsa	48
2.2.2.στ. Παρατήρηση και μελέτη των SCEs των κυττάρων	48
2.2.2.ζ. Υπολογισμός % αναστολής/επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης (χρωματιδιακών ανταλλαγών)	49
2.2.3. Δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού (Proliferation Rate Index)	49
2.2.4. Στατιστική μελέτη	49

3. Αποτελέσματα	52
3.1. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιτομυκίνης C στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (καμπύλη μιτομυκίνης)	52
3.2. Επίδραση των διαλυτών στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	52
3.3. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	52
4. Συζήτηση	69
Βιβλιογραφία	75

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Σελίδα

<u>Εικόνα 1.1.</u> Η γενική δομή των φλαβονοειδών	13
<u>Εικόνα 1.2.</u> Οι δομές των κύριων κατηγοριών των φλαβονοειδών	14
<u>Εικόνα 1.3.</u> Χημικές δομές της <i>trans</i> - και της <i>cis</i> - ισομορφής της ρεσβερατρόλης	15
<u>Εικόνα 1.4.</u> Χημικές δομές της γλυκοσίδης της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης, της α-βινιφερίνης και της ε-βινιφερίνης	16
<u>Εικόνα 1.5.</u> Μονοπάτι βιοσύνθεσης του <i>trans</i> -κινναμικού οξέος	17
<u>Εικόνα 1.6.</u> Μονοπάτι βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών	17
<u>Εικόνα 1.7.</u> Αντιδράσεις που καταλύονται από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS) και τη συνθάση της ρεσβερατρόλης (RS). Το ένα μονοπάτι οδηγεί στη βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης	18
<u>Εικόνα 1.8.</u> Α) Απλοποιημένο διάγραμμα που δείχνει το μεταβολισμό των πολυφαινόλων. Β) Πιθανές οδοί για τις πολυφαινόλες που καταναλώνει ο άνθρωπος	21
<u>Εικόνα 1.9.</u> Σχηματική αναπαράσταση μιας διαμήκουσ τομής αρτηρίας.	25
<u>Εικόνα 1.10.</u> Αναστολή της αγγειογένεσης από τις πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη (CAM) από έμβρυο κοτόπουλου	28
<u>Εικόνα 1.11.</u> Η διαδικασία της αγγειογένεσης ξεκινά με την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας από από μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), όπως η MMP-2 και με αύξηση της διαπερατότητας του αγγείου	30
<u>Εικόνα 1.12.</u> Πιθανός μηχανισμός των διαμεσολαβούμενων από μέταλλα βλαβών του DNA που προκαλεί το γαλλικό οξύ, ένας μεταβολίτης του προπυλ-γαλλικού	33
<u>Εικόνα 1.13.</u> Χημική δομή του γαλλικού οξέος (τριϋδροξυβενζοϊκού οξέος	33
<u>Εικόνα 1.14.</u> Χημική δομή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ)	34
<u>Εικόνα 1.15.</u> Χημική δομή της κερκετίνης (3', 3', 4', 5, 7-πενταϋδροξυφλαβόνη)	35
<u>Εικόνα 1.16.</u> Χημική δομή της ρουτίνης (3-ο-ραμνοσυλ-γλυκοσυλ-κερκετίνη)	36
<u>Εικόνα 1.17.</u> Σταφύλια (κόκκινα) ελληνικής ποικιλίας Μανδηλαριάς Σαντορίνης	37
<u>Εικόνα 1.18.</u> Χημική δομή της μιτομυκίνης C	38
<u>Εικόνα 2.1.</u> Σχηματική αναπαράσταση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σ' ένα χρωμόσωμα δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης	42
<u>Εικόνα 2.2.</u> Η κολχικίνη προστίθεται στις 72 ώρες έτσι ώστε τα κύτταρα να έχουν συμπληρώσει δυο μιτωτικές διαιρέσεις και να «μπλοκάρουν» στη μετάφαση όπου τα χρωμοσώματα είναι πολύ συμπυκνωμένα και παρατηρούνται εύκολα	43
<u>Εικόνα 2.3.</u> Διαγραμματική αναπαράσταση της δράσης της BrdU στην καλλιέργεια, με βάση τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αντιγραφής του DNA	44
<u>Εικόνα 2.4.</u> Μεταφασικά χρωμοσώματα Α) Πρώτης μιτωτικής διαίρεσης, Β) Δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης και Γ) Τρίτης μιτωτικής διαίρεσης, όπως αυτά φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο	45
<u>Εικόνα 3.1.</u> Καμπύλη συσχέτισης της συγκέντρωσης μιτομυκίνης με το μέσο όρο του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο για κάθε καλλιέργεια	54
<u>Εικόνα 3.2.</u> Επίδραση της μεθανόλης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	55
<u>Εικόνα 3.3.</u> Επίδραση του DMSO στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	56
<u>Εικόνα 3.4.</u> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	57

<u>Εικόνα 3.5.</u> Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	58
<u>Εικόνα 3.6.</u> Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	59
<u>Εικόνα 3.7.</u> Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	60
<u>Εικόνα 3.8.</u> Επίδραση του γαλλικού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	61
<u>Εικόνα 3.9.</u> Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του γαλλικού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	62
<u>Εικόνα 3.10.</u> Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	63
<u>Εικόνα 3.11.</u> Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	64
<u>Εικόνα 3.12.</u> Επίδραση της κερκετίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	65
<u>Εικόνα 3.13.</u> Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της κερκετίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	66
<u>Εικόνα 3.14.</u> Επίδραση της ρουτίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	67
<u>Εικόνα 3.15.</u> Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της ρουτίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο	68

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Σελίδα

<u>Πίνακας 1.1.</u> Μέσες αναλογίες (mg/l) ορισμένων πολυφαινόλων που υπάρχουν στο κρασί	12
<u>Πίνακας 1.2.</u> Δομές των σημαντικότερων φυσικών φαινολικών οξέων	15
<u>Πίνακας 1.3.</u> Σύσταση σε πολυφαινόλες του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε διάφορες συγκεντρώσεις	36
<u>Πίνακας 1.4.</u> Σύσταση σε πολυφαινόλες του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε διάφορες συγκεντρώσεις	37
<u>Πίνακας 2.1.</u> Τιμές Κατανομής t-student	51
<u>Πίνακας 3.1.</u> Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιτομυκίνης C στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (καμπύλη μιτομυκίνης)	54
<u>Πίνακας 3.2.</u> Επίδραση της μεθανόλης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	55
<u>Πίνακας 3.3.</u> Επίδραση του DMSO στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	56
<u>Πίνακας 3.4.</u> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	57
<u>Πίνακας 3.5.</u> Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	59
<u>Πίνακας 3.6.</u> Επίδραση του γαλλικού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	61
<u>Πίνακας 3.7.</u> Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	63
<u>Πίνακας 3.8.</u> Επίδραση της κερκετίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	65
<u>Πίνακας 3.9.</u> Επίδραση της ρουτίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	67

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SCEs: χρωματιδιακές ανταλλαγές
ROS: δραστικές μορφές οξυγόνου
RWPCs: πολυφαινολικά συστατικά του κόκκινου κρασιού
PAHs: πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες
HDL: λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
RNS: δραστικές μορφές αζώτου
SOD: δισμουτάση του σουπεροξειδίου
eNOS: επαγόμενη μορφή της συνθάσης του NO
CAM: χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη
CDKs: κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες
GSH: γλουταθειόνη
COX: κυκλοοξυγενάση
DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο
GSH-Px: περοξειδάση της γλουταθειόνης
LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
BrdU: 5-βρωμοδεοξουριδίνη
PRI: δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες είναι συστατικά της ανθρώπινης διαίτας, καθώς βρίσκονται σε αφθονία σε φρούτα και λαχανικά, αλλά και σε προϊόντα επεξεργασίας τους (π.χ. κρασί). Οι ευεργετικές δράσεις των πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία ανακαλύφθηκαν με επιδημιολογικές μελέτες που έδειξαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και της ανάπτυξης στεφανιαίας καρδιακής νόσου. Έκτοτε, έχει πραγματοποιηθεί μια πληθώρα ερευνών *in vitro* και *in vivo*, οι οποίες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες εκτός από καρδιοπροστατευτική δράση έχουν επίσης αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιγόνες και γενικότερα χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια ανίχνευσης πιθανών νέων μηχανισμών χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιών. Αυτό επιτεύχθηκε με τη μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιών στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (δείκτης μεταλλαξιγένεσης) που επάγει η μιτομυκίνη C, ένας οξειδωτικός παράγοντας, σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα *in vitro*. Οι ουσίες που εξετάστηκαν ήταν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, η κερκετίνη και η ρουτίνη, καθώς και το υδατικό και το μεθανολικό εκχύλισμα σταφυλιών Μανδηλαριάς Σαντορίνης. Η κερκετίνη ήταν η μόνη πολυφαινόλη που μείωνε τον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών που προκαλούσε η μιτομυκίνη C. Το γαλλικό οξύ, η ρουτίνη και τα δύο εκχυλίσματα σταφυλιών Μανδηλαριάς Σαντορίνης ενίσχυαν τη δράση της μιτομυκίνης, αφού αύξαναν τις χρωματιδιακές ανταλλαγές, ενώ το πρωτοκατεχοϊκό οξύ δεν είχε καμία επίδραση σ' αυτές. Η προοξειδωτική δράση του γαλλικού οξέος, της ρουτίνης και των δύο εκχυλισμάτων σταφυλιών Μανδηλαριάς ίσως να αποτελεί έναν μηχανισμό χημειοπροστασίας μέσω επαγωγής της απόπτωσης, εν αντιθέσει με τον άμεσο αντιοξειδωτικό μηχανισμό δράσης της κερκετίνης που πιθανότατα περιλαμβάνει τη δέσμευση ιόντων μετάλλων και το σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με αυτά, εμποδίζοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι πολυφαινόλες με προοξειδωτική δράση μπορούν επιπλέον να βρουν εφαρμογή και στη χημειοθεραπεία του καρκίνου, καθιστώντας πιο αποτελεσματική τη δράση της μιτομυκίνης C.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

1.1.α. Ιδιότητες και χημική σύσταση κρασιού-σταφυλιών

«Οίνος καρδίαν ανθρώπου ευφραίνει». Ο άνθρωπος παράγει και πίνει κρασί εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Οι παλαιότερες μαρτυρίες για την παραγωγή κρασιού χρονολογούνται περίπου στο 6000 π.Χ., στον βόρειο Καύκασο. Από εκεί, το κρασί διαδόθηκε σε πολλές άλλες χώρες, όπου και έγινε αποδεκτό ως στοιχείο πλέον της κοινωνίας, του πολιτισμού και της θρησκείας.

Το κρασί έχει θεωρηθεί ως ένα ποτό που έχει την ιδιότητα να δρα ως διεγερτικό, ορεκτικό, ακόμα και ως αναλγητικό για πολλούς σωματικούς πόνους, όπως επίσης όμως και ένα προϊόν που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές δυσλειτουργίες όπως το σύνδρομο Wernicke-Korsakov, καρδιομυοπάθεια, κίρρωση του ήπατος και μερικές μορφές καρκίνου. Παρόλα αυτά, οι πρώτες έρευνες στη δεκαετία του 1970 έδειξαν ότι άνδρες και γυναίκες με μέτρια κατανάλωση αλκοόλ είχαν σημαντικά μικρότερες πιθανότητες θανάτου από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε σχέση με τα άτομα που δεν έπιναν (Van de Wiel A. et al., 2001). Πολλές επιδημιολογικές μελέτες σ' ολόκληρο τον κόσμο έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ λιγοστής έως μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ και μειωμένου κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας καρδιακής νόσου και ισχαιμικού σοκ. Ιδιαίτερα σε χώρες με υψηλή κατανάλωση κρασιού τα παρατηρούμενα ποσοστά θνησιμότητας λόγω καρδιακών επεισοδίων ήταν χαμηλά.

Το κρασί παράγεται από τις ποικιλίες σταφυλιού *Vitis vinifera*, της οικογένειας Vitaceae. Στο κρασί έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 ενώσεις μέχρι σήμερα, εκ των οποίων 160 είναι εστέρες. Οι περισσότερες από αυτές είναι παρούσες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (μεταξύ 10^{-1} και 10^{-6} mg/L), μερικές όμως βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100mg/L. Μεταξύ των ενώσεων αυτών συμπεριλαμβάνονται και το νερό, οι αλκοόλες (κυρίως η αιθανόλη), τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη), η γλυκερόλη και οι πολυφαινόλες. Η ταυτοποίηση όλων αυτών των ενώσεων οφείλεται βασικά στην ανάπτυξη των σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων, όπως η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματοσκοπία μάζας (MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Soleas G. et al., 1997).

Το ενδιαφέρον για τα πιθανά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία από τα κόκκινα κρασιά αυξήθηκε κατακόρυφα αμέσως μετά την διατύπωση του «Γαλλικού Παράδοξου». Αυτό βασίστηκε σε έρευνες που έδειξαν ότι άνθρωποι στη Γαλλία και την Ιταλία, δύο από τις κύριες οινοπαραγωγούς χώρες της Ευρώπης, ενώ ακολουθούσαν έναν τρόπο ζωής που χαρακτηριζόταν από υψηλή σε κορεσμένα λιπαρά διαίτα, ελάχιστη σωματική άσκηση και κάπνισμα, παρουσίαζαν χαμηλά ποσοστά ανάπτυξης στεφανιαίας καρδιακής νόσου λόγω της συχνής τους κατανάλωσης κόκκινου κρασιού σε σχέση με άτομα άλλων χωρών (π.χ. της Νότιας Αμερικής ή των περιοχών της Βόρειας Ευρώπης) (Tomera J.F., 1999). Έτσι, η μεσογειακή διαίτα αποτέλεσε πηγή έμπνευσης για έναν υγιεινό τρόπο ζωής, τονίζοντας το ρόλο των θρεπτικών συστατικών. Πέρα από το κρασί, η υψηλή πρόσληψη φρέσκων φρούτων και λαχανικών, η χρήση ελαιόλαδου και η κατανάλωση περισσότερων ψαριών και λιγότερου κόκκινου κρέατος, θεωρούνται όλα σημαντικά στοιχεία αυτής της υγιεινής διατροφής.

Ορισμένες από τις καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις στους Γάλλους και τους Ιταλούς πιθανώς οφείλονται στη μέτρια κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών, ενώ η προστασία από την αθηροσκλήρωση αποδίδεται στην ίδια την αιθανόλη του κρασιού. Έχει βρεθεί επίσης ότι η αιθανόλη αυξάνει τα επίπεδα της HDL στην κυκλοφορία, ενώ μεταβάλλει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Van de Wiel A. et al., 2001).

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση κρασιού εμποδίζει την οξειδωση της LDL, ενώ έχει την ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες. Η αιθανόλη όμως από μόνη της δεν έχει αυτές τις ιδιότητες, οπότε αυτές θα πρέπει να αποδοθούν στις πολυφαινόλες που περιέχει το κόκκινο κρασί (Dreosti I.E., 2000).

1.2. Πολυφαινόλες

1.2.α. Γενικά

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται στα σταφύλια και σε άλλα φρούτα και λαχανικά. Αν και οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, σε υψηλές συγκεντρώσεις βρίσκονται σε μερικές μόνο τροφές και ποτά, όπως στα εσπεριδοειδή, στα μήλα, στα κρεμμύδια, στα αχλάδια, στη σοκολάτα, στο τσάι, στον καφέ και το κακάο, στο κρασί, στους χυμούς σταφυλιών και στο ξύδι. Γενικά, σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν περισσότερες από 8000 φαινολικές ενώσεις στα φυτά (Scalbert A. and Williamson G., 2000).

Τα σταφύλια, *Vitis vinifera*, ένα από τα πιο ευρέως καταναλισκόμενα φρούτα στον κόσμο, αποτελούν μια εξαιρετική πηγή πολυφαινολών, είτε όταν καταναλώνονται ως φρέσκα φρούτα, είτε ως επεξεργασμένα προϊόντα της διαδικασίας παραγωγής κρασιού (Tomera J.F., 1999). Το 90-95% των πολυφαινολών του σταφυλιού εντοπίζονται στους σπόρους και στη φλούδα του. Τα σταφύλια έχουν διαφορετική σύσταση σε πολυφαινόλες σε σχέση με τις άλλες πηγές τους. Για παράδειγμα, στην πλειοψηφία τους είναι διαφορετικές από αυτές του τσαγιού, καθώς κυρίως πρόκειται για πολυμερείς ενώσεις, ενώ στο τσάι οι πολυφαινόλες είναι μονομερείς (π.χ. κατεχίνες) (Iijima K. et al., 2002).

Τα περισσότερα φυτά συνθέτουν διαρκώς φαινυλπροπανοειδή όπως τα φλαβονοειδή και τα υδροξυκιναμικά οξέα. Παρόλα αυτά, μεγάλη συσσώρευση πολυφαινολών στα φυτά μπορεί να προκληθεί υπό συνθήκες αβιοτικού και βιοτικού στρες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, οι χαμηλές θερμοκρασίες, οι τραυματισμοί, οι χαμηλές ποσότητες θρεπτικών ουσιών και η προσβολή από παθογόνα (Sakihama Y. et al., 2002). Ο ακριβής τους ρόλος στα ίδια τα φυτά δεν είναι επακριβώς γνωστός. Γενικά, η σύνθεσή τους έχει σχετιστεί με διάφορες λειτουργίες, όπως η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, η πρωτεϊνοσύνθεση, η ενζυμική δραστηριότητα, η φωτοσύνθεση και ως δομικά συστατικά των φυτών (Robbins R.J., 2003). Πιστεύεται ότι μια δράση τους είναι να απομακρύνουν και να μειώνουν τη δραστηριότητα μετάλλων που προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, ενώ λόγω της δομής τους μπορούν να προστατεύουν από τις βλαβερές επιδράσεις της ακτινοβολίας UV και να εξασθενούν το ορατό φως (ειδικά στην περιοχή μεταξύ 350-450 nm). Μερικές πολυφαινόλες της κατηγορίας των φλαβονοειδών λειτουργούν ως ορατά έγχρωμα σήματα για σημαντικές αλληλεπιδράσεις (διασπορά της γύρης και των φρούτων) μεταξύ φυτών και ζώων (Soleas G. et al., 1997). Μερικά φυτά εκκρίνουν φλαβονοειδή με σκοπό να εμποδίσουν την ανάπτυξη και την εκβλάστηση των σπόρων γειτονικών φυτών διαφορετικού είδους, ένα φαινόμενο που ονομάζεται αλληλοπάθεια. Τα φλαβονοειδή επίσης παράγονται ως απόκριση σε ιϊκές,

βακτηριακές ή μολύνσεις από μύκητες, καθώς έχουν την ιδιότητα να κατακρημνίζουν δομικές πρωτεΐνες και ένζυμά τους αντιδρώντας με τις προλίνες τους. Η ιδιότητά τους αυτή είναι επίσης υπεύθυνη για την αίσθηση στυπτικότητας και συνεπώς τη μείωση της νοστιμάδας του φυτού στα ζώα που το καταναλώνουν (Dreosti I.E., 2000).

1.2.β. Περιεκτικότητα του κρασιού σε πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες του κρασιού βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στα κόκκινα κρασιά (1000-4000 mg/L) συγκριτικά με τα λευκά κρασιά (200-300 mg/L). Τα κόκκινα κρασιά περιέχουν ένα εύρος υδατοδιαλυτών πολυφαινολών οι οποίες περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, τη ρεσβερατρόλη, φλαβονόλες, φλαβονόλες, προκυανιδίνες και ανθοκυανίνες, με μεγαλύτερη τη συγκέντρωση προκυανιδινών και ανθοκυανινών (500-900 mg/L). Κατά τη ζύμωση της φλούδας των σταφυλιών η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο κρασί αυξάνεται και ακολούθως αρχίζει να πέφτει καθώς οι φαινόλες ενώνονται με τις πρωτεΐνες και τα κυτταρικά υπολείμματα της ζύμης. Κατά την ωρίμανση του κρασιού, η σύσταση και η περιεκτικότητα των πολυφαινολών του μεταβάλλεται σημαντικά. Τα νεοσυντιθέμενα κόκκινα κρασιά, έχοντας σχετικά υψηλά επίπεδα προκυανιδινών (ταννινών) και ανθοκυανινών, έχουν μια βιολετί χροιά. Αυτές μειώνονται σταδιακά με την ωρίμανση ενώ ταυτόχρονα σχηματίζονται νέες ολιγομερείς και πολυμερείς κόκκινες χρωστικές με μοριακά βάρη της τάξεως των 2000-4000 Da. Σύσσωμάτωση των προκυανιδινών έχει ως αποτέλεσμα την κατακρήμνιση των συστατικών αυτών και λιγότερη στυπτικότητα στα ωριμασμένα κρασιά (Dreosti I.E., 2000). Το κρασί έχει το πλεονέκτημα ότι διαθέτει τις πολυφαινόλες σε διαλυτή και άμεσα βιοδιαθέσιμη μορφή συγκριτικά με τα λαχανικά και τα φρούτα, στα οποία τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε πολυμερείς, αδιάλυτες ή ισχυρά συνδεδεμένες μορφές που τα καθιστούν μη διαθέσιμα για άμεση απορρόφηση.

Η ποσότητα των πολυφαινολών που εκχυλίζονται από τα σταφύλια κατά τη διαδικασία παραγωγής του κρασιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ανάδευση, ο τύπος του δοχείου ζύμωσης, οι συγκεντρώσεις αιθανόλης, το SO₂, το στέλεχος του σακχαρομύκητα, το pH και τα πηκτινολυτικά ένζυμα. Οι ποσότητες των πολυφαινολών στα σταφύλια εξαρτάται αντίστοιχα από την καλλιέργεια, τον τρύγο και τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής (Soleas G. et al, 1997).

Πίνακας 1.1.: Μέσες αναλογίες (mg/l) ορισμένων πολυφαινολών που υπάρχουν στο κρασί.

Phenolic compounds	Red wine	White wine
Catechin	191.3	34.9
Gallie acid	95.0	6.8
Epicatechin	82.0	21.2
Rutin	9.1	0.0
Myricetin	8.5	0.0
Quercetin	7.7	0.0
Caffeic acid	7.1	2.8

1.2.γ. Χημική δομή των πολυφαινολών

Οι πολυφαινολικές ουσίες συνήθως διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή.

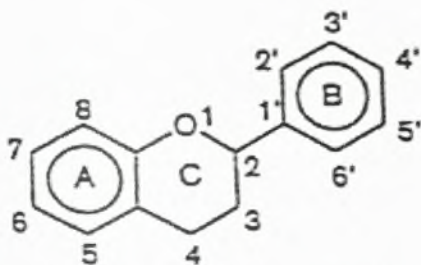
Φλαβονοειδή

Ο όρος φλαβονοειδή (ή βιοφλαβονοειδή) εισάχθηκε το 1952 από τους Γερμανούς ερευνητές Geissman και Hinreir για να δηλώσει μια κατηγορία χημικών ενώσεων που βρίσκονται στα περισσότερα φυτά (Van de Wiel A. et al, 2001). Τα φλαβονοειδή συνήθως συσσωρεύονται σε επιδερμικά κύτταρα φυτικών οργάνων όπως τα λουλούδια, τα φύλλα, οι μίσχοι, οι ρίζες, οι σπόροι και τα φρούτα, είτε σε γλυκοσιδικές μορφές (γλυκοσίδες), είτε σε μη γλυκοσιδικές μορφές (αγλυκόνες). Οι γλυκοσίδες εντοπίζονται κυρίως σε υδροφιλικές περιοχές του κυττάρου όπως τα χυμοτόπια και οι αποπλάστες, ενώ αντίθετα οι αγλυκόνες σε λιποφιλικές περιοχές όπως οι αδένες έκκρισης λαδιού και τα κηρώδη στρώματα (Sakihama Y. et al, 2002).

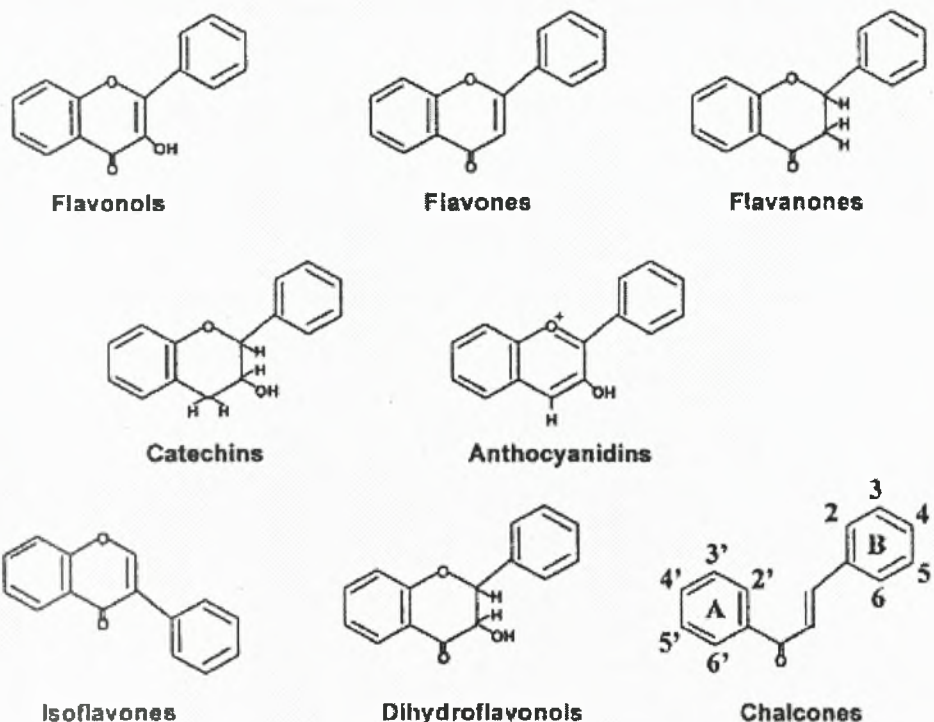
Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια ομάδα περισσότερων από 4000 πολυφαινολικές ενώσεις. Αυτές είναι ενώσεις θερμοανθεκτικές και έχουν μια κοινή δομή (C6-C3-C6) και κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον βαθμό κορεσμού και το άνοιγμα του κεντρικού δακτυλίου πυρανίου, κυρίως σε φλαβόνες, φλαβανόλες (είτε ως μονομερείς (κατεχίνες), είτε ως πολυμερείς (προανθοκυανιδίνες)), ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες ή διϋδροφλαβονόλες και χαλκόνες (Εικόνα 1.2.)(Ren W. et al., 2003).

Τα φλαβονοειδή έχουν ένα κοινό βασικό τμήμα, τον φλαβανικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) (Εικόνα 1.1.) που ενώνονται μέσω ενός δακτυλίου πυρανίου που περιέχει οξυγόνο. Επειδή σχεδόν πάντα υπάρχει μια ομάδα φαινολικού οξέος ενωμένη με έναν από τους βενζολικούς δακτυλίους, οι ενώσεις αυτές λέγονται πολυφαινόλες. Διαφορές στο βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου (C), υδροξυλίωσης των τριών δακτυλίων, γλυκοσυλίωσης, ακυλίωσης με φαινολικά οξέα καθώς επίσης και η ύπαρξη στερεοϊσομερών τους, οδήγησαν σε μια μεγάλη οικογένεια δομών με ουσιώδεις διαφορές στη βιολογική δράση, βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεσματικότητά τους.

Τα πιο συνηθισμένα φλαβονοειδή στο κρασί είναι η κερκετίνη, καμπερόλη και μυρικετίνη (φλαβονόλες), η κατεχίνη, η επικατεχίνη και οι ταννίνες (φλαβανόλες) και η κυανίνη (ανθοκυανίνες) (Εικόνα 1.2.). Υπάρχουν είτε ελεύθερα, είτε πολυμερισμένα με σάκχαρα, άλλα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή (Van de Wiel A. et al., 2001).



Εικόνα 1.1.: Η γενική δομή των φλαβονοειδών.



Εικόνα 1.2.: Οι δομές των κύριων κατηγοριών των φλαβονοειδών.

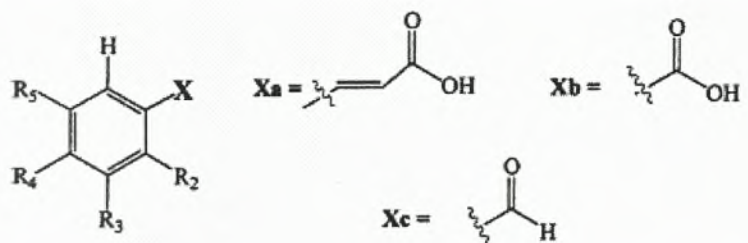
Μη φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή είναι είτε φαινολικά οξέα, είτε στυλβένια, είτε λιγνάνες. Ο όρος «φαινολικά οξέα» γενικά περιγράφει φαινόλες που διαθέτουν μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Ως μεταβολίτες των φυτών όμως, αναφέρεται σε μια ομάδα οργανικών οξέων που έχουν μόνο έναν αρωματικό δακτύλιο και είναι παράγωγα είτε του υδροξυκιναμικού οξέος (X_a) (π.χ. καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ) είτε του υδροξυβενζοϊκού οξέος (X_b) (π.χ. γαλλικό οξύ) (Πίνακας 1.2.). Ο βασικός τους σκελετός παραμένει ο ίδιος (Πίνακας 1.2.) και ο αριθμός και οι θέσεις των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο δημιουργούν την ποικιλία των διαφορετικών ενώσεων. Σε πολλές περιπτώσεις, αλδεϋδικά ανάλογα (X_c) ταξινομούνται επίσης και αναφέρονται ως φαινολικά οξέα (π.χ. βανιλίνη) (Πίνακας 1.2.). Το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, το φεουλικό, το βανιλικό και το πρωτοκατεχοϊκό είναι οξέα που βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα φυτά. Άλλα οξέα βρίσκονται μόνο σε επιλεγμένες τροφές ή φυτά (π.χ. γεντισικό, συριγγικό) (Robbins R., 2003).

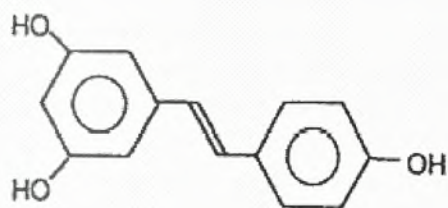
Η άλλη κατηγορία των μη φλαβονοειδών είναι τα στυλβένια και οι γλυκοσίδες των στυλβενίων, με αντιπροσωπευτική ένωση την πολύ καλά μελετημένη *trans*-ρεσβερατρόλη (Εικόνα 1.3.). Ο βασικός δομικός σκελετός τους αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους μέσω μιας γέφυρας μεθυλενίου. Η ρεσβερατρόλη είναι το βασικό μονομερές μόριο μιας οικογένειας πολυμερών που ονομάζονται βινιφερίνες (Εικόνα 1.4.) και έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την εξέλιξη της μόλυνσης από μύκητες (Fremont L., 2000).

Τέλος, υπάρχουν και οι λιγνάνες, οι οποίες αποτελούνται από δύο μονάδες φαινυλπροπανίου και βρίσκονται σε αφθονία στο λιναρόσπορο όπως επίσης και σε άλλες τροφές όπως δημητριακά, φρούτα και λαχανικά, σε σημαντικά μικρότερες ποσότητες όμως (Manach C. et al., 2004).

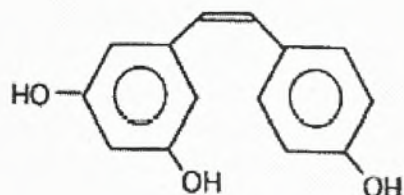
Πίνακας 1.2.: Δομές των σημαντικότερων φυσικών φαινολικών οξέων.



R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	code	common name
H	H	H	H	a	1	cinnamic acid
-OH	H	H	H	a	2	<i>o</i> -coumaric acid
H	H	-OH	H	a	3	<i>p</i> -coumaric acid
H	-OH	H	H	a	4	<i>m</i> -coumaric acid
H	-OCH ₃	-OH	H	a	5	ferulic acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	6	sinapic acid
H	-OH	-OH	H	a	7	caffeic acid
H	H	H	H	b	8	benzoic acid
-OH	H	H	H	b	9	salicylic acid
H	H	-OH	H	b	10	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
H	-OCH ₃	-OH	H	b	11	vanillic acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	12	syringic acid
H	-OH	-OH	H	b	13	protocatechuic acid
-OH	H	H	-OH	b	14	gentisic acid
-OH	-OH	-OH	-OH	b	15	gallic acid
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	16	veratric acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	17	syringaldehyde
H	-OCH ₃	-OH	H	c	18	vanillin

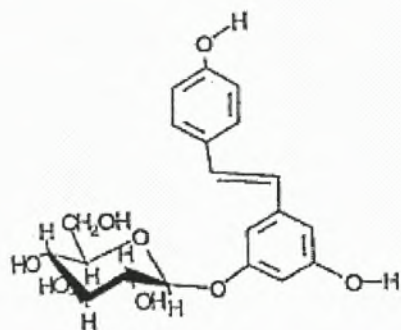


trans-resveratrol

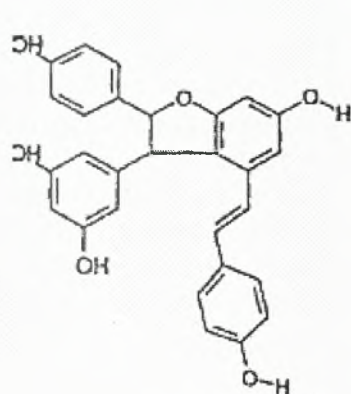


cis-resveratrol

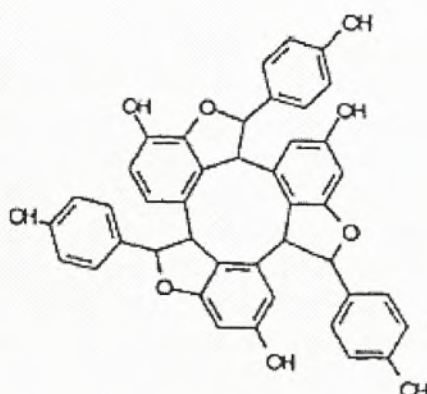
Εικόνα 1.3.: Χημικές δομές της trans- και της cis- ισομορφής της ρεσβερατρόλης.



Trans-resveratrol glucoside



α-viniferin



ε-viniferin

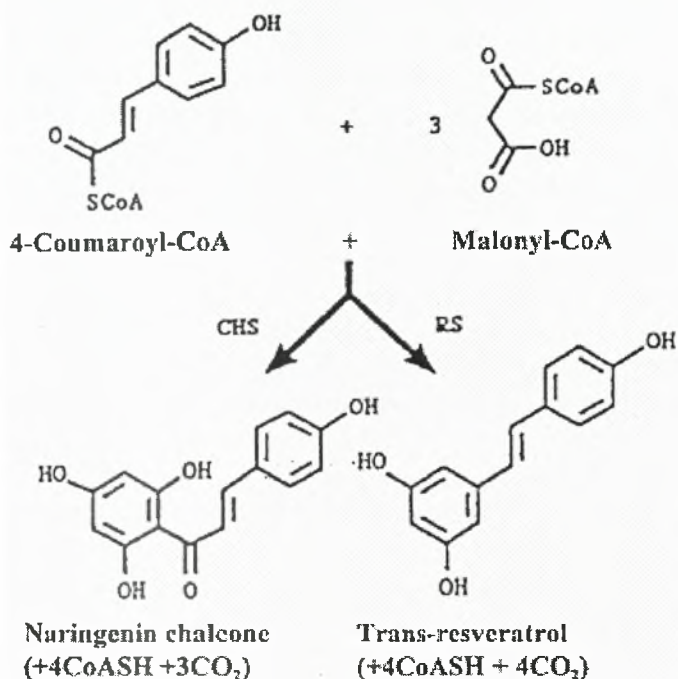
Εικόνα 1.4.: Χημικές δομές της γλυκοσίδης της *trans*-ρεσβερατρόλης, της α-βινιφερίνης και της ε-βινιφερίνης.

1.2.δ. Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών

Τα περισσότερα φυτά συνθέτουν διαρκώς φαινυλπροπανοειδή όπως τα φλαβονοειδή και τα υδροξυκινναμικά οξέα. Παρόλα αυτά αυξημένη παραγωγή τους μπορεί να προκληθεί από αβιοτικό και βιοτικό στρες (Sakihama Y. et al., 2002).

Η βιοσύνθεση όλων των φυτικών φαινολικών ενώσεων γίνεται μέσω του επονομαζόμενου γενικού μεταβολικού μονοπατιού των φαινυλπροπανοειδών. Όλες οι ενώσεις προέρχονται από το αρωματικό αμινοξύ L-φαινυλαλανίνη, το οποίο με τη σειρά του προκύπτει μέσω του μονοπατιού του σικιμικού, από το φαινυλ-πυροσταφυλικό με την καταλυτική επίδραση του ενζύμου PKA (αμινοτρανσφεράση της 2-κετογλουταρικής L-φαινυλαλανίνης). Ακολούθως, η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται με τη βοήθεια του ενζύμου PAL (λύαση της φαινυλαλανίνης αμμωνίας) σε *trans*-κινναμικό οξύ (Εικόνα 1.5.). Στη συνέχεια, το κινναμικό οξύ μεττρέπεται σε υδροξυκινναμικό οξύ (p-κουμαρικό οξύ) από το ένζυμο C4H (υδροξυλάση του 4-κινναμικού) και της ο-μεθυλοτρανσφεράσης. Το ένζυμο 4CL (CoA λυγάση του 4-κουμαρικού) καταλύει τον σχηματισμό του υδροξυκινναμόυλο CoA (p-κουμαρούλο-CoA) (Soleas G. et al., 1997).

Τα στυλβένια προκύπτουν στα σταφύλια με τη συμπύκνωση του p-κουμαροϋλο-CoA με τρία μόρια μηλονυλο-CoA με τη δράση της συνθάσης των στυλβενίων. Το πιο γνωστό από τα στυλβένια, η *trans*-ρεσβερατρόλη προκύπτει από τη δράση της συνθάσης της ρεσβερατρόλης, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.7. (Soleas G. et al., 1997).



Εικόνα 1.7.: Αντιδράσεις που καταλύονται από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS) και τη συνθάση της ρεσβερατρόλης (RS). Το ένα μονοπάτι οδηγεί στη βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης.

1.2.ε. Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών

Για πολλά χρόνια, ελάχιστα ήταν γνωστά σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών. Αυτό κυρίως οφειλόταν στις δυσκολίες αξιόπιστης ποσοτικοποίησης των διαφόρων πολυφαινολών των τροφών και των μεταβολιτών τους στα βιολογικά υγρά. Πρόσφατες μελέτες των παρατηρούμενων σωματικών αποκρίσεων σε ανθρώπους και ζώα έπειτα από την κατανάλωση φλαβονοειδών προτείνουν σημαντική πρόσληψή τους από το έντερο, αν και πολύ λίγα φαρμακοκινητικά δεδομένα είναι διαθέσιμα (Dreosti I.E., 2000).

Γενικά, η απορρόφηση και ο μεταβολισμός των πολυφαινολών εξαρτάται από τη χημική τους δομή και τη διαλυτότητά τους. Η χημική τους δομή καθορίζει το ρυθμό και την έκταση της εντερικής τους απορρόφησης καθώς και τη φύση των μεταβολιτών τους στο πλάσμα. Τα περισσότερα μονομερή και μικρά ολιγομερή φλαβονοειδή είναι διαλυτά στο νερό και ως ένα βαθμό και στα λιπίδια. Μεγάλα πολυμερή φλαβονοειδή είναι λιγότερο διαλυτά. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν και ο βαθμός γλυκοσυλίωσης και η σύζευξη με άλλες πολυφαινόλες (Dreosti I.E., 2000).

Η απορρόφηση των φλαβονοειδών μέσω της δίαιτας θεωρούνταν για πολλά χρόνια αμελητέα, καθώς στις τροφές βρίσκονται συνδεδεμένα με σάκχαρα (όπως γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη κ.ά.) ως β-γλυκοσίδες (με εξαίρεση τις κατεχίνες). Μόνο τα ελεύθερα φλαβονοειδή (χωρίς μόριο σακχάρου), οι λεγόμενες αγλυκόνες, θεωρούνταν ικανές να περάσουν το εντερικό τοίχωμα, ενώ δεν

υπάρχουν, ούτε και εκκρίνονται ένζυμα που μπορούν να σπάσουν αυτούς τους β-γλυκοσιδικούς δεσμούς στο εντερικό τοίχωμα. Υδρόλυση συμβαίνει μόνο στο παχύ έντερο από μικροοργανισμούς, οι οποίοι ταυτοχρόνως αποικοδομούν εκτενώς τα φλαβονοειδή (Hollman P.C.H. and Katan M.B., 1999). Βάσει αυτού, οι κατεχίνες και οι κατεχίνες-γαλλικό του τσαγιού, του κρασιού και του κακάο που δεν είναι γλυκοσυλιωμένες και εύκολα υδατοδιαλυτές, θα έπρεπε να απορροφώνται άμεσα από το λεπτό έντερο. Αντίθετα, μερικές γλυκοσυλιωμένες φλαβόνες και φλαβονόλες πιθανώς χρειάζεται να υδρολυθούν στις αγλυκόνες τους από βακτήρια στον τελικό ειλέο και στο παχύ έντερο πριν απορροφηθούν (Dreosti I.E., 2000). Προσφάτως όμως, δείχθηκε ότι όχι μόνο οι αγλυκόνες αλλά και οι γλυκοσίδες των φλαβονοειδών μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο (Van de Wiel A. et al., 2001). Σε μια μελέτη εντερικής απορρόφησης σε εθελοντές ανθρώπους, απορροφήθηκαν στο λεπτό έντερο οι μισές από τις γλυκοσίδες της κερκετίνης που είχαν προσλάβει μέσω της διαίτας οι εθελοντές, ενώ τα επίπεδα απορρόφησης της ρουτίνης, μιας ραμνογλυκοσίδης της κερκετίνης ήταν το μισό με ένα τρίτο αυτών της γλυκοσίδης της κερκετίνης (Scalbert A. and Williamson G., 2000). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η σύζευξη με γλυκόζη ενισχύει την απορρόφηση από το λεπτό έντερο (Hollman P.C.H. and Katan M.B., 1999).

Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε ανθρώπους έδειξαν ότι οι ποσότητες των πολυφαινολών που βρέθηκαν ανέπαφες στα ούρα ποικίλουν από το ένα φαινολικό συστατικό στο άλλο. Για παράδειγμα είναι ιδιαίτερα χαμηλά για την κερκετίνη και τη ρουτίνη, μια γλυκοσίδη της κερκετίνης (0.3-1.4%), αλλά οι τιμές τους είναι μεγαλύτερες για τις κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, τις ισοφλαβόνες της σόγιας, τις φλαβανόνες των εσπεριδοειδών και των ανθοκυανιδινών του κόκκινου κρασιού (3-26%). Ένα σημαντικό όμως ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται (75-99%) δεν ανιχνεύεται στα ούρα. Αυτό υπονοεί ότι είτε δεν έχουν απορροφηθεί μέσω του εντερικού τοιχώματος και στη συνέχεια εκκριθεί στη χολή, είτε ότι δεν έχουν μεταβολιστεί από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου ή από τους ανθρώπινους ιστούς (Scalbert A. and Williamson G., 2000).

Εκτιμάται ότι η μέση ημερήσια πρόσληψη όλων των φλαβονοειδών από τις διατροφικές πηγές κυμαίνεται μεταξύ 23 και 170 mg για τον άνθρωπο (Cook N.C. and Samman S., 1996). Οι συγκεντρώσεις όμως των ανέπαφων φλαβονοειδών στο ανθρώπινο πλάσμα σπάνια ξεπερνούν το 1μM όταν οι ποσότητες των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται δεν ξεπερνούν αυτές που λαμβάνονται μέσω της διαίτας (Scalbert A. and Williamson G., 2000). Έρευνες της πρόσληψης κατεχινών του τσαγιού σε τρωκτικά και σε εθελοντές έδειξαν ότι η απορρόφηση των φλαβονοειδών και των προϊόντων μικροβιακής αποικοδόμησής τους είναι ταχύτατη και ότι τα μέγιστα επίπεδά τους στο αίμα παρατηρούνται έπειτα από το πέρας 1,5 έως 2,5 ωρών (Dreosti I.E., 2000).

1.2.στ. Μεταβολισμός των πολυφαινολών

Το πρωταρχικό σημείο του μεταβολισμού των πολυφαινολών (στομάχι, λεπτό έντερο, ήπαρ) καθορίζεται τόσο από την ίδια τους τη δομή, όσο και από τη δόση που χορηγούνται. Για παράδειγμα, όπως προαναφέρθηκε, τα πολυφαινολικά παράγωγα απαιτούν αποσύζευξή τους με υδρόλυση από την ομάδα ή τις ομάδες που τους έχουν προστεθεί (σάκχαρα, φαινολικά οξέα) ώστε να απορροφηθούν και να μεταβολιστούν περαιτέρω. Οι ελεύθερες πολυφαινόλες κατά το μεταβολισμό τους υπόκεινται σε μεθυλίωση, σύζευξη μεθειϊκό, γλυκουρονιδίωση ή συνδυασμό αυτών, γεγονός που αυξάνει την υδατοδιαλυτότητά τους. Τα βήματα αυτά ρυθμίζονται από την

εξειδίκευση και την κατανομή των ενζύμων που καταλύουν τις αντίστοιχες αντιδράσεις. Επιπλέον, μεγάλες δόσεις μεταβολίζονται πρωταρχικά στο ήπαρ. Αντίθετα, μικρές δόσεις μπορεί να μεταβολιστούν από την εντερική βλενώδη μεμβράνη με το ήπαρ να παίζει δευτερεύοντα ρόλο για την περαιτέρω μετατροπή των συζευγμένων στο λεπτό έντερο πολυφαινολών. Αυτό υποδεικνύει ότι το έντερο είναι ένα σημαντικό σημείο μεταβολισμού των πολυφαινολών της διαίτας. Γενικά, το μονοπάτι που ακολουθείται για το μεταβολισμό τους είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών (Urquiaga I. and Leighton F., 2000).

Στην περίπτωση των γλυκοσυλιωμένων πολυφαινολών, η αφαίρεση του υδρόφιλου τμήματος συνήθως είναι απαραίτητη για την παθητική τους διάχυση μέσω του τοιχώματος του λεπτού εντέρου. Έτσι, το πρώτο βήμα του μεταβολισμού τους θα πρέπει να είναι η ενζυμική απομάκρυνση του σακχάρου τους (από γλυκοσιδάσες). Γλυκοσιδάσες μπορεί να βρίσκονται είτε στην ίδια την τροφή (ενδογενώς ή να έχουν προστεθεί κατά την επεξεργασία τους), στα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα ή τέλος μπορούν να εκκριθούν από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Τα ανθρώπινα κύτταρα εκφράζουν μερικές β-γλυκοσιδάσες, η έκφρασή τους όμως είναι ιστοειδική. Οι κύριες ανθρώπινες β-γλυκοσιδάσες είναι η CBG (cytosolic β-glucosidase, κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση) και η LPH (lactase phlorizin hydrolase). Η CBG είναι ένα διαλυτό ένζυμο που βρίσκεται σε πολλούς ιστούς, κυρίως όμως στο ήπαρ, όπου πιστεύεται ότι καταλύει την απογλυκοσυλίωση ενός μεγάλου εύρους ξενοβιοτικών γλυκοσίδων. Αντίθετα, η LPH βρίσκεται μόνο στο λεπτό έντερο. Τα φυσιολογικά υποστρώματα αυτής της β-γλυκοσιδάσης είναι τα γλυκοσυλκεραμίδια, τα λακτοσυλκεραμίδια και η ίδια η λακτόζη. Πρόσφατα βρέθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των γλυκοσίδων των πολυφαινολών, καθώς καταλύει την υδρόλυση ενός μεγάλου εύρους πολυφαινολικών γλυκοσίδων, συμπεριλαμβανομένης και της 3-O-γλυκοσιδής της κερκετίνης, η οποία δεν αποτελεί υπόστρωμα για τη CBG. Μη ενζυματική απογλυκοσυλίωση στο ανθρώπινο σώμα, όπως π.χ. στις όξινες συνθήκες του στομάχου, δεν συμβαίνει. Πολυφαινόλες με συζευγμένη γλυκόζη ή αραβινόζη και ξυλόζη αποτελούν πιθανά υποστρώματα για τις ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες, στην περίπτωση της ραμνόζης όμως, απογλυκοσυλίωση συμβαίνει μόνο από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Scalbert A. and Williamson G., 2000).

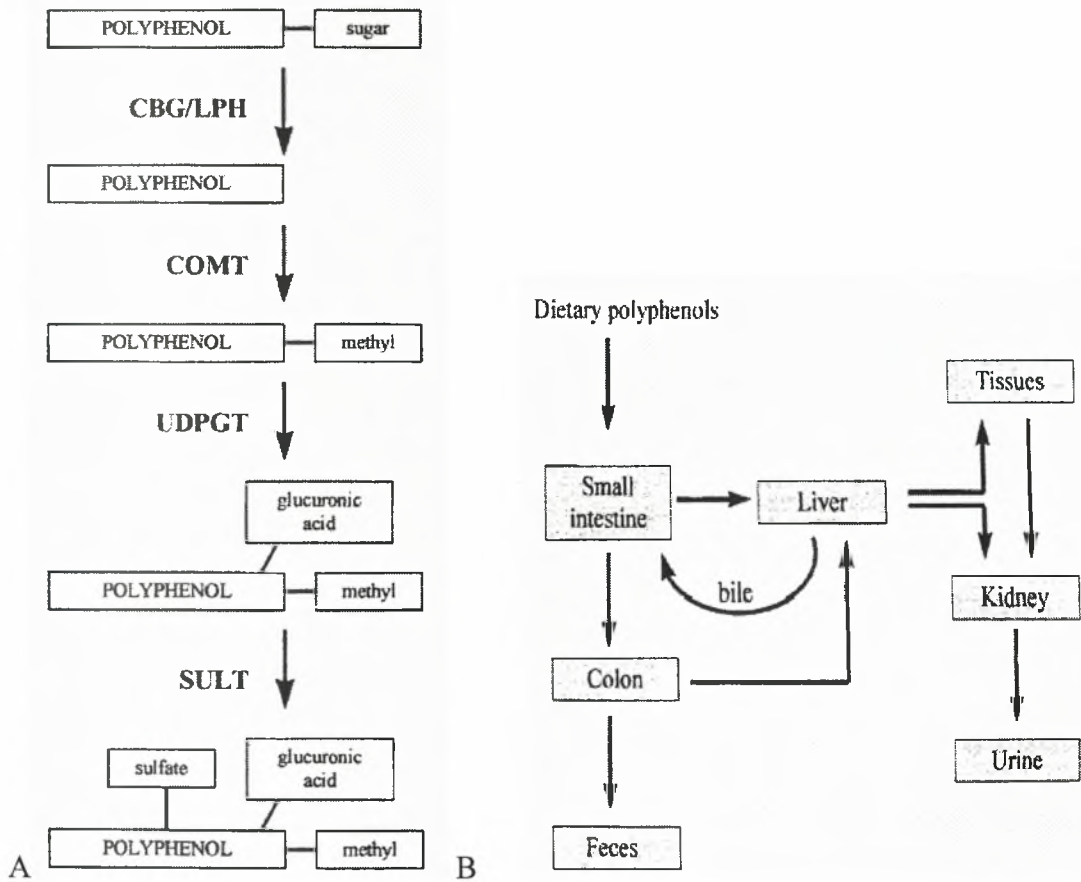
Έπειτα από την τυχόν αποσύζευξη από σάκχαρα, οι ελεύθερες πολυφαινόλες, όπως προαναφέρθηκε, συζευγνύονται με άλλες ομάδες. Το ένζυμο COMT (catechol-O-methyltransferase, O-μεθυλοτρανσφεράση της κατεχόλης) το οποίο είναι σημαντικό για τον μεταβολισμό της ντοπαμίνης, μεθυλιώνει τις πολυφαινόλες και βρίσκεται σε πολλούς ιστούς. Η εξειδίκευσή του για τις πολυφαινόλες θα καθορίσει ποιες υδροξυλομάδες στον πολυφαινολικό δακτύλιο θα μεθυλιωθούν. Το κυτόχρωμα P450 όμως απομεθυλιώνει τις φλαβονόλες στη θέση 4' και όχι στη θέση 3' (Scalbert A. and Williamson G., 2000).

Ακολούθως, μπορεί να γίνει σύζευξη των πολυφαινολών με γλυκουρονικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο UDPGT (UDP γλυκουρονοσυλο-τρανσφεράση). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η γλυκουρονιδίωση των πολυφαινολών γίνεται κυρίαρχα στο έντερο, στο ήπαρ και στα νεφρά. Από όλους τους ιστούς, το ήπαρ έχει τη μέγιστη ικανότητα για γλυκουρονιδίωση. Η επίδραση της γλυκουρονιδίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις στις περισσότερες πολυφαινόλες δεν είναι γνωστή. Οι βιολογικές δραστηριότητες των μεταβολιτών τους αποτελούν ένα σημαντικό πεδίο έρευνας (Manach C. et al., 2004).

Στη συνέχεια, οι προκύπτοντες μεταβολίτες μπορούν να συζευχθούν με μια ομάδα θειϊκού, μια αντίδραση που καταλύεται από τις SULT (phenol

sulfotransferases), τις σουλφοτρανσφεράσες των φαινολών, μια μικρή ομάδα κυτταροπλασματικών ενζύμων που υπάρχουν σε πολλούς ιστούς. Τα ενδογενή τους υποστρώματα είναι οι ιωδοθυρονίνες. Γενικά, οι σουλφοτρανσφεράσες δεν επάγονται από τη δίαιτα, τις ξеноβιοτικές ουσίες ή το περιβάλλον. Αντιθέτως, μερικές σουλφοτρανσφεράσες αναστέλλονται από τις πολυφαινόλες (π.χ η κερκετίνη αναστέλλει την ανθρώπινη SULT1A1) (Scalbert A. and Williamson G., 2000).

Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται στο στομάχι ή στο λεπτό έντερο θα καταλήξουν στο παχύ έντερο. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες που έχουν απορροφηθεί, μεταβολιστεί στο ήπαρ και έχουν εκκριθεί στη χολή ή άμεσα από τα εντεροκύτταρα πίσω στο λεπτό έντερο, θα φτάσουν επίσης στο παχύ έντερο, αλλά με διαφορετική χημική δομή, όπως π.χ. γλυκουρονίδια. Το παχύ έντερο περιέχει περίπου 10^{12} μικροοργανισμούς/cm³ και διαθέτει τεράστιες καταλυτικές και υδρολυτικές δυνατότητες. Εκεί πραγματοποιούνται εύκολα αντιδράσεις αποσύνθεσης (Manach C. et al., 2004). Για παράδειγμα, η 3-O-ραμνογλυκοσίδη της κερκετίνης και η 3-O-ραμνοσίδη της κερκετίνης που δεν υδρολύονται από ενδογενή ένζυμα, εκεί μεταβολίζονται σε κερκετίνη από τη μικροχλωρίδα και συγκεκριμένα από μικροοργανισμούς όπως οι *Bacteroides distasonis* (α-ραμνογλυκοσιδάση), *B. uniformis*, (β-γλυκοσιδάση) και *B. ovatus* (β-γλυκοσιδάση). Επιπρόσθετα, οι πολυφαινόλες που είναι ενωμένες με άλλα φαινολικά ή οργανικά οξέα ή και λιπίδια, επίσης δεν μπορούν να αποσυνευχθούν από αυτά με τη δράση ενδογενών ενζύμων και απαιτούν την παρουσία και δράση ενζύμων όπως οι ξυλανάσες και οι εστεράσες της εντερικής μικροχλωρίδας. Αντίθετα με τα ένζυμα στους ανθρώπινους ιστούς, η εντερική μικροχλωρίδα καταλύει τη διάσπαση των ίδιων των πολυφαινολών σε απλούστερες ενώσεις (Scalbert A. and Williamson G., 2000).



Εικόνα 1.8.: Α) Απλοποιημένο διάγραμμα που δείχνει το μεταβολισμό των πολυφαινολών. Β) Πιθανές οδοί για τις πολυφαινόλες που καταναλώνει ο άνθρωπος.

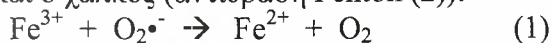
1.3. Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

1.3.α. Γενικά: Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες

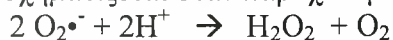
Μια ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως ένα χημικό είδος που μπορεί να υπάρχει ανεξάρτητα και έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα εξωτερικά του τροχιακά, αντίθετα με τα συνηθισμένα ζεύγη ηλεκτρονίων που περιστρέφονται σε διαφορετικές κατευθύνσεις στα αντίστοιχα τροχιακά τους. Μια ένωση ή ένα στοιχείο μπορεί να γίνει ελεύθερη ρίζα είτε κερδίζοντας ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο είτε χάνοντας ένα. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γενικά αυξάνει τη χημική δραστηριότητα του ατόμου ή μορίου επειδή αυτό προσπαθεί να αποσπάσει κάποιο άλλο από άλλα οργανικά μόρια με σκοπό να ζευγαρώσει το μονό του ηλεκτρόνιο. Παρόλα αυτά, η πραγματική δραστηριότητα ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ριζών (Mylonas C. and Kouretas D., 1999). Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο υδρογόνου με ένα πρωτόνιο και ένα μονό ηλεκτρόνιο.

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι πιο αντιπροσωπευτικός όσον αφορά στη βιοχημεία του κυττάρου, καθώς περιλαμβάνει όχι μόνο τις ρίζες στις οποίες το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εντοπίζεται στο άτομο του οξυγόνου (π.χ. ιόν σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$ και υδροξύλιο OH^{\bullet}) αλλά επίσης και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, όπως το H_2O_2 , το O_3 και το $HOCl$ (υποχλωριώδες οξύ). Υπάρχουν αντίστοιχα και RNS (Reactive Nitrogen Species), δραστικές μορφές αζώτου όπως το NO^{\bullet} , το NO_2^{\bullet} και το $ONOO^-$ (που δεν είναι ρίζα). Οι πιο βασικές ουσίες που συμμετέχουν στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στο κύτταρο είναι το οξυγόνο O_2 , το σουπεροξειδίο $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 , τα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης και η ρίζα υδροξυλίου OH^{\bullet} . Μερικές από τις ROS είναι πολύ λιγότερο δραστικές από άλλες, π.χ. το $O_2^{\bullet-}$ και το NO^{\bullet} αντιδρούν άμεσα με λίγα μόρια του ανθρώπινου σώματος, ενώ το OH^{\bullet} μπορεί να αντιδράσει με οτιδήποτε. Έτσι, όταν αυτό σχηματίζεται *in vivo*, αντιδρά στο σημείο σχηματισμού του (Halliwell B., 2001).

Οι ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές μορφές παράγονται συνεχώς από τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος, συνήθως από αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σ' αυτές μπορούν να μεσολαβούν ένζυμα ή να πραγματοποιούνται μη ενζυμικά, συχνά μέσω της αναγωγικής χημείας των ιόντων των μετάλλων μετάπτωσης. Η διαρροή ηλεκτρονίων άμεσα στο O_2 από τους ενδιάμεσους φορείς της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς τους προκαλεί σταθερά το σχηματισμό του $O_2^{\bullet-}$. Το OH^{\bullet} παράγεται φυσιολογικά σε χαμηλά επίπεδα από το H_2O_2 και το $O_2^{\bullet-}$ σύμφωνα με την αντίδραση Haber-Weiss (αντιδράσεις 1 και 2). Η αντίδραση αυτή όμως επιταχύνεται παρουσία συγκεκριμένων ιόντων μετάλλων μετάπτωσης όπως ο σίδηρος και ο χαλκός (αντίδραση Fenton (2)):



Το H_2O_2 σχηματίζεται όταν παραχθεί μεγάλη ποσότητα $O_2^{\bullet-}$ *in vivo*:



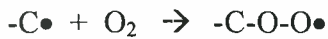
Επιπλέον, H_2O_2 μπορεί να προκύψει και ως προϊόν της δράσης διαφόρων οξειδωτικών ενζύμων στα κύτταρα, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων και η οξειδάση της ξανθίνης. Το H_2O_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών, ενώ μερικές φορές έχει τη δράση μορίου ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Halliwell B., 2001, Mylonas C. and Kouretas D., 1999).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με όλα τα βιολογικά μόρια (τα οποία ως επί το πλείστον δεν είναι ρίζες), τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες, τις

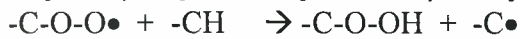
πρωτεΐνες και το DNA. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα μόρια αυτά, παράγονται νέες ρίζες και οι αντιδράσεις συνεχίζονται. Για παράδειγμα, το OH• αντιδρά με τους υδατάνθρακες αποσπώντας από αυτούς H• και αφήνοντας πίσω του μια νέα ρίζα:



Αυτή η διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει την αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών που προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε λιπιδιακά υπεροξειδία ή απλώς υπεροξειδία:



Η προκύπτουσα ρίζα υπεροξυλίου μπορεί να επιτεθεί στις μεμβρανικές πρωτεΐνες και στις γειτονικές πλευρικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων:



Η προκύπτουσα ρίζα C• αντιδρά και πάλι με O₂ δίνοντας άλλη μια ρίζα υπεροξυλίου και έτσι η αλυσιδωτή αντίδραση συνεχίζει για πολλούς ακόμη κύκλους, οξειδώνοντας όλο και περισσότερα μόρια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Παρομοίως το OH• μπορεί να αντιδράσει με την πουρίνη γουανίνη του DNA, προκαλώντας το σχηματισμό μιας νέας ρίζας, της 8-υδροξυγουανίνης:



Αντίθετα με το OH• που είναι συνήθως μια βλαβερή ρίζα, άλλες, λιγότερο δραστικές μπορεί να είναι χρήσιμες in vivo. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το NO•, το οποίο παράγεται κυρίως από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα φαγοκύτταρα και ρυθμίζει την πίεση του αίματος ενώ μπορεί να θανατώσει παράσιτα μέσω των μακροφάγων. Επιπλέον, το O₂•⁻ παράγεται από τα φαγοκύτταρα και τα βοηθά να καταπολεμήσουν βακτήρια. Παρόλα αυτά, οι δυο αυτές ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους παράγοντας μια πιο δραστική και απ' τις δυο τους ένωση (Halliwell B. and Gutteridge J., 1999):



Οι δράσεις των ελευθέρων ριζών σχετίζονται με την παθολογία περισσότερων από 100 ανθρώπινων ασθενειών, μεταξύ των οποίων το αιμορραγικό σοκ, η κυστική ίνωση και το AIDS. Μολαταύτα, σε πολύ λίγες ασθένειες οι ROS αποτελούν την πρωταρχική αιτία της κατάστασης, όπως για παράδειγμα, συνεχείς βλάβες στο DNA από ROS/RNS μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση μερικών τύπων καρκίνων στον άνθρωπο. Συχνότερα, η αυξημένη παραγωγή τους είναι το αποτέλεσμα της ασθένειας, την οποία και επιδεινώνουν, όπως π.χ. στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας, του εμφυσήματος και των καρκίνων που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονές (Halliwell B., 2001).

Στους ζωντανούς οργανισμούς όμως, εφόσον παράγονται συνεχώς ελεύθερες ρίζες, θα πρέπει να υπάρχουν και μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας (αντιοξειδωτικά), οι οποίοι ελαχιστοποιούν (αλλά δεν εμποδίζουν πλήρως) τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται στα βιομόρια. Οι μηχανισμοί αυτοί δρουν είτε παρεμβαίνοντας και τερματίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις συνεχούς παραγωγής ελευθέρων ριζών και/ή δεσμεύοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), ούτως ώστε να αποφευχθεί το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών που δε μπορεί να περιοριστεί από την αντιοξειδωτική άμυνα. Οι κύριοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ενός οργανισμού είναι οι εξής:

✓ Ένζυμα

Το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Υπάρχουν τρεις τύποι SOD, η Cu-ZnSOD που είναι κυτταροπλασματική, η MnSOD που εντοπίζεται στα

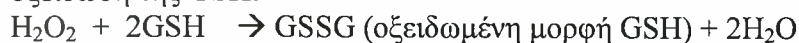
μιτοχόνδρια και ένας τρίτος τύπος (εξωκυτταρικός) που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Η αντίδραση που καταλύουν είναι:



Το ένζυμο καταλάση. Βρίσκεται σε αφθονία στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα και καταλύει την αντίδραση:



Τα ένζυμα περοξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH-Px). Είναι μια ομάδα κυτταροπλασματικών, μιτοχονδριακών και εξωκυτταρικών ενζύμων, σε αφθονία στην καρδιά, στους πνεύμονες και στον εγκέφαλο, που έχουν ως υπόστρωμά τους το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GSH). Είναι ικανές να μετατρέψουν τα υδροπεροξειδία των λιπιδίων και το H_2O_2 σε νερό και σταθερές αλκοόλες με οξείδωση της GSH:



✓ Διαλυτά αντιοξειδωτικά

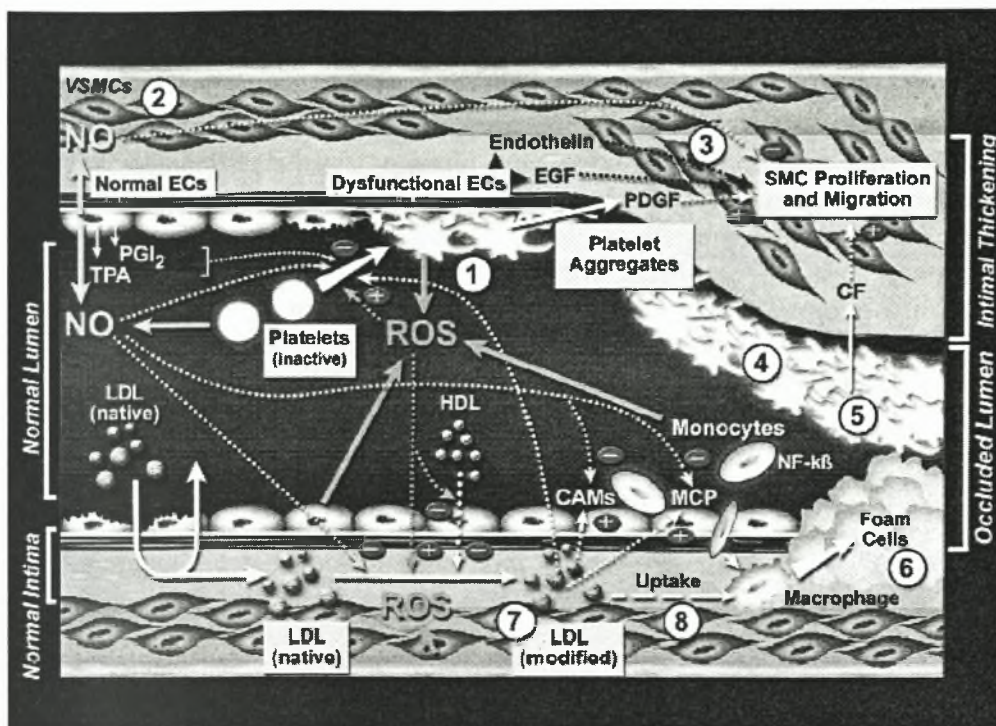
Εκτός από τα ένζυμα, υπάρχουν πολλά διαλυτά χαμηλού M.B. αντιοξειδωτικά, όπως η GSH (γλουταθειόνη) που μπορεί να δεσμεύει διάφορα ROS (π.χ. HOCl και ONOO⁻) άμεσα, εκτός από το να αποτελεί υπόστρωμα των GSH-Px. Άλλα τέτοια αντιοξειδωτικά είναι το ουρικό οξύ και η αλβουμίνη.

✓ Αντιοξειδωτικά της διατροφής

Ως αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να δράσουν και πολλές ενώσεις που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Τέτοια είναι η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και τα φλαβονοειδή (Halliwell B., 2001, Mylonas C. and Kouretas D., 1999, Halliwell B. and Gutteridge J., 1999).

1.3.β. Αντιοξειδωτική-Καρδιοπροστατευτική δράση

Οι πολυφαινόλες έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αυτό αποδίδεται κυρίως στη δραστηριότητα του φαινολικού τμήματος του μορίου τους. Ο κυρίαρχος μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης τους είναι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών (ROS) όπως το σουπεροξειδίο, η ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ και οι ρίζες περοξυλίου (Soleas G. et al., 1997) και μέσω της απόδοσης ενός ατόμου υδρογόνου (Robbins R.J., 2003), τερματίζοντας έτσι τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Μπορούν όμως να δράσουν και σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα με δισθενή ιόντα μετάλλων, μειώνοντας έτσι έμμεσα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσω των αντιδράσεων Fenton (Sanchez-Moreno C. et al., 1999). Έτσι, οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τόσο από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, όσο και από τις οξειδωτικές βλάβες στο DNA, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στην ανάπτυξη καρκίνου (Wilms L.C., et al., 2005). Η προστασία του DNA από βλάβες επιτυγχάνεται εκτός από τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών που αντιδρούν ακαριαία μ' αυτό (π.χ. OH[•]) και μέσω άλλων μηχανισμών, όπως η παρεμπόδιση του σπασίματος του ενός κλώνου του DNA, άλλα ακόμα και έπειτα από την αντίδρασή του DNA με OH[•], με την ταχύτατη επιδιόρθωση των σχηματιζόμενων ριζών ανιόντων δεοξυθυμιδίνης (dT[•]) (Zhao C. et al., 2003).



Εικόνα 1.9.: Σχηματική αναπαράσταση μιας διαμήκουσ τομής αρτηρίας. Στο επάνω μισό της απεικονίζονται φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) στα αριστερά και δυσλειτουργικά στο κέντρο και δεξιά (1). Τα υγιή ECs παράγουν NO, το οποίο αναστέλλει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αρτηριακό τοίχωμα και προκαλεί τη χαλάρωση των λείων αγγειακών μυϊκών κυττάρων (VSMCs)(2). Επιπλέον, φυσιολογικές ποσότητες NO αναστέλλουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των VSMCs προς την κοιλότητα του αγγείου (3). Όταν τα ECs δυσλειτουργούν, δεν παράγουν αρκετό NO και έτσι σχηματίζονται συσσωματώματα αιμοπεταλίων στο τοίχωμα (4). Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν διάφορους αυξητικούς και χημειοτακτικούς (CF) παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν τα VSMCs στην κοιλότητα, έχοντας ως αποτέλεσμα μια στένωση της κοιλότητας (5). Στο κάτω μισό της εικόνας φαίνονται οι LDL, οι οποίες διεισδύουν στο αρτηριακό τοίχωμα και βοηθούν στην ανάπτυξη αφρωδών κυττάρων (6). Η LDL οξειδώνεται από οξειδωτικά ή από ελεύθερες ρίζες και μετατρέπεται σε τροποποιημένη LDL (M-LDL) (7). Η M-LDL μπορεί να ενεργοποιήσει τα ECs και αυτά να απελευθερώσουν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM), τα οποία προσελκύουν μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα στο αρτηριακό τοίχωμα (8).

Με βάση αυτές τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών μπορεί να δοθεί εξήγηση και για το γαλλικό παράδοξο και γενικότερα για την προστατευτική δράση του κρασιού, των φρούτων και των λαχανικών από καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση και η στεφανιαία νόσος. Η στεφανιαία αρτηριακή νόσος οφείλεται εν μέρει στους πέντε ακόλουθους παράγοντες: στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, στην οξείδωση της LDL από ελεύθερες ρίζες, στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων και στη φλεγμονή που περιλαμβάνει τα μονοκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα (Mann L.B. and Folts J.D., 2004). Οι πολυφαινόλες του κρασιού μπορούν και παρεμβαίνουν και στις πέντε παραπάνω αιτίες έναρξης αθηροσκληρωτικής διαδικασίας η οποία οδηγεί σε νόσο των στεφανιαίων αρτηριών. Επιδρούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγοντας τη συνθάση του NO (eNOS) και αυξάνοντας την παραγωγή NO, το οποίο προκαλεί

αγγειοδιαστολή, ενώ προστατεύει από θρομβώσεις αφού αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και της προσκόλλησής τους στο αγγειακό τοίχωμα (Wallerath T. et al., 2005). Παράλληλα εμποδίζουν και την οξείδωση του συμπαράγοντα της συνθάσης του NO τετραϋδροβιοπτερίνη σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η οποία μετατρέπει έτσι τη συνθάση του NO σε ένζυμο που παράγει σουπεροξειδίο (Stoclet J.-C. et al., 2004). Έχει αποδειχθεί επίσης ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών αγγειακών κυττάρων μειώνοντας την έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης A, ενώ εμποδίζουν την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονή (Iijima K. et al., 2002).

Η καλύτερα μελετημένη δράση των πολυφαινόλων όμως είναι η αναστολή της οξείδωσης της LDL. Πέρα από τη δέσμευση και την αναστολή του σχηματισμού των ROS λόγω των χηλικών ιδιοτήτων τους, οι πολυφαινόλες έχει βρεθεί ότι προστατεύουν την α-τοκοφερόλη της LDL από οξείδωση, είτε καθώς οξειδώνονται οι ίδιες, είτε δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου στη ρίζα της α-τοκοφερόλης (Cook N.C. and Samman S., 1996). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι μπορούν να προσδένονται με πρωτεΐνες και λιποσώματα και ιδιαίτερα με τα σωματίδια LDL (αλλά και HDL), προστατεύοντάς τα από οξείδωση από ιόντα μετάλλων μετάπτωσης *in vitro* (Ivanov V. et al., 2001).

Οι πολυφαινόλες έχουν επίσης την ιδιότητα να προστατεύουν και τα ερυθροκύτταρα από τις ROS, καθώς αυτά είναι μεταφορείς οξυγόνου με υψηλά ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες τους και μεγάλες κυτταρικές συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης, κάτι που τα καθιστά επιρρεπή σε οξειδωτικές βλάβες. Οι ROS εμπλέκονται ιδιαίτερα στους μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών των ερυθροκυττάρων στη β-θαλασσαιμία, στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και σε άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες (Tedesco I. et al., 2000).

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν και κατά του ιού HIV-1, είτε δεσμεύοντας τις ROS που μπορούν να τον ενεργοποιήσουν στα κύτταρα των φορέων του (Halliwell B. & Gutteridge, 1998), είτε αναστέλλοντας το ένζυμο ντεγκράση το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στη χρωματίνη του ξενιστή (Robbins R.J., 2003).

Συσχέτιση χημικής δομής-αντιοξειδωτικής ικανότητας φλαβονοειδών

Είναι γνωστό ότι η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων που προέρχονται από τα σταφύλια επηρεάζεται όχι μόνο από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, αλλά και από τη σύνθεσή τους σε διάφορα πολυφαινόλικά συστατικά (Davalos A. et al., 2001). Τα φλαβονοειδή έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τις σχέσεις δομής και αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Γενικά αυτή εξαρτάται από:

- 1) Την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη θέση τρία (3-OH) του δακτυλίου C. Τα φλαβονοειδή που έχουν μια 3-OH ομάδα όπως η φισετίνη, η (+)-κατεχίνη και η κερκετίνη είναι πιο δραστικοί δεσμευτές ROS σε σχέση με αυτούς που δεν έχουν 3-OH υποκαταστάτη, π.χ. απιγενίνη και ναριγκενίνη.
- 2) Έναν διπλό δεσμό μεταξύ ανθράκων δύο και τρία (C2-C3) του δακτυλίου C. Υδρογόνωση αυτού του δεσμού μειώνει την ικανότητα για αναστολή της λιπιδιακής υπεροξειδωσης.
- 3) Η ομάδα καρβονυλίου στον C-4 του δακτυλίου C αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η κατεχίνη στερείται C-4 καρβονυλίου και έχει χαμηλότερη ικανότητα δέσμευσης OH• σε σχέση με την κερκετίνη που έχει μια C-4 καρβονυλομάδα (Cook and Samman S., 1996).

- 4) Τον αριθμό των υδροξυλομάδων. Η ικανότητα για δέσμευση ROS αυξάνεται με την αύξηση των υδροξυλομάδων στον δακτύλιο B, ιδιαίτερα στον C-3', ενώ μειώνεται σημαντικά καθώς ο αριθμός των υδροξυλομάδων μειώνεται.
- 5) Το πρότυπο της υδροξυλίωσης. Υδροξυλομάδες στις θέσεις C-5 και C-7 του δακτυλίου A, στις θέσεις C-3' και C-4' του δακτυλίου B και στη θέση C-3 του δακτυλίου C φαίνεται να προσδίδουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Soleas G. et al., 1997).
- 6) Την παρουσία ενός τμήματος σακχάρου. Οι αγλυκόνες είναι πιο αποτελεσματικές όσον αφορά στη δέσμευση ROS σε σχέση με τις γλυκοσίδες *in vitro*. Αυτό όμως ίσως να μην είναι σημαντικό *in vivo* καθώς το σάκχαρο αφαιρείται από το φλαβονοειδές κατά το μεταβολισμό της ουσίας στο ανθρώπινο σώμα και πριν αυτό φτάσει στο πλάσμα (Noroozi M. et al., 1998).
- 7) Οι μεθοξυλ-ομάδες μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών *in vitro* λόγω παρεμπόδισης στο χώρο.
- 8) Τα φλαβονοειδή που έχουν C-4 καρβονυλομάδα και μια C-3 ή C-5 υδροξυλομάδα, όπως π.χ. η ρουτίνη και η κερκετίνη, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης όπως Fe^{3+} και Cu^{2+} , εμποδίζοντας την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Fenton και επομένως την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Cook N.C. and Samman S., 1996).

1.3.γ. Χημειοπροστατευτική-Αντικαρκινική δράση

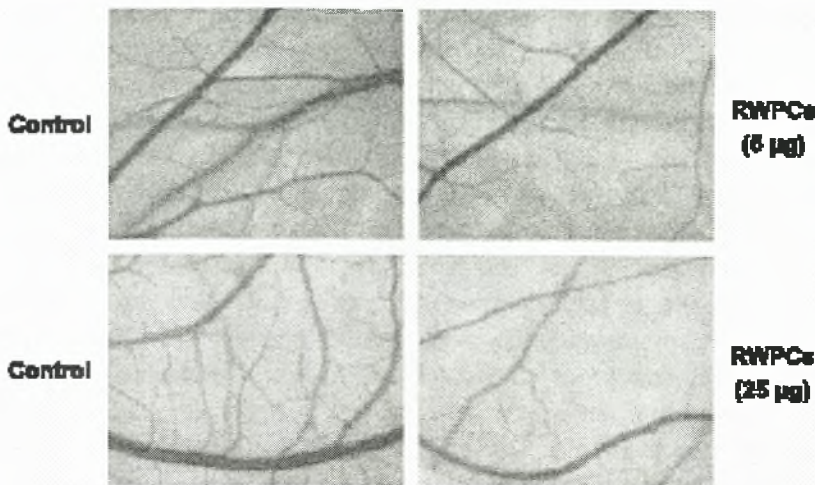
Μια πληθώρα επιστημονικών ερευνών έχει δείξει ότι οι πολυφαινόλες μπορούν, πέρα από το να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, να παρεμβαίνουν σε όλα τα στάδια της διαδικασίας καρκινογένεσης-έναρξης, προαγωγής, προόδου-και να την αναστέλλουν.

Επιδημιολογικές μελέτες σε πολλές χώρες έχουν δείξει ότι πρόσληψη φλαβονοειδών μέσω της διαίτας παρουσίαζε μια αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση με την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Ενδεικτικά, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε Φιλανδούς άνδρες που ακολουθούσαν δίαιτα με τροφές πλούσιες σε κερκετίνη παρουσίαζαν χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα, ενώ άνδρες των οποίων η δίαιτα περιλάμβανε τροφές πλούσιες σε μυρικετίνη είχαν μικρότερες πιθανότητες καρκίνου του προστάτη. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν έναν προστατευτικό ρόλο των φλαβονοειδών έναντι του καρκίνου (Ren W. et al., 2003).

Σε *in vitro* μελέτες, έχει δειχθεί ότι μια πληθώρα πολυφαινολικών ουσιών εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς και κυττάρων από όγκους ανθρώπων και ζώων, όπως λευχαιμίας, καρκινώματος πλακώδους επιθηλίου και καρκίνων του γατρεντερικού (Soleas G. et al., 1997). Οι περισσότερες από τις ουσίες που μελετήθηκαν εμπόδιζαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χωρίς να είναι κυτταροτοξικές (Ren W. et al., 2003).

Πολυάριθμες μελέτες όμως έχουν γίνει και *in vivo*, σε πειραματόζωα. Έχει δειχθεί ότι το πράσινο και το μαύρο τσάι, άλλα και οι καθαρές πολυφαινόλες τους αναστέλλουν τόσο την επαγόμενη από UV, όσο και τη χημικά επαγόμενη ογκογένεση σε ζώα. Το τσάι και τα συστατικά του έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την καρκινογένεση στην επιδερμίδα, στους πνεύμονες, στον οισοφάγο, στο στομάχι, το ήπαρ, το λεπτό και το παχύ έντερο, το πάγκρεας και τους μαστικούς αδένες πειραματόζωων (Lambert J.D. and Yang C.S., 2003). Επίσης, *in vivo* έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη από έμβρυο κοτόπουλου (CAM)

όπου η εφαρμογή πολυφαινόλων του κόκκινου κρασιού, του πράσινου τσαγιού ή της επιγαλοκατεχίνης-3-γαλλικού (EGCG) μείωνε την αγγειογένεση (Εικόνα 1.10.) (Oak M.-H. et al., 2005). Επιπρόσθετα, πρόσληψη ρεσβερατρόλης, μείωνε σημαντικά την αγγείωση του κερατοειδούς χιτώνα σε ποντίκια όπου επαγόταν από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) (Stoclet J.-C. et al., 2004).



Εικόνα 1.10.: Αναστολή της αγγειογένεσης από τις πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη (CAM) από έμβρυο κοτόπουλου. Τοπική εφαρμογή τους (5 και 25 µg) στην CAM αναστέλλει ισχυρά το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων συγκριτικά με το μάρτυρα (control) έπειτα από 48ωρη επώαση.

Όλα τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα οδήγησαν τελικά στην πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών διαφόρων πολυφαινόλων σε ασθενείς με καρκίνους. Ορισμένες από τις πολυφαινόλες αυτές, όπως η ημισυνθετική φλαβόνη φλαβοπυριδόλη-η οποία είναι αναστολέας των εξαρτώμενων από κυκλίνες κινασών (CDKs), γεγονός που την καθιστά ιδανικό αντικαρκινικό φάρμακο-έχουν περάσει ήδη από τη φάση I στη φάση II των κλινικών δοκιμών, με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Ren W. et al., 2003).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες έχουν χημειοπροστατευτική δράση, δηλαδή στο στάδιο της έναρξης της καρκινογένεσης βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην επίδρασή τους στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Έχειδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες (όπως π.χ. η κερκετίνη, η καεμπφερόλη και η γαλαγκίνη) έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού, όπως το κυτόχρωμα P450, τα οποία και είναι υπεύθυνα για τη μεταβολική ενεργοποίηση προ-καρκινογόνων ουσιών σε δραστικές ενώσεις, ικανές να πυροδοτήσουν την καρκινογένεση. Ορισμένα φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η φισετίνη, η μυρικετίνη, η καεμπφερόλη, η χρυσίνη και η απιγενίνη είναι ισχυροί αναστολείς της σουλφοτρανσφεράσης των πολυφαινόλων (SULT), ένα ένζυμο που πιστεύεται ότι συμμετέχει στην ενεργοποίηση καρκινογόνων όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), οι αλλυλικές αλκοόλες, οι βενζυλικές αλκοόλες και οι N-υδροξυαρυλαμίνες (Galati G. and O'Brien P.J., 2004).

Αντίθετα με την επίδρασή τους στα ένζυμα της φάσης I, οι πολυφαινόλες επάγουν τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού. Αυτά τα ένζυμα διευκολύνουν την απέκκριση των ξενοβιοτικών ουσιών, συμβάλλοντας στη μεταβολική αποτοξίνωση του οργανισμού από καρκινογόνες ουσίες. Τέτοια ένζυμα είναι η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η NAD(P)H οξειδοοδουκτάση της κινόνης

(NQO) και η UDP-γλυκουρονυλοτρανσφεράση (UDPGT) (Galati G. and O'Brien P.J., 2004).

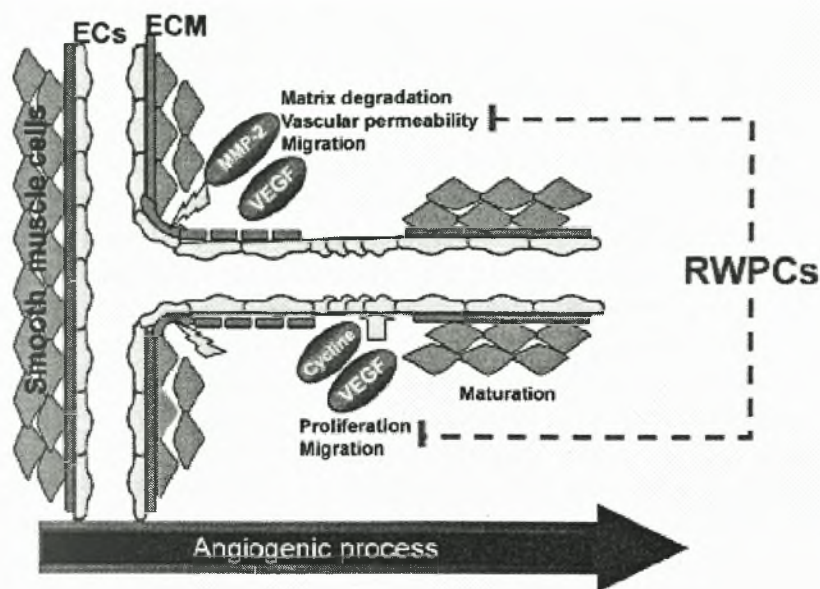
Άλλοι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών είναι η άμεση αλληλεπίδρασή τους και η παρεμπόδιση της μεταλλαξιγόνου δράσης των μεταβολιτών των καρκινογόνων ουσιών όπως τα διολεποξειδία των PAHs (Soleas G., et al., 1997), αλλά και ο περιορισμός του σχηματισμού νιτροζαμινών στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, καθώς και άλλων νιτροδών συστατικών που υπάρχουν στις τροφές. Έτσι, τα κύτταρα προστατεύονται από τις δυσμενείς επιδράσεις των ουσιών αυτών (Tomera J.F., 1999). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την VacA, μια τοξίνη που εκκρίνεται από το παθογόνο βακτήριο *Helicobacter pylori* και θεωρείται υπεύθυνη για την ανάπτυξη καρκίνων του γαστρεντερικού, πεπτικού έλκους και λεμφωμάτων των λεμφοειδών κυττάρων που συχνά αυτό προκαλεί (Tombola F. et al., 2003).

Οι πολυφαινόλες όμως, εκτός από την παρεμπόδιση στο στάδιο της έναρξης, μπορούν να παρέμβουν και στα στάδια της προαγωγής και της προόδου της καρκινογένεσης, δρώντας πλέον ως αντικαρκινικές ουσίες. Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς είναι και η αναστολή της αγγειογένεσης (σε όλα της τα στάδια), μιας διαδικασίας απαραίτητης για την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων (Cao Y. et al., 2002). Έχει βρεθεί πρόσφατα ότι οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού και του πράσινου τσαγιού αναστέλλουν την ενεργοποίηση της MMP-2 στα λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα, μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης που αποκωδομεί τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) ούτως ώστε να αναδιοργανωθεί δομικά το τοίχωμα της αρτηρίας και να ξεκινήσει η διαδικασία της αγγειογένεσης (Εικόνα 1.11.) (Oak M.-H. et al., 2005). Επίσης, οι πολυφαινόλες εμποδίζουν την έκφραση του παράγοντα VEGF, ο οποίος ενεργοποιεί τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων *in vitro* και *in vivo* (Εικόνα 1.11.) (Stoclet J.-C. et al., 2004). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού βρέθηκε ότι αναστέλλουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων (Araim O. et al., 2002) μέσω της μείωσης της έκφρασης της κυκλίνης A (Iijima K. et al., 2002). Η αναστολή της αγγειογένεσης αποτελεί έναν δυνατό στόχο για την αντικαρκινική θεραπεία, στην οποία μπορούν να βρουν εφαρμογή οι πολυφαινόλες.

Εναλλακτικοί μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, μέσω της αναστολής ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η κυκλοοξυγενάση (COX) και η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) (απαραίτητη για τη σύνθεση του DNA), αλλά και της αναστολής σηματοδοτικών μορίων όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ren W. et al., 2003). Αντίθετα, έχει βρεθεί ότι η p53 δεν επηρεάζεται από τις πολυφαινόλες του κρασιού (Soleas G., et al., 2001).

Ένας άλλος μηχανισμός είναι και το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M, όπως έχει βρεθεί σε καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών με την επίδραση πολυφαινολών όπως η γενιστεΐνη, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η EGCG. Αυτό πιθανώς να οφείλεται εν μέρει στην αναστολή των CDKs από τις ουσίες αυτές (Ren W. et al., 2003).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες επάγουν την απόπτωση σε ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, μέσω της ενεργοποίησης κασπασών και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών, ενώ έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν τη διαφοροποίηση καρκινικών σειρών σε κύτταρα με ώριμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Ren W. et al., 2003).



Εικόνα 1.11.: Η διαδικασία της αγγειογένεσης ξεκινά με την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας από από μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), όπως η MMP-2 και με αύξηση της διαπερατότητας του αγγείου. Αυτά τα γεγονότα προάγουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και ακολούθως την ωρίμανση του νέου αιμοφόρου αγγείου ως απόκριση σε τοπικούς παράγοντες όπως ο VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας). Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού αναστέλλουν την ενεργοποίηση της MMP-2, την έκφραση του VEGF και τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών κυττάρων.

Τέλος, έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τη δράση της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης, μιας πρωτεΐνης που αντλεί τα χορηγούμενα αντικαρκινικά φάρμακα έξω από τα κύτταρα και ευθύνεται έτσι για τις χαμηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις τους και επομένως συχνά για την αποτυχία της χημειοθεραπείας (Galati G. and O'Brien P.J., 2004).

Ανάλογα με την αιτιολογία της ασθένειας, οι προστατευτικές επιδράσεις των πολυφαινολών μπορούν να παρατηρούνται σε συγκεκριμένα είδη καρκίνων μόνο (Nerka C. et al, 1999), αλλά και να διαφέρουν μεταξύ υγιών και καρκινικών κυττάρων (Yamamoto T., 2003). Παρόλα αυτά, το ευρύ αυτό φάσμα των βιοχημικών και κυτταρικών λειτουργιών των πολυφαινολών δίνει ελπίδες τόσο για την πρόληψη, όσο και για τη θεραπεία μιας πληθώρας συχνών ανθρώπινων διαταραχών και ασθενειών, όπως ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση.

1.3.δ. Προοξειδωτική δράση

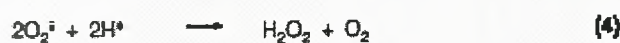
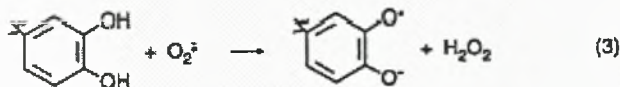
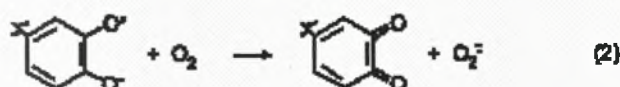
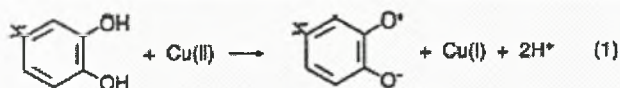
Σε αντίθεση με τις ωφέλιμες για την ανθρώπινη υγεία δράσεις τους, μερικά φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι έχουν μεταλλαξιογόνο δράση. Αυτές οι βλαβερές επιδράσεις θεωρείται ότι προκύπτουν από τις προοξειδωτικές αντί για αντιοξειδωτικές δράσεις των αντίστοιχων φλαβονοειδών. Οι βιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις ενός φλαβονοειδούς συστατικού εξαρτώνται από τη συμπεριφορά του είτε ως αντιοξειδωτικού είτε ως προοξειδωτικού. Έχει αποδειχθεί ότι οι ίδιες ενώσεις μπορούν να συμπεριφέρονται τόσο ως αντιοξειδωτικά, όσο και ως

προοξειδωτικά, ανάλογα με τη συγκέντρωση και την πηγή των ελευθέρων ριζών σ' ένα σύστημα (Cao G. et al., 1997).

Έχει αποδειχθεί ότι οι φαινολικές ουσίες της δίαιτας έχουν τη δυνατότητα να δρουν ως προοξειδωτικά σε συστήματα τα οποία διαθέτουν δραστικά οξειδοαναγωγικά μέταλλα. Παρουσία οξυγόνου, μέταλλα μετάπτωσης όπως ο χαλκός (Cu) και ο σίδηρος (Fe) καταλύουν την κυκλική οξειδοαναγωγή των φαινολικών ουσιών, οδηγώντας στον σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και άλλων οργανικών ριζών, όπως οι ρίζες φαινοξυλίου, οι οποίες μπορούν να βλάψουν το DNA, τα λιπίδια, (προκαλώντας την έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης υπεροξειδωσης των λιπαρών οξέων) και άλλα βιολογικά μόρια. Η προοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών εξαρτάται από την ικανότητά τους να ανάγουν μέταλλα, αλλά και το οξυγόνο και να δημιουργούν χημικά σύμπλοκα (Sakihama et al., 2002). Φλαβονόλες με πυρογαλλολικούς και γενικότερα φλαβονοειδή με κατεχολικούς-3', 4'-διϋδροξυ υποκαταστάτες στους Β δακτυλίους τους έχει αποδειχθεί ότι μπορούν είτε να αυτοοξειδωθούν παρουσία μετάλλων μετάπτωσης, είτε να οξειδωθούν με την καταλυτική δράση περοξειδασών, ενζύμων που περιέχουν αίμη στο μόριό τους και καταλύουν την οξείδωση μιας ποικιλίας ξενοβιοτικών ουσιών από το H₂O₂, με αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις την παραγωγή ROS (Awad H.M. et al., 2001, Galati G. and O'Brien P.J., 2004).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι η κατεχίνη του πράσινου τσαγιού επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού (EGCG) έχει την ιδιότητα να επάγει το σχηματισμό H₂O₂ και να προκαλεί οξειδωτικές βλάβες σε απομονωμένο και κυτταρικό DNA παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης. Αυτή η προοξειδωτική δράση μπορεί να εξηγήσει την ικανότητα της EGCG να ενισχύει την προκαλούμενη από διμεθυλδραζίνη ή νιτροσαμίνη καρκινογένεση του παχέος εντέρου που παρατηρήθηκε σε ποντίκια (Galati G. and O'Brien P.J., 2004).

Για την εξήγηση της προοξειδωτικής δράσης κατεχολών όπως το διϋδροκαφεϊκό οξύ, το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ, έχει προταθεί ένας μηχανισμός που βασίζεται στην πραγματοποίηση των ακόλουθων αντιδράσεων:



↓
DNA Damage

Η αρχική οξείδωση των κατεχολών από το Cu²⁺ έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ημικιμόνης (αντίδραση 1) η οποία μπορεί να αντιδράσει με το O₂ προς σχηματισμό O₂^{•-} (αντίδραση 2). Αυτή η αντίδραση έχει αυτοκαταλυτικό χαρακτήρα καθώς το O₂^{•-} μπορεί να οξειδώσει την αρχική ένωση και να δημιουργήσει άλλη μια ημικιμόνη και H₂O₂ (αντίδραση 3). Το H₂O₂ μπορεί ακολούθως να μετατραπεί

ταχύτητα σε ρίζα $\text{OH}\cdot$ παρουσία Cu^+ μέσω μιας αντίδρασης τύπου Fenton (αντίδραση 5) (Sakihama Y. et al., 2002).

Όπως προαναφέρθηκε, φλαβονοειδή με φαινολικούς δακτυλίους μπορούν να οξειδωθούν με τη δράση περοξειδασών σε ρίζες φαινοξυλίου. Ένα παράδειγμα αποτελεί η κερκετίνη, το πιο άφθονο φλαβονοειδές στην ανθρώπινη διαίτα, η οποία περιέχει έναν κατεχολικό B δακτύλιο και οξειδώνεται από περοξειδάσες όπως η τυροσινάση ή η HRP (horseradish peroxidase) σε ενδιάμεσες ενώσεις κινόνης και ημικινόνης οι οποίες ακολούθως μπορούν να αντιδράσουν με γλουταθειόνη (GSH) προς σχηματισμό ενώσεων γλουταθειόνη-κερκετίνης (Galati G. and O'Brien P.J., 2004). Μπορεί επίσης να αυτοοξειδωθεί. Η κερκετίνη έτσι αφού οξειδωθεί σε κινόνη, δρα ως ηλεκτρονιόφιλο και μπορεί και συνδέεται ομοιοπολικά με το DNA και μερικές πρωτεΐνες όπως έχει βρεθεί σε κυτταρικές σειρές, ή παράγει ROS. Συνεπώς δίκαια θεωρείται η κύρια μεταλλαξιγόνο ουσία του κόκκινου κρασιού. Επιπλέον, η κερκετίνη, όπως επίσης και φαινολικές ουσίες όπως η τυραμίνη και η 3-γλυκοσίδα της μαλβιδίνης μπορούν να γίνουν άμεσα γενοτοξικές έπειτα από νιτροσυλίωσή τους *in vitro* (Awad H.M. et al., 2001, Tomera J.F., 1999).

Τα πολυφαινολικά συστατικά του κόκκινου κρασιού συνολικά έχει βρεθεί ότι έχουν μεταλλαξιγόνο δράση. Αυτό ίσως να εξηγείται εν μέρει από το γεγονός ότι επάγουν το σχηματισμό σουπεροξειδίου $\text{O}_2\cdot^-$ όπως έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων (Stoclet J.-C. et al., 2004). Επιπλέον, ένα από τα σημαντικά συστατικά του κόκκινου κρασιού, η ρεσβερατρόλη, επάγει το σχηματισμό χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs), ενός δείκτη μεταλλαξιγένεσης σε κυτταρικές σειρές από πνεύμονα χάμστερ, ενώ παρουσία ιόντων χαλκού προκαλεί θραύση του DNA (Matsuoka A. et al., 2001).

Οι προοξειδωτικές δράσεις των φλαβονοειδών δεν φαίνεται να είναι και τόσο σημαντικές *in vivo*, καθώς τα περισσότερα μέταλλα μετάπτωσης είναι απομονωμένα σε μορφές που δεν είναι ικανές να καταλύσουν αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Μπορούν να γίνουν κυρίως σε περιπτώσεις σοβαρών ασθενειών με υπερφόρτωση αυτών των μετάλλων. Παρόλα αυτά, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων φλαβονοειδών με τη μορφή διαιτητικών συμπληρωμάτων είναι επισφαλής έως ότου οι ακριβείς δράσεις τους έναντι του οξειδωτικού στρες αποτιμηθούν (Cao G. et al., 1997).

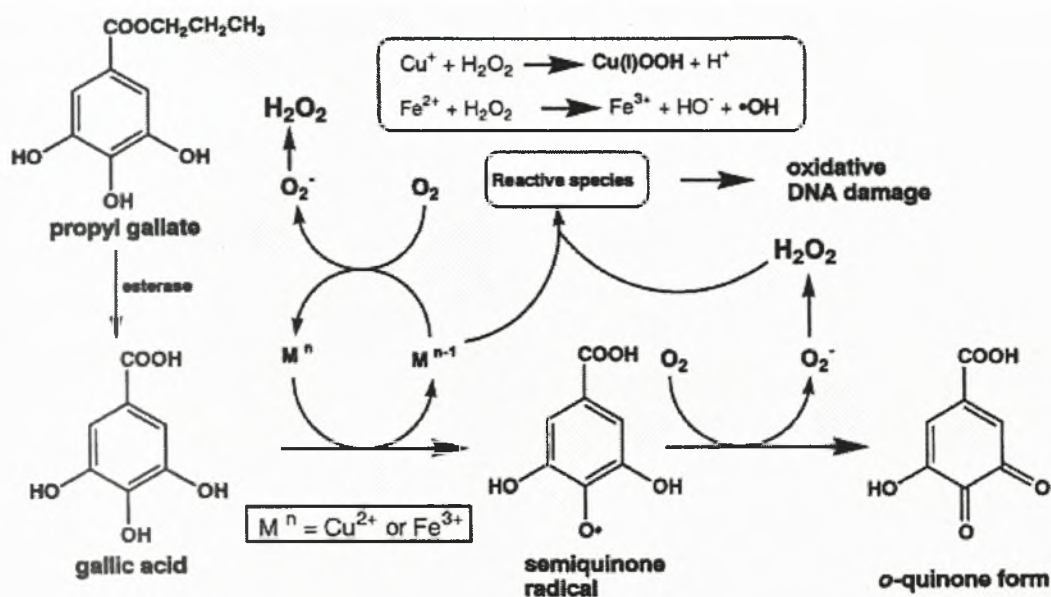
1.4. Γαλλικό οξύ

Το γαλλικό οξύ είναι ένα φαινολικό οξύ, παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Ο χημικός του τύπος είναι $\text{HC}_7\text{H}_5\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O}$ (τριϋδροξυβενζοϊκό ή διοξυσαλικυλικό οξύ) (Εικόνα 1.13.).

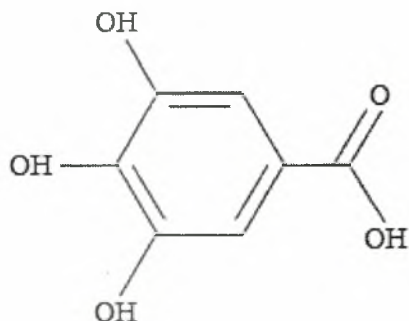
Το γαλλικό οξύ έχει βακτηριοστατικές, κυρίως όμως αντικαρκινικές ιδιότητες. Είναι γνωστό ότι επάγει τον κυτταρικό θάνατο ή σταματά τον κυτταρικό κύκλο σε μια ποικιλία κυτταρικών κυττάρων μέσω διαφορετικών μηχανισμών, ανάλογα με τον τύπο τους (Pellegrina C.D. et al, 2005). Ο συνήθης μηχανισμός είναι η επαγωγή των ROS σ' αυτά τα κύτταρα, ενώ έχει παρατηρηθεί επίσης ότι οδηγεί σε απόπτωση καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του στομάχου (Arimura T. et al., 2004).

Το γαλλικό οξύ όμως, έχει δειχθεί πειραματικά ότι διαθέτει και ισχυρές μεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Πειράματα έχουν γίνει με προπυλ-γαλλικό (PG), ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό με ευρεία χρήση ως συντηρητικό τροφίμων, του οποίου κύριος μεταβολίτης είναι το γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το γαλλικό οξύ αυξάνει τα επίπεδα της 8-υδροξυγουανίνης παρουσία Cu(II) και Fe(III) και εμπλέκεται στην πρόκληση οξειδωτικών βλαβών στο DNA σε καλλιέργειες

ανθρώπων κυττάρων. Οι βλάβες αυτές οφείλονται κυρίως στην παραγωγή $\text{OH}\cdot$ από αντιδράσεις Fenton. Ο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου παράγεται $\text{OH}\cdot$ από το γαλλικό οξύ φαίνεται στην εικόνα 1.12. : Η αυτοοξειδωση του γαλλικού οξέος από μέταλλα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ρίζας ημικινόνης. Παρουσία ιόντος μετάλλου M^n παράγεται H_2O_2 από το σουπεροξειδίο $\text{O}_2^{\cdot-}$, με ταυτόχρονη αναγωγή του M^n σε M^{n-1} (Kobayashi H. et al., 2004).



Εικόνα 1.12.: Πιθανός μηχανισμός των διαμεσολαβούμενων από μέταλλα βλαβών του DNA που προκαλεί το γαλλικό οξύ, ένας μεταβολίτης του προπυλ-γαλλικού.



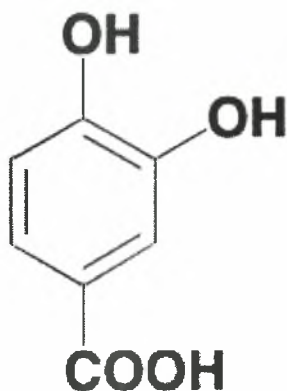
Εικόνα 1.13.: Χημική δομή του γαλλικού οξέος (τριϋδροξυβενζοϊκού οξέος).

1.5. Πρωτοκατεχοϊκό οξύ

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ είναι ένα παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Ο χημικός του τύπος είναι $(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH}$ (3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ) (Εικόνα 1.14.). Είναι ένα από τα πιο άφθονα φαινολικά οξέα στα εδάφιμα λαχανικά και φρούτα (Robbins R.J., 2003).

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ έχει βακτηριοστατικές ιδιότητες και έτσι βρίσκει πολλές εφαρμογές στη φαρμακευτική. Διαθέτει επίσης ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες, δέκα φορές πιο ισχυρές από την α -τοκοφερόλη. Επιπλέον, μικρές δόσεις

πρωτοκατεχοϊκού οξέος (ακόμα και 100 ppm) έδειξαν πολύ σημαντικές χημειοπροστατευτικές δράσεις σε διάφορους τύπους επαγόμενης καρκινογένεσης στα ποντίκια. Αντίθετα, υψηλές δόσεις πρωτοκατεχοϊκού οξέος πριν την εφαρμογή των καρκινογόνων παραγόντων (οι οποίοι αυξάνουν τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού), ενισχύει την ογκογένεση σε ποντίκια, καθώς επάγει το σχηματισμό ROS. Έχει προταθεί ότι γι' αυτό ευθύνεται το γεγονός ότι το πρωτοκατεχοϊκό οξύ αποικοδομείται από την τυροσινάση σε μεταβολίτες χωρίς αντιοξειδωτικές ιδιότητες ή ακόμα και με δυνατότητες προαγωγής και ενίσχυσης της ογκογένεσης (Nakamura Y. et al., 2000).



Εικόνα 1.14.: Χημική δομή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος (3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ).

1.6. Κερκετίνη

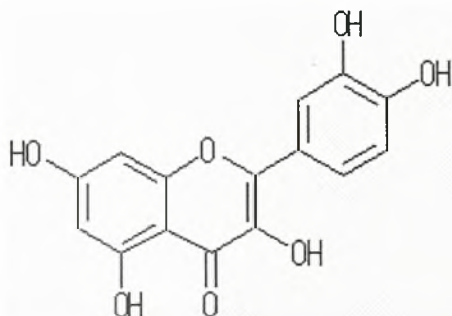
Η κερκετίνη είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα φλαβονοειδή. Είναι μια φλαβονόλη (3', 3'', 4', 5, 7-πενταϋδροξυφλαβόνη) (Εικόνα 1.15.), η οποία βρίσκεται σε μια πληθώρα εδώδιμων φρούτων και λαχανικών, όπως τα μήλα, τα σταφύλια, τα λεμόνια, τα κρεμμύδια και οι ντομάτες. Η μέση ημερήσια κατανάλωση κερκετίνης από τον άνθρωπο κυμαίνεται από 16 έως 25 mg (Undeger U. et al., 2004, Jakubowicz-Gil J. et al., 2005).

Η κερκετίνη βρίσκει ένα μεγάλο εύρος βιολογικών, φαρμακολογικών και ιατρικών εφαρμογών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι είναι μια πολύ καλά μελετημένη ουσία, η οποία έχει αποδειχθεί ότι έχει και αντιμεταλλαξιγόνο, αλλά και μεταλλαξιγόνο δράση (Undeger U. et al., 2004).

Η κερκετίνη θεωρείται ότι έχει την ικανότητα να δρα τόσο ως αναστολέας της διαδικασίας καρκινογένεσης, όσο και ως ισχυρός χημειοπροστατευτικός παράγοντας. Η κερκετίνη διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορεί είτε να δεσμεύσει τις ROS, είτε να σχηματίσει χηλικά σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων, εμποδίζοντας τις αντιδράσεις Fenton. Μ' αυτόν τον τρόπο προστατεύει την οξείδωση των βιολογικών μακρομορίων και κυρίως του DNA. Έχει βρεθεί επίσης ότι αναστέλλει την παραγωγή NO, ενώ προστατεύει από την επαγόμενη από H₂O₂ απόπτωση κυττάρων (Chow J.-M. et al., 2005). Επιπλέον, επηρεάζει τη δραστηριότητα ενός ευρέος φάσματος ενζύμων στα θηλαστικά, όπως του κυτοχρώματος P450, διαφόρων ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού, της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, της DNA και της RNA πολυμεράσης και της τοποϊσομεράσης, προστατεύοντας το DNA από μεταλλάξεις (Da Silva J. et al., 2002). Η κερκετίνη αποτελεί επίσης και έναν σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα, καθώς αναστέλλει τον

πολλαπλασιασμό πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων (Soleas G. et al., 1997), διευκολύνει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και ενισχύει τη δράση χημειοθεραπευτικών ουσιών όπως η *cis*-πλατίνη στα καρκινικά κύτταρα (Jakubowicz-Gil J. et al., 2005).

Η μεταλλαξιγόνος δράση της κερκετίνης που έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες, πιθανολογείται ότι οφείλεται στην αυτοοξειδωσή της (Tomera J.F., 1999). Η αυτοοξειδωση της κερκετίνης καταλήγει στην παραγωγή μεταβολιτών τύπου ημικινόνης και κινόνης, οι οποίοι μπορούν να δράσουν ως ηλεκτρονιόφιλα, αντιδρώντας με βιολογικά μακρομόρια όπως το DNA, ή προκαλώντας το σχηματισμό ROS μέσω κυκλικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (Awad H.M. et al., 2001).



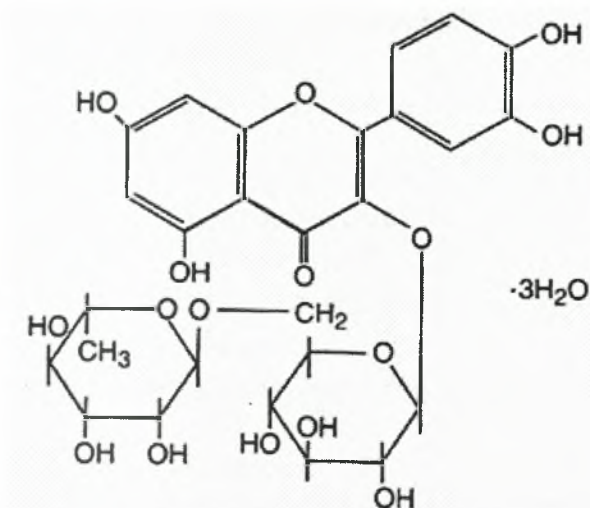
Εικόνα 1.15.: Χημική δομή της κερκετίνης (3', 3', 4', 5, 7-πενταϋδροξυφλαβόνη).

1.7. Ρουτίνη

Η ρουτίνη είναι ένα φλαβονοειδές και συγκεκριμένα μια φλαβονόλη. Δομικά, πρόκειται για τη γλυκοσίδη της κερκετίνης (3-ο-ραμνοσυλ-γλυκοσυλ-κερκετίνη) (Εικόνα 1.16.). Η ρουτίνη, όπως και η κερκετίνη, είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα φυσικά φλαβονοειδή με ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών. Βρίσκεται διάφορες τροφές όπως η σίκαλη, ο μαϊντανός, οι ντομάτες και τα βερίκοκα (Kwon K.H. et al., 2005).

Οι βιολογικές ιδιότητες της ρουτίνης παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με αυτές της κερκετίνης, κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω της μεγάλης ομοιότητας και στη χημική τους δομή. Η ρουτίνη έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς δρα είτε ως δεσμευτής ROS, είτε σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων. Επιπλέον, μπορεί και προστατεύει το DNA από μεταλλάξεις και μέσω της επιδιόρθωσης των ριζών ανιόντων δεοξυθυμιδίνης ($dT^{\bullet-}$) που σχηματίζονται από την αντίδρασή του με OH^{\bullet} (Zhao C. et al., 2003). Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής της ικανότητας *in vitro* είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτήν της κερκετίνης, λόγω της παρουσίας του σακχάρου στο μόριό της (Noroosi M. et al., 1998).

Η ρουτίνη έχει επίσης αντικαρκινικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ορισμένων καρκινικών σειρών, ενώ μπορεί να μεταβάλλει τη δραστηριότητα ενζύμων ή και να εμποδίσει άμεσα τη μεταλλαξιγόνο επίδραση πολλών καρκινογόνων ουσιών (Soleas G. et al., 1997).



Εικόνα 1.16.: Χημική δομή της ρουτίνης (3-ο-ραμνοσυλ-γλυκοσυλ-κερκετίνη).

1.8. Μεθανολικά-Υδατικά εκχυλίσματα Μανδηλαριάς

Τα εκχυλίσματα της πειραματικής διαδικασίας προέρχονται από την ελληνική ποικιλία σταφυλιών Μανδηλαριάς Σαντορίνης. Η ποικιλία Μανδηλαριάς είναι μια από τις πιο έντονες όσον αφορά στο χρώμα τους ποικιλίες (Εικόνα 1.17.), χαρακτηριστικό προϊόν της περιοχής του Αιγαίου. Η καλλιέργεια της Μανδηλαριάς αρχικά ξεκίνησε στα νησιά των Κυκλάδων, στη Ρόδο και την Κρήτη. Στη συνέχεια διαδόθηκε στην Πελοπόννησο, την Αττική, τη Βοιωτία, την Εύβοια, τη Θεσσαλία και τη Μακεδονία. Σήμερα, οι συνολικές της καλλιέργειες Μανδηλαριάς καταλαμβάνουν περίπου 15000 στρέμματα (1500 εκτάρια).

Τα κρασιά που παράγονται από τη Μανδηλαριά έχουν μέτρια έως χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, μέση οξύτητα και πλούσιο, έντονο κόκκινο χρώμα.

Η σύσταση των υδατικών (Πίνακας 1.3.) και των μεθανολικών (Πίνακας 1.4.) εκχυλισμάτων σε πολυφαινόλες ήταν γνωστή.

Πίνακας 1.3.: Σύσταση σε πολυφαινόλες του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε διάφορες συγκεντρώσεις.

	75μg/ml	150μg/ml	300μg/ml
Γαλλικό οξύ (μM)	0,69	1,38	2,77
Κατεχίνη (μM)	0,09	0,18	0,36
Επικατεχίνη (μM)	0,08	0,17	0,33
trans-ρεσβερατρόλη (μM)	0,01	0,03	0,05
Κερκετίνη (μM)	0,03	0,06	0,12
Βινιφερίνη (μM)	0,04	0,08	0,17
Σύνολο (μM)	0,95	1,90	3,79

Πίνακας 1.4.: Σύσταση σε πολυφαινόλες του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε διάφορες συγκεντρώσεις.

	75μg/ml	150μg/ml	300μg/ml
Γαλλικό οξύ (μM)	7,2	14,4	28,8
Επικατεχίνη (μM)	1,2	2,4	4,8
Κατεχίνη (μM)	1,5	3	6
p-κουμαρικό οξύ (μM)	0,25	0,5	1
Φερουλικό οξύ (μM)	0,07	0,13	0,26
Ρεσβερατρόλη (μM)	0,25	0,5	1
Ρουτίνη (μM)	0,04	0,07	0,14
Κερκετίνη (μM)	0,5	1	2
Σιρινγκικό οξύ (μM)	3,4	6,8	13,6
Σύνολο (μM)	14,40	28,80	57,60



Εικόνα 1.17.: Σταφύλια (κόκκινα) ελληνικής ποικιλίας Μανδηλαριάς Σαντορίνης.

1.9. Μιτομυκίνη C

Η μιτομυκίνη C είναι ένα κυτταροτοξικό αντιβιοτικό που παράγεται από το μύκητα *Streptomyces caespitosus*. Αποτελεί μια ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως στη χημειοθεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνων, καθώς έχει ισχυρές μεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Είναι ένα από τα ελάχιστα αντιβιοτικά που αντιδρά άμεσα και ομοιοπολικά με το DNA, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Tomasz M. et al., 1987, Iyer V.N. and Szybalski W., 1963).

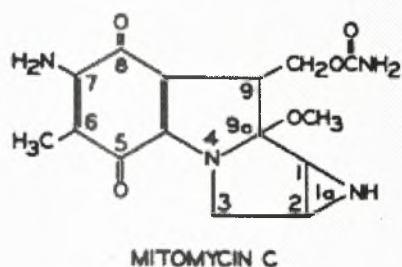
Η μιτομυκίνη C αλληλεπιδρά με το DNA, καταλήγοντας τελικά σε ομοιοπολική (μη αντιστρεπτή) της σύνδεση με αυτό και ακολούθως στο σχηματισμό σταυροσυνδέσμων (cross-links) μεταξύ των συμπληρωματικών κλώνων του DNA. Αυτές οι μεταβολές που προκαλεί στο DNA πιστεύεται ότι είναι απαραίτητες για την κυτταροτοξικότητά της (Ueda K. and Komano T., 1984). Πέρα όμως από την αλκυλιωτική για το DNA δράση της, η μιτομυκίνη C έχει προταθεί ότι μπορεί να σχηματίζει H_2O_2 , $O_2^{\bullet -}$ και ρίζες υδροξυλίου έπειτα από αναγωγική βιοενεργοποίησή της, προκαλώντας έτσι βλάβες στο DNA (Undeger U. et al., 2004).

Για την πρόκληση βλαβών στο DNA έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη η αναγωγική ενεργοποίηση της μιτομυκίνης C (Ueda K. and Komano T., 1984). Στα βιολογικά συστήματα, η μιτομυκίνη C μπορεί να αναχθεί από μια ποικιλία ενζύμων (ρεδουκτάσες των βακτηρίων και των θηλαστικών), από χημικούς αναγωγικούς παράγοντες, καθώς και από ήπιες όξινες συνθήκες (Tomasz M. et al., 1987). Από αυτήν τη διαδικασία προκύπτουν ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις ικανές να προκαλούν σταυροσυνδέσμους στους κλώνους του DNA. Οι ηλεκτρονιόφιλες αυτές ενώσεις μπορούν να προκύψουν είτε με αναγωγή ενός ηλεκτρονίου, είτε δύο ηλεκτρονίων. Το προϊόν της αναγωγής με ένα ηλεκτρόνιο είναι μια ρίζα, το ανιόν της ημικινόνης της μιτομυκίνης C, το οποίο μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο για να δώσει την αρχική κινόνη μιτομυκίνη C και σουπεροξειδίο $O_2^{\bullet-}$. Επομένως, παρουσία φυσιολογικών συγκεντρώσεων οξυγόνου, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της παραγόμενης ρίζας ημικινόνης $MC^{\bullet-}$ εμπλέκεται στην άμεση αλκυλίωση του DNA και έτσι η πρόκληση σταυροσυνδέσμων μέσω αυτού του μονοπατιού είναι αμελητέα. Αντίθετα, η αναγωγή με δύο ηλεκτρόνια, έχει ως προϊόν την υδροκινόνη της μιτομυκίνης C (MCH_2), η οποία δεν αντιδρά ταχύτατα με το μοριακό οξυγόνο και έτσι η πρόκληση σταυροσυνδέσμων είναι ανεξάρτητη από το οξυγόνο (Penketh P.G. et al., 2001).

Τη μεγάλη χημική δραστηριότητα του μορίου της μιτομυκίνης C θα μπορούσε να συμπεράνει κανείς λογικά από τη δομή του (Εικόνα 1.18.): ο δακτύλιος αζιριδίνης 1, 2, 1^a, η μεθυλοουρεθάνη στη θέση 9, η δομή κινόνης 5, 8 και οι υποκαταστάτες στις θέσεις 7 και 9α είναι όλες πολύ δραστικές ομάδες. Η πολυκυκλική δομή μπορεί να ευνοεί την παρεμβολή αυτής της ένωσης στο DNA, ως ένα βήμα προηγούμενου του σχηματισμού επιλεκτικών σταυροσυνδέσμων (Iyer V.N. and Szybalski W., 1963).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η δράση της μιτομυκίνης C στο DNA χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία του, προκαλώντας κυρίως βλάβες στις δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες G-T (Ueda K. and Komano T., 1984).

Οι ιδιότητες της μιτομυκίνης C, την καθιστούν κατάλληλη για χρησιμοποίησή της εκτός από ιατρικούς, και για ερευνητικούς σκοπούς. Η μιτομυκίνη C εφαρμόζεται σήμερα σε μια πληθώρα πειραμάτων μελέτης του DNA τόσο σε ανέπαφα, όσο και σε μετασχηματισμένα κύτταρα, όπως επίσης και σε ελέγχους κυτταροτοξικότητας ουσιών με τη μέθοδο των χρωματιδιακών ανταλλαγών. Παρόλα αυτά, η ακριβής δράση της και η χημική φύση των σταυροσυνδέσμων που προκαλεί, μένουν να αποδειχθούν.



Εικόνα 1.18.: Χημική δομή της μιτομυκίνης C.

1.10. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Η πειραματική αυτή μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια ανίχνευσης πιθανών νέων μηχανισμών χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιών. Η χημειοπροστατευτική αυτή δράση των πολυφαινολών μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τη μεταλλαξιγένεση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο και στα τρία στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση των πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιών στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (δείκτης μεταλλαξιγένεσης) που επάγει η μιτομυκίνη C, σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα *in vitro*. Η μελέτη των βιολογικών δράσεων των πολυφαινολών σε ευκαρυωτικά κύτταρα είναι πολύ σημαντική διότι είναι ενώσεις που βρίσκονται σε αφθονία στην πλειοψηφία των βασικών τροφών της ανθρώπινης διαίτας και έχει προταθεί ότι προστατεύουν από πολλές ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, η στεφανιαία καρδιακή νόσος και ο καρκίνος.

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 ακόλουθων εταιρειών:

Sigma (Η.Π.Α.)

5-Βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU)
Hoechst 33258 (Bisbenzimidazole H 33258)
Κολχικίνη
Γαλλικό οξύ
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ
Κερκετίνη
Ρουτίνη

Merck (Γερμανία)

Χλωριούχο Κάλιο (KCl)
Μεθανόλη (CH₃OH).
Αιθανόλη (CH₃CH₂OH)
Δισόξινο φωσφορικό Κάλιο (KH₂PO₄)
Μονόξινο φωσφορικό Νάτριο (Na₂HPO₄)
Κιτρικό οξύ
Χρωστική Giemsa
Οξικό οξύ (CH₃COOH)

Fluka (Η.Π.Α.)

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Leo (Δανία)

Ηπαρίνη

Biochrom (Γερμανία)

RPMI – 1640
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
Penicillin-Streptomycin
Φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA)
L – γλουταμίνη

Kyowa (Ιαπωνία)

Μιτομυκίνη C

2.1.2. Κύτταρα

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες ήταν ανθρώπινα λεμφοκύτταρα από δείγματα αίματος εθελοντών αιμοδοτών. Οι εθελοντές ήταν ηλικίας 19-25 ετών, υγιείς, μη καπνίζοντες και δεν έπαιρναν φάρμακα. Οι αιμοληψίες γίνονταν την ημέρα που έμπαιναν και οι καλλιέργειες.

2.1.3. Ουσίες και εκχυλίσματα σταφυλιών

Μελετήθηκε η δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικό και υδατικό) από μια ποικιλία αμπέλου (*Vitis vinifera*), η οποία ονομάζεται *Μανδηλαριά Σαντορίνης* (κόκκινα σταφύλια). Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Επιπλέον, οι καθαρές ουσίες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής πολυφαινόλες: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ, κερκετίνη και ρουτίνη.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister chromatid exchanges ή SCEs)

2.2.1.α. Γενικά

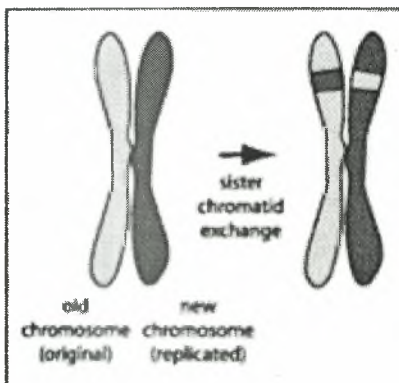
Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister Chromatid Exchange, SCEs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1958 από τον Herbert Taylor και τους συνεργάτες του. Οι SCEs αποτελούν ένα φυσικό φαινόμενο άμεσα συνδεδεμένο με την αντιγραφή του DNA. Πρόκειται για ανταλλαγές γενετικού υλικού ανάμεσα σε απόλυτα ομόλογες θέσεις του χρωμοσώματος, μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (Εικόνα 2.1.). Αυτό συμβαίνει κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Οι SCEs συμβαίνουν φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης, κατά το ζευγάρωμα των συμπυκνωμένων αδελφών χρωματίδων. Ομόλογες αλληλουχίες DNA ευθυγραμμίζονται η μια δίπλα στην άλλη, προκαλείται σπάσιμο και στις δυο και στη συνέχεια αυτές ανταλλάσσονται μεταξύ των δύο χρωματίδων. Όταν όμως το DNA ενός κυττάρου υφίσταται σοβαρές βλάβες από γενοτοξικούς παράγοντες, ο ρυθμός των SCEs αυξάνεται (Albanesi T. et al, 1999). Ο μοριακός μηχανισμός αυτής της διαδικασίας δεν είναι ακόμη σαφής. Πιστεύεται ότι οι SCEs προκαλούνται λόγω της ανεπάρκειας των επιδιορθωτικών ενζύμων και των βλαβών που προκαλούν σ' αυτά οι γενοτοξικοί και μεταλλαξιγόνοι παράγοντες. Άλλες αναφορές πάλι, υποστηρίζουν πως οι SCEs είναι μια προσπάθεια του κυττάρου να επιδιορθώσει τις βλάβες του DNA που προκαλούνται από τους γενοτοξικούς παράγοντες. Μερικές αναφορές προτείνουν ότι συμβαίνουν λόγω ενεργοποίησης ενός επιδιορθωτικού μονοπατιού του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Sonoda E. et al, 1999). Επιπλέον, οι SCEs έχουν συσχετιστεί με την επαγωγή σημειακών μεταλλάξεων, την ενίσχυση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και την κυτταροτοξικότητα.

Η μελέτη της συχνότητας των χρωματιδιακών ανταλλαγών είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη δοκιμασία για την διαπίστωση των βλαβών που προκαλούν ουσίες στο DNA των κυττάρων στη διάρκεια της συνθετικής φάσης. Η αύξηση της συχνότητας των SCE θεωρείται ότι αντανάκλα στην αποτυχία της επισκευής των

βλαβών του DNA και είναι 200 φορές πιο ευαίσθητος δείκτης των βλαβών του DNA από ότι είναι η μελέτη των χρωμοσωμικών ατυπιών (Latt S.A., 1974).

Η μέθοδος των SCEs έχει το προτέρημα ότι εφαρμόζεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Πειράματα *in vivo* ή *in vitro* με κύτταρα θηλαστικών δίνουν πληροφορίες για την κατάσταση στα θηλαστικά με μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι πειράματα σε προκαρυωτικά βακτηριακά κύτταρα (Takehisa S., 1982, Williams G.M. and Weisburger J.H., 1988). Άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (υπολογισμός PRI (Proliferation Rate Index), έλεγχος πιθανής κυτταροστατικότητας και κυτταροτοξικότητας) και η στατιστική ισχύς των αποτελεσμάτων, καθώς οι μετρήσεις γίνονται σε μεγάλο αριθμό κυττάρων. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι αποτελεί έναν δείκτη βλαβών, διότι οι ίδιες οι SCEs δεν είναι μεταλλάξεις στο DNA, καθώς επίσης και ότι απαιτεί *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες για δυο συνεχείς S φάσεις (2 μιτώσεις) και επομένως πρόκειται για μια σχετικά χρονοβόρα διαδικασία.

Η μέθοδος των SCEs έχει μεγαλύτερη ευαισθησία αλλά μικρότερη εξειδίκευση. Ο όρος ευαισθησία αναφέρεται στο ποσοστό (%) καρκινογόνων ουσιών που δίνουν θετικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο, ενώ ο όρος εξειδίκευση αφορά στο ποσοστό (%) μη καρκινογόνων ουσιών που δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα. Αυτό σημαίνει ότι με τη μέθοδο των SCEs υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να επισημανθεί η καρκινογόνος δράση μιας ουσίας, λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας. Υπάρχει όμως μεγάλη πιθανότητα μια μη καρκινογόνος ουσία να δώσει θετικό αποτέλεσμα λόγω χαμηλότερης εξειδίκευσης (Tennant R.W. et al. 1987).



Εικόνα 2.1. : Σχηματική αναπαράσταση των χρωματιδιακών ανταλλαγών σ' ένα χρωμόσωμα δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης. Στο χρωμόσωμα δεξιά διακρίνεται στον άνω βραχίονα μια διπλή χρωματιδιακή ανταλλαγή.

2.2.1.β. Η μέθοδος

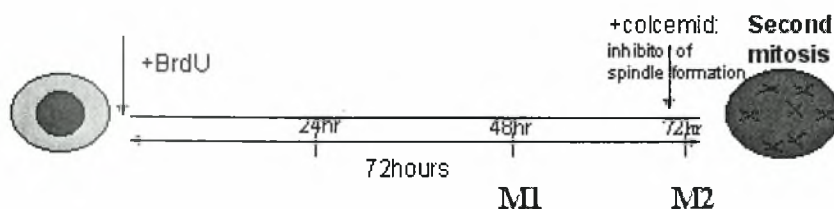
Η μέθοδος των SCEs συνήθως εφαρμόζεται σε ανθρώπινα περιφερειακά λεμφοκύτταρα του αίματος. Τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται στην G₀ φάση του κυτταρικού τους κύκλου και πρέπει να διεγερθούν για να διαιρεθούν *in vitro*, από ένα μη εξειδικευμένο αντιγόνο όπως η φυτοαιμαγλουτίνη (PHA). Για έναν επαρκή αριθμό μιτωτικών κυττάρων, ένας αναστολέας σχηματισμού της πυρηνικής ατράκτου όπως η κολχικίνη πρέπει να προστεθεί λίγο πριν τη μονιμοποίησή τους (στις 72 ώρες), για να «μπλοκάρει» τα κύτταρα στην (προ)μετάφαση της δεύτερης μίτωσης (Εικόνα 2.2.).

Η παρατήρηση των SCE γίνεται στα μεταφασικά χρωμοσώματα δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης. Για να μπορέσουν οι SCEs να γίνουν ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο πρέπει να προηγηθεί ενσωμάτωση στο DNA ενός κατάλληλου νουκλεοσιδικού αναλόγου. Το 1972 οι Zakharow και Egorina ενσωμάτωσαν στο DNA την 5-βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) που αντικαθιστά τη θυμιδίνη. Η BrdU προστίθεται στο καλλιεργητικό υλικό για τη διάρκεια δυο πλήρων κυτταρικών κύκλων και κατά την αντιγραφή του DNA ενσωματώνεται σε όλους τους νέους κλώνους που παράγονται. Κατά την χρώση των παρασκευασμάτων των λεμφοκυττάρων, η BrdU αντιδρά μέσω μιας φωτοχημικής αντίδρασης (η οποία υποβοηθάται από υπεριώδες φως μακρού μήκους κύματος) με την χρωστική Hoechst 33258. Στη συνέχεια γίνεται εφαρμογή της Giemsa στα παρασκευάσματα, πετυχαίνοντας διαφορετικό χρωματισμό των χρωματίδων. Σύμφωνα με τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αντιγραφής του DNA, μετά από μία μιτωτική διαίρεση (1^η μιτωτική διαίρεση), οι δυο χρωματίδες των χρωμοσωμάτων θα αποτελούνται από έναν παλαιό, αρχικό κλώνο και από έναν νέο με BrdU. Επομένως και οι δυο θα χρωματίζονταν σκούρες από το φυσιολογικό χρώμα της Giemsa (Εικόνα 2.3.). Στην 2^η μιτωτική διαίρεση, η μια χρωματίδα των χρωμοσωμάτων θα αποτελείται από δυο νέους κλώνους DNA και συνεπώς θα χρωματίζεται λιγότερο σκούρη (ωχρή), ενώ η άλλη που θα έχει και τον παλαιό κλώνο, θα χρωματίζεται σκούρη (Εικόνες 2.3. και 2.4.B). Αν συμβεί μια ανταλλαγή, αυτή φαίνεται σαν ένα σκούρο τμήμα της μιας χρωματίδας να έχει μετατοπιστεί στην άλλη. Κατά την 3^η (ή και πλέον) μιτωτική διαίρεση στα περισσότερα χρωμοσώματα και οι δυο χρωματίδες θα έχουν ενσωματωμένη BrdU στους δυο κλώνους DNA, άρα ολόκληρα τα χρωμοσώματα θα εμφανίζονται ωχρά (Εικόνα 2.4.Γ).

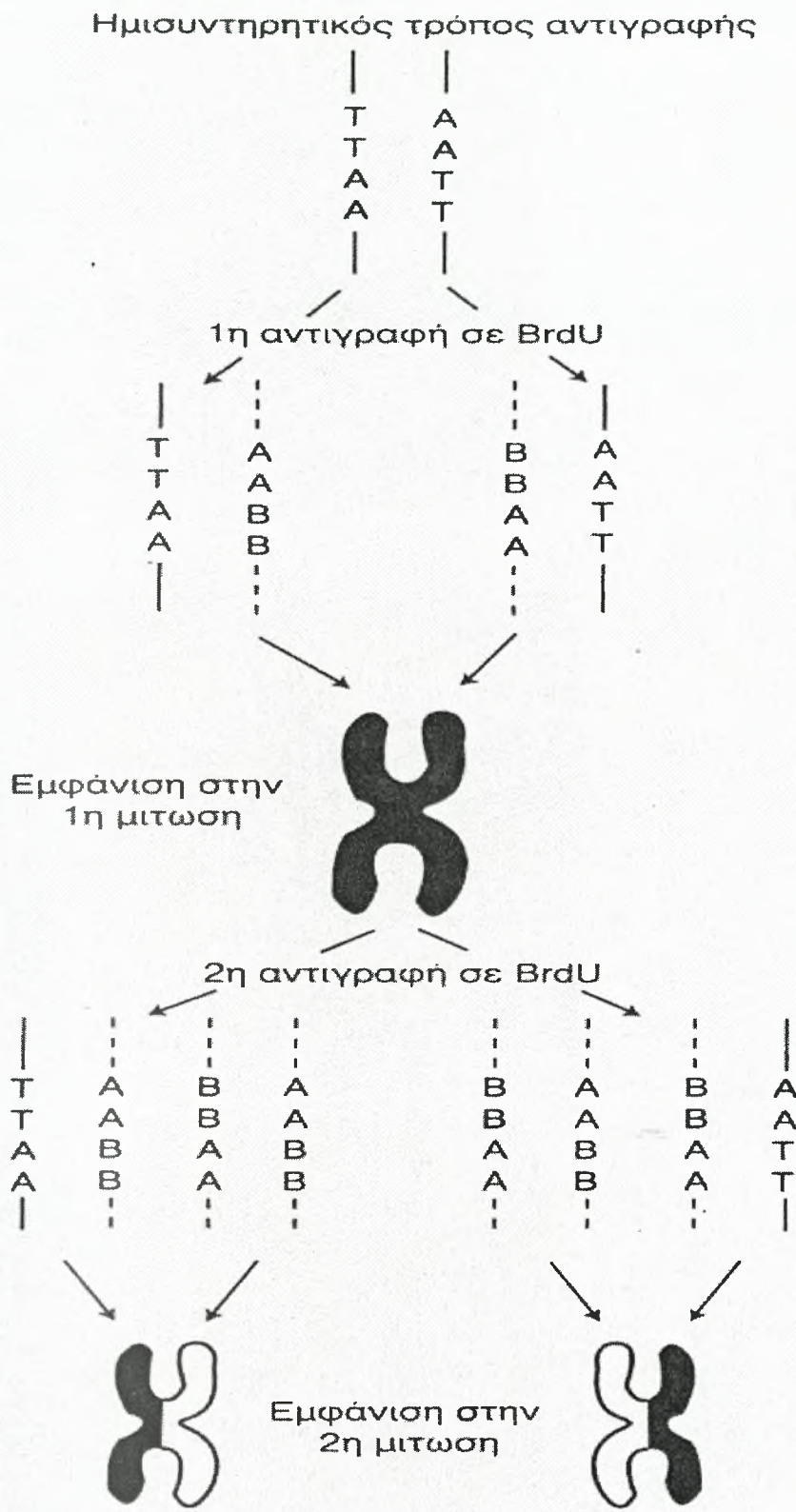
2.2.1.γ. Εφαρμογές των χρωματιδιακών ανταλλαγών

Η μελέτη των SCEs συμβάλλει:

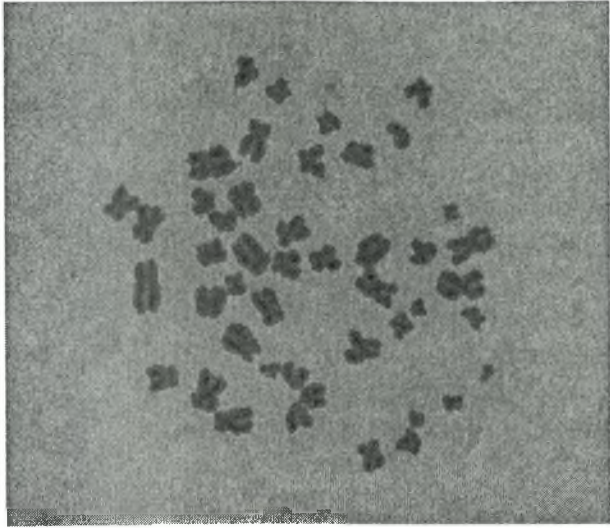
- Στον εντοπισμό μεταλλαξιγόνων – καρκινογόνων ουσιών.
- Στον εντοπισμό αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών (ικανών να εμποδίσουν ή να αντισταθμίσουν τη δράση των μεταλλαξιγόνων).
- Στην εκτίμηση της επίδρασης φυσικών και χημικών παραγόντων του περιβάλλοντος.
- Στην εκτίμηση της αντινεοπλασματικής χημειοθεραπείας, με πειράματα *in vitro*, *in vivo* και συνδυασμένα *in vivo-in vitro*.



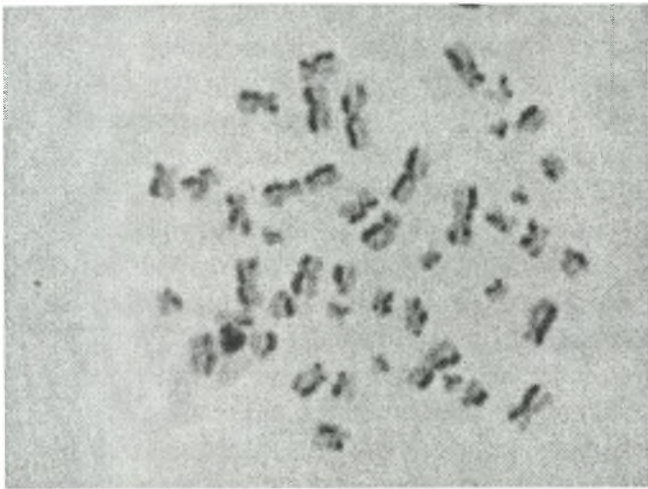
Εικόνα 2.2. : Η κολχικίνη προστίθεται στις 72 ώρες έτσι ώστε τα κύτταρα να έχουν συμπληρώσει δυο μιτωτικές διαιρέσεις και να «μπλοκάρουν» στη μετάφαση όπου τα χρωμοσώματα είναι πολύ συμπυκνωμένα και παρατηρούνται εύκολα.



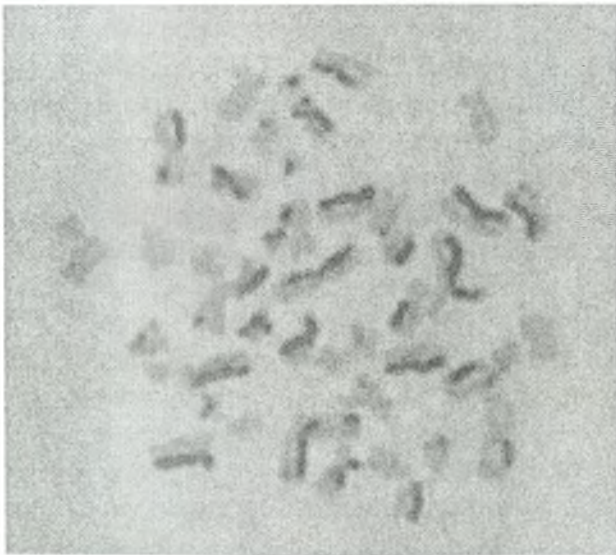
Εικόνα 2.3. : Διαγραμματική αναπαράσταση της δράσης της BrdU στην καλλιέργεια, με βάση τον ημισυντηρητικό μηχανισμό αντιγραφής του DNA.



A



B



Γ

Εικόνα 2.4. : Μεταφασικά
χρωμοσώματα
Α) Πρώτης μιτωτικής διαίρεσης,
Β) Δεύτερης μιτωτικής
διαίρεσης και
Γ) Τρίτης μιτωτικής διαίρεσης,
όπως αυτά φαίνονται στο οπτικό
μικροσκόπιο.

2.2.2. Πειραματική διαδικασία

2.2.2.α. Καλλιεργητικά υλικά και γημικά αντιδραστήρια

1. Καλλιεργητικό υλικό RPMI – 1640. Στο καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 περιέχονται πολλά αμινοξέα, σάκχαρα πολυσακχαρίτες και θρεπτικά συστατικά, απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε 100ml καλλιεργητικού υλικού RPMI-1640 προστίθενται 20ml ορού εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum) που περιέχει πολλές πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες, 2ml Pennicilin-Streptomycin, αντιβιοτικά για να εμποδίσουν τυχόν μικροβιακές επιμολύνσεις στην καλλιέργεια, 2.5ml φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) για να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και 2ml L-γλουταμίνης ενός απαραίτητου, αλλά ασταθούς αμινοξέος.
2. Διάλυμα ηπαρίνης – Anticlot. Αναρροφάται 0.5ml ηπαρίνης σε κάθε σύριγγα μιας χρήσεως πριν την αιμοληψία.
3. Διάλυμα 5-Βρωμοδεοξουριδίνης. Παρασκευάζεται με δισαπεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό διάλυμα 1000μg/ml. Το διάλυμα φυλάγεται σε φιαλίδιο σκούρου χρώματος για την αποφυγή της φωτόλυσης.
4. Διάλυμα μιτομυκίνης C. Παρασκευάζεται με δισαπεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό.
5. Διαλύματα stock υδατικού και μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς 237mg/ml και 386mg/ml αντίστοιχα, 20% σε μεθανόλη και τα δυο. Από τα διαλύματα stock με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα με τελικές συγκεντρώσεις στην καλλιέργεια 75μg/ml, 150μg/ml και 300μg/ml.
6. Διαλύματα stock 100mM γαλλικού οξέος και πρωτοκατεχοϊκού οξέος 10% και 8.9% σε μεθανόλη αντίστοιχα. Επίσης, διαλύματα stock 100mM κερκετίνης και ρουτίνης 100% σε DMSO. Από τα διαλύματα stock των 100mM κάθε πολυφαινόλης με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα με τελικές συγκεντρώσεις στην καλλιέργεια 5μM, 50μM και 100μM.
7. Διάλυμα κολχικίνης (Colchicine). Παρασκευάζεται με δισαπεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό διάλυμα 50μg/ml.
8. Διάλυμα χλωριούχου καλίου (KCl). Σε 500ml δισαπεσταγμένο νερό διαλύονται 2.74gr KCl, έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση 0.075M. Το διάλυμα αυτό είναι υπότονο και έτσι προκαλεί τη διόγκωση των κυττάρων, εξασφαλίζοντας την επαρκή διασπορά των χρωμοσωμάτων μέσα στα λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, απελευθερώνεται και απομακρύνεται η αιμοσφαιρίνη καθώς και άλλες πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων.
9. Διάλυμα μονιμοποίησης (Fix). Παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του με την ανάμιξη ενός (1) όγκου οξικού οξέος (CH₃COOH) και τριών (3) όγκων μεθανόλης (CH₃OH). Το διάλυμα αυτό προκαλεί μετουσίωση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών, οπότε και θανατώνει τα κύτταρα, κυρίως όμως διατηρεί την μορφολογία των χρωμοσωμάτων έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.
10. Διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33258 (Bisbenzimidazole H 33258). Διαλύεται σε δισαπεσταγμένο νερό ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.75 μg/ml.
11. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.8 (Sorensen buffer). Για την παρασκευή του χρησιμοποιούνται: α) Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού Καλίου (KH₂PO₄)

- 1/15M β) Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) 1/15M. Για την παρασκευή 100ml Sorensen γίνεται ανάμιξη 53.4ml διαλύματος α και 46.6ml διαλύματος β.
12. Ρυθμιστικό διάλυμα Mac Llvaines, pH 8.0. Για την παρασκευή του χρησιμοποιούνται: α) Διάλυμα κιτρικού οξέος 21.02gr/lit. β) Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) 35.6gr/lit. Γίνεται ανάμιξη των διαλυμάτων α και β σε αναλογία 15:85 (15 όγκοι α και 85 όγκοι β) ώστε να προκύψει διάλυμα pH 8.0.
13. Διάλυμα χρωστικής Giemsa 4% σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.8. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

2.2.2.β. Εξοπλισμός και όργανα

1. Θάλαμος ρεύματος αέρος συνεχούς ροής (Laminar Air-Flow) για την εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών εργασίας.
2. Φυγόκεντρος τύπου Hettich.
3. Επωαστικός κλίβανος Binder για να διατηρεί τις καλλιέργειες σε θερμοκρασία 37°C.
4. Ηλεκτρονικός ζυγός Sartorius.
5. Ψυκτικός θάλαμος (-20°C) και ψυγείο (+4°C).
6. Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας: ειδική λάμπα UV ισχύος 300 Watt (Osram) τοποθετείται σε ειδική διάταξη, σε απόσταση 40 cm από τις αντικειμενοφόρους πλάκες.
7. Οπτικό μικροσκόπιο Olympus.

2.2.2.γ. Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων

Οι αιμοληψίες γίνονται με ηπαρινισμένες σύριγγες μιας χρήσεως κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Οι επόμενοι χειρισμοί διενεργούνται στον θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής για την εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών: Σε σωληνάρια Falcon τοποθετούνται 5ml του καλλιεργητικού υλικού RPMI και προστίθενται 10 σταγόνες αίματος. Επιπλέον προστίθενται 50μl BrdU σε κάθε καλλιέργεια ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Οι καλλιέργειες στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε σταθερή θερμοκρασία 37°C για 72 ώρες. Στις 25 ώρες καλλιέργειας προστίθενται 100μl από το διάλυμα των εξεταζόμενων ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις καθώς και 50μl από το διάλυμα της μιτομυκίνης C (τελικής συγκέντρωσης 20ng/ml). Για κάθε εξεταζόμενη ουσία χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (καλλιέργεια στην οποία δεν έχει προστεθεί καμιά ουσία), ένας θετικός μάρτυρας (καλλιέργεια που περιέχει μόνο μιτομυκίνη) καθώς και ένας μάρτυρας που περιείχε μόνο την εξεταζόμενη ουσία στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που αυτή μελετήθηκε. Στις 70 ώρες καλλιέργειας προστίθενται 50μl διαλύματος κολχικίνης ώστε να προκύψει συγκέντρωση 0.5μg/ml και η επώασή τους συνεχίζεται για δυο ώρες ακόμη.

2.2.2.δ. Απομόνωση των λεμφοκυττάρων (διαδικασία πλύσεων)

Οι καλλιέργειες βγαίνουν από τον επωαστικό κλίβανο και μετά από ανάδευση μεταγγίζονται με πιπέτες Pasteur σε σωληνάρια φυγοκέντρησης των 10ml. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές και στους 25°C και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστίθενται με ανάδευση και σταγόνα-σταγόνα 7ml υπότονου διαλύματος KCl 0.075M και αφήνονται για 20 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές, αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολούθως, προστίθενται σταγόνα-σταγόνα και με σύγχρονη ανάδευση 7ml διαλύματος μονιμοποίησης (Fix) και τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές, στους 25°C. Η παραπάνω διαδικασία με το διάλυμα μονιμοποίησης επαναλαμβάνεται άλλες τρεις (3) φορές. Μετά από μεσοδιάστημα ηρεμίας από 20 λεπτά έως 48 ώρες στους -20°C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα (2-3 σταγόνες) επιστρώνεται με πιπέτες Pasteur από μεγάλο ύψος σε αντικειμενοφόρους πλάκες (που διατηρούνται στους 4°C μέσα σε αιθανόλη), οι οποίες τελικά αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.

2.2.2.ε. Χρώση των παρασκευασμάτων των αντικειμενοφόρων πλακών κατά Fluorescence Plus Giemsa

Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται σε διάλυμα Hoechst για 12 λεπτά. Αφού απομακρυνθούν από αυτό, ενοσταλάζονται σε κάθε μια 2-3 σταγόνες ρυθμιστικού διαλύματος McIlvaines pH 8.0 και τοποθετείται καλυπτρίδα. Τα παρασκευάσματα τοποθετούνται κάτω από τη λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για 1 ώρα και 15 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρούνται οι καλυπτρίδες και τοποθετούνται σε διάλυμα Giemsa 4% για 8 λεπτά. Κατόπιν, ξεπλένονται με άφθονο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.

2.2.2.στ. Παρατήρηση και μελέτη των SCE's των κυττάρων

Η παρατήρηση πραγματοποιείται με οπτικό μικροσκόπιο και μεγέθυνση x100 (καταδυτικός φακός). Η χρήση του καταδυτικού φακού γίνεται με κεδρέλαιο.

Τα απαραίτητα κριτήρια για την ορθή μελέτη των χρωματιδιακών ανταλλαγών είναι τα εξής:

- A) Η ικανοποιητική διαφοροποίηση (διαφορετική χρώση) των αδελφών χρωματίδων και η σαφής διάκριση μεταξύ 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} ή μετέπειτα γενιάς.
- B) Η απουσία αλληλοεπικαλύψεων στα χρωμοσώματα, ώστε να μην αποκρύπτεται αριθμός ανταλλαγών και να μην αλλοιώνονται τα αποτελέσματα.
- Γ) Για τον υπολογισμό των SCE's ανά μετάφαση, πολλαπλασιάζουμε το πηλίκο του ολικού αριθμού των ανταλλαγών δια του αριθμού των χρωμοσωμάτων, επί 46.

Για κάθε συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν οι χρωματιδιακές ανταλλαγές σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων της 2^{ης} μιτωτικής διαίρεσης.

2.2.2.ζ. Υπολογισμός της % αναστολής/επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης (χρωματιδιακών ανταλλαγών)

Η % αναστολή/επαγωγή των χρωματιδιακών ανταλλαγών για μια εξεταζόμενη ουσία υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου

\bar{x} ο μέσος όρος των χρωματιδιακών ανταλλαγών παρουσία της εξεταζόμενης ουσίας

\bar{x}_c ο μέσος όρος των χρωματιδιακών ανταλλαγών του θετικού μάρτυρα (της μιτομυκίνης C) και

m ο μέσος όρος των χρωματιδιακών ανταλλαγών του αρνητικού μάρτυρα (των αυτόματων χρωματιδιακών ανταλλαγών, απουσία οποιασδήποτε ουσίας)

2.2.3. Δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού (Proliferation Rate Index, PRI)

Επιπρόσθετα, ακολουθώντας την ίδια τεχνική, είναι δυνατή η εκτίμηση του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού (Proliferation Rate Index, PRI) των κυττάρων. Παράλληλα με την καταμέτρηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στα ίδια παρασκευάσματα από τις κυτταροκαλλιέργειες, μπορεί να μετρηθεί και ο PRI. Ο PRI εκφράζει το κατά πόσο τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν και επομένως εάν μια ουσία έχει κυτταροστατικότητα ή ακόμα και κυτταροτοξικότητα. Για τον υπολογισμό του δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού μετρήθηκαν τουλάχιστον 100 πυρήνες λεμφοκυττάρων συνολικά.

Ο Δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού (PRI) υπολογίζεται με τον τύπο:

$$PRI = [(M^1 + 2M^2 + 3M^{3+}) / (M^1 + M^2 + M^3)] * 100$$

όπου M^1 ο αριθμός των μεταφάσεων στην πρώτη μιτωτική διαίρεση

M^2 ο αριθμός των μεταφάσεων στη δεύτερη μιτωτική διαίρεση και

M^{3+} ο αριθμός των μεταφάσεων στην τρίτη και μετέπειτα μιτωτική διαίρεση

2.2.4. Στατιστική μελέτη

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίζονται οι μέσες τιμές των χρωματιδιακών ανταλλαγών και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής (standard deviation). Η στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων όσον αφορά τις SCEs αλλά και το δείκτη PRI βασίζεται στο κριτήριο t-Student.

Για τον υπολογισμό του **αριθμητικού μέσου όρου** από αταξινόμητο υλικό εφαρμόζεται ο τύπος:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

όπου: x_i είναι οι τιμές της μεταβλητής και
 N είναι το πλήθος των μετρήσεων

Αν το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων των τιμών της μεταβλητής από τον αριθμητικό μέσο όρο διαιρεθεί με τον αριθμό των παρατηρήσεων προκύπτει το μέτρο της μεταβλητότητας, το οποίο παριστάνει τον μέσο όρο των αποκλίσεων και ονομάζεται μέση τετραγωνική απόκλιση ή **διακύμανση** (variance). Υπολογίζεται από τον τύπο:

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

όπου n το μέγεθος του δείγματος

Προκειμένου να υπάρξει ένα μέτρο της διασποράς που να εκφράζεται στις ίδιες μονάδες μέτρησης με την μεταβλητή, υπολογίζουμε την τετραγωνική ρίζα της διακύμανσης. Το μέτρο της διασποράς που συμβολίζεται με s , ονομάζεται **τυπική ή σταθερά απόκλιση** (standard deviation):

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

Η t-κατανομή του Student

Οι συγκρίσεις μεταξύ των μέσων όρων των χρωματιδιακών ανταλλαγών παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών και του θετικού μάρτυρα της μιτομυκίνης C, στηρίχθηκε στην εφαρμογή της δοκιμασίας t του Student, οπότε και εκτιμήθηκε και η στατιστική σημαντικότητά τους.

Η τιμή του κριτηρίου t υπολογίζεται με τον τύπο:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{και επειδή } n_1 = n_2 \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n}}}$$

όπου

\bar{x}_1, \bar{x}_2 οι μέσοι όροι του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε μια καλλιέργεια

s_1, s_2 οι τυπικές αποκλίσεις κάθε δείγματος (καλλιέργειας)

n το πλήθος του δείγματος (στην περίπτωση αυτή αντιστοιχεί σε 30 πυρήνες λεμφοκυττάρων για όλες τις καλλιέργειες)

Αφού υπολογιστεί η τιμή του t , συγκρίνεται με την τιμή του πίνακα 2.1. που αντιστοιχεί σε $p < 0.05$ για βαθμούς ελευθερίας $df = n_1 + n_2 - 2$, δηλαδή $30 + 30 - 2$ και άρα για $df = 58$.

Πίνακας 2.1. : Τιμές Κατανομής t-student

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιτομυκίνης C στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (καμπύλη μιτομυκίνης).

Σε μια σειρά καλλιιεργειών προστέθηκαν διαλύματα με τελικές συγκεντρώσεις μιτομυκίνης C στην καλλιέργεια (mmc) 10, 20, 30, 50 και 70 ng/ml και μετρήθηκε ο αριθμός των χρωματιδιακών ανταλλαγών καθώς και ο δείκτης ρυθμού πολλαπλασιασμού (PRI) για κάθε μια από αυτές. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης μιτομυκίνης η οποία και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα. Η συγκέντρωση αυτή ήταν τα 20ng/ml διότι δεν αντιστοιχούσε σε πλατό της καμπύλης μιτομυκίνης (Εικόνα 3.1.), προκαλούσε μια ικανοποιητική αύξηση στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ δεν μείωνε πολύ και το δείκτη PRI.

3.2. Επίδραση των διαλυτών στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

Επειδή ορισμένες πολυφαινόλες και εκχυλίσματα δεν ήταν ιδιαίτερα διαλυτά στο νερό, προστέθηκαν ορισμένοι οργανικοί διαλύτες ούτως ώστε να διευκολύνουν τη διάλυσή τους. Οι διαλύτες αυτού ήταν η μεθανόλη και το DMSO. Έτσι, μελετήθηκε η επίδρασή τους στον αριθμό των SCEs και στον δείκτη PRI των λεμφοκυττάρων παρουσία μιτομυκίνης. Οι συγκεντρώσεις των διαλυτών που μελετήθηκαν, ήταν οι μέγιστες που χρησιμοποιήθηκαν για την διάλυση των εξεταζόμενων ουσιών.

Η μεθανόλη μελετήθηκε σε συγκέντρωση 0,3% v/v παρουσία 20ng/ml μιτομυκίνης. Βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει ούτε τον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών, ούτε το δείκτη PRI (Πίνακας 3.2., Εικόνα 3.2.).

Το DMSO μελετήθηκε σε συγκέντρωση 2,5% v/v παρουσία 20ng/ml μιτομυκίνης. Βρέθηκε ότι δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών, ενώ μειώνει κατά 19,52% το δείκτη PRI (Πίνακας 3.3., Εικόνα 3.3.).

3.3. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

Το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς Σαντορίνης προκαλούσε αύξηση των SCEs στη μεγάλη του συγκέντρωση (300μg/ml), ενώ στις άλλες δυο μικρότερες (75μg/ml, 150μg/ml) δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στον αριθμό τους (Πίνακας 3.4., Εικόνα 3.4.). Ο δείκτης PRI δεν είχε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις τρεις συγκεντρώσεις συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα, ούτε και παρουσία υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς 300μg/ml χωρίς μιτομυκίνη.

Το μεθανολικό εκχύλισμα της Μανδηλαριάς είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή των SCEs τόσο στη μεγάλη, όσο και στη μεσαία συγκέντρωσή του (300, 150 μg/ml) (Πίνακας 3.5., Εικόνα 3.6.). Ο δείκτης PRI μειωνόταν μόνο στην υψηλή του συγκέντρωση 300 μg/ml τόσο παρουσία, όσο και απουσία μιτομυκίνης.

Το γαλλικό οξύ είχε μια σημαντική επαγωγή SCEs και στις τρεις συγκεντρώσεις του 5, 50 και 100μM (31,21, 67,31 και 103,29% αντίστοιχα) (Πίνακας 3.6., Εικόνα 3.9.), ενώ παράλληλα μείωνε το δείκτη PRI και στις τρεις συγκεντρώσεις του, παρουσία μιτομυκίνης.

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση στις SCEs σε καμιά συγκεντρώση, μείωνε όμως το δείκτη PRI και στη μεσαία και στη μεγάλη εξεταζόμενη συγκεντρώσή του (Πίνακας 3.7., Εικόνα 3.10.).

Η κερκετίνη παρουσίασε μια σημαντική αναστολή των SCEs και στις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις της 5, 50 και 100 μM (16,5, 69,99 και 78,16 % αναστολή αντίστοιχα), ενώ αντίθετα σε συγκεντρώση 100μM απουσία μιτομυκίνης είχε μια επαγωγή SCEs 32,49 % (Πίνακας 3.8., Εικόνα 3.12.). Βρέθηκε επίσης ότι μειώνει το δείκτη PRI σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις της (και πιο έντονα, κατά 36,67% στα 100μM).

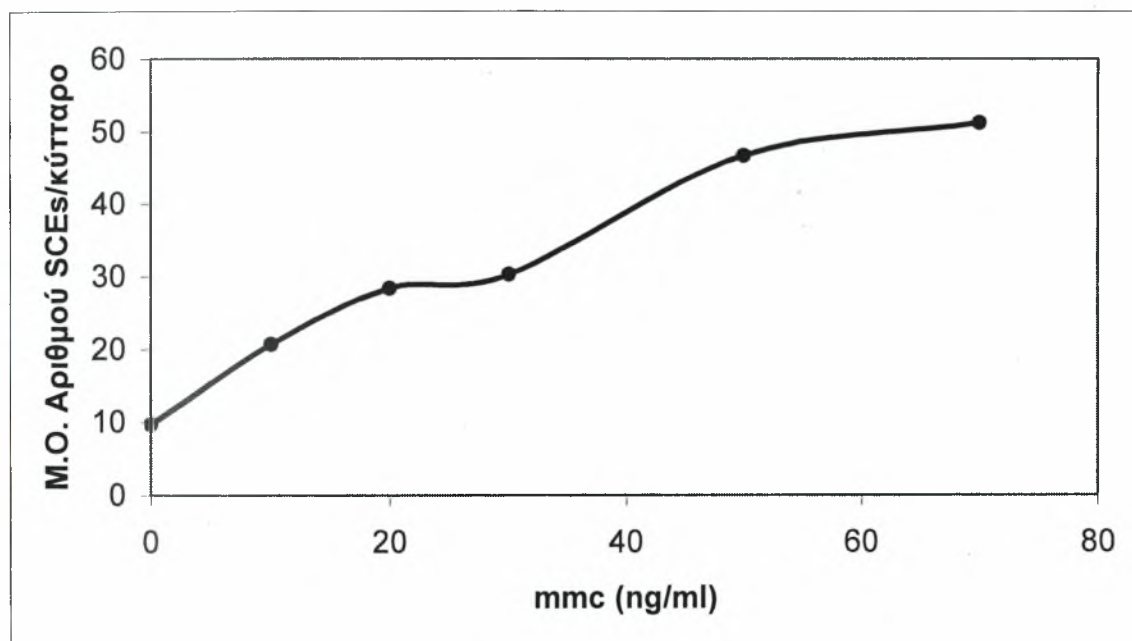
Η ρουτίνη βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση του αριθμού των SCEs σε συγκεντρώσεις 50 και 100μM (35,1 και 33,86 % αντίστοιχα) (Πίνακας 3.9., Εικόνα 3.15.), ενώ μειώνει το δείκτη PRI στις δυο παραπάνω εξεταζόμενες συγκεντρώσεις της, αλλά και μόνη της σε συγκεντρώση 100μM, απουσία μιτομυκίνης C.

Πίνακας 3.1. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων μιτομυκίνης C στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (καμπύλη μιτομυκίνης).

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI
Αρνητικός μάρτυρας	9,67±2,70	1,63
10 ng/ml mmc	20,65±2,37 *	1,8 *
20 ng/ml mmc	28,33±2,47 *	1,66
30 ng/ml mmc	30,28±4,65 *	1,74 *
50 ng/ml mmc	46,70±6,26 *	1,55 *
70 ng/ml mmc	51,20±4,73 *	1,43 *

¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).



Εικόνα 3.1. Καμπύλη συσχέτισης της συγκέντρωσης μιτομυκίνης με το μέσο όρο του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο για κάθε καλλιέργεια.

Πίνακας 3.2. Επίδραση της μεθανόλης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	8,73±2,82	1,44±0,49		
Θετικός μάρτυρας (mmc) ²	22,02±2,96	1,22±0,42		
Μεθανόλη 0,3% v/v +mmc	22,21±2,47	1,25±0,48	-	1,4

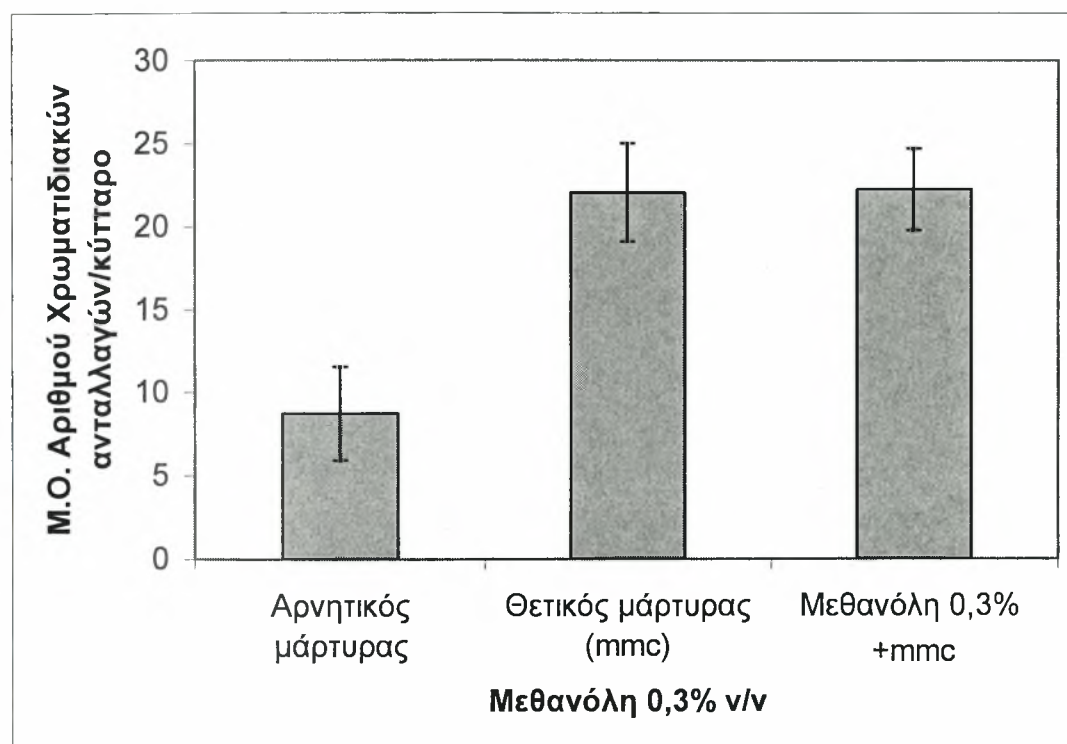
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.2. Επίδραση της μεθανόλης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05)

Πίνακας 3.3. Επίδραση του DMSO στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	7,64±2,73	2,23±0,69		
Θετικός μάρτυρας (mmc) ²	25,12±4,80	2,10±0,77		
DMSO 2,5% v/v +mmc	25,37±4,78	1,69±0,46*	-	1,40

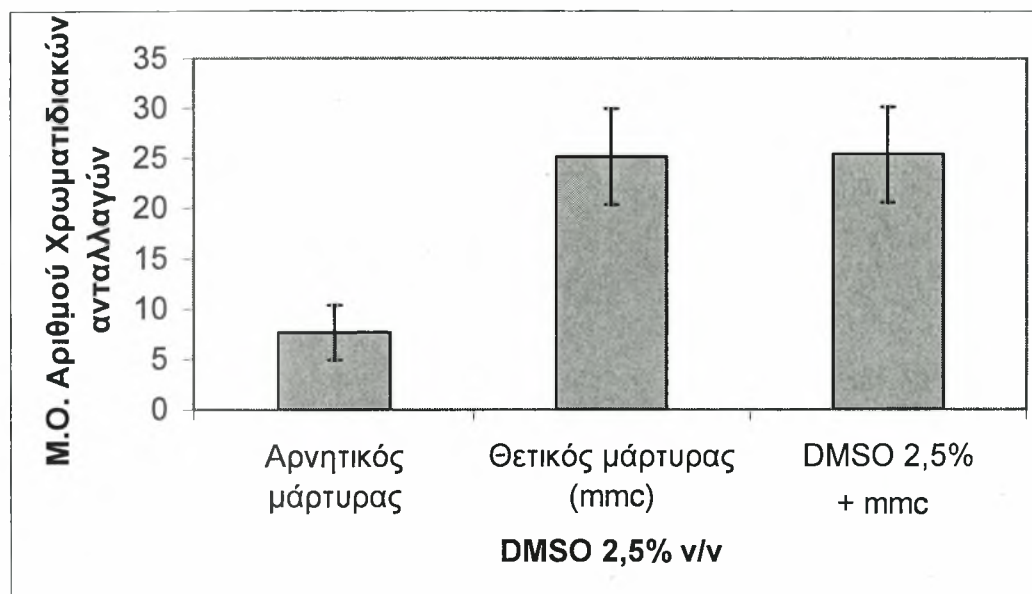
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.3. Επίδραση του DMSO στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).

Πίνακας 3.4. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	7,47±1,89	1,56±0,64		
Θετικός μάρτυρας (mms) ²	17,18±2,40	1,48±0,52		
75μg/ml υδατ. εκχ. Μανδ. +mms	17,35±2,30	1,46±0,58	-	1,79
150μg/ml υδατ. εκχ. Μανδ. +mms	17,09±2,71	1,51±0,49	0,89	-
300μg/ml υδατ. εκχ. Μανδ. +mms	21,50±2,77	1,47±0,59	-	44,51*
300μg/ml υδατ. εκχ. Μανδ.	8,19±1,72	1,58±0,67	-	9,63

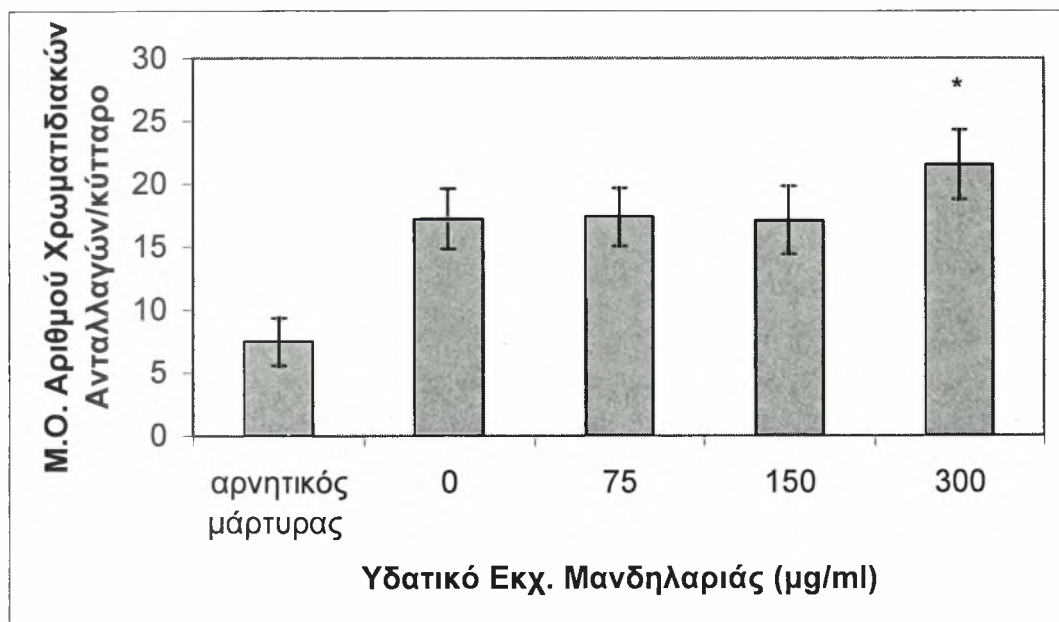
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

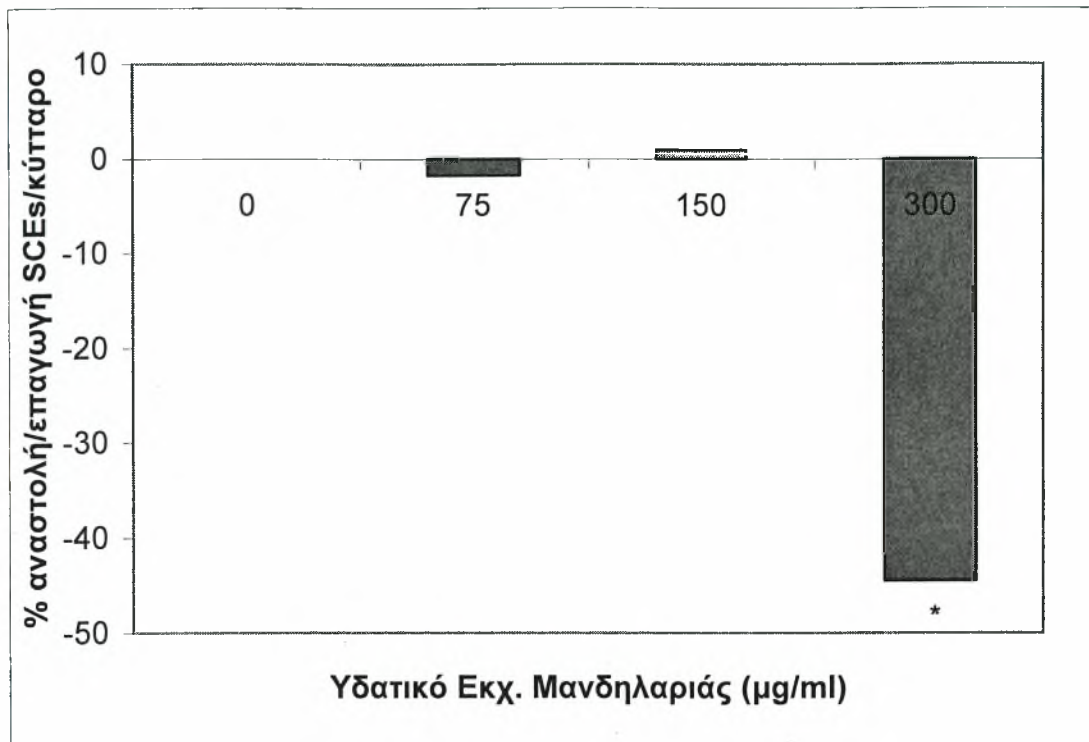
³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.4. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.5. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).

Πίνακας 3.5. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	7,47±1,89	1,81±0,64		
Θετικός μάρτυρας (mms) ²	17,18±2,40	1,69±0,56		
75μg/ml μεθανολ. εκχ. Μανδ. +mms	16,92±2,63	1,62±0,69	2,64	-
150μg/ml μεθανολ. εκχ. Μανδ.+mms	19,88±3,26	1,68±0,57	-	27,82*
300μg/ml μεθανολ. εκχ. Μανδ.+mms	22,47±3,77	1,55±0,63*	-	54,55*
300μg/ml μεθανολ. εκχ. Μανδ.	7,76±1,52	1,72±0,58*	-	3,9

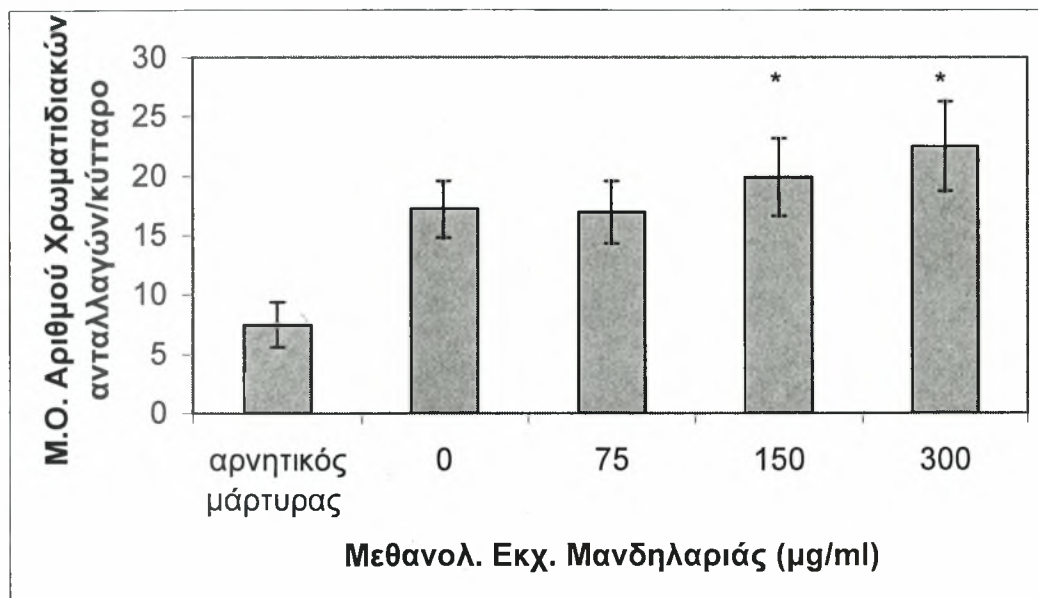
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

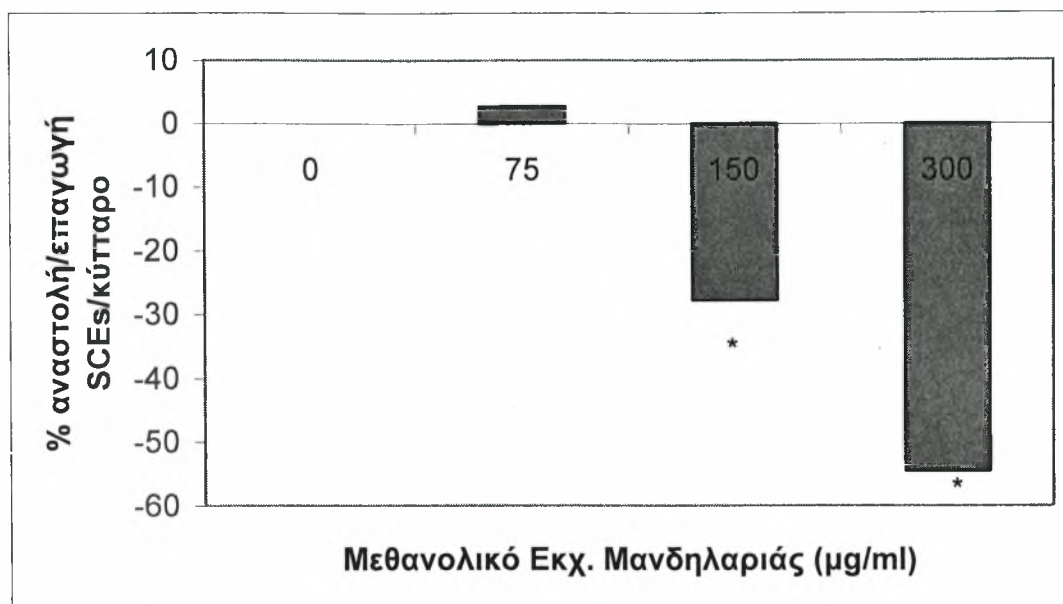
³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.6. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.7. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).

Πίνακας 3.6. Επίδραση του γαλλικού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O. SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	9,15±1,89	1,9±0,78		
Θετικός μάρτυρας (mmc) ²	23,47±2,63	1,77±0,58		
5μM γαλλικό οξύ +mmc	27,94±3,11	1,7±0,48*	-	31,21*
50μM γαλλικό οξύ +mmc	33,11±3,47	1,65±0,64*	-	67,31*
100μM γαλλικό οξύ +mmc	38,26±4,38	1,45±0,52*	-	103,29*
100μM γαλλικό οξύ	9,01±2,01	1,95±0,77	1,5	-

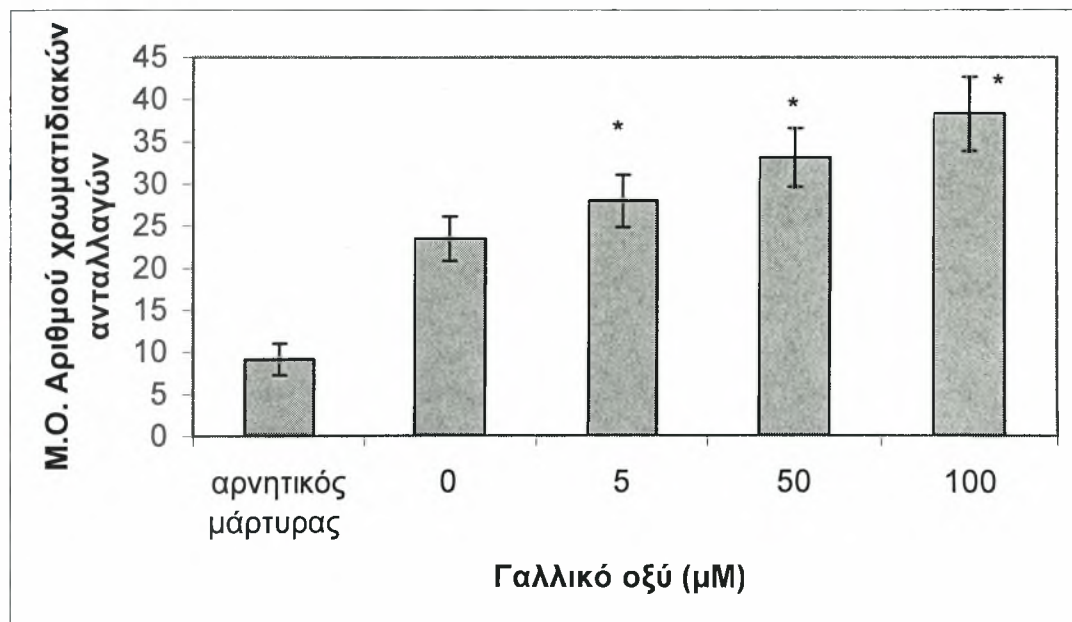
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

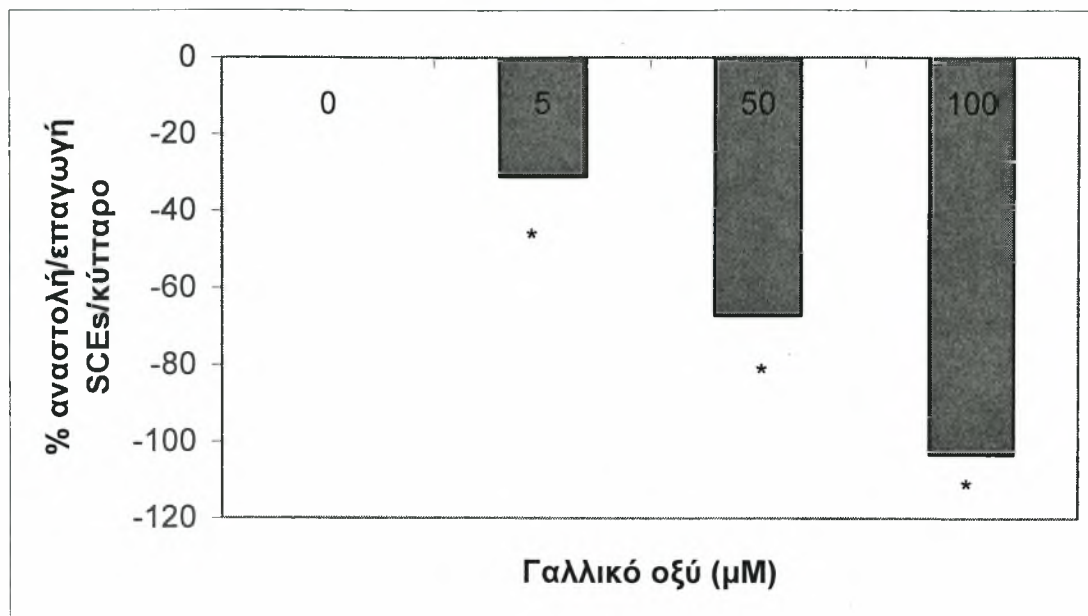
³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.8. Επίδραση του γαλλικού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.9. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του γαλλικού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).

Πίνακας 3.7. Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	9,15±1,89	1,9±0,78		
Θετικός μάρτυρας (mms) ²	23,47±2,63	1,77±0,58		
5μM πρωτοκατεχοϊκό οξύ+mms	23,14±2,46	1,79±0,71	2,27	-
50μM πρωτοκατεχοϊκό οξύ+mms	22,53±2,41	1,71±0,57*	6,58	-
100μM πρωτοκατεχοϊκό οξύ+mms	22,45±2,47	1,68±0,68*	7,13	-
100μM πρωτοκατεχοϊκό οξύ	8,85±1,54	1,95±0,73	3,26	-

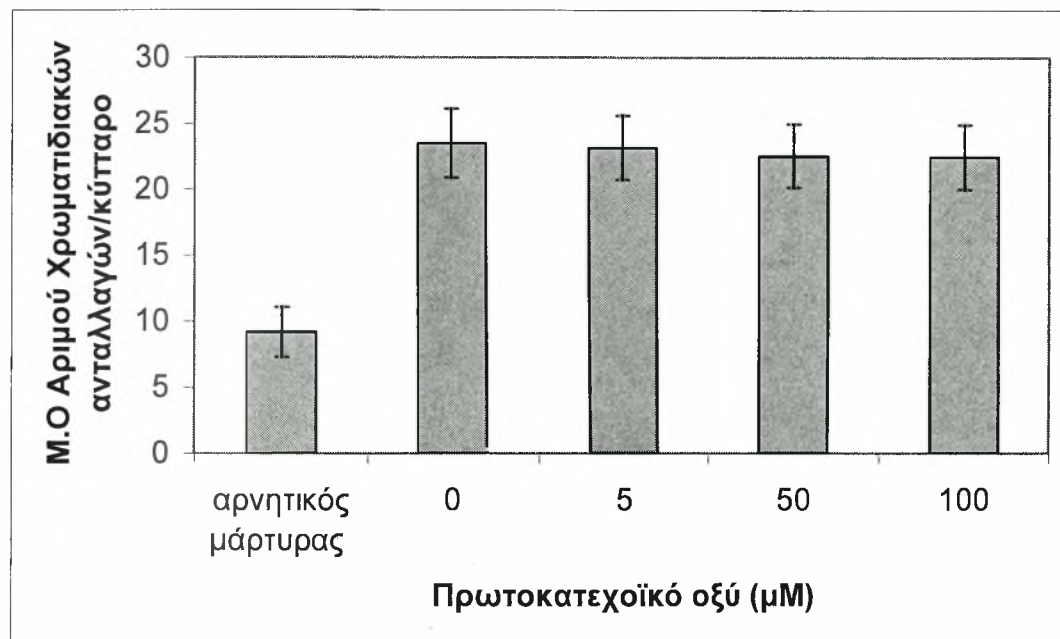
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

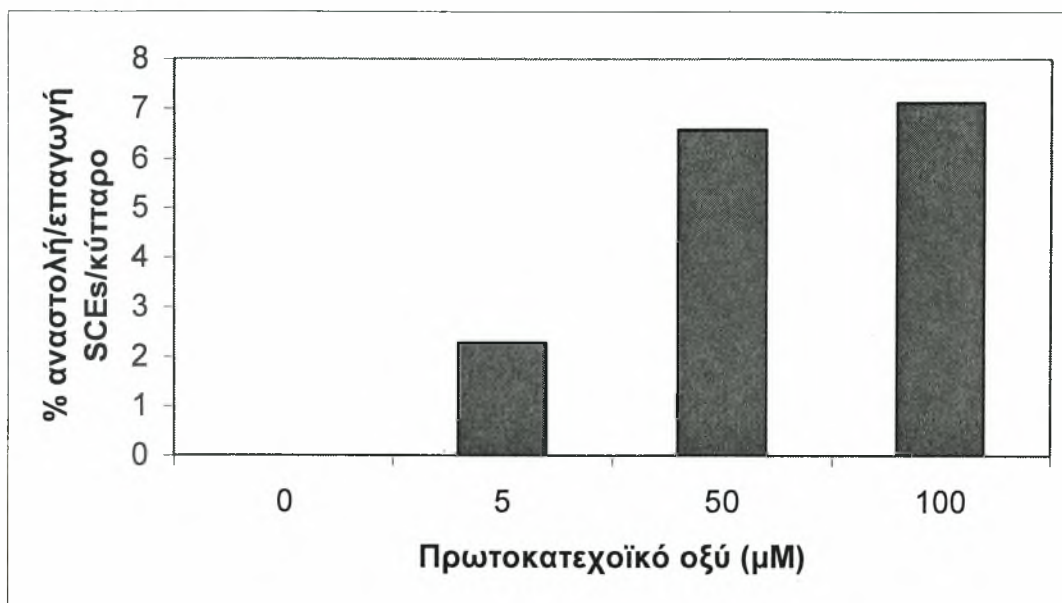
³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.10. Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.11. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).

Πίνακας 3.8. Επίδραση της κερκετίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	9,06±1,90	1,99±0,75		
Θετικός μάρτυρας (mmc) ²	22,58±3,72	1,8±0,62		
5μM κερκετίνη +mmc	20,35±2,91	1,55±0,56*	16,5*	-
50μM κερκετίνη +mmc	13,12±3,58	1,6±0,57*	69,99*	-
100μM κερκετίνη +mmc	12,01±2,91	1,14±0,38*	78,16*	-
100μM κερκετίνη	12,01±2,98	1,35±0,48*	-	32,49*

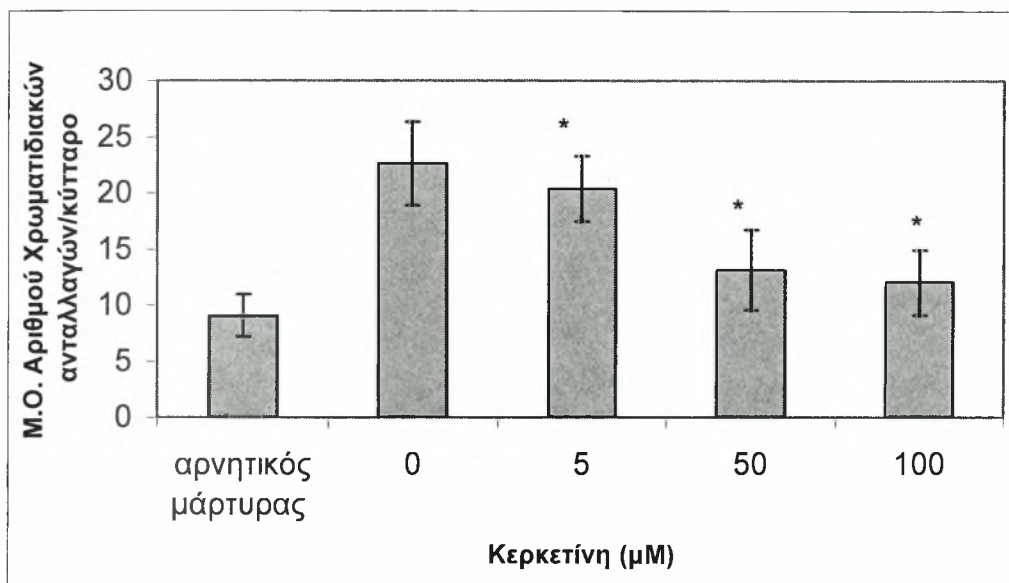
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

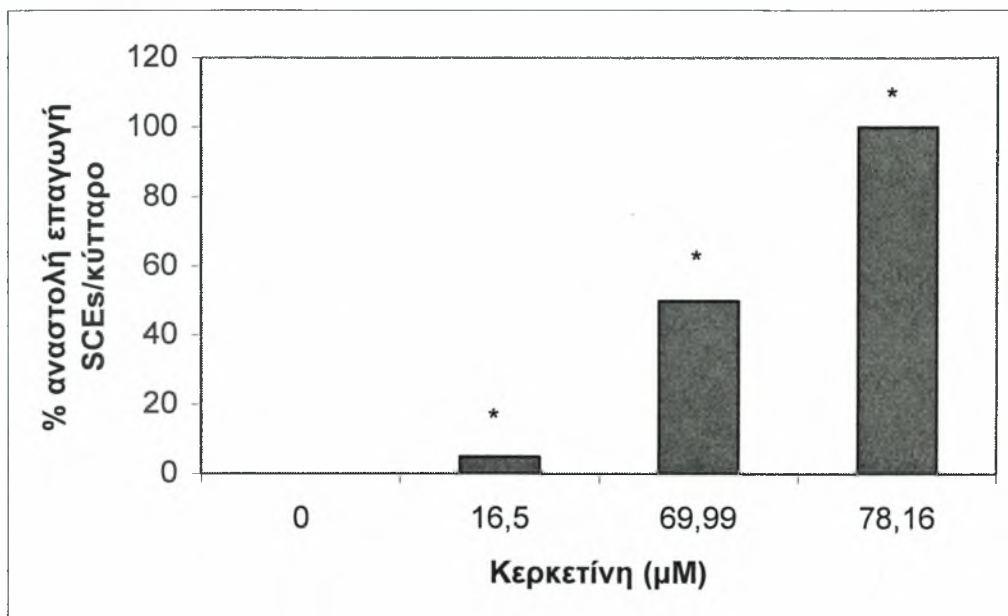
³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.12. Επίδραση της κερκετίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.13. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της κερκετίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).

Πίνακας 3.9. Επίδραση της ρουτίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών και στο δείκτη PRI των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	M.O SCEs/κύτταρο ¹	PRI	% αναστολή ³	% επαγωγή ³
Αρνητικός μάρτυρας	9,06±1,90	1,99±0,75		
Θετικός μάρτυρας (mmc) ²	22,58±3,72	1,8±0,62		
5μM ρουτίνη +mmc	22,93±3,77	1,78±0,49	-	2,56
50μM ρουτίνη +mmc	27,33±3,67	1,63±0,76*	-	35,1*
100μM ρουτίνη +mmc	27,16±4,23	1,51±0,61*	-	33,86*
100μM ρουτίνη	10,00±3,06	1,53±0,7*	-	10,36

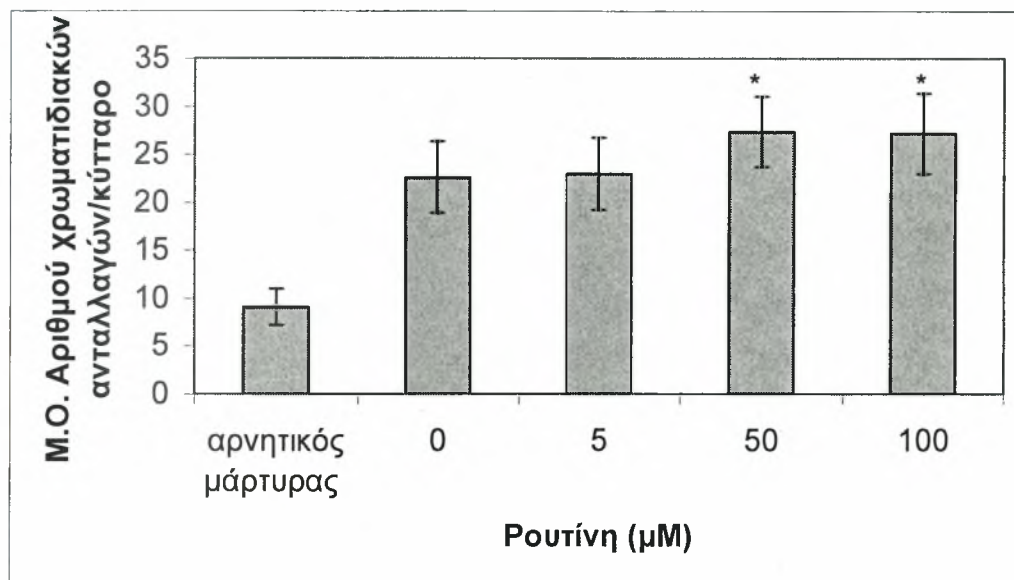
¹ Οι τιμές είναι η μέση τιμή (M.O.) ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των χρωματιδιακών ανταλλαγών ανά κύτταρο. Η μέση τιμή προκύπτει από τις SCEs που μετρήθηκαν σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων.

² Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml.

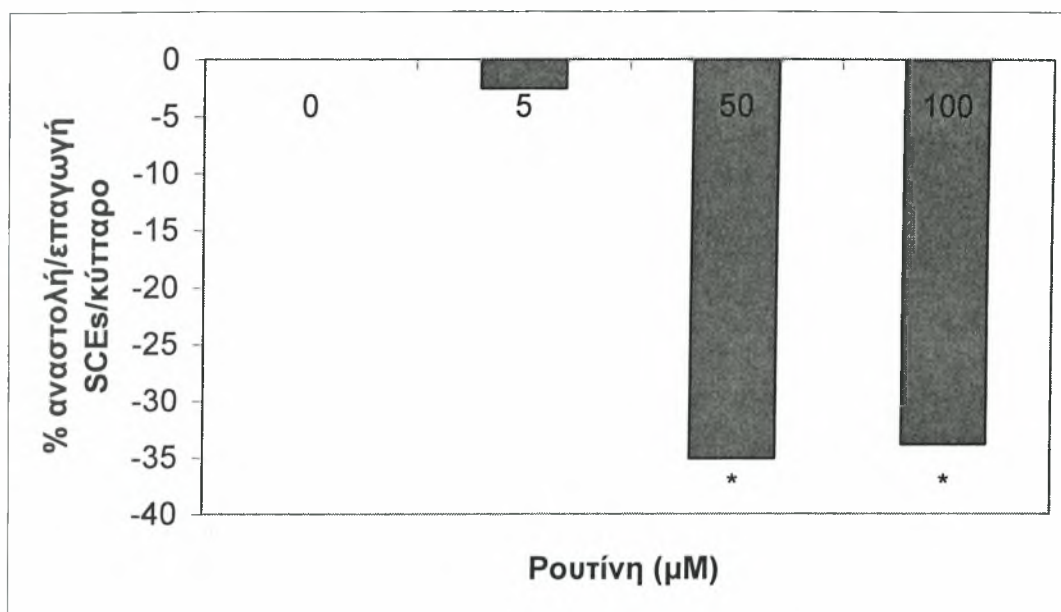
³ Η % αναστολή/επαγωγή SCEs υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

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

* Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.14. Επίδραση της ρουτίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Η συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 20ng/ml (εκτός από την καλλιέργεια του αρνητικού μάρτυρα). Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές των SCEs είναι ο μέσος όρος από μετρήσεις σε 30 μεταφασικούς πυρήνες λεμφοκυττάρων. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές (p<0,05).



Εικόνα 3.15. Απεικόνιση της % αναστολής/επαγωγής της ρουτίνης στον αριθμό των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) ανά ανθρώπινο λεμφοκύτταρο. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν επαγωγή του αριθμού των ανταλλαγών. Ο αστερίσκος * υποδηλώνει ότι πρόκειται για τιμές στατιστικά σημαντικές, ενώ όπου δεν υπάρχει οι τιμές είναι στατιστικά μη σημαντικές ($p < 0,05$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλή πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής από φρούτα και λαχανικά μπορεί να σχετίζεται με χαμηλές πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου στους ανθρώπους. Αυτό υποστηρίζεται και από μια πληθώρα *in vitro* και *in vivo* μελετών, οι οποίες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν τα διάφορα στάδια της διαδικασίας καρκινογένεσης (έναρξη, προαγωγή, πρόοδος). Με βάση τις *in vivo* και *in vitro* μελέτες, πολλοί μηχανισμοί χημειοπροστατευτικής δράσης μπορούν να εμπλέκονται. Οι μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών, γενικά περιλαμβάνουν τη δέσμευση και την αναστολή του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, την αναστολή της μεταβολικής βιοενεργοποίησης των καρκινογόνων, την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή της απόπτωσης και της διαφοροποίησης και την αναστολή της αγγειογένεσης (Ren W. et al., 2003, Hollman P.C. and Katan M.B., 1999). Εκτός από αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση όμως, οι πολυφαινόλες μπορούν να έχουν και προοξειδωτική δράση (Sakihama Y. et al., 2002).

Τα σταφύλια περιέχουν μια ποικιλία φαινολικών ουσιών σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, όπως κινναμικά οξέα, φλαβονόλες και συμπυκνωμένες ταννίνες και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανά αντιμεταλλαξιγόνα και χημειοπροστατευτικά. Επιπλέον, πολλά φαινολικά συστατικά των σταφυλιών που δεν επηρεάζονται από τη διαδικασία της ζύμωσης, είναι παρόντα και στο κρασί (Patinelli A. et al., 1996). Οι ευεργετικές για τον άνθρωπο δράσεις των σταφυλιών υποστηρίζονται από μελέτες που έχουν δείξει ότι χυμοί σταφυλιών έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες (Sanchez-Moreno C. et al., 1999). Πρόσφατα βρέθηκε επίσης ότι εκχυλίσματα σταφυλιών επάγουν την απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Roy A.M. et al., 2005).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια ανίχνευσης ενός νέου πιθανού μηχανισμού χημειοπροστατευτικής δράσης των πολυφαινολών και εκχυλισμάτων σταφυλιών. Η χημειοπροστατευτική αυτή δράση των πολυφαινολών μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τη μεταλλαξιγένεση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο και στα τρία στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδρασή τους στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C μεταλλάξεις σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν οι χρωματιδιακές ανταλλαγές (SCEs), ένας ευαίσθητος δείκτης μεταλλαξιγένεσης. Οι πολυφαινόλες που μελετήθηκαν ήταν το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, η κερκετίνη, και η ρουτίνη και τα εκχυλίσματα σταφυλιών ήταν υδατικό και μεθανολικό από την ελληνική ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης.

Το γαλλικό οξύ προκαλούσε αύξηση στον αριθμό των SCEs και στις τρεις συγκεντρώσεις του (5, 50 και 100 μ M), ενώ μόνο του (απουσία μιτομυκίνης C) σε συγκέντρωση 300 μ M δεν είχε καμιά επίδραση στον αριθμό τους στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Αντιθέτως, σε μια παρόμοια μελέτη, το γαλλικό οξύ μπορούσε να αναστείλει το σχηματισμό SCEs που προκαλούσε η μιτομυκίνη C σε CHO κύτταρα (από ωοθήκες κινεζικού χάμστερ) (Sasaki Y.F. et al., 1989). Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα είναι πολύ πιθανό να οφείλονται τόσο στον διαφορετικό κυτταρικό τύπο (κύτταρα ωοθηκών και όχι λεμφοκύτταρα), όσο και στο γεγονός ότι προέρχονται από χάμστερ και όχι από άνθρωπο. Βέβαια, προοξειδωτική δράση του γαλλικού οξέος έχει βρεθεί επίσης και σε άλλη μελέτη, όπου ενίσχυε το σπάσιμο κλώνων πλασμιδιακού DNA από τη μιτομυκίνη C (Stagos D. et al., 2005). Άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι το γαλλικό οξύ εμπλέκεται στην πρόκληση οξειδωτικών βλαβών στο DNA σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων (Kobayashi H. et al., 2004)

αν και σε μελέτες ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (απομάκρυνσης μιας σταθερής ελεύθερης, π.χ. DPPH) έχει βρεθεί ότι το γαλλικό έχει ισχυρή ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Sanchez-Moreno C. et al., 1999, Kumagai J. et al., 2003). Επίσης, σε δοκιμή του Ames με προκαρνωτικά στελέχη *Salmonella typhimurium* TA 97, 98 και 100, το γαλλικό έχει βρεθεί ότι έχει αντιμεταλλαξιγόνο δράση υπό την επίδραση διαφόρων μεταλλαξιγόνων ουσιών όπως το 2-ακετυλαμινοφλουορένιο, το οποίο όμως δεν δρα μέσω ελευθέρων ριζών (Hour T.-C. et al., 1999). Αντιθέτως, σε δοκιμή Ames με επαγόμενη από μπλεομυκίνη (ενός παράγοντα που δρα μέσω ελευθέρων ριζών) μεταλλαξιγένεση σε *Salmonella typhimurium* TA102, το γαλλικό οξύ δεν είχε καμία σημαντική επίδραση (Stagos D. et al., 2004).

Ο πιθανός μηχανισμός προοξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος στα λεμφοκύτταρα περιλαμβάνει τις αντιδράσεις του με ιόντα μετάλλων όπως Fe^{3+} και Cu^{2+} , τα οποία μπορεί και ανάγει (1) μετατρέπόμενο σε ημικιόνη (SQ).



Τα ιόντα αυτά ακολούθως αντιδρούν με το παραγόμενο από τη μιτομυκίνη $C H_2O_2$, παράγοντας $OH\cdot$ (2) που αντιδρά άμεσα με το DNA, προκαλώντας μεταλλάξεις. Έτσι, το γαλλικό μπορεί να ευνοήσει την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton (2), καθώς την τροφοδοτεί με τα ανηγμένα ιόντα μετάλλων του κυττάρου, ενώ επίσης η παραγόμενη ημικιόνη αντιδρά με O_2 , δίνοντας συνέχεια στην αντίδραση (2) μέσω της (4).



Μια άλλη πιθανή εξήγηση για την αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) που προκαλεί το γαλλικό οξύ στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, πιθανώς να περιλαμβάνει την τροποποίηση της δραστηριότητας ενζύμων που εμπλέκονται στις διαδικασίες επανένωσης των κλώνων του DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S (Sasaki Y.F. et al., 1989).

Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, παρατηρήθηκε ότι δεν επηρεάζει τον αριθμό των SCEs, σε καμία από τις τρεις συγκεντρώσεις (5, 50 και 100 μM). Επιπλέον δεν έχει καμία επίδραση στις SCEs μόνο του (απουσία μιτομυκίνης). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα από δοκιμή Ames στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella* TA102, όπου το πρωτοκατεχοϊκό οξύ επίσης δεν είχε καμία επίδραση (Stagos D. et al., 2004). Αντίθετα, ενίσχυε την επίδραση της μιτομυκίνης (σπάσιμο κλώνων) στο DNA πλασμιδίου (Stagos D. et al., 2005). Το πρωτοκατεχοϊκό από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με άλλη αναφορά, μπορεί και μειώνει τις επαγόμενες από μιτομυκίνη C χρωμοσωμικές ατυπίες σε κύτταρα CHO και προστατεύει το DNA από θραύση (Nakamura T. et al., 1997).

Συγκριτικά με το γαλλικό οξύ (τριϋδροξυβενζοϊκό ή διοξυσαλικυλικό οξύ), το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (3,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ) είναι ένα πολύ λιγότερο δραστικό μόριο, καθώς έχει μια λιγότερη υδροξυλομάδα (5-OH). Πιθανότατα λοιπόν η συμμετοχή του στις αντιδράσεις αναγωγής μετάλλων που ευνοούν τη Fenton να είναι αμελητέα σε σχέση με αυτή του γαλλικού. Ούτε όμως η αντιοξειδωτική του ικανότητα είναι επαρκής ώστε να εμποδίσει το σχηματισμό SCEs. Έτσι, το φαινολικό αυτό οξύ δεν έχει καμία επίδραση στις SCEs που επάγει ο οξειδωτικός παράγοντας μιτομυκίνη C και δεν παρουσιάζει ούτε προοξειδωτική δράση, αλλά ούτε και αντιοξειδωτική δράση.

Η κερκετίνη μπορεί και αναστέλλει το σχηματισμό SCEs από τη μιτομυκίνη και στις τρεις συγκεντρώσεις (5, 50 και 100 μM), ενώ απουσία μιτομυκίνης, αυξάνει τις SCEs (κατά 32,5%) στα λεμφοκύτταρα. Η προστατευτική in vitro δράση της

κερκετίνης έναντι των οξειδωτικών βλαβών του DNA σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα έχει παρατηρηθεί και σε προγενέστερες μελέτες. Έχει δειχθεί με τη δοκιμασία comet, ενός ευαίσθητου δείκτη βλαβών του DNA, ότι επώαση με κερκετίνη μειώνει τις βλάβες του DNA σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 (Noroozi M. et al., 1998, Lloriz N. et al., 2004) και στο καρκινογόνο των τροφών βενζο(α)πυρένιο (Wilms L.C. et al., 2005). Επιπλέον, η κερκετίνη προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες στο DNA που επάγονται από H_2O_2 σε μονοκύτταρα κύτταρα αίματος από ομφάλιο λώρο νεογνών (Zhao J. et al., 2004), αλλά και από τη δράση της μιτομυκίνης C σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, με βάση τη δοκιμασία comet (Undeger U. et al., 2004). Και με τη δοκιμασία του Ames όμως, στην επαγόμενη από t-βουτυλ-υδροπεροξειδίου και υδροπεροξειδίου του κουμένιου ή από H_2O_2 μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102, η κερκετίνη είχε προστατευτική δράση. Απουσία όμως του οξειδωτικού παράγοντα, και στις δυο παραπάνω μελέτες, η κερκετίνη μόνη της είχε μεταλλαξιγόνο δράση (Edenharder R. and Grunhage D., 2003, Grey C.E. and Adlercreutz P., 2003). Επίσης σε μελέτες με βάση τη δοκιμασία comet και αυτή των μικροπυρήνων, σε κύτταρα ποντικού, η κερκετίνη έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζει μεταλλαξιγόνο δράση, προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες στο DNA και επίσης ότι επάγει SCEs σε κύτταρα CHO (Da Silva J. et al., 2002).

Η προστασία της κερκετίνης από τις SCEs που προκαλεί η μιτομυκίνη C στην παρούσα μελέτη, πιθανότατα οφείλεται στις αντιοξειδωτικές, κυρίως όμως στις χηλικές ιδιότητες του μορίου της. Η κερκετίνη έχει πολλές πιθανές θέσεις που μπορούν να δεσμεύσουν μεταλλα όπως Fe^{3+} και Cu^{2+} , συμπεριλαμβανομένης και της C-4 καρβονυλομάδας και των C-3 και C-5 υδροξυλομάδων (Cook N.C. and Samman S., 1996). Επιπλέον, η κατεχολική 3', 4'-διυδροξυ-δομή στον B δακτύλιο της κερκετίνης θεωρείται σημαντική για την αντιοξειδωτική της ικανότητα, κυρίως όμως για το σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με ιόντα μετάλλων (Sestili P. et al., 2002). Έτσι, εμποδίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Fenton που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, ενώ μπορεί παράλληλα να δεσμεύει τις ROS που σχηματίζονται από τη μιτομυκίνη C. Ο μηχανισμός αυτός της δράσης της κερκετίνης μέσω σχηματισμού χηλικών συμπλόκων έχει προταθεί και σε άλλες αναφορές (Lloriz N. et al., 2004, Sestili P. et al., 2002). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η κερκετίνη μπορεί και επιδιορθώνει ταχύτατα τις ρίζες ανιόντων δεοξυθυμιδίνης ($dT^{\bullet -}$) που προκαλεί η ρίζα OH^{\bullet} στο DNA, κάτι που μπορεί να αποτελεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης της κερκετίνης (Zhao C. et al., 2003). Αντίθετα, η μεταλλαξιγένεση που προκαλεί η κερκετίνη απουσία μιτομυκίνης C, ενδεχομένως να οφείλεται στην αυτοοξείδωσή της. Απουσία μιτομυκίνης, δεν παράγονται μεγάλες ποσότητες ROS. Η αυτοοξείδωση της κερκετίνης όμως, μπορεί να καταλήξει στο σχηματισμό μεταβολιτών ημικιόννης και κινόννης αυτής. Οι μεταβολίτες αυτοί μπορούν να δράσουν ως ηλεκτρονιόφιλα αντιδρώντας με το DNA, ενώ μπορούν επίσης να παράγουν επιπλέον ROS όπως $O_2^{\bullet -}$ και H_2O_2 , μέσω κυκλικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την κυτταρική αναπνοή (Awad H.M. et al., 2001).

Είναι γνωστό από άλλες αναφορές ότι η κερκετίνη δρα ως αντιμεταλλαξιγόνο παρουσία οξειδωτικών ουσιών, ενώ παρουσιάζει μεταλλαξιγόνο δράση από μόνη της (Grey C.E. and Adlercreutz P., 2003). Έτσι και στην παρούσα μελέτη, ενώ η κερκετίνη προστατεύει το DNA από τη δράση της μιτομυκίνης C, απουσία του οξειδωτικού αυτού παράγοντα παρουσιάζει μεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Μια πιθανή εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί βασίζεται στο ότι η μιτομυκίνη προκαλεί οξειδωτικές βλάβες στο DNA μέσω παραγωγής ROS και κυρίως H_2O_2 , αλλά και $O_2^{\bullet -}$

και $\text{OH}\cdot$ οι οποίες ενισχύουν την αντίδραση Fenton. Αυτές οι ρίζες μπορούν να προκαλέσουν αναγωγή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} λαμβάνοντας μέρος στις αντιδράσεις Haber-Weiss. Πιθανώς λοιπόν έμμεσα η μιτομυκίνη να αυξάνει τη συγκέντρωση Fe^{2+} , το οποίο όμως δεσμεύει η κερκετίνη λόγω των χηλικών ιδιοτήτων της, εμποδίζοντας έτσι αποτελεσματικά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Fenton, άρα και των οξειδωτικών βλαβών του DNA. Ταυτόχρονα όμως, αυτή η σύνδεση της κερκετίνης με ιόντα μετάλλων εμποδίζει την αυτοοξειδωσή της, η οποία πραγματοποιείται απουσία του οξειδωτικού παράγοντα μιτομυκίνη C. Μάλιστα, όπως έχει βρεθεί, η αυτοοξειδωσή της πραγματοποιείται στο κατεχολικό 3',4'-διϋδροξυ τμήμα της, το οποίο όμως είναι εν μέρει υπεύθυνο και για τις χηλικές της ιδιότητες. Η αυτοοξειδωσή της οδηγεί στο σχηματισμό ηλεκτρονιόφιλων μεταβολιτών κινόνης και ημικινόνης, που αποτελούν τη βάση της προοξειδωτικής δράσης της (Awad H.M. et al., 2001). Εξάλλου υπάρχουν ενδείξεις ότι υπεύθυνοι για τη μεταλλαξιγένεση της κερκετίνης είναι οι μεταβολίτες της, οι οποίοι είναι και πολύ δραστηριοί (Grey C.E. and Adlercreutz P., 2003).

Η ρουτίνη βρέθηκε ότι ενισχύει τη δράση της μιτομυκίνης C και αυξάνει τον αριθμό των SCEs στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (50 και 100 μM). Σύμφωνα με άλλες μελέτες, η ρουτίνη προστατεύει από οξειδωτική καταστροφή του DNA, όπως έδειξε η δοκιμασία comet στην επίδραση της μιτομυκίνης C σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Undeger U. et al., 2004), καθώς και η δοκιμή Ames στην επαγόμενη από H_2O_2 ή άλλους καρκινογόνους παράγοντες μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η προστατευτική της δράση όμως, ήταν πολύ ασθενέστερη σε σχέση με αυτήν της κερκετίνης (Edenharder R. and Grunhage D., 2003, Grey C.E. and Adlercreutz P., 2003). Σε άλλες αναφορές όμως, έχει παρατηρηθεί ότι η ρουτίνη δεν είχε καμία αντιμεταλλαξιγόνο δράση, τόσο σε κύτταρα ποντικού (δοκιμασία comet) (Da Silva J. et al., 2002), όσο και σε ανθρώπινα μονοκύτταρα κύτταρα (Zhao J. et al., 2004).

Μια πιθανή εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί για τη δράση της ρουτίνης στην παρούσα μελέτη, βασίζεται στο γεγονός ότι η ρουτίνη, μια γλυκοσίδη της κερκετίνης, είναι ένα πολύ λιγότερο δραστικό μόριο σε σχέση με την κερκετίνη. Η ρουτίνη, λόγω του σακχάρου στη θέση C-3 (όπου η κερκετίνη έχει υδροξυλομάδα) έχει μειωμένες χηλικές, αλλά και αντιοξειδωτικές ικανότητες. Επιπλέον, το μόριο σακχάρου είναι μια ογκώδης ομάδα που παρεμποδίζει τις αντιδράσεις δέσμευσης των ιόντων μετάλλων ή των ROS, με τις ομάδες στο μόριο της ρουτίνης. Έχει προταθεί επίσης ότι το σάκχαρο καθιστά τη ρουτίνη αρκετά υδρόφιλο μόριο, οπότε και αυτή δε μπορεί να διεισδύσει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου (Grey C.E. and Adlercreutz P., 2003). Φαίνεται λοιπόν ότι στην παρούσα μελέτη, η ρουτίνη όχι μόνο έχει ανεπαρκείς χηλικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αλλά και ότι η αυτοοξειδωσή της, ενισχύει τη δράση της μιτομυκίνης C στο DNA των λεμφοκυττάρων.

Το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς προκαλούσε αύξηση των χρωματιδιακών ανταλλαγών στη μεγάλη συγκέντρωση (300 $\mu\text{g/ml}$), ενώ στις μικρότερες (75 και 150 $\mu\text{g/ml}$) δεν είχε καμιά επίδραση στον αριθμό των SCEs. Το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς προκαλούσε αύξηση των SCEs στα 150 και 300 $\mu\text{g/ml}$ μόνο. Τόσο το υδατικό, όσο και το μεθανολικό εκχύλισμα, μόνα τους (απουσία μιτομυκίνης C) δεν είχαν καμιά επίδραση στον αριθμό SCEs.

Η σύσταση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινόλες είναι γνωστή και φαίνεται στους πίνακες 1.3. (υδατικό) και 1.4. (μεθανολικό). Τόσο στο μεθανολικό, όσο και στο υδατικό εκχύλισμα, η κυρίαρχη σε συγκέντρωση πολυφαινόλη είναι το γαλλικό οξύ. Το γαλλικό οξύ, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζει προοξειδωτική δράση.

Επομένως η προοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών πιθανώς οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Επιπλέον και η επικατεχίνη, μια πολυφαινόλη με αρκετά μικρότερη, αλλά επίσης σημαντική συγκέντρωση στα εκχυλίσματα, αυξάνει τις SCEs παρουσία μιτομυκίνης C (αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας). Από την άλλη πλευρά, οι διαφορές στις δράσεις του μεθανολικού (αύξηση SCEs στα 150 και 300μg/ml) και του υδατικού (αύξηση μόνα στα 300μg/ml), πιθανότατα οφείλονται στις πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών του υδατικού σε σχέση με αυτές του μεθανολικού.

Όσον αφορά την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στο δείκτη ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI), το γαλλικό οξύ προκαλούσε μείωση και στις τρεις συγκεντρώσεις του παρουσία μιτομυκίνης. Και η ρουτίνη επίσης μειώνει το PRI, ενώ αυξάνει τον αριθμό των SCEs στα 50 και στα 100μM. Αυτό παρατηρείται συχνά στην περίπτωση ουσιών που αυξάνουν τις SCEs. Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ δείχνει μια μικρή κυτταροστατική δράση στη μεσαία (50μM) και στη μεγάλη (100μM) εξεταζόμενη συγκέντρωσή του παρουσία μιτομυκίνης. Στην περίπτωση της κερκετίνης, αν και παρατηρείται αναστολή των SCEs παρουσία μιτομυκίνης, ταυτοχρόνως υπάρχει και μια μείωση στο PRI και στις τρεις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις της. Στα 5 και στα 50μM η μείωση αυτή οφείλεται στο DMSO, το διαλύτη της κερκετίνης. Στα 100μM όμως, ένα σημαντικό ποσοστό της μείωσης του PRI οφείλεται στην ίδια την κερκετίνη. Αυτό δεν είναι αναμενόμενο για μια ουσία που αναστέλλει το σχηματισμό SCEs, η κερκετίνη όμως είναι γνωστό ότι τροποποιεί τη δραστηριότητα ενζύμων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. αναστέλλει την τοποϊσομεράση I). Το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς προκαλούσε μείωση στο PRI στα 300μg/ml παρουσία και απουσία μιτομυκίνης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη σύστασή του, καθώς σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκεται το γαλλικό οξύ που έχει κυτταροστατική δράση. Το υδατικό εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση στο δείκτη PRI. Αν και σε αυτό το εκχύλισμα επίσης υπερτερούν οι ουσίες με κυτταροστατική δράση, ωστόσο η συνολική τους συγκέντρωση είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτήν του μεθανολικού εκχυλίσματος.

Από όλα τα παραπάνω, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι οι δράσεις των πολυφαινολών (αντιοξειδωτικές-προοξειδωτικές) είναι ένα πολύπλοκο ζήτημα στο οποίο δεν έχει δοθεί μια ξεκάθαρη απάντηση μέχρι σήμερα. Υπάρχει μια πληθώρα αναφορών που υποστηρίζουν ότι οι πολυφαινόλες έχουν κυτταροτοξική δράση καθώς είναι προοξειδωτικά, ενώ άλλες αναφορές τονίζουν τις αντιοξειδωτικές και προστατευτικές τους ιδιότητες, τις οποίες και αποδεικνύουν πειραματικά. Οι διαφορές αυτές όμως, ίσως να οφείλονται εν μέρει και στις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες. Προς το παρόν, δεν είναι γνωστό το ενδοκυτταρικό σημείο στο οποίο οι πολυφαινόλες κατευθύνονται και στο οποίο δρουν μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, αν και πολλές μελέτες προτείνουν ότι αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες και κάποιες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες (Lloriz N. et al., 2004).

Τα ευκαρυωτικά ανθρώπινα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη θεωρούνται αρκετά αντιπροσωπευτικά (σε σχέση με έρευνες σε προκαρυωτικά ή κύτταρα τρωκτικών) ώστε να εξετάσει κανείς τη δράση των πολυφαινολών και ακολούθως να προσπαθήσει να γενικεύσει τα αποτελέσματά του στα πολύπλοκα συστήματα του ανθρώπου. Παρόλα αυτά, είναι πάντοτε δύσκολο κανείς να προσομοιώσει *in vitro* τις συνθήκες που επικρατούν *in vivo* στα κύτταρα. Τα κύτταρα σε *in vitro* καλλιέργειες τείνουν να έχουν υψηλά επίπεδα οξυγόνωσης, αντίθετα με τις *in vivo* συνθήκες. Επιπλέον, το O₂ έχει πολύ μικρότερη μερική πίεση στους ιστούς απ' ό,τι στην ατμόσφαιρα. Τέλος, στους ζωντανούς οργανισμούς υπάρχει αυστηρή διαμερισματοποίηση των συστατικών του συστήματος παραγωγής

ROS (ιόντων μετάλλων, O₂), ενώ υπάρχουν ισχυροί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που δεσμεύουν τις ROS πριν αυτές αλληλεπιδράσουν με το DNA (Krishnaja A.P. and Sharma N.K., 2003).

Τα αποτελέσματα για τις εξεταζόμενες ουσίες της μελέτης αυτής, υποδεικνύουν τη χημειοπροστατευτική τους δράση, η οποία επιτυγχάνεται όμως με διαφορετικούς μηχανισμούς. Η κερκετίνη φαίνεται ότι άμεσα, με βάση τις ισχυρές χηλικές και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, μπορεί και προστατεύει το DNA από μεταλλάξεις. Η προοξειδωτική δράση (αντί για αντιοξειδωτική) της ρουτίνης, του γαλλικού οξέος και των εκχυλισμάτων σταφυλιών Μανδηλαριάς ίσως να αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό για τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητές τους, καθώς οι ROS μπορούν να οδηγήσουν σε απόπτωση, προκαλώντας κατακερματισμό του DNA σε κύτταρα που έχουν υποστεί σημαντικές βλάβες. Ο μηχανισμός αυτός θεωρείται χημειοπροστατευτικός και σε άλλες αναφορές (Galati G. and O'Brien P.J., 2004). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες που ενισχύουν τη δράση της μιτομυκίνης C (γαλλικό οξύ, ρουτίνη και εκχυλίσματα Μανδηλαριάς) θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή στη χημειοθεραπεία του καρκίνου, ενδεχομένως και σε συνδυασμό με άλλες πολυφαινόλες που έχει βρεθεί ότι οδηγούν σε απόπτωση τα καρκινικά κύτταρα, ενώ αντίθετα προστατεύουν τα φυσιολογικά υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (Yamamoto T. et al., 2003). Κάτι τέτοιο θα καθιστούσε πιο αποτελεσματική τη δράση της μιτομυκίνης C έναντι των καρκινικών κυττάρων, ενώ παράλληλα θα μπορούσε να προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα, ελαττώνοντας έτσι τις παρενέργειες, που είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης χημειοθεραπείας.



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albanesi T., Polani S., Cozzi R. and Perticone P., DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro, *Mutation Research* 429 (1999) 239-248
- Araim O., Ballantyne J., Waterhouse A.L. and Sumpio B.E., Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols, *Journal of vascular surgery* 35 (2002) 1226-1232
- Arimura T., Kojima-Yuasa A., Kennedy D.O. and Matsui-Yuasa I., Reactive oxygen species-independent G1 arrest induced by evening primrose extract in Ehrlich ascites tumour cells, *Cancer Letters* 207 (2004) 19-25
- Awad H.M., Boersma M.G., Boeren S., Van Bladeren P., Vervoort J. and Rietjens I., Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 398-408
- Cao G., Sofic E. and Prior R.L., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine* 22 (1997) 749-760
- Cao Y., Cao R. and Brakenhielm E., Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (2002) 380-390
- Chow J.-M., Shen S.-C., Huan S., Lin H.-Y. and Chen Y.-C., Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase I gene expression in macrophages, *Biochemical Pharmacology* (2005) *In press*
- Cook N.C. and Samman S., Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *Nutritional Biochemistry* 7 (1996) 66-76
- Da Silva J., Herrmann S.M., Heuser V., Peres W., Possa Maroni N., Gonzalez-Gallego J. and Erdtmann B., Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test, *Food and Chemical Toxicology* 40 (2002) 941-947
- Davalos A., Bartolome B. and Gomez-Cordoves C., Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars, *Food Chemistry* (2004) *In press*
- Dreosti I.E., Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine, *Nutrition* 16 (2000) 692-694
- Edenharder R. and Grunhage D., Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutation Research* 540 (2003) 1-18
- Fremont L., Biological Effects of Resveratrol, *Life Sciences*, 66 (2000) 663-673

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

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

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, (1999), Oxford University Press

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

Hollman P.C. and Katan M.B., Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability, *Food and Chemical Toxicology* 37 (1999) 937-942

Hour T.-C., Liang Y.-C., Chu I.-S. and Lin J.-K., Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine, *Food and chemical Toxicology* 37 (1999) 569-579

Iijima K., Yoshizumi M. and Ouchi Y., Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function-molecular mechanism of the 'French paradox', *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (2002) 1033-1039

Ivanov V., Carr A.C. and Frei B., Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal ion-dependent and -independent oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4442-4449

Iyer V.N. and Szybalski W., A molecular mechanism of mitomycin action: Linking of complementary DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50 (1963) 355-362

Jakubowicz-Gil J., Paduch R., Piersiak T., Glowniak K., Gawron A. and Kandeferszerzen, The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells, *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 1343-1350

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

Krishnaja A.P. and Sharma N.K., Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes in vitro, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement* 1 (2003) 99-112

Kwon K.H., Murakami A., Tanaka T. and Ohigashi H., Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression, *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 395-406

Lambert J.D. and Yang C.S., Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols, *Mutation Research* 523-524 (2003) 201-208

Latt S.A., Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 (1974) 3162-3166

Llopiz N., Puiggros F., Cespedes E., Arola L., Ardevol A., Blade C. and Salvado J.M., Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1083-1087

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition* 79 (2004) 727-747

Mann L.B. and Folts J.D., Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease: a review, *Pathophysiology* 10 (2004) 105-112

Matsuoka A., Furuta A., Ozaki M., Fukuhara K. and Miyata N., Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line, *Mutation Research* 494 (2001) 107-113

Mylonas C. and Kouretas D., Lipid Peroxidation and Tissue Damage, *in vivo* 13 (1999) 295-310

Nakamura T., Nakazawa Y., Onizuka S., Satoh S., Chiba A., Sekihashi K., Miura A., Yasugahira N. and Sasaki Y.F., Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves: The clastogen- suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice, *Mutation Research* 388 (1997) 7-20

Nakamura Y., Torikai K., Ohto Y., Murakami A., Tanaka T. and Ohigashi H., A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase, *Carcinogenesis* 21 (2000) 1899-1907

Nepka C., Asprodini E. and Kouretas D., Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals, *European Journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 24 (1999) 183-189

Noroozi M., Angerson W. and Lean M., Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes, *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998) 1210-1218

Oak M.-H., El Bedoui J. and Schini-Kerth V., Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea, *Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (2005) 1-8

Patrineli A., Clifford M.N., Walker R. and Ioannides C., Mutagenicity of white grape juice in the Ames test, *Food and Chemical Toxicology* 34 (1996) 559-562

Pellegrina C., Padovani G., Mainente F., Zoccatelli G., Bissoli G., Mosconi S., Veneri G., Peruffo A., Andrighetto G., Rizzi C. and Chignola R., Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*, *Cancer Letters* (2005) *In press*

Penketh P.G., Hodnick W.F., Belcourt M.F., Shyam K., Sherman D.H. and Sartorelli A.C., Inhibition of DNA cross-linking by mitomycin C by peroxidase-mediated oxidation of mitomycin C hydroquinone, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 34445-34452

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. and Zhang L., Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews* 23 (2003) 519-534

Robbins R.J., Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, *J. Agric. Food. Chem.* 51 (2003) 2866-2887

Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. and Yamasaki H., Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology* 177 (2002) 67-80

Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International* 32 (1999) 407-412

Sasaki Y.F., Imanishi H., Ohta T. and Shirasu Y., Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research* 226 (1989) 103-110

Sasaki Y.F., Imanishi H., Ohta T., Watanabe M., Matsumoto K. and Shirasu Y., Suppressing effect of tannic acid on the frequencies of mutagen-induced sister chromatid exchanges in mammalian cells, *Mutation Research* 213 (1989) 195-203

Scalbert A. and Williamson G., Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *J. Nutr.* 130 (2000) 2073S-2085S

Sestili P., Diamantini G., Bedini A., Cerioni L., Tommasini I., Tarzia G. and Cantoni O., Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by *tert*-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism, *Biochem. J.* 364 (2002) 121-128

Soleas G., Diamandis E.P. and Goldberg D.M., Wine as a biological fluid: History, Production and Role in disease prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11 (1997) 287-313

Soleas G., Goldberg D.M., Grass L., Levesque M. and Diamandis E.P., Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines?, *Clinical Biochemistry* 34 (2001) 415-420

Sonoda E., Sasaki M.S., Morrison C., Yamaguchi-Iwai Y., Takata M. and Takeda S., Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells, *Molecular and Cellular Biology* 19 (1999) 5166-5169

Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S., Anagnostopoulos K. and Kouretas D., Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA, *International Journal of Molecular Medicine* 15 (2005) 1013-1022

Stagos D., Kouris S. and Kouretas D., Plant phenolics protect from bleomycin-induced oxidative stress and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102, *Anticancer Research* 24 (2004) 743-746

Stoclet J.-C., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M.-H., El Bedoui J., Chataigneau M. and Schini-Kerth V., Vascular protection by dietary polyphenols, *European Journal of Pharmacology* 500 (2004) 299-313

Takehisa S., Induction of sister chromatid exchanges by chemical agents. In: S. Wolff (ed). Sister chromatid exchange, John Wiley and Sons New York, (1982) p.p. 87-148

Tedesco I., Russo M., Russo P., Iacomino G., Russo G.L., Carraturo A., Faruolo C., Moio L. and Palumbo R., Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells, *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000) 114-119

Tennant R.W., Margolin B.H., Shelby M.D., Zeiger E., Haseman J.K., Spalding J., Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays, *Science* 236 (1987) 933-940

Tomasz M., Lipman R., Chowdary D., Pawlak J., Verdine G.L. and Nakanishi K., Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA, *Science* 235 (1987) 1204-1208

Tombola F., Campello S., De Luca L., Ruggiero P., Del Giudice G., Papini E. and Zoratti M., Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *FEBS Letters* 543 (2003) 184-189

Tomera J.F., Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption, *Trends in Food Science & Technology* 10 (1999) 129-138

Ueda K. and Komano T., Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl)mitomycin C, *Nucleic Acids Research* 12 (1984) 6673-6683

Undeger U., Aydin S., Basaran A. and Basaran N., The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DANN damage, *Toxicology Letters* 151 (2004) 143-149

Urquiaga I. and Leighton F., Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, *Biological Research* 33 (2000) 1-14

Van de Wiel A., Van Golde P.H.M. and Hart H.C., Blessings of the grape, *European Journal of Internal Medicine* 12 (2001) 484-489

Wallerath T., Li H., Godtel-Ambrust U., Schwartz P. and Forstermann U., A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase, *Nitric Oxide* 12 (2005) 97-104

Williams G.M. and Weisburger J.H. Application of a cellular test battery in the decision point approach to carcinogen identification, *Mutat. Res.*, 205 (1988) 79-90

Wilms L.C., Hollman P., Boots A.W. and Kleinjans J., Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes, *Mutation Research* 582 (2005) 155-162

Yamamoto T., Hsu S., Lewis J., Wataha J., Dickinson D., Singh B., Bollag W., Lockwood P., Ueta E., Osaki T. and Schuster G., Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor vs normal epithelial cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307 (2003) 230-236

Zhao C., Shi Y., Wang W., Jia Z., Yao S., Fan B. and Zheng R., Fast repair of deoxythymidine radical anions by two polyphenols: rutin and quercetin, *Biochemical Pharmacology* 65 (2003) 1967-1971

Zhao J., Liu X.-J., Ma J.-W. and Zheng R.-L., DNA damage in healthy term neonate, *Early Human Development* 77 (2004) 89-98