



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

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Φ. ΣΤΑΓΚΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΕΣ

ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

(*VITIS VINIFERA*)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Φ. ΣΤΑΓΚΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΕΣ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ
(*VITIS VINIFERA*)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΣΕΡΚΟΣ ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΜΙΩΤΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

*«Η ζωή δεν είναι παίξε-γέλασε
Πρέπει να τήνε πάρεις σοβαρά,
Που έτσι να πούμε, ακουμπισμένος σ' έναν τοίχο
με τα χέρια σου δεμένα
Ή μέσα στ' αργαστήρι
με λευκή μπλούζα και μεγάλα ματογυάλια
Θε να πεθάνεις, για να ζήσουνε οι άνθρωποι,
Οι άνθρωποι, που ποτέ δε θάχεις δει το πρόσωπό τους
Και θα πεθάνεις ξέροντας καλά
Πως τίποτα πιο ωραίο, πως τίποτα πιο αληθινό
απ' τη ζωή δεν είναι.»*

Απόσπασμα από το ποίημα του Ναζίμ Χικμέτ
«Για τη ζωή».

*Στους γονείς μου
Φώτη και Αμαλία*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2003-2006 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η μελέτη αυτή αποτελούσε μέρος του προγράμματος ‘Όίνος και Υγεία’ που χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και την ΚΕΟΣΟΕ (την πανελλήνια κλαδική συνεταιριστική ένωση παραγωγών αμπελουργικών προϊόντων) μέσω της Γ.Γ.Ε.Τ. (ΠΕΝΕΔ 2001). Οι ερευνητικοί φορείς που συμμετείχαν ήταν το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας), το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Τμήμα Φαρμακευτικής) και το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας). Αντικείμενο του προγράμματος ήταν:

- i. Η ποιοτική και ποσοτική καταγραφή των βιολογικά δραστικών συστατικών που περιέχονται σε ελληνικούς οίνους, καθώς και στις αντίστοιχες ποικιλίες σταφυλιού.
- ii. Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των δραστικών συστατικών.
- iii. Η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ταχεία ανίχνευση των βιολογικά δραστικών ουσιών του κρασιού και η μελέτη της επίδρασης της αμπελοκομικής τεχνικής και της οινοποίησης στα βιολογικά χαρακτηριστικά των κρασιών.

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή αυτής της διατριβής, έχω υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της.

Η εργασία αυτή έγινε κάτω από την επίβλεψη και την καθοριστική καθοδήγηση του αναπληρωτή καθηγητή κ. Δ. Κουρέτα, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος της διατριβής, την εποικοδομητική κριτική του, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, τη συνεχή ενθάρρυνση, το

αδιάλειπτο ενδιαφέρον του και τη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Εκφράζω ακόμα τις ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ζ. Μαμούρη και τον επίκουρο καθηγητή κ. Κ. Σταθόπουλο για τις υποδείξεις τους.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που την αποτελούσαν ο αναπληρωτής καθηγητής κ. Δ. Κουρέτας, ο αναπληρωτής καθηγητής κ. Ζ. Μαμούρης, ο επίκουρος καθηγητής κ. Κ. Σταθόπουλος, ο καθηγητής κ. Σ. Χαρουτουγιάν, ο καθηγητής κ. Α. Σκαλτσούνης, ο καθηγητής κ. Β. Βασιλείου και ο επίκουρος καθηγητής κ. Δ. Κομιώτης, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους με τους οποίους συνεργάστηκα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Ιδιαίτερα ευχαριστώ θερμά τις συναδέλφους κκ. Χ. Σπανού, Δ. Θεοφανίδου, Γ. Κακαλοπούλου, Μ. Μαργαρίτη, και Γ. Γεωργάκα με τις οποίες είχα άψογη συνεργασία κατά τη διάρκεια εκπόνησης των διπλωματικών τους εργασιών. Ευχαριστώ θερμά τον δρ. κ. Ι. Κωσταρόπουλο, τον δρ. κ. Μ. Νικολαΐδη, τον κ. Κ. Αναγνωστόπουλο και τον κ. Ε. Καραμπέρη (οι δύο τελευταίοι τώρα είναι λέκτορες του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου), για τις ουσιαστικές και πολύτιμες υποδείξεις τους. Επίσης ευχαριστώ τον λέκτορα κ. Δ. Καρπούζα, τον δρ. κ. Α. Κυπάρο, τον δρ. κ. Γ. Πανουτσόπουλο και τον δρ. κ. Η. Γούναρη για τη φιλική συνεργασία. Ευχαριστώ επίσης και όλους τους φοιτητές/τριες που εργάστηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών στη διάρκεια των τεσσάρων αυτών χρόνων για την αρμονική συνεργασία.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια κ. Ι. Φλώρου, της Ιατρικής Σχολής του The Pennsylvania State University στις Η.Π.Α., που δέχτηκε να εργαστώ στο

εργαστήριό της για τέσσερις μήνες, όπου έγιναν τα πειράματα που αφορούσαν την επίδραση των φυτικών πολυφαινόλων στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A πρωτεΐνης. Την ευχαριστώ για τη θερμή φιλοξενία, για τον πολύτιμο χρόνο της που διέθεσε επιβλέποντας τα πειράματά μου, για τις ουσιαστικές υποδείξεις και παρατηρήσεις της, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την οικονομική βοήθεια που μου προσέφερε. Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τον σύζυγό της καθηγητή κ. D. Phelps (στο εργαστήριο του οποίου επίσης εργάστηκα) για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς και όλους με τους οποίους συνεργάστηκα, τον T. Umstead, τον δρ. G. Wang, τον X. Guo, τον δρ. Z. Lin, τον δρ. Anatoly Mikerov και την S. DiAngelo.

Ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες από το πρόγραμμα 'Όινοσ και Υγεία'. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επιστημονικό υπεύθυνο του προγράμματος, τον καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σ. Χαρουτουιάν για την επίλυση των όποιων προβλημάτων παρουσιάστηκαν, καθώς επίσης και τις συνεργάτιδες του δρ. κ. Σ. Κουλοχέρη και την υποψήφια διδάκτορα κ. Μ. Αναστασιάδη. Επίσης, ευχαριστώ την επιστημονική ομάδα του καθηγητή κ. Λ. Σκαλτσούνη, από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, που μας παρείχε τα εκχυλίσματα αμπέλου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γ. Καζαντζόγλου που απομόνωσε τα εκχυλίσματα αμπέλου και τα πολυφαινολικά κλάσματα και προσδιόρισε τις φυτικές πολυφαινόλες. Επίσης ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Σ. Μητάκου, τον λέκτορα κ. Π. Μαγιάτη, και την υποψήφια διδάκτορα κ. Α. Παληογιάννη. Ευχαριστώ επίσης από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών τον δρ. κ. Πίντζα και την υποψήφια διδάκτορα κ. Φ. Ψαχούλια. Επίσης ευχαριστώ την ΚΕΟΣΟΕ για την οικονομική υποστήριξη που μας παρείχε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη Δ.Ε.Π. του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια που μου προσέφεραν οποτεδήποτε τη

χρειάστηκα, ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή κ. Δ. Κομιώτη για τη βοήθειά του σε θέματα που αφορούσαν τη σχέση χημικής δομής-δράσης των φυτικών πολυφαινολών.

Ευχαριστώ θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δ. Μουρελάτο από το Ιατρικό Τμήμα του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη βοήθειά του στη μέθοδο με τις χρωματιδιακές ανταλλαγές.

Ευχαριστώ επίσης τη λέκτορα κ. Ε. Πετεινάκη για τη βοήθειά της στις αιμοληψίες και τον επίκουρο καθηγητή κ. Πολύζο που μας παρείχε τις ουσίες μιτομυκίνη C και μπλεομυκίνη από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Αρσενάκη από το Βιολογικό Τμήμα του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη χορήγηση των κυττάρων *Salmonella typhimurium* TA102.

Ευχαριστώ τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, τις κκ. Γ. Οικονόμου, Α. Καραγιάννη, Κ. Γραφανάκη και την Ι. Γαργαλιάνου, καθώς και τον κ. Π. Γκασδρόγκα για τη βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Περιεχόμενα Σχημάτων	5
Περιεχόμενα Πινάκων	11
Συντμήσεις	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1.1 Χημειοπροφύλαξη και φυτοχημικά συστατικά	19
1.1.1 Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου	19
1.1.2 Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου	20
1.1.3 Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης	21
1.2 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες	25
1.2.1 Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών	26
1.2.2 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	28
1.2.3 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών	32
1.3 Βιολογικές ιδιότητες σταφυλιών (κρασιού)	38
1.4 Χημική σύσταση σταφυλιών	40
1.5 Φυτικές πολυφαινόλες	40
1.5.1 Χημική δομή φυτικών πολυφαινολών	40
1.5.2 Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών	46
1.5.3 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών	46
1.6 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών	52
1.6.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση	53
1.6.2 Καρδιοπροστατευτική δράση	58
1.6.3 Αντικαρκινική δράση	59
1.6.4 Άλλες βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών	60
1.7 Σκοπός μελέτης	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (<i>VITIS VINIFERA</i>)	
2.1 Γενικά	69
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	71
2.2.1 Υλικά	71
2.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια	71
2.2.2 Μέθοδοι	71
2.2.2.i Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH•	71
2.2.2.ii Στατιστική ανάλυση	72
2.3 Αποτελέσματα	74
2.3.1 Πρότυπη καμπύλη DPPH	74
2.3.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και των πολυφαινολικών κλασμάτων αμπέλου με τη μέθοδο του DPPH	74
2.3.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών πολυφαινολών με τη μέθοδο του DPPH	75

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ
ΑΜΠΕΛΟΥ (*VITIS VINIFERA*)**

3.1 Γενικά	101
3.1.1 Μεταλλαξιγένεση και οξειδωτικό στρες	102
3.1.2 Αντιμεταλλαξιγόνο δράση φυτικών πολυφαινολών	105
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	108
3.2.1 Υλικά	108
3.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια	108
3.2.1.ii Οργανισμοί	108
3.2.1.iii Πλασμίδιο	108
3.2.2 Μέθοδοι	109
3.2.2.i Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C	109
3.2.2.ii Το τεστ του Ames	114
3.2.2.iii Ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges)	123
3.3 Αποτελέσματα	134
3.3.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C	134
3.3.1.i Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C	134
3.3.1.ii Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά στην επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C	135
3.3.1.iii Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C	136
3.3.2 Τεστ του Ames	149
3.3.2.i Επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102	149
3.3.2.ii Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	149
3.3.2.iii Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	150
3.3.2.iv Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	151
3.3.2.v Επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	171
3.3.2.vi Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	171
3.3.2.vii Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	172

3.3.2.viii Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>S. typhimurium</i> TA102	173
3.3.3 Ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges)	193
3.3.3.i Επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση των SCEs σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	193
3.3.3.ii Επίδραση των διαλυτών στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση των SCEs σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	193
3.3.3.iii Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση του αριθμού των SCEs σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα	194
3.3.3.iv Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση του αριθμού των SCEs σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα	195
3.3.3.v Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση του αριθμού των SCEs σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα	195
3.4 Συζήτηση	217
3.4.1 Μελέτη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων αμπέλου	217
3.4.2 Μελέτη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης πολυφαινολικών κλασμάτων αμπέλου	220
3.4.3 Μελέτη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης φυτικών πολυφαινολών	222

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΟΖΟΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ SP-A ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

4.1 Γενικά	235
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	241
4.2.1 Υλικά	241
4.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια	241
4.2.2 Μέθοδοι	241
4.2.2.i Απομόνωση ανθρώπινης SP-A	241
4.2.2.ii Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	242
4.2.2.iii Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS και χρώση με νιτρικό άργυρο	243
4.2.2.iv Πειραματική διάταξη παραγωγής O ₃	244
4.2.2.v Έκθεση της SP-A στο O ₃ παρουσία φυτικών πολυφαινολών	246
4.2.2.vi Προσδιορισμός των καρβονυλικών ομάδων της SP-A πρωτεΐνης	247
4.2.2.vii Σταθεροποίηση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο του dot-blot	248
4.2.2.viii Στατιστική ανάλυση	250
4.3 Αποτελέσματα	251
4.3.1 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση δειγμάτων SP-A και προσδιορισμός της οξειδωσής τους	251
4.3.2 Καμπύλη οξειδωσής της SP-A από το O ₃	251
4.3.3 Επίδραση φυτικών πολυφαινολών στην επαγόμενη από το O ₃ οξειδωσής της SP-A	251
4.4 Συζήτηση	265

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ

**ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*VITIS VINIFERA*) ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗ I**

5.1	Γενικά	273
5.2	Υλικά και Μέθοδοι	278
5.2.1	Υλικά	278
5.2.1.i	Χημικά αντιδραστήρια	278
5.2.1.ii	Ένζυμα	278
5.2.1.iii	Πλασμίδιο	278
5.2.2	Μέθοδοι	278
5.2.2.i	Χαλάρωση πλασμιδιακού DNA από τη δράση τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού (DNA relaxation assay)	278
5.2.2.ii	Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από τη δράση ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (DNA relaxation assay)	281
5.2.2.iii	Στατιστική ανάλυση	282
5.3	Αποτελέσματα	282
5.3.1	Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού	282
5.3.2	Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού	283
5.3.3	Επίδραση των πολυφαινολών στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού	283
5.3.4	Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I	284
5.3.5	Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I	285
5.4	Συζήτηση	303
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ		308
Περίληψη (Ελληνικά)		321
Περίληψη (Αγγλικά)		324
Βιβλιογραφία		327

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Σχήμα 1.1 Σχηματισμός της 8-υδροξυγουανίνης.	34
Σχήμα 1.2 Προϊόντα που σχηματίζονται μετά την επίδραση ΔΜΟ και ΔΜΑ στα αμινοξέα τυροσίνη και φαινυλαλανίνη.	35
Σχήμα 1.3 Χημικές δομές φλαβονοειδών.	41
Σχήμα 1.4 Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών.	42
Σχήμα 1.5 Βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος.	47
Σχήμα 1.6 Βιοσύνθεση των πολυφαινολών.	48
Σχήμα 1.7 Βιοσύνθεση <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης.	49
Σχήμα 1.8 Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων.	57
Σχήμα 1.9 Σταφύλια των ποικιλιών Μανδηλαριά Σαντορίνης και ΑσσύρτικοΣαντορίνης.	63
Σχήμα 1.10 Απομόνωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων και πολυφαινολικών κλασμάτων αμπέλου.	64
Σχήμα 1.11 Χημικές δομές εξεταζόμενων πολυφαινολικών οξέων.	66
Σχήμα 1.12 Χημικές δομές εξεταζόμενων φλαβονοειδών και ρεσβερατρόλης.	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Σχήμα 2.1 Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•) και της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.	73
Σχήμα 2.2 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης DPPH.	77
Σχήμα 2.3 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς.	79
Σχήμα 2.4 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς.	80
Σχήμα 2.5 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικου.	81
Σχήμα 2.6 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου.	82
Σχήμα 2.7 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς.	83
Σχήμα 2.8 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς.	84
Σχήμα 2.9 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς.	85
Σχήμα 2.10 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το γαλλικό οξύ.	86
Σχήμα 2.11 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το πρωτοκατεχοϊκό οξύ.	87
Σχήμα 2.12 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το καφεϊκό οξύ.	88
Σχήμα 2.13 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το φερουλικό οξύ.	89
Σχήμα 2.14 Επίδραση στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από το κουμαρικό οξύ.	90

Σχήμα 2.15 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από την (+)-κατεχίνη.	91
Σχήμα 2.16 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από την (-)-επικατεχίνη.	92
Σχήμα 2.17 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από την κερκετίνη.	93
Σχήμα 2.18 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από τη ρουτίνη.	94
Σχήμα 2.19 % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH από την <i>trans</i> -ρεσβερατρόλη.	95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Σχήμα 3.1 Απεικονίζεται η μετατροπή ενός υπερελικωμένου δίκλωνου κυκλικού πλασμιδιακού DNA (supercoiled) σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA (open circular) μετά τη δημιουργία θραύσεων από τη μιτομυκίνη C.	112
Σχήμα 3.2 Χημική δομή μιτομυκίνης C.	113
Σχήμα 3.3 Δημιουργία χιάσματος ανάμεσα σε δύο γουανίνες δύο διαφορετικών αλυσίδων του DNA με την παρεμβολή της μιτομυκίνης C σε μορφή υδροκινόνης.	113
Σχήμα 3.4 Χημική δομή της μπλεομυκίνης A ₂ .	119
Σχήμα 3.5 Ανταλλαγή χρωμοσωμικού τμήματος μεταξύ δύο αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange).	125
Σχήμα 3.6 Πυρήνες 1 ^{ης} , 2 ^{ης} και 3 ^{ης} μιτωτικής διαίρεσης.	127
Σχήμα 3.7 Διάγραμμα που δείχνει πως επιτυγχάνεται η διαφορετική χρώση των χρωματίδων με την ενσωμάτωση της BrdU λόγω του ημισυντηρητικού τρόπου αντιγραφής.	128
Σχήμα 3.8 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	138
Σχήμα 3.9 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	139
Σχήμα 3.10 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	140
Σχήμα 3.11 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	141
Σχήμα 3.12 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	142
Σχήμα 3.13 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	143
Σχήμα 3.14 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	145
Σχήμα 3.15 Επίδραση του γαλλικού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	146
Σχήμα 3.16 Επίδραση του φερουλικού οξέος και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA.	147
Σχήμα 3.17 Καμπύλη μεταλλαξιγένεσης της μπλεομυκίνης σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	153

Σχήμα 3.18 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	154
Σχήμα 3.19 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	155
Σχήμα 3.20 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	156
Σχήμα 3.21 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	157
Σχήμα 3.22 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	158
Σχήμα 3.23 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη επαγόμενη σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	159
Σχήμα 3.24 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	160
Σχήμα 3.25 Επίδραση του φερουλικού οξέος στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	161
Σχήμα 3.26 Επίδραση του γαλλικού οξέος στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	162
Σχήμα 3.27 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	163
Σχήμα 3.28 Επίδραση της ρουτίνης στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	164
Σχήμα 3.29 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	165
Σχήμα 3.30 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	166
Σχήμα 3.31 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	167
Σχήμα 3.32 Επίδραση της κερκετίνης στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	168
Σχήμα 3.33 Επίδραση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	169
Σχήμα 3.34 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη μπλεομυκίνη μεταλλάξεις σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	170
Σχήμα 3.35 Καμπύλη μεταλλαξιγένεσης του H ₂ O ₂ σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	175
Σχήμα 3.36 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	176
Σχήμα 3.37 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	177
Σχήμα 3.38 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην	

επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	178
Σχήμα 3.39 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	179
Σχήμα 3.40 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	180
Σχήμα 3.41 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	181
Σχήμα 3.42 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	182
Σχήμα 3.43 Επίδραση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	183
Σχήμα 3.44 Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	184
Σχήμα 3.45 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	185
Σχήμα 3.46 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	186
Σχήμα 3.47 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	187
Σχήμα 3.48 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	188
Σχήμα 3.49 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	189
Σχήμα 3.50 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	190
Σχήμα 3.51 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	191
Σχήμα 3.52 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	192
Σχήμα 3.53 Καμπύλη αύξησης των SCEs και ελάττωσης του PRI από την επίδραση της MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	198
Σχήμα 3.54 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	200
Σχήμα 3.55 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	201
Σχήμα 3.56 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	202
Σχήμα 3.57 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	203
Σχήμα 3.58 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από	

τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	204
Σχήμα 3.59 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	205
Σχήμα 3.60 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	206
Σχήμα 3.61 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	207
Σχήμα 3.62 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	208
Σχήμα 3.63 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	209
Σχήμα 3.64 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	210
Σχήμα 3.65 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	211
Σχήμα 3.66 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	212
Σχήμα 3.67 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	213
Σχήμα 3.68 Επίδραση της κερκετίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	214
Σχήμα 3.69 Επίδραση της ρουτίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	215
Σχήμα 3.70 Επίδραση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	216
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
Σχήμα 4.1 Απεικονίζονται οι περιοχές της SP-A.	237
Σχήμα 4.2 Μηχανισμός παραγωγής του όζοντος από τη φωτοχημική ρύπανση.	240
Σχήμα 4.3 Οζονόλυση.	241
Σχήμα 4.4 Απεικονίζεται η πειραματική διάταξη παραγωγής του O ₃ .	245
Σχήμα 4.5 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και dot-blot των SP-A δειγμάτων.	254
Σχήμα 4.6 Καμπύλη οξειδωσης της SP-A από το O ₃ .	255
Σχήμα 4.7 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	256
Σχήμα 4.8 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	257
Σχήμα 4.9 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	258
Σχήμα 4.10 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	259
Σχήμα 4.11 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	260
Σχήμα 4.12 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	261
Σχήμα 4.13 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	262

Σχήμα 4.14 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	263
Σχήμα 4.15 Απεικονίζεται η % αναστολή των φυτικών πολυφαινολών στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A.	264
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
Σχήμα 5.1 Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης I.	275
Σχήμα 5.2 Μηχανισμός δράσης των αναστολέων της κατηγορίας I των τοποϊσομερασών.	277
Σχήμα 5.3 Χαλάρωση πλασμιδιακού DNA από τη δράση της τοποϊσομεράσης I (DNA relaxation assay).	280
Σχήμα 5.4 % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	286
Σχήμα 5.5 % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	287
Σχήμα 5.6 % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	288
Σχήμα 5.7 % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	289
Σχήμα 5.8 % αναστολή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	290
Σχήμα 5.9 % αναστολή του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	292
Σχήμα 5.10 % αναστολή της κερκετίνης στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	293
Σχήμα 5.11 % αναστολή του καφεϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	294
Σχήμα 5.12 % αναστολή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	295
Σχήμα 5.13 % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	297
Σχήμα 5.14 % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	298
Σχήμα 5.15 % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	299
Σχήμα 5.16 % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	300
Σχήμα 5.17 % αναστολή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	301

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Πίνακας 1.1 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση σε μονομερείς πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων αμπέλου.	65
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πίνακας 2.1 Τιμές IC ₅₀ των εξεταζόμενων ουσιών.	78
Πίνακας 2.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	79
Πίνακας 2.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	80
Πίνακας 2.4 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	81
Πίνακας 2.5 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	82
Πίνακας 2.6 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	83
Πίνακας 2.7 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	84
Πίνακας 2.8 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.	85
Πίνακας 2.9 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.	86
Πίνακας 2.10 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.	87
Πίνακας 2.11 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.	88
Πίνακας 2.12 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του φερουλικού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.	89
Πίνακας 2.13 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του κουμαρικού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.	90
Πίνακας 2.14 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της (+)-κατεχίνης με τη μέθοδο του DPPH.	91
Πίνακας 2.15 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της (-)-επικατεχίνης με τη μέθοδο του DPPH.	92
Πίνακας 2.16 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της κερκετίνης με τη μέθοδο του DPPH.	93
Πίνακας 2.17 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της ρουτίνης με τη μέθοδο του DPPH.	94
Πίνακας 2.18 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης με τη μέθοδο του DPPH.	95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πίνακας 3.1 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	138
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Πίνακας 3.2 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	139
Πίνακας 3.3 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	140
Πίνακας 3.4 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	141
Πίνακας 3.5 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	142
Πίνακας 3.6 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	143
Πίνακας 3.7 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	144
Πίνακας 3.8 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	145
Πίνακας 3.9 Επίδραση του γαλλικού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	146
Πίνακας 3.10 Επίδραση του φερουλικού οξέος και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	147
Πίνακας 3.11 Επίδραση της (+)-κατεχίνης, της (-)-επικατεχίνης και του κουμαρικού οξέος στις επαγόμενες από τη MMC ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.	148
Πίνακας 3.12 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	154
Πίνακας 3.13 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	155
Πίνακας 3.14 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	156
Πίνακας 3.15 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	157
Πίνακας 3.16 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	158
Πίνακας 3.17 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	159
Πίνακας 3.18 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	160
Πίνακας 3.19 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	161
Πίνακας 3.20 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	162
Πίνακας 3.21 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	163
Πίνακας 3.22 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από τη	

μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	164
Πίνακας 3.23 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	165
Πίνακας 3.24 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	166
Πίνακας 3.25 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	167
Πίνακας 3.26 Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	168
Πίνακας 3.27 Επίδραση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	169
Πίνακας 3.28 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	170
Πίνακας 3.29 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> TA102.	176
Πίνακας 3.30 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> TA102.	177
Πίνακας 3.31 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> TA102.	178
Πίνακας 3.32 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> TA102.	179
Πίνακας 3.33 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	180
Πίνακας 3.34 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	181
Πίνακας 3.35 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	182
Πίνακας 3.36 Επίδραση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	183
Πίνακας 3.37 Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	184
Πίνακας 3.38 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	185
Πίνακας 3.39 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	186
Πίνακας 3.40 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	187
Πίνακας 3.41 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	188
Πίνακας 3.42 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	189
Πίνακας 3.43 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	190

Πίνακας 3.44 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	191
Πίνακας 3.45 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	192
Πίνακας 3.46 Επίδραση της μεθανόλης και του DMSO στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	199
Πίνακας 3.47 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	200
Πίνακας 3.48 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	201
Πίνακας 3.49 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	202
Πίνακας 3.50 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	203
Πίνακας 3.51 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	204
Πίνακας 3.52 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	205
Πίνακας 3.53 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	206
Πίνακας 3.54 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	207
Πίνακας 3.55 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	208
Πίνακας 3.56 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	209
Πίνακας 3.57 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	210
Πίνακας 3.58 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	211
Πίνακας 3.59 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	212
Πίνακας 3.60 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	213
Πίνακας 3.61 Επίδραση της κερκετίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	214
Πίνακας 3.62 Επίδραση της ρουτίνης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	215
Πίνακας 3.63 Επίδραση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης στην αύξηση των SCEs που προκαλούνται από τη MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.	216

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Πίνακας 5.1 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	286
Πίνακας 5.2 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	287
Πίνακας 5.3 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου	

(άσπρα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	288
Πίνακας 5.4 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	289
Πίνακας 5.5 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	290
Πίνακας 5.6 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	291
Πίνακας 5.7 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	292
Πίνακας 5.8 Επίδραση της κερκετίνης στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	293
Πίνακας 5.9 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	294
Πίνακας 5.10 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	295
Πίνακας 5.11 Επίδραση του φερουλικού οξέος, του κουμαρικού οξέος, του γαλλικού οξέος και της ρουτίνης στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.	296
Πίνακας 5.12 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	297
Πίνακας 5.13 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	298
Πίνακας 5.14 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	299
Πίνακας 5.15 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	300
Πίνακας 5.16 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	301
Πίνακας 5.17 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς και του του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.	302

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Πίνακας 6.1 Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης.	320
---------------------------------------------------------------------------------	-----

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA	Ασκορβικό οξύ
AAF	2-ακετυλο-αμινο-φλουορένιο
ADPRT	πολύ(ADP-ριβουσυλ)-τρανσφεράση
BAL (bronchoalveolar lavage)	Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
BrdU	5-βρωμοδεοξυουριδίνη
BSA (bovine serum albumin)	Αλβουμίνη από ορό βοδιού
C	Κυτοσίνη
CAT	Καταλάση
CDK	Κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη
CFU (Colony Forming Units)	Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
CO ₂	Διοξείδιο του άνθρακα
CRD	Περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων
Cys	Κυστεΐνη
DHA	Αφυδροασκορβικό οξύ
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξείδιο
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNPH	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
DNP	2,4-δινιτροφαινυλδραζόνης
DOPA	Δυδροξυφαινυλαλανίνη
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ
FeCl ₃	Τριχλωριούχος σίδηρος
G	Γουανίνη
Gly	Γλυκίνη
GSH	Γλουταθειόνη
GSHPX	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSSG	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
GST	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
FPG (Fluorescence plus Giemsa)	Χρώση με φθορισμό και Giemsa
H ⁺	Κατιόντα υδρογόνου
Hg	Υδράργυρος
His	Ιστιδίνη
His ⁺	Ανεξάρτητα από ιστιδίνη κύτταρα
HNE	4-υδροξυ-2-τρανσ-νονενάλη
H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HOCl	Υποχλωριώδες οξύ
MDA	Μαλονδιαλδεΰδη
Met	Μεθειονίνη
MMC	Μιτομυκίνη C
LDL (low density lipoprotein)	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
NAD ⁺	Νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NF-κβ (Nuclear Factor-κβ)	Μεταγραφικός παράγοντας NF-κβ

NO	Μονοξειδίο του αζώτου
NO ₂	Διοξειδίο του αζώτου
O	Ατομικό οξυγόνο
O ₂	Οξυγόνο
O ₃	Όζον
O ₂ ^{•-}	Ρίζα του σουπεροξειδίου
ODC	Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης
OH [•]	Ρίζα του υδροξυλίου
Q	Κινόνη
PARP	Πολύ(ADP-ριβοζη)-πολυμεράση
PHA	Φυτοαιμογλουτινίνη
PhIP	2-αμινο-1-μεθυλ-6-φαινυλιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
PRI	Δείκτης Πολλαπλασιασμού Κυττάρων
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
PTK	Πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης
RO [•]	Ρίζα του αλκοξυλίου
RO ₂ [•]	Ρίζα του αλκυπεροξυλίου
SCEs	Χρωματιδιακές ανταλλαγές
SDS	Άλας με νάτριο του θεικού δωδεκυλίου
SOD	Δισμουτάση του υπεροξειδίου
SP	Πρωτεΐνη επιφανειοδραστικού παράγοντα
SQ ^{•-}	Ημικινόνη
TAE	Τρις-υδροξυμεθυλο-αμινο μεθάνιο οξικό οξύ
TNF-α (Tumour Necrosis Factor-α)	Αυξητικός παράγοντας TNF-α
Tris	Τρις-υδροξυμεθυλο-αμινο-μεθάνιο
Trp	Τρυπτοφάνη
Trp-P-1	3-άμινο-1,4-διμέθυλο-5H-πυριδο[4,3-b]ινδόλη
Tyr	Τυροσίνη
UV	Υπεριώδης ακτινοβολία
U	Μονάδα ενζύμου
ΔMA	Δραστικές Μορφές Αζώτου
ΔMO	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Χημειοπροφύλαξη και φυτοχημικά συστατικά

«Η τροφή μπορεί να είναι φάρμακο για κάθε άνθρωπο, και το φάρμακο μπορεί να αναζητηθεί στην τροφή»

Ιπποκράτης, 400 π.χ.

Το 1976 ο Sporn εισήγαγε την έννοια της ‘χημειοπροφύλαξης’ που σημαίνει την πρόληψη της εμφάνισης του καρκίνου μέσω της χορήγησης βιοδραστικών μη θρεπτικών συστατικών των φυτικών τροφών (τα οποία ονομάζονται φυτοχημικά συστατικά) είτε ως μέρος της διαίτας είτε ακόμα με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής (Sporn 1976). Η χημειοπροφύλαξη θεωρείται μία από τις σημαντικότερες στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου καθώς επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως στην έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, στο κάπνισμα και τη διατροφή (Morse και Stoner 1993). Σύμφωνα με τον Wattenberg (1985) οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- i) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
- ii) Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την πρώτη φάση (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας.
- iii) Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την προαγωγική (promotion) και την προοδευτική (progression) φάση της καρκινογένεσης.

1.1.1 Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου συνήθως αναστέλλουν το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), φυτικές πολυφαινόλες (π.χ. καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ),

σουλφυδρυλικές ενώσεις (π.χ. N-ακετυλοκυστεΐνη) και διάφορα αμινοξέα (π.χ. προλίνη, θειοπρολίνη). Για παράδειγμα, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981; Hartman και Shankel 1990; Κουρέτας 2003).

1.1.2 Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: i) αναστολείς του κυτοχρώματος P-450, ii) επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών, iii) εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών, iv) επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA (Κουρέτας 2003).

Το κυτόχρωμα P-450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων αλλά και άλλων κυττάρων, τα οποία παίζουν τον κύριο ρόλο στη φάση I του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών. Οι αντιδράσεις της φάσης I μερικές φορές οδηγούν στη μετατροπή προ-καρκινογόνων ουσιών σε καρκινογόνες. Έτσι έχει βρεθεί ότι ουσίες που αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P-450, όπως το ισοθειοκυανικό φαινυλεξύλιο, εμποδίζουν την ανάπτυξη όγκων στους πνεύμονες ποντικών (Morse και συν., 1991).

Οι αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας και της απέκκρισης των ξеноβιοτικών ουσιών. Συνεπώς, ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II (π.χ. την τρανσφεράση της γλουταθειόνης ή GST) πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην απομάκρυνση καρκινογόνων ουσιών. Για παράδειγμα, ένα ισοθειοκυανικό παράγωγο που βρίσκεται

στα μπρόκολα, είναι πιθανός επαγωγέας της GST και αναστέλλει τη χημικά προκαλούμενη ανάπτυξη των όγκων σε αρουραίους (Zhang και συν., 1992).

Τα περισσότερα καρκινογόνα μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρονιόφιλες μορφές που αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις (DNA adducts), οι οποίες οδηγούν σε μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του DNA και ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση αντιογκογονιδίων (Κουρέτας 2003). Κατά συνέπεια, η εξουδετέρωση των ηλεκτρονιόφιλων καρκινογόνων ουσιών θεωρείται βασικός μηχανισμός χημειοπροφύλαξης. Για παράδειγμα, μία φυτική πολυφαινόλη, το ελλαγικό οξύ, αντιδρά ομοιοπολικά με το διολεποξειδίο του βενζοπυρενίου και το απενεργοποιεί προστατεύοντας πειραματόζωα από καρκινογένεση (Sayer και συν., 1982).

Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ορισμένα χημικά καρκινογόνα ελαττώνουν τα επίπεδα ενζύμων, όπως την πολύ(ADP-ριβουσυλ)-τρανσφεράση (ADPRT), που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Έχει βρεθεί (Farzareh και συν., 1988) ότι η N-ακετυλοκυστεΐνη αποτρέπει την ελάττωση των επιπέδων του ενζύμου ADPRT, που προκαλείται από το χημικό καρκινογόνο 2-ακετυλο-αμινοφλουορένιο (AAF).

1.1.3 Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης

Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτής της κατηγορίας μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: i) αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών, ii) επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης, iii) ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος (signal transduction pathways), iv) ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, v) αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων, vi) επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας, vii) επαγωγείς της απόπτωσης, viii) ρυθμιστές της

μεθυλίωσης του DNA, ix) αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, x) επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης και xi) αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (De Flora και Ramel 1990).

Η συγκέντρωση των πολυαμινών στα κύτταρα σχετίζεται με την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και συχνά με μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Ένα ένζυμο κλειδί στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυαμινών είναι η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) που καταλύει τη μετατροπή της ορνιθίνης σε πουτρεσκίνη. Τα επίπεδα της ODC και των πολυαμινών είναι συχνά αυξημένα στους καρκινικούς ιστούς. Διάφοροι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες φαίνεται να δρουν μέσω αναστολής της ODC, όπως το ελλαγικό οξύ και οι φυτικές πολυφαινόλες που βρίσκονται στο τσάι (Κουρέτας 2003).

Χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι ότι έχουν χάσει την ικανότητα να διαφοροποιούνται. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης (Huang και συν., 1986; Sani και συν., 1990).

Τα μόρια των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελούν στόχους χημειοπροφύλαξης με αποτέλεσμα τη φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για παράδειγμα, μία κατηγορία φυτικών πολυφαινολών, τα φλαβονοειδή, αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) οδηγώντας σε καταστολή της καρκινογένεσης (Kelloff και συν., 1997).

Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες μπορεί να δρουν άμεσα αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της δραστηριότητας ορμονών ή αυξητικών παραγόντων. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να γίνει σε επίπεδο υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (όσον αφορά αυξητικούς παράγοντες

και πεπτιδικές ορμόνες) ή σε επίπεδο κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υποδοχέων (όσον αφορά τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών). Για παράδειγμα τα αντιστρογόνα, όπως η ταμοξιφένη, συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας τη σύνδεση και τη δράση των οιστρογόνων, τα οποία εμφανίζουν δράση προαγωγέα σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan 1992).

Οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν την ικανότητα των χημειοπροφυλακτικών ουσιών να αναστέλλουν τη δράση των ογκογονιδίων εστιάζονται στο ογκογονίδιο *ras*. Για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη *ras*, θα πρέπει πρώτα να υποστεί φαρνεσυλίωση. Έχει λοιπόν βρεθεί ότι η ουσία D-λιμονίνη, που βρίσκεται στα κίτρα, αναστέλλει τη φάση προόδου των όγκων του μαστού σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα (Elson και συν., 1988).

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των χασμοσυνδέσμων (*gap junctions*) κυτταρικής επικοινωνίας. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω των οποίων τα κύτταρα επικοινωνούν με τα γειτονικά κύτταρα. Πιστεύεται ότι στην καρκινογενετική διαδικασία αναστέλλεται αυτή η κυτταρική επικοινωνία. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες όπως το β-καροτένιο, το ρετινοϊκό οξύ και η βιταμίνη Α προάγουν την επικοινωνία των κυττάρων μέσω των χασμοσυνδέσμων αναστέλλοντας την μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά (Zhang και συν., 1991; Κουρέτας 2003).

Η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί σημαντική παράμετρο ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Διάφορες καρκινογόνες ουσίες με μιτογόνο δράση αναστέλλουν την απόπτωση (Bursch και συν., 1992). Έχει αποδειχτεί ότι αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επάγουν την απόπτωση, όπως η ταμοξιφένη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Bursch και συν., 1992) ή η

σουλινδάκη, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που αναστέλλει την ανάπτυξη πολυπύδων στο παχύ έντερο (Labayle και συν., 1991).

Έχει αποδειχτεί ότι η υπομεθυλίωση του DNA οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wainfan και Poirier 1992). Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν σαν δότες μεθυλικών ομάδων. Για παράδειγμα, η μεθειονίνη που συμμετέχει μαζί με το φολικό οξύ και τη βιταμίνη B12 στη ρύθμιση του ενδοκυττάρου μεταβολισμού του μεθυλίου, αναστέλλει τους χημικά προκαλούμενους όγκους του μαστού σε αρουραίους (Wainfan και Dizik 1987).

Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν διάφορα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη λύση της βασικής μεμβράνης, με συνέπεια τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Τέτοια ένζυμα είναι οι πρωτεάσες (π.χ. η κολλαγενάση, η υαλουρονιδάση, η καθεψίνη D, και η ελαστάση) και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Έτσι, η χημειοπροφυλακτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών, τουλάχιστον εν μέρει, οφείλεται στην αναστολή της λύσης της βασικής μεμβράνης (Kennedy 1998).

Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση μέσω διάφορων μηχανισμών. Για παράδειγμα, το ρετινοϊκό οξύ αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων, ενώ φαρμακολογικές δόσεις της βιταμίνης E αυξάνουν την παραγωγή αντισωμάτων (Hill και Grubbs 1992).

Κατά την καρκινογένεση παρατηρείται αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, που συμμετέχει στην παρατηρούμενη φλεγμονώδη αντίδραση. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας 2003). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας δημιουργούνται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι αναστολείς των κυκλοοξυγενασών, όπως τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα πιροξικάμη και ινδομεθακίνη καθώς και ορισμένες φυτικές πολυφαινόλες είναι δραστικοί αναστολείς της καρκινογένεσης (Reddy και συν., 1987). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι αναστολείς της λιποξυγενάσης, όπως η βιταμίνη E, αναστέλλουν την προαγωγική φάση της καρκινογένεσης σε επιδερμίδα ποντικών (Huang και συν., 1991).

Σήμερα η 'χημειοπροφύλαξη' αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για την πρόληψη όχι μόνο του καρκίνου αλλά και μιας σειράς άλλων χρόνιων παθήσεων (Hong και Sporn 1997; Liu 2003). Γενικά, μία σειρά από επιδημιολογικές και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση φυτικών τροφών παίζει σημαντικό χημειοπροστατευτικό ρόλο, γιατί συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για προσβολή από ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος και γενικότερα οι ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς και διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσοι (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) (Willett 2002; Nepka και συν., 1999; Huang και συν., 1994; Joseph και συν., 1999; Tijburg και συν., 1997). Επιπλέον τα φυτοχημικά συστατικά χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παρασκευή φαρμάκων καθώς σε ένα μεγάλο ποσοστό των σύγχρονων χρησιμοποιούμενων φαρμάκων οι δραστικές τους ουσίες είναι ή προέρχονται από τέτοια συστατικά (Colic και Pavelic 2000).

1.2 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Στα μόρια και τα άτομα, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε μόριο ή άτομο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο, γενικά, αυξάνει τη

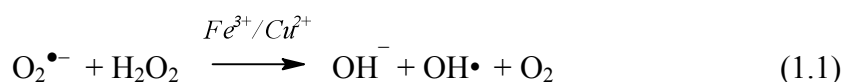
δραστικότητα του μορίου ή του ατόμου γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος ηλεκτρονίων. Ωστόσο η δραστικότητα διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ριζών (Halliwell και Gutteridge 1998; Mylonas και Kouretas 1999). Στους ζωντανούς οργανισμούς το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να βρίσκεται σε άτομο οξυγόνου (π.χ. ρίζα του υδροξυλίου $\text{OH}\bullet$), σε άτομο θείου (π.χ. θειολικές ρίζες $\text{RS}\bullet$), σε άτομο άνθρακα (π.χ. ρίζα του τριχλωρομεθυλίου CCl_3) ή σε άτομο αζώτου (π.χ. μονοξειδίο του αζώτου $\text{NO}\bullet$).

Στο εσωτερικό των κυττάρων παράγονται συνεχώς ουσίες που ονομάζονται 'Δραστικές Μορφές Οξυγόνου' ή ΔΜΟ (Reactive Oxygen Species ή ROS). Ο όρος ΔΜΟ περιλαμβάνει τις ελεύθερες ρίζες στις οποίες το ελεύθερο ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε άτομο οξυγόνου, όπως για παράδειγμα το σουπεροξειδίο ($\text{O}_2\bullet^-$), η ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}\bullet$), η ρίζα του αλκυπεροξυλίου ($\text{RO}_2\bullet$) και η ρίζα του αλκοξυλίου ($\text{RO}\bullet$) καθώς και κάποια παράγωγα του οξυγόνου τα οποία δεν είναι ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες και/ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Ένας άλλος παρόμοιος όρος είναι οι 'Δραστικές Μορφές Αζώτου' ή ΔΜΑ που περιλαμβάνει τις ελεύθερες ρίζες στις οποίες το ελεύθερο ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε άτομο αζώτου (π.χ. το μονοξειδίο του αζώτου $\text{NO}\bullet$ και το διοξειδίο του αζώτου NO_2) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες και/ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO^-).

1.2.1 Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών

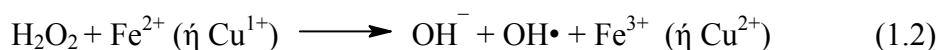
Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό ως (παρα)προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, συνήθως από αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων που μπορεί να είναι ενζυμικές ή και μη ενζυμικές. Για παράδειγμα, μία

από τις περισσότερο δραστικές ρίζες, η ρίζα του υδροξυλίου (OH•) παράγεται κατά την αντίδραση Haber-Weiss (αντίδραση 1.1) από το H₂O₂ και το O₂.



Η αντίδραση Haber-Weiss είναι αρκετά αργή για να έχει φυσιολογική σημασία, αλλά μπορεί να πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ταχύτητα παρουσία μεταβατικών μετάλλων, χηλικών ενώσεων ή αιμοπρωτεϊνών. Στα βιολογικά συστήματα το μεταβατικό μέταλλο είναι συνήθως ο σίδηρος συνδεδεμένος με διάφορες πρωτεΐνες, όπως φερίτινη, λακτοφερίνη και αιμογλοβίνη (Mylonas και Kouretas 1999).

Μια άλλη αντίδραση που θεωρείται σημαντική για την παραγωγή ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς είναι η αντίδραση Fenton (αντίδραση 1.2), όπου παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων (κυρίως Fe²⁺ και Cu¹⁺) παράγεται η ρίζα OH• από H₂O₂.



Επίσης, ΔΜΟ παράγονται και από τη 'διαρροή' ηλεκτρονίων από τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Για παράδειγμα, άμεση πρόσληψη των ηλεκτρονίων, που παράγονται στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, από το O₂ οδηγεί στο σχηματισμό O₂^{•-}. Υπολογίζεται ότι περίπου το 1-3% του O₂ στα κύτταρα μετατρέπεται σε O₂^{•-} στα μιτοχόνδρια (Halliwell και Gutteridge 1998). Επιπλέον, ΔΜΟ δημιουργούνται από αντιδράσεις αυτοοξειδωσης (π.χ. των κατεχολαμινών και του τετραϋδροφολικού) και κατά τις αντιδράσεις διαφόρων ενζυμικών συστημάτων όπως των ενζύμων P450 του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών, της οξειδάσης της ξανθίνης, της συνθετάσης των προσταγλανδινών, της λιποξυγενάσης, της αλδεϋδικής οξειδάσης και της

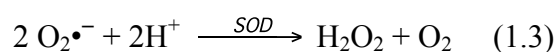
οξειδάσης των αμινοξέων (Mylonas και Kouretas 1999). ΔΜΟ παράγονται και από τη δράση εξωγενών παραγόντων. Για παράδειγμα, η έκθεση των οργανισμών σε ακτινοβολίες προκαλεί το σπάσιμο του δεσμού O-H που υπάρχει στα μόρια H₂O (το κύριο συστατικό των κυττάρων) με αποτέλεσμα το σχηματισμό OH• και H•.

1.2.2 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Οι οργανισμοί διαθέτουν μία σειρά από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς έτσι ώστε η παραγωγή των ΔΜΟ να είναι ελεγχόμενη και να μην ξεπερνά κάποια όρια. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού περιλαμβάνουν τις εξής κατηγορίες: i) αντιοξειδωτικά ένζυμα, ii) πρωτεΐνες (π.χ. τρανσφερίνες, απτογλοβίνες, αιμοπηξίνη, μεταλλοθειονίνη και κερουλοπλασμίνη) που απομακρύνουν προ-οξειδωτικές ουσίες, (π.χ. τα ιόντα μεταβατικών μετάλλων) και την αίμη, iii) πρωτεΐνες που προστατεύουν τα βιολογικά μακρομόρια από βλάβες (συμπεριλαμβανομένων των οξειδωτικών) με διάφορους μηχανισμούς (π.χ. πρωτεΐνες θερμικού σοκ) και iv) αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους που εξουδετερώνουν τις ΔΜΟ. Αρκετές από αυτές τις ουσίες βρίσκονται στις τροφές (Mylonas και Kouretas 1999; Halliwell και Gutteridge 1998).

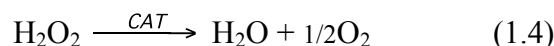
Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν ένζυμα που βρίσκονται σε εξειδικευμένα κυτταρικά οργανίδια ή υποκυτταρικά τμήματα και ελέγχουν την παραγωγή των ΔΜΟ. Από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα θεωρούνται τα εξής:

1) Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) απομακρύνει το O₂•⁻ επιταχύνοντας τη μετατροπή του σε H₂O₂ (αντίδραση 1.3). Στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν αναγνωριστεί μία SOD στα μιτοχόνδρια που περιέχει Mn στο ενεργό κέντρο (MnSOD), μία SOD στο κυτταρόπλασμα που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (CuZnSOD) και μία εξωκυτταρική SOD.

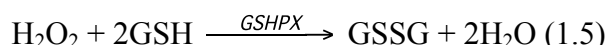


Η δράση της SOD, όπως και όλων των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, βρίσκεται σε μία λεπτή ισορροπία. Έτσι η SOD είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία αλλά η υπερέκφρασή της μπορεί να προκαλέσει βλάβες στον οργανισμό. Για παράδειγμα, στα άτομα με τρισωμία του 21^{ου} χρωμοσώματος (σύνδρομο Down) η CuZnSOD υπερεκφράζεται (το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο 21^ο χρωμόσωμα) και αυτό αποτελεί μία από τις αιτίες της παθολογίας αυτών των ατόμων (Fridovich 1995). Επίσης το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση της CuZnSOD έχει βρεθεί μεταλλαγμένο σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών ασθενειών και αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης.

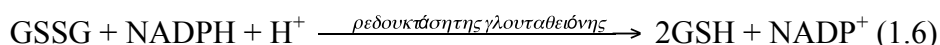
2) Η καταλάση (CAT) είναι επίσης ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που διασπά το H₂O₂ σε O₂ και H₂O (αντίδραση 1.4) και βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα (Chance και συν., 1979).



3) Μία άλλη σημαντική κατηγορία ενζύμων που απομακρύνουν το H₂O₂ είναι οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSHPX), οι οποίες απαιτούν σελήνιο για τη δράση τους και οξειδώνουν την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη (GSSG) χρησιμοποιώντας το H₂O₂ (αντίδραση 1.5) (Chance και συν., 1979).



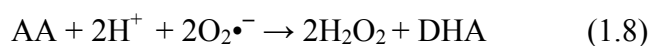
Η δράση των GSHPX συνδυάζεται με τη δράση της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (μία φλαβοπρωτεΐνη) η οποία αναγεννά τη GSH από τη GSSG χρησιμοποιώντας NADPH ως αναγωγικό (αντίδραση 1.6). Η αναλογία GSH/GSSG αποτελεί έναν από τους κυριότερους τρόπους ρύθμισης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στο εσωτερικό του κυττάρου (Powis και συν., 1995).



Εκτός από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, οι οργανισμοί διαθέτουν διαλυτά μόρια μικρού μοριακού βάρους τα οποία μπορούν να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες και να τις μετατρέπουν σε λιγότερο βλαβερές και πιο σταθερές μορφές. Για παράδειγμα η GSH, η οποία είναι ένα τριπεπτίδιο (αποτελείται από γλουταμινικό οξύ – κυστεΐνη – γλυκίνη) μπορεί και εξουδετερώνει ΔΜΟ εκτός από το να αποτελεί υπόστρωμα για τις GSHPX (Mylonas και Kouretas 1999). Επιπλέον, η θειορεδοξίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο που έχει δύο γειτονικές κυστεϊνικές-SH ομάδες σε ανηγμένη μορφή. Η θειορεδοξίνη συνδέεται με την πρωτεΐνη-στόχο, ανάγει τη δισουλφιδική γέφυρα της πρωτεΐνης ενώ οξειδώνει τις κυστεϊνικές-SH ομάδες της σε μια κυστίνη-S₂ (αντίδραση 1.7) (Halliwell και Gutteridge 1998).

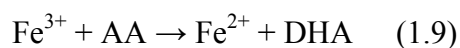


Άλλα μόρια μικρού μοριακού βάρους με αντιοξειδωτική δράση είναι το ουρικό οξύ, η μπιλιρουμπίνη, οι μελανίνες κ.α. Επίσης, μία σειρά από σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους βρίσκονται στις τροφές, οι οποίες μπορούν να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες και να τις μετατρέπουν σε λιγότερο βλαβερές και πιο σταθερές μορφές. Για παράδειγμα, η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι μια ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία, η οποία όταν αντιδρά με ελεύθερες ρίζες μετατρέπεται στο αφυδροασκορβικό οξύ (αντίδραση 1.8)



όπου AA: ασκορβικό οξύ, DHA: δυδροασκορβικό οξύ.

Κάτω όμως από ορισμένες συνθήκες μπορεί να δρα και ως προ-οξειδωτικό όταν ανάγει τον Fe³⁺ σε Fe²⁺ (αντίδραση 1.9). Στη συνέχεια ο Fe²⁺ μπορεί να πάρει μέρος στην αντίδραση Fenton και να παράγει OH•.



Το ασκορβικό οξύ αναγεννάται από τη GSH από μια αντίδραση που καταλύεται από τη ρεδοκτάση του αφυδροασκορβικού (αντίδραση 1.10).



Η βιταμίνη C φυσιολογικά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε συγκεντρώσεις 40-80μΜ. Μικρές συγκεντρώσεις όμως βιταμίνης C έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας όπου ο αυξημένος καταβολισμός της πιστεύεται ότι προκαλείται από χρόνια φλεγμονή (Mylonas και Kouretas 1999; Sinclair και συν., 1990).

Επίσης, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) είναι η πιο σημαντική ουσία που εξουδετερώνει τις ΔΜΟ μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες προστατεύοντας από λιπιδιακή υπεροξειδωση (Halliwell και Gutteridge 1998). Λόγω του ότι είναι λιπόφιλη ουσία μπορεί και διεισδύει στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών. Η βιταμίνη E μετατρέπεται σε μια μη δραστική ρίζα διακόπτοντας την αλυσίδα αντιδράσεων της λιπιδιακής υπεροξειδωσης (αντίδραση 1.11).



Όπου AH: βιταμίνη E, A•: ρίζα βιταμίνης E, LOOH: λιπιδικό υπεροξείδιο, LOOH•: ρίζα λιπιδικού περοξυλίου.

Γενικότερα, στις φυτικές τροφές, εκτός από τις βιταμίνες C και E, υπάρχουν αρκετές φυτοχημικές ουσίες με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, όπως το σελήνιο τα καροτενοειδή και οι φυτικές πολυφαινόλες (Liu 2003). Παρά την ύπαρξη όμως των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, υπολογίζεται ότι το 1% περίπου των ΔΜΟ που

παράγονται καθημερινά θα προκαλέσει κυτταρικές βλάβες (Berger 2005). Για το λόγο αυτό οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί (π.χ. των βλαβών του DNA) είναι επίσης απαραίτητοι για να ελαχιστοποιηθούν οι προκαλούμενες βλάβες.

1.2.3 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών

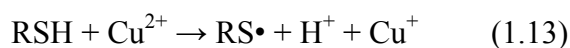
Οι ΔΜΟ είναι απαραίτητα μόρια, για παράδειγμα σε οξείες αλλά και χρόνιες φλεγμονές τα φαγοκύτταρα μετά από απόκριση σε φλεγμονώδεις παράγοντες και σε προϊόντα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων παράγουν $O_2^{\bullet-}$ για να σκοτώνουν τα βακτήρια. Οι υποδοχείς των φαγοκυττάρων, που συνδέονται με ενδοτοξίνες, με συστατικά του συμπληρώματος της ανοσίας, με το λευκοτριένιο B₄, και παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων προκαλούν ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης που είναι συνδεδεμένη με τις κυτταρικές μεμβράνες η οποία οδηγεί στο σχηματισμό $O_2^{\bullet-}$ με την ακόλουθη αντίδραση:

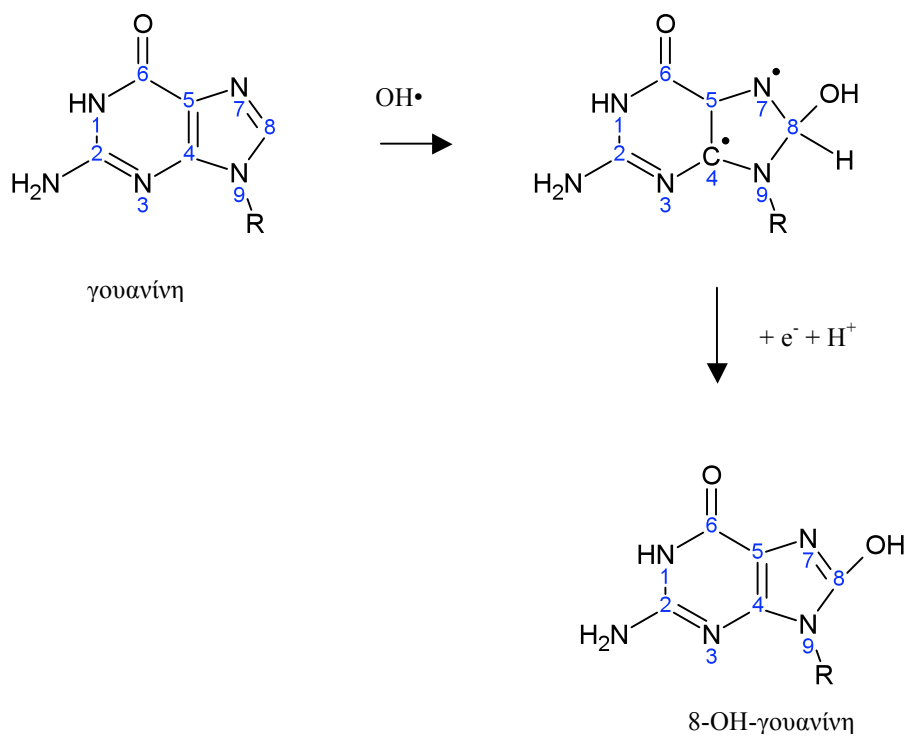


Επίσης, το NO^{\bullet} που συντίθεται από το αμινοξύ L-αργινίνη στα αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα, στα φαγοκύτταρα και σε διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους έχει πολλές λειτουργίες. Για παράδειγμα, το NO^{\bullet} συμβάλλει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης προκαλώντας διαστολή των αγγείων και στη θανάτωση των μικροβίων από τα φαγοκύτταρα. Το H_2O_2 χρησιμοποιείται από το ένζυμο υπεροξειδάση του θυρεοειδή για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών, ενώ χρησιμοποιείται και ως σηματοδοτικό μόριο σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB από τον παράγοντα TNFα απαιτεί σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους το H_2O_2 . Το H_2O_2 μπορεί επίσης να αναστείλει πρωτεϊνικές φωσφατάσες και έτσι να προκαλέσει αύξηση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης.

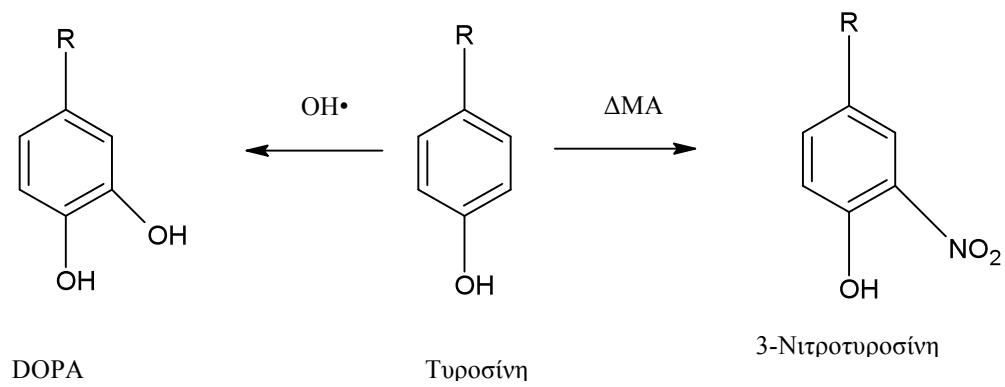
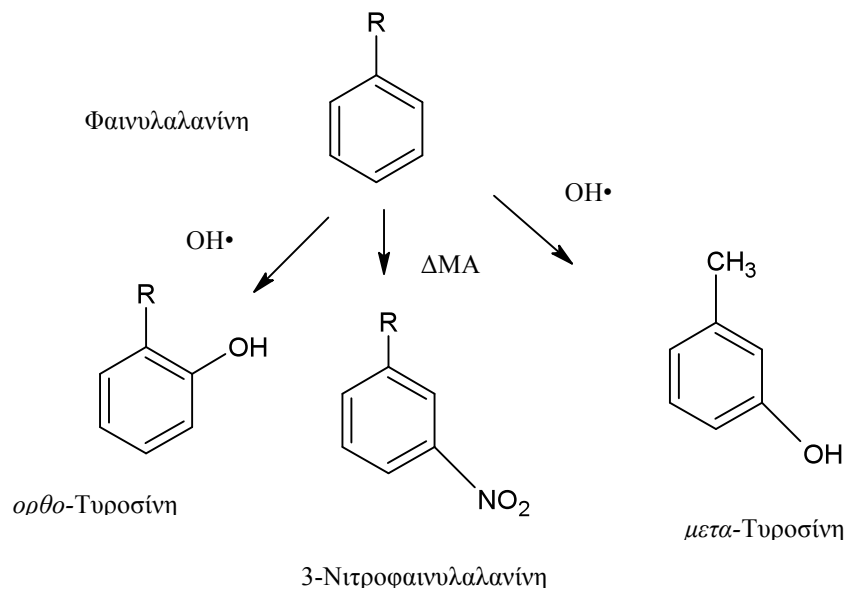
Οι ελεύθερες ρίζες όμως είναι συνήθως πολύ δραστικά μόρια που μπορούν να αντιδρούν και να προκαλούν βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια, όπως είναι το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Οι βλάβες στο DNA προκαλούνται κυρίως από τη ρίζα $\text{OH}\cdot$, η οποία όμως πρέπει να δημιουργηθεί κοντά στο DNA αφού έχει μικρή ικανότητα διάχυσης μέσα στο κύτταρο. Η ρίζα αυτή μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό διαφόρων προϊόντων αφού μπορεί να αντιδράσει και με τη δεοξυριβόζη του DNA αλλά και με τις αζωτούχες βάσεις (πουρίνες και πυριμιδίνες). Για παράδειγμα, η $\text{OH}\cdot$ μπορεί να προστεθεί στη βάση του DNA γουανίνη, στις θέσεις 4, 5 ή 8 του πουρινικού δακτυλίου. Η προσθήκη $\text{OH}\cdot$ στη θέση C8 οδηγεί στο σχηματισμό της 8-υδροξυγουανίνης (Σχήμα 1.1), ο προσδιορισμός της οποίας χρησιμοποιείται ως δείκτης για την πρόκληση βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες (Breen και Murphy 1995). Επιπλέον, οι ΔΜΟ προκαλούν συνήθως στο DNA μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις.

Οι ΔΜΟ/ΔΜΑ μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στις πρωτεΐνες με άμεση επίδραση. Για παράδειγμα, αντίδραση ΔΜΑ με την τυροσίνη και τη φαινυλαλανίνη οδηγεί στο σχηματισμό νιτροσυλιωμένων προϊόντων (Σχήμα 1.2). Επιπλέον, επίδραση της $\text{OH}\cdot$ στις πρωτεΐνες προκαλεί το σχηματισμό διαφόρων προϊόντων (Σχήμα 1.2). Επίσης, αρκετές ΔΜΟ όταν αντιδρούν με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών (ιδιαίτερα την ιστιδίνη, την αργινίνη, τη λυσίνη και την προλίνη) παράγουν προϊόντα με καρβονυλομάδες, οι οποίες μπορούν να προσδιοριστούν μετά από αντίδραση με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH). Οι $-\text{SH}$ ομάδες της κυστεΐνης οξειδώνονται σε θειολικές ρίζες ($\text{RS}\cdot$) μετά από την επίδραση ΔΜΟ/ΔΜΑ και με άμεση αντίδραση με ιόντα μεταβατικών μετάλλων (αντίδραση 1.13).





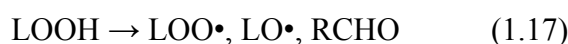
Σχήμα 1.1 Σχηματισμός της 8-υδροξυγουανίνης. Προσθήκη μιας $\text{OH}\cdot$ στον C8 της γουανίνης οδηγεί στο σχηματισμό της ρίζας της 8-υδροξυγουανίνης, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε 8-υδροξυγουανίνη.



Σχήμα 1.2 Προϊόντα που σχηματίζονται μετά την επίδραση ΔMO και ΔMA στα αμινοξέα τυροσίνη και φαινυλαλανίνη. DOPA: Δυδροξυφαινυλαλανίνη.

Επιπρόσθετα, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν ‘δευτερογενείς βλάβες’ στις πρωτεΐνες και μέσω των τελικών προϊόντων της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, όπως η μαλονδιαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυ-2-τρανσ-νονενάλη (HNE) (Halliwell και Gutteridge 1998).

Η πιο ευαίσθητη κατηγορία βιολογικών μακρομορίων στην προσβολή από ελεύθερες ρίζες θεωρούνται τα λιπίδια (Halliwell και Gutteridge 1984). Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) που εύκολα μπορούν να οξειδωθούν από ελεύθερες ρίζες. Η λιπιδιακή υπεροξειδωση μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες επειδή μετά την αρχική οξείδωση ακολουθεί μια αυτο-αναπαραγόμενη αλυσίδα αντιδράσεων από λιπιδιακές υπεροξειδώσεις (Mylonas και Kouretas 1999). Η λιπιδιακή υπεροξειδωση ξεκινάει με την οξείδωση ενός λιπαρού οξέος (LH) από μια ρίζα (R•) με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας λιπιδιακής ρίζας (L•) (αντίδραση 1.14). Η λιπιδιακή ρίζα μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο (O₂) και να σχηματιστεί μια ρίζα περοξυλίου (LOO•) (αντίδραση 1.15). Οι ρίζες περοξυλίου προκαλούν μια αλυσίδα αντιδράσεων κατά τις οποίες μπορούν να οξειδωθούν περισσότερα μόρια PUFA και να σχηματιστούν λιπιδιακά υπεροξειδία (LOOH) (αντίδραση 1.16) που μπορούν να διασπαστούν σε πιο δραστικά μόρια, ιδιαίτερα σε αλδεϋδες (RCHO) (αντίδραση 1.17).



Η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο για τον προσδιορισμό της λιπιδιακής υπεροξειδωσης είναι το τεστ του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA τεστ), που

στηρίζεται στην αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος κυρίως με τη μαλονδιαλδεϋδη (MDA), ένα από τα προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων.

Όταν η παραγωγή των ελευθέρων ριζών δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που διαθέτουν οι οργανισμοί για την εξουδετέρωσή τους, τότε προκαλείται το ονομαζόμενο ‘οξειδωτικό στρες’ (Sies 1991). Το ‘οξειδωτικό στρες’ μπορεί να προκληθεί από δύο κυρίως αιτίες:

1. Από ελάττωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Για παράδειγμα, πολλές ξеноβιοτικές ουσίες όταν μεταβολίζονται συνδέονται με GSH. Έτσι μεγάλη συγκέντρωση μιας ξеноβιοτικής ουσίας μπορεί να προκαλέσει έλλειψη GSH και κατά συνέπεια ‘οξειδωτικό στρες’ αν και η ίδια η ξеноβιοτική ουσία μπορεί να μην ανήκει στις ΔΜΟ/ΔΜΑ.
2. Από αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ/ΔΜΑ, όταν για παράδειγμα ο οργανισμός εκτεθεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών ή σε ουσίες που όταν μεταβολίζονται δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Επίσης, αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ/ΔΜΑ συμβαίνει όταν υπάρχει υπερβολική ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, όπως σε ασθένειες στις οποίες προκαλούνται χρόνιες φλεγμονές (π.χ. στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και στο κολικό έλκος).

Λόγω των σημαντικών βλαβών που μπορεί να προκαλέσει το ‘οξειδωτικό στρες’ στα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε ιστούς και όργανα, θεωρείται ως ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες για περισσότερες από 100 ασθένειες του ανθρώπου (Thomas και Kalyanaraman 1998). Για παράδειγμα, πιστεύεται ότι οι ΔΜΟ/ΔΜΑ εμπλέκονται στις ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος, στον καρκίνο (Wiseman και συν., 1995), σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) (McCord 1993), καθώς επίσης πιστεύεται ότι επιταχύνουν τη διαδικασία της γήρανσης (Finkel και Holbrook 2000) και ότι παίζουν σημαντικό

ρόλο στη πρόκληση φλεγμονών (Halliwell και Gutteridge 1998). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι σε αρκετές ασθένειες οι ΔΜΟ παράγονται ως αποτέλεσμα της παθολογίας της ασθένειας και δεν αποτελούν την πρωταρχική αιτία πρόκλησής της.

1.3 Βιολογικές ιδιότητες σταφυλιών (κρασιού)

Η άμπελος είναι ένα από τα φυτά του οποίου ο καρπός (τα σταφύλια) και το κύριο προϊόν του (το κρασί) παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae*, με σημαντικότερο είδος το *Vitis vinifera* από το οποίο προέρχεται και το 90% της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών (Soleas και συν., 1997). Το *Vitis vinifera* πιστεύεται ότι είναι ένα από τα πρώτα φυτά που άρχισε να καλλιεργεί ο άνθρωπος και υπάρχουν ιστορικές αποδείξεις που δείχνουν ότι η συστηματική καλλιέργειά του ξεκίνησε πριν από περίπου 6.000 χρόνια (Soleas και συν., 1997). Από την αρχαιότητα ακόμα τα σταφύλια και το κρασί είχαν χρησιμοποιηθεί σε κοινωνικο-θρησκευτικές εκδηλώσεις καθώς και για θεραπευτικούς σκοπούς. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στις βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών και του κρασιού κυρίως ύστερα από μία έρευνα (Renaud και de Lorgeril 1992) που πρότεινε ως εξήγηση στο λεγόμενο ‘γαλλικό παράδοξο’ την κατανάλωση κρασιού. ‘Γαλλικό παράδοξο’ έχει ονομαστεί η παρατήρηση ότι στη Γαλλία υπάρχουν μικρότερα ποσοστά καρδιακών παθήσεων σε σύγκριση με άλλες ανεπτυγμένες χώρες, αν και η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά, το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης καθώς και οι τιμές άλλων δεικτών υψηλού κινδύνου για καρδιοπάθειες δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στη Γαλλία και στις άλλες χώρες. Η προστασία των σταφυλιών και του κρασιού έναντι των καρδιακών παθήσεων πιστεύεται ότι οφείλεται στην αντι-αθηρωματική δράση τους βελτιώνοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου (Chou και συν., 2001), αυξάνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και προστατεύοντας έτσι από οξείδωση τη λιποπρωτεΐνη

χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Day και συν., 1997), και ελαττώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Keenil και συν., 2000). Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού ίσως συνδέεται με προστασία από κάποιες μορφές καρκίνου (Boffetta και Garfinkel 1990; Renaud και συν., 1998). Επίσης, εκχυλίσματα από σπέρματα σταφυλιών ανέστειλαν σε *in vivo* πειράματα την ανάπτυξη μοσχεύματος από ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη (Singh και συν., 2004), ενώ *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα από σταφύλια παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα έναντι ανθρώπινων κυτταροκαλλιιεργειών από καρκινικά κύτταρα του μαστού, του προστάτη, του εντέρου και του πνεύμονα ενώ ενίσχυσαν την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων (Agarwal και συν., 2000α; Agarwal και συν., 2000β; Ye και συν., 1999; Bagchi και συν., 2002). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την αντικαρκινική δράση των σταφυλιών και του κρασιού όπως η διακοπή της κυτταρικής αύξησης μέσω τροποποίησης βιοχημικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο καθώς και της δράσης διαφόρων κινασών, η επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης (Agarwal και συν., 2000β; Bagchi και συν., 2002), η αναστολή των κυκλοοξυγενασών (COX-1 και COX-2) (Waffo-Teguo και συν., 2001) και η αναστολή της αγγειογένεσης (Singh και συν., 2004). Ωστόσο, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων των σταφυλιών δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί και η μελέτη τους θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική (De Flora και συν., 2001). Άλλες βιολογικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών είναι αντιοξειδωτικές (Bagchi και συν., 2000), αντιμικροβιακές (Weisse και συν., 1995), δράση κατά του έλκους (Saito και συν., 1998) και αντιυπερτασικές (Soares De Moura και συν., 2002).

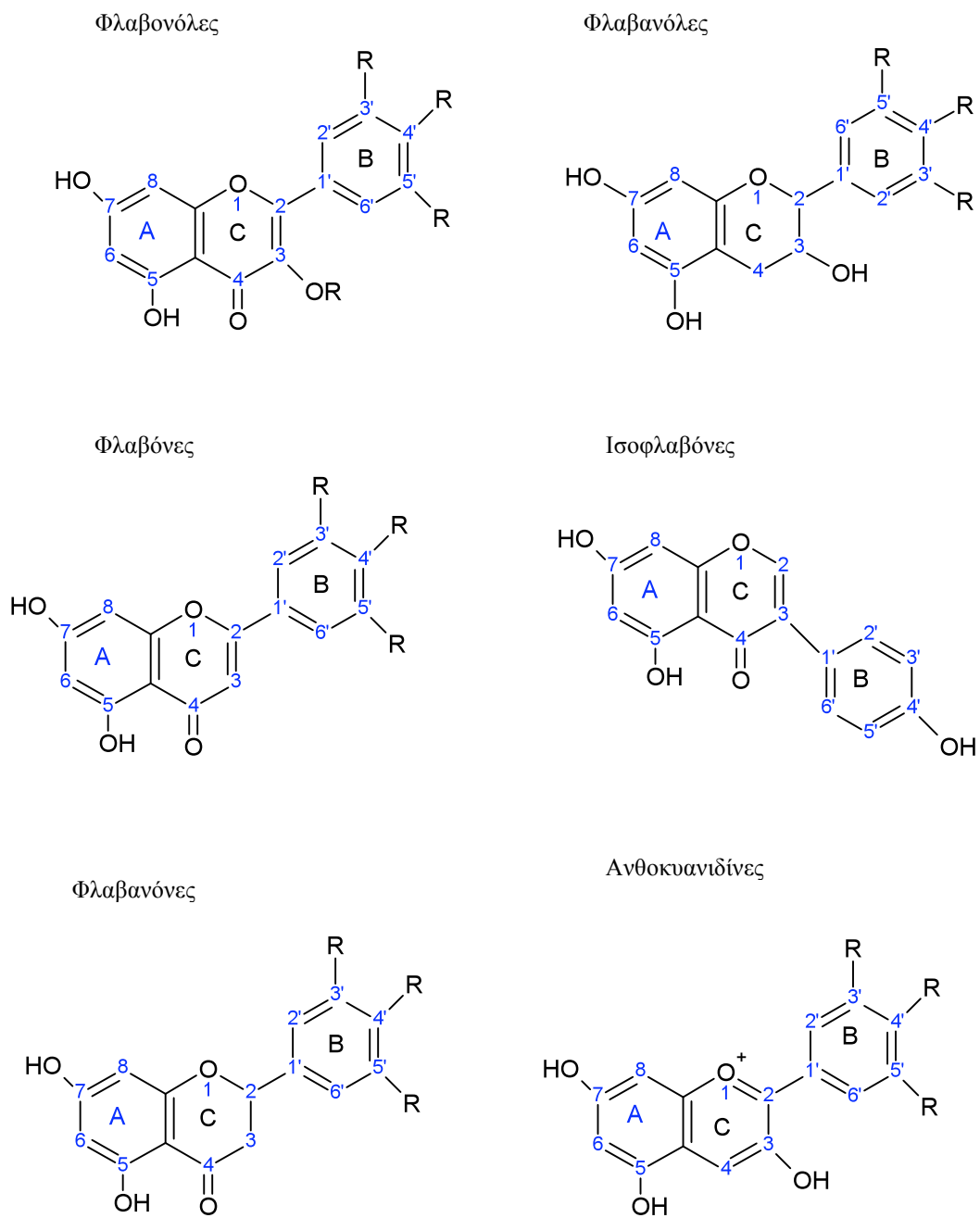
1.4 Χημική σύσταση σταφυλιών

Αν και τα τελευταία 30-40 χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη χημική σύσταση των σταφυλιών και του κρασιού, ωστόσο δεν είναι πλήρως γνωστή. Περισσότερες από 500 χημικές ουσίες έχουν αναγνωριστεί από τις οποίες οι 150 περίπου είναι εστέρες. Μεταξύ αυτών των ενώσεων περιλαμβάνονται το νερό (η συγκέντρωση του οποίου παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών), σάκχαρα (με κυριότερα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ενώ η σουκρόζη συναντάται σπανιότερα), οργανικά οξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 10^{-1} - 10^{-6} mg/lt ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση >100 mg/lt οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson 1993).

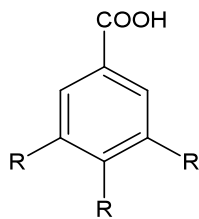
1.5 Φυτικές πολυφαινόλες

1.5.1 Χημική δομή φυτικών πολυφαινολών

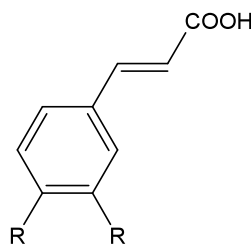
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες (Σχήματα 1.3 και 1.4) (Manach και συν., 2004).



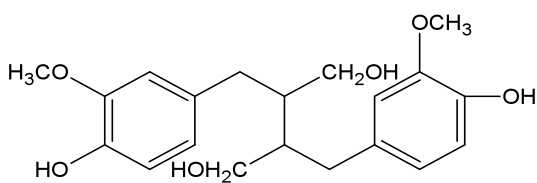
Σχήμα 1.3 Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.



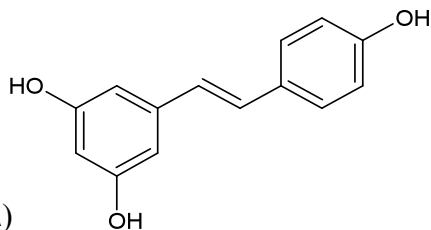
(A)



(B)



(Γ)



(Δ)

Σχήμα 1.4 Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών. (A) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (B) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι (Α και Β) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο, δηλαδή παρουσιάζουν τη δομή (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη) (Σχήμα 1.3). Τα φλαβονοειδή μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Σημαντική κατηγορία πολυμερών είναι οι προανθοκυανιδίνες ή προκυανιδίνες που προκύπτουν από πολυμερισμό των φλαβανολών με τους γαλλικούς εστέρες τους με δεσμούς μεταξύ του C4 και του C6 ή C8. Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσίδια (Lea και συν., 1979; Soleas και συν., 1997; Ferguson 2001; Cook και Samman 1996). Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach και συν., 2004). Οι φλαβόνες βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi και Naczki 1995). Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan και Clifford 2000). Τα

ισοφλαβονοειδή βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια, με τη σόγια και τα προϊόντα της να είναι οι κυριότερες πηγές. Χαρακτηριστικό των ισοφλαβονοειδών είναι ότι αν και δεν είναι στεροειδή, η δομή τους παρουσιάζει ομοιότητες με των οιστρογόνων, με αποτέλεσμα να μπορούν να συνδέονται με υποδοχείς οιστρογόνων και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα (Cassidy και συν., 2000). Οι φλαβανόλες, είτε ως μονομερή (κατεχίνες) είτε ως πολυμερή (προκυανιδίνες), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερούκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (π.χ. στο λάχανο, στα φασόλια, στη μελιτζάνα) αλλά είναι περισσότερο άφθονα στα φρούτα (Clifford 2000).

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκιναμικού οξέος (Σχήμα 1.4). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που

μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Clifford 1999). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Lempereur και συν., 1997). Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.

Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας (Σχήμα 1.4). Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli και συν., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση (Bhat και Pezzuto 2002). Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas και συν., 1997).

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες (Σχήμα 1.4). η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ άλλα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητές τους (Adlercreutz και Mazur 1997).

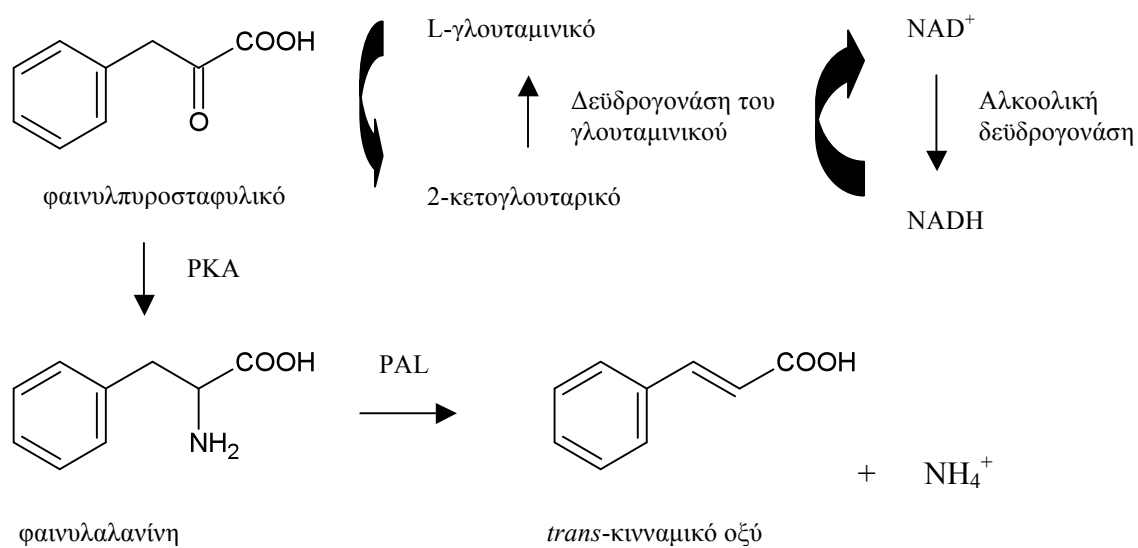
1.5.2 Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών

Το πρώτο στάδιο στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών περιλαμβάνει το σχηματισμό φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό και η οποία τελικά μετατρέπεται σε κινναμικό οξύ μέσω του σικιμικού μονοπατιού (Σχήμα 1.5). Στη συνέχεια από το κινναμικό οξύ παράγονται τα πολυφαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή μέσω του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλπροπανοειδή και του ειδικού μονοπατιού για τα φλαβονοειδή αντίστοιχα (Σχήμα 1.6) (Sakihama και συν., 2002; Robbins 2003).

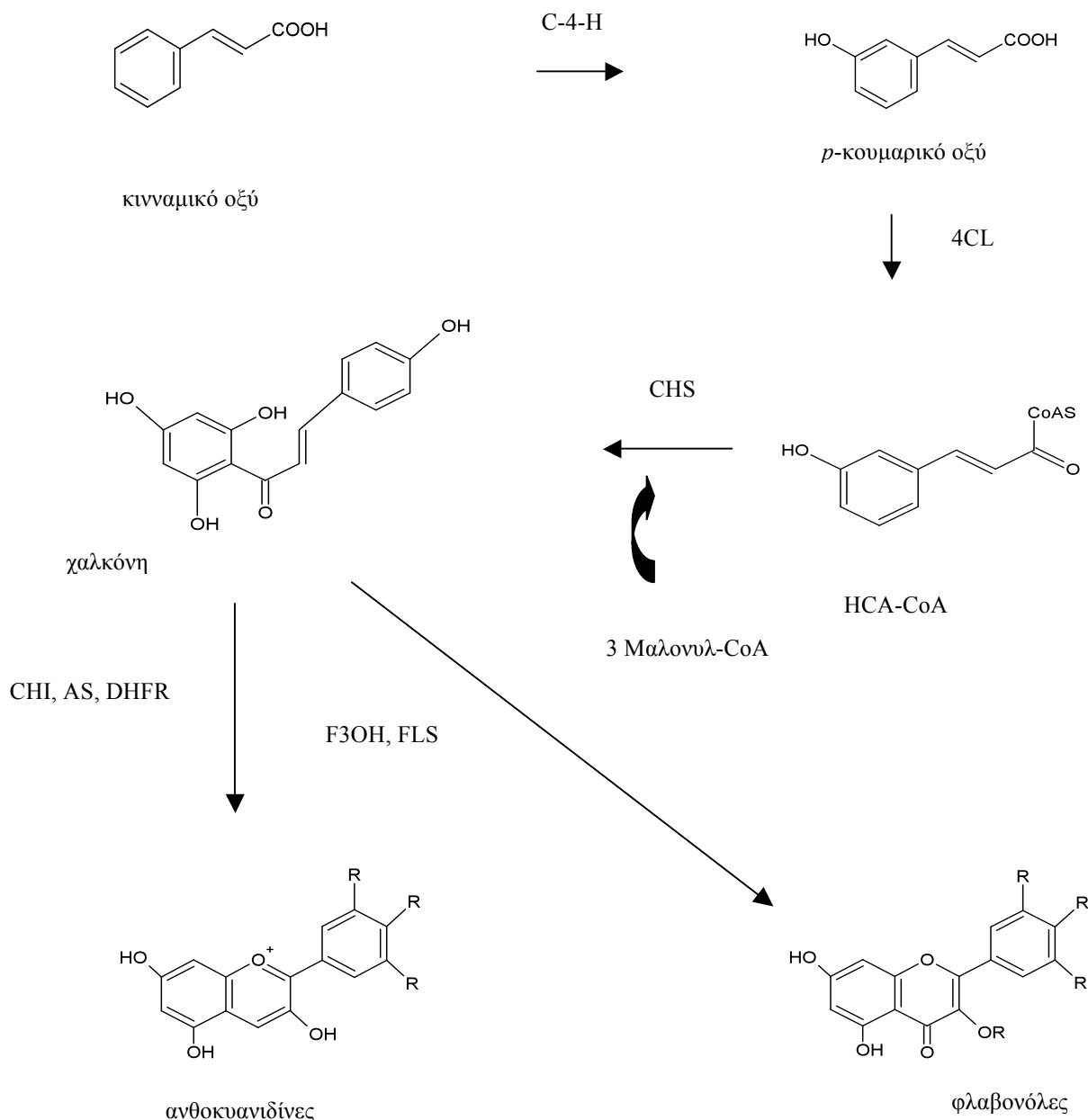
Η *trans*-ρεσβερατρόλη παράγεται από τη συμπύκνωση του *p*-κουμαρυλ-CoA (το οποίο είναι προϊόν του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλπροπανοειδή) με τρία μόρια μάλονυλ-CoA που καταλύεται από τη συνθετάση της ρεσβερατρόλης (Σχήμα 1.7) (Gorham, 1980).

1.5.3 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών

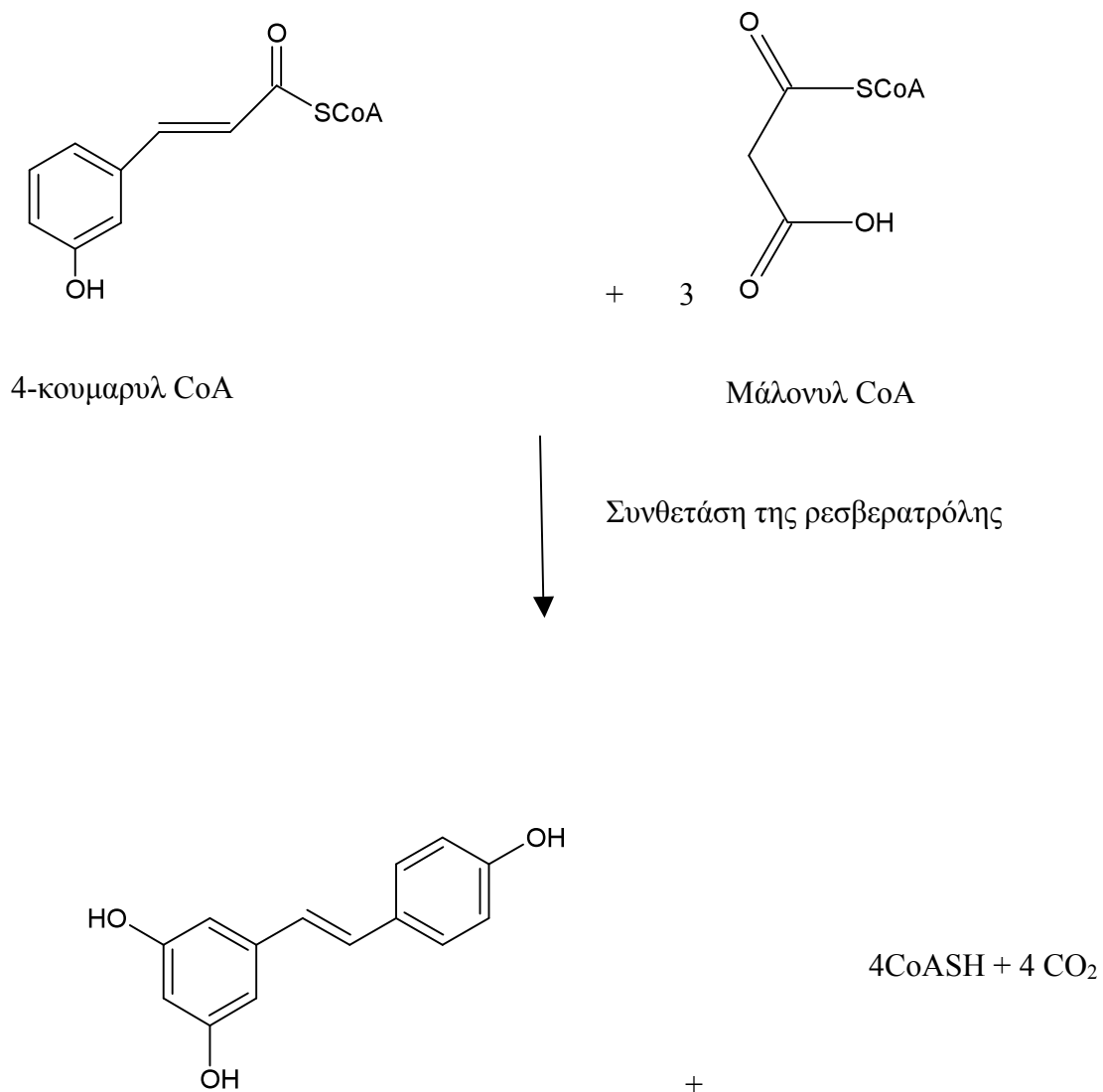
Για την κατανόηση των επιδράσεων των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται. Ίσως για παράδειγμα ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφώνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα. Πιστεύεται ότι η μέση πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που τρώνε καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1gr ανά ημέρα (Kuhnau 1976; Radtke και συν., 1998; Santos-Buelga και Scalbert 2000). Τα δύο τρίτα αυτής της ημερήσιας πρόσληψης πιστεύεται ότι είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο πολυφαινολικά οξέα (Scalbert και Williamson 2000). Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert και Williamson 2000). Οι αγλυκόνες (δηλαδή



Σχήμα 1.5 Βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Το φαινυλπυροσταφυλικό μετατρέπεται από την L-φαινυλαλανίνη-2-κετογλουταρική αμινοτρανσφεράση (PKA) παρουσία του L-γλουταμινικού σε φαινυλαλανίνη. Στη συνέχεια μέσω της λύσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL) η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε *trans*-κινναμικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση αμμωνιακών ιόντων (από Soleas και συν., 1997).



Σχήμα 1.6 Βιοσύνθεση των πολυφαινολών. Το κινναμικό οξύ υδρολύεται από την υδροξυλάση του 4-κινναμικού (C-4-H) σε *p*-κουμαρικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε *p*-κουμαρυλ-CoA (HCA-CoA) από την 4-CoA λιγάση (4CL), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πολυφαινολικών οξέων (γενικό μονοπάτι για τα φαινυλπροπανοειδή). Το HCA-CoA παρoυσία της συνθετάσης της χαλκόνης (CHS) συμπυκνώνεται με 3 μόρια μαλόνυλ-CoA και σχηματίζει τη χαλκόνη, η οποία μετατρέπεται σε διάφορα φλαβονοειδή όπως φλαβονόλες και ανθοκυανιδίνες (ειδικό μονοπάτι για τα φλαβονοειδή). CHI: ισομεράση της χαλκόνης, F3OH: υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης, AS: συνθετάση της ανθοκυανίνης, DHFR: ρεδοκτάση της δυϊδροφλαβονόλης, FLS: συνθετάση της φλαβονόλης (από Sakihama και συν., 2002).



Σχήμα 1.7 Βιοσύνθεση *trans*-ρεσβερατρόλης. Το *p*-κουμαρυλ-CoA αντιδρά με τρία μόρια μάλονυλ CoA. Η αντίδραση καταλύεται από τη συνθετάση της ρεσβερατρόλης

οι πολυφαινόλες που δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα) απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Όμως πολλές από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στις τροφές με τη μορφή γλυκοσιδίων ή πολυμερών είναι αρκετά υδρόφιλες για να απορροφηθούν με παθητική διάχυση από το έντερο και έτσι πρέπει να υδρολυθούν από ένζυμα του εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα πριν απορροφηθούν κυρίως από το παχύ έντερο (Hollman και Katan 1997). Όταν η υδρόλυση γίνεται από τα βακτήρια του εντέρου τότε συνήθως μειώνεται η απορρόφηση των πολυφαινολών γιατί οι αγλυκονικές μορφές που σχηματίζονται αποικοδομούνται περαιτέρω σε διάφορα αρωματικά οξέα (Scheline 1991). Επιπλέον, έχει προταθεί (Hollman και συν., 1995) ότι κάποια γλυκοσίδια μεταφέρονται στα εντεροκύτταρα από τη μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκόζης που εξαρτάται από νάτριο (SGLT1) και στη συνέχεια υδρολύονται από την κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση ή από την υδρολάση της φλοριζινικής λακτάσης (LPH). Οι ανθοκυανιδίνες πρέπει να απορροφώνται και να μεταβολίζονται με διαφορετικό μηχανισμό από τις άλλες πολυφαινόλες γιατί βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος με τις γλυκοσιδικές τους μορφές (Passamonti και συν., 2002). Οι πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών όπως οι προκυανιδίνες πιστεύεται ότι απορροφώνται σε μικρό βαθμό και ότι η όποια βιολογική δράση τους περιορίζεται στην περιοχή του εντέρου (Deprez και συν., 2001).

Διάφορες χημικές ομάδες, οι οποίες είναι κυρίως θειικές, μεθυλικές και γλυκουρονικές, προστίθενται στις πολυφαινόλες κατά την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ (οι κυριότεροι όμως μεταβολίτες των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος είναι τα γλυκουρονίδια) και η προσθήκη αυτών των ομάδων καταλύεται από θειοτρανσφεράσες, μεθυλτρανσφεράσες, και από γλυκουρονικές τρανσφεράσες αντίστοιχα (Manach και συν., 2004). Η προσθήκη αυτή συμβαίνει σε

όλες τις ξενοβιοτικές ουσίες με σκοπό να γίνουν περισσότερο υδρόφιλες και έτσι να περιοριστεί η τοξική δράση τους καθώς διευκολύνεται η απέκκριση τους είτε μέσω της χολής είτε με τα ούρα. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή ένα σημαντικό ποσοστό των γλυκουρονιδίων που σχηματίζονται στο βλεννογόνο του εντέρου εκκρίνεται πίσω στον εντερικό αυλό και έτσι μειώνεται η καθαρή απορρόφησή τους (Crespy και συν., 1999). Οι μεταβολίτες των πολυφαινόλων δεν βρίσκονται στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή αλλά συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με την αλβουμίνη (Boulton και συν., 1998). Η επίδραση της σύνδεσης των πολυφαινόλων με την αλβουμίνη στις βιολογικές τους δράσεις δεν είναι γνωστή, αν και μία μελέτη (Dangles και συν., 1999) έδειξε ότι η κερκετίνη (μία από τις πιο κοινές πολυφαινόλες) διατηρεί την αντιοξειδωτική της δράση μετά τη σύνδεσή της με την αλβουμίνη. Αν και μέχρι σήμερα οι μεταβολίτες λίγων πολυφαινόλων είναι γνωστοί, η αναγνώρισή τους είναι σημαντική γιατί μπορεί να έχουν διαφορετική δράση από τις αρχικές πολυφαινόλες.

Η συγκέντρωση των πολυφαινόλων στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής. Γενικά όμως τα επίπεδα των πολυφαινόλων στο πλάσμα κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nM έως και 10μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες μετά την κατανάλωση των τροφών (Bell και συν., 2000; Graefe και συν., 2001; Lee και συν., 1995; Rein και συν., 2000; Manach και συν., 2004). Μία μελέτη (Duthie και συν., 1998) έδειξε ότι μετά από κατανάλωση 100ml κόκκινου κρασιού (που περιέχει περίπου 500mg πολυφαινόλων), η συνολική ποσότητα των πολυφαινόλων στο πλάσμα ήταν 15μM. Ήταν όμως ενδιαφέρον ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης στο πλάσμα αντιστοιχούσε σε 50μM πολυφαινόλων, γεγονός που δείχνει ότι είχαν σχηματιστεί μη

γνωστοί μεταβολίτες που δεν υπολογίστηκαν στο συνολικό ποσό των πολυφαινολών και οι οποίοι όμως είχαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η διάρκεια ημιζωής των πολυφαινολών στο πλάσμα έχει υπολογιστεί από 2 έως 11 ώρες ανάλογα με τον τύπο της πολυφαινόλης, γεγονός που δείχνει ότι στο πλάσμα θα μπορούσαν να διατηρηθούν οι πολυφαινόλες σε σημαντικές συγκεντρώσεις μετά από τακτική κατανάλωση φυτικών τροφών (Cao και συν., 2001; Bell και συν., 2000; Graefe και συν., 2001). Η απέκκριση των πολυφαινολών γίνεται είτε μέσω της χολής (κυρίως των πολυμερισμένων μορφών) είτε με τα ούρα. Ένα ποσοστό των αγλυκονικών μορφών που αποβάλλεται με τη χολή μπορεί να επαναπορροφηθεί μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας (Coldham και Sauer 2000).

Ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα, λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα διάφορα όργανα και ιστούς. Μελέτες που έγιναν με πειραματόζωα δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς (π.χ. στη μήτρα, στον προστάτη, στο μαστό, στις ωθήκες) (Fritz και συν., 1998; Chang και συν., 2000; Wang και συν., 2002). Επιπλέον, μπορεί στο πλάσμα να υπερτερούν οι αγλυκονικές μορφές των πολυφαινολών και στους ιστούς οι γλυκοσιδικές ή το αντίστροφο ενώ μπορεί να εμφανίζονται στους ιστούς και διαφορετικοί μεταβολίτες λόγω του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού (Hong και συν., 2002; Maubach και συν., 2003).

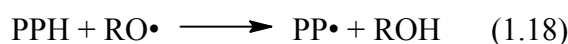
1.6 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών

Η μεγάλη εξάπλωση των πολυφαινολών στα φυτά οφείλεται στις πολλές και ποικίλες ιδιότητές τους. Οι φυτικές πολυφαινόλες προστατεύουν το φυτό από παθογόνους μικροοργανισμούς και από την υπεριώδη ακτινοβολία, προσδίδουν χρώμα στα άνθη και τους καρπούς και έτσι συμβάλλουν στη γονιμοποίηση των

φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach και συν., 2004; Di Carlo και συν., 1999; Harborne 1986).

1.6.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινολών που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση, δηλαδή η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ή να παρεμποδίζουν το σχηματισμό ΔΜΟ. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο (1.2.3) οι ΔΜΟ θεωρούνται αιτιολογικός παράγοντας για αρκετές ασθένειες. Οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες δρώντας οι υδροξυλομάδες τους ως δότες ατόμων υδρογόνου (ή ηλεκτρονίων) κατά την αντίδραση (1.18) (Ferguson 2001):



όπου $\text{RO}\cdot$ είναι μία ελεύθερη ρίζα οξυγόνου, PPH είναι μία πολυφαινόλη και $\text{PP}\cdot$ είναι μία πολυφαινολική ρίζα.

Συνήθως οι πολυφαινολικές ρίζες είναι σταθερές και δεν αντιδρούν με βιολογικά μακρομόρια ή μπορεί να αντιδρούν με άλλες ρίζες και να σχηματίζουν αδρανή προϊόντα (αντίδραση 1.19) (Ferguson 2001):



Επίσης, οι πολυφαινόλες έχουν χηλικές ιδιότητες, δηλαδή έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων και έτσι να αναστέλλουν τις αντιδράσεις Fenton

(αντίδραση 1.2, σ. 27) και Haber-Weiss (αντίδραση 1.1, σ. 27), οι οποίες πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο για την παραγωγή ελευθέρων ριζών στο εσωτερικό των κυττάρων (Ferguson 2001).

Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας, ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή (Rice-Evans και συν., 1996). Τα χαρακτηριστικά της δομής των πολυφαινολών που συμβάλλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική τους δράση πιστεύεται ότι είναι τα εξής:

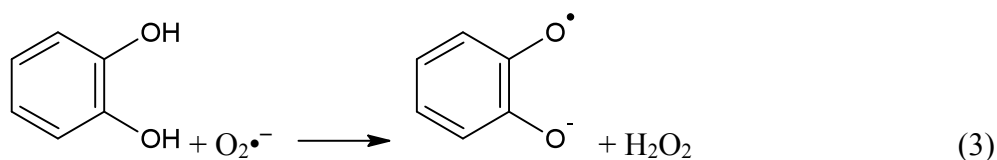
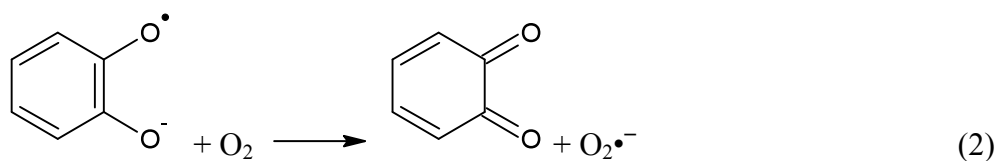
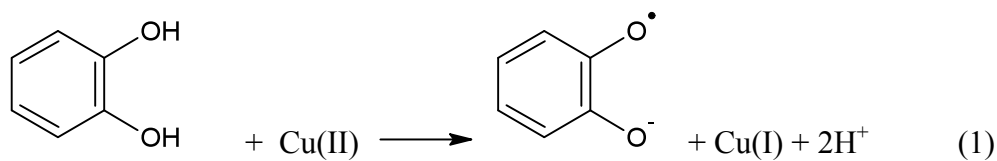
1. Η ύπαρξη δύο υδροξυλομάδων σε *ορθο* θέση (δηλαδή στις θέσεις 3',4') στο B δακτύλιο των φλαβονοειδών (η ονομαζόμενη κατεχολική δομή) θεωρείται καθοριστική για την εμφάνιση αντιοξειδωτική δράσης των φλαβονοειδών (Σχήμα 1.3). Πιστεύεται ότι όταν υπάρχει αυτή η δομή τα φλαβονοειδή είναι πιο αποτελεσματικοί δότες ατόμων υδρογόνου που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, λόγω αυτής της δομής μετά την απομάκρυνση των ατόμων υδρογόνου προκύπτει μία σχετικά σταθερή ρίζα *ορθο*-ημικινόνης λόγω ευκολότερης μετακίνησης των ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο της πολυφαινόλης (Rice-Evans και συν., 1996; Heim και συν., 2002). Επίσης, η ύπαρξη δύο υδροξυλομάδων στις θέσεις 3,4 είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική δράση των υδροξυβενζοϊκών και των υδροξυκιναμικών οξέων (Σχήμα 1.4).
2. Οι φλαβανόλες (Σχήμα 1.3) που έχουν τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις 3',4',5' του B δακτυλίου (πυρογαλλολική δομή) καθώς και τα πολυφαινολικά οξέα (Σχήμα 1.4) με παρόμοια δομή έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτές με κατεχολική δομή (Rice-Evans και συν., 1996).

3. Η ύπαρξη του 2,3 διπλού δεσμού στο C δακτύλιο των φλαβονοειδών (Σχήμα 1.3), με την προϋπόθεση ότι υπάρχει η κατεχολική δομή, αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση τους γιατί διευκολύνει τη μετατόπιση ηλεκτρονίων από το B δακτύλιο στον A με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται η ρίζα του αρυλοξυλίου που προκύπτει (Rice-Evans και συν., 1996).
4. Η 4-καρβονυλομάδα στο C δακτύλιο σε συνδυασμό με το 2,3 διπλό δεσμό του ίδιου δακτυλίου ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών (Σχήμα 1.3) (Heim και συν., 2002).
5. Η 3-OH στο C δακτύλιο σε συνδυασμό με το 2,3 διπλό δεσμό και την 4-καρβονυλομάδα του C δακτυλίου ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών (Σχήμα 1.3). Τα μόρια των φλαβονοειδών με μια 3-OH είναι επίπεδα, ενώ τα φλαβονοειδή που δεν έχουν αυτό το χαρακτηριστικό εμφανίζουν μια ελαφριά περιστροφή. Πιστεύεται ότι στα μόρια που είναι επίπεδα γίνεται ευκολότερα η μετατόπιση των ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο της πολυφαινόλης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η σταθερότητα της φαινολικής ρίζας που προκύπτει μετά την απομάκρυνση των ατόμων υδρογόνου (Van Acker και συν., 1996).
6. Η 5-OH και η 7-OH στον A δακτύλιο σε συνδυασμό με το 2,3 διπλό δεσμό και την 4-καρβονυλομάδα του C δακτυλίου ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών (Rice-Evans και συν., 1996). Γενικότερα, πιστεύεται ότι όσο περισσότερες είναι οι υδροξυλομάδες μιας πολυφαινόλης τόσο ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει (Heim και συν., 2002).
7. Στις πολυμερείς πολυφαινόλες (π.χ. προκυανιδίνες) φαίνεται ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός πολυμερισμού αυξάνεται η σταθερότητα της πολυφαινολικής ρίζας, και άρα τόσο ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει η πολυφαινόλη (Castillo και συν., 2000).

8. Τα φλαβονοειδή με υδροξυλομάδες στις θέσεις 3',4' και 5 καθώς και 4-καρβονυλομάδα παρουσιάζουν ισχυρές χηλικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό αναστέλλουν την αντίδραση Fenton (Cheng και Breen 2000).
9. Στα πολυφαινολικά οξέα (Σχήμα 1.4) η ύπαρξη μιας μεθυλενικής ομάδας (-CH₂-) ανάμεσα στην καρβοξυλική ομάδα και στον αρωματικό δακτύλιο ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση (Siquet και συν., 2006).

Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ, όπως είναι η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση (Robak και συν., 1988) και η οξειδάση της ξανθίνης (Chang και συν., 1993). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ΔΜΟ, όπως είναι η καταλάση, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Breinhold και συν., 1999). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να γίνεται με άμεση ή έμμεση επίδραση των πολυφαινολών στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element ή ARE) (Yu και συν., 1997). Το ARE βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους.

Οι φυτικές πολυφαινόλες εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li και Trush 1994; Rahman και συν., 1989). Η παραγωγή ΔΜΟ από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe³⁺ ή το Cu²⁺ σε Fe²⁺ και Cu¹⁺ αντίστοιχα (Yoshino και συν., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 1.2, σ.27) οδηγούν στο



Σχήμα 1.8 Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Η οξείδωση της πολυφαινόλης από το Cu(II) οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικινόνης (αντίδραση 1), η οποία μπορεί να αντιδράσει με O₂ και να σχηματίσει τη ρίζα του O₂^{•-} (αντίδραση 2). Η αντίδραση αυτή έχει αυτοκαταλυτικό χαρακτήρα, αφού το O₂^{•-} μπορεί να αντιδράσει με την αρχική πολυφαινόλη και να ξανασχηματιστεί η ημικινόνη και H₂O₂ (αντίδραση 3). H₂O₂ μπορεί να σχηματιστεί και από την αντίδραση του O₂^{•-} με H⁺ (αντίδραση 4). Τέλος ο Cu(I) μπορεί να αντιδράσει με το H₂O₂ μέσω της αντίδρασης Fenton και να οδηγήσει στην παραγωγή OH[•] (αντίδραση 5).

σχηματισμό $\text{OH}\cdot$. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αντίδραση των πολυφαινολών με το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} μπορεί να προκαλέσει μέσω μιας σειράς αντιδράσεων (Σχήμα 1.8) και το σχηματισμό H_2O_2 , το οποίο παίρνει μέρος στην αντίδραση Fenton (Sakihama και συν., 2002). Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino και συν., 1999) και άρα έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto και συν., 2003; Fukumoto και Mazza 2000).

1.6.2 Καρδιοπροστατευτική δράση

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog και συν., 1993; Knekt και συν., 1996). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτή η προστατευτική δράση όπως η αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Frankel 1993). Η οξείδωση της LDL θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας στα αγγεία. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι πολυφαινόλες μειώνουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και έτσι μειώνεται ο σχηματισμός θρόμβων (Tzeng και συν., 1991). Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τα ένζυμα κυκλοξυγενάση και λιποξυγενάση που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος από τα αιμοπετάλια (Alcaraz και Ferrandiz 1987). Το αραχιδονικό οξύ χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση προσταγλανδινών, ενδοπεροξειδίων και θρομβοξίνης A_2 που προκαλούν συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων.

1.6.3 Αντικαρκινική δράση

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να προσφέρουν προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt και συν., 2002), του στήθους (Dai και συν., 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (García-Closas και συν., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand και συν., 2000). Επίσης, *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστείλουν την καρκινογένεση σε πειραματόζωα (Kamei και συν., 1996; Caltagirone και συν., 2000), ενώ σε *in vitro* μελέτες οι πολυφαινόλες ανέστειλαν την ανάπτυξη καρκινικών κυτταροκαλλιιεργειών (Hirano και συν., 1994; Kuntz και συν., 1999). Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους ασκείται αυτή η αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών πιστεύεται ότι είναι η αναστολή των ενζύμων της φάσης I (π.χ. κάποια από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450) του μεταβολισμού ξενοβιοτικών ουσιών, τα οποία πιστεύεται ότι μετατρέπουν προκαρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες (Tsygion και συν., 1994; Le Marchand και συν., 2000). Ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες επάγουν τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών (π.χ. τη γλουταθειονο-S-τρανσφεράση, τη UDP-γλυκουρονυλ-τρανσφεράση) τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο τελικό στάδιο απομάκρυνσης των καρκινογόνων ουσιών (Bu-Abbas και συν., 1998). Επιπλέον, πιστεύεται ότι οι πολυφαινόλες δρουν ως αναστολείς ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όπως είναι η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) (Tanaka και συν., 1997), οι τοποϊσομεράσες I και II (Constantinou και συν., 1995) ή μετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως είναι η πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης (PTK) (Ferry και συν., 1996), και οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDKs) (Senderowicz 1999). Επιπροσθέτως, θεωρείται ότι η

αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών πρέπει να συμβάλλει σημαντικά στην αναστολή της καρκινογένεσης αφού οι ΔΜΟ μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο DNA και μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά (Ren και συν., 2003). Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Wang και συν., 1999; Iwashita και συν., 2000). Άλλοι προτεινόμενοι αντικαρκινικοί μηχανισμοί των πολυφαινολών είναι η επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης (Kim και συν., 2000), η φυτοοιστρογονική τους δράση (Gehm και συν., 1997) και η αναστολή της αγγειογένεσης (Paper 1998).

1.6.4 Άλλες βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών

Στις φυτικές πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, την προστασία έναντι των ασθενειών του καρδιαγγειακού συστήματος και του καρκίνου, έχουν αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες όπως προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans 1994), δράση κατά του έλκους (Alarcon και συν., 1994) αντιϊκές (Chu και συν., 1992) αντιαλλεργικές (Di Carlo και συν., 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia και συν., 1986), και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach και συν., 2004).

1.7 Σκοπός μελέτης

Η παρούσα μελέτη είχε ως αντικείμενο την εξέταση εκχυλισμάτων καθώς και φυτικών πολυφαινολών από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*) ως προς ορισμένες από τις βιολογικές τους ιδιότητες. Η χημική σύσταση των σταφυλιών επηρεάζεται σημαντικά από το έδαφος και τις κλιματικές συνθήκες κατά συνέπεια διαφορετικές ποικιλίες μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες και αντίστοιχες μελέτες στις ελληνικές ποικιλίες είναι περιορισμένες (Macheix και

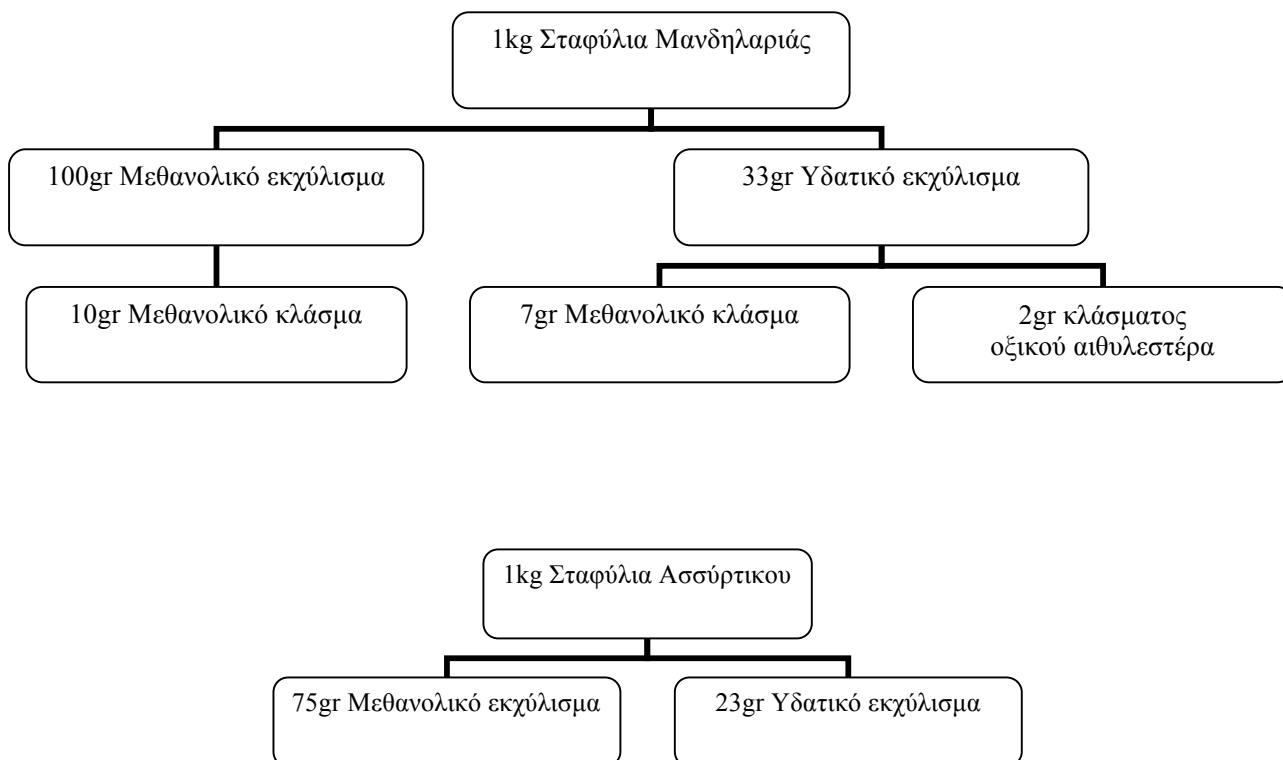
συν., 1990; Soleas και συν., 1997). Επιπλέον αν και είναι γνωστές αρκετές από τις βιολογικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων από σταφύλια και των συστατικών τους, οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλονται δεν είναι γνωστοί και η διερεύνησή τους θεωρείται σημαντική (De Flora και συν., 2001).

Εξετάστηκαν εκχυλίσματα, μεθανολικά και υδατικά, από τις ποικιλίες Ασύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια) και Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) (Σχήμα 1.9). Όπως έχει αναφερθεί οι σημαντικότερες ουσίες των σταφυλιών όσον αφορά τη βιολογική δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες. Γι' αυτό το λόγο εξετάστηκαν πολυφαινολικά κλάσματα από τα εκχυλίσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης. Συγκεκριμένα ένα μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα και δύο κλάσματα (ένα μεθανολικό και ένα οξικού αιθυλεστέρα) από το υδατικό εκχύλισμα. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων και των πολυφαινολικών κλασμάτων καθώς και ο καθορισμός της σύστασής τους έγινε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Σχήμα 1.10). Επίσης, εξετάστηκαν μονομερείς φυτικές πολυφαινόλες που ανιχνεύτηκαν στα παραπάνω εκχυλίσματα και κλάσματα. Στον Πίνακα 1.1 φαίνεται η πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων. Οι εξεταζόμενες πολυφαινόλες ήταν: το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, η κερκετίνη, η ρουτίνη, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και η ρεσβερατρόλη (Σχήματα 1.11 και 1.12). Το καφεϊκό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και η ρουτίνη δεν ανιχνεύτηκαν στα παραπάνω εκχυλίσματα αλλά έχουν βρεθεί σε άλλες ποικιλίες σταφυλιών (Soleas και συν., 1997). Οι εξής βιολογικές ιδιότητες μελετήθηκαν:

1. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH που βασίζεται στην ικανότητα των εξεταζόμενων ουσιών να εξουδετερώνουν τη ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH).
2. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών σε μεταλλάξεις που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι: i) επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τον οξειδωτικό παράγοντα μιτομυκίνη C, ii) πρόκληση μεταλλάξεων σε βακτηριακά κύτταρα (*S. typhimurium* TA102) από τις μεταλλαξιγόνες ουσίες μπλεομυκίνη και H₂O₂ και iii) αύξηση των SCEs από τη μεταλλαξιγόνο ουσία μιτομυκίνη C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.
3. Η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στην προκαλούμενη από το όζον οξείδωση της πρωτεΐνης SP-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα.
4. Η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση I.



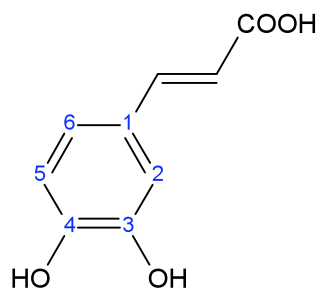
Σχήμα 1.9 Σταφύλια των ποικιλιών Μανδηλαριά Σαντορίνης (αριστερά) και Ασσύρτικο Σαντορίνης (δεξιά).



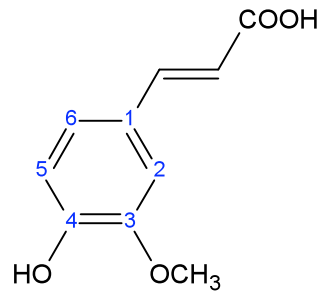
Σχήμα 1.10 Μετά την αφαίρεση του χυμού, ένα μέρος του στερεού υπολείμματος των σταφυλιών εκχυλίστηκε με μεθανόλη ενώ ένα άλλο με νερό. Στη συνέχεια οι διαλύτες εξατμίστηκαν υπό μειωμένη πίεση για να παραχθεί το ξηρό υπόλειμμα του μεθανολικού εκχυλίσματος και του υδατικού εκχυλίσματος αντίστοιχα. Ένα μέρος από το μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά υποβλήθηκε σε MPLC [RP-18 Si gel 60 Merck (20-40 μm)] (για την έκλουση χρησιμοποιήθηκε αρχικά νερό και στη συνέχεια μεθανόλη). Το μεθανολικό κλάσμα συλλέχτηκε και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό μειωμένη πίεση για να προκύψει το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα. Επίσης, ένα μέρος από το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά υποβλήθηκε σε MPLC [RP-18 Si gel 60 Merck (20-40 μm)] (για την έκλουση χρησιμοποιήθηκε αρχικά νερό και στη συνέχεια μεθανόλη). Το μεθανολικό κλάσμα συλλέχτηκε και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό μειωμένη πίεση για να προκύψει το μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα. Ένα μέρος από το μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος εκχυλίστηκε δύο φορές με διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα/νερού για να παραχθεί το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα του υδατικού εκχυλίσματος.

Πίνακας 1.1 Ποιοτική και ποσοτική σύσταση σε μονομερείς πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων από τις ποικιλίες Ασσύρτικο Σαντορίνης και Μανδηλαριά Σαντορίνης και των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης.

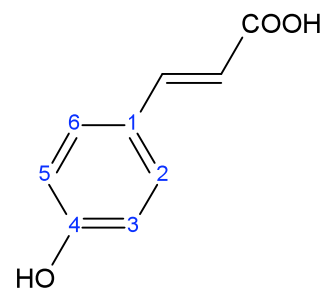
mg/g εκχυλίσματος	Ασσύρτικο Σαντορίνης		Μανδηλαριά Σαντορίνης		Υδατικό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα	Μεθανολικό εκχύλισμα
	Μεθανολικό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα	Μεθανολικό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα	Κλάσμα Οξικού αιθυλεστέρα	Κλάσμα Μεθανολικό	Κλάσμα Μεθανολικό
<i>Trans</i> -ρεσβερατρόλη	0.01	0.02	0.22	0.04	20.11	0.1	0.9
(+)-Κατεχίνη	2.25	4.09	0.9	0.35	55.38	0.9	2.72
(-)-Επικατεχίνη	1.08	2.10	1.1	0.32	87.35	0.9	4.32
Κερκετίνη	0.04	0.03	-	0.13	21.45	-	0.04
Γαλλικό οξύ	0.22	0.48	1.23	1.57	330.38	2.1	2.07
Φερουλικό οξύ	-	-	-	-	-	0.01	0.14
Σύνολο	3,6	6,72	3,45	2,41	516,47	4,01	10,19



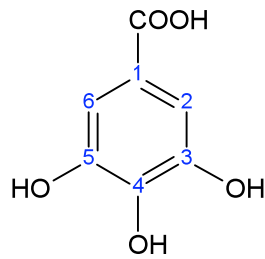
Καφεϊκό οξύ



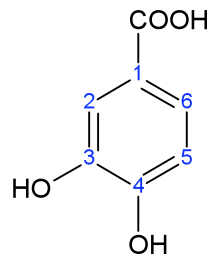
Φερουλικό οξύ



Κουμαρικό οξύ

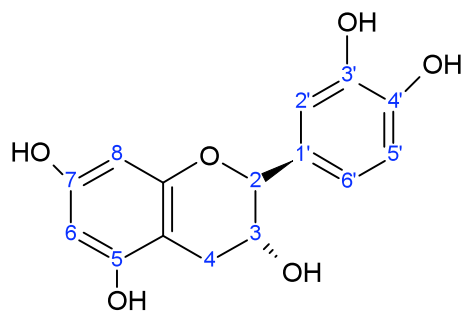


Γαλλικό οξύ

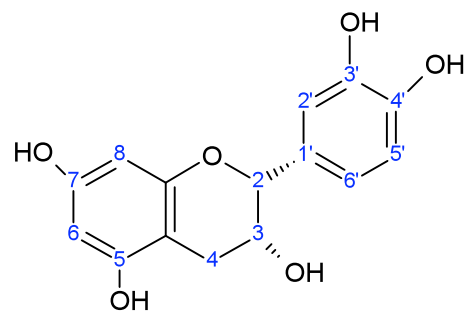


Πρωτοκατεχοϊκό οξύ

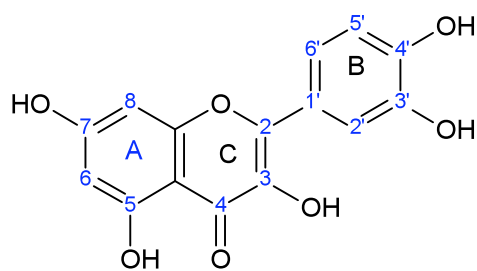
Σχήμα 1.11 Χημικές δομές εξεταζόμενων πολυφαινολικών οξέων. Το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ είναι υδροξυκινναμικά οξέα, ενώ το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ είναι υδροξυβενζοϊκά οξέα.



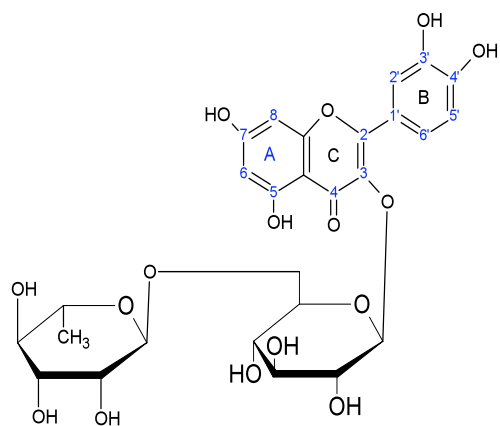
(+)-Κατεχίνη



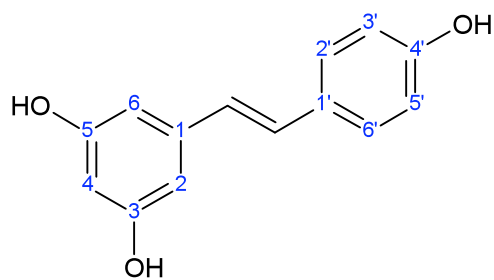
(-)-Επικατεχίνη



Κερκετίνη



Ρουτίνη



Ρεσβερατρόλη

Σχήμα 1.12 Χημικές δομές εξεταζόμενων φλαβονοειδών και ρεσβερατρόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ
(*VITIS VINIFERA*)**

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*VITIS VINIFERA*)

2.1 Γενικά

Η σημαντικότερη ιδιότητα των εκχυλισμάτων από σταφύλια, του κρασιού καθώς και των φυτικών πολυφαινολών που περιέχουν, θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση, δηλαδή η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και τις άλλες ΔΜΟ που παράγονται στους ζωντανούς οργανισμούς και που μπορούν να προκαλούν βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια οδηγώντας στην πρόκληση διαφόρων ασθενειών (Murthy και συν., 2002; De Beer και συν., 2003; Landrault και συν., 2001). Για παράδειγμα, η καρδιοπροστατευτική δράση του κρασιού αποδίδεται κυρίως στην ικανότητα των πολυφαινολών που περιέχει να παρεμποδίζουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Teissedre και συν., 2000). Η οξείδωση της LDL θεωρείται σημαντικός παράγοντας για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας στα αγγεία. Επιπλέον, στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται εν μέρει και η πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από σταφύλια. Έχει αναφερθεί ότι ένα πολυφαινολικό κλάσμα από σπέρματα σταφυλιών ανέστειλε την επαγόμενη από 7,12-διμεθυλοβενζοανθρακίνη (DMBA) καρκινογένεση σε επιδερμίδα ποντικών, και αυτή η δράση οφειλόταν πιθανώς στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών του κλάσματος (Zhao και συν., 1999). Επιπρόσθετα, εκχύλισμα από σπέρματα σταφυλιών πλούσιο σε προανθοκυανιδίνες ανέστειλε την κυτταροτοξικότητα σε κερατινοκύτταρα που προκαλούνταν από οξειδωτικούς παράγοντες (Bagchi και συν., 2000).

Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Activity) των αντιοξειδωτικών ουσιών χρησιμοποιούνται διάφορες

μέθοδοι. Δύο από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες μεθόδους βασίζονται στον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών να εξουδετερώνουν τις ρίζες 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ή DPPH (Brand-Williams και συν., 1995) και 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ ή ABTS^{•+} (Rice-Evans και συν., 1996). Σε αρκετές μελέτες η αντιοξειδωτική δράση που προκύπτει από τις παραπάνω μεθόδους συγκρίνεται με τη δράση του Trolox (η υδατοδιαλυτή μορφή της βιταμίνης E) και εκφράζεται σε μονάδες TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Ως TEAC ορίζεται η συγκέντρωση εκείνη του διαλύματος Trolox που έχει ίδια αντιοξειδωτική δράση με διάλυμα συγκέντρωσης 1mM της υπό εξέτασης ουσίας (Rice-Evans και συν., 1996). Επίσης, μια από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες μεθόδους για να εξεταστεί αν μια ουσία μπορεί να αναστείλει την οξείδωση των λιπιδίων είναι το τεστ του θειοβαρβιτουρικού οξέος ή (Thiobarbituric Acid test ή TBA test). Η οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών μπορεί να προκαλέσει σε αυτές διάφορες βλάβες ενώ η οξείδωση της LDL όπως αναφέρθηκε θεωρείται σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας για τις καρδιοπάθειες. Το TBA τεστ στηρίζεται στο ότι τα λιπίδια όταν οξειδωθούν από κάποιο οξειδωτικό παράγοντα (π.χ. FeCl₃) σχηματίζουν διάφορα προϊόντα, κυρίως μαλονδιαλδεΐδη (MDA). Τα προϊόντα αυτά κάτω από όξινες συνθήκες και με θέρμανση αντιδρούν με το TBA και σχηματίζουν ένα έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 532nm. Όταν μια ουσία αναστέλλει το σχηματισμό αυτού του προϊόντος θεωρείται ότι μπορεί να προστατεύει από οξείδωση τα λιπίδια. Στην παρούσα μελέτη για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων ουσιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του DPPH.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Υλικά

2.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια

Η χημική ουσία 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) ήταν από την εταιρεία Sigma (Η.Π.Α.). Τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).

2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.2.i Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH•

Η μέθοδος, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Σχήμα 2.1). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e⁻) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Σχήμα 2.1), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση.

Κατά τη μέθοδο αυτή, σε 950μl μεθανόλης ή διαλύματος των εξεταζόμενων ουσιών προστίθενται 50μl διαλύματος DPPH έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της ρίζας να είναι 100μM. Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Ενώ δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους 25⁰C για 20 λεπτά στο σκοτάδι (το DPPH είναι φωτοευαίσθητο) και γίνεται φασματοφωτομέτρηση στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του

1ml. Επίσης, ελέγχθηκε αν τα εκχυλίσματα και οι πολυφαινόλες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 517nm. Οι εξεταζόμενες ουσίες ήταν διαλυμένες σε μεθανόλη, εκτός από την κερκετίνη και τη ρεσβερατρόλη που διαλύθηκαν σε DMSO. Για να εξεταστεί αν το DMSO επηρεάζει την απορρόφηση, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιείχαν DPPH και DMSO. Σε κάθε πείραμα οι μετρήσεις γινότανε εις τριπλούν και έγιναν τουλάχιστον δύο πειράματα για την εξέταση κάθε ουσίας.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τον τύπο:

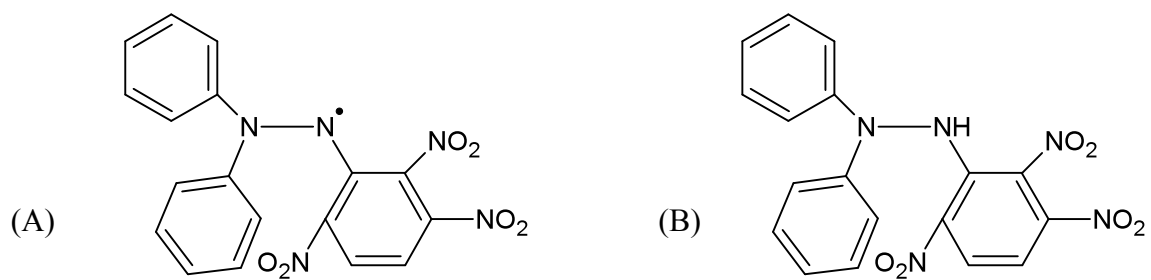
$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_8) / A_0 \times 100$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_8 : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

2.2.2.ii Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 517nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Επιπλέον, με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος Kinet προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%.



Σχήμα 2.1 (A) Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•). (B) Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1 Πρότυπη καμπύλη DPPH

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης DPPH κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις DPPH (5, 10, 20, 40 80 και 100μM) φωτομετρήθηκαν στα 517nm (Σχήμα 2.2). Επιλέχθηκαν τα 100μM γιατί η συγκέντρωση αυτή βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης και προκαλούσε μία ικανοποιητική αύξηση στην απορρόφηση.

2.3.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και των πολυφαινολικών κλασμάτων αμπέλου με τη μέθοδο του DPPH

Τα εκχυλίσματα και από τις δύο ποικιλίες αμπέλου μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 540nm σε συγκεντρώσεις 5-500μg/ml, γεγονός που δείχνει ότι μπορούσαν να εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,98, p < 0,01$; $r = -0,99, p < 0,01$ αντίστοιχα) τη ρίζα DPPH (Σχήματα 2.3-2.4 και Πίνακες 2.2-2.3) και οι τιμές του IC₅₀ ήταν αντίστοιχα 25 και 40μg/ml (Πίνακας 2.1). Επίσης, το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,97, p < 0,01$; $r = -0,99, p < 0,01$ αντίστοιχα) τη ρίζα DPPH (Σχήματα 2.5-2.6 και Πίνακες 2.4-2.5) και οι τιμές του IC₅₀ ήταν αντίστοιχα 35 και 52μg/ml αντίστοιχα (Πίνακας 2.1). Σύμφωνα με αυτές τις τιμές η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων ήταν: Μεθανολικό Μανδηλαριάς > Μεθανολικό Ασσύρτικου > Υδατικό Μανδηλαριάς > Υδατικό Ασσύρτικου.

Τα πολυφαινολικά κλάσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά εξουδετέρωσαν τη ρίζα DPPH σε συγκεντρώσεις 3-200μg/ml δείχνοντας αντιοξειδωτική δράση. Το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα και το μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό

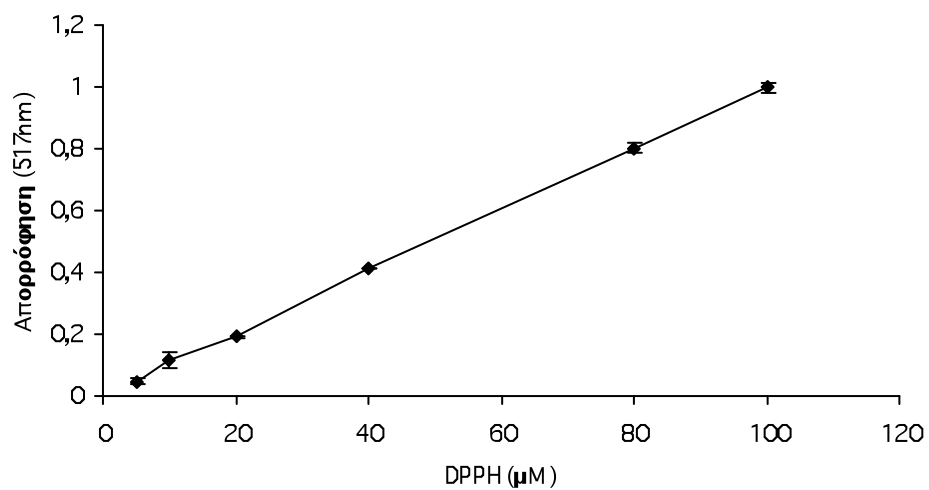
εκχύλισμα εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,97, p < 0,01$; $r = -0,96, p < 0,01$ αντίστοιχα) τη ρίζα DPPH (Σχήματα 2.7-2.8 και Πίνακες 2.6-2.7) και οι τιμές του IC_{50} ήταν αντίστοιχα 19 και 46 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 2.1). Το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα εξουδετέρωσε δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,94, p < 0,01$) τη ρίζα DPPH (Σχήμα 2.9 και Πίνακας 2.8) και η τιμή του IC_{50} ήταν 92 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 2.1). Η σειρά δραστηριότητάς τους ήταν: Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα > Κλάσμα μεθανολικό από το υδατικό εκχύλισμα > Κλάσμα μεθανολικό από το μεθανολικό εκχύλισμα.

2.3.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράση των φυτικών πολυφαινόλων με τη μέθοδο του DPPH

Οι φυτικές πολυφαινόλες, με εξαίρεση το κουμαρικό οξύ μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του DPPH στα 540nm σε συγκεντρώσεις 0,5-50 μM δείχνοντας αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, τα δύο υδροξυβενζοϊκά οξέα, το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,97, p < 0,01$; $r = -0,89, p < 0,01$ αντίστοιχα) τη ρίζα DPPH (Σχήματα 2.10-2.11 και Πίνακες 2.9-2.10 αντίστοιχα) και οι τιμές του IC_{50} ήταν αντίστοιχα 7 και 29 μM (Πίνακας 2.1).

Από τα υδροξυκιναμικά οξέα, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ, εξουδετέρωσαν δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,90, p < 0,01$; $r = -0,86, p < 0,01$ αντίστοιχα) τη ρίζα DPPH (Σχήματα 2.12-2.13 και Πίνακες 2.11-2.12). Η τιμή του IC_{50} για το καφεϊκό οξύ ήταν 11 μM (Πίνακας 2.1). Το φερουλικό οξύ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (50 μM) έδειξε 32% αναστολή. Σε αντίθεση το κουμαρικό οξύ, όπως αναφέρθηκε, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση (Σχήμα 2.14 και Πίνακας 2.13).

Από τα φλαβονοειδή, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η κερκετίνη και η ρουτίνη μείωσαν δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,96, p < 0,01$; $r = -0,97, p < 0,01$; $r = -0,96, p < 0,01$ και $r = -0,86, p < 0,01$ αντίστοιχα) την απορρόφηση του DPPH στα 540nm (Σχήματα 2.15-2.18 και Πίνακες 2.14-2.17) και οι τιμές του IC_{50} ήταν αντίστοιχα 14, 11, 12 και 21 μ M (Πίνακας 2.1). Η *trans*-ρεσβερατρόλη μείωσε δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,81, p < 0,01$) την απορρόφηση του DPPH στα 540nm, αλλά παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή μόνο στα 30 και 50 μ M κατά 15 και 25% αντίστοιχα (Σχήμα 2.19 και Πίνακας 2.18). Η σειρά δραστηριότητας των πολυφαινολών ήταν: γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ = κερκετίνη = (-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη > ρουτίνη > πρωτοκατεχοϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > *trans*-ρεσβερατρόλη > κουμαρικό οξύ.



Σχήμα 2.2 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης DPPH. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα εις τριπλούν (n=9).

Πίνακας 2.1 Τιμές IC₅₀ των εξεταζόμενων ουσιών. Το IC₅₀ δείχνει τη συγκέντρωση στην οποία οι εξεταζόμενες ουσίες προκαλούν αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας του DPPH κατά 50%.

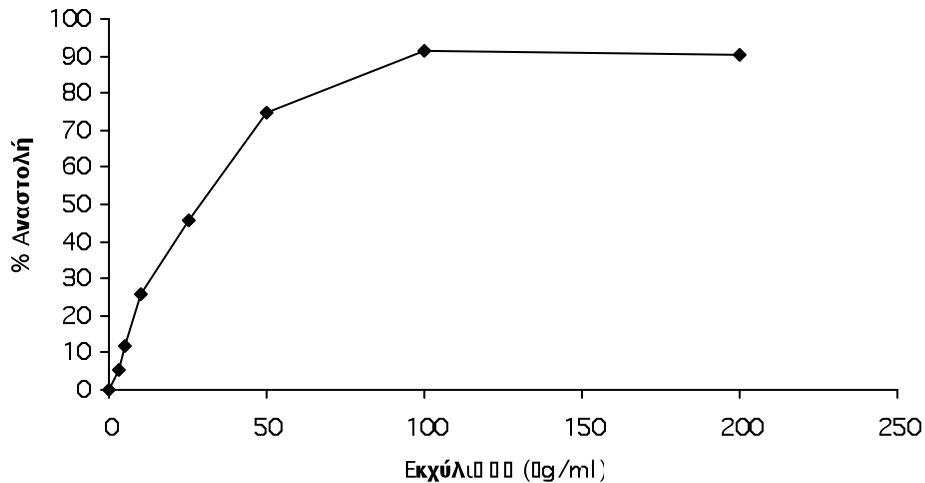
	IC ₅₀ ^a
Υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου	52±7 ^β
Μεθανολικό εκχύλισμα Ασσύρτικου	35±5 ^β
Υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς	40±6 ^β
Μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς	25±4 ^β
Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς	19±4 ^β
Κλάσμα μεθανολικό από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς	46±8 ^β
Κλάσμα μεθανολικό από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς	92±15 ^β
Καφεϊκό οξύ	11±2 ^γ
Φερουλικό οξύ	- ^δ
Κουμαρικό οξύ	- ^ε
Γαλλικό οξύ	7±1 ^γ
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	29±2 ^γ
(+)-Κατεχίνη	14±3 ^γ
(-)-Επικατεχίνη	11±2 ^γ
Κερκετίνη	12±4 ^γ
Ρουτίνη	21±1 ^γ
<i>Trans</i> -Ρεσβερατρόλη	- ^ζ

^aΟι τιμές εκφράζονται ως IC₅₀±SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). ^βΣτα εκχυλίσματα και τα κλάσματα οι μονάδες συγκέντρωσης του IC₅₀ είναι μg εκχυλίσματος ανά ml. ^γΣτις πολυφαινόλες οι μονάδες συγκέντρωσης του IC₅₀ είναι μM. ^δΣτη μεγαλύτερη συγκέντρωση (50μM) η αναστολή του φερουλικού οξέος ήταν 32%. ^εΤο κουμαρικό οξύ στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή. ^ζΣτη μεγαλύτερη συγκέντρωση (50μM) η αναστολή της *trans*-ρεσβερατρόλης ήταν 25%.

Πίνακας 2.2 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού εκχύλισματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,063±0,015
DPPH+Εκχύλισμα 3μg/ml	1,006±0,031
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,938±0,025*
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,791±0,025*
DPPH+Εκχύλισμα 30μg/ml	0,577±0,025*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,266±0,005*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,093±0,004*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,104±0,002*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

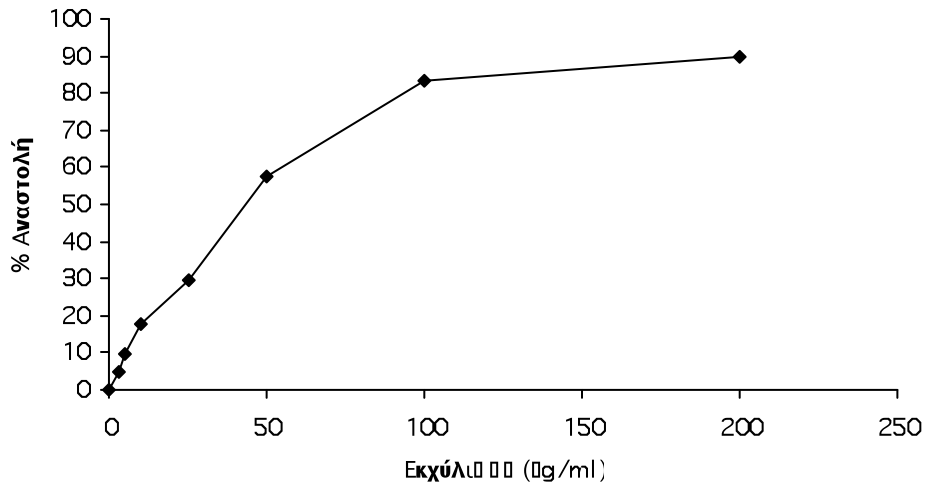


Σχήμα 2.3 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς.

Πίνακας 2.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,071±0,010
DPPH+Εκχύλισμα 3μg/ml	1,021±0,008*
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,965±0,014*
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,883±0,025*
DPPH+Εκχύλισμα 30μg/ml	0,754±0,024*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,456±0,050*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,178±0,014*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,108±0,008*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

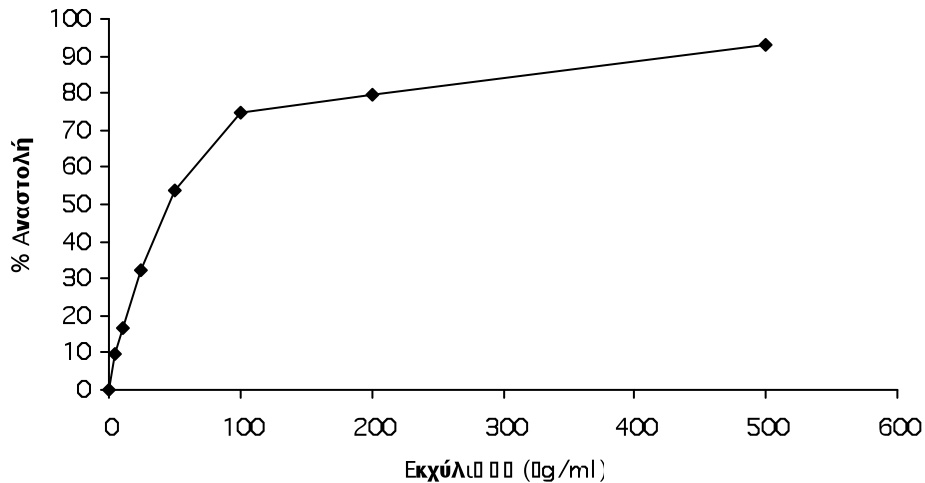


Σχήμα 2.4 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς.

Πίνακας 2.4 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,088±0,025
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,984±0,011*
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,908±0,009*
DPPH+Εκχύλισμα 25μg/ml	0,739±0,026*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,502±0,033*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,277±0,007*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,225±0,007*
DPPH+Εκχύλισμα 500μg/ml	0,076±0,007*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

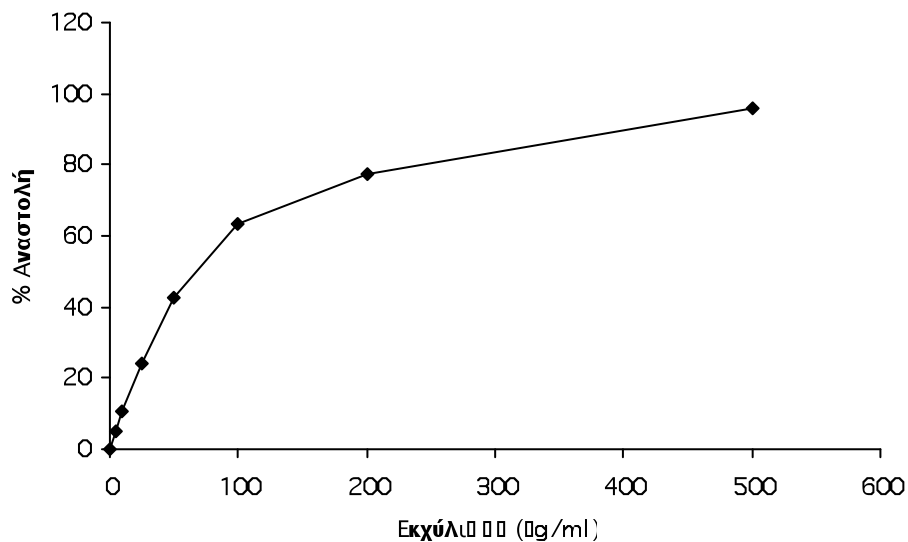


Σχήμα 2.5 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου.

Πίνακας 2.5 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,038±0,037
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,984±0,026
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,929±0,026*
DPPH+Εκχύλισμα 25μg/ml	0,789±0,030*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,598±0,047*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,379±0,011*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,234±0,004*
DPPH+Εκχύλισμα 500μg/ml	0,042±0,005*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

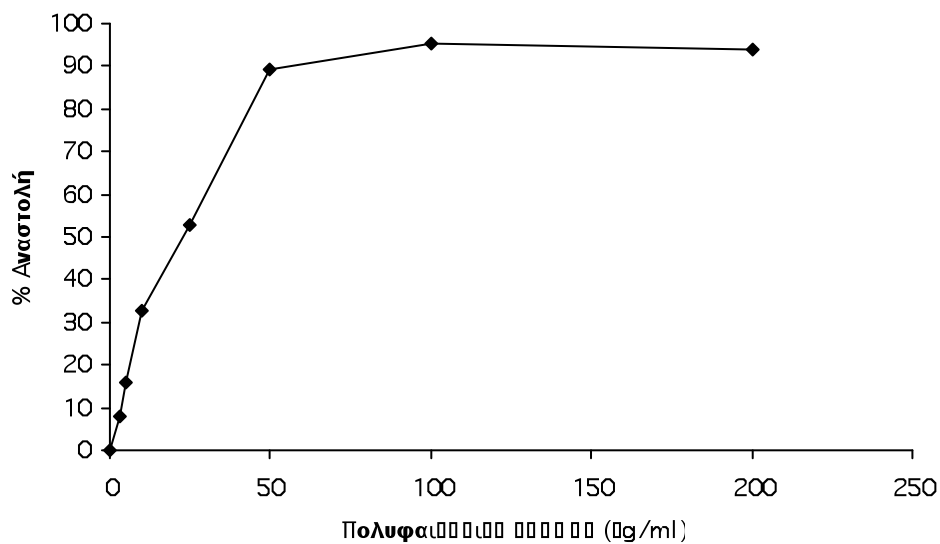


Σχήμα 2.6 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το υδατικό εκχύλισμα Ασσύρτικου.

Πίνακας 2.6 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	0,948±0,025
DPPH+Εκχύλισμα 3μg/ml	0,874±0,005
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,797±0,021*
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,640±0,011*
DPPH+Εκχύλισμα 30μg/ml	0,450±0,006*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,101±0,002*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,046±0,007*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,059±0,016*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

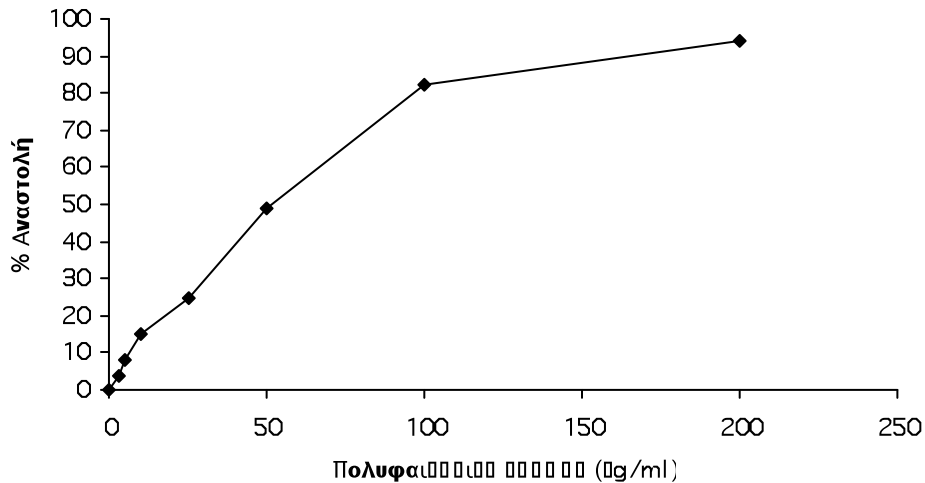


Σχήμα 2.7 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς.

Πίνακας 2.7 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,011±0,044
DPPH+Εκχύλισμα 3μg/ml	0,973±0,037
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,929±0,043
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,860±0,023*
DPPH+Εκχύλισμα 30μg/ml	0,761±0,022*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,515±0,027*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,181±0,008*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,059±0,002*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

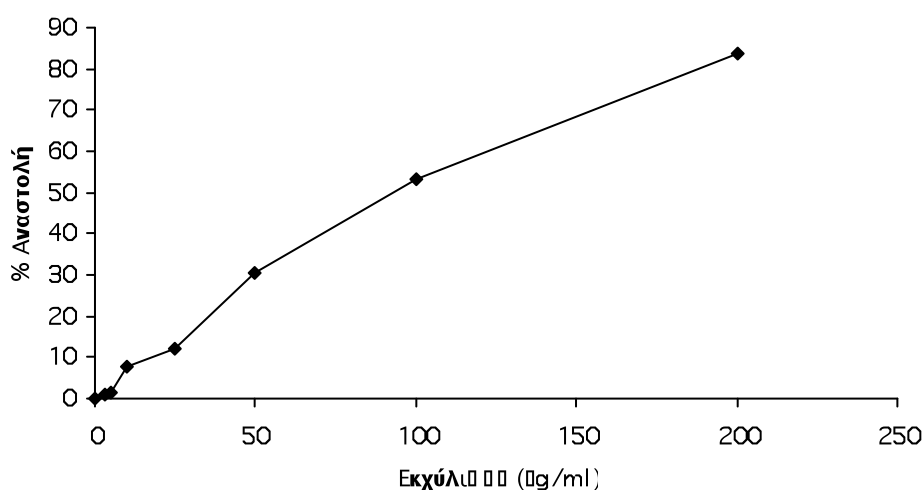


Σχήμα 2.8 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς.

Πίνακας 2.8 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) με τη μέθοδο του DPPH.

	Απορρόφηση _{517nm} ^α
DPPH ^β	1,010±0,004
DPPH+Εκχύλισμα 3μg/ml	1,000±0,025
DPPH+Εκχύλισμα 5μg/ml	0,996±0,047
DPPH+Εκχύλισμα 10μg/ml	0,934±0,036*
DPPH+Εκχύλισμα 30μg/ml	0,886±0,013*
DPPH+Εκχύλισμα 50μg/ml	0,701±0,028*
DPPH+Εκχύλισμα 100μg/ml	0,471±0,002*
DPPH+Εκχύλισμα 200μg/ml	0,167±0,010*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

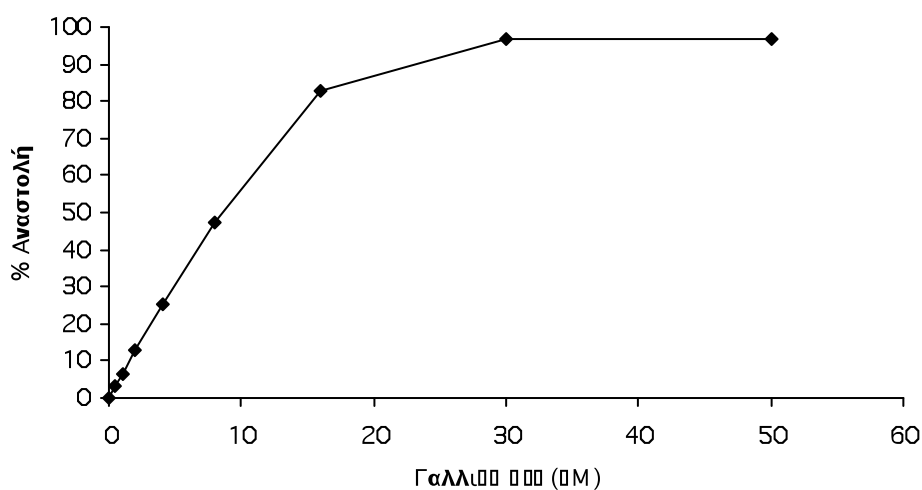


Σχήμα 2.9 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς.

Πίνακας 2.9 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	0,963±0,040
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 0,5μM	0,934±0,023
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 1μM	0,899±0,030
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 2μM	0,839±0,045*
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 4μM	0,719±0,029*
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 8μM	0,510±0,017*
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 16μM	0,164±0,022*
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 30μM	0,031±0,005*
DPPH+Γαλλικό οξύ οξύ 50μM	0,030±0,004*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

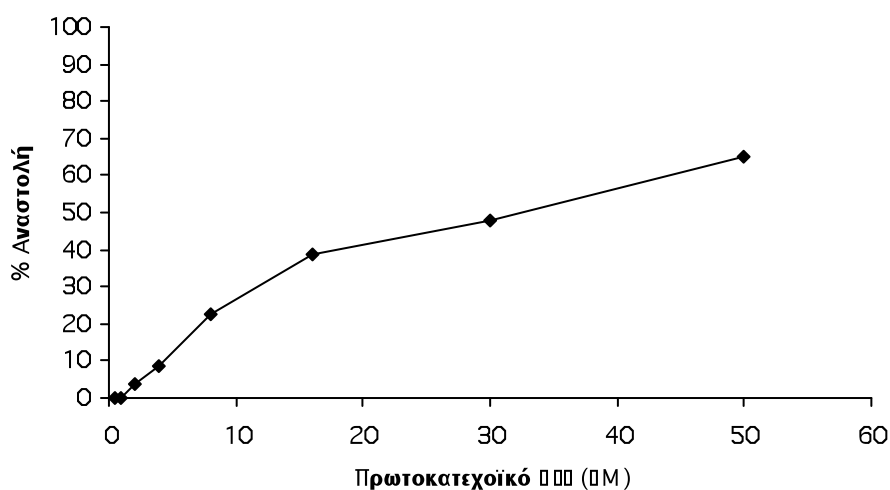


Σχήμα 2.10 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το γαλλικό οξύ.

Πίνακας 2.10 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του πρωτοκατεχοϊκού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	0,928±0,057
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 0,5μM	0,927±0,048
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 1μM	0,928±0,063
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 2μM	0,896±0,043
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 4μM	0,847±0,044
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 8μM	0,721±0,021*
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 16μM	0,568±0,016*
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 30μM	0,483±0,035*
DPPH+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 50μM	0,325±0,048*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

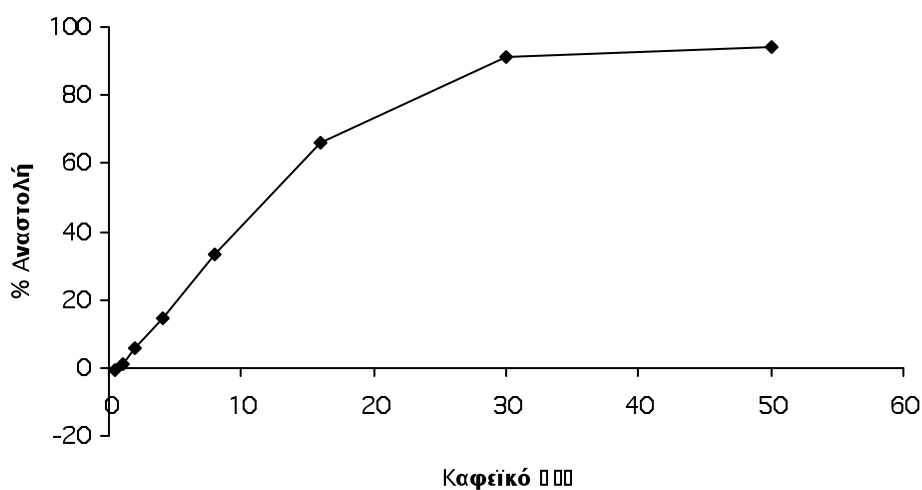


Σχήμα 2.11 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσης της από το πρωτοκατεχοϊκό οξύ.

Πίνακας 2.11 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.

	Απορρόφηση _{517nm} ^α
DPPH ^β	0,803±0,056
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 0,5μM	0,811±0,067
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 1μM	0,796±0,062
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 2μM	0,756±0,054
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 4μM	0,686±0,062
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 8μM	0,536±0,060*
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 16μM	0,272±0,012*
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 30μM	0,072±0,011*
DPPH+Καφεϊκό οξύ οξύ 50μM	0,046±0,007*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

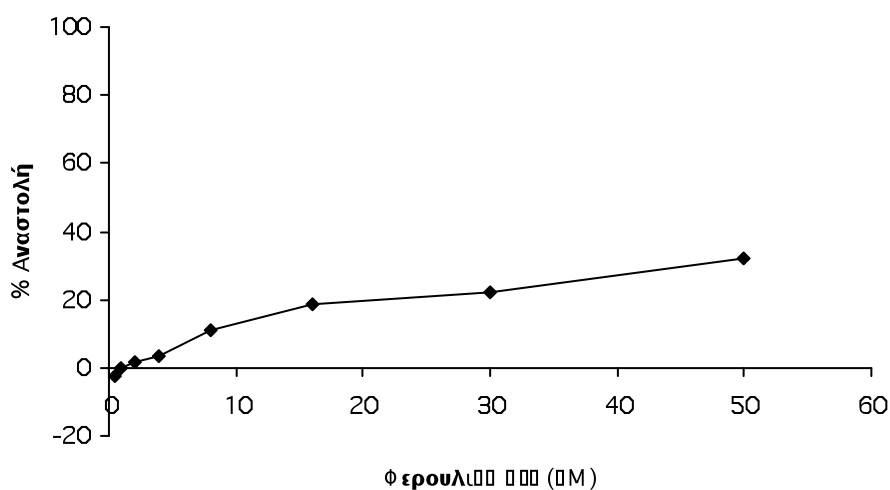


Σχήμα 2.12 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το καφεϊκό οξύ.

Πίνακας 2.12 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του φερουλικού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.

	Απορρόφηση _{517nm} ^α
DPPH ^β	1,193±0,040
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 0,5μM	1,219±0,016
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 1μM	1,193±0,020
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 2μM	1,176±0,029
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 4μM	1,152±0,056
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 8μM	1,061±0,064*
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 16μM	0,970±0,102*
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 30μM	0,929±0,087*
DPPH+Φερουλικό οξύ οξύ 50μM	0,813±0,131*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

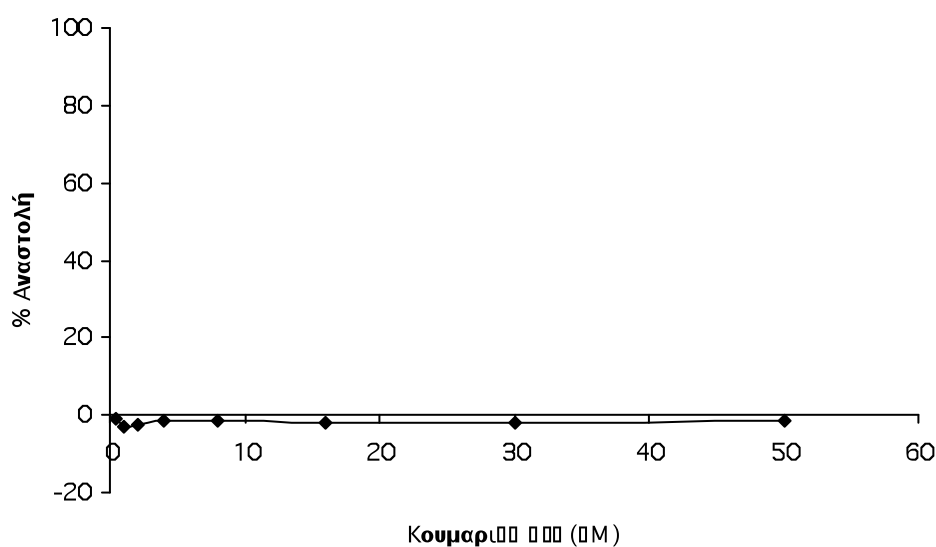


Σχήμα 2.13 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το φερουλικό οξύ.

Πίνακας 2.13 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του κουμαρικού οξέος με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,311±0,026
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 0,5μM	1,326±0,019
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 1μM	1,350±0,034
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 2μM	1,345±0,024
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 4μM	1,330±0,029
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 8μM	1,327±0,040
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 16μM	1,335±0,023
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 30μM	1,338±0,043
DPPH+Κουμαρικό οξύ οξύ οξύ 50μM	1,328±0,039

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

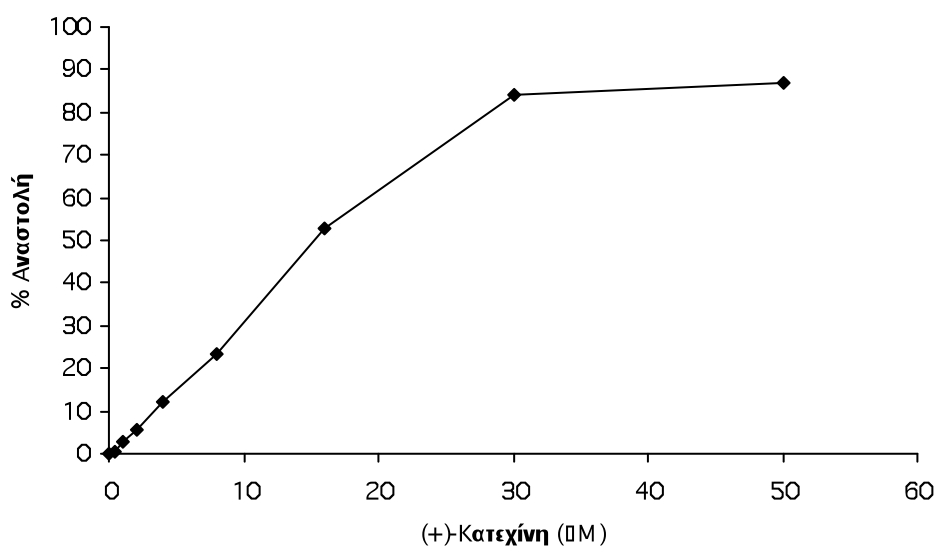


Σχήμα 2.14 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από το κουμαρικό οξύ.

Πίνακας 2.14 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της (+)-κατεχίνης με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,041±0,034
DPPH+Κατεχίνη 0,5μM	1,037±0,038
DPPH+Κατεχίνη 1μM	1,012±0,025
DPPH+Κατεχίνη 2μM	0,983±0,019*
DPPH+Κατεχίνη 4μM	0,917±0,023*
DPPH+Κατεχίνη 8μM	0,798±0,021*
DPPH+Κατεχίνη 16μM	0,490±0,049*
DPPH+Κατεχίνη 30μM	0,166±0,024*
DPPH+Κατεχίνη 50μM	0,135±0,016*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

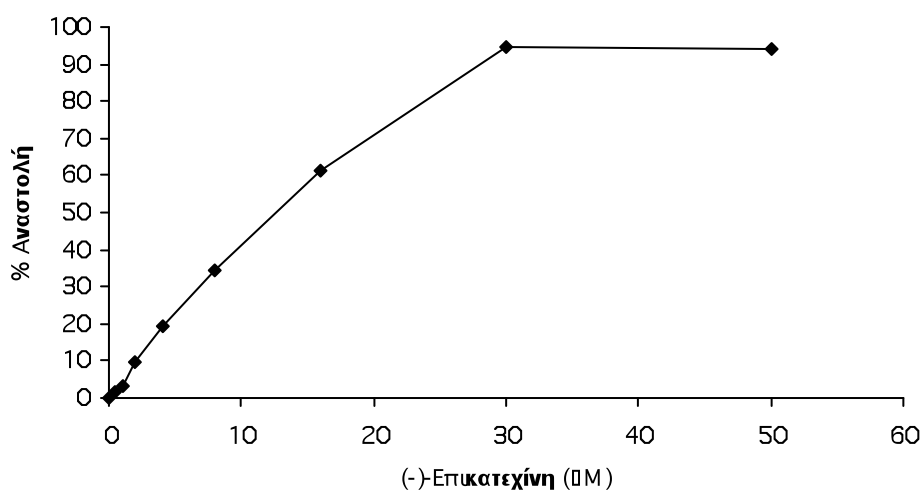


Σχήμα 2.15 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από την (+)-κατεχίνη.

Πίνακας 2.15 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της (-)-επικατεχίνης με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	0,866±0,026
DPPH+Επικατεχίνη 0,5μM	0,853±0,021
DPPH+Επικατεχίνη 1μM	0,838±0,019
DPPH+Επικατεχίνη 2μM	0,782±0,014*
DPPH+Επικατεχίνη 4μM	0,697±0,009*
DPPH+Επικατεχίνη 8μM	0,569±0,025*
DPPH+Επικατεχίνη 16μM	0,333±0,031*
DPPH+Επικατεχίνη 30μM	0,046±0,005*
DPPH+Επικατεχίνη 50μM	0,052±0,005*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

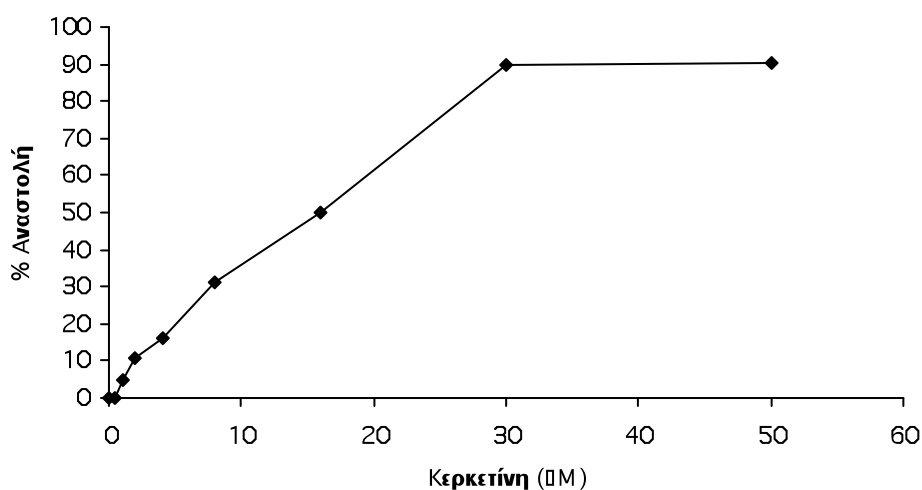


Σχήμα 2.16 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από την (-)-επικατεχίνη.

Πίνακας 2.16 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της κερκετίνης με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,295±0,058
DPPH+Κερκετίνη 0,5μM	1,294±0,038
DPPH+Κερκετίνη 1μM	1,230±0,032
DPPH+Κερκετίνη 2μM	1,156±0,098
DPPH+Κερκετίνη 4μM	1,084±0,057*
DPPH+Κερκετίνη 8μM	0,891±0,074*
DPPH+Κερκετίνη 16μM	0,648±0,031*
DPPH+Κερκετίνη 30μM	0,133±0,016*
DPPH+Κερκετίνη 50μM	0,123±0,012*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

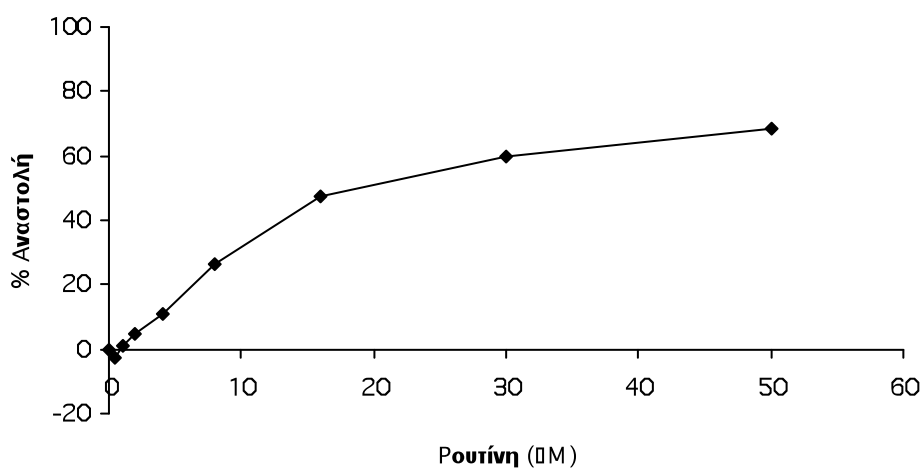


Σχήμα 2.17 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από την κερκετίνη.

Πίνακας 2.17 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της ρουτίνης με τη μέθοδο του DPPH.

	Απορρόφηση _{517nm} ^α
DPPH ^β	1,041±0,027
DPPH+Ρουτίνης οξύ 0,5μM	1,066±0,026
DPPH+Ρουτίνης οξύ 1μM	1,033±0,034
DPPH+Ρουτίνης οξύ 2μM	0,990±0,060
DPPH+Ρουτίνης οξύ 4μM	0,930±0,132
DPPH+Ρουτίνης οξύ 6μM	0,770±0,056*
DPPH+Ρουτίνης οξύ 8μM	0,496±0,078*
DPPH+Ρουτίνης οξύ 16μM	0,331±0,027*
DPPH+Ρουτίνης οξύ 30μM	0,256±0,013*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).

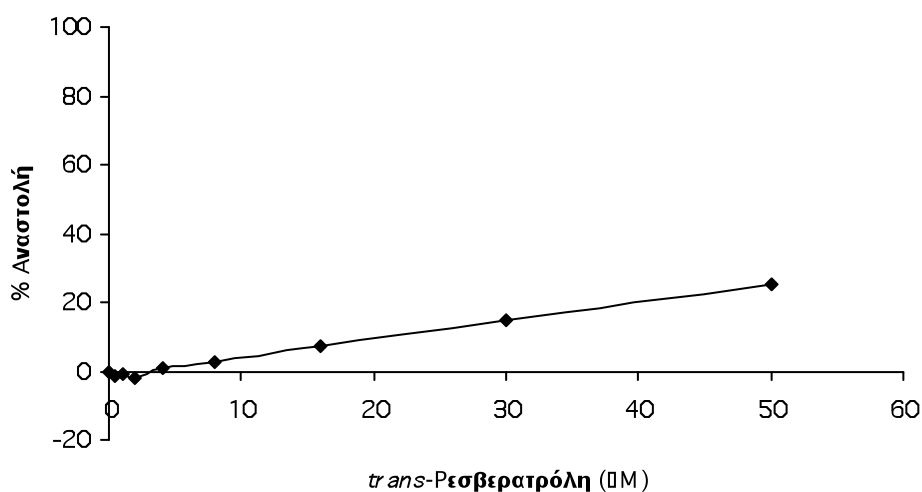


Σχήμα 2.18 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσής της από τη ρουτίνη.

Πίνακας 2.18 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της *trans*-ρεσβερατρόλης με τη μέθοδο του DPPH.

Απορρόφηση _{517nm} ^α	
DPPH ^β	1,280±0,051
DPPH+Ρεσβερατρόλη 0,5μM	1,301±0,022
DPPH+Ρεσβερατρόλη 1μM	1,295±0,028
DPPH+Ρεσβερατρόλη 2μM	1,309±0,026
DPPH+Ρεσβερατρόλη 4μM	1,269±0,027
DPPH+Ρεσβερατρόλη 8μM	1,244±0,039
DPPH+Ρεσβερατρόλη 16μM	1,188±0,026
DPPH+Ρεσβερατρόλη 30μM	1,089±0,021*
DPPH+Ρεσβερατρόλη 50μM	0,954±0,029*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση και προέκυψαν από τρία πειράματα στα οποία έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του DPPH ήταν 100μM. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο DPPH (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 2.19 Απεικονίζεται η % αναστολή στο σχηματισμό της ρίζας DPPH λόγω εξουδετέρωσης της από τη *trans*-ρεσβερατρόλη.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτό το πειραματικό μέρος προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αμπέλου και των φυτικών πολυφαινόλων με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου DPPH. Τα εκχυλίσματα και τα πολυφαινολικά κλάσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όπως δείχνουν οι τιμές IC_{50} , οι οποίες κυμαινότανε μεταξύ (19-92 μ g/ml). Δηλαδή, με βάση την απόδοση των σταφυλιών σε εκχυλίσματα (Σχήμα 1.10), η αντιοξειδωτική δράση παρουσιάστηκε σε συγκεντρώσεις που έχουν φυσιολογική σημασία. Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων η σειρά δραστηρότητάς τους ήταν: Μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς > Μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου > Υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς > Υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου. Παρατηρούμε πως τα μεθανολικά εκχυλίσματα ήταν πιο δραστικά από τα υδατικά, ενώ επίσης τα εκχυλίσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) ήταν πιο δραστικά από τα αντίστοιχά τους της ποικιλίας Ασύρτικο (άσπρα σταφύλια). Ωστόσο, η σειρά περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε πολυφαινόλες ήταν: Υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου > Μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου > Μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς > Υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (Πίνακας 1.1). Δηλαδή η σειρά δραστηρότητας των εκχυλισμάτων με βάση την αντιοξειδωτική τους δράση δεν ήταν αντίστοιχη με τη σειρά που προκύπτει από την περιεκτικότητά τους σε μονομερείς πολυφαινόλες.

Το ίδιο παρατηρήθηκε και με τα πολυφαινολικά κλάσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά. Σε αυτή την περίπτωση η σειρά δραστηρότητας των κλασμάτων με βάση την αντιοξειδωτική τους δράση είναι: Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα > Κλάσμα μεθανολικό από το υδατικό εκχύλισμα > Κλάσμα μεθανολικό από το μεθανολικό εκχύλισμα. Ωστόσο, η σειρά περιεκτικότητας των κλασμάτων σε πολυφαινόλες είναι: Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό

εκχύλισμα > Κλάσμα μεθανολικό από το μεθανολικό εκχύλισμα > Κλάσμα μεθανολικό από το υδατικό εκχύλισμα (Πίνακας 1.1). Παρατηρούμε ότι το μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα αν και περιείχε μικρότερη συγκέντρωση πολυφαινολών (4,01 έναντι 10,19 μg πολυφαινολών ανά g κλάσματος). Δηλαδή μόνο στην περίπτωση του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στη μεγάλη του συγκέντρωση σε πολυφαινόλες και στην ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση. Επιπλέον, το μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα έχει τιμή IC_{50} 46 $\mu\text{g}/\text{ml}$, που είναι παραπλήσια με την τιμή του υδατικού εκχυλίσματος (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ενώ το κλάσμα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών σε σχέση με το εκχύλισμα (4,01 μg πολυφαινολών ανά g κλάσματος έναντι 2,41 μg πολυφαινολών ανά g εκχυλίσματος). Επιπρόσθετα, το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα έχει τιμή IC_{50} 92 $\mu\text{g}/\text{ml}$, που είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) του μεθανολικού εκχυλίσματος, ενώ το κλάσμα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών σε σχέση με το εκχύλισμα (10,19 μg πολυφαινολών ανά g κλάσματος έναντι 3,45 μg πολυφαινολών ανά g εκχυλίσματος). Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα δείχνουν πως η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων τους δεν οφείλεται μόνο στις μονομερείς πολυφαινόλες που περιέχουν αλλά και σε άλλες ουσίες. Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματα αμπέλου περιέχουν ολιγομερείς και πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών (π.χ. προκυανιδίνες) που παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Torres και συν., 2002).

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, όλες με εξαίρεση το κουμαρικό οξύ, εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας τη ρίζα DPPH. Ήταν επίσης σημαντικό ότι οι τιμές IC_{50} ορισμένων από αυτές (του καφεϊκού οξέος, του γαλλικού

οξέος, της κερκετίνης και της (-)-επικατεχίνης) ήταν κοντά στα 10μM, δηλαδή σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στους οργανισμούς μέσω της διαίτας. Η σειρά δραστικότητάς τους ήταν: γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ = κερκετίνη = (-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη > ρουτίνη > πρωτοκατεχοϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > *trans*-ρεσβερατρόλη > κουμαρικό οξύ. Παρατηρούμε ότι μεταξύ των δύο υδροξυβενζοϊκών οξέων, του γαλλικού οξέος και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, πιο δραστικό ήταν το γαλλικό οξύ. Το ίδιο είχε παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες όπου είχε χρησιμοποιηθεί η μέθοδος DPPH (Stoka και Cisowski 2003; Fukumoto και Mazza 2000). Η διαφορά τους είναι ότι το γαλλικό οξύ έχει μια περισσότερη υδροξυλομάδα από το πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Σχήμα 1.11) και άρα μπορεί να δώσει περισσότερα άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών (Rice-Evans και συν., 1996). Η σειρά δραστικότητας των τριών υδροξυκινναμικών οξέων, δηλαδή του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού οξέος και του κουμαρικού οξέος, ήταν σύμφωνη με άλλες μελέτες (Fukumoto και Mazza 2000; Burdette και συν., 2002). Το καφεϊκό οξύ, που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, διαφέρει από τα άλλα δύο υδροξυκινναμικά οξέα στο ότι έχει δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 (κατεχολική δομή), ενώ το κουμαρικό οξύ έχει μόνο ένα υδροξύλιο και στο φερουλικό οξύ το ένα από τα δύο υδροξύλια έχει αντικατασταθεί από μία μεθόξυ ομάδα (Σχήμα 1.11). Πιστεύεται ότι λόγω αυτής της δομής το καφεϊκό οξύ εμφανίζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Lodovici και συν., 2001; Rice-Evans και συν., 1996). Επίσης, το φερουλικό οξύ είναι πιο δραστικό από το κουμαρικό οξύ (το οποίο δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις), και πιστεύεται ότι αυτό οφείλεται στην ύπαρξη της μεθόξυ ομάδας (Rice-Evans και συν., 1996). Η κερκετίνη ήταν πιο δραστική από τη γλυκοσυλιωμένη της μορφή, τη ρουτίνη (Σχήμα 1.12). Πιστεύεται ότι η προσθήκη σακχάρων ελαττώνει την

αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων γιατί ελαττώνει τον αριθμό των υδροξυλομάδων που μπορούν να δώσουν άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, ενώ επίσης διαταράσσεται η επίπεδη στερεοδιάταξη της πολυφαινόλης (Heim και συν., 2002). Όπως έχει αναφερθεί (παράγραφος 1.6.1) όταν το μόριο της πολυφαινόλης είναι επίπεδο διευκολύνεται η μετατόπιση ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο της, με αποτέλεσμα η φαινολική ρίζα που προκύπτει να είναι περισσότερο σταθερή. Οι τιμές IC_{50} των στερεοϊσομερών (-)-επικατεχίνης και (+)-κατεχίνης ήταν 11 και 14 μ M αντίστοιχα, με την (-)-επικατεχίνη δηλαδή να εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Faucouneau και συν., 1997). Επίσης, ήταν ενδιαφέρον ότι το στυλβένιο *trans*-ρεσβερατρόλη, μια από τις περισσότερο μελετημένες πολυφαινόλες που έχει παρουσιάσει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (Dong 2003; Jang και συν., 1997), εμφάνισε μικρή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες πολυφαινόλες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ,
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ
ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*VITIS VINIFERA*)

Stagos D., Kouris S., Kouretas D
Plant phenolics protect from bleomycin-induced oxidative stress and
mutagenicity in Salmonella typhimurium TA102
Anticancer Research 24:743-745; 2004

Stagos D., Kazantzoglou G., Theofanidou D., Kakalopoulou G., Magiatis P.,
Mitaku S., Kouretas D
Activity of grape extracts from Greek varieties of Vitis vinifera against mutagenicity
induced by bleomycin and hydrogen peroxide in Salmonella typhimurium TA102
Mutation Research 609:165-175; 2006

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ,
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ
ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*VITIS VINIFERA*)**

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ως μετάλλαξη ορίζεται κάθε κληρονομήσιμη αλλαγή του γενετικού υλικού, η οποία δεν δημιουργείται από τους γνωστούς μηχανισμούς που ανασυνδυάζουν τα γονίδια (δηλαδή τον εγγενή τρόπο αναπαραγωγής, τον τυχαίο ανασυνδυασμό των ασύνδετων γονιδίων και τη χιασματυπία) ή την ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού. Ο μηχανισμός της αλλαγής από τη μια κληρονομήσιμη κατάσταση στην άλλη ονομάζεται μεταλλαξιγένεση και το μέσο που προκαλεί την αλλαγή μεταλλαξιγόνο. Ένα άτομο με μετάλλαξη που εκφράζεται και φαινοτυπικά ονομάζεται μετάλλαγμα (Τριανταφυλλίδης 1992).

Ανάλογα με τη μονάδα του γενετικού υλικού που αλλάζει, οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε:

α) Γονιδιακές μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις σημείου που έχουν σχέση με την αλλαγή ενός μόνο γονιδίου με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα νέο αλληλόμορφο.

β) Χρωμοσωματικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με αλλαγές στη δομή των χρωμοσωμάτων.

γ) Γενοματικές μεταλλάξεις που έχουν σχέση με αλλαγές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων.

Οι μεταλλάξεις μπορούν να δημιουργηθούν είτε σε γεννητικά κύτταρα (γεννητικές μεταλλάξεις) είτε σε σωματικά κύτταρα (σωματικές μεταλλάξεις). Οι γεννητικές μεταλλάξεις είναι κληρονομήσιμες ενώ οι σωματικές μεταλλάξεις παράγουν μεταλλαγμένο φαινότυπο μόνο σε τμήμα του οργανισμού. Οι μεταλλάξεις είναι δυνατό να δημιουργούνται: i) φυσικά (αυτόματα ή αυθόρμητα), ii) τεχνητά και iii) κατευθυνόμενα. Οι φυσικές μεταλλάξεις είναι δυνατό να δημιουργούνται από τις

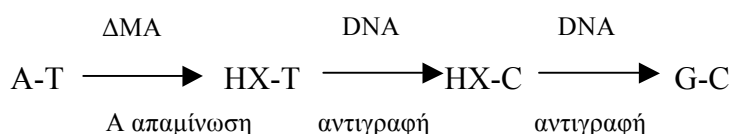
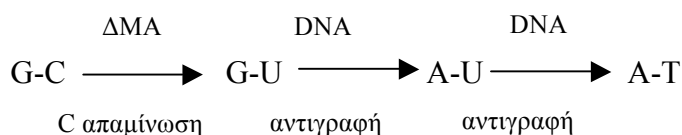
κοσμικές ακτινοβολίες, από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, αλλά ακόμη και από μεταθετά γενετικά στοιχεία. Οι τεχνητές μεταλλάξεις δημιουργούνται με την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων κυρίως ακτινοβολιών (π.χ. ακτίνες X, ακτίνες-γ) και χημικών ενώσεων πάνω στους οργανισμούς. Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση προκύπτει από την *in vitro* χημική τροποποίηση του DNA.

3.1.1 Μεταλλαξιγένεση και οξειδωτικό στρες

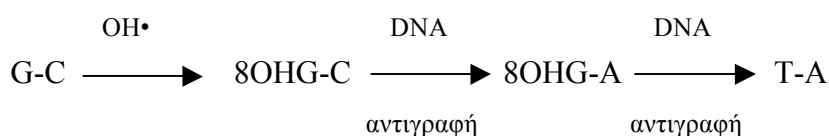
Οι ΔΜΟ/ΔΜΑ μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες στο DNA, κυρίως θραύσεις των κλώνων του DNA και χημική τροποποίηση των βάσεων του. Οι θραύσεις των κλώνων του DNA μπορούν να οδηγήσουν σε υπερβολική ενεργοποίηση του ενζύμου πολύ(ADP-ριβόζη)πολυμεράση (PARP) με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Το ένζυμο αυτό είναι συνδεδεμένο με τη χρωματίνη και ριβοσυλιώνει τις πυρηνικές πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας ως δότη για την ADP-ριβόζη το νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD^+). Η ριβοσυλίωση αυτή πιστεύεται ότι διευκολύνει την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Ωστόσο, υπερβολική ενεργοποίηση του ενζύμου PARP οδηγεί σε εξάντληση του NAD^+ και σε μειωμένη σύνθεση ATP και τελικά σε κυτταρικό θάνατο (Szabo και συν., 1996).

Η τροποποίηση των βάσεων του DNA μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό μεταλλάξεων είτε άμεσα είτε έμμεσα κατά το διπλασιασμό του DNA ή κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης των βλαβών του (Rodríguez και συν., 1995). Για παράδειγμα, οι ΔΜΑ απαμινώνουν την αδενίνη (A) σε υποξανθίνη (HX) και την κυτοσίνη (C) σε ουρακίλη (U). Έτσι ενώ η αδενίνη ζευγαρώνει με τη θυμίνη (T), η υποξανθίνη μπορεί να ζευγαρώσει με την κυτοσίνη. Επίσης, ενώ η κυτοσίνη ζευγαρώνει με τη γουανίνη (G), η ουρακίλη ζευγαρώνει με την αδενίνη. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των τροποποιήσεων είναι μεταλλάξεις όπου ένα ζευγάρι βάσεων αντικαθίσταται από ένα άλλο, και πιο συγκεκριμένα μεταλλάξεις μετάπτωσης (transition mutations). Στις

μεταλλάξεις μετάπτωσης αντικαθίσταται μια βάση πουρίνης (δηλαδή η αδενίνη ή η γουανίνη) από μια άλλη βάση πουρίνης, ή μια βάση πυριμιδίνης (δηλαδή η κυτοσίνη ή η θυμίνη) από μια άλλη βάση πυριμιδίνης.



Ορισμένα από τα προϊόντα που σχηματίζονται από την τροποποίηση των βάσεων του DNA από τη ρίζα $\text{OH}\cdot$ είναι η γλυκολ-θυμίνη που μπορεί να σταματήσει το διπλασιασμό του DNA ή να οδηγήσει σε μετάλλαξη μετάπτωσης του τύπου $\text{T}\rightarrow\text{C}$, και η 8-υδροξυγουανίνη (8OHG) που προκαλεί μεταλλάξεις μεταστροφής (transversion mutations). Στις μεταλλάξεις μεταστροφής μια βάση πουρίνης αντικαθίσταται από μια βάση πυριμιδίνης και αντίστροφα. Αυτό συμβαίνει γιατί η 8-υδροξυγουανίνη ζευγαρώνει λανθασμένα με αδενίνη.



Η κατανομή των μεταλλάξεων που προκαλούνται από $\Delta\text{MO}/\Delta\text{MA}$ δεν είναι τυχαία αλλά παρατηρούνται σε ορισμένα ‘θερμά σημεία’ (hotspots). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως η δυνατότητα πρόσβασης των $\Delta\text{MO}/\Delta\text{MA}$ στο DNA (για παράδειγμα οι περιοχές του DNA που συνδέουν τα νουκλεοσώματα είναι περισσότερο εκτεθειμένες από ότι τα ίδια τα νουκλεοσώματα), ενώ επίσης υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα σχηματισμού της ρίζας $\text{OH}\cdot$ από την αντίδραση Fenton (παράγραφος 1.2.1, αντίδραση 1.2) σε περιοχές του DNA όπου συνδέονται ιόντα

μεταβατικών μετάλλων (Halliwell και Gutteridge 1998). Οι περισσότεροι συχνές μεταλλάξεις που προκαλούνται από τις ΔΜΟ είναι μεταπτώσεις του τύπου C → T και μεταστροφές του τύπου G → C και G → T, ενώ επίσης συνήθως στις μεταλλάξεις αυτές εμπλέκεται η 8-υδροξυγουανίνη. Γενικά, το πρότυπο των μεταλλάξεων που προκαλούνται σε ένα γονίδιο από τις ΔΜΟ/ΔΜΑ εξαρτάται από τη διαμόρφωση και την ακολουθία των βάσεων του, από τον τύπο της DNA πολυμεράσης που αντιγράφει το γονίδιο και από τη διαμόρφωση του DNA στις γειτονικές του περιοχές που μπορεί να επηρεάζει την ακρίβεια της αντιγραφής από τις πολυμεράσες (Moraes και συν., 1990).

Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, στο DNA θεωρούνται ένα σημαντικό στάδιο κατά την καρκινογένεση, καθώς και σε άλλες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως είναι οι καρδιοπάθειες, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) και η πρόωγη γήρανση (Wiseman και συν., 1995; Finkel και Holbrook 2000; McCord και συν., 1993). Για παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του ‘πολυσταδιακού μοντέλου’, οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την πρόοδο (progression) (Κουρέτας 2003). Η έναρξη, το πρώτο στάδιο, προκαλείται από τη δημιουργία μη αντιστρεπτών βλαβών στο DNA (πιθανότατα σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση) σε ένα ‘αρχικό κύτταρο’ (initiated cell) που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε (Trosko και Chang 1989). Στο δεύτερο στάδιο, την προαγωγή, τα αρχικά μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάτω από την επίδραση μιτογόνων παραγόντων (προαγωγέων) με τελική κατάληξη το

σχηματισμό ενός κλώνου από μεταλλαγμένα κύτταρα. Σε ένα από αυτά τα κύτταρα, μία ‘κρίσιμη’ μετάλλαξη το μετατρέπει στο πρώτο προ-καρκινογόνο κύτταρο. Η προαγωγή συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια και είναι ένα αντιστρεπτό στάδιο αφού αφαίρεση του προαγωγέα συχνά έχει ως αποτέλεσμα ο ιστός να επανέρθει στην φυσιολογική του κατάσταση αν και θα περιέχει ‘αρχικά κύτταρα’ (Trosko και συν., 1983). Στο τελικό μη αντιστρεπτό στάδιο, την πρόοδο, το προ-καρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό εξαιτίας νέων μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση του καρκινικού φαινότυπου, δηλαδή ενός κυτταρικού κλώνου με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διείσδυσης και μετάστασης (Kerbel και συν., 1984).

3.1.2 Αντιμεταλλαξιγόνος δράση φυτικών πολυφαινολών

Μελέτες που αφορούν την αντιμεταλλαξιγόνο δράση των φυτικών πολυφαινολών έχουν δείξει ότι οι κυριότεροι μηχανισμοί μέσω των οποίων πιθανώς ασκείται αυτή η δράση είναι οι εξής:

1. Αναστολή της πρόσληψης του μεταλλαξιγόνου, όπως του βενζοπυρενίου από τα κύτταρα (Hatch και συν., 2000).
2. Αναστολή της ομοιοπολικής σύνδεσης μεταλλαξιγόνων με το DNA (σχηματισμός DNA adducts). Για παράδειγμα, η κερκετίνη, η γενιστεΐνη και η τανγερετίνη ανέστειλαν το σχηματισμό DNA adducts στο παχύ έντερο αρουραίων στους οποίους είχε χορηγηθεί το μεταλλαξιγόνο PhIP (Breinhold και συν., 1999).
3. Αναστολή της νιτροσυλίσωσης του DNA. Αρκετά χημικά μεταλλαξιγόνα, όπως *N*-νιτροζο ενώσεις (που σχηματίζονται στο στομάχι από νιτρικές ή νιτρώδης ενώσεις) δρουν μέσω νιτροσυλίσωσης των βάσεων του DNA (Κουρέτας 2003). Έχει αναφερθεί ότι το γαλλικό οξύ και το ταννικό οξύ μείωσαν τη μεταλλαξιγένεση που προκάλεσαν *N*-νιτροζο ενώσεις σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* (Gichner και συν., 1987). Επίσης, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό

οξύ ανέστειλαν το σχηματισμό *N*-νιτροζο ενώσεων σε αρουραίους στους οποίους είχαν χορηγηθεί αμινοπυριδίνη και νιτρικό οξύ (Kuenzig και συν., 1984). Ωστόσο, υπάρχουν και πολυφαινόλες που προκαλούν νιτροσυλίωση του DNA (Pignatelli και συν., 1980).

4. Επαγωγή των ενζύμων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Για παράδειγμα, η πολυφαινόλη βανιλίνη και το ισομερές της *o*-βανιλίνη μείωναν τις μεταλλάξεις που προκαλούσαν αλκυλιωτικοί παράγοντες σε κύτταρα *Escherichia coli*. Η αναστολή αυτή οφειλότανε σε επαγωγή του μηχανισμού επιδιόρθωσης SOS (Takahashi και συν., 1990). Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η μυρικετίνη έχει προκαλέσει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της DNA-πολυμεράσης β (το ένζυμο αυτό διαθέτει ιδιότητες επιδιόρθωσης) με αποτέλεσμα τη μείωση οξειδωτικών βλαβών που προκαλούνταν στο DNA από άλατα μετάλλων (Abalea και συν., 1999).
5. Αναστολή ή επαγωγή των ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών (ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450). Αρκετές πολυφαινόλες αναστέλουν τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών που μετατρέπουν προ-καρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες (Lee και συν., 1994). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι οι περισσότερες πολυφαινόλες έδειξαν αναστολή σε συγκεντρώσεις που δεν μπορούν να επιτευχθούν μέσω της δίαιτας. Επίσης, σε μία μελέτη το ελλαγικό οξύ μείωσε τα επίπεδα των ενζύμων της φάσης I του μεταβολισμού στο ήπαρ αρουραίων, αλλά προτάθηκε ότι αυτό οφειλότανε σε μια μη επιλεκτική καταστροφή αυτών των ενζύμων από το ελλαγικό οξύ (Ayrton και συν., 1992). Επιπλέον, ορισμένες πολυφαινόλες προκαλούν επαγωγή των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών (π.χ. GST, CYP1A2,

CYP2E1 και CYP3A1), που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των καρκινογόνων ουσιών (Prochaska και Talany 1988; Helsby και συν., 1997).

6. Αναστολή των βλαβών που προκαλούνται στο DNA μέσω οξειδωτικών μηχανισμών (Ferguson 2001). Όπως έχει αναφερθεί (παράγραφος 1.6.1) μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των φυτικών πολυφαινόλων είναι η αντιοξειδωτική τους δράση που εκδηλώνεται μέσω διάφορων μηχανισμών. Κατά συνέπεια μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένες φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύουν το DNA από οξειδωτικές βλάβες. Για παράδειγμα, η μυρικετίνη μείωνε τις οξειδωτικές βλάβες του DNA που επάγονταν από σίδηρο σε καλλιέργειες από ηπατοκύτταρα αρουραίου (Abalea και συν., 1999).

Λόγω του ότι οι ΔΜΟ/ΔΜΑ αποτελούν έναν από τους κύριους παράγοντες μεταλλαξιγένεσης στα κύτταρα και άρα πρόκλησης ασθενειών, όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν αμυντικούς μηχανισμούς για να αντιμετωπίζουν τις συνέπειες της κυτταρικής βλάβης που προκαλείται από οξειδωτικούς μηχανισμούς (παράγραφος 1.2.2). Τα εκχυλίσματα των σταφυλιών παρουσιάζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έτσι σε αυτό το πειραματικό μέρος εξετάστηκε η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων από σταφύλια ελληνικών ποικιλιών αμπέλου έναντι μεταλλαξιγόνων ουσιών που δρουν μέσω οξειδωτικών μηχανισμών, ως ένας μηχανισμός χημειοπροστατευτικής δράσης. Επιπλέον, επειδή τα κυριότερα αντιοξειδωτικά συστατικά των σταφυλιών θεωρούνται οι φυτικές πολυφαινόλες, εξετάστηκαν πολυφαινολικά κλάσματα από τα εκχυλίσματα καθώς και φυτικές πολυφαινόλες.

Για να εξεταστεί η αντιμεταλλαξιγόνος δράση χρησιμοποιήθηκαν τρία πειραματικά μοντέλα: i) απομονωμένο πλασμιδιακό DNA, ii) βακτηριακά κύτταρα

(*Salmonella typhimurium*) και iii) ευκαρυωτικά κύτταρα (λεμφοκύτταρα).

Συγκεκριμένα, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) Η επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C.
- 2) Πρόκληση μεταλλάξεων σε βακτηριακά κύτταρα (*S. typhimurium* TA102) από τις μεταλλαξιγόνες ουσίες μπλεομυκίνη και H₂O₂ (τεστ του Ames).
- 3) Αύξηση των ανταλλαγών χρωμοσωμικών τμημάτων (Sister Chromatid Exchanges ή SCEs) από τη μεταλλαξιγόνο ουσία μιτομυκίνη C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 ΥΛΙΚΑ

3.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία), Pancreac (Ισπανία) και Sigma (Η.Π.Α.). Τα θρεπτικά υλικά ήταν των εταιρειών Merck, Biochrom (Μ.Β.) και Pancreac (Ισπανία). Η μπλεομυκίνη ήταν από την εταιρεία Nippon Kayaku (Ιαπωνία) ενώ η μιτομυκίνη C ήταν από την Kyowa (Ιαπωνία).

3.2.1.ii Οργανισμοί

Στη δοκιμή του Ames χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102. Τα κύτταρα διατηρούνταν σε διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80⁰C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα εξεταζόταν τα γενετικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.

3.2.1.iii Πλασμίδιο

Το πλασμίδιο pGem-3z ήταν της εταιρείας Promega (Η.Π.Α.).

3.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.2.i Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C

Γενικά

Ορισμένοι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (π.χ. $O_2^{\bullet-}$ και OH^{\bullet}) οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν κοψίματα (nicks) σε έναν από τους κλώνους ενός δίκλωνου DNA (Halliwell και Gutteridge 1998). Οι βλάβες αυτές στο DNA μπορούν να οδηγήσουν στη συνέχεια σε μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση (Finkel και Holbrook 2000). Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για να διαπιστώσουμε αν μια ουσία αναστέλλει τη δημιουργία των παραπάνω βλαβών στο DNA είναι η επώαση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα με πλασμιδιακό DNA (Yamagishi και συν. 2001; Kitts και συν. 2001). Το κυκλικό δίκλωνο πλασμιδιακό DNA όταν βρίσκεται στην υπερελικωμένη του μορφή (supercoiled) λόγω της συμπαγούς διαμόρφωσής του παρουσιάζει υψηλή ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε μία πηκτή αγαρόζης. Αν προκληθούν κοψίματα σε έναν από τους κλώνους του από έναν μεταλλαξιγόνο παράγοντα τότε το υπερελικωμένο DNA ξετυλίγεται και μετατρέπεται σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA (open circular ή relaxed) το οποίο έχει μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτή αγαρόζης (Σχήμα 3.1). Έτσι σε μία ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το υπερελικωμένο και το χαλαρωμένο DNA θα δώσουν διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ζώνες. Δίκλιωνα κοψίματα οδηγούν στο σχηματισμό γραμμικού DNA (linear) το οποίο σε μία πηκτή αγαρόζης μετακινείται ανάμεσα στο υπερελικωμένο και στο χαλαρωμένο DNA. Αν στην αντίδραση προστεθεί μία ουσία που παρεμποδίζει τη δράση της μεταλλαξιγόνου ουσίας τότε θα ανασταλεί και η μετατροπή του υπερελικωμένου DNA σε χαλαρωμένο. Στην παρούσα μελέτη ως μεταλλαξιγόνος ουσία χρησιμοποιήθηκε η μιτομυκίνη C και εξετάστηκε αν τα εκχυλίσματα αμπέλου

και οι πολυφαινόλες μπορούσαν να αναστείλουν τις επαγόμενες από μιτομυκίνη C ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

Μηχανισμός μεταλλαξιγόνου δράσης μιτομυκίνης C

Η μιτομυκίνη C (Σχήμα 3.2) είναι ένα φυσικό αντιβιοτικό που απομονώνεται από διάφορα είδη του βακτηρίου *Streptomyces* και χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο (Paz και συν. 2004; Verweij και συν. 1990). Η μιτομυκίνη C, η οποία είναι μία κινόνη (Q), μπορεί να αναχθεί από ένζυμα (π.χ. ρεδουκτάσες), από χημικούς αναγωγικούς παράγοντες ή μετά από διάλυσή της σε ελαφρώς όξινα υδατικά διαλύματα (Tomasz και συν. 1987). Η αναγωγή της οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικινόνης (SQ^{•-}) (αντίδραση 3.1) η οποία αντιδρώντας με O₂ παράγει την αρχική μιτομυκίνη C (Q) αλλά και O₂^{•-} (αντίδραση 3.2). Το O₂^{•-} σε υδατικά διαλύματα σχηματίζει H₂O₂ μέσω της αντίδρασης (3.3). Παρουσία Fe⁺² το H₂O₂ μέσω της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 3.4) παράγει ρίζες υδροξυλίου (OH[•]), οι οποίες μπορούν να επιδράσουν στο DNA και να προκαλέσουν μονόκλιωνα ή δίκλιωνα κοψίματα (Halliwell και Gutteridge 1998).



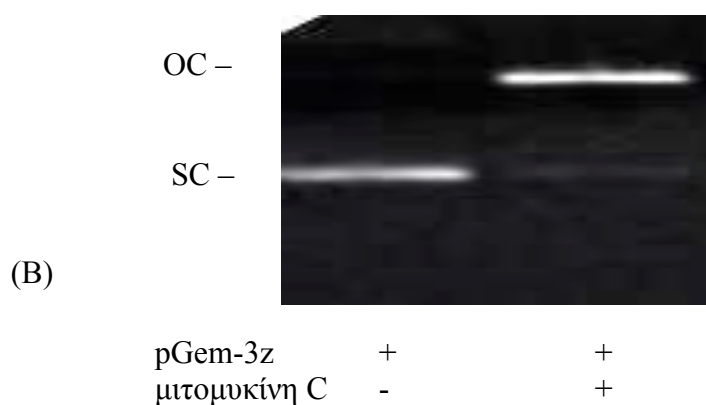
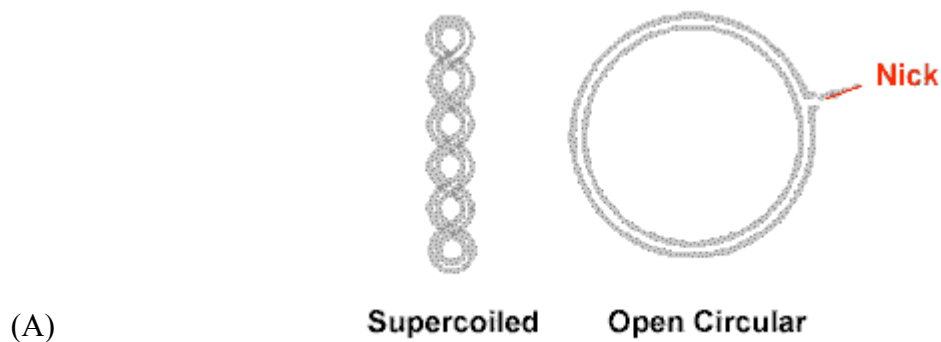
Μέθοδος

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που έχει περιγραφεί από τον Yamagishi και τους συνεργάτες του (Yamagishi και συν. 2001). Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επωάστηκε για 1 ώρα στους 37⁰C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄·7H₂O), 78μM EDTA και 0,004% μιτομυκίνης C παρουσία ή απουσία των εξεταζόμενων ουσιών. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μl και η αντίδραση έγινε σε σωλήνες των

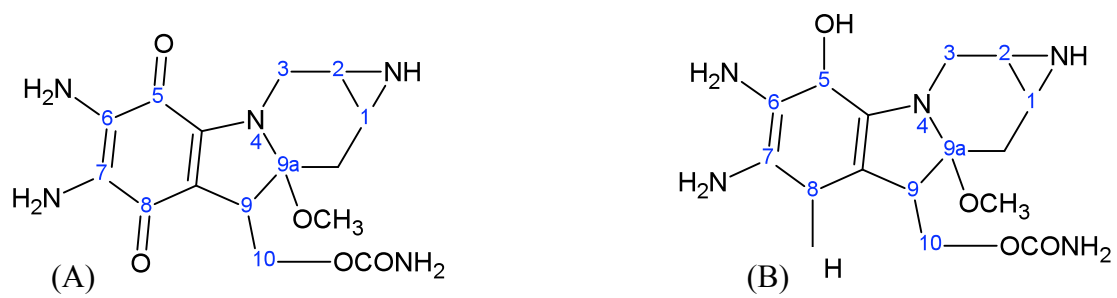
0,5ml. Μετά την επώαση, στα δείγματα προστέθηκαν 3μl διαλύματος φόρτωσης (30%w/v γλυκερόλη, 0,25%w/v κυανό της βρωμοφαινόλης) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) για 90 λεπτά σε πηκτή αγαρόζης 0,9%w/v. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TAE pH 8,0 (40mM Tris-οξικό οξύ, 2mM EDTA). Ακολούθησε χρώση των ζωνών του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/ml) για 30 λεπτά και αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό για 30 λεπτά. Οι πηκτές αφού τοποθετήθηκαν σε συσκευή εκπομπής UV φωτογραφήθηκαν με κάμερα Polaroid DS-34 ή με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Η.Π.Α.) έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα περιελάμβανε έναν αρνητικό μάρτυρα (pGem-3z DNA χωρίς μιτομυκίνη C ή εξεταζόμενες ουσίες), ένα θετικό μάρτυρα (pGem-3z DNA με μιτομυκίνη C) καθώς και δείγματα που περιείχαν το pGem-3z, τη μιτομυκίνη C και τις εξεταζόμενες ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Επίσης, επειδή ορισμένες από τις εξεταζόμενες ουσίες ήταν διαλυμένες σε κάποιο διαλύτη (μεθανόλη, αιθανόλη ή DMSO), εξετάστηκε αν οι διαλύτες επηρεάζουν την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από τη μιτομυκίνη C. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιείχαν το pGem-3z, τη μιτομυκίνη C και το διαλύτη. Για την εξέταση κάθε ουσίας έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα (n = 3). Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην επαγωγή θραύσεων από τη μιτομυκίνη C στο πλασμιδιακό DNA προσδιορίστηκε από την εξίσωση (1):

$$\% \text{ Αναστολή} = (S - S_0) / (S_{\text{control}} - S_0) \times 100 \quad (1)$$

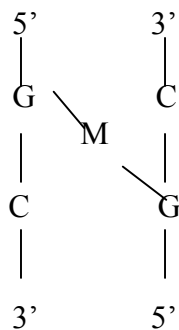
Όπου S_{control} είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα αρνητικός μάρτυρας. S_0 είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα θετικός μάρτυρας και S είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στα δείγματα που περιείχαν τις εξεταζόμενες ουσίες και τη μιτομυκίνη C.



Σχήμα 3.1 Απεικονίζεται η μετατροπή ενός υπερελικωμένου δίκλωνου κυκλικού πλασμιδιακού DNA (supercoiled) σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA (open circular) μετά τη δημιουργία ενός κοψίματος (nick). (A) Σχηματική παράσταση. (B) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επώαστηκε για 1 ώρα στους 37⁰C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄.7H₂O), 78μM EDTA παρουσία ή απουσία 0,004% μιτομυκίνης C. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA.



Σχήμα 3.2 (A) Χημική δομή μιτομυκίνης C (κινόνη). (B) Υδροκινόνη.



Σχήμα 3.3 Δημιουργία χιάσματος ανάμεσα σε δύο γουανίνες (G) δύο διαφορετικών αλυσίδων του DNA με την παρεμβολή της μιτομυκίνης C (M) σε μορφή υδροκινόνης. C: βάση κυτοσίνης. G: βάση γουανίνης.

Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές ($n = 3$) του % ποσοστού των τριών μορφών του πλασμιδιακού DNA (δηλαδή, υπερελικωμένης, χαλαρής και γραμμικής) για κάθε συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ του % ποσοστού της υπερελικωμένης μορφής του DNA και της συγκέντρωσης των ουσιών με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

3.2.2.ii Το τεστ του Ames

Γενικά

Το τεστ του Ames, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Ames και τους συνεργάτες του (Ames και συν. 1973), είναι μία μέθοδος μικρής διάρκειας (short-term), αξιόπιστη και ευαίσθητη που έχει ως σκοπό την ανίχνευση χημικών ουσιών που προκαλούν μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό (Τριανταφυλλίδης 1992). Η μέθοδος στηρίζεται στη χρησιμοποίηση διαφόρων στελεχών *Salmonella typhimurium* τα οποία είναι εξαρτώμενα από ιστιδίνη, δηλαδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη γιατί καθένα από αυτά τα στελέχη φέρει μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Όταν τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης τότε είναι πιθανό να συμβούν επαναμεταλλάξεις, δηλαδή νέες μεταλλάξεις στα ήδη μεταλλαγμένα γονίδια της ιστιδίνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τα γονίδια να

ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχουν συμβεί επαναμεταλλάξεις μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Για το λόγο αυτό η μέθοδος ανήκει στη κατηγορία των τεστ αντιστροφής (reversion tests). Ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *S. typhimurium*. Όταν μία μεταλλαξιγόνος ουσία προστεθεί στο θρεπτικό υλικό θα προκαλέσει αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με τις καλλιέργειες στις οποίες δεν έχει προστεθεί η συγκεκριμένη ουσία.

Υπάρχουν διάφορα στελέχη *S. typhimurium*, καθένα από τα οποία είναι ευαίσθητο στην πρόκληση μεταλλάξεων από διαφορετικές κατηγορίες χημικών ουσιών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TA102 γιατί είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου (Levin και συν. 1982, Mortelmans και Zeiger 2000). Η μετάλλαξη στο οπερόνιο της ιστοιδίνης που υπάρχει σε αυτό το στέλεχος είναι η *hisG428*, η οποία είναι μία μετάλλαξη λήξης (TAA) και μπορεί να αναστραφεί από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (μεταπτώσεις ή μεταστροφές). Η μετάλλαξη *hisG428* βρίσκεται στο πλασμίδιο pAQ1 που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102 με σκοπό να αυξηθούν οι πιθανές θέσεις ανάστροφων μεταλλάξεων. Επίσης το πλασμίδιο pAQ1 προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευση του. Το στέλεχος TA102, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη *S. typhimurium*, φέρει χαρακτηριστικά που το καθιστούν πιο ευαίσθητο στη δράση χημικών μεταλλαξιγόνων. Συγκεκριμένα φέρει τη μετάλλαξη *rfa* που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης, περιέχει το πλασμίδιο pKM101

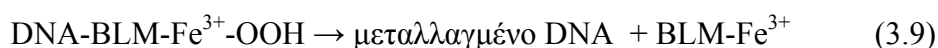
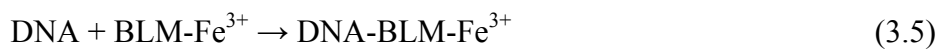
το οποίο αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλάξεις μέσω ενίσχυσης του επιδιορθωτικού μηχανισμού βλαβών στο DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway). Το πλασμίδιο αυτό προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευσή του.

Επίσης, το τεστ του Ames μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών, δηλαδή ουσιών που προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από χημικές ουσίες (Santana-Rios και συν. 2001, Melo και συν 2003, Ferrer και συν. 2002). Για το σκοπό αυτό, σε κάποιες καλλιέργειες προστίθεται μία μεταλλαξιγόνος ουσία ενώ σε άλλες καλλιέργειες προστίθεται η μεταλλαξιγόνος ουσία μαζί με την πιθανή αντιμεταλλαξιγόνο ουσία. Μείωση του αριθμού των επαναμεταλλαγμάτων στις δεύτερες καλλιέργειες σε σύγκριση με τις πρώτες είναι ένδειξη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης της ουσίας. Έτσι, στην παρούσα μελέτη η μέθοδος του Ames χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί αν τα εκχυλίσματα αμπέλου και οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούσαν να αναστείλουν τις προκαλούμενες από μπλεομυκίνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) μεταλλάξεις.

Μηχανισμός μεταλλαξιγόνου δράσης μπλεομυκίνης

Όπως αναφέρθηκε, στη μέθοδο του Ames χρησιμοποιήθηκε ως μεταλλαξιγόνος ουσία η μπλεομυκίνη η οποία προκαλεί μεταλλάξεις μέσω παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Μπλεομυκίνη είναι η ονομασία μιας οικογένειας αντιβιοτικών γλυκοπεπτιδίων που παράγονται από το *Streptomyces verticillus*. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μπλεομυκίνη A₂ (Σχήμα 3.4). Λόγω της μεταλλαξιγόνου δράσης της η μπλεομυκίνη μπορεί να θανατώνει καρκινικά κύτταρα και έτσι χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διάφορων μορφών

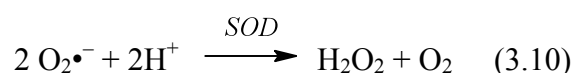
καρκίνου (Byrnes και συν. 1990). Έχει προταθεί (Sugihara και συν. 2005, Stubbe και συν. 1996, Li και συν. 2001) ότι η μπλεομυκίνη προκαλεί βλάβες στο DNA σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Δηλαδή, η μπλεομυκίνη συνδέεται στο DNA και σχηματίζει σύμπλοκο με ιόντα τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) (αντίδραση 3.5). Παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα, το σύμπλοκο ανάγεται (αντίδραση 3.6) και σχηματίζεται ένα νέο σύμπλοκο με μοριακό οξυγόνο (αντίδραση 3.7). Μετά την αναγωγή του (αντίδραση 3.8), το νέο σύμπλοκο ενεργοποιείται και παράγει ΔMO, όπως $\text{O}_2^{\bullet-}$ και OH^{\bullet} οι οποίες προκαλούν μονόκλωνα και δίκλωνα σπασίματα στο DNA (αντίδραση 3.9).

Μηχανισμός μεταλλαξιγόνου δράσης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

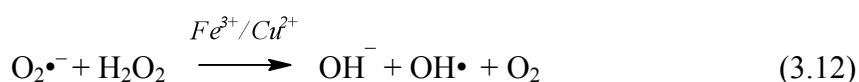
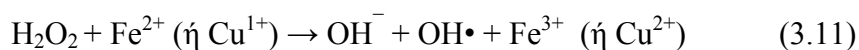
Το H_2O_2 μοιάζει με το ύδωρ στη μοριακή του δομή και διαχέεται εύκολα μέσα και ανάμεσα στα κύτταρα. Στο εσωτερικό των κυττάρων το H_2O_2 μπορεί να παραχθεί από τη δράση διαφόρων ενζύμων, όπως από τη δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD, αντίδραση 3.10), τις οξειδάσες των αμινοξέων και την οξειδάση της ξανθίνης (Halliwell και συν. 2000).



Το H_2O_2 συμμετέχει σε αρκετές λειτουργίες του μεταβολισμού. Για παράδειγμα, χρησιμοποιείται από το ένζυμο υπεροξειδάση του θυρεοειδή για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Επίσης, χρησιμοποιείται και ως ενδοκυτταρικό σήμα μεταγωγής, αφού πιστεύεται ότι σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους η

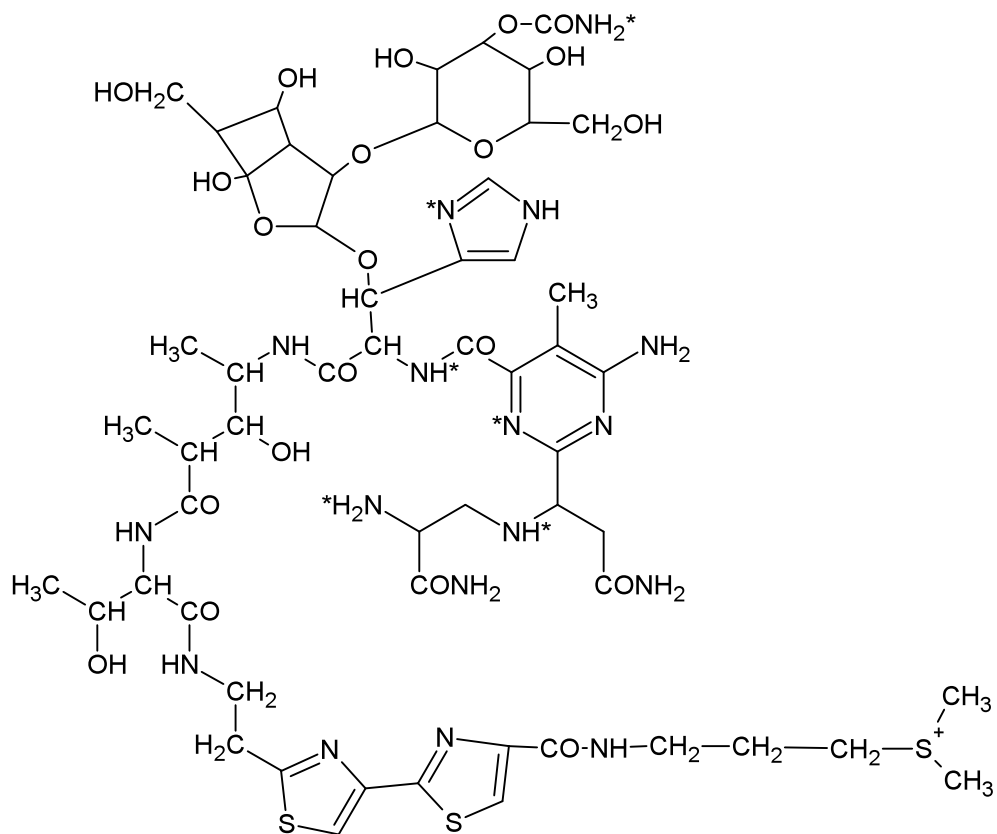
ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ από τον παράγοντα TNF-α απαιτεί την παρουσία του H₂O₂ (Halliwell και Gutteridge 1998). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχτεί ότι μπορεί και αναστέλλει άμεσα τη δράση ορισμένων ενζύμων (π.χ. διάφορων φωσφατασών, τη δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΐδης) κυρίως μέσω οξειδωσης των σουλφυδρυλικών ομάδων (-SH) των ενεργών κέντρων (Brodie και Reed 1987).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις το H₂O₂ (10-100μM) είναι τοξικό και για το λόγο αυτό υπάρχουν ένζυμα, όπως η καταλάση (παράγραφος 1.2.2), που έχουν ως ρόλο να το απομακρύνουν από τα κύτταρα. Το H₂O₂ δεν είναι πολύ δραστικό μόριο αλλά μπορεί να αντιδράσει με ιόντα σιδήρου ή χαλκού (Kobayashi και συν. 1990) και να οδηγήσει στην παραγωγή OH• κυρίως μέσω των αντιδράσεων Fenton (αντίδραση 3.11) και Haber-Weiss (αντίδραση 3.12). Οι OH• είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν μονόκλωνα και δίκλωνα σπασίματα στο DNA που οδηγούν στη δημιουργία μεταλλάξεων.



Καλλιεργητικά υλικά

- Διάλυμα αλάτων Vogel-Bonner (50X). Σε 1000ml απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr θειϊκού μαγνησίου (MgSO₄.H₂O), 100gr κιτρικού οξέος (C₆H₈O₇), 500gr διβασικού φωσφορικού οξέος (K₂HPO₄) και 175gr φωσφορικού αμμωνικού νατρίου (Na₂NH₂PO₄.4H₂O). Το διάλυμα αποστειρώνεται



Σχήμα 3.4 Χημική δομή της μπλεομυκίνης A₂. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν θέσεις οι οποίες αλληλεπιδρούν με ιόντα μεταβατικών μετάλλων.

- στους 121⁰C για 30 λεπτά και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Διάλυμα γλυκόζης 10% v/v. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121⁰C για 30 λεπτά και διατηρείται στους 4⁰C.
 - Διάλυμα Glucose Minimal άγαρ. Σε 1000ml απιονισμένου νερού προστίθενται 15gr άγαρ και το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121⁰C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 65⁰C για 45 λεπτά και ακολουθεί προσθήκη 20ml διαλύματος Vogel-Bonner (50X) και 50ml διαλύματος γλυκόζης 10% v/v. Το διάλυμα μοιράζεται ανά 25ml σε τριβλία (100X15mm) και αφήνεται να πήξει.
 - Διάλυμα ιστιδίνης 0,5mM. Σε 1000ml απιονισμένου νερού προστίθενται 96mg ιστιδίνης. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121⁰C για 20 λεπτά και διατηρείται στους 4⁰C.
 - Διάλυμα Top άγαρ. Σε 1000ml απιονισμένου νερού προστίθενται 6gr άγαρ και 6gr χλωριούχου νατρίου. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121⁰C για 30 λεπτά και ακολουθεί προσθήκη κάτω από ασηπτικές συνθήκες 100ml διαλύματος ιστιδίνης 0,5mM.
 - Θρεπτικό υλικό Nutrient Broth (Merck). Σε 1000ml απιονισμένου νερού προστίθενται 8gr Nutrient Broth και το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121⁰C για 30 λεπτά.

Τυπική μέθοδος κατά Ames

Η τυπική μέθοδος (standard plate incorporation assay) του Ames χρησιμοποιήθηκε. 200μl από τα κύτταρα *S. typhimurium* TA102 που διατηρούνται στους -80⁰C προστίθενται σε 30 ml θρεπτικού υλικού Nutrient Broth, και τα κύτταρα αναπτύσσονται στους 37⁰C για 10-14 ώρες μέχρι η πυκνότητά τους να είναι 1-2X10⁹ μονάδες αποικιών ανά ml (CFU/ml). Η πυκνότητα προσδιορίζεται με φωτομέτρηση

στα 540nm. Τιμές οπτικής απορρόφησης μεταξύ 0.1 – 0.2 αντιστοιχούν σε $1-2 \times 10^9$ μονάδες αποικιών ανά ml. Στη συνέχεια, 100μl από την καλλιέργεια προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες 10ml που διατηρούνται στους 45⁰C και περιέχουν 2ml Top άγαρ, 50μl της μεταλλαξιγόνου ουσίας (μπλεομυκίνης ή H₂O₂) και 50μl της εξεταζόμενης ουσίας. Η διατήρηση αυτής της θερμοκρασίας είναι σημαντική γιατί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 48⁰C τα κύτταρα σκοτώνονται ενώ σε μικρότερη από 43⁰C πήζει το άγαρ. Το περιεχόμενο των σωλήνων αναδεύεται ήπια με vortex και απλώνεται στην επιφάνεια των τριβλίων που περιέχουν το Glucose Minimal άγαρ. Όταν το Top άγαρ στερεοποιηθεί (2-3 λεπτά), τα τριβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό κλίβανο στους 37⁰C για 48 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που αναπτύσσονται σε κάθε τριβλίο.

Κάθε πείραμα περιελάμβανε έναν αρνητικό μάρτυρα (καλλιέργειες που δεν περιείχαν καμία ουσία), ένα θετικό μάρτυρα (καλλιέργειες που περιείχαν μόνο τη μεταλλαξιγόνο ουσία) και ένα μάρτυρα που περιείχε μόνο την εξεταζόμενη ουσία στη μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Λόγω του ό,τι ορισμένες από τις εξεταζόμενες ουσίες ήταν διαλυμένες σε κάποιο διαλύτη (μεθανόλη, αιθανόλη ή DMSO), εξετάστηκε αν οι διαλύτες επηρεάζουν τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που προκύπτουν από αυτόματες μεταλλάξεις, καθώς επίσης και αν επηρεάζουν τη δράση των μεταλλαξιγόνων ουσιών. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που περιείχαν μόνο το διαλύτη καθώς και καλλιέργειες που περιείχαν τη μεταλλαξιγόνο ουσία και το διαλύτη. Για την εξέταση κάθε ουσίας έγιναν τουλάχιστον δύο πειράματα, σε καθένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση της ουσίας. Ο υπολογισμός

της % αναστολής ή επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης των εξεταζόμενων ουσιών έγινε με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

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

\bar{x} : ο μέσος όρος των επαναμεταλλαγμένων αποικιών παρουσία της εξεταζόμενης και της μεταλλαξιγόνου ουσίας.

\bar{x}_c : ο μέσος όρος των επαναμεταλλαγμένων αποικιών του θετικού μάρτυρα (της καλλιέργειας που περιείχε μόνο τη μεταλλαξιγόνο ουσία).

m : ο μέσος όρος των επαναμεταλλαγμένων αποικιών του αρνητικού μάρτυρα (της καλλιέργειας που δεν περιείχε καμία ουσία).

Επίσης, σε κάθε πείραμα γινότανε έλεγχος κυτταροτοξικότητας. Ο έλεγχος γίνεται με την παρατήρηση των τριβλίων στο οπτικό μικροσκόπιο (40X) για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός μη ορατού με γυμνό μάτι στρώματος αποικιών που σχηματίζεται από μη επαναμεταλλαγμένα κύτταρα. Το στρώμα αυτό σχηματίζεται από κύτταρα που είναι εξαρτώμενα από ιστιδίνη, τα οποία λόγω της πολύ μικρής ποσότητας ιστιδίνης που έχει προστεθεί στο Top άγαρ δεν μπορούν να σχηματίσουν μεγάλες αποικίες που να είναι ορατές στο γυμνό μάτι αλλά μπορούν να πραγματοποιήσουν 6-8 κυτταρικές διαιρέσεις και να σχηματίσουν ένα λεπτό στρώμα από μικρο-αποικίες. Όταν μία χημική ουσία έχει ήπια τοξικότητα τότε η πυκνότητα αυτού του στρώματος είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα τριβλία που δεν περιέχουν την ουσία. Σε περίπτωση έντονης τοξικότητας το στρώμα των μικρο-αποικιών απουσιάζει εντελώς και εμφανίζονται ορατές στο γυμνό μάτι αποικίες μη επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, οι οποίες όμως είναι μικρότερες σε μέγεθος από τις αποικίες των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων.

Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων για κάθε καλλιέργεια καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής ή της επαγωγής της μεταλλαξιγένεσης που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

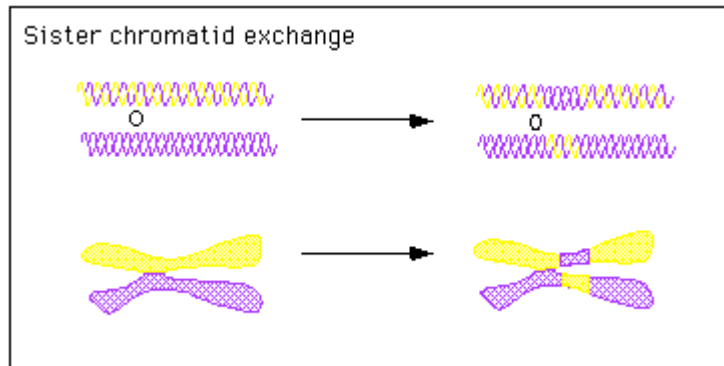
3.2.2.iii Ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges)

Γενικά

Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister Chromatid Exchanges ή SCEs) περιγράφηκαν περιγράφηκαν για πρώτη φορά, το 1958 από τον Taylor και τους συνεργάτες του (Taylor και συν. 1958). Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές είναι η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ απόλυτα ομόλογων θέσεων των δύο αδελφών χρωματίδων του χρωμοσώματος (Σχήμα 3.5). Αποτελούν ένα φυσικό φαινόμενο άμεσα συνδεδεμένο με την αντιγραφή του DNA. Έτσι σε υγιή άτομα ο αριθμός των SCEs είναι 8-9 ανά κύτταρο (Bender και συν. 1988). Η ανταλλαγή συμβαίνει κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου πριν οι χρωματίδες ξεχωρίσουν σε δύο αυτοτελή χρωμοσώματα. Προϋπόθεση για τη δημιουργία των SCEs είναι η ρήξη των αλυσίδων του DNA και η επανασύνδεσή τους (Κουρέτας 2003).

Η παρατήρηση των SCEs γίνεται στα μεταφασικά χρωμοσώματα, που απομονώνονται συνήθως από λεμφοκύτταρα του αίματος, με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Για να μπορέσουν οι SCEs να γίνουν ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο πρέπει να χρωματιστούν διαφορετικά οι δύο αδελφές χρωματίδες. Αυτό γίνεται με την ενσωμάτωση στο DNA της 5-βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) που είναι χημικό ανάλογο της θυμιδίνης (Zakharow και Egoлина 1972). Μετά από μία μιτωτική κυτταρική διαίρεση, λόγω του ημισυντηρητικού αυτοδιπλασιασμού του DNA, κάθε χρωματίδα αποτελείται από μία μητρική αλυσίδα DNA και από μία θυγατρική στην οποία έχει ενσωματωθεί η BrdU (Σχήματα 3.6, 3.7). Μετά από μία δεύτερη μιτωτική διαίρεση η μία χρωματίδα έχει ενσωματωμένη BrdU στη μία αλυσίδα γιατί χρησιμοποιεί σαν μητρική αλυσίδα αυτή που έχει θυμιδίνη. Ενώ η άλλη χρωματίδα έχει ενσωματωμένη BrdU και στις δύο αλυσίδες γιατί χρησιμοποιεί σαν μητρική αλυσίδα αυτή που έχει BrdU (Σχήματα 3.6, 3.7). Η χρώση των χρωματίδων γίνεται με την τεχνική Fluorescence plus Giemsa (FPG), με την οποία συνδυάζονται διαδοχικά χρώση των παρασκευασμάτων με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258, έκθεση των παρασκευασμάτων σε υπεριώδες φως ώστε να γίνει η φωτοχημική αντίδραση μεταξύ της BrdU και της Hoechst 33258 και στη συνέχεια χρώση με Giemsa (Perry και Wolff 1974). Ο συνδυασμός της BrdU με τη Hoechst 33258 παρεμποδίζει τη δράση της Giemsa. Συνεπώς, η Giemsa χρωματίζει σκούρα τη μία χρωματίδα που έχει ενσωματωμένη BrdU μόνο στη μία αλυσίδα ενώ η χρωματίδα που έχει BrdU και στις δύο αλυσίδες παραμένει ανοιχτόχρωμη (Σχήμα 3.7).

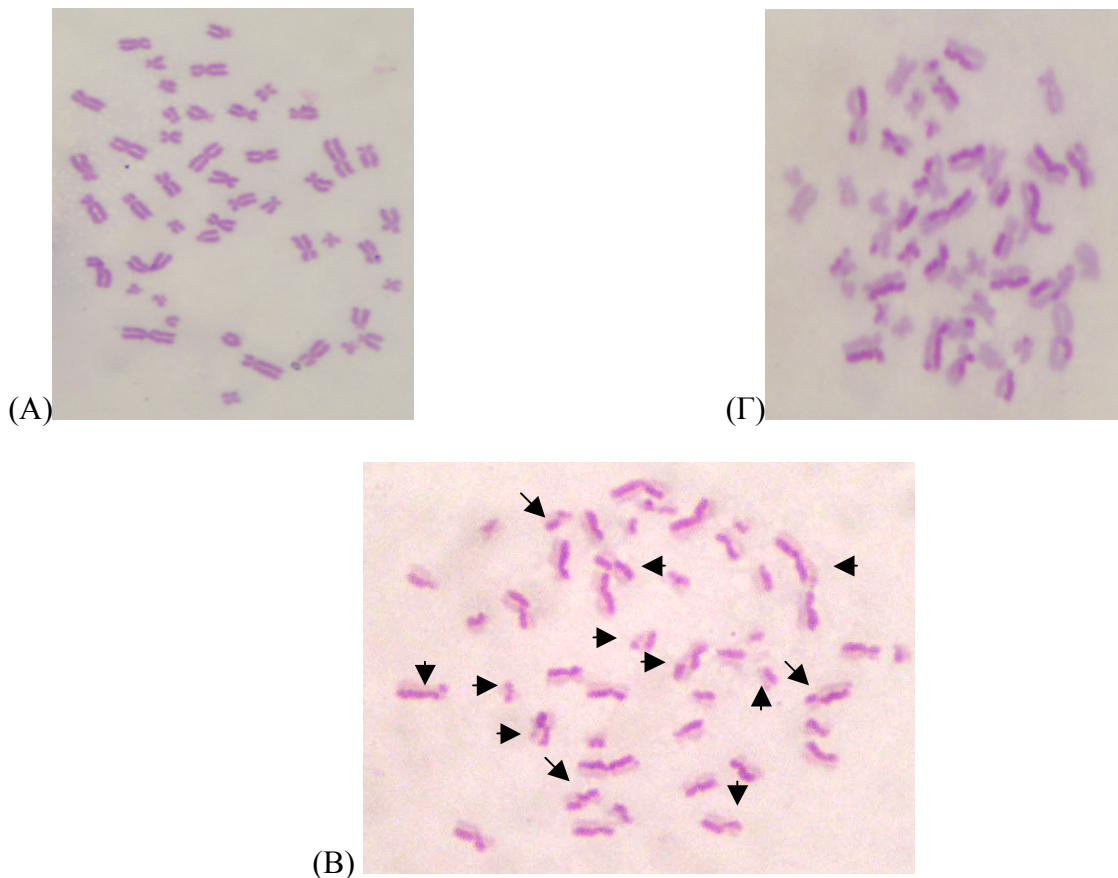
Οι SCEs αποτελούν μία εξαιρετικά ευαίσθητη δοκιμασία για τη διαπίστωση των βλαβών που προκαλούν ουσίες στο DNA των κυττάρων στη διάρκεια της συνθετικής φάσης S του κυτταρικού κύκλου (Latt 1974; Mourelatos και συν. 1983). Δηλαδή χρη-



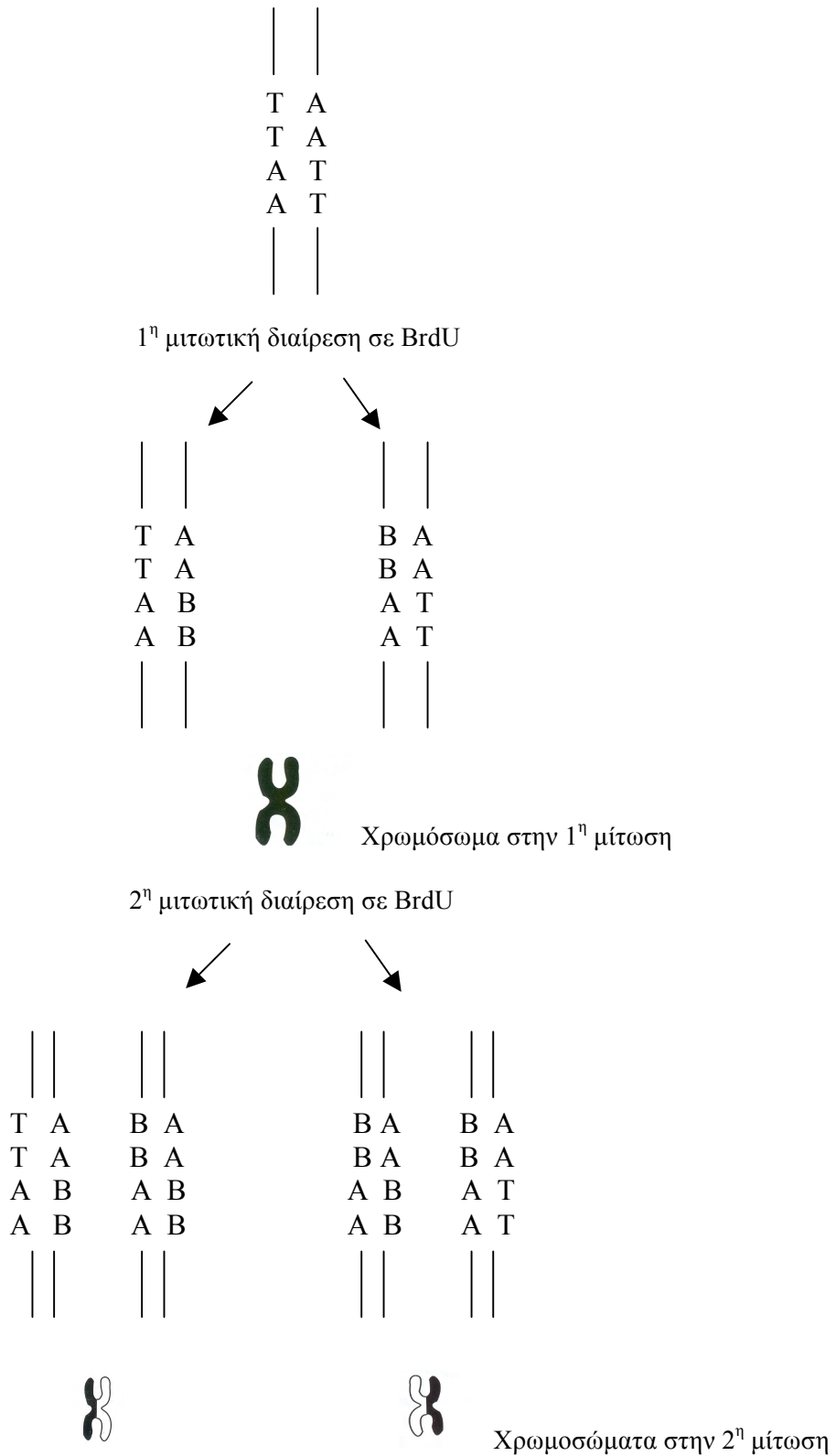
Σχήμα 3.5 Ανταλλαγή χρωμοσωμικού τμήματος μεταξύ δύο αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange).

σιμοποιούνται ως κυτταρογενετικός δείκτης για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ουσιών αν και αυτές καθαυτές οι SCEs δεν είναι μεταλλάξεις. Η αύξηση της συχνότητας των SCEs προκαλείται κυρίως από μεταλλαξιγόνα που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τις βάσεις του DNA (DNA adducts) ή παρεμβαίνουν στο μηχανισμό διπλασιασμού του DNA παρεμποδίζοντας τη δράση των ενζύμων που επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA. Ενδεικτικά, αύξηση στη συχνότητα των SCEs προκαλείται από το κάπνισμα (Evans 1982) και τα φυτοφάρμακα (Kourakis και συν., 1992). Η μέθοδος έχει μεγάλη ευαισθησία, δηλαδή υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να επισημανθεί η καρκινογόνος δράση μιας ουσίας, ενώ έχει μικρότερη εξειδίκευση δηλαδή μπορεί μία μη καρκινογόνος ουσία να δώσει θετικό αποτέλεσμα (Tennant και συν. 1987). Επίσης, αύξηση στον αριθμό των SCEs παρατηρείται σε ασθενείς με κληρονομικά νοσήματα που σχετίζονται με γενωμική αστάθεια (π.χ. σύνδρομο του Bloom, μελαγχρωματική ξηροδερμία), γεγονός που δείχνει ότι στη δημιουργία των SCEs παίζουν ρόλο οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των βλαβών του DNA (Mueller and Young 1998).

Γενικά, ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται αύξηση στον αριθμό των SCEs δεν είναι εντελώς γνωστός. Πιστεύεται ότι δημιουργούνται κοντά ή ακριβώς στο σημείο της διχάλας διπλασιασμού. Έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις, όπως ότι οι SCEs μπορεί να προκύπτουν από μετατόπιση μίας αλυσίδας του DNA σε μία διχάλα διπλασιασμού που έχει ακινητοποιηθεί (Sasaki 1980) ή ότι η τοποϊσομεράση II προκαλεί τη δημιουργία SCEs δημιουργώντας ταυτόχρονα σπασίματα και στις δύο αδελφές χρωματίδες κοντά στο σημείο της διχάλας διπλασιασμού με επακόλουθη επανασύνδεση (Painter 1980). Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination) ίσως είναι ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς που προκαλούν SCEs (Sonoda και συν. 1999).



Σχήμα 3.6 (Α) Πυρήνας 1^{ης} μιτωτικής διαίρεσης. Οι χρωματίδες σε όλα τα χρωμοσώματα είναι σκουρόχρωμες. (Β) Πυρήνας 2^{ης} μιτωτικής διαίρεσης. Σε όλα τα χρωμοσώματα η μία χρωματίδα είναι σκουρόχρωμη και η άλλη ανοιχτόχρωμη (εκτός από τα σημεία των χρωματιδιακών ανταλλαγών). Τα βέλη δείχνουν θέσεις χρωματιδιακών ανταλλαγών. (Γ) Πυρήνας 3^{ης} και μετέπειτα κυτταρικής διαίρεσης. Υπάρχουν χρωμοσώματα όπου και οι δύο χρωματίδες είναι ανοιχτόχρωμες.



Σχήμα 3.7 Διάγραμμα που δείχνει πως επιτυγχάνεται η διαφορετική χρώση των χρωματίδων με την ενσωμάτωση της BrdU λόγω του ημισυντηρητικού τρόπου αντιγραφής. A: Αδερίνη, T: Θυμίνη, B: BrdU.

Εκτός από την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών, οι SCEs χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων σε μελέτες *in vitro*, *in vivo* και συνδυασμένα *in vivo* – *in vitro* (Mourelatos 1983). Επίσης, οι SCEs χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών (Bhattacharya και συν. 2004; Ekmecki και συν. 1995). Έχει αποδειχτεί ότι ΔΜΟ όπως $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 αυξάνουν τον αριθμό των SCEs (Ray και Husain 2002), ενώ αντιοξειδωτικές ουσίες και συστατικά φυτικών τροφών καταστέλλουν την προηγούμενη αύξηση (Chakraborty και συν. 2003; Weitberg και συν. 1985).

Μηχανισμός δημιουργίας SCEs από τη μιτομυκίνη C

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε αν τα εκχυλίσματα αμπέλου και οι πολυφαινόλες μπορούσαν να αναστείλουν την αύξηση των SCEs που προκαλείται από το μεταλλαξιγόνο μιτομυκίνη C (MMC) σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Η μιτομυκίνη C είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές ενώσεις που προκαλούν αύξηση στη συχνότητα των SCEs (Latt 1974). Όπως αναφέρθηκε (παράγραφος 3.2.2.i), σε ελαφρώς όξινα υδατικά διαλύματα η αναγωγή της MMC από ένα e^- παρουσία ιόντων δισθενούς σιδήρου οδηγεί στην παραγωγή ΔΜΟ που προκαλούν ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Στο εσωτερικό όμως των κυττάρων η μιτομυκίνη C ανάγεται από ρεδοκτάσες με την προσθήκη ενός ή δύο e^- (Tomasz και συν. 1987). Η προσθήκη ενός e^- οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικινόνης ($\text{SQ}\cdot^-$), η οποία σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις μοριακού οξυγόνου έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και αντιδρά αμέσως με O_2 κατά την αντίδραση (3.2) της παραγράφου 3.2.2.i (Penketh και συν. 2001). Η προσθήκη όμως δύο e^- οδηγεί στο σχηματισμό μιας υδροκινόνης (QH_2) που είναι ενεργοποιημένη στις θέσεις C(1) και C(10) και μπορεί να δρα μέσω δύο θέσεων (bifunctional) ως αλκυλιωτικός παράγοντας του DNA (Σχήμα 3.2, σ. 110). Συγκεκριμένα αντιδρά ομοιοπολικά με τις εξωκυκλικές 2-

αμινομάδες δύο βάσεων G σε ακολουθίες CpG σχηματίζοντας χιάσματα μεταξύ των αλυσίδων του DNA (Σχήμα 3.3, σ. 113) που πιστεύεται ότι οδηγούν στο σχηματισμό SCEs (Paz και συν. 2004). Η ομοιοπολική σύνδεση της ενεργοποιημένης QH₂ με το DNA αναστέλλεται από ουσίες που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και άρα πιστεύεται ότι αυτές εμπλέκονται σε κάποιο στάδιο στο σχηματισμό των χιασμάτων και των SCEs από τη δράση της μιτομυκίνης C (Doi 1988).

Δείκτης πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI)

Η τεχνική με την οποία γίνεται καταμέτρηση των SCEs μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον υπολογισμό του δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Proliferation Rate Index ή PRI). Στην περίπτωση αυτή γίνεται καταμέτρηση 100 πυρήνων που μπορεί να βρίσκονται στην 1^η (M1), στη 2^η (M2) ή στην 3^η και μετέπειτα κυτταρικές διαιρέσεις (M3) (Σχήμα 3.6). Το PRI υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$PRI = (M1 + 2M2 + 3M3) / 100$$

Δηλαδή, το PRI είναι ο μέσος όρος του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων της καλλιέργειας και με βάση αυτόν το δείκτη μπορεί να εκτιμηθεί η κυτταροστατική ή κυτταροτοξική δράση μιας ουσίας (Ντόζη και Μουρελάτος 1989). Η ελάχιστη τιμή που μπορεί να πάρει το PRI είναι ίση με (1) που σημαίνει ότι υπάρχει μεγάλη κυτταροστατικότητα στην καλλιέργεια και τα κύτταρα δεν μπορούν να προχωρήσουν πέρα από την 1^η κυτταρική διαίρεση. Ενώ η μέγιστη τιμή του είναι ίση με (3) που δείχνει ότι τα κύτταρα διαιρούνται με υψηλό ρυθμό.

Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων

Για τις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων έγιναν αιμοληψίες από εθελοντές αιμοδότες με ηπαρινισμένη σύριγγα μιας χρήσεως κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Οι αιμοδότες ήταν υγιή άτομα (20-35 ετών), μη καπνιστές και τα οποία δεν

υποβάλλονταν σε φαρμακευτική αγωγή κατά την περίοδο της αιμοληψίας. Οι επόμενοι χειρισμοί έγιναν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow). 10 σταγόνες από το αίμα προστίθενται σε σωλήνες των 50ml που περιέχουν 5ml καλλιεργητικού υλικού RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 15% ορό από έμβρυο μύσχου, 4mM L-γλουταμίνη, 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 0,1ml φυτοαιμογλουτινίνη (PHA). Η PHA είναι μία μουκοπρωτεΐνη που δρα ως μιτογόνο διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Στις καλλιέργειες προστέθηκε και 5-βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37⁰C για 72 ώρες. 24 ώρες μετά την έναρξη της επώασης, προστίθεται στις καλλιέργειες 50μl μιτομυκίνης C σε συγκέντρωση 20ng/ml και 100μl από το διάλυμα των εξεταζόμενων ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Επίσης, κάθε πείραμα περιελάμβανε έναν αρνητικό μάρτυρα (καλλιέργειες που δεν περιείχαν καμία ουσία), ένα θετικό μάρτυρα (καλλιέργειες που περιείχαν μόνο τη μιτομυκίνη C) και ένα μάρτυρα που περιείχε μόνο την εξεταζόμενη ουσία στη μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνταν στο πείραμα. Για την εξέταση κάθε ουσίας πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα. Λόγω του ότι ορισμένες από τις εξεταζόμενες ουσίες ήταν διαλυμένες σε κάποιο διαλύτη (μεθανόλη, αιθανόλη ή DMSO), εξετάστηκε αν οι διαλύτες επηρεάζουν τον αριθμό των SCEs που προκύπτουν από τη δράση της μιτομυκίνης C. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που περιείχαν τη μιτομυκίνη C και το διαλύτη. 70 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας προστίθεται 50μl διαλύματος κολχικίνης σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και η επώαση συνεχίζεται για 2 ώρες ώστε τα κύτταρα να σταματήσουν στη φάση της μετάφασης.

Μετά τις 72 ώρες οι καλλιέργειες βγαίνουν από τον επωαστικό κλίβανο και ύστερα από ανάδευση μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15ml και

φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται σταγόνα-σταγόνα με ταυτόχρονη ανάδευση 5-7ml υποτονικού διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) 0,075M και αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υποτονικό διάλυμα συμβάλλει στην καταστροφή των ερυθροκυττάρων ενώ παράλληλα προκαλεί διόγκωση των λεμφοκυττάρων και βοηθάει έτσι στην καλύτερη διασπορά των χρωμοσωμάτων μέσα στα λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται σταγόνα-σταγόνα με σύγχρονη ανάδευση 5-7ml διαλύματος μονιμοποίησης (διάλυμα Fix) που αποτελείται από μεθανόλη και οξικό οξύ σε αναλογία 3:1 αντίστοιχα. Με τη διαδικασία της μονιμοποίησης σκοτώνονται τα κύτταρα και απομακρύνονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες, ενώ τα χρωμοσώματα διατηρούν τη μορφολογία τους. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Το στάδιο της προσθήκης του διαλύματος Fix και της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται τουλάχιστον άλλες δύο φορές ή μέχρι να γίνει ανοιχτόχρωμο το διάλυμα, γεγονός που δείχνει ότι έχουν απομακρυνθεί οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά υπολείμματα. Μετά την τελευταία φορά που προστίθεται διάλυμα Fix, δεν ακολουθεί φυγοκέντρωση αλλά τα παρασκευάσματα τοποθετούνται στους -20°C για τουλάχιστον 20 λεπτά. Στη συνέχεια τα παρασκευάσματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό, το υπερκείμενο απορρίπτεται έτσι ώστε να απομείνει ~0,5ml διαλύματος και το ίζημα εναιωρείται στο εναπομείνον διάλυμα με ανάδευση χρησιμοποιώντας πιπέττα Pasteur. 3-4 σταγόνες από το διάλυμα ενσταλλάζονται με πιπέττα Pasteur από ύψος τουλάχιστον ενός μέτρου σε αντικειμενοφόρες πλάκες (που διατηρούνται σε αιθανόλη στους $+4^{\circ}\text{C}$) οι οποίες στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Fluorescence plus Giemsa χρώση

Πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετείται για 12 λεπτά διάλυμα χρωστικής Hoechst 33258 συγκέντρωσης 100μg/ml. Απορρίπτεται η Hoechst, 2-3 σταγόνες διαλύματος McIlvaines pH 8,0 (παρασκευάζεται με ανάμιξη διαλύματος κιτρικού οξέος 0,1M και μονόξινου φωσφορικού νατρίου 0,25M σε αναλογία 15:85 αντίστοιχα) ενσταλλάζονται πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες και ακολουθεί η τοποθέτηση καλυπτρίδων. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται κάτω από λάμπα (Osram 300W) υπεριώδους φωτός για 1 ώρα και 15 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρούνται οι καλυπτρίδες και οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται για 8 λεπτά σε διάλυμα χρωστικής Giemsa 3%v/v (3ml Giemsa προστίθενται σε 97ml ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen pH 6,8). Μετά τη χρώση οι αντικειμενοφόρες ξεπλένονται με νερό βρύσης και αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX41 σε μεγέθυνση X100 (καταδυτικός φακός σε λάδι μικροσκοπίου).

Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για να υπολογιστεί η συχνότητα των SCEs ανά πυρήνα (δηλαδή ανά 46 χρωμοσώματα) σε μία καλλιέργεια, μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες 2^{ns} μιτωτικής διαίρεσης που περιείχαν τουλάχιστον 42 χρωμοσώματα και στη συνέχεια υπολογίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση. Στους πυρήνες που είχαν λιγότερα από 46 χρωμοσώματα, πολλαπλασιάζουμε τον ολικό αριθμό των ανταλλαγών επί 46 και διαιρούμε το γινόμενο με τον αριθμό των χρωμοσωμάτων.

Για να προσδιοριστεί η % αναστολή ή επαγωγή των εξεταζόμενων ουσιών στον αριθμό των SCEs που προκαλούνται από τη μιτομυκίνη C χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

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

\bar{x} : ο μέσος όρος των SCEs παρουσία της εξεταζόμενης ουσίας και της μιτομυκίνης C.

\bar{x}_c : ο μέσος όρος των SCEs του θετικού μάρτυρα (της καλλιέργειας που περιείχε μόνο μιτομυκίνη C).

m : ο μέσος όρος των SCEs του αρνητικού μάρτυρα (της καλλιέργειας που δεν περιείχε καμία ουσία).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των SCEs των διαφόρων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής ή της επαγωγής στον αριθμό των SCEs που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman.

Ο προσδιορισμός του PRI έγινε όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των τιμών του PRI των διαφόρων καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το χ^2 -test.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C

3.3.1.i Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C

Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα από την ποικιλία Ασύρτικο (άσπρα σταφύλια) ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,85, p < 0,01$ και $r = 0,87, p < 0,01$) τις προκαλούμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις του DNA καθώς παρεμπόδισαν τη

μετατροπή του υπερελικωμένου DNA σε χαλαρή μορφή (Πίνακες 3.1, 3.2 και Σχήματα 3.8, 3.9). Η ανασταλτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος ήταν 36 και 47% σε συγκέντρωση 200 και 400 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Το υδατικό εκχύλισμα παρουσίασε στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) αναστολή κατά 30% μόνο στα 400 $\mu\text{g/ml}$.

Τα εκχυλίσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) επίσης ανέστειλαν το σχηματισμό της χαλαρής μορφής του DNA που προκαλείται από τη δράση της μιτομυκίνης C. Συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη αναστολή ($r = 0,75, p < 0,01$) και η αναστολή ήταν 38% στατιστικά σημαντική στα 400 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 3.3 και Σχήμα 3.10). Επίσης, το μεθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη αναστολή ($r = 0,76, p < 0,01$), η τιμή της οποίας ήταν 19% στατιστικά σημαντική στα 400 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 3.4 και Σχήμα 3.11).

3.3.1.ii Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στην επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C

Σε αντίθεση με την ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά, τα πολυφαινολικά κλάσματα είτε δεν επηρέασαν είτε ενίσχυσαν την δράση της μιτομυκίνης C δείχνοντας προ-οξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα ενίσχυσε τις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C θραύσεις στο DNA αφού η χαλαρή και η γραμμική μορφή του DNA αυξήθηκαν σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C (Πίνακας 3.5 και Σχήμα 3.12). Η μέγιστη βλάβη στο DNA προκλήθηκε στα 200 $\mu\text{g/ml}$ όπου υπήρξε μερικός κατακερματισμός του πλασμιδιακού DNA όπως δείχνουν οι αχνές ζώνες DNA και στις τρεις μορφές του DNA, δηλαδή στην υπερελικωμένη, στη χαλαρή και στη γραμμική (Σχήμα 3.12, σειρά 5). Ενώ στα 400 και στα 600 $\mu\text{g/ml}$ η έκταση της βλάβης του DNA ήταν μικρότερη από ότι στα 200 $\mu\text{g/ml}$ (Σχήμα 3.12, σειρές 3-4 και Πίνακας

3.5). Μία παρόμοια επίδραση παρατηρήθηκε και στο μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα. Δηλαδή, στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, στα 200 και στα 400μg/ml, υπήρξε μερικός κατακερματισμός του DNA το οποίο δηλώνει μία προ-οξειδωτική δράση (Σχήμα 3.13, σειρές 5 και 6). Ωστόσο δεν υπήρξε σχεδόν καμία επίδραση στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C ρήξη του DNA στις μικρότερες (50 και 100μg/ml) καθώς και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (600μg/ml) (Σχήμα 3.13, σειρές 3, 4 και 7, Πίνακας 3.6). Καμία επίδραση στη δράση της μιτομυκίνης C δεν άσκησε το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα (Πίνακας 3.7).

3.3.1.iii Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση μιτομυκίνης C

Όπως τα πολυφαινολικά κλάσματα έτσι και οι πολυφαινόλες καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ ενίσχυσαν τη δράση της μιτομυκίνης C (Σχήματα 3.14, 3.15 και 3.16 αντίστοιχα και Πίνακες 3.8, 3.9 και 3.10 αντίστοιχα). Το καφεϊκό οξύ ενίσχυσε δόσοεξαρτώμενα το σχηματισμό γραμμικού DNA ($r = 0,89$, $p < 0,01$) (Πίνακας 3.8 και Σχήμα 3.14). Για παράδειγμα στα 100μM η ποσότητα του γραμμικού DNA αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά κατά 2,8 φορές σε σύγκριση με το δείγμα που περιείχε μόνο μιτομυκίνη C. Ενώ το φερουλικό οξύ (Πίνακας 3.10 και Σχήμα 3.16) και το κουμαρικό οξύ (Πίνακας 3.11) που έχουν παρόμοια χημική δομή με το καφεϊκό οξύ δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική επίδραση στη δράση της μιτομυκίνης C. Επίσης, καμία επίδραση δεν άσκησαν στη δράση της MMC η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη (Πίνακας 3.11). Το γαλλικό οξύ επίσης έδειξε δόσοεξαρτώμενη ($r = 0,89$, $p < 0,01$) προ-οξειδωτική δράση (Πίνακας 3.9 και Σχήμα 3.15). Στα 100μM γαλλικού οξέος η ποσότητα της χαλαρωμένης μορφής του DNA αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά κατά 1,5 φορές σε σύγκριση με το δείγμα που περιείχε μόνο μιτομυκίνη C (Πίνακας 3.9). Επιπροσθέτως, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ

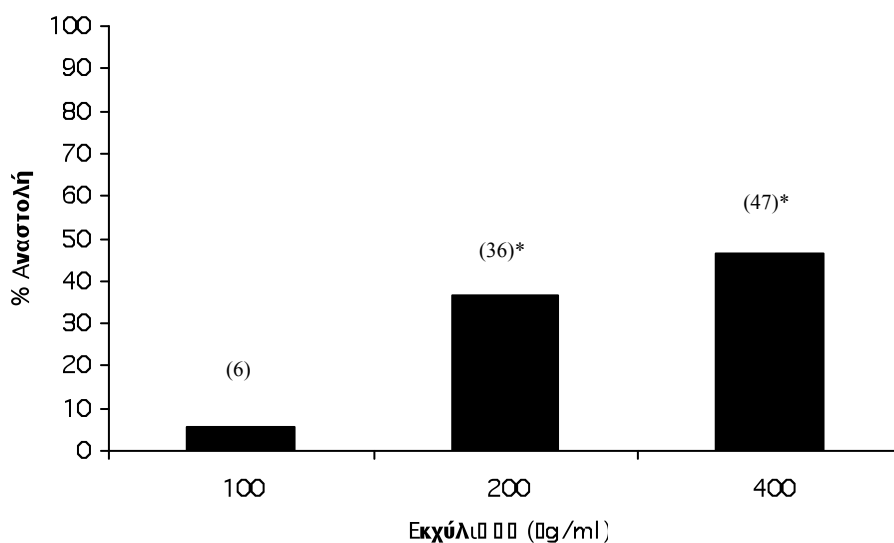
που έχει παρόμοια χημική δομή με το γαλλικό οξύ ενίσχυσε δοσοεξαρτώμενα ($r=0,89, p<0,01$) τη δράση της μιτομυκίνης C (Πίνακας 3.10 και Σχήμα 3.16). Στα 100 μ M η ποσότητα του γραμμικού DNA αυξήθηκε κατά 2,6 φορές σε σύγκριση με το δείγμα που περιείχε μόνο μιτομυκίνη C. Συνεπώς, η σειρά δραστηριότητας των εξεταζόμενων πολυφαινολών όσον αφορά την προ-οξειδωτική τους δράση στη συγκεκριμένη μέθοδο ήταν καφεϊκό οξύ > πρωτοκατεχοϊκό οξύ > γαλλικό οξύ > φερουλικό οξύ = κουμαρικό οξύ = (+)-κατεχίνη = (-)-επικατεχίνη.

Η ρουτίνη ήταν διαλυμένη σε μεθανόλη, η μέγιστη συγκέντρωση της οποίας στην τελική αντίδραση ήταν 1%v/v. Σε αυτή τη συγκέντρωση όμως η μεθανόλη ανέστειλε τη μετατροπή της υπερελικωμένης μορφής του DNA σε χαλαρή μορφή. Για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατή η εξέταση της ρουτίνης με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Για τον ίδιο λόγο δεν ήταν δυνατή και η εξέταση της κερκετίνης και της *trans*-ρεσβερατρόλης οι οποίες ήταν διαλυμένες σε DMSO. Το DMSO σε συγκέντρωση 0,1%v/v ανέστειλε τη μετατροπή της υπερελικωμένης μορφής του DNA σε χαλαρή μορφή.

Πίνακας 3.1 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA		
	SC ^a	OC ^a	Linear ^a
Αρνητικός μάρτυρας	98±2*	MA	MA
DNA+MMC ^b	29±3	71±3	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 100μg/ml	30±5	70±5	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 200μg/ml	54±6*	46±6*	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 400μg/ml	61±4*	39±4*	MA

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^bΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Linear: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

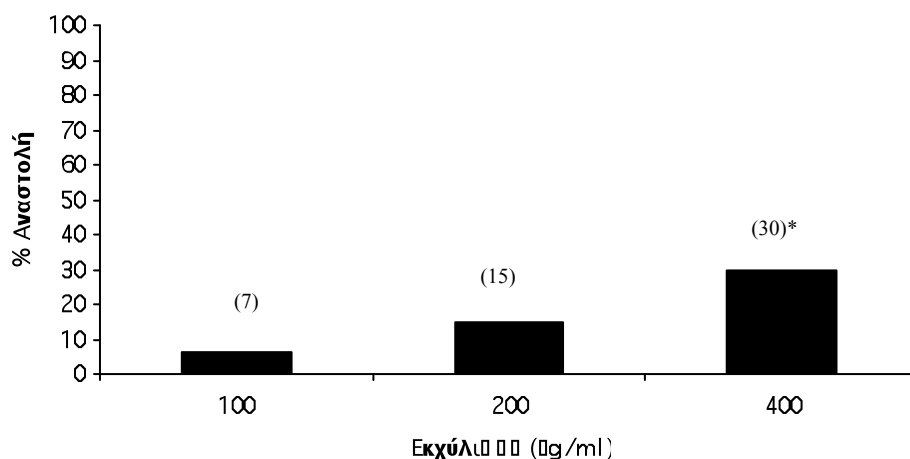


Σχήμα 3.8 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) έναντι των επαγόμενων από μιτομυκίνη C θραύσεων σε pGem-3z DNA. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.i. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.2 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA		
	SC ^a	OC ^a	Linear ^a
Αρνητικός μάρτυρας	90±3*	10±3*	MA
DNA+MMC ^b	29±3	71±3	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 100μg/ml	33±4	67±4	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 200μg/ml	38±5	62±5	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 400μg/ml	47±5*	53±5*	MA

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^bΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Linear: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

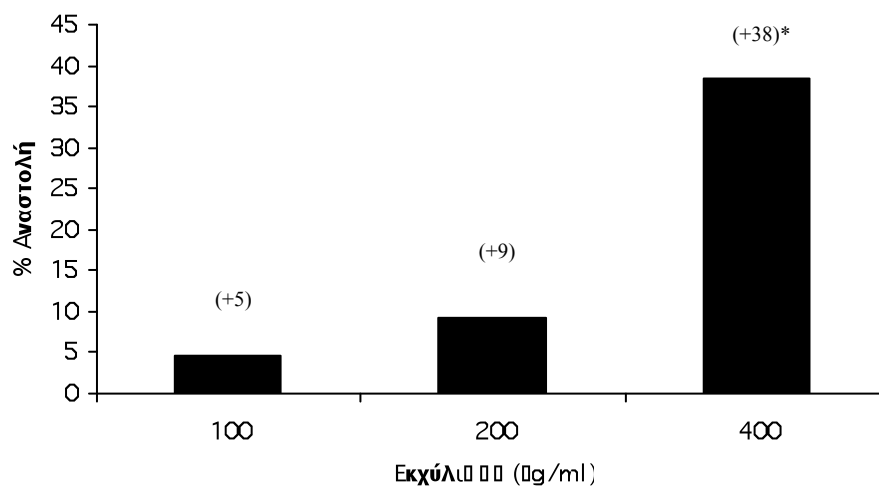


Σχήμα 3.9 Διάγραμμα που δείχνει την % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.i. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.3 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA		
	SC ^a	OC ^a	Linear ^a
Αρνητικός μάρτυρας	94±5*	6±5*	MA
DNA+MMC ^b	29±3	71±3	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 100μg/ml	32±8	68±8	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 200μg/ml	35±6	65±6	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 400μg/ml	54±5*	46±5*	MA

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^bΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Linear: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

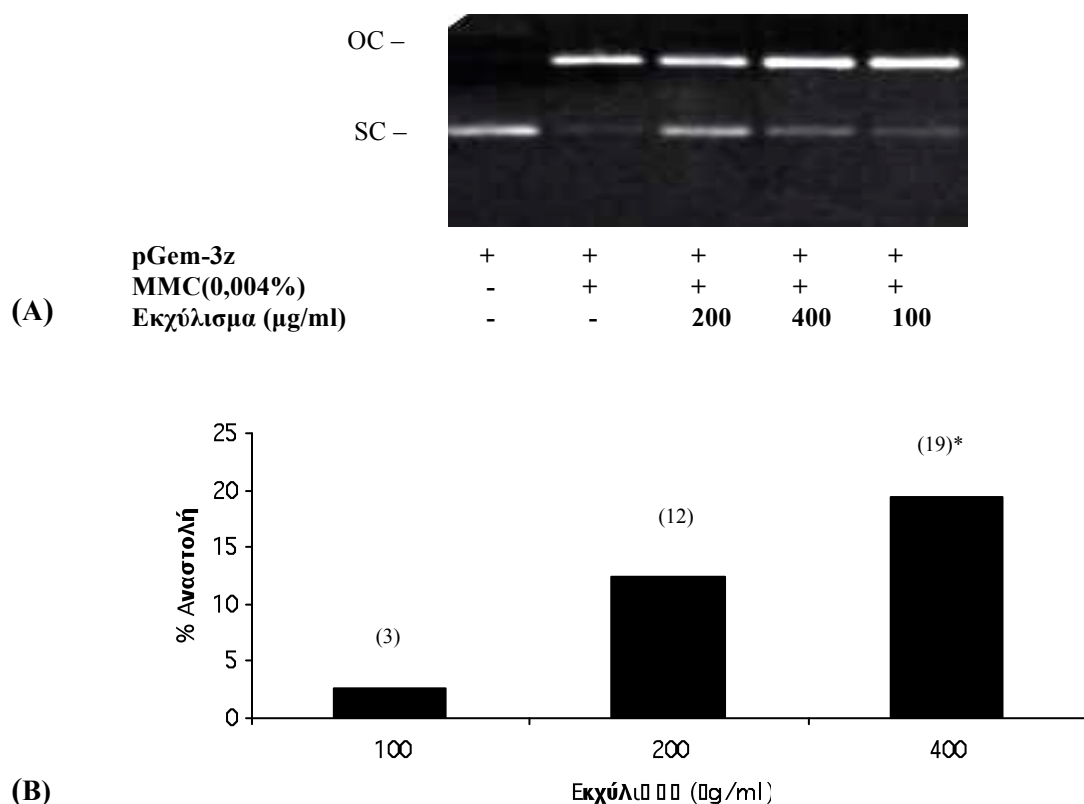


Σχήμα 3.10 Διάγραμμα που δείχνει την % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.i Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.4 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA		
	SC ^α	OC ^α	Linear ^α
Αρνητικός μάρτυρας	82±7*	18±7*	MA
DNA+MMC ^β	20±3	80±3	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 100μg/ml	22±5	78±5	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 200μg/ml	28±6	72±6	MA
DNA+MMC+Εκχύλισμα 400μg/ml	32±3*	68±3*	MA

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Linear: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

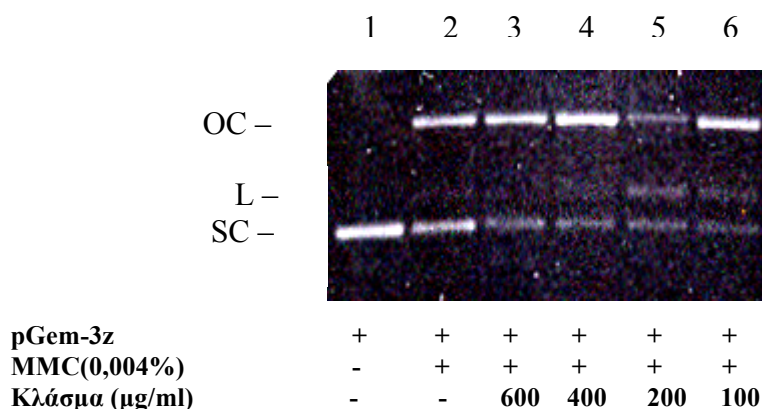


Σχήμα 3.11 Απεικονίζεται η επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι των επαγόμενων από μιτομυκίνη C θραύσεων σε pGem-3z DNA. (A) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. (B) Διάγραμμα που δείχνει την % αναστολή. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.i. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.5 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA				% Αναστολή/Επαγωγή ^γ			
	SC ^α	OC ^α	Lin ^α	OC+Lin ^α	SC ^α	OC ^α	Lin ^α	OC+Lin ^α
Αρνητικός μάρτυρας	98±2*	MA	MA	MA				
DNA+MMC ^β	41±2	51±2	8±4	59±6				
DNA+MMC+Κλάσμα 100μg/ml	18±2*	66±2*	16±1	82±3*	+40*	-29*	-100*	-39*
DNA+MMC+ Κλάσμα 200μg/ml	ΜΠ	ΜΠ	ΜΠ	ΜΠ	-	-	-	-
DNA+MMC+ Κλάσμα 400μg/ml	21±3*	64±4*	16±1	80±5*	+35*	-25*	-100*	-36*
DNA+MMC+ Κλάσμα 600μg/ml	28±1*	59±5	13±6	72±11*	+23*	-16*	-63*	-22*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.ι SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. ΜΠ: μη προσδιορίσιμο DNA λόγω μερικού κατακερματισμού. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

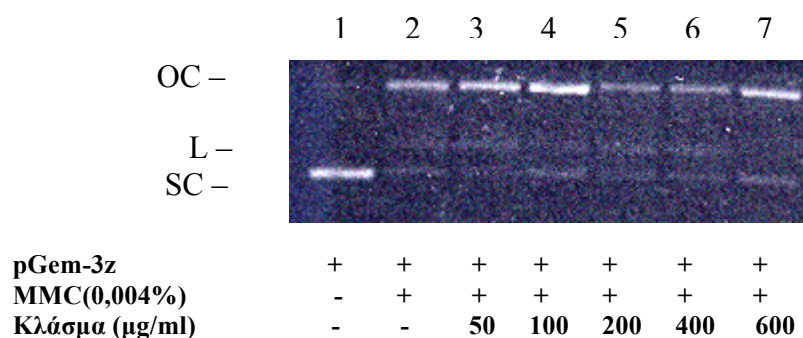


Σχήμα 3.12 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επώαστηκε για 1 ώρα στους 37⁰C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄·7H₂O), 78μM EDTA παρουσία ή απουσία 0,004% μιτομυκίνης C και διάφορων συγκεντρώσεων του κλάσματος. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; L: γραμμικό DNA.

Πίνακας 3.6 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA				% Αναστολή/Επαγωγή ^γ			
	SC ^α	OC ^α	Lin ^α	OC+Lin ^α	SC	OC	Lin	OC+Lin
Αρνητικός μάρτυρας	87±4*	13±4*	MA	13±4				
DNA+MMC ^β	14±3	71±3	15±5	86±8				
DNA+MMC+Κλάσμα 50μg/ml	9±3	74±5	17±2	91±7	+7	-5	-13	-7
DNA+MMC+ Κλάσμα 100μg/ml	16±2	72±1	11±3	83±4	-3	-2	+27	+4
DNA+MMC+ Κλάσμα 200μg/ml	ΜΠ	ΜΠ	ΜΠ	ΜΠ	-	-	-	-
DNA+MMC+ Κλάσμα 400μg/ml	ΜΠ	ΜΠ	ΜΠ	ΜΠ	-	-	-	-
DNA+MMC+ Κλάσμα 600μg/ml	20±3	80±3	MA	80±3	-8	-16	-	+8

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. ΜΠ: μη προσδιορισίμο DNA λόγω μερικού κατακερματισμού. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 3.13 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επώαστηκε για 1 ώρα στους 37⁰C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄.7H₂O), 78μM EDTA παρουσία ή απουσία 0,004% μιτομυκίνης C και διάφορων συγκεντρώσεων του κλάσματος. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; L: γραμμικό DNA.

Πίνακας 3.7 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

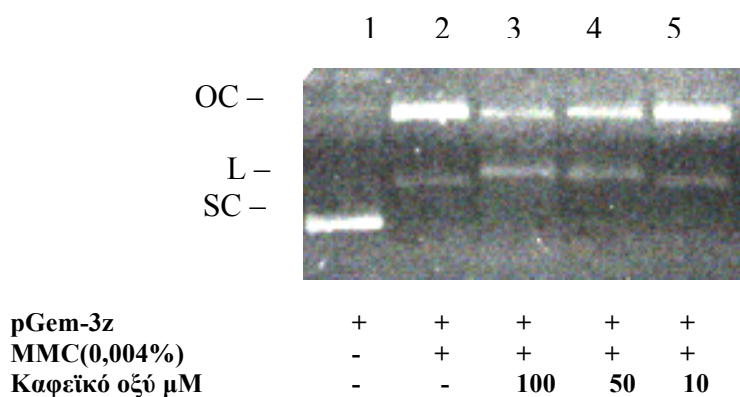
	% Ποσοστό του DNA			% Αναστολή/Επαγωγή ^γ	
	SC ^α	OC ^α	Linear ^α	SC	OC
Αρνητικός μάρτυρας	92±5*	18±5*	MA		
DNA+MMC ^β	19±4	81±4	MA		
DNA+MMC+Κλάσμα 50μg/ml	18±3	82±3	MA	+1	-1
DNA+MMC+ Κλάσμα 100μg/ml	15±5	85±5	MA	+5	-5
DNA+MMC+ Κλάσμα 200μg/ml	22±6	78±6	MA	-4	+4
DNA+MMC+ Κλάσμα 400μg/ml	18±6	82±6	MA	+1	-1
DNA+MMC+ Κλάσμα 600μg/ml	20±3	80±3	MA	-1	+1

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.8 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA			% Αναστολή/Επαγωγή ^γ		
	SC ^α	OC ^α	Lin ^α	SC ^α	OC ^α	Lin ^α
Αρνητικός μάρτυρας	97±5*	MA	MA			
DNA+MMC ^β	MA	92±2	8±2			
DNA+MMC+Καφεϊκό οξύ 10μM	MA	91±4	9±4	-	+1	-13
DNA+MMC+ Καφεϊκό οξύ 50μM	MA	81±3*	19±3*	-	+12*	-138*
DNA+MMC+ Καφεϊκό οξύ 100μM	MA	77±3*	23±3*	-	+16*	-188*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

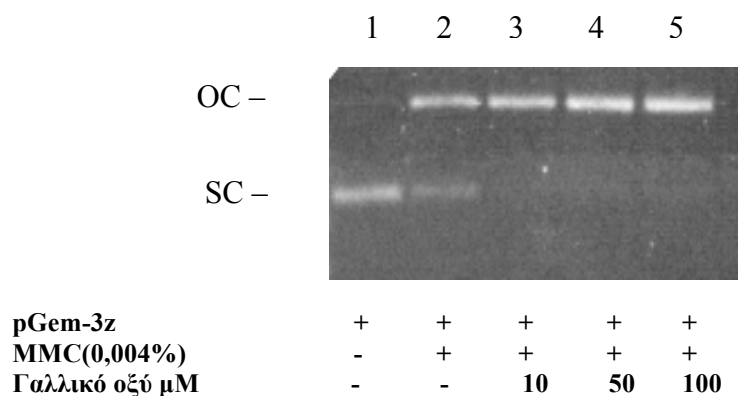


Σχήμα 3.14 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επώαστηκε για 1 ώρα στους 37°C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄·7H₂O), 78μM EDTA παρουσία ή απουσία 0,004% μιτομυκίνης C και διάφορων συγκεντρώσεων του καφεϊκού οξέος. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; L: γραμμικό DNA.

Πίνακας 3.9 Επίδραση του γαλλικού οξέος στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA			% Αναστολή/Επαγωγή ^γ		
	SC ^α	OC ^α	Lin ^α	SC ^α	OC ^α	Lin ^α
Αρνητικός μάρτυρας	98±2*	MA	MA			
DNA+MMC ^β	45±6	55±6	MA			
DNA+MMC+Γαλλικό οξύ 10μM	31±7	69±7	MA	+26	-25	-
DNA+MMC+Γαλλικό οξύ 50μM	20±7*	80±7*	MA	+47*	-45*	-
DNA+MMC+Γαλλικό οξύ 100μM	16±4*	84±4*	MA	+55*	-53*	-

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).

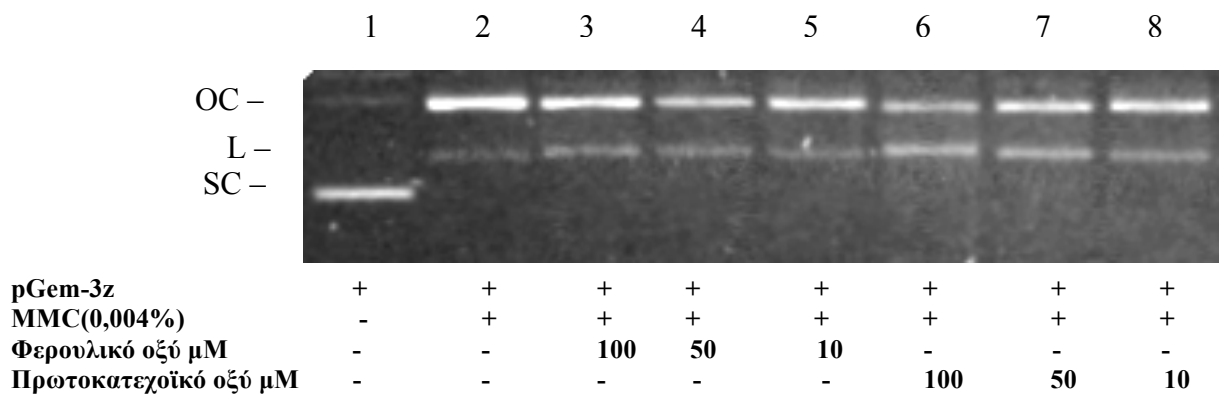


Σχήμα 3.15 Επίδραση του γαλλικού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επώαστηκε για 1 ώρα στους 37⁰C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄.7H₂O), 78μM EDTA παρουσία ή απουσία 0,004% μιτομυκίνης C και διάφορων συγκεντρώσεων του γαλλικού οξέος. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; L: γραμμικό DNA.

Πίνακας 3.10 Επίδραση του φερουλικού οξέος και πρωτοκατεχοϊκού οξέος στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA			% Αναστολή/Επαγωγή ^γ		
	SC ^α	OC ^α	Lin ^α	SC ^α	OC ^α	Lin ^α
Αρνητικός μάρτυρας	86±6*	14±6*	MA			
DNA+MMC ^β	MA	79±2	21±2			
DNA+MMC+Φερουλικό οξύ 10μM	MA	69±6	31±6	-	+13	-48
DNA+MMC+Φερουλικό οξύ 50μM	MA	67±5	33±5	-	+15	-57
DNA+MMC+Φερουλικό οξύ 100μM	MA	72±3	28±3	-	+9	-33
DNA+MMC+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 10μM	MA	63±4*	37±4*	-	+20*	-76*
DNA+MMC+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 50μM	MA	56±2*	44±2*	-	+29*	-110*
DNA+MMC+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 100μM	MA	45±5*	55±5*	-	+43*	-162*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικομένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. MA: <5%, μη ανιχνεύσιμη ζώνη DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 3.16 Επίδραση του φερουλικού οξέος και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στις επαγόμενες από μιτομυκίνη C θραύσεις σε pGem-3z DNA. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,9%. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης είναι από πάνω προς τα κάτω. Πλασμιδιακό DNA pGem-3z (38ng/10μl) επώαστηκε για 1 ώρα στους 37⁰C με 143μM θειϊκού σιδήρου (FeSO₄.7H₂O), 78μM EDTA παρουσία ή απουσία 0,004% μιτομυκίνης C και διάφορων συγκεντρώσεων των πολυφαινολών. SC: υπερελικομένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; L: γραμμικό DNA.

Πίνακας 3.11 Επίδραση της (+)-κατεχίνης, (-)-επικατεχίνης και του κουμαρικού οξέος στις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C (MMC) ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

	% Ποσοστό του DNA		% Αναστολή/Επαγωγή ^γ
	SC ^α	OC ^α	SC ^γ
Αρνητικός μάρτυρας	88±7*	12±7*	
DNA+MMC ^β	28±6	72±6	
DNA+MMC+Κατεχίνη 10μM	29±3	71±3	+2
DNA+MMC+Κατεχίνη 50μM	31±3	69±3	+4
DNA+MMC+Κατεχίνη 100μM	32±4	68±4	+7
DNA+MMC+Επικατεχίνη 10μM	30±8	60±8	+3
DNA+MMC+Επικατεχίνη 50μM	35±11	65±1	+12
DNA+MMC+Επικατεχίνη 100μM	36±9	64±9	+13
DNA+MMC+Κουμαρικό οξύ 10μM	24±4	76±4	-7
DNA+MMC+Κουμαρικό οξύ 50μM	37±7	63±7	+15
DNA+MMC+Κουμαρικό οξύ 100μM	32±6	68±6	+7

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού των τριών διαφορετικών μορφών του DNA, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της μιτομυκίνης C ήταν 0,004%. ^γΟι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή και οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο μιτομυκίνη C. Η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.i. SC: υπερελικωμένο DNA; OC: χαλαρωμένο DNA; Lin: γραμμικό DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pGem-3z και μιτομυκίνη C (θετικοί μάρτυρες). Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πολυφαινολών και του θετικού μάρτυρα (δείγμα που περιείχε μόνο μιτομυκίνη C).

3.3.2 Τεστ του Ames

3.3.2.i Επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης μπλεομυκίνης, χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,1, 0,5 και 1,5μg/τριβλίο) και προέκυψε η καμπύλη του σχήματος 3.17 που απεικονίζει τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση μπλεομυκίνης. Ως πιο κατάλληλη συγκέντρωση επιλέχτηκε τα 0,5μg/τριβλίο γιατί βρισκότανε στη γραμμική περιοχή της καμπύλης, ενώ παράλληλα προκαλούσε μία ικανοποιητική αύξηση στον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών.

Η μεθανόλη, η αιθανόλη και το DMSO χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση ορισμένων από τις εξεταζόμενες ουσίες. Η μέγιστη συγκέντρωση της μεθανόλης, της αιθανόλης και του DMSO στις καλλιέργειες ήταν 0,8, 0,06 και 2,5% αντίστοιχα. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις οι διαλύτες δεν επηρέαζαν τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών παρουσία ή απουσία της μπλεομυκίνης.

3.3.2.ii Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102.

Τα εκχυλίσματα, υδατικά και μεθανολικά, και των δύο εξεταζόμενων ποικιλιών αμπέλου παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή έναντι της προκαλούμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) ανέστειλε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) και δόσοεξαρτώμενα ($r = -0,91$, $p < 0,01$) κατά 42, 60 και 69% τη δράση της μπλεομυκίνης σε συγκεντρώσεις 0,3, 3 και 6mg ανά τριβλίο αντίστοιχα (Σχήμα 3.18 και Πίνακας 3.12). Το υδατικό εκχύλισμα της ίδιας ποικιλίας παρουσίασε στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) και δόσοεξαρτώμενη ($r = -0,96$, $p < 0,01$)

αναστολή στις συγκεντρώσεις των 3 και 6mg/τριβλίο κατά 66 και 75% αντίστοιχα (Σχήμα 3.19 και Πίνακας 3.13). Επίσης, κανένα από τα παραπάνω εκχυλίσματα δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών απουσία μπλεομυκίνης και δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακες 3.12, 3.13).

Επιπρόσθετα, το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια), ανέστειλε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) και δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,91$, $p < 0,01$) την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση κατά 57 και 75% σε συγκεντρώσεις 3 και 6mg/τριβλίο αντίστοιχα (Σχήμα 3.20 και Πίνακας 3.14). Το υδατικό εκχύλισμα της ίδιας ποικιλίας, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή ($p < 0,05$) κατά 35% μόνο στη συγκέντρωση των 6mg/τριβλίο (Σχήμα 3.21 και Πίνακας 3.15). Επίσης, στις συγκεντρώσεις των 0,3 και 3mg/τριβλίο υπήρξε τάση προς αναστολή με αποτέλεσμα ο συντελεστής συσχέτισης r του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών και της συγκέντρωσης αυτού του εκχυλίσματος να έχει μία υψηλή αρνητική τιμή ($r = -0,88$, $p < 0,01$). Κανένα από τα παραπάνω εκχυλίσματα δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών απουσία μπλεομυκίνης και δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακες 3.14, 3.15).

3.3.2.iii Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102.

Σε αντίθεση με την ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Μανδηλαριά έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης, τα πολυφαινολικά κλάσματα της ίδιας ποικιλίας είτε δεν επηρέασαν είτε ενίσχυσαν τη δράση της μπλεομυκίνης. Συγκεκριμένα, τα μεθανολικά κλάσματα από το

μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα δεν επηρέασαν σημαντικά τη δράση της μπλεομυκίνης (Σχήματα 3.22 και 3.23 αντίστοιχα και Πίνακες 3.16 και 3.17 αντίστοιχα). Αντίθετα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα ενίσχυσε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) και δόσοεξαρτώμενα ($r = 0,86$, $p < 0,01$) τη μεταλλαξιγένεση (Σχήμα 3.24 και Πίνακας 3.18). Για παράδειγμα, η επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ήταν 51% στα 0,3mg/ml (Σχήμα 3.24).

Κανένα από τα παραπάνω κλάσματα δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών απουσία μπλεομυκίνης και δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακες 3.16, 3.17 και 3.18).

3.3.2.iv Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102.

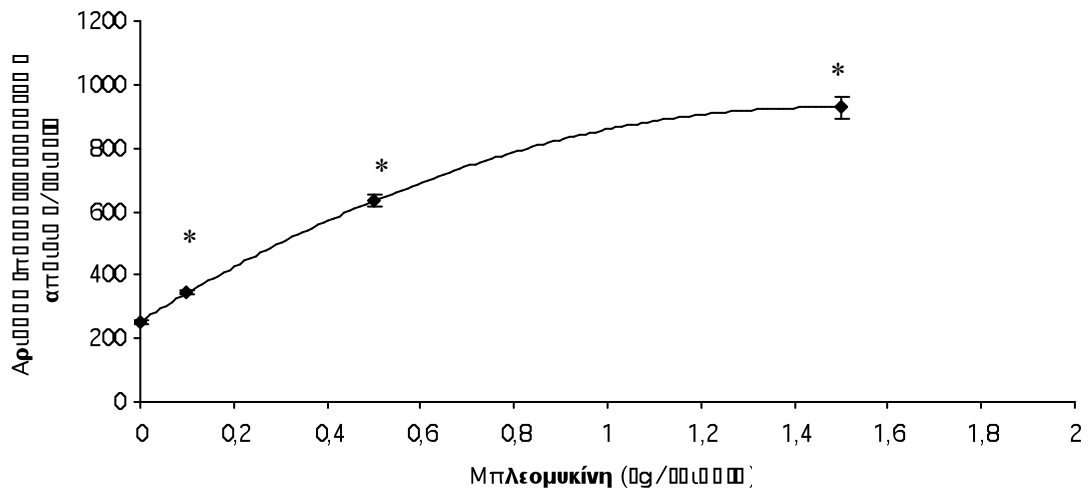
Όπως τα πολυφαινολικά κλάσματα, έτσι και οι πολυφαινόλες είτε δεν επηρέασαν τη δράση της μπλεομυκίνης είτε ενίσχυσαν την προκαλούμενη μεταλλαξιγένεση. Συγκεκριμένα, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, η ρουτίνη, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και το κουμαρικό οξύ δεν άσκησαν καμία σημαντική επίδραση στη δράση της μπλεομυκίνης σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 και 500μM (Σχήματα 3.25-3.31 αντίστοιχα και Πίνακες 3.19-3.25 αντίστοιχα).

Από την άλλη μεριά, η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη ενίσχυσαν τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης. Η κερκετίνη στα 100μM προκάλεσε επαγωγή στη δράση της μπλεομυκίνης κατά 19% και η παρατηρούμενη επαγωγή ήταν δόσοεξαρτώμενη ($r = 0,83$, $p < 0,01$) (Σχήμα 3.32). Ήταν αξιοσημείωτο πως η κερκετίνη παρουσίασε μεταλλαξιγόνο δράση στα 100μM κατά 22% ακόμη και απουσία μπλεομυκίνης (Πίνακας 3.26). Αυτό σημαίνει πως πιθανώς η ενίσχυση της μεταλλαξιγόνου δράσης της μπλεομυκίνης από την κερκετίνη οφείλεται σε

αθροιστική δράση και όχι σε συνεργική. Επίσης, η ρεσβερατρόλη ενίσχυσε δόσοεξαρτώμενα ($r = 0,88, p < 0,01$) τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που προκαλούνται από τη μπλεομυκίνη (Πίνακας 3.27). Στη συγκέντρωση των 500μM η αύξηση ήταν 47% (Σχήμα 3.33). Σε αντίθεση με την κερκετίνη, η ρεσβερατρόλη δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων απουσία μπλεομυκίνης (Πίνακας 3.27) και κατά συνέπεια η παρατηρούμενη επαγωγή οφείλεται πιθανώς σε μία συνεργική δράση μεταξύ ρεσβερατρόλης και μπλεομυκίνης.

Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το καφεϊκό οξύ που ανέστειλε τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης (Σχήμα 3.34 και Πίνακας 3.28). Η αναστολή ήταν δόσοεξαρτώμενη ($r = -0,95, p < 0,01$) με στατιστικά σημαντικές τιμές 21, 32, 48 και 61% σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 και 500μM αντίστοιχα (Σχήμα 3.34). Ενώ το φερουλικό και το κουμαρικό οξύ που έχουν παρόμοια χημική δομή με το καφεϊκό οξύ δεν επηρέασαν όπως αναφέρθηκε τη δράση της μπλεομυκίνης.

Από τις παραπάνω πολυφαινόλες, η κερκετίνη παρουσίασε κυτταροτοξικότητα στα 500μM παρουσία αλλά και απουσία μπλεομυκίνης (Πίνακας 3.26). Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε η κερκετίνη έδειξε μεταλλαξιγόνο δράση στα 100μM απουσία μπλεομυκίνης. Οι υπόλοιπες πολυφαινόλες δεν παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα και δεν επηρέασαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που προκαλούνται από αυτόματες μεταλλάξεις (Πίνακες 3.19-3.25 και 3.27, 3.28).

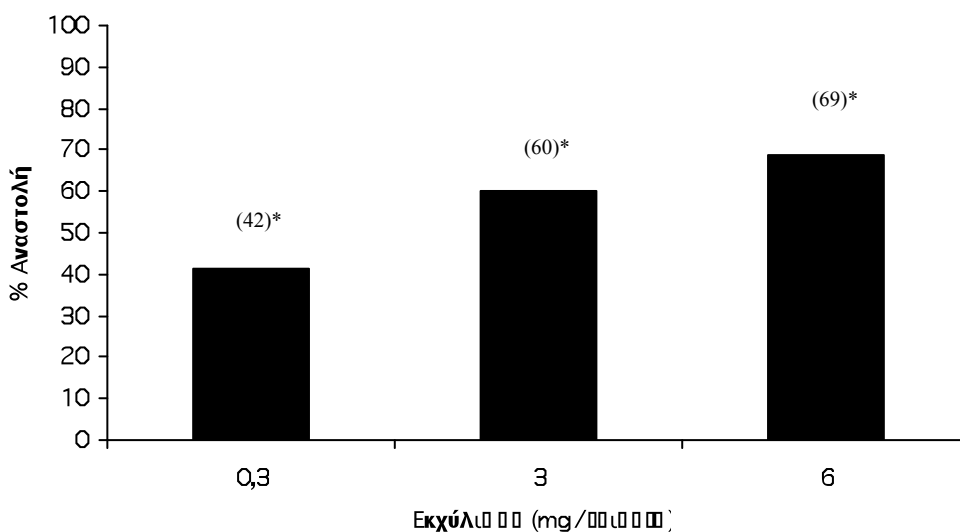


Σχήμα 3.17 Μεταλλαξιγένεση της μπλεομυκίνης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Απεικονίζονται οι μέσες τιμές \pm την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων/τριβλίο. Οι τιμές προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για την κάθε συγκέντρωση. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν μπλεομυκίνη (αρνητικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.12 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			360 ± 9
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	367 ± 14
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	306 ^γ ± 30
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	179 ^γ ± 17*
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	122 ^γ ± 31*
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	96 ^γ ± 4*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

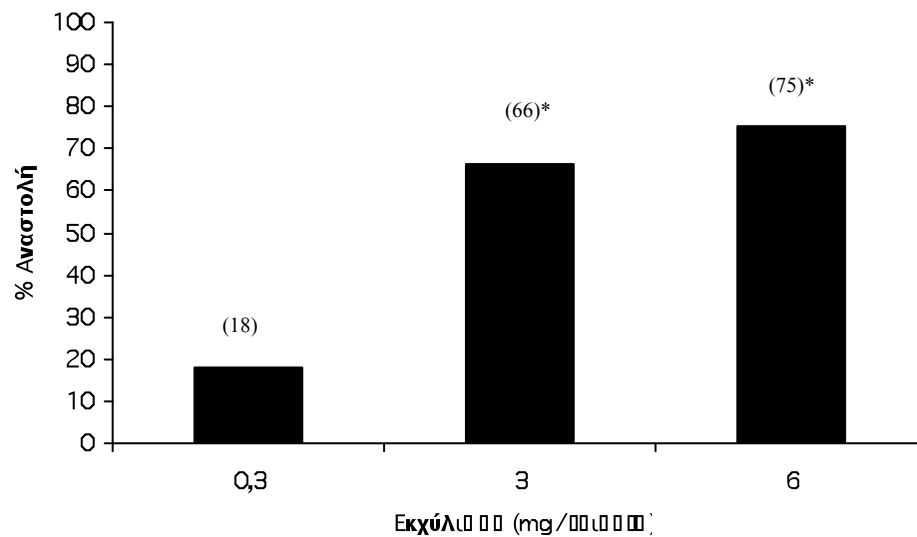


Σχήμα 3.18 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.13 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			390 ± 26
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	373 ± 17
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	428 ^γ ± 57
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	350 ^γ ± 56
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	144 ^γ ± 46*
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	106 ^γ ± 8*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

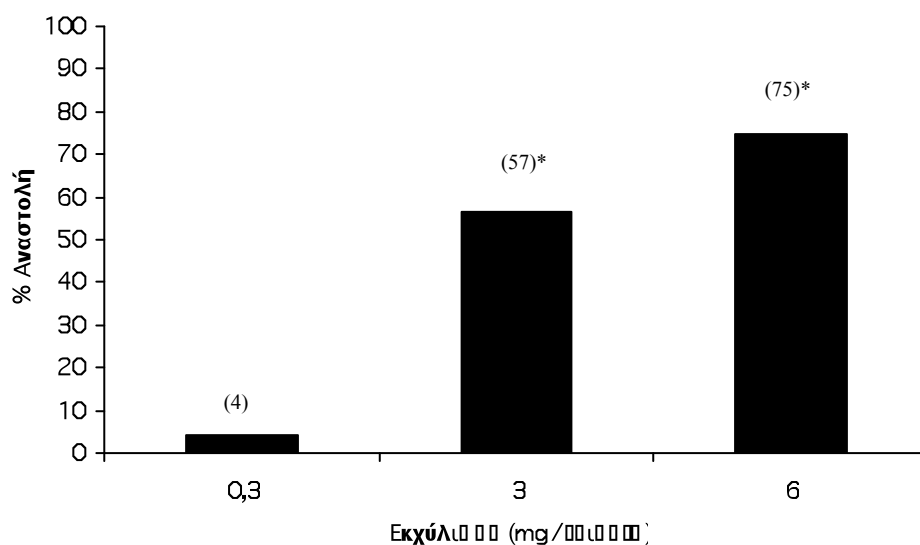


Σχήμα 3.19 Απεικονίζεται η % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.14 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			339 ± 26
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	320 ± 12
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	426 ^γ ± 45
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	408 ^γ ± 15
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	185 ^γ ± 44*
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	107 ^γ ± 11*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

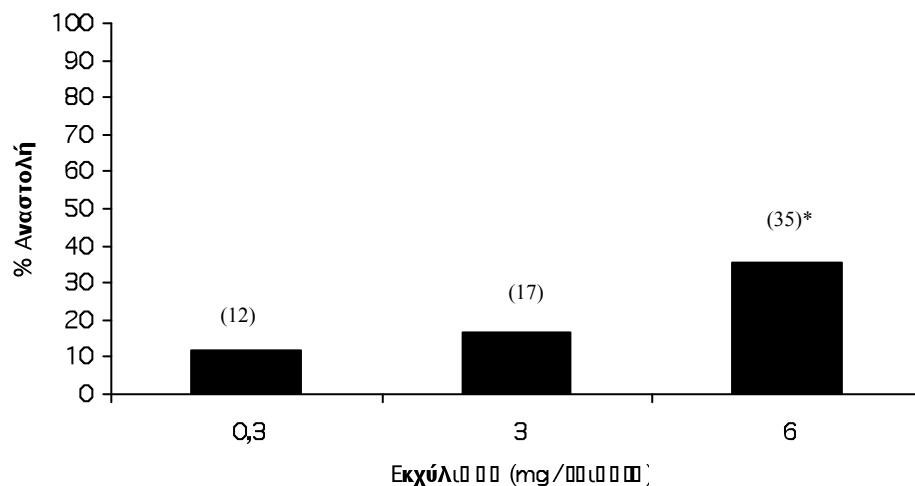


Σχήμα 3.20 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.15 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			335 ± 14
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	298 ± 18
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	240 ^γ ± 14
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	211 ^γ ± 28
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	200 ^γ ± 38
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	Μπλεομυκίνη	155 ^γ ± 11*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).



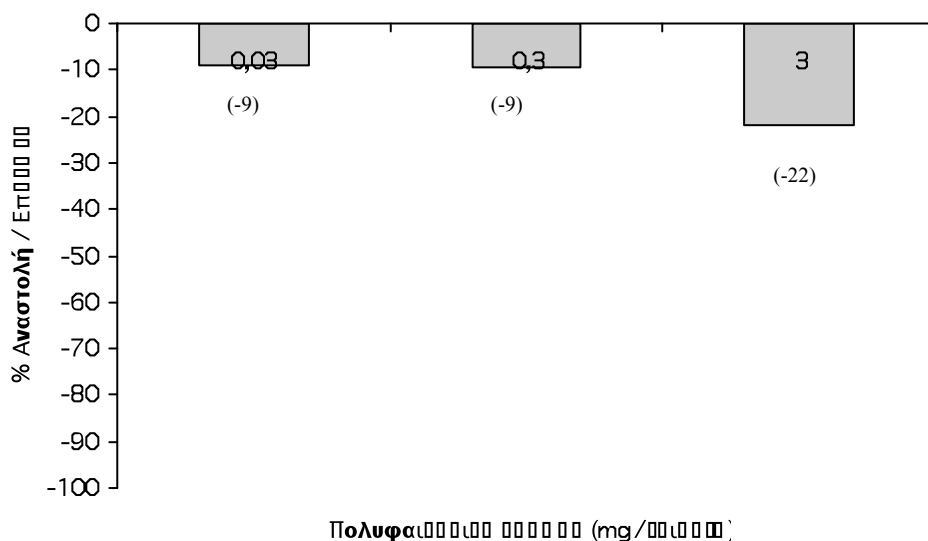
Σχήμα 3.21 Απεικονίζεται η % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.16 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας		302	± 10
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ -	319	± 25
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	258 ^γ	± 31
Κλάσμα 0,03mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	281 ^γ	± 34
Κλάσμα 0,3mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	282 ^γ	± 50
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	315 ^γ	± 59

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



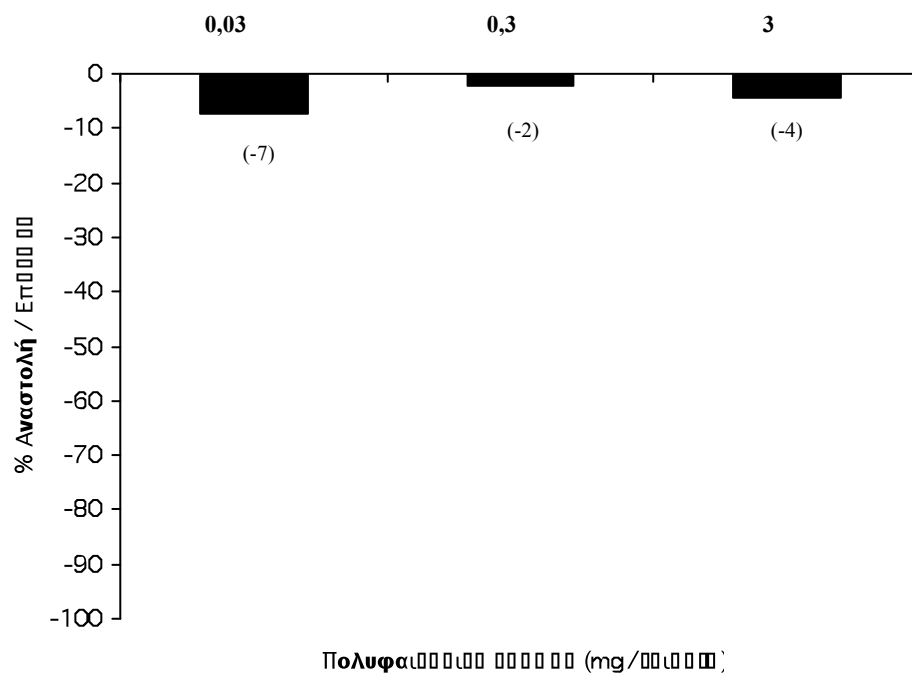
Σχήμα 3.22 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.17 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας		280 ± 16
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ -	316 ± 20
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	402 ^γ ± 45
Κλάσμα 0,03mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	432 ^γ ± 12
Κλάσμα 0,3mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	411 ^γ ± 41
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	419 ^γ ± 7

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση.

^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

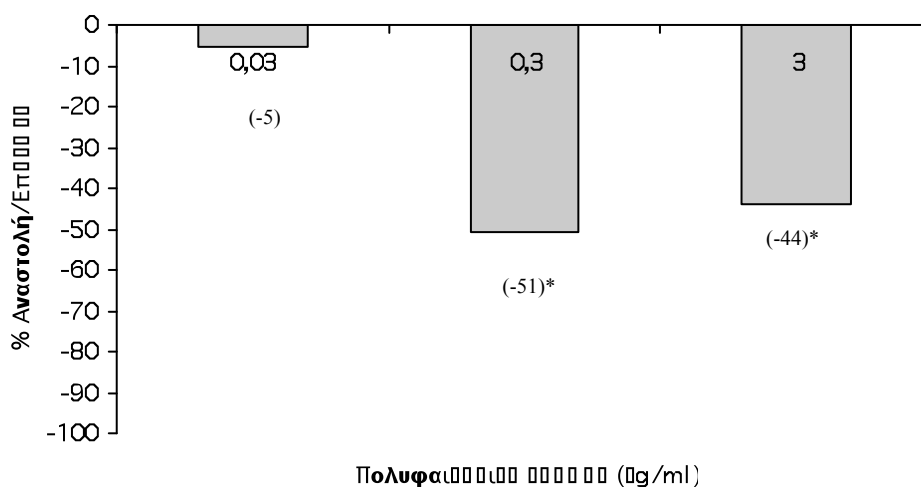


Σχήμα 3.23 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.18 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας		334 ± 12
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ -	362 ± 25
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	209 ^γ ± 7
Κλάσμα 0,03mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	220 ^γ ± 13
Κλάσμα 0,3mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	315 ^γ ± 23*
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ Μπλεομυκίνη	301 ^γ ± 19*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

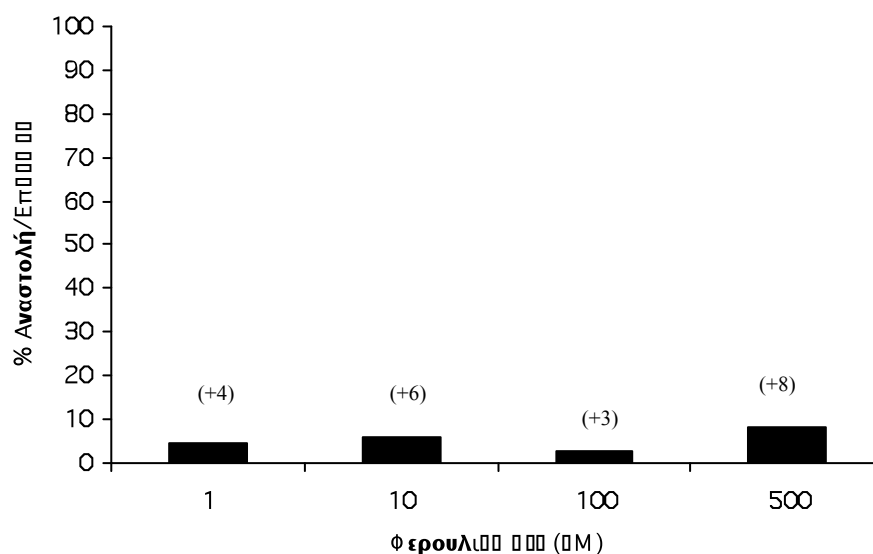


Σχήμα 3.24 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιογένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.19 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a	
Αρνητικός μάρτυρας		324	± 17
Φερουλικό οξύ 500μM	+ -	321	± 19
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	315 ^γ	± 15
Φερουλικό οξύ 1μM	+ Μπλεομυκίνη	301 ^γ	± 22
Φερουλικό οξύ 10μM	+ Μπλεομυκίνη	297 ^γ	± 35
Φερουλικό οξύ 100μM	+ Μπλεομυκίνη	306 ^γ	± 27
Φερουλικό οξύ 500μM	+ Μπλεομυκίνη	289 ^γ	± 45

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

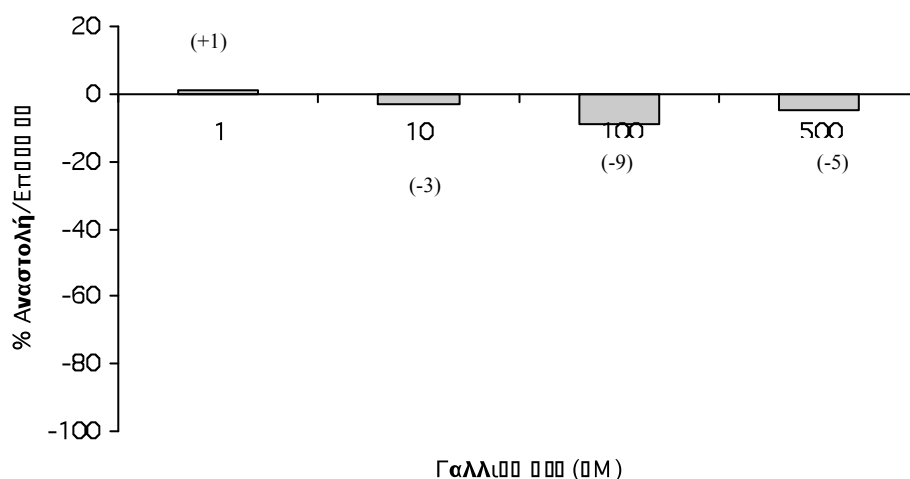


Σχήμα 3.25 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του φερουλικού οξέος έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.20 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a		
Αρνητικός μάρτυρας		316	±	27
Γαλλικό οξύ 500μM	+ -	324	±	30
-	+ Μπλεομυκίνη ^b	314 ^γ	±	45
Γαλλικό οξύ 1μM	+ Μπλεομυκίνη	311 ^γ	±	17
Γαλλικό οξύ 10μM	+ Μπλεομυκίνη	323 ^γ	±	8
Γαλλικό οξύ 100μM	+ Μπλεομυκίνη	342 ^γ	±	26
Γαλλικό οξύ 500μM	+ Μπλεομυκίνη	330 ^γ	±	14

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^bΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

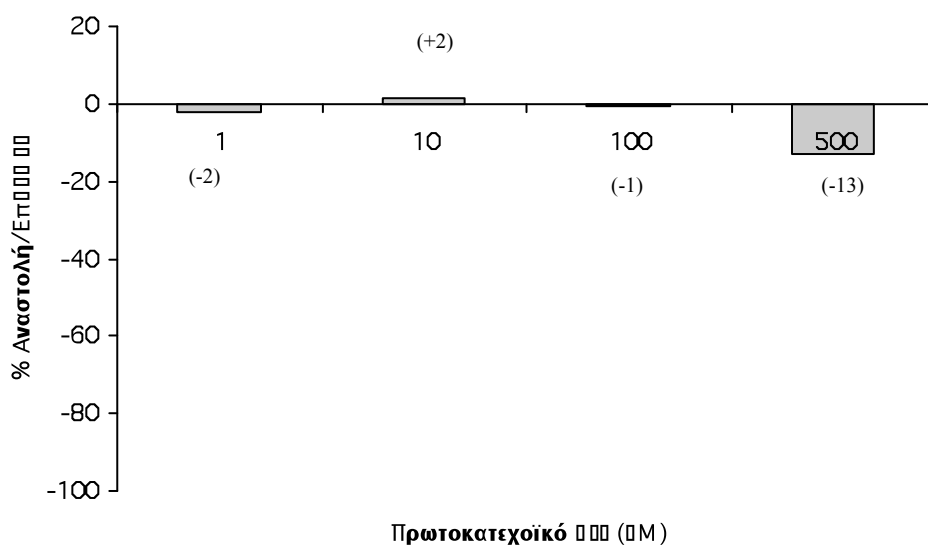


Σχήμα 3.26 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του γαλλικού οξέος έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.21 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a	
Αρνητικός μάρτυρας		316	± 27
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 500μM	+ -	308	± 9
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	314 ^γ	± 45
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 1μM	+ Μπλεομυκίνη	320 ^γ	± 7
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 10μM	+ Μπλεομυκίνη	309 ^γ	± 14
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 100μM	+ Μπλεομυκίνη	316 ^γ	± 10
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 500μM	+ Μπλεομυκίνη	354 ^γ	± 14

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

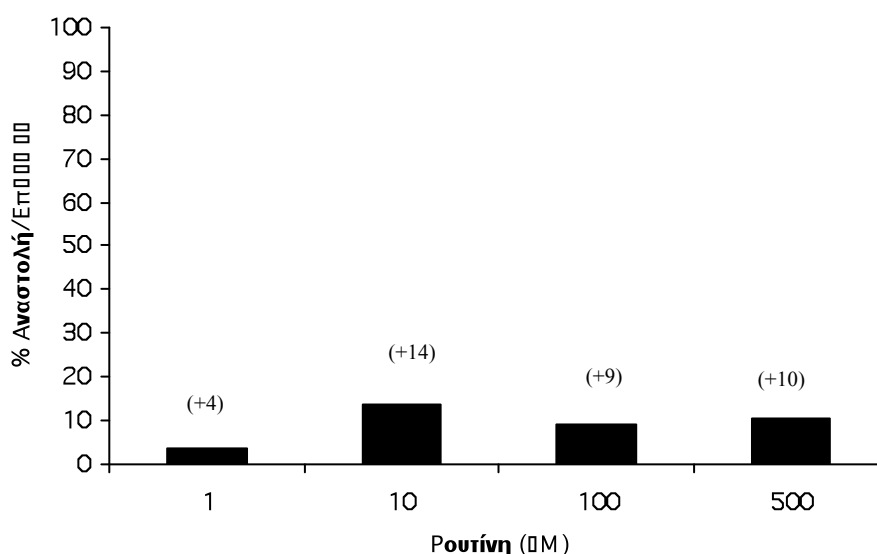


Σχήμα 3.27 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.22 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a
Αρνητικός μάρτυρας		231 ± 10
Ρουτίνη 500μM	+ -	223 ± 18
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	224 ^γ ± 36
Ρουτίνη 1μM	+ Μπλεομυκίνη	216 ^γ ± 21
Ρουτίνη 10μM	+ Μπλεομυκίνη	193 ^γ ± 31
Ρουτίνη 100μM	+ Μπλεομυκίνη	204 ^γ ± 18
Ρουτίνη 500μM	+ Μπλεομυκίνη	201 ^γ ± 34

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

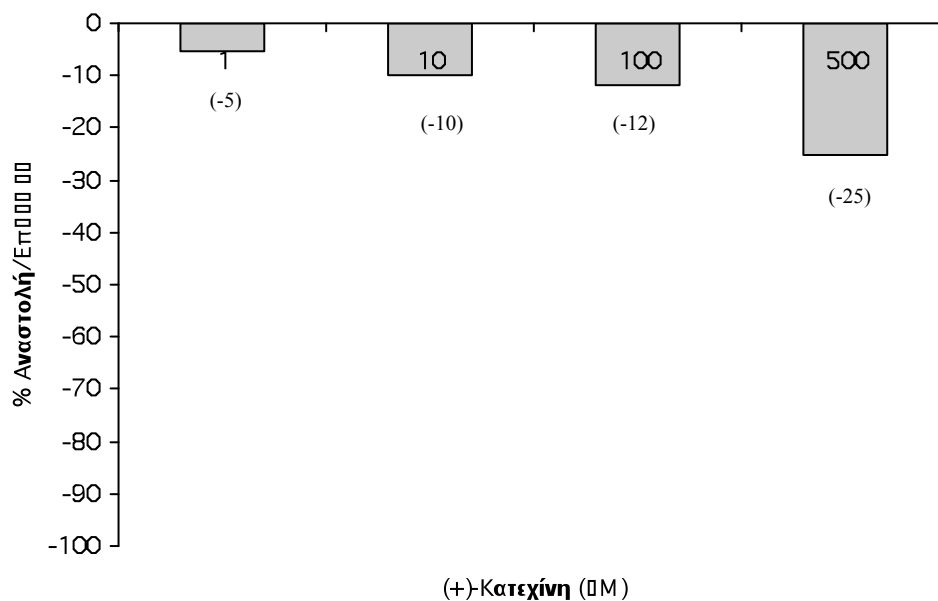


Σχήμα 3.28 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της ρουτίνης έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.23 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a	
Αρνητικός μάρτυρας		266	± 16
(+)-Κατεχίνη 500μM	+ -	277	± 41
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	332 ^γ	± 44
(+)-Κατεχίνη 1μM	+ Μπλεομυκίνη	350 ^γ	± 14
(+)-Κατεχίνη 10μM	+ Μπλεομυκίνη	365 ^γ	± 46
(+)-Κατεχίνη 100μM	+ Μπλεομυκίνη	371 ^γ	± 30
(+)-Κατεχίνη 500μM	+ Μπλεομυκίνη	415 ^γ	± 65

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

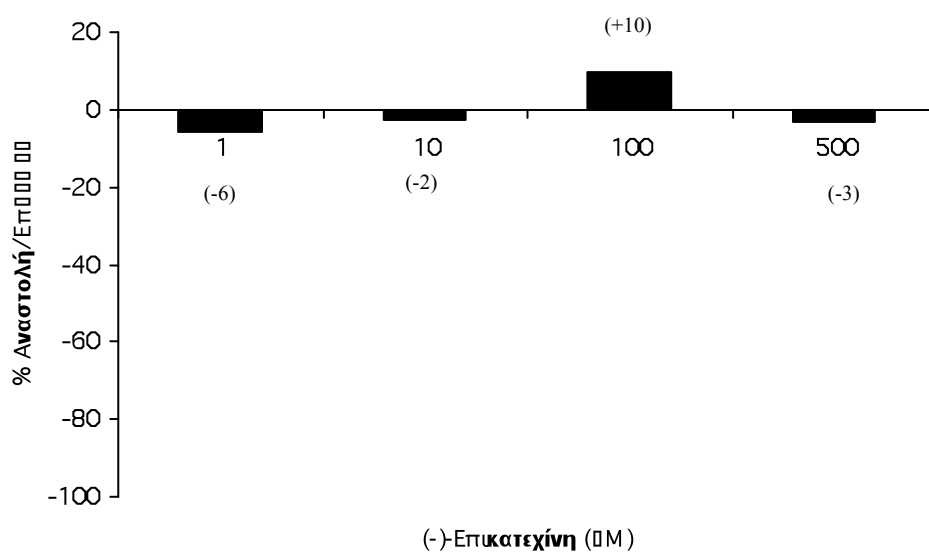


Σχήμα 3.29 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της (+)-κατεχίνης έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.24 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a	
Αρνητικός μάρτυρας		373	± 41
(-)-Επικατεχίνη 500μΜ	+ -	354	± 19
-	+ Μπλεομυκίνη ^b	416 ^γ	± 22
(-)-Επικατεχίνη 1μΜ	+ Μπλεομυκίνη	439 ^γ	± 38
(-)-Επικατεχίνη 10μΜ	+ Μπλεομυκίνη	426 ^γ	± 14
(-)-Επικατεχίνη 100μΜ	+ Μπλεομυκίνη	376 ^γ	± 37
(-)-Επικατεχίνη 500μΜ	+ Μπλεομυκίνη	429 ^γ	± 23

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^bΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

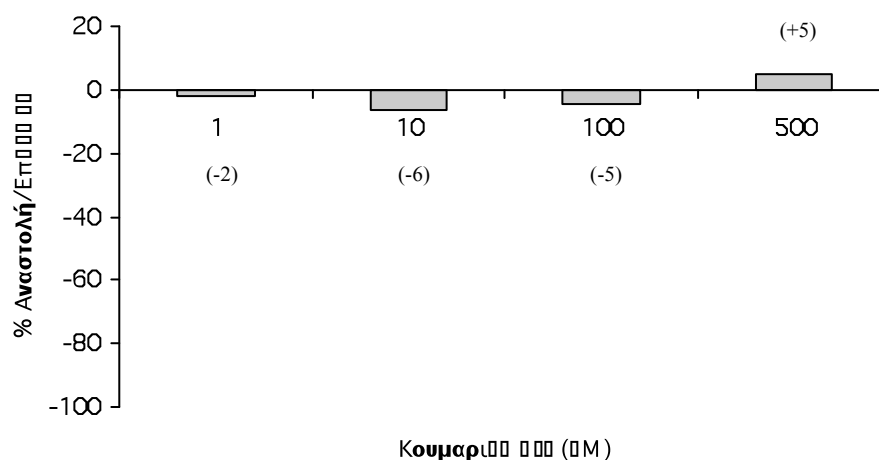


Σχήμα 3.30 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της (-)-επικατεχίνης έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.25 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας			316	± 27
Κουμαρικό οξύ 100μM	+	-	318	± 12
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	314 ^γ	± 45
Κουμαρικό οξύ 1μM	+	Μπλεομυκίνη	321 ^γ	± 20
Κουμαρικό οξύ 10μM	+	Μπλεομυκίνη	334 ^γ	± 17
Κουμαρικό οξύ 100μM	+	Μπλεομυκίνη	329 ^γ	± 9
Κουμαρικό οξύ 500μM	+	Μπλεομυκίνη	298 ^γ	± 34

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

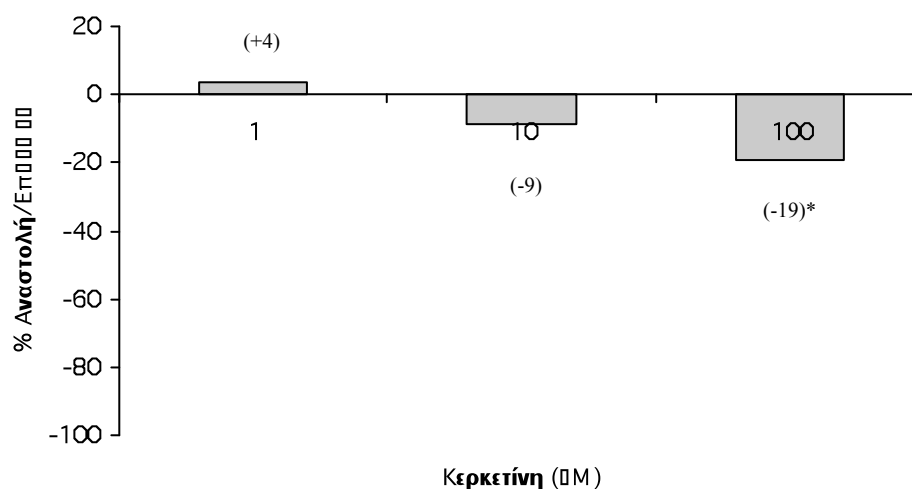


Σχήμα 3.31 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του κουμαρικού οξέος έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.26 Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a
Αρνητικός μάρτυρας			344 ± 36
Κερκετίνη 500μΜ	+	-	κυτταροτοξικότητα
Κερκετίνη 100μΜ	+	-	419 ± 23 ^{**}
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	386 ^γ ± 8
Κερκετίνη 1μΜ	+	Μπλεομυκίνη	371 ^γ ± 21
Κερκετίνη 10μΜ	+	Μπλεομυκίνη	419 ^γ ± 20
Κερκετίνη 100μΜ	+	Μπλεομυκίνη	460 ^γ ± 6 [*]
Κερκετίνη 500μΜ	+	Μπλεομυκίνη	κυτταροτοξικότητα

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα.

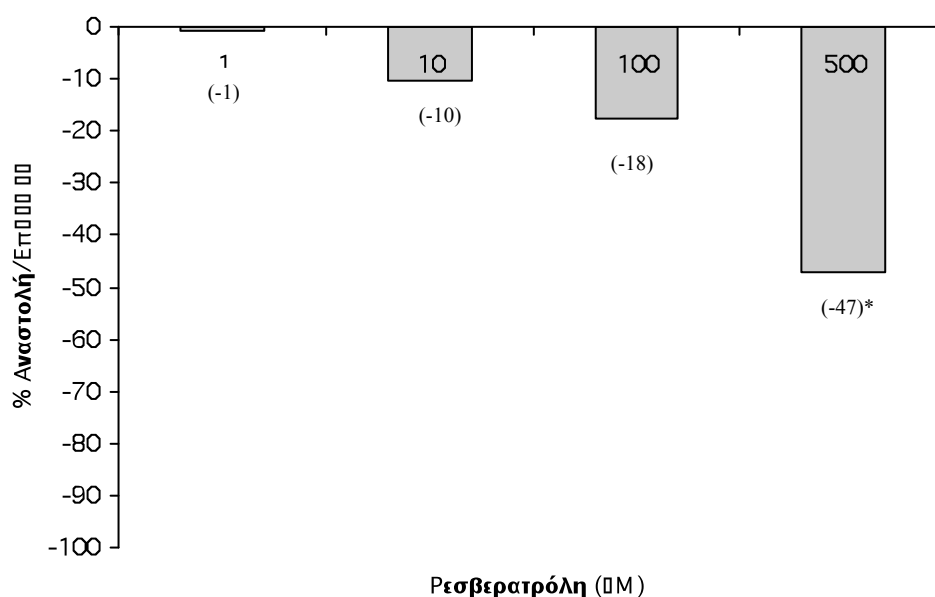


Σχήμα 3.32 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της κερκετίνης έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.27 Επίδραση της *trans*-ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a	
Αρνητικός μάρτυρας		320	± 11
Ρεσβερατρόλη 500μΜ	+ -	347	± 31
-	+ Μπλεομυκίνη ^β	494 ^γ	± 31
Ρεσβερατρόλη 1μΜ	+ Μπλεομυκίνη	497 ^γ	± 13
Ρεσβερατρόλη 10μΜ	+ Μπλεομυκίνη	545 ^γ	± 31
Ρεσβερατρόλη 100μΜ	+ Μπλεομυκίνη	582 ^γ	± 48
Ρεσβερατρόλη 500μΜ	+ Μπλεομυκίνη	727 ^γ	± 40*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

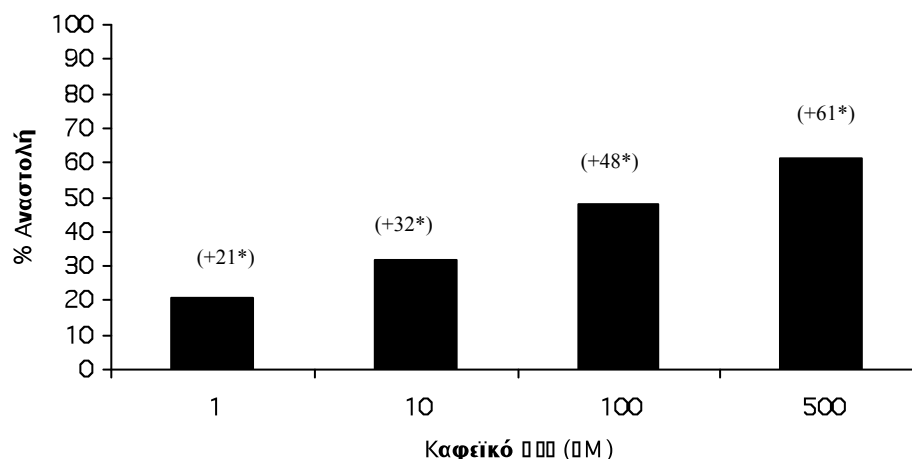


Σχήμα 3.33 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της *trans*-ρεσβερατρόλης έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.28 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a	
Αρνητικός μάρτυρας			324	± 18
Καφεϊκό οξύ 500μΜ	+	-	327	± 29
-	+	Μπλεομυκίνη ^β	315 ^γ	± 15
Καφεϊκό οξύ 1μΜ	+	Μπλεομυκίνη	249 ^γ	± 25*
Καφεϊκό οξύ 10μΜ	+	Μπλεομυκίνη	214 ^γ	± 32*
Καφεϊκό οξύ 100μΜ	+	Μπλεομυκίνη	164 ^γ	± 19*
Καφεϊκό οξύ 500μΜ	+	Μπλεομυκίνη	122 ^γ	± 14*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ήταν 0,5μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 3.34 Απεικονίζεται η % αναστολή του καφεϊκού οξέος έναντι της επαγόμενης από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο μπλεομυκίνη (θετικοί μάρτυρες).

3.3.2.v Επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης H₂O₂ που θα χρησιμοποιούνταν για να εξεταστεί η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων και των πολυφαινολών, σχεδιάστηκε μία καμπύλη που απεικονίζει τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων σε συνάρτηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (15, 35, 70 και 100μg/τριβλίο) (Σχήμα 3.35). Η συγκέντρωση που επιλέχτηκε ήταν τα 100μg/τριβλίο καθώς οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν τοξικές για τα κύτταρα ενώ οι μικρότερες δεν προκαλούσαν ικανοποιητική αύξηση στον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων.

Η μεθανόλη, και το DMSO χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση ορισμένων από τις εξεταζόμενες ουσίες. Η μέγιστη συγκέντρωση της μεθανόλης και του DMSO στις καλλιέργειες ήταν 2,5, και 0,5% αντίστοιχα. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις οι διαλύτες δεν επηρέαζαν τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών παρουσία ή απουσία του H₂O₂.

3.3.2.vi Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102.

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα και των δύο ποικιλιών, όπως και στα πειράματα με τη μπλεομυκίνη, ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την προκαλούμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση (κόκκινα σταφύλια: $r = -0,90$, $p < 0,01$; άσπρα σταφύλια: $r = -0,92$, $p < 0,01$). Το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) ανέστειλε τη μεταλλαξιγένεση κατά 69%, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) κατά 82% σε συγκέντρωση 6mg/τριβλίο (Πίνακες 3.29 και 3.30 αντίστοιχα και Σχήματα 3.36 και 3.37 αντίστοιχα). Αντίθετα, το υδατικό εκχύλισμα από τα κόκκινα σταφύλια ενίσχυσε τη μεταλλαξιγόνο δράση του H₂O₂ δοσοεξαρτώμενα

($r = 0,98, p < 0,01$) (Σχήμα 3.38). Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (6mg/τριβλίο) σχεδόν τετραπλασίασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H_2O_2 (Πίνακας 3.31). Το υδατικό εκχύλισμα από τα άσπρα σταφύλια δεν επηρέασε σημαντικά σε καμία συγκέντρωση τη δράση του H_2O_2 (Πίνακας 3.32 και Σχήμα 3.39). Παρουσίασε όμως μία τάση προς αύξηση της μεταλλαξιόνου δράσης της μπλεομυκίνης στα 3 και 6mg/τριβλίο κατά 62 ($p = 0,061$) και 48% ($p = 0,057$) αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε και στα πειράματα με τη μπλεομυκίνη, κανένα από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα και δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που προκαλούνται από αυτόματες μεταλλάξεις στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακες 3.28-3.32).

3.3.2.vii Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H_2O_2 μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102.

Το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος ενίσχυσε δόσοεξαρτώμενα ($r = 0,91, p < 0,01$) την προκαλούμενη από το H_2O_2 μεταλλαξιγένεση (Σχήμα 3.40 και Πίνακας 3.33), ενώ όπως αναφέρθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα ανέστειλε τη δράση του H_2O_2 . Το συγκεκριμένο κλάσμα σε συγκέντρωση 3mg/τριβλίο αύξησε κατά 123% τη δράση του H_2O_2 (Πίνακας 3.33). Το μεθανολικό κλάσμα και το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα δεν επηρέασαν στατιστικώς σημαντικά σε καμία συγκέντρωση τη δράση του H_2O_2 αν και εμφάνισαν μία τάση ($r = 0,67, p = 0,01$) προς ενίσχυση της συγκεκριμένης δράσης. Για παράδειγμα το μεθανολικό κλάσμα αύξησε κατά 71% ($p = 0,058$) τη δράση της μπλεομυκίνης στα 3mg/τριβλίο, ενώ το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα κατά 43% ($p = 0,12$) (Πίνακες 3.34 και 3.35 αντίστοιχα και Σχήματα 3.41 και 3.42 αντίστοιχα).

Όπως αναφέρθηκε και στα πειράματα με τη μπλεομυκίνη, κανένα από τα παραπάνω κλάσματα δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα και δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που προκαλούνται από αυτόματες μεταλλάξεις στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακες 3.33-3.35).

3.3.2.viii Επίδραση των πολυφαινόλων στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102.

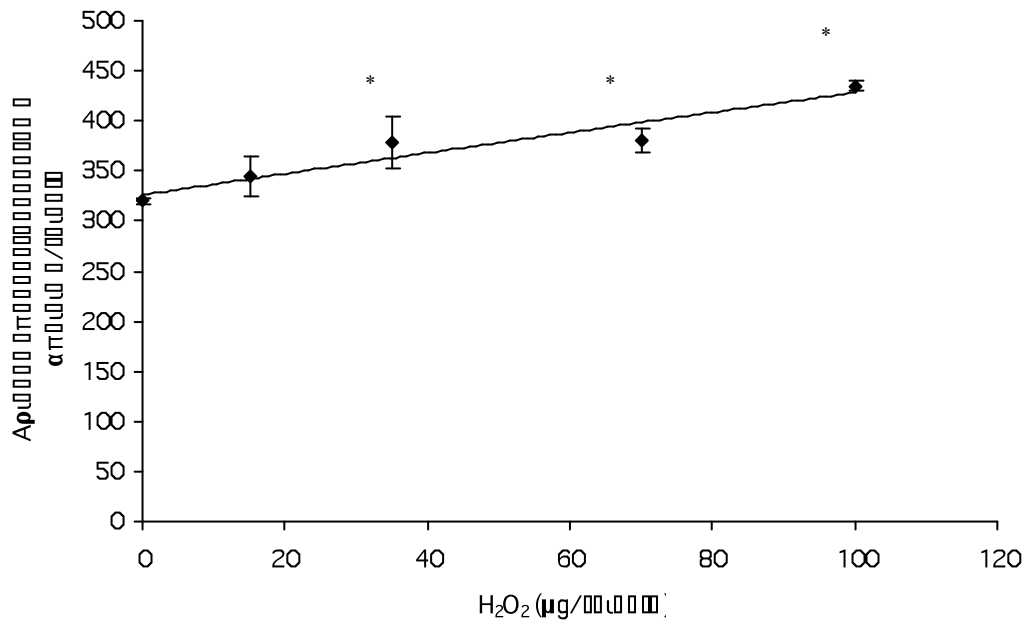
Από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, η *trans*-ρεσβερατρόλη, όπως και στα πειράματα με τη μπλεομυκίνη, ενίσχυσε δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,81$, $p < 0,01$) τη μεταλλαξιγόνο δράση του H₂O₂ (Πίνακας 3.36). Για παράδειγμα, στη συγκέντρωση των 100μM η αύξηση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων ήταν 60% ($p < 0,05$) (Σχήμα 3.43).

Η μοναδική πολυφαινόλη που ανέστειλε τη δράση του H₂O₂ ήταν η κερκετίνη, η οποία παρουσίασε αναστολή κατά 34% στα 100μM ενώ δεν υπήρξε αναστολή στο 1μM και στα 10μM (Σχήμα 3.44 και Πίνακας 3.37). Αντιθέτως η γλυκοσυλιωμένη μορφή της κερκετίνης, η ρουτίνη, δεν ανέστειλε σε καμία συγκέντρωση τη δράση του H₂O₂ (Σχήμα 3.45 και Πίνακας 3.38).

Οι υπόλοιπες πολυφαινόλες, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ δεν επηρέασαν στατιστικώς σημαντικά σε καμία συγκέντρωση τη δράση του H₂O₂ (Σχήματα 3.46-3.52 αντίστοιχα και Πίνακες 3.39-3.45 αντίστοιχα).

Όπως αναφέρθηκε και στα πειράματα με τη μπλεομυκίνη, καμία από τις παραπάνω πολυφαινόλες δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα και δεν επηρέασε τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που προκαλούνται από αυτόματες μεταλλάξεις στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις με εξαίρεση τη ρεσβερατρόλη που

εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 500μM (παρουσία όμως H₂O₂) και την κερκετίνη που παρουσίασε μεταλλαξιγόνο δράση στα 100μM (Πίνακες 3.36-3.45).

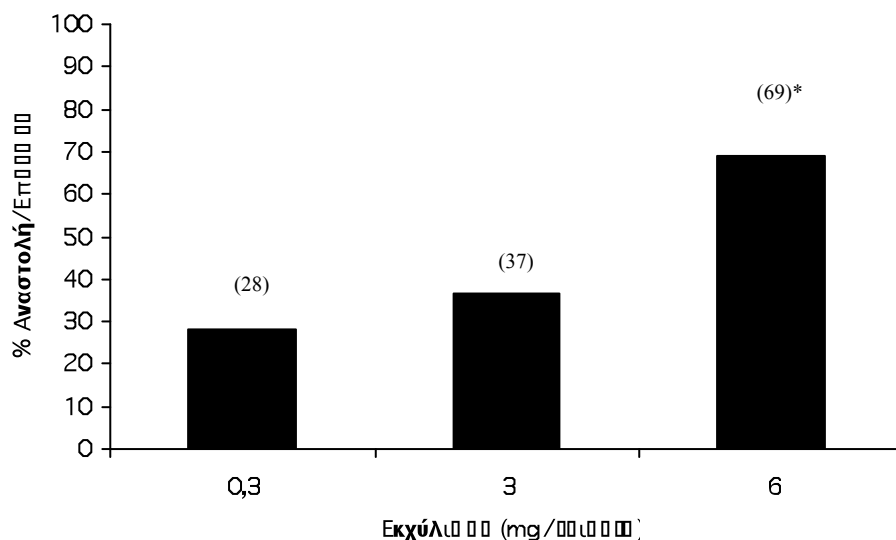


Σχήμα 3.35 Μεταλλαξιγένεση του H₂O₂ σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Απεικονίζονται οι μέσες τιμές ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων/τριβλίου. Οι τιμές προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για την κάθε συγκέντρωση. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν H₂O₂.

Πίνακας 3.29 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			313 ± 12
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	325 ± 17
-	+	H ₂ O ₂ ^β	68 ^γ ± 20
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	49 ^γ ± 12
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	43 ^γ ± 18
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	21 ^γ ± 6*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

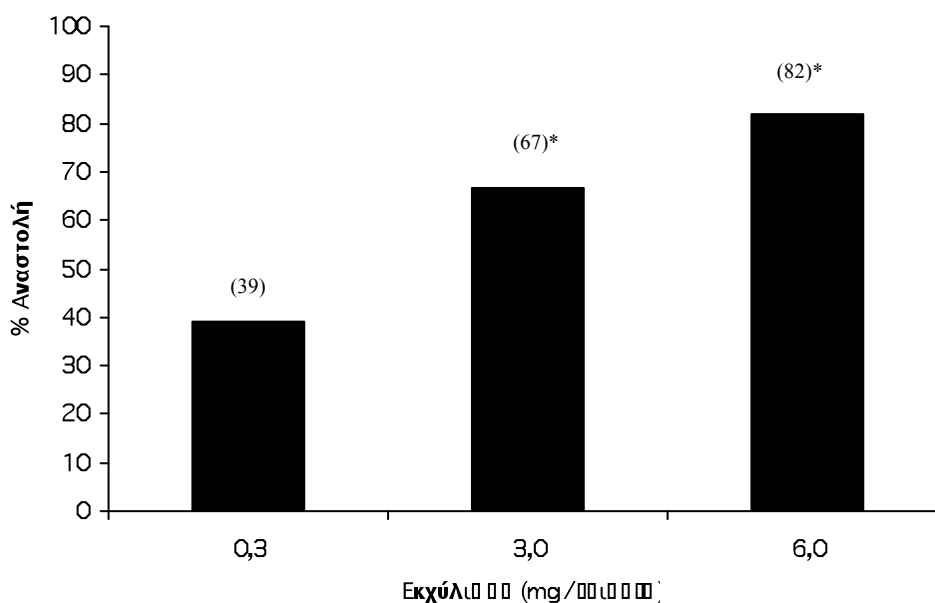


Σχήμα 3.36 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.30 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας		370	± 24
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+ -	384	± 17
-	+ H ₂ O ₂ ^β	223 ^γ	± 67
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	136 ^γ	± 45
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	74 ^γ	± 12*
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	40 ^γ	± 7*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

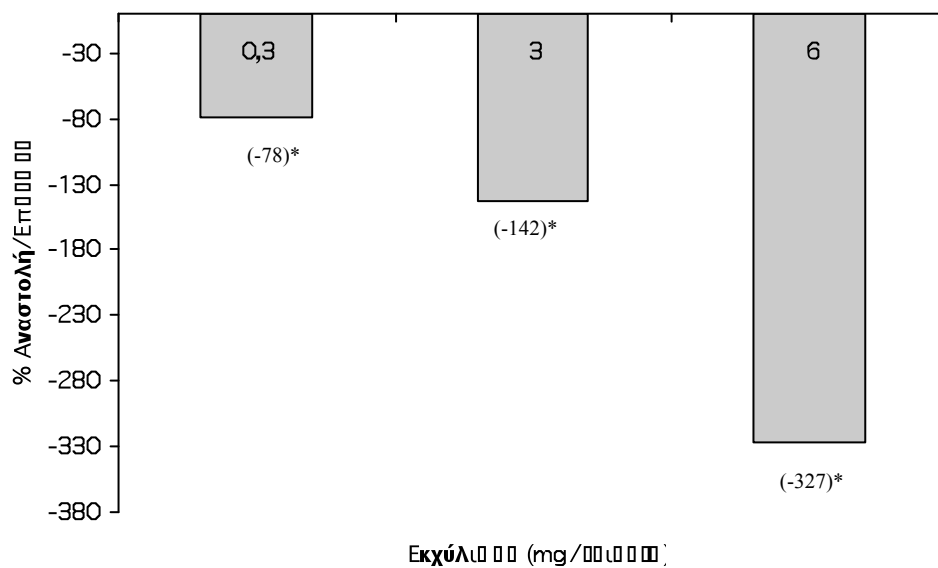


Σχήμα 3.37 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.31 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας			287	± 13
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	296	± 11
-	+	H ₂ O ₂ ^β	83 ^γ	± 6
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	148 ^γ	± 10*
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	201 ^γ	± 10*
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	354 ^γ	± 25*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

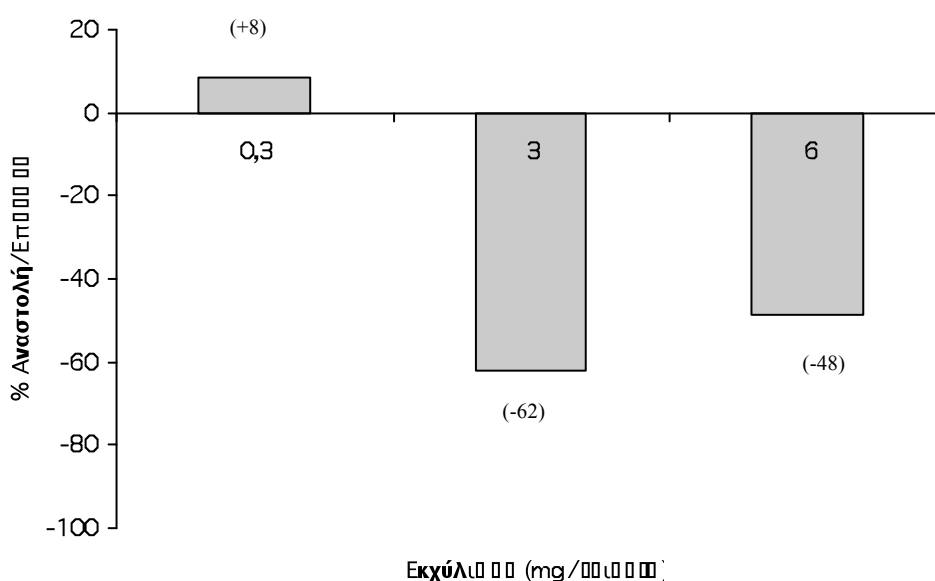


Σχήμα 3.38 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.32 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			290 ± 24
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	-	285 ± 14
-	+	H ₂ O ₂ ^β	132 ^γ ± 44
Εκχύλισμα 0,3mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	121 ^γ ± 18
Εκχύλισμα 3mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	214 ^γ ± 65
Εκχύλισμα 6mg/τριβλίο	+	H ₂ O ₂	196 ^γ ± 43

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

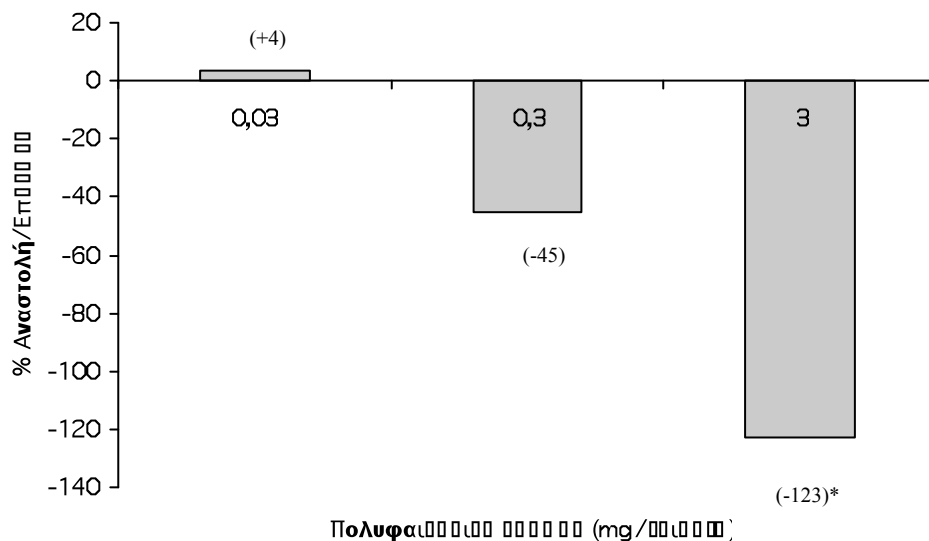


Σχήμα 3.39 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.33 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας		266	± 9
Πολυφαινολικό κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ -	275	± 11
-	+ H ₂ O ₂ ^β	82 ^γ	± 14
Πολυφαινολικό κλάσμα 0,03mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	79 ^γ	± 5
Πολυφαινολικό κλάσμα 0,3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	119 ^γ	± 38
Πολυφαινολικό κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	183 ^γ	± 27*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

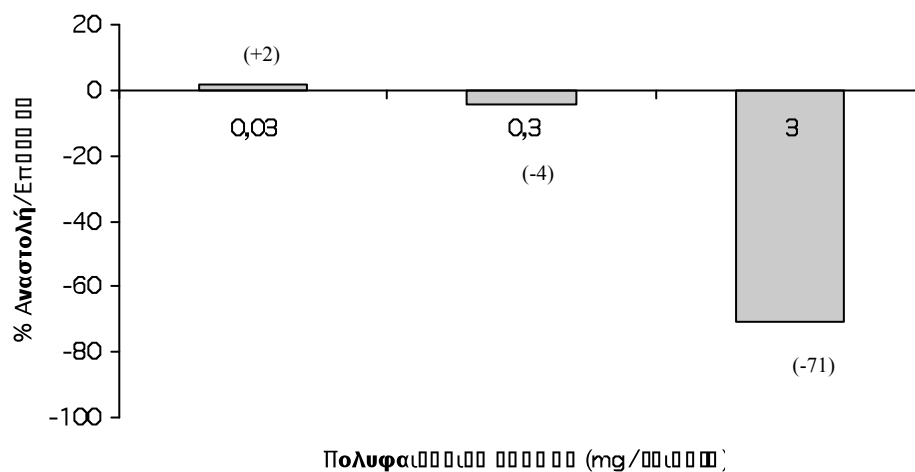


Σχήμα 3.40 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.34 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας		303	± 10
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ -	314	± 27
-	+ H ₂ O ₂ ^β	116 ^γ	± 40
Κλάσμα 0,03mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	114 ^γ	± 20
Κλάσμα 0,3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	121 ^γ	± 26
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	198 ^γ	± 65

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

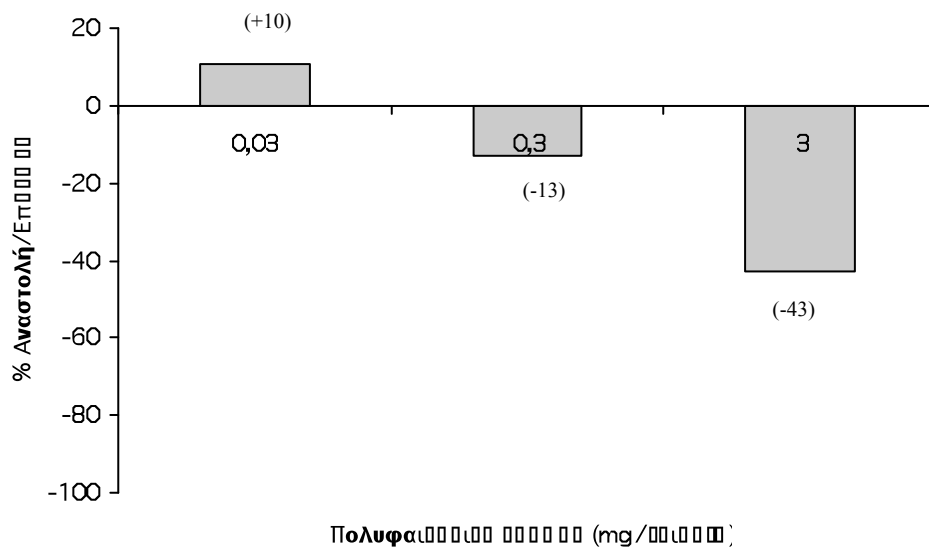


Σχήμα 3.41 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.35 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α	
Αρνητικός μάρτυρας		389	± 35
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ -	405	± 12
-	+ H ₂ O ₂ ^β	124 ^γ	± 36
Κλάσμα 0,03mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	111 ^γ	± 9
Κλάσμα 0,3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	140 ^γ	± 19
Κλάσμα 3mg/τριβλίο	+ H ₂ O ₂	177 ^γ	± 47

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

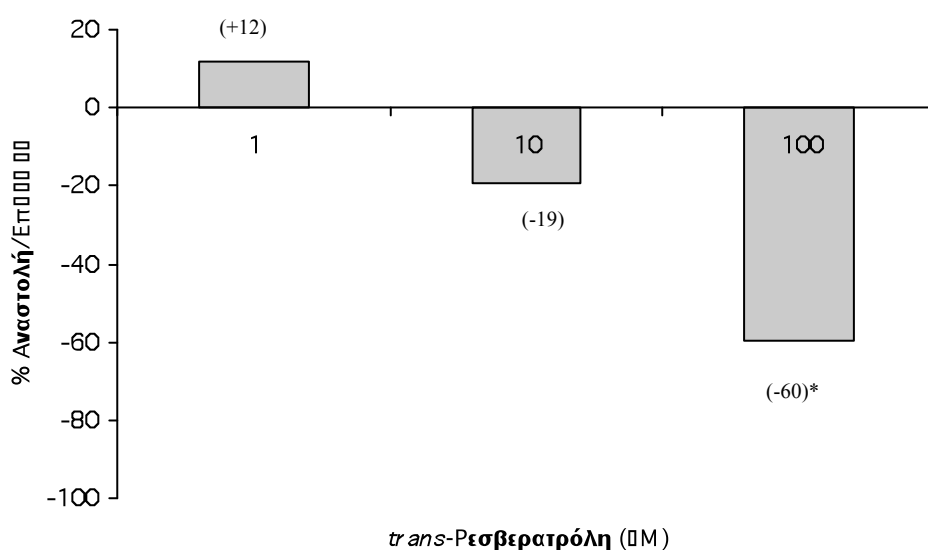


Σχήμα 3.42 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.36 Επίδραση της *trans*-ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α		
Αρνητικός μάρτυρας			295	±	7
Ρεσβερατρόλη 100μΜ	+	-	301	±	12
Ρεσβερατρόλη 500μΜ	+	-	293	±	19
-	+	H ₂ O ₂ ^β	109 ^γ	±	13
Ρεσβερατρόλη 1μΜ	+	H ₂ O ₂	96 ^γ	±	5
Ρεσβερατρόλη 10μΜ	+	H ₂ O ₂	130 ^γ	±	20
Ρεσβερατρόλη 100μΜ	+	H ₂ O ₂	174 ^γ	±	15*
Ρεσβερατρόλη 500μΜ	+	H ₂ O ₂	κυτταροτοξικότητα		

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

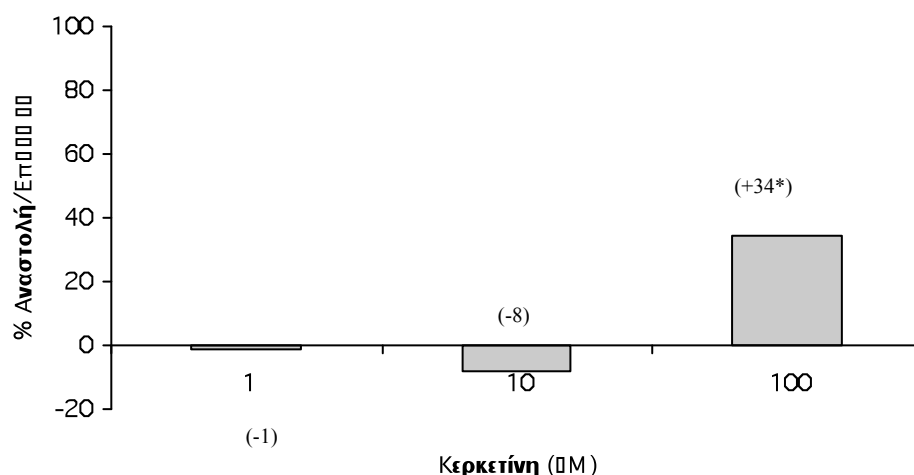


Σχήμα 3.43 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της *trans*-ρεσβερατρόλης έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.37 Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			320 ± 14
Κερκετίνη 100μM	+	-	385 ± 8**
-	+	H ₂ O ₂ ^β	134 ^γ ± 12
Κερκετίνη 1μM	+	H ₂ O ₂	136 ^γ ± 8
Κερκετίνη 10μM	+	H ₂ O ₂	145 ^γ ± 14
Κερκετίνη 100μM	+	H ₂ O ₂	88 ^γ ± 4*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). ***p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες.

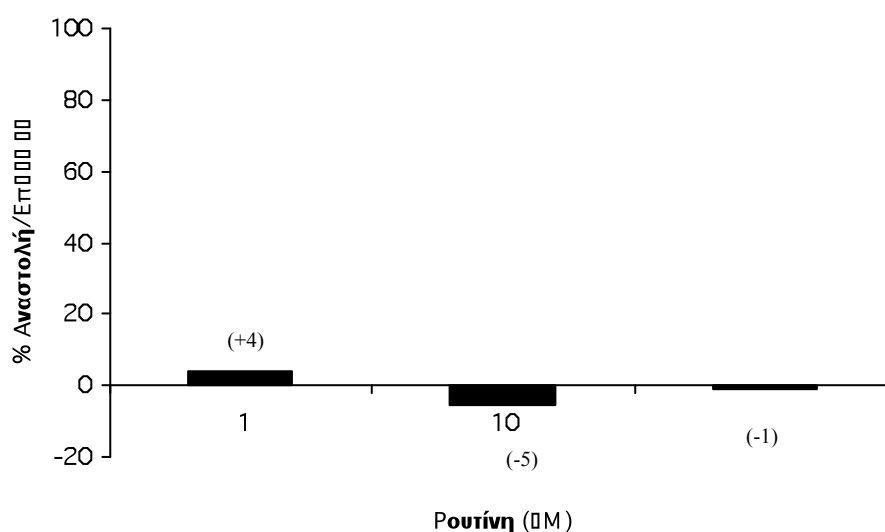


Σχήμα 3.44 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της κερκετίνης έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.38 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a
Αρνητικός μάρτυρας			320 ± 14
Ρουτίνη 100μM	+	-	317 ± 10
-	+	H ₂ O ₂ ^β	134 ^γ ± 12
Ρουτίνη 1μM	+	H ₂ O ₂	129 ^γ ± 9
Ρουτίνη 10μM	+	H ₂ O ₂	141 ^γ ± 15
Ρουτίνη 100μM	+	H ₂ O ₂	136 ^γ ± 9

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

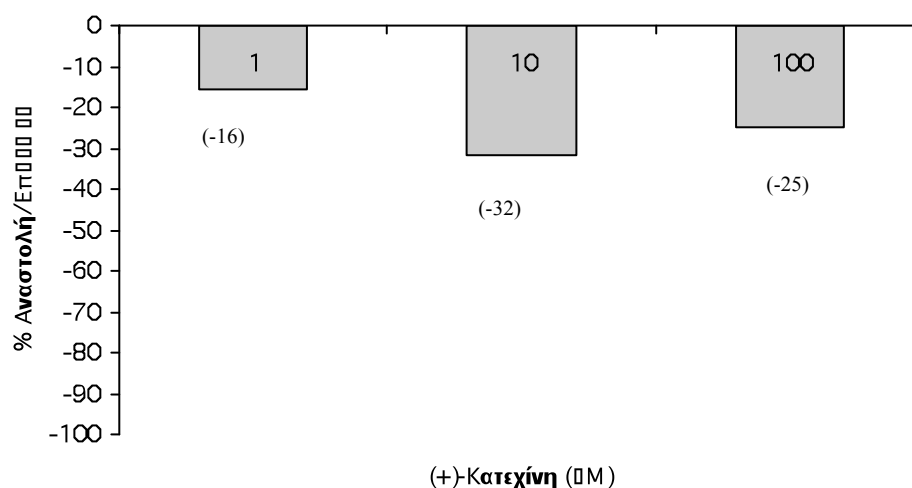


Σχήμα 3.45 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της ρουτίνης έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.39 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^a
Αρνητικός μάρτυρας			281 ± 20
(+)-Κατεχίνη 100μM	+	-	290 ± 10
-	+	H ₂ O ₂ ^β	116 ^γ ± 18
(+)-Κατεχίνη 1μM	+	H ₂ O ₂	134 ^γ ± 10
(+)-Κατεχίνη 10μM	+	H ₂ O ₂	153 ^γ ± 23
(+)-Κατεχίνη 100μM	+	H ₂ O ₂	145 ^γ ± 24

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

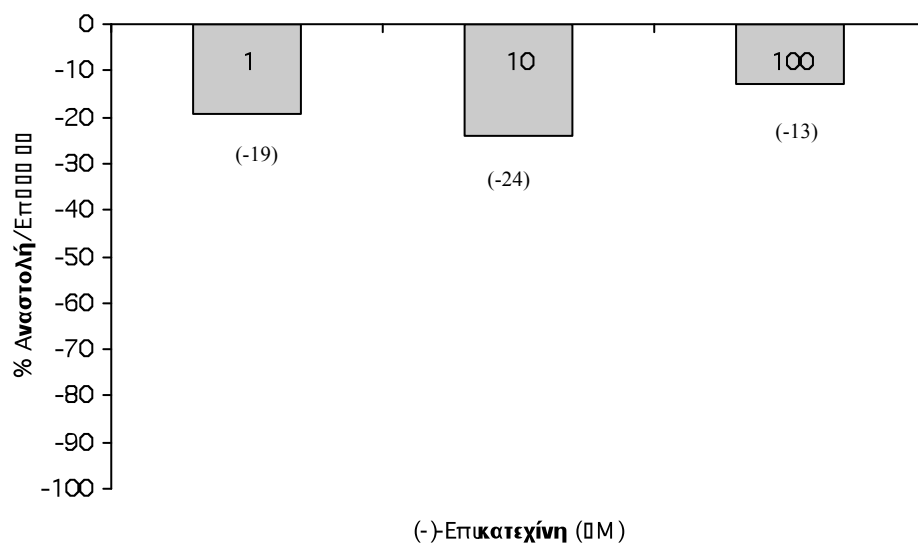


Σχήμα 3.46 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της (+)-κατεχίνης έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.40 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

		Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας		299 ± 18
(-)-Επικατεχίνη 100μM	+ -	310 ± 14
-	+ H ₂ O ₂ ^β	108 ^γ ± 13
(-)-Επικατεχίνη 1μM	+ H ₂ O ₂	129 ^γ ± 23
(-)-Επικατεχίνη 10μM	+ H ₂ O ₂	134 ^γ ± 19
(-)-Επικατεχίνη 100μM	+ H ₂ O ₂	122 ^γ ± 14

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

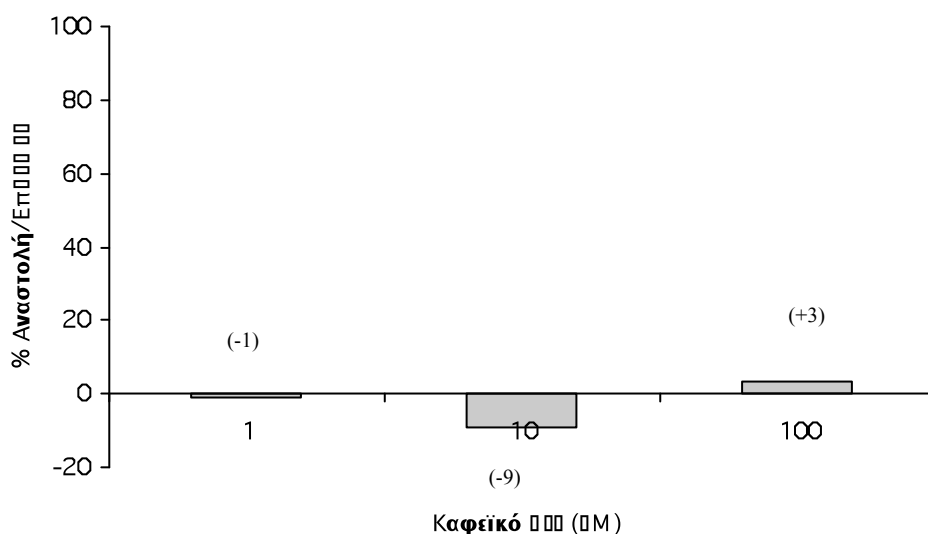


Σχήμα 3.47 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της (-)-επικατεχίνης έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.41 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			305 ± 10
Καφεϊκό οξύ 100μM	+	-	309 ± 12
-	+	H ₂ O ₂ ^β	121 ^γ ± 13
Καφεϊκό οξύ 1μM	+	H ₂ O ₂	122 ^γ ± 8
Καφεϊκό οξύ 10μM	+	H ₂ O ₂	132 ^γ ± 14
Καφεϊκό οξύ 100μM	+	H ₂ O ₂	117 ^γ ± 11

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

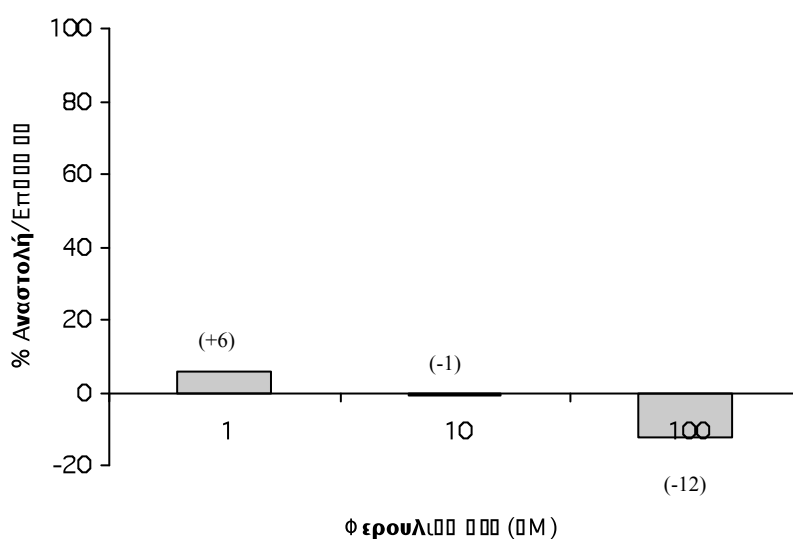


Σχήμα 3.48 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του καφεϊκού οξέος έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.42 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			305 ± 10
Φερουλικό οξύ 100μM	+	-	303 ± 8
-	+	H ₂ O ₂ ^β	121 ^γ ± 13
Φερουλικό οξύ 1μM	+	H ₂ O ₂	114 ^γ ± 12
Φερουλικό οξύ 10μM	+	H ₂ O ₂	122 ^γ ± 9
Φερουλικό οξύ 100μM	+	H ₂ O ₂	136 ^γ ± 16

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

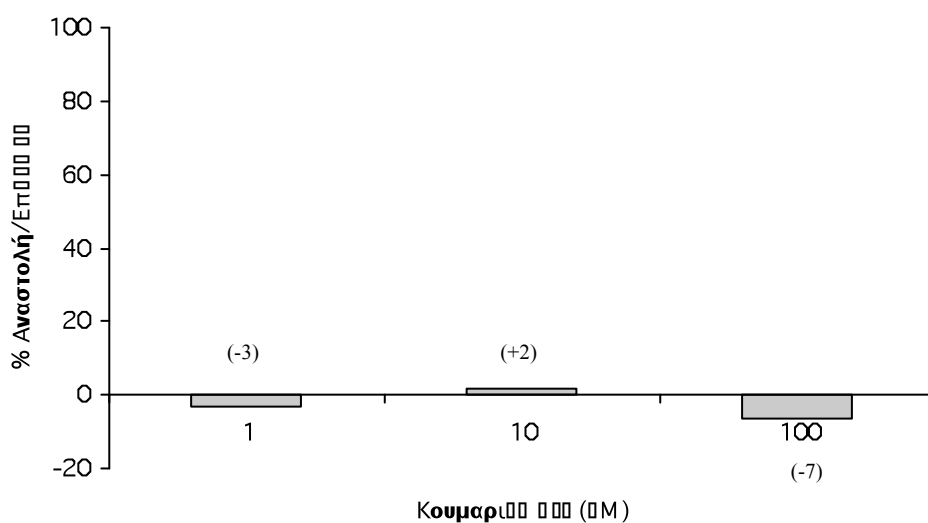


Σχήμα 3.49 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του φερουλικού οξέος έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.43 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			305 ± 10
Κουμαρικό οξύ 100μM	+	-	311 ± 13
-	+	H ₂ O ₂ ^β	121 ^γ ± 13
Κουμαρικό οξύ 1μM	+	H ₂ O ₂	125 ^γ ± 12
Κουμαρικό οξύ 10μM	+	H ₂ O ₂	119 ^γ ± 8
Κουμαρικό οξύ 100μM	+	H ₂ O ₂	129 ^γ ± 13

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

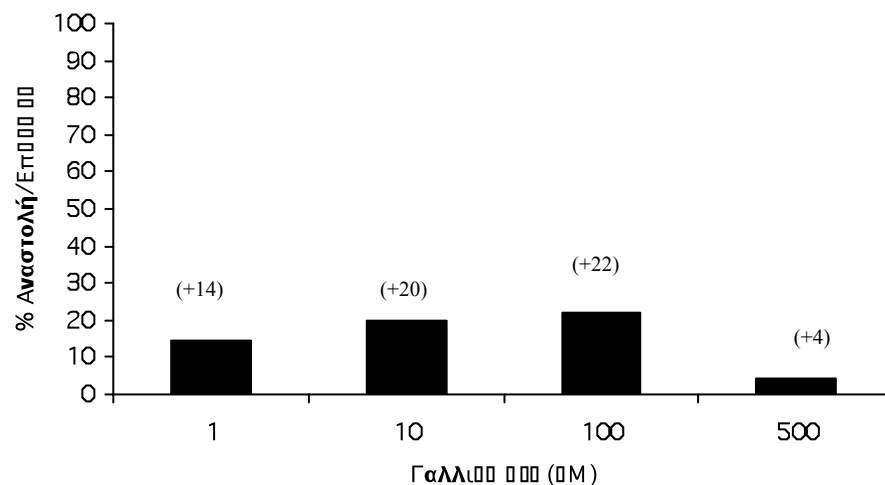


Σχήμα 3.50 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του κουμαρικού οξέος έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.44 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α
Αρνητικός μάρτυρας			327 ± 27
Γαλλικό οξύ 100μM	+	-	322 ± 25
-	+	H ₂ O ₂ ^β	91 ^γ ± 12
Γαλλικό οξύ 1μM	+	H ₂ O ₂	78 ^γ ± 8
Γαλλικό οξύ 10μM	+	H ₂ O ₂	73 ^γ ± 17
Γαλλικό οξύ 100μM	+	H ₂ O ₂	71 ^γ ± 26
Γαλλικό οξύ 500μM	+	H ₂ O ₂	87 ^γ ± 17

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

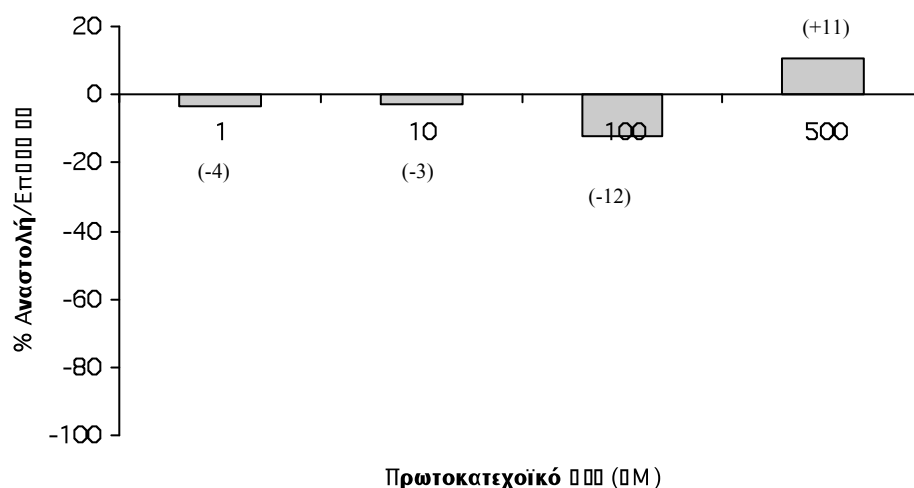


Σχήμα 3.51 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του γαλλικού οξέος έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.45 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

			Αριθμός His ⁺ αποικιών / τριβλίο ^α		
Αρνητικός μάρτυρας			271	±	11
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 100μM	+	-	282	±	16
-	+	H ₂ O ₂ ^β	114 ^γ	±	16
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 1μM	+	H ₂ O ₂	118 ^γ	±	6
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 10μM	+	H ₂ O ₂	117 ^γ	±	19
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 100μM	+	H ₂ O ₂	128 ^γ	±	14
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 500μM	+	H ₂ O ₂	102 ^γ	±	22

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων, που προέκυψαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. ^βΗ συγκέντρωση του H₂O₂ ήταν 100μg/τριβλίο. ^γΟι τιμές έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση του αριθμού των αποικιών του αρνητικού μάρτυρα. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Σχήμα 3.52 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο H₂O₂ (θετικοί μάρτυρες). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

3.3.3 Ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges)

3.3.3.i Επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση των SCEs σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

Σε μία σειρά καλλιεργειών προστέθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις MMC (10, 20, 30, 50 και 70ng/ml) και προσδιορίστηκε σε κάθε καλλιέργεια ο αριθμός των SCEs και το PRI (Σχήμα 3.53). παρατηρήθηκε μία δόσοεξαρτώμενη ($r = 0,98$, $p < 0,01$) αύξηση του αριθμού των SCEs σε σχέση με τη συγκέντρωση της MMC. Η συγκέντρωση που επιλέχτηκε ήταν τα 20ng/ml γιατί βρισκότανε στη γραμμική περιοχή αύξησης της καμπύλης, προκαλούσε μία ικανοποιητική αύξηση στον αριθμό των SCEs σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα ενώ παράλληλα δεν μειωνόταν σε μεγάλο βαθμό η τιμή του PRI.

3.3.3.ii Επίδραση των διαλυτών στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση των SCEs σε καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

Η μεθανόλη και το DMSO χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση ορισμένων από τις εξεταζόμενες ουσίες. Εξετάστηκε η επίδραση των διαλυτών, σε συγκέντρωση ίση με τη μέγιστη τελική συγκέντρωσή τους που υπήρχε στις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων, στον αριθμό των SCEs και την τιμή του PRI παρουσία της MMC.

Η μέγιστη συγκέντρωση της μεθανόλης στις καλλιέργειες ήταν 1%v/v. Σε αυτή τη συγκέντρωση η μεθανόλη δεν επηρέαζε τον αριθμό των SCEs παρουσία της MMC (Πίνακας 3.46).

Η συγκέντρωση του DMSO στις καλλιέργειες ήταν 2%v/v. Σε αυτή τη συγκέντρωση το DMSO δεν επηρέαζε τον αριθμό των SCEs παρουσία της MMC. Ωστόσο παρουσίασε κυτταροστατική δράση ελαττώνοντας την τιμή του PRI στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) κατά 37% (Πίνακας 3.46).

3.3.3.iii Επίδραση των εκχυλισμάτων αμπέλου στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση του αριθμού των SCEs σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

Τα εκχυλίσματα (μεθανολικά και υδατικά) και των δύο ποικιλιών παρουσίασαν προ-οξειδωτική δράση αυξάνοντας τον αριθμό των SCEs που επάγονται από τη MMC σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) αύξησε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) και δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,77, p < 0,01$) τις SCEs κατά 28 και 56% σε συγκεντρώσεις 150 και 300 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα, ενώ το υδατικό εκχύλισμα της ίδιας ποικιλίας ενίσχυσε σημαντικά ($p < 0,05$) τη δράση της MMC κατά 45% μόνο στη συγκέντρωση των 300 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακες 3.47 και 3.48 αντίστοιχα και Σχήματα 3.54 και 3.55 αντίστοιχα). Επίσης, το μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Ασύρτικο (άσπρα σταφύλια) ενίσχυσε δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,77, p < 0,01$) και σημαντικά ($p < 0,05$) τη δράση της MMC κατά 18 και 24% σε συγκεντρώσεις 150 και 300 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα και το υδατικό εκχύλισμα της ίδιας ποικιλίας αύξησε δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,92, p < 0,01$) και σημαντικά ($p < 0,05$) τη δράση της MMC κατά 27 και 32% σε συγκεντρώσεις 150 και 300 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (Πίνακες 3.49 και 3.50 και Σχήματα 3.56 και 3.57). Ήταν όμως αξιοσημείωτο ότι κανένα από τα εκχυλίσματα δεν επηρέασε τον αριθμό των SCEs απουσία της MMC (Πίνακες 3.49 και 3.50), γεγονός που δείχνει ότι τα εκχυλίσματα έδρασαν συνεργικά με τη MMC και όχι αθροιστικά για να προκαλέσουν αύξηση των SCEs.

Επίσης, και τα τέσσερα εκχυλίσματα παρουσίασαν κυτταροστατική δράση παρουσία της MMC ελαττώνοντας το δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PRI). Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα από τα κόκκινα σταφύλια μείωσαν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) το PRI στα 150 και στα 300 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακες 3.47 και 3.48 αντίστοιχα) ενώ τα εκχυλίσματα από τα άσπρα σταφύλια έδειξαν σημαντική

($p < 0,05$) κυτταροστατικότητα μόνο στα 300 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακες 3.49 και 3.50 αντίστοιχα). Όπως και με τις SCEs, τα εκχυλίσματα απουσία της MMC δεν επηρέασαν το PRI (Πίνακες 3.47-3.50).

3.3.3.iv Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση του αριθμού των SCEs σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

Το μεθανολικό κλάσμα και το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα του υδατικού εκχυλίσματος παρουσίασαν παρόμοια δράση με το υδατικό εκχύλισμα, δηλαδή ενίσχυσαν σημαντικά ($p < 0,05$) και δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,92$, $p < 0,01$ και $r = 0,97$, $p < 0,01$) τη δράση της MMC (Πίνακες 3.51 και 3.52 αντίστοιχα και Σχήματα 3.58 και 3.59 αντίστοιχα). Σε συγκεντρώσεις 150 και 300 $\mu\text{g/ml}$, η επαγωγή ήταν 24 και 49% για το μεθανολικό κλάσμα και 43 και 72% για το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα. Ωστόσο απουσία της MMC δεν επηρέασαν τον αριθμό των SCEs (Πίνακες 3.51 και 3.52). Επίσης τα δύο κλάσματα δεν επηρέασαν το PRI είτε απουσία είτε παρουσία της MMC (Πίνακες 3.51 και 3.52).

Το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος δεν άσκησε καμία επίδραση στον αριθμό των SCEs είτε παρουσία είτε απουσία της MMC (Πίνακας 3.53 και Σχήμα 3.60) σε αντίθεση με αυτό καθαυτό το εκχύλισμα που όπως αναφέρθηκε ενίσχυσε τη δράση της MMC. Επίσης, δεν επηρέασε το PRI είτε απουσία είτε παρουσία της MMC (Πίνακας 3.53).

3.3.3.v Επίδραση των πολυφαινολών στην επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση του αριθμού των SCEs σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

Από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες το γαλλικό οξύ παρουσίασε προ-οξειδωτική δράση αυξάνοντας δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,97$, $p < 0,01$) τον αριθμό των SCEs που επάγονται από τη MMC. Η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$)

κατά 31, 67 και 104% σε συγκεντρώσεις 5, 50 και 100μM αντίστοιχα (Πίνακας 3.54 και Σχήμα 3.61). Επίσης, παράλληλα με την αύξηση των SCEs, μείωσε την τιμή του PRI σημαντικά ($p < 0,05$) παρουσία της MMC στα 5, 50 και 100μM δείχνοντας κυτταροστατική δράση. Απουσία όμως της MMC το γαλλικό οξύ δεν επηρέασε ούτε τον αριθμό των SCEs ούτε και το PRI (Πίνακας 3.54). Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, σε αντίθεση με το γαλλικό οξύ με το οποίο έχει παρόμοια χημική δομή, δεν άσκησε καμία επίδραση στον αριθμό των SCEs και στην τιμή του PRI είτε παρουσία είτε απουσία της MMC (Πίνακας 3.55 και Σχήμα 3.62).

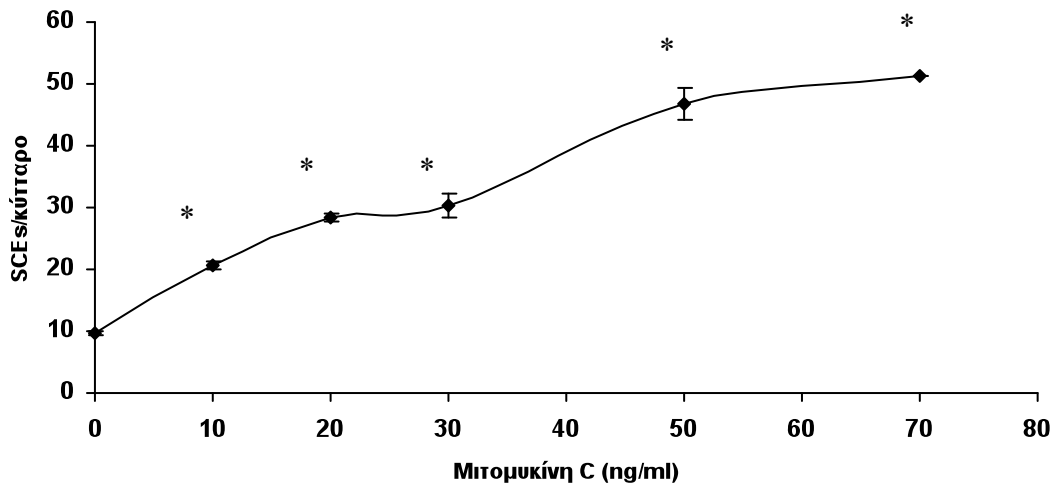
Το καφεϊκό οξύ ενίσχυσε δοσοεξαρτώμενα ($r = 0,86$, $p < 0,01$) τη δράση της MMC ενώ παράλληλα μείωσε το PRI (Πίνακας 3.56). Η αύξηση ήταν σημαντική ($p < 0,05$) κατά 55% στα 100μM (Σχήμα 3.63). Επίσης όμως και απουσία της MMC το καφεϊκό οξύ αύξησε σημαντικά ($p < 0,05$) τον αριθμό των SCEs κατά 26% στα 100μM και μείωσε το PRI (Πίνακας 3.56). Το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ σε αντίθεση με το καφεϊκό οξύ με το οποίο έχουν παρόμοια χημική δομή, δεν άσκησαν καμία επίδραση στον αριθμό των SCEs και στην τιμή του PRI είτε παρουσία είτε απουσία της MMC (Πίνακας 3.57 και 3.58 αντίστοιχα και Σχήμα 3.64 και 3.65 αντίστοιχα).

Η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη που έχουν παρόμοια χημική δομή δεν επηρέασαν τον αριθμό των SCEs είτε παρουσία είτε απουσία της MMC (Πίνακες 3.59 και 3.60 και Σχήματα 3.66 και 3.67). Ωστόσο έδειξαν κυτταροστατική δράση μειώνοντας την τιμή του PRI σημαντικά ($p < 0,05$) παρουσία της MMC στα 50 και στα 100μM αλλά και απουσία της MMC στα 100μM (Πίνακες 3.59 και 3.60).

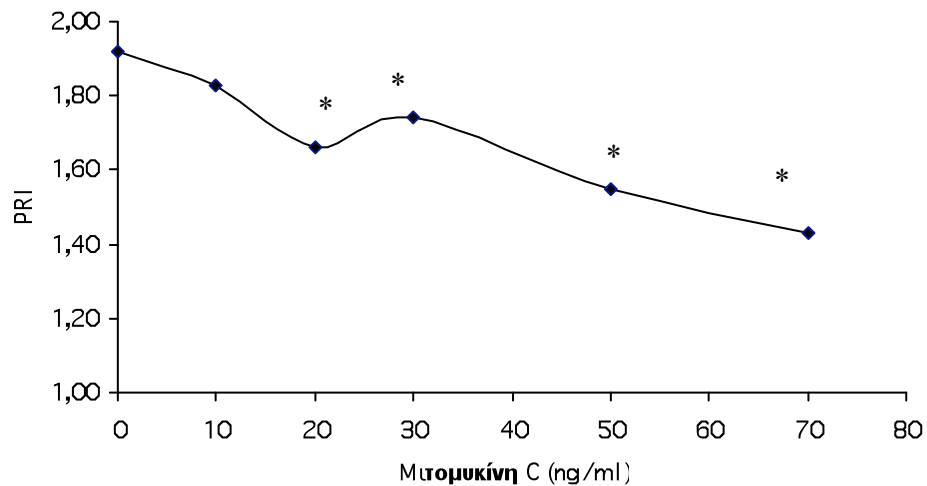
Η κερκετίνη ήταν η μοναδική από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες που ανέστειλε την επαγόμενη από τη MMC αύξηση των SCEs. Η αναστολή ήταν δοσοεξαρτώμενη ($r = -0,97$, $p < 0,01$) και ήταν σημαντική ($p < 0,05$) στις

συγκεντρώσεις των 50 και 100μM με τιμές 70 και 78% αντίστοιχα (Πίνακας 3.61 και Σχήμα 3.68). Παρά την ανασταλτική της δράση παρουσία της MMC, η κερκετίνη αύξησε σε συγκέντρωση 100μM τον αριθμό των SCEs απουσία της MMC (Πίνακας 3.61). Επιπρόσθετα, η κερκετίνη μείωσε σημαντικά ($p<0,05$) το PRI παρουσία και απουσία της MMC δείχνοντας κυτταροστατική δράση (Πίνακας 3.61). Η ρουτίνη, σε αντίθεση με την κερκετίνη (με την οποία έχει παρόμοια χημική δομή), ενίσχυσε σημαντικά ($p<0,05$) τη δράση της MMC κατά 35 και 34% σε συγκεντρώσεις 50 και 100μM αντίστοιχα (Πίνακας 3.62 και Σχήμα 3.69). Επίσης, έδειξε κυτταροστατική δράση ελαττώνοντας το PRI στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$) σε συγκεντρώσεις 5, 50 και 100μM παρουσία της MMC αλλά και απουσία της MMC σε συγκέντρωση 100μM (Πίνακας 3.62).

Η *trans*-ρεσβερατρόλη στις συγκεντρώσεις των 5 και 50μM δεν επηρέασε τη δράση της MMC όσον αφορά τις SCEs (Πίνακας 3.63 και Σχήμα 3.70). Αλλά στα 100μM παρουσίασε μεγάλη κυτταροστατικότητα ελαττώνοντας το PRI κατά 100% (PRI=1) με αποτέλεσμα να μην προχωρούν τα κύτταρα στη 2^η κυτταρική διαίρεση και άρα να μην είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι SCEs. Επίσης, παρουσίασε κυτταροστατικότητα στις συγκεντρώσεις των 5 και 50μM παρουσία της MMC καθώς και απουσία της MMC στα 100μM. Η παρατηρούμενη κυτταροστατικότητα οφειλόταν όμως εν μέρει και στο DMSO (η ρεσβερατρόλη ήταν διαλυμένη σε DMSO, η τελική συγκέντρωση του οποίου στις καλλιέργειες ήταν 2%v/v) γιατί όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.3.ii το DMSO προκαλεί ελάττωση του PRI (Πίνακας 3.46).



(A)



(B)

Σχήμα 3.53 (A) Αύξηση των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της μιτομυκίνης C. Απεικονίζονται οι μέσες τιμές \pm την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs/κύτταρο. Οι τιμές προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα, σε κάθε ένα από τα οποία καταμετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. (B) Επίδραση της μιτομυκίνης C στο δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI). Οι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα, σε κάθε ένα από τα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 100 μεταφάσεων. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Πίνακας 3.46 Επίδραση της μεθανόλης και του DMSO στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

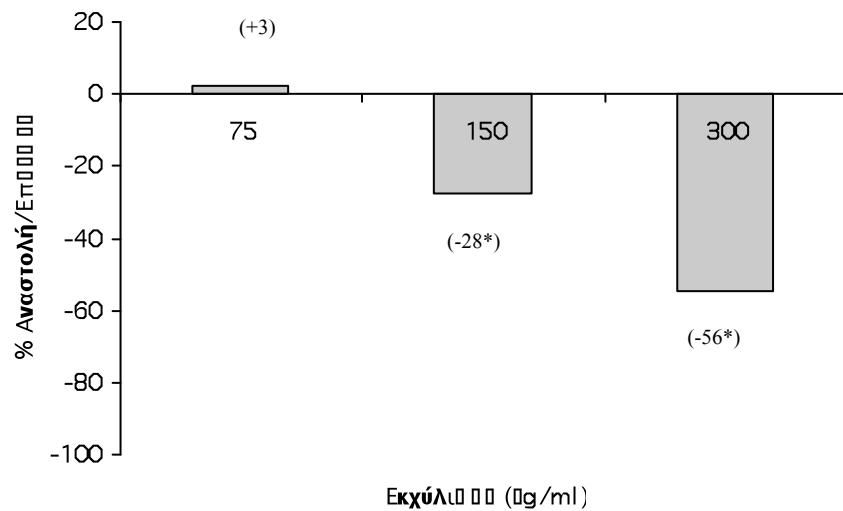
	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	7,65 ± 0,09*	45	141	114	2,23**
MMC ^γ	25,10 ± 0,52	75	120	105	2,10
MMC+ DMSO 2%v/v	25,36 ± 0,07	93	207	-	1,69**
Αρνητικός μάρτυρας	8,73 ± 0,13*	79	137	84	2,02**
MMC ^γ	22,04 ± 0,32	99	128	73	1,91
MMC+ Μεθανόλη 0,3%v/v	22,25 ± 0,34	108	123	69	1,87

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 3.47 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	7,51 ± 0,88*	108	114	78	1,90**
Εκχύλισμα 300μg/ml	7,74 ± 0,42*	117	111	72	1,85**
MMC ^γ	17,18 ± 0,16	93	183	24	1,77
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	16,75 ± 0,20	101	169	30	1,76
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	19,87 ± 0,10*	113	167	20	1,69**
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	22,63 ± 1,24*	124	159	17	1,64**

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

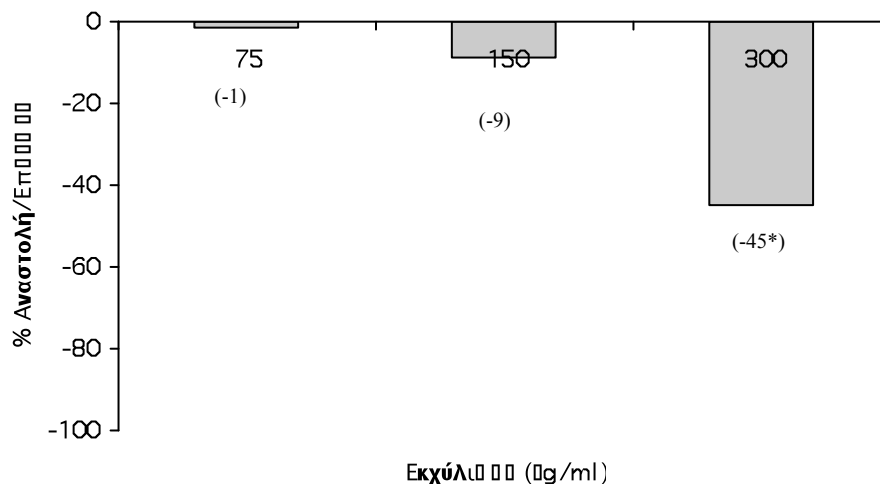


Σχήμα 3.54 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.48 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	7,51 ± 0,88*	108	114	78	1,90**
Εκχύλισμα 300μg/ml	8,17 ± 0,32*	99	123	78	1,93**
MMC ^γ	17,18 ± 0,16	93	183	24	1,77
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	17,32 ± 0,77	95	174	31	1,79
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	18,01 ± 0,45	117	166	17	1,67**
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	21,50 ± 0,12*	131	156	13	1,61**

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

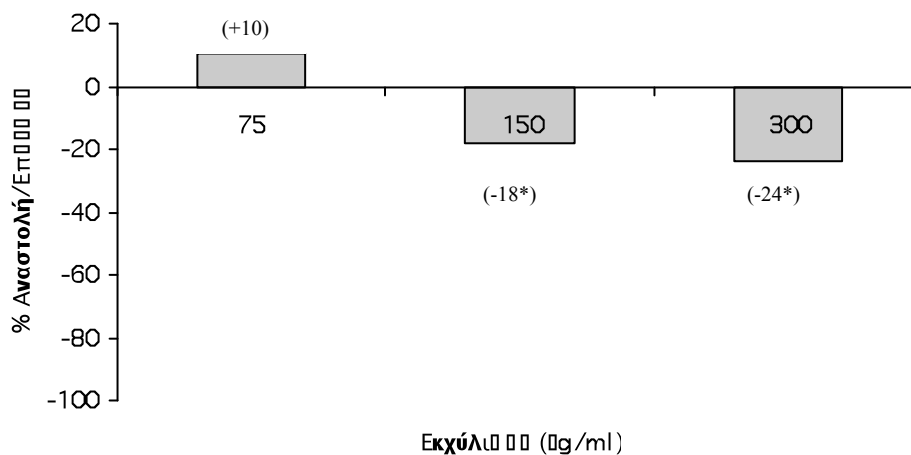


Σχήμα 3.55 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιογένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.49 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,50 ± 0,74*	144	80	76	1,77**
Εκχύλισμα 300μg/ml	8,58 ± 0,49*	147	84	69	1,74**
MMC ^γ	21,19 ± 0,27	177	96	27	1,50
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	19,84 ± 0,50	169	105	26	1,52
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	23,50 ± 0,20*	184	93	23	1,46
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	24,24 ± 0,10*	195	91	14	1,40**

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

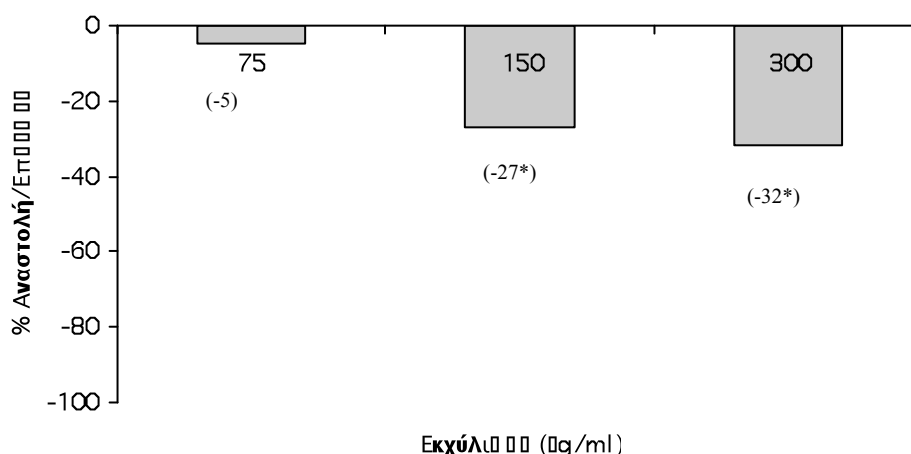


Σχήμα 3.56 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.50 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,85 ± 0,61*	117	144	39	1,74**
Εκχύλισμα 300μg/ml	8,52 ± 0,28*	114	156	30	1,72**
MMC ^γ	19,91 ± 0,16	171	102	27	1,52
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	20,44 ± 0,20	163	106	31	1,56
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	22,91 ± 0,10*	158	121	21	1,54
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	23,42 ± 0,56*	188	97	15	1,42**

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

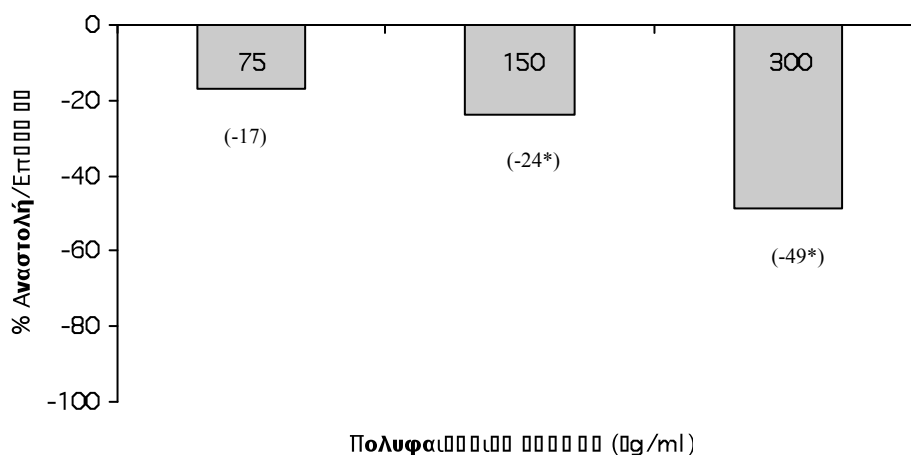


Σχήμα 3.57 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.51 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	7,65 ± 0,09*	45	141	114	2,23**
Εκχύλισμα 300μg/ml	8,15 ± 0,89*	42	143	115	2,24**
MMC ^γ	25,10 ± 0,52	75	120	105	2,10
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	28,04 ± 0,90	75	132	93	2,06
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	29,22 ± 0,10*	83	125	92	2,03
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	33,57 ± 1,76*	88	122	90	2,01

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

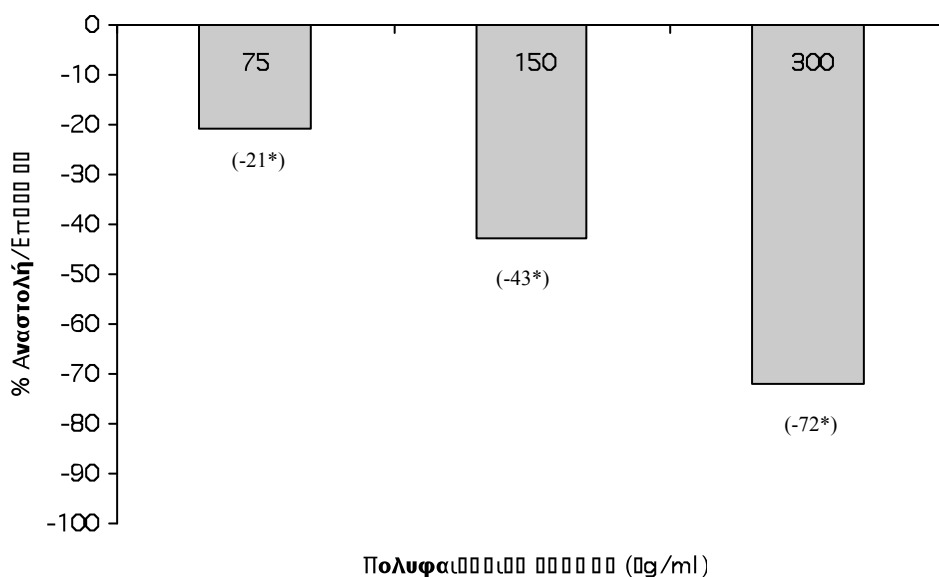


Σχήμα 3.58 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.52 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	7,65 ± 0,09*	45	141	114	2,23**
Εκχύλισμα 300μg/ml	7,73 ± 0,38*	32	148	120	2,29**
MMC ^γ	25,10 ± 0,52	75	120	105	2,10
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	28,76 ± 0,43*	63	138	99	2,12
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	32,60 ± 0,24*	89	122	89	2,00
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	37,66 ± 0,83*	85	113	102	2,06

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

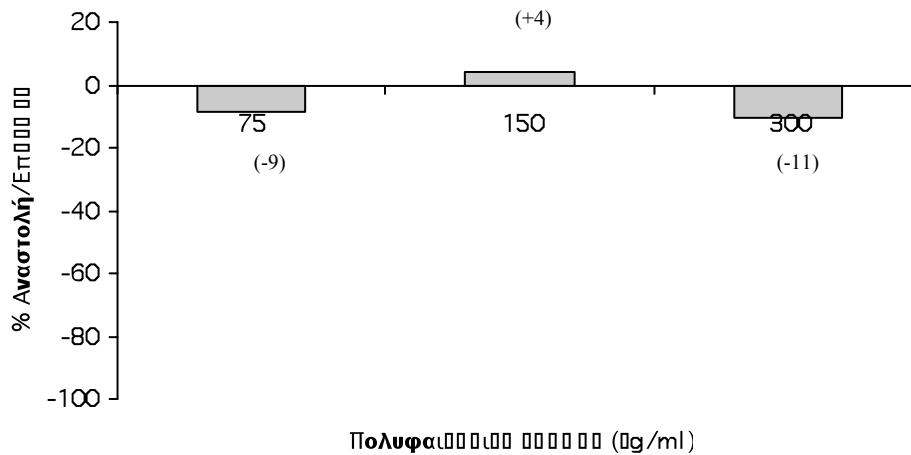


Σχήμα 3.59 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.53 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,12 ± 0,96*	84	156	60	1,92**
Εκχύλισμα 300μg/ml	7,31 ± 0,32*	90	153	57	1,89**
MMC ^γ	21,15 ± 0,11	111	123	66	1,85
MMC+Εκχύλισμα 75μg/ml	22,26 ± 0,83	108	123	69	1,87
MMC+Εκχύλισμα 150μg/ml	20,60 ± 0,30	112	120	68	1,85
MMC+Εκχύλισμα 300μg/ml	22,53 ± 0,40	126	112	62	1,79

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

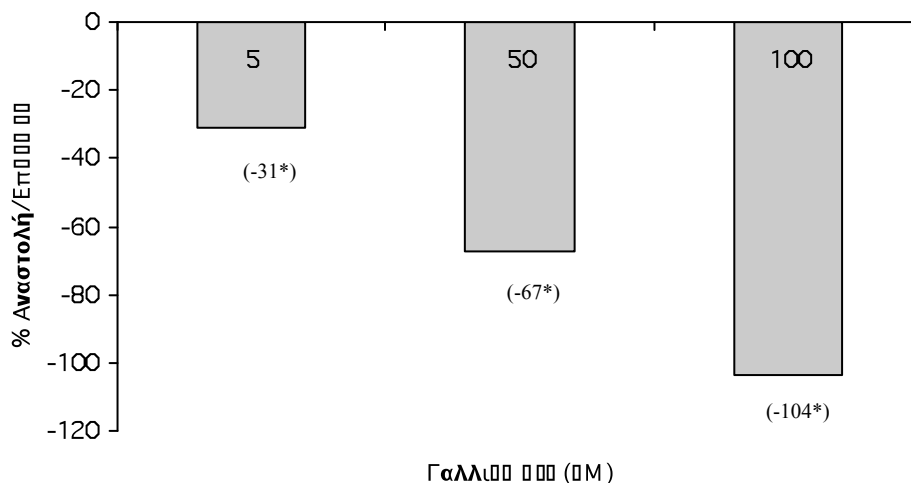


Σχήμα 3.60 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.54 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	9,17 ± 0,44*	108	114	78	1,90**
Γαλλικό οξύ 100μM	9,02 ± 0,11*	96	123	81	1,95**
MMC ^γ	23,45 ± 0,36	93	183	24	1,77
MMC+ Γαλλικό οξύ 5μM	27,92 ± 0,47*	93	204	3	1,70**
MMC+ Γαλλικό οξύ 50μM	33,05 ± 1,17*	132	141	27	1,65**
MMC+ Γαλλικό οξύ 100μM	38,25 ± 0,18*	168	129	3	1,45**

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

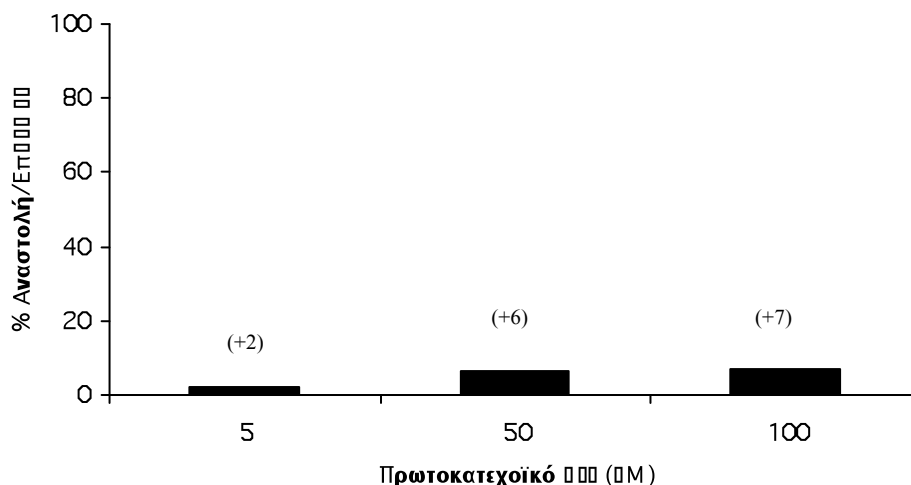


Σχήμα 3.61 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του γαλλικού οξέος έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.55 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	9,17 ± 0,44*	108	114	78	1,90**
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 100μM	8,86 ± 0,11*	112	101	87	1,92**
MMC ^γ	23,45 ± 0,36	93	183	24	1,77
MMC+ Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 5μM	23,12 ± 0,57	95	172	33	1,79
MMC+ Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 50μM	22,55 ± 0,58	105	177	18	1,71
MMC+ Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 100μM	22,43 ± 0,42	108	176	16	1,69

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

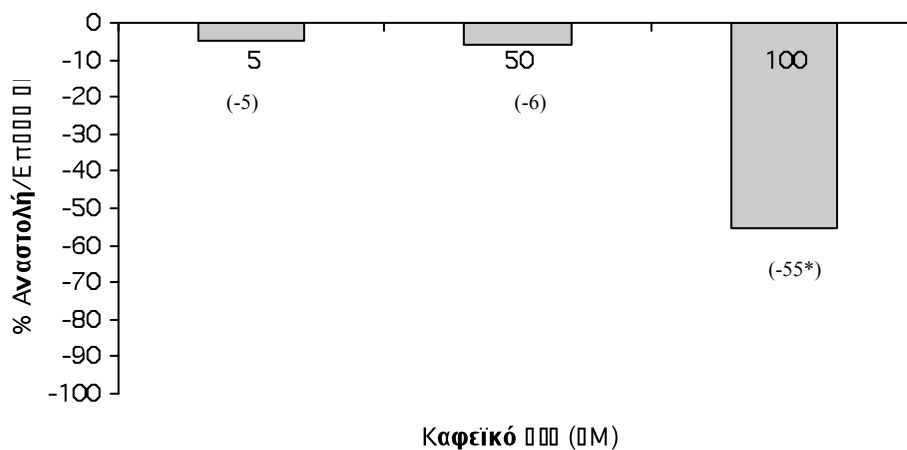


Σχήμα 3.62 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.56 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,07 ± 0,33*	54	123	123	2,23 ^{##}
Καφεϊκό οξύ 100μM	10,15 ± 0,03**	74	120	106	2,11 [#]
MMC ^γ	23,48 ± 0,62	90	119	91	2,00
MMC+ Καφεϊκό οξύ 5μM	24,26 ± 0,74	87	105	108	2,07
MMC+ Καφεϊκό οξύ 50μM	24,37 ± 0,16	87	111	102	2,05
MMC+ Καφεϊκό οξύ 100μM	32,01 ± 1,25*	123	87	90	1,89 ^{##}

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες. # $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες. ## $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

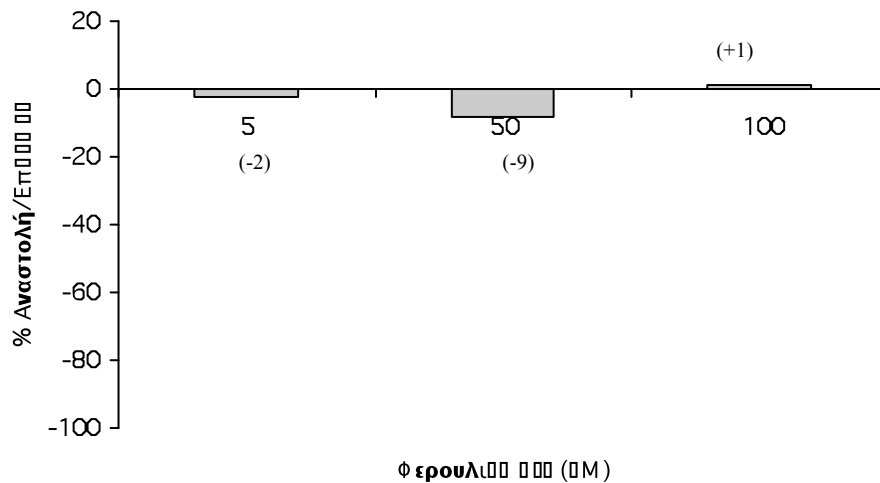


Σχήμα 3.63 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του καφεϊκού οξέος έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.57 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,07 ± 0,33*	54	123	123	2,23**
Φερουλικό οξύ 100μM	8,17 ± 0,72*	45	127	128	2,28**
MMC ^γ	23,48 ± 0,62	90	119	91	2,00
MMC+ Φερουλικό οξύ 5μM	23,84 ± 0,07	108	107	85	1,92
MMC+ Φερουλικό οξύ 50μM	24,79 ± 0,25	100	104	96	1,99
MMC+ Φερουλικό οξύ 100μM	23,28 ± 0,07	104	101	95	1,97

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες.

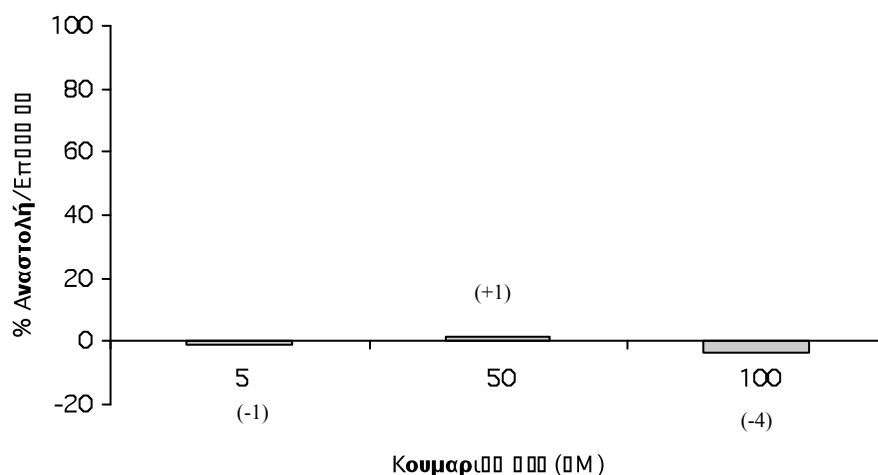


Σχήμα 3.64 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του φερουλικού οξέος έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.58 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,07 ± 0,33*	54	123	123	2,23**
Κουμαρικό οξύ 100μM	8,24 ± 0,26*	42	128	130	2,29**
MMC ^γ	23,48 ± 0,62	90	119	91	2,00
MMC+ Κουμαρικό οξύ 5μM	23,66 ± 0,64	100	110	90	1,97
MMC+ Κουμαρικό οξύ 50μM	23,28 ± 0,70	107	101	92	1,95
MMC+ Κουμαρικό οξύ 100μM	24,03 ± 0,84	104	108	88	1,95

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες.

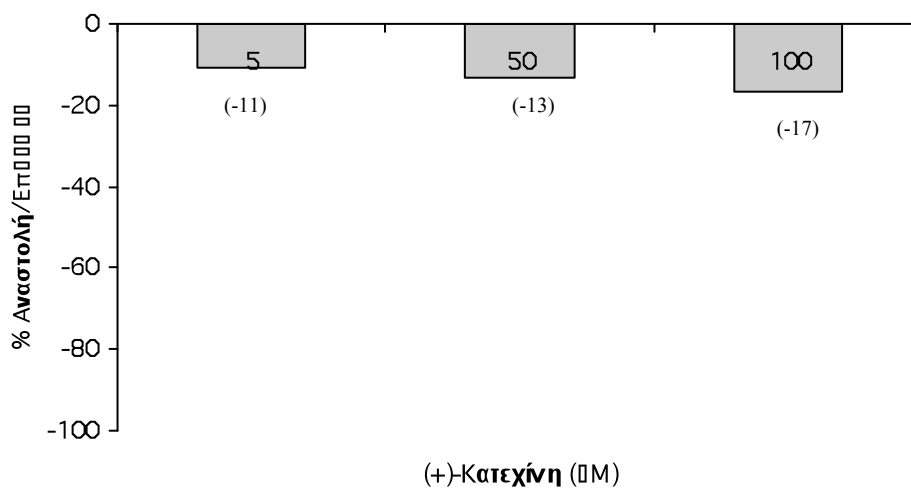


Σχήμα 3.65 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του κουμαρικού οξέος έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 3.59 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,81 ± 0,40*	81	99	120	2,13 ^{##}
Κατεχίνη 100μM	9,26 ± 0,39*	129	114	57	1,76 [#]
MMC ^γ	19,90 ± 0,71	93	132	75	1,94
MMC+ Κατεχίνη 5μM	21,09 ± 0,24	95	126	79	1,95
MMC+ Κατεχίνη 50μM	21,39 ± 0,35	138	113	49	1,70 ^{##}
MMC+ Κατεχίνη 100μM	21,75 ± 0,42	144	111	45	1,67 ^{##}

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. # $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. ## $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

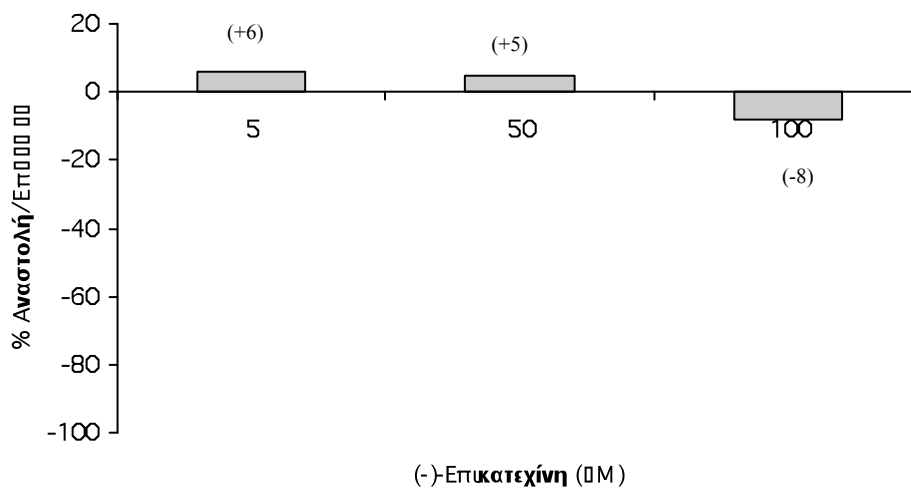


Σχήμα 3.66 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της (+)-κατεχίνης έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές τιμές.

Πίνακας 3.60 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	8,81 ± 0,40*	81	99	120	2,13 ^{##}
Επικατεχίνη 100μM	8,71 ± 0,90*	132	108	60	1,76 [#]
MMC ^γ	19,90 ± 0,71	93	132	75	1,94
MMC+ Επικατεχίνη 5μM	19,26 ± 1,06	105	130	65	1,87
MMC+ Επικατεχίνη 50μM	19,38 ± 0,34	129	138	33	1,68 ^{##}
MMC+ Επικατεχίνη 100μM	20,77 ± 1,33	138	114	48	1,70 ^{##}

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. # $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. ## $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

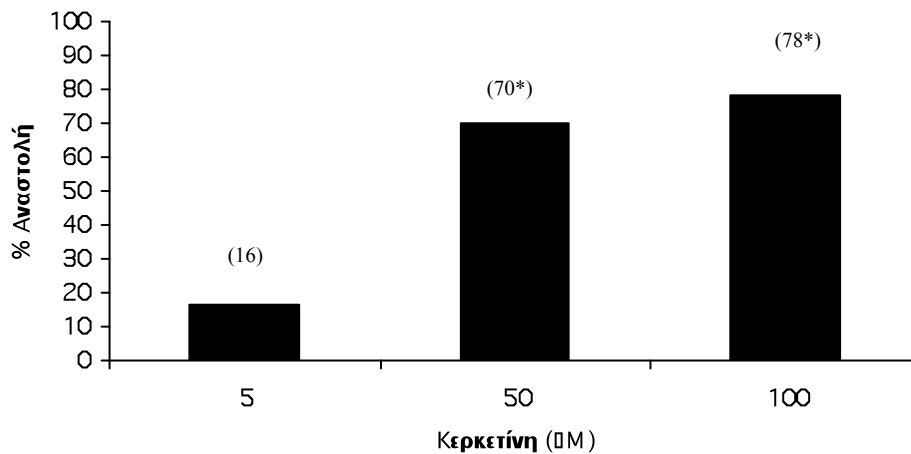


Σχήμα 3.67 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της (-)-επικατεχίνης έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.61 Επίδραση της κερκετίνης στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	9,06 ± 0,10*	84	135	81	1,99 ^{##}
Κερκετίνη 100μM	12,00 ± 0,12**	195	105	0	1,35 [#]
MMC ^γ	22,58 ± 0,08	93	174	33	1,80
MMC+ Κερκετίνη 5μM	20,39 ± 0,84	144	147	9	1,55 ^{##}
MMC+ Κερκετίνη 50μM	13,11 ± 0,28*	132	156	12	1,60 ^{##}
MMC+ Κερκετίνη 100μM	12,04 ± 0,48*	261	36	3	1,14 ^{##}

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. # $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. ## $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

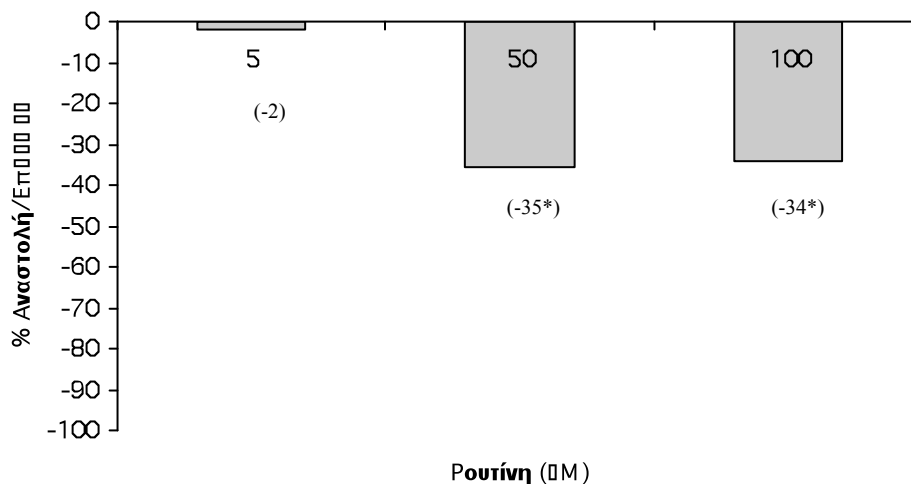


Σχήμα 3.68 Απεικονίζεται η % αναστολή της κερκετίνης έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.62 Επίδραση της ρουτίνης στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	9,06 ± 0,10*	84	135	81	1,99 ^{##}
Ρουτίνη 100μM	9,97 ± 0,66*	177	87	36	1,53 [#]
MMC ^γ	22,58 ± 0,08	93	174	33	1,80
MMC+ Ρουτίνη 5μM	22,86 ± 1,62	102	169	29	1,76 ^{##}
MMC+ Ρουτίνη 50μM	27,36 ± 0,85*	162	87	51	1,63 ^{##}
MMC+ Ρουτίνη 100μM	27,17 ± 0,28*	165	117	18	1,51 ^{##}

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. * $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ** $p < 0,05$ σε σύγκριση (Dunnnett's test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. # $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικού μάρτυρα. ## $p < 0,05$ σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).

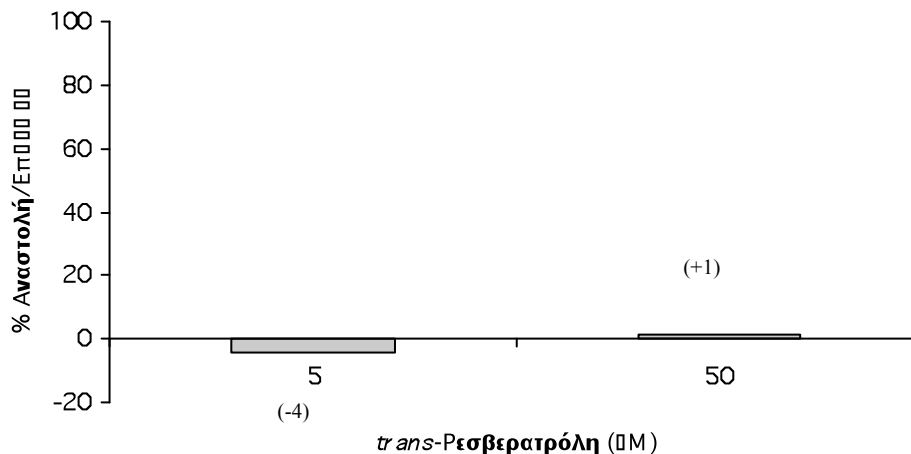


Σχήμα 3.69 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της ρουτίνης έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. * $p < 0,05$.

Πίνακας 3.63 Επίδραση της *trans*-ρεσβερατρόλης στην κυτταρογενετική δράση της μιτομυκίνης C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

	SCEs/κύτταρο ^α	M1	M2	M3	PRI ^β
Αρνητικός μάρτυρας	7,65 ± 0,09*	45	141	114	2,23 ^{##}
Ρεσβερατρόλη 100μM	κυτταροτοξικότητα	300	-	-	1,00 [#]
MMC ^γ	25,10 ± 0,52	75	120	105	2,10
MMC+ Ρεσβερατρόλη 5μM	25,84 ± 0,70	72	210	18	1,82 ^{##}
MMC+ Ρεσβερατρόλη 50μM	24,86 ± 0,31	252	48	-	1,16 ^{##}
MMC+ Ρεσβερατρόλη 100μM	κυτταροτοξικότητα	300	-	-	1,00 ^{##}

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των SCEs που προέκυψαν από τρία πειράματα σε κάθε ένα από τα οποία μετρήθηκαν οι SCEs σε 30 πυρήνες ανά καλλιέργεια. ^βΟι τιμές του PRI προέκυψαν με βάση την εξίσωση της παραγράφου 3.2.2.iii από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν οι πυρήνες 1^{ης} (M1), 2^{ης} (M2), και 3^{ης} (M3) κυτταρικής διαίρεσης σε σύνολο 300 μεταφάσεων. ^γΗ συγκέντρωση της MMC ήταν 20ng/ml. **p*<0,05 σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες). ***p*<0,05 σε σύγκριση (Dunnett's test) με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες. #*p*<0,05 σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες αρνητικούς μάρτυρες. ##*p*<0,05 σε σύγκριση (χ^2 -test) με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο MMC (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 3.70 Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της *trans*-ρεσβερατρόλης έναντι της αύξησης των SCEs σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από τη δράση της MMC. Η % αναστολή/επαγωγή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.iii. Οι θετικές τιμές δηλώνουν αναστολή της μεταλλαξιγένεσης ενώ οι αρνητικές τιμές δηλώνουν επαγωγή. **p*<0,05.

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτό το πειραματικό μέρος μελετήθηκε η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στις μεταλλάξεις που προκαλούνται από οξειδωτικούς παράγοντες σε τρία διαφορετικά πειραματικά μοντέλα: i) σε πλασμιδιακό DNA ii) σε βακτηριακά κύτταρα και iii) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Στην περίπτωση του πλασμιδιακού DNA και των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος οξειδωτικός παράγοντας, η μιτομυκίνη C (MMC), ενώ στα βακτηριακά κύτταρα ως οξειδωτικοί παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν η μπλεομυκίνη και το H₂O₂.

3.4.1 Μελέτη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων αμπέλου

Τα εκχυλίσματα και από τις δύο ποικιλίες αμπέλου ανέστειλαν τις επαγόμενες από MMC θραύσεις του πλασμιδιακού DNA, ενώ αύξησαν τον αριθμό των SCEs που προκαλούσε η MMC σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, δηλαδή στην περίπτωση αυτή παρουσίασαν προ-οξειδωτική δράση. Ωστόσο κανένα από τα εκχυλίσματα δεν επηρέασε τον αριθμό των SCEs απουσία της MMC, γεγονός που δείχνει ότι τα εκχυλίσματα έδρασαν συνεργικά και όχι αθροιστικά με τη MMC για να αυξήσουν τον αριθμό των SCEs. Επίσης, στη μέθοδο των SCEs τα εκχυλίσματα παρουσίασαν κυτταροστατική δράση ελαττώνοντας το PRI παρουσία όμως και όχι απουσία της MMC. Η διαφορετική επίδραση των εκχυλισμάτων στη δράση της MMC μεταξύ των δύο διαφορετικών μεθόδων μπορεί να εξηγηθεί από το ότι τα συστατικά των εκχυλισμάτων, που είναι υπεύθυνα για την αναστολή των θραύσεων του πλασμιδιακού DNA από τη MMC, στο εσωτερικό των λεμφοκυττάρων μπορεί να αλληλεπιδρούν με άλλες ουσίες ή να μεταβολίζονται με αποτέλεσμα να τροποποιείται η δράση τους. Επιπλέον, ίσως ένας άλλος λόγος για αυτή τη διαφορετική επίδραση των εκχυλισμάτων στη δράση της MMC είναι ότι όπως έχει αναφερθεί (παράγραφοι 3.2.2.i και 3.2.2.iii) οι μηχανισμοί με τους οποίους η MMC προκαλεί ρήξεις στο

πλασμιδιακό DNA και αύξηση των SCEs είναι διαφορετικοί. Στην πρώτη περίπτωση η αναγωγή της MMC οδηγεί στο σχηματισμό H_2O_2 και τελικά σε ΔΜΟ μέσω της αντίδρασης Fenton, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η αναγωγή της MMC οδηγεί στο σχηματισμό μίας υδροκινόνης που συνδέεται ομοιοπολικά με το DNA και προκαλεί μέσω ΔΜΟ τις SCEs. Στη μέθοδο με τα βακτηριακά κύτταρα *S. typhimurium* TA102, τα εκχυλίσματα και από τις δύο ποικιλίες αμπέλου ανέστειλαν την προκαλούμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση. Επίσης, τα μεθανολικά εκχυλίσματα των δύο ποικιλιών ανέστειλαν τη μεταλλαξιγόνο δράση του H_2O_2 στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102, ενώ αντίθετα τα υδατικά εκχυλίσματα ενίσχυσαν τη δράση του. Η διαφορετική επίδραση των μεθανολικών από τα υδατικά εκχυλίσματα στη δράση του H_2O_2 μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική χημική σύστασή τους. Επιπλέον η διαφορετική επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ανάμεσα στη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης και του H_2O_2 θα μπορούσε να αποδοθεί στους διαφορετικούς μηχανισμούς (παράγραφος 3.2.2.ii) με τους οποίους τα δύο μεταλλαξιγόνα ασκούν τη δράση τους. Γενικότερα, το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σε άλλες μεθόδους αντιοξειδωτική και σε άλλες προ-οξειδωτική δράση δείχνει ότι πρέπει να χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι για να εκτιμηθεί η χημειοπροστατευτική δράση φυτοχημικών ουσιών.

Με βάση το μηχανισμό με τον οποίο η μπλεομυκίνη και το H_2O_2 ασκούν τη μεταλλαξιγόνο δράση τους καθώς και με τα αποτελέσματα άλλων μελετών (Grey και Adlercreutz 2003; Ferguson και συν., 2003; Larramendy και συν., 1989; Byrnes και Petering 1993) στις οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί αυτά τα μεταλλαξιγόνα, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών είτε στη δέσμευση Fe^{2+} ή σε ένα συνδυασμό αυτών των ιδιοτήτων. Επίσης, η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων θα

μπορούσε να οφείλεται στη σύνδεση ορισμένων συστατικών τους με τη μπλεομυκίνη με αποτέλεσμα να μειώνεται είτε η πρόσληψη της από τα κύτταρα είτε η συγγένεια της με το DNA (η μπλεομυκίνη εκτός από το να παράγει ΔΜΟ έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το DNA).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα, κυρίως των μεθόδων με το πλασμιδιακό DNA και τα κύτταρα *S. typhimurium* TA102, δείχνουν ότι η ανασταλτική δράση (η οποία παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις που έχουν φυσιολογική σημασία) των εκχυλισμάτων αμπέλου έναντι των βλαβών που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες ίσως να είναι ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η χημειοπροστατευτική τους δράση που έχει παρατηρηθεί σε άλλες *in vivo* και *in vitro* μελέτες (Singh και συν., 2004; Agarwal και συν., 2000α). Ωστόσο, τα εκχυλίσματα ενίσχυσαν τη δράση της MMC στη μέθοδο των SCEs (δηλαδή έδειξαν προ-οξειδωτική δράση), ενώ επίσης τα υδατικά εκχυλίσματα ενίσχυσαν τη δράση του H₂O₂ στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Ήταν όμως ενδιαφέρον ότι σε αυτές τις περιπτώσεις τα εκχυλίσματα από μόνα τους δεν παρουσίασαν μεταλλαξιγόνο δράση, αλλά μόνο παρουσία των μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Δηλαδή, η προ-οξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ήταν εκλεκτική αφού δεν παρουσιάστηκε σε φυσιολογικά κύτταρα αλλά σε κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η εκλεκτική προ-οξειδωτική δράση φυτοχημικών συστατικών ίσως είναι ένας σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας, ο οποίος οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση (Malik και συν., 2003; Piwocka και συν., 1999; Mukhtar και συν., 1988). Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος έχει προταθεί πρόσφατα ως βασικός μηχανισμός προστασίας έναντι της γενωμικής αστάθειας αφού εξασφαλίζει ότι κύτταρα που έχουν υποστεί γενετικές βλάβες δεν θα επιβιώσουν (Ferguson 2001; Sun και συν., 2004). Επιπλέον,

εκχυλίσματα από σταφύλια έχουν παρουσιάσει κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρέασαν την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων (Ye και συν., 1999; Bagchi και συν., 2000). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αυτή η εκλεκτική κυτταροτοξικότητα ίσως να οφείλεται σε εκλεκτική προ-οξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Επιπρόσθετα, οι παρατηρούμενες δράσεις των εκχυλισμάτων δεν θα μπορούσαν να αποδοθούν σε καμία από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, γιατί οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών εκείνων που έδειξαν παρόμοια δράση με τα εκχυλίσματα ήταν πολύ μικρότερες από τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εκχυλίσματα.

3.4.2 Μελέτη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης πολυφαινολικών κλάσμάτων αμπέλου

Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα, τα πολυφαινολικά κλάσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) ενίσχυσαν τις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C θραύσεις του πλασμιδιακού DNA. Στην περίπτωση αυτή ήταν ενδιαφέρον ότι υπήρχαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις στις οποίες η προ-οξειδωτική δράση ήταν μέγιστη, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττωνόταν. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες με πολυφαινόλες και πιστεύεται ότι στις μικρότερες συγκεντρώσεις επικρατεί η προ-οξειδωτική δράση τους που αποδίδεται κυρίως στην ικανότητα των πολυφαινολών να ανάγουν τα ιόντα μετάλλων με αποτέλεσμα την παραγωγή ΔΜΟ (παράγραφος 3.4.3). Στις μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις αυτή η αναγωγική ιδιότητα των ουσιών αντισταθμίζεται από την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν παράλληλα τις ΔΜΟ (Suter και Richter 2000; Fukumoto και Mazza 2000).

Επίσης, σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα, τα πολυφαινολικά κλάσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά είτε ενίσχυσαν είτε δεν επηρέασαν τη δράση της μπλεομυκίνης ή του H₂O₂ στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Εξαίρεση αποτέλεσε

η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος στη δράση του H₂O₂. Στην περίπτωση αυτή, το εκχύλισμα, όπως και τα κλάσματά του, ενίσχυσε τη δράση του H₂O₂. Ήταν όμως αξιοσημείωτο ότι τα κλάσματα από μόνα τους δεν παρουσίασαν μεταλλαξιγένεση, και άρα τα κλάσματα φαίνεται να δρούσαν συνεργικά και όχι αθροιστικά με τη μπλεομυκίνη ή το H₂O₂. Δηλαδή, η προ-οξειδωτική δράση παρουσιάστηκε μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων, γεγονός που όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων (παράγραφος 3.4.1) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η αντίθεση ανάμεσα στη δράση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων τους στα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να εξηγηθεί ως ένα βαθμό από τη διαφορετική τους σύσταση στις εξεταζόμενες πολυφαινόλες. Για παράδειγμα, η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη που ενίσχυσαν τη δράση της μπλεομυκίνης βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμα από το οποίο προήλθε το κλάσμα (Πίνακας 1.1). Το κλάσμα, όπως και οι πολυφαινόλες, ενίσχυσε τη δράση της μπλεομυκίνης ενώ το εκχύλισμα την ανέστειλε. Γενικότερα, στη μέθοδο με το πλασμιδιακό DNA και τα κύτταρα *S. typhimurium* TA102 η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολικών κλασμάτων βρίσκεται σε αντίθεση με την ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων. Μία εξήγηση για τη διαφορετική δράση κλασμάτων και εκχυλισμάτων θα μπορούσε να είναι ότι οι ουσίες στις οποίες οφείλεται η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων απουσιάζουν από τα κλάσματα. Επιπλέον, επειδή τα κλάσματα είναι εμπλουτισμένα σε πολυφαινόλες, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων δεν οφείλεται στις πολυφαινόλες. Όπως αναφέρθηκε όμως και στην παράγραφο 3.4.1, έως τώρα οι πολυφαινόλες θεωρούνται τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά και γενικότερα δραστικά συστατικά των σταφυλιών (Agarwal και συν., 2000β; Bagchi και συν., 2000; Matito

και συν., 2003; Zhao και συν., 1999) και άρα η διαφορετική δράση ανάμεσα στα εκχυλίσματα και τα κλάσματα θα μπορούσε να οφείλεται σε μία συνεργική δράση μεταξύ των πολυφαινολών και ουσιών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα και απουσιάζουν από τα κλάσματα.

Τα μεθανολικό κλάσμα και το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά έδειξαν παρόμοια δράση με τα εκχυλίσματα στη μέθοδο των SCEs. Δηλαδή αύξησαν τις SCEs παρουσία της μιτομυκίνης C, ενώ απουσία της δεν είχαν καμία επίδραση. Συνεπώς, τα παραπάνω κλάσματα, όπως συνέβη και στη μέθοδο με τα βακτηριακά κύτταρα, έδρασαν συνεργικά με το μεταλλαξιγόνο για να προκαλέσουν αύξηση των SCEs. Τα παραπάνω κλάσματα ενίσχυσαν τη δράση της MMC τόσο στη μέθοδο με τις SCEs όσο και στη μέθοδο με το πλασμιδιακό DNA. Επιπλέον, το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς δεν επηρέασε τη δράση της MMC ούτε στη μέθοδο των SCEs αλλά ούτε και στην περίπτωση του πλασμιδιακού DNA. Ωστόσο, τα κλάσματα αυτά σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα δεν επηρέασαν το PRI.

3.4.3 Μελέτη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης φυτικών πολυφαινολών

Από τα υδροξυκινναμικά οξέα, το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ, δεν επηρέασαν τις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις του πλασμιδιακού DNA αλλά ούτε και τις SCEs που προκαλούσε το ίδιο μεταλλαξιγόνο στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Σε μία άλλη μελέτη όμως το φερουλικό οξύ σε συγκεντρώσεις 30-100μM αύξησε τις SCEs που προκαλούσε η MMC σε καλλιέργειες κυττάρων από ωοθήκες κινεζικών χάμστερ (Sasaki και συν., 1989a). Η διαφορά στη δράση του φερουλικού οξέος ανάμεσα στη τελευταία και στην παρούσα μελέτη μπορεί να εξηγηθεί από το ότι είχαν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι από διαφορετικούς οργανισμούς. Επιπλέον, το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ δεν επηρέασαν τη

δράση της μπλεομυκίνης και του H_2O_2 στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102 σε συγκεντρώσεις 1-100 μ M. Έχει αναφερθεί (Ferguson και συν., 2003) ότι το φερούλικό και το κουμαρικό οξύ ανέστειλαν τη δράση της μπλεομυκίνης σε κύτταρα *S. typhimurium* TA102 αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>750 μ M) από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Το καφεϊκό οξύ, που ανήκει επίσης στα υδροξυκινναμικά οξέα, ενίσχυσε τις προκαλούμενες από MMC βλάβες του πλασμιδιακού DNA παρουσιάζοντας προ-οξειδωτική δράση. Έχει αναφερθεί επίσης ότι το καφεϊκό οξύ προκάλεσε θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA παρουσία Cu^{2+} (Sakihama και συν., 2002). Γενικότερα, πιστεύεται (Sakihama και συν., 2002; Yamanaka και συν., 1997; Li και Trush 1994; Li και συν., 2000) ότι η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών παρουσία Cu^{2+} και Fe^{3+} (στην αντίδραση της MMC με το πλασμιδιακό DNA συμμετέχουν ιόντα Fe) οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν αυτά τα ιόντα σε Cu^{1+} και Fe^{2+} αντίστοιχα, τα οποία στη συνέχεια παίρνουν μέρος στην αντίδραση Fenton (παράγραφος 3.2.2.i, αντίδραση 3.4). Επίσης, στις καλλιέργειες των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων το καφεϊκό οξύ αύξησε τις SCEs κατά 55% στα 100 μ M παρουσία της MMC και κατά 26% απουσία της. Λόγω του ότι η αύξηση των SCEs ήταν μεγαλύτερη παρουσία της MMC, το αποτέλεσμα δείχνει μία συνεργική δράση ανάμεσα στο καφεϊκό οξύ και τη MMC. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με μία άλλη μελέτη στην οποία το καφεϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις 30-100 μ M αύξησε τις SCEs που προκαλούσε η MMC σε καλλιέργειες κυττάρων από ωοθήκες κινεζικών χάμστερ (Sasaki και συν., 1989α). Επιπλέον, στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα το καφεϊκό οξύ έδειξε κυτταροστατική δράση ελαττώνοντας το PRI. Σε συνδυασμό με την αύξηση των SCEs, αυτή η κυτταροστατική δράση πιθανώς να οφείλεται στην ενεργοποίηση μηχανισμών που καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο όταν συμβαίνουν βλάβες στο DNA, έτσι ώστε να

μπορέσουν να δράσουν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί (Ren και συν., 2003). Το καφεϊκό οξύ ήταν η μοναδική πολυφαινόλη που ανέστειλε τη δράση της μπλεομυκίνης στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102 και η αναστολή ξεκινούσε από τη συγκέντρωση του 1μM, ενώ δεν επηρέασε τη δράση του H₂O₂ στα ίδια κύτταρα σε συγκεντρώσεις 1-100μM. Σε μία άλλη μελέτη (Grey και Adlercreutz 2003) το καφεϊκό οξύ ανέστειλε τη δράση του H₂O₂ στα κύτταρα TA102 αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>500μM) από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, το καφεϊκό οξύ δεν παρουσίασε μεταλλαξιγόνο δράση στα βακτηριακά κύτταρα σε αντίθεση όπως αναφέρθηκε με τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Γενικότερα, από τα εξεταζόμενα υδροξυκινναμικά οξέα, το καφεϊκό οξύ ήταν το πιο δραστικό. Η διαφορά στη δομή τους είναι ότι το καφεϊκό οξύ έχει δύο υδροξύλια στις θέσεις 3,4 (κατεχολική δομή) ενώ το κουμαρικό οξύ έχει μόνο ένα υδροξύλιο και στο φερουλικό οξύ το ένα από τα δύο υδροξύλια έχει αντικατασταθεί από μία μεθόξυ ομάδα (Σχήμα 1.11). Πιστεύεται ότι λόγω αυτής της διαφοράς το καφεϊκό οξύ εμφανίζει ισχυρές αντιοξειδωτικές αλλά και χηλικές ιδιότητες (Lodovici και συν., 2001). Με δεδομένο το ότι η μπλεομυκίνη προκαλεί μεταλλάξεις μέσω παραγωγής ΔMO αλλά και ότι χρειάζεται την παρουσία ιόντων Fe για να δράσει, η παρατηρούμενη αναστολή του καφεϊκού οξέος έναντι της μπλεομυκίνης μπορεί να αποδοθεί στην κατεχολική της δομή.

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ, ενίσχυσαν τις βλάβες που προκαλούσε η MMC στο πλασμιδιακό DNA. Σε αυτή τη μέθοδο το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, που έχει δύο υδροξυλομάδες, εμφάνισε ισχυρότερη προ-οξειδωτική δράση από το γαλλικό οξύ, που έχει τρεις υδροξυλομάδες (Σχήμα 1.11). Όπως έχει ήδη αναφερθεί η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών παρουσία μετάλλων αποδίδεται κυρίως στην αναγωγική τους ικανότητα. Πιστεύεται ότι τα

πολυφαινολικά οξέα με τρεις υδροξυλομάδες έχουν μικρότερη προ-οξειδωτική δράση από εκείνα με δύο υδροξυλομάδες, γιατί οι δύο υδροξυλομάδες δεσμεύουν και ανάγουν ένα ιόν μετάλλου ενώ η τρίτη που μένει ελεύθερη εμφανίζει παράλληλα αντιοξειδωτική δράση (Siquet και συν., 2006). Επιπλέον, το γαλλικό οξύ ενίσχυσε τη δράση της MMC και στις καλλιέργειες των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων αυξάνοντας τις SCEs και παράλληλα παρουσίασε κυτταροστατική δράση ελαττώνοντας το PRI. Ωστόσο, απουσία της MMC δεν άσκησε καμία επίδραση. Σε μία άλλη μελέτη όμως το γαλλικό οξύ σε συγκεντρώσεις 10-100μM ανέστειλε τις SCEs που προκαλούσε η MMC σε καλλιέργειες κυττάρων από ωοθήκες κινεζικών χάμστερ (Sasaki και συν., 1989β). Η διαφορά στη δράση του γαλλικού οξέος ανάμεσα στη τελευταία και στην παρούσα μελέτη μπορεί να εξηγηθεί από το ότι είχαν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι από διαφορετικούς οργανισμούς. Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ όμως, δεν άσκησε καμία επίδραση στις SCEs παρουσία ή απουσία της μιτομυκίνης C. Κανένα από τα δύο υδροξυβενζοϊκά οξέα δεν άσκησε επίδραση στη δράση της μιτομυκίνης ή του H₂O₂ στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Το γαλλικό οξύ έχει παρουσιάσει ανασταλτική δράση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA100 και TA98 έναντι των ουσιών 9-αμινοακρινιδίνη και *N*-μεθυλ-*N'*-νιτρο-*N*-νιτροζογουανιδίνη (MNNG) αντίστοιχα, που είναι όμως ουσίες μη οξειδωτικές (Hour και συν., 1999).

Τα φλαβονοειδή (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη, τα οποία είναι στερεοϊσομερή, δεν άσκησαν καμία επίδραση στη δράση της μιτομυκίνης C στο πλασμιδιακό DNA στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (10-100μM). Σε μία άλλη μελέτη (Yamagishi και συν., 2001) είχε αναφερθεί ανασταλτική δράση της (-)-επικατεχίνης έναντι της MMC στην ίδια μέθοδο αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>650μM). Η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη δεν επηρέασαν τις SCEs παρουσία ή απουσία της μιτομυκίνης C, ενώ δεν άσκησαν επίδραση και στην

προκαλούμενη από τη μπλεομυκίνη και το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Το αποτέλεσμα ήταν σύμφωνο με άλλη μελέτη με τα ίδια κύτταρα, στην οποία η (+)-κατεχίνη δεν επηρέασε τη δράση του H₂O₂ (Grey και Adlercreutz 2003). Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη παρουσίασαν κυτταροστατική δράση ελαττώνοντας το PRI. Η κυτταροστατική αυτή δράση πιθανώς να οφείλεται στην ανασταλτική δράση αυτών των πολυφαινολών έναντι ενζύμων, όπως DNA πολυμερασών (Mizushima και συν., 2005) που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γιατί από τη μια παρατηρήθηκε μείωση του PRI παρουσία αλλά και απουσία της MMC και από την άλλη η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη δεν επηρέασαν τις SCEs.

Η ρουτίνη, που είναι επίσης φλαβονοειδής, έδειξε προ-οξειδωτική δράση ενισχύοντας τη δράση της MMC στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, από μόνη της δεν επηρέασε τις SCEs γεγονός που δείχνει συνεργική δράση ανάμεσα στη ρουτίνη και τη MMC. Στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102, η ρουτίνη δεν επηρέασε τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης και του H₂O₂. Όσον αφορά το H₂O₂, το αποτέλεσμα ήταν σύμφωνο με άλλη μελέτη στην οποία η ρουτίνη δεν επηρέασε τη δράση του στα κύτταρα TA102 (Grey και Adlercreutz 2003). Η ρουτίνη παρουσίασε κυτταροστατική δράση στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα ελαττώνοντας το PRI παρουσία αλλά και απουσία της MMC, άρα η δράση αυτή πιθανώς οφείλεται στην ανασταλτική δράση έναντι ενζύμων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η κερκετίνη ήταν η μοναδική από τα φλαβονοειδή που ανέστειλε τη δράση του H₂O₂ στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν σύμφωνο με μία άλλη μελέτη στην οποία είχε εξεταστεί η κερκετίνη σε συνδυασμό με κύτταρα *S. typhimurium* TA102 και H₂O₂ (Grey και Adlercreutz 2003), ενώ έχει αναφερθεί ότι

η κερκετίνη προστάτευε από την προκαλούμενη από το H_2O_2 τοξικότητα σε κύτταρα U937 (Sestili και συν., 2002) αλλά και σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Wilms και συν., 2005). Έχει προταθεί (Kobayashi και συν., 1990) ότι σημαντικό ρόλο στις προκαλούμενες από το H_2O_2 βλάβες του DNA παίζουν τα ιόντα Fe και Cu που οδηγούν στην παραγωγή $OH\cdot$ μέσω της αντίδρασης Fenton (παράγραφος 3.2.2.i, αντίδραση 3.4). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι χηλικές ενώσεις αναστέλλουν τη δράση του H_2O_2 (Jornot και συν., 1998). Άρα η ανασταλτική δράση της κερκετίνης έναντι του H_2O_2 θα μπορούσε να αποδοθεί στις ισχυρές χηλικές της ιδιότητες (van Acker και συν., 1996; Sestili και συν., 2002) ή σε ένα συνδυασμό των χηλικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της (Edenharder και Grunhage 2003). Πιστεύεται (Cook και Samman 1996) ότι τα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, που έχουν μία C4 καρβονυλομάδα και μία C3 ή C5 υδροξυλομάδα (Σχήμα 1.12) παρουσιάζουν ισχυρές χηλικές ιδιότητες. Η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη έχουν υδροξυλομάδες στις θέσεις C3 και C5 αλλά δεν έχουν C4 καρβονυλομάδα (Σχήμα 1.12). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η κερκετίνη ήταν 10 φορές πιο δραστική από την κατεχίνη στην αναστολή της οξείδωσης λιπιδίων επαγόμενη από ιόντα Fe (Chen και Ahn 1998). Στην ύπαρξη της C4 καρβονυλομάδας έχει αποδοθεί και η ισχυρότερη ικανότητα της κερκετίνης σε σύγκριση με την (+)-κατεχίνη να δεσμεύει $OH\cdot$ (Cook και Samman 1996). Όσον αφορά τη ρουτίνη, (που είναι η γλυκοσυλιωμένη μορφή της κερκετίνης, Σχήμα 1.12), η απουσία ανασταλτικής δράσης θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη δυσκολία των γλυκοσυλιωμένων ουσιών, λόγω της αυξημένης υδροφιλικότητας τους, να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες και να εισέλθουν στα κύτταρα. Επίσης, πιστεύεται ότι η προσθήκη σακχάρων ελαττώνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών γιατί ελαττώνει τον αριθμό των υδροξυλομάδων που μπορούν να δώσουν άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, ενώ επίσης

διαταράσσεται η επίπεδη στερεοδιάταξη της πολυφαινόλης (Heim και συν., 2002; Cook και Samman 1996). Όπως έχει αναφερθεί (παράγραφος 1.6.1) όταν το μόριο της πολυφαινόλης είναι επίπεδο διευκολύνεται η μετατόπιση ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο της πολυφαινόλης, με αποτέλεσμα η φαινολική ρίζα που προκύπτει να είναι περισσότερο σταθερή.

Σε αντίθεση με την ανασταλτική δράση έναντι του H_2O_2 στα βακτηριακά κύτταρα, η κερκετίνη ενίσχυσε τη δράση της μπλεομυκίνης στα ίδια κύτταρα. Επίσης, σε άλλη μελέτη με τα ίδια κύτταρα, η κερκετίνη είχε προστατευτική δράση στην επαγόμενη από υπεροξείδιο του βουτυλίου και υπεροξείδιο του κουμένιου μεταλλαξιγένεση (Edenharder και Grunhage 2003). Αυτή η αντίθεση μπορεί να εξηγηθεί από τους διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους δρουν τα διαφορετικά μεταλλαξιγόνα και δείχνει την ανάγκη να χρησιμοποιούνται περισσότεροι από ένας οξειδωτικοί παράγοντες για την εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μιας ουσίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή αυξάνουν την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη αποικοδόμηση του DNA ανάγοντας το Fe^{3+} σε Fe^{2+} (Sugihara και συν., 2005; Laughton και συν., 1989). Έχει επίσης προταθεί (Sugihara και συν., 2003) ότι τα φλαβονοειδή χρειάζονται τις ακόλουθες υδροξυλομάδες για να ενισχύσουν τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης: i) το C7-υδροξύλιο στον A δακτύλιο ii) το C4'-υδροξύλιο στο B δακτύλιο και iii) το C3-υδροξύλιο στο C δακτύλιο (Σχήμα 1.12). Όμως στην παρούσα μελέτη η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη που διαθέτουν τα τρία αυτά υδροξύλια δεν επηρέασαν τη δράση της μπλεομυκίνης. Η κερκετίνη όμως, η οποία εκτός από τα τρία υδροξύλια έχει επιπλέον την C4 καρβονυλομάδα και ένα 2,3 διπλό δεσμό στο C δακτύλιο (Σχήμα 1.12), ενίσχυσε τη δράση της μπλεομυκίνης. Συνεπώς τα αποτελέσματα δείχνουν πως αυτός ο διπλός

δεσμός και η καρβονυλομάδα ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της μεταλλαξιγένεσης της μπλεομυκίνης από τα φλαβονοειδή.

Η κερκετίνη ήταν η μοναδική από τα φλαβονοειδή και γενικότερα από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες που ανέστειλε, αν και σε μεγάλη συγκέντρωση (100μM), την επαγόμενη από τη μιτομυκίνη C αύξηση των SCEs στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Επίσης, σε μελέτη με τη μέθοδο comet η κερκετίνη προστάτευε το DNA από βλάβες που προκαλούσε η MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Undeger και συν., 2004). Ωστόσο, η κερκετίνη παρουσίασε μεταλλαξιγόνο δράση από μόνη της αυξάνοντας τις SCEs. Παρόμοια επίδραση εμφάνισε η κερκετίνη και στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102, δηλαδή όπως αναφέρθηκε παραπάνω ανέστειλε τη δράση του H₂O₂ αλλά από μόνη της παρουσίασε μεταλλαξιγόνο δράση. Αυτή η ιδιότητα της κερκετίνης να παρεμποδίζει τη δράση μεταλλαξιγόνων ουσιών και από μόνη της να εμφανίζει μεταλλαξιγένεση, έχει αναφερθεί αρκετές φορές στη βιβλιογραφία με χρησιμοποίηση διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Grey και Adlercreutz 2003; Vrijssen και συν., 1990; Van den Hoeven και συν., 1984). Έχει προταθεί ότι η μεταλλαξιγόνος δράση της οφείλεται στην ικανότητα της να σχηματίζει σύμπλοκα με Fe³⁺ ή Cu²⁺ σε αερόβιες συνθήκες με αποτέλεσμα να αυτο-οξειδώνεται και να παράγονται ΔMO που προκαλούν βλάβες στο DNA, ενώ η αντιμεταλλαξιγόνος δράση της αποδίδεται στις ισχυρές αντιοξειδωτικές και χηλικές ιδιότητές της (Formica και Regelson 1995). Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως πως είναι δυνατό σε έναν κυτταρικό τύπο η κερκετίνη να παρεμποδίζει τη δράση μεταλλαξιγόνων ουσιών και ταυτόχρονα η ίδια να εμφανίζει μεταλλαξιγόνο δράση. Πιστεύεται όμως ότι το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον μέσα στο οποίο βρίσκεται παίζει σημαντικό ρόλο, αφού είναι γνωστό ότι και άλλες ουσίες δρουν ως αντιοξειδωτικά κάτω από ορισμένες συνθήκες και ως προ-οξειδωτικά κάτω από άλλες (Laughton και συν., 1989; Formica και Regelson 1995).

Επιπλέον, η κερκετίνη εμφάνισε κυτταροστατική δράση στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα ελαττώνοντας το PRI. Το γεγονός πως η δράση αυτή παρουσιάστηκε και παρουσία της MMC, δηλαδή στην περίπτωση που η κερκετίνη ελάττωσε τις SCEs, δείχνει ότι η κυτταροστατικότητα της κερκετίνης οφείλεται πιθανώς στην ανασταλτική δράση έναντι ενζύμων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, η κερκετίνη είναι ισχυρός αναστολέας των τοποϊσομερασών (Constantinou και συν., 1995).

Η *trans*-ρεσβερατρόλη ενίσχυσε τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης και του H₂O₂ στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Ωστόσο, δεν προκάλεσε μεταλλαξιγένεση από μόνη της, άρα υπήρξε μία συνεργική δράση ανάμεσα σε αυτή και στα μεταλλαξιγόνα. Επίσης, και σε μελέτες με κύτταρα *S. typhimurium* TA98 και TA100, η ρεσβερατρόλη δεν έδρασε ως μεταλλαξιγόνο από μόνη της (Matsuoka και συν., 2001). Η *trans*-ρεσβερατρόλη έχει εμφανίσει αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε κύτταρα *S. typhimurium* TA98 έναντι της ουσίας Trp-P-1, η οποία όμως δεν είναι οξειδωτικός παράγοντας (Uenobe και συν., 1997). Στις καλλιέργειες των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων η *trans*-ρεσβερατρόλη δεν επηρέασε τις SCEs σε συγκεντρώσεις 5-50μM παρουσία ή απουσία της MMC, ενώ στα 100μM δεν ήταν δυνατή η καταμέτρηση των SCEs γιατί λόγω της μεγάλης κυτταροστατικότητας τα κύτταρα σταματούσαν στην 1^η κυτταρική διαίρεση. Σε καλλιέργειες κυττάρων από κινεζικό χάμστερ, η *trans*-ρεσβερατρόλη είχε προκαλέσει από μόνη της αύξηση των SCEs σε συγκεντρώσεις 10-40μM, ενώ στα 80μM τα κύτταρα σταματούσαν στην 1^η κυτταρική διαίρεση (Matsuoka και συν., 2001). Είχε υποστηριχτεί ότι στη δράση αυτή έπαιζε σημαντικό ρόλο η 4'-OH (Matsuoka και συν., 2002). Επίσης, η *trans*-ρεσβερατρόλη είχε προκαλέσει τη δημιουργία κυττάρων με μικροπυρήνες στο τεστ των μικροπυρήνων (micronucleus test), αλλά δεν είχε προκαλέσει αριθμητικές

χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως πολυπλοειδίες ή ανευπλοειδίες σε κύτταρα από κινεζικό χάμστερ (Matsuoka και συν., 2001). Η μέθοδος comet έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 50μM προκαλούσε βλάβες στο DNA σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων όχι όμως από μόνη της αλλά μόνο παρουσία Cu^{2+} (Azmi και συν., 2005). Στην ίδια μελέτη είχε υποστηριχτεί ότι οι υδροξυλομάδες της *trans*-ρεσβερατρόλης παίζουν σημαντικό ρόλο στην προ-οξειδωτική δράση της και ότι η δράση αυτή είναι ίσως υπεύθυνη για τις αντικαρκινικές ιδιότητές της. Η ισχυρή κυτταροστατική δράση της *trans*-ρεσβερατρόλης μπορεί να εξηγηθεί από την ανασταλτική δράση της έναντι ενζύμων που είναι σημαντικά για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως η ριβονουκλεοτιδική ρεδουκτάση (Fontecave και συν., 1998).

Συμπερασματικά, οι πολυφαινόλες που παρουσίασαν χημειοπροστασία ήταν το καφεϊκό οξύ από τη μπλεομυκίνη στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102 και η κερκετίνη από το H_2O_2 και τη MMC στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102 και στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, οι πολυφαινόλες είτε δεν επηρέασαν είτε ακόμη ενίσχυσαν τη δράση των οξειδωτικών παραγόντων παρουσιάζοντας προ-οξειδωτική δράση. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, πιστεύεται ότι στην προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών παίζουν βασικό ρόλο τα ιόντα μετάλλων όπως Fe και Cu. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι σημαντική γιατί μπορεί να οδηγεί καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση (Galati και συν., 2000; Azmi και συν., 2005). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι αυτή η προ-οξειδωτική δράση είναι εκλεκτική, δηλαδή παρουσιάζεται σε καρκινικά και όχι σε φυσιολογικά κύτταρα (Yamamoto και συν., 2003). Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν έχει διευκρινιστεί αλλά έχει αναφερθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις μετάλλων (Yoshida και συν., 1993). Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι στα *in vitro*

πειράματα η μερική πίεση του οξυγόνου είναι αρκετά υψηλή με αποτέλεσμα οι πολυφαινόλες να αυτο-οξειδώνονται και να παρουσιάζουν προ-οξειδωτική δράση, ενώ πιθανώς αυτό να μην συμβαίνει στους ιστούς των οργανισμών όπου η μερική πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλότερη (Sang και συν., 2005). Επίσης, στην παρούσα μελέτη τόσο η προστατευτική (με εξαίρεση το καφεϊκό οξύ στα βακτηριακά κύτταρα) όσο και η προ-οξειδωτική (με εξαίρεση το γαλλικό οξύ στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα) δράση των πολυφαινολών παρουσιάστηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>10μM), οι οποίες δεν μπορούν να επιτευχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της δίαιτας. Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα δεν υποστηρίζουν ένα χημειοπροστατευτικό ρόλο των πολυφαινολών. Ωστόσο, παρουσιάζουν ενδιαφέρον γιατί πολυφαινόλες έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ως φάρμακα (Weiss και συν., 1988; Ferry και συν., 1996; Wang 2001). Για παράδειγμα, η μπλεομυκίνη και η MMC, που χρησιμοποιήθηκαν ως οξειδωτικοί παράγοντες, είναι αντικαρκινικά φάρμακα (παράγραφοι 3.2.2.ii και 3.2.2.i). Άρα οι πολυφαινόλες που στην παρούσα μελέτη ενίσχυσαν τη δράση αυτών των μεταλλαξιγόνων θα μπορούσαν να δοκιμαστούν σε χημειοθεραπευτικά σχήματα.

Γενικά, τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη έδειξαν ότι η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων δεν οφείλεται πιθανώς στις εξεταζόμενες πολυφαινόλες. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι εξετάστηκαν μόνο οι μονομερείς πολυφαινόλες. Για παράδειγμα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ολιγομερείς και πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών (π.χ. προκυανιδίνες) έχουν αντιμεταλλαξιγόνες (Lloriz και συν., 2004) και αντικαρκινικές ιδιότητες (Bagchi και συν., 2002; Zhao και συν., 1999). Συμπερασματικά όμως, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την άποψη που έχει διατυπωθεί πρόσφατα ότι η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται πιθανώς στην αλληλεπίδραση και τη συνεργική δράση

πολλών φυτοχημικών συστατικών, η συνολική δράση των οποίων οδηγεί σε οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (Liu 2004; Glei και συν., 2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΟΖΟΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ SP-A ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

*Stagos D., Umstead T.M., Phelps D.S., Skaltsounis L., Charoutounian S.,
Kouretas D., Floros J.*

*Inhibition of ozone-induced SP-A oxidation by plant polyphenols
Free Radical Research (in press)*

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΟΖΟΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ SP-A ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

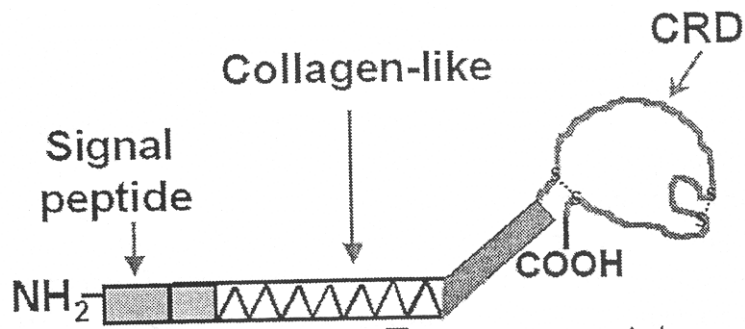
4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας του πνεύμονα (pulmonary surfactant) αποτελεί ένα σύνθετο και αυστηρά ρυθμιζόμενο σύμπλεγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών που παράγεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II στα τελικά βρογχιόλια των πνευμόνων. Μία από τις βασικότερες λειτουργίες του είναι η ελάττωση της επιφανειακής τάσης στην αέρια-υγρή μεσόφαση της επιφάνειας των κυψελίδων, γεγονός που αυξάνει την ενδοτικότητα των πνευμόνων και καθιστά ευκολότερη την έκπτυξή τους στους χαμηλούς πνευμονικούς όγκους ώστε να εξασφαλίζεται η βέλτιστη ανταλλαγή O₂ και CO₂ (Floros και Phelps 2002; Phelps 2001). Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας αποτελείται από 90% λιπιδίων και 10% πρωτεϊνών. Τα επικρατέστερα λιπίδια είναι διάφορα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη, η σφιγγομυελίνη και λιπαρά οξέα. Οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant proteins ή SP) διακρίνονται σε δύο ομάδες τις υδρόφοβες (SP-B και SP-C) και τις υδρόφιλες (SP-A και SP-D) (Floros και Phelps 2002).

Η πιο διεξοδικά μελετημένη πρωτεΐνη του επιφανειοδραστικού παράγοντα και αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι η SP-A, η οποία είναι μία σιαλογλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος ~30-35kDa σε ανηγμένες συνθήκες (Haagsman και συν., 1987; Phelps και συν., 1984) και κωδικοποιείται από δύο παρόμοια γονίδια που βρίσκονται στο 10^ο χρωμόσωμα (Bruns και συν., 1987). Η SP-A συντίθεται και εκκρίνεται από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II του πνεύμονα και από τα κύτταρα της τραχείας και του βρογχικού υποβλεννογόνιου αδένου (Floros και Phelps 2002). Η SP-A ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται κολλεκτίνες, οι οποίες στο αμινοτελικό άκρο περιέχουν μία χαρακτηριστική

ακολουθία όμοια με του κολλαγόνου, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχουν μία περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (carbohydrate recognition domain ή CRD) (Σχήμα 4.1). Οι περιοχές που μοιάζουν με κολλαγόνο περιέχουν μία σειρά από 23 τριπλέτες Gly-X-Y (όπου Y είναι μία προλίνη ή υδροξυπρολίνη) ακολουθούμενη από μία υδρόφοβη περιοχή-‘αυχένα’ που παίζει ρόλο στον τριμερισμό της πρωτεΐνης (Palaniyar και συν., 2000). Η σφαιρική καρβοξυτελική CRD περιοχή αλληλεπιδρά με μονοστοιβάδες λιπιδίων, υδατανθράκων και κυττάρων τύπου II (Palaniyar και συν., 2000; McCormack και συν., 1994). Αυτές οι περιοχές του καρβοξυτελικού και του αμινοτελικού άκρου παίζουν ρόλο στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Η SP-A παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία, στο μεταβολισμό και τη δομή του επιφανειοδραστικού παράγοντα καθώς επίσης στη φυσική ανοσία και την τροποποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας στον πνεύμονα (Floros και Phelps 2002; Crouch και Wright 2001; McCormack και Whitsett 2002). Έτσι μελέτες έχουν δείξει ότι η SP-A από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage ή BAL) διεγείρει την παραγωγή κυτοκινών (Guillot και συν., 2002; Kremlev και συν., 1997), οξειδίου του αζώτου (NO) (Blau και συν., 1997), την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Kortides και συν., 1997), τον πολλαπλασιασμό ανοσοκυττάρων (Kremlev και συν., 1994), τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα των κυψελίδων (Van Iwaarden και συν., 1990; Ding και συν., 2004) και την παραγωγή της μεταλλοπρωτεΐνης-9 (Vasquez και συν., 2003). Επίσης όμως, και ένας αντιφλεγμονώδης ρόλος έχει αποδοθεί στην SP-A (Awasthi και συν., 2001; Borron και συν., 2000; McIntosh και συν., 1996). Για παράδειγμα, μελέτες *in vivo* και *in vitro* έχουν δείξει ότι η SP-A αναστέλλει την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτες



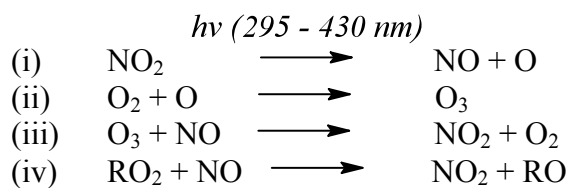
Σχήμα 4.1 Απεικονίζονται οι περιοχές της SP-A. Η SP-A ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται κολλεκτίνες, οι οποίες στο αμινοτελικό άκρο περιέχουν μία χαρακτηριστική ακολουθία όμοια με του κολλαγόνου (collagen-like) που βρίσκεται κοντά στην περιοχή του σηματοδοτικού πεπτιδίου (signal peptide), ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχουν μία περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (carbohydrate recognition domain ή CRD) (Floros και Phelps 2002).

παραγωγή κυτοκινών, την παραγωγή NO και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Η αντίθεση ανάμεσα στο φλεγμονώδη και τον αντιφλεγμονώδη ρόλο της SP-A έχει εξηγηθεί ως ένα βαθμό από μία πρόσφατη μελέτη (Gardai και συν., 2003) που έδειξε ότι η SP-A μπορεί να έχει διαφορετική δράση ανάλογα με το αν συνδέεται στα κύτταρα-στόχους μέσω του αμινοτελικού ή μέσω του καρβοξυτελικού άκρου. Επιπλέον, μία λεπτή ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στην προ-φλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη κατάσταση που υπάρχει σε έναν υγιή πνεύμονα οφείλεται εν μέρει και στη δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Έχει προταθεί ότι η SP-A και τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα αλληλεπιδρούν, αφού έχει δείχτεί ότι τα λιπίδια μπορούν να τροποποιούν τη δράση της SP-A (Kortides και συν., 1997; Kremlev και συν., 1994; Kremlev και συν., 1997). Έτσι αλλαγές στα σχετικά ποσά των λιπιδίων προς την SP-A ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ανοσολογικής κατάστασης του πνεύμονα. Επίσης, διάφορα μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της φυσικής ανοσίας ίσως επηρεάζουν τη δράση της SP-A στα διάφορα στάδια της φλεγμονώδους απόκρισης (Flores και Phelps 2002; Lawrence και συν., 2001).

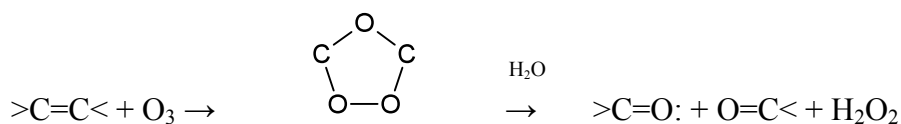
Το όζον (O_3) είναι ένας σημαντικός παράγοντας της φωτοχημικής ρύπανσης του αέρα. Παράγεται από μία αντίδραση που καταλύεται από το ηλιακό φως ανάμεσα στα οξείδια του αζώτου και σε πτητικές οργανικές ενώσεις (Σχήμα 4.2). Σύμφωνα με διεθνείς κανονισμούς η συγκέντρωση του O_3 στην ατμόσφαιρα δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 0,08 ppm (Baltasano και συν., 2003). Υπολογίζεται όμως, ότι για παράδειγμα στις Η.Π.Α. πάνω από 133 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν σε πόλεις όπου η συγκέντρωση του O_3 ξεπερνά αυτό το όριο (USEPA 2001). Το ίδιο συμβαίνει και σε πολλές πόλεις σε όλο τον κόσμο με αποτέλεσμα η ρύπανση της ατμόσφαιρας από το O_3 να καθίσταται ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Έτσι ενώ το O_3 της στρατόσφαιρας

προστατεύει από την ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία, το O₃ της τροπόσφαιρας προκαλεί βλάβες στους πνεύμονες που χαρακτηρίζονται κυρίως από παθολογικές αλλαγές όπως οίδημα, φλεγμονή, καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων και αποδόμηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (Putman και συν., 1997; Shelley και συν., 1989; Aris και συν., 1993; Devlin και συν., 1991). Επιπλέον το O₃ είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας (μόνο το F₂, το O και F₂O είναι περισσότερο οξειδωτικά από αυτό) (Τοσσίδης και Συγκολλίτου-Κουράκου 1986) ο οποίος μετατρέπεται εύκολα σε ΔΜΟ οι οποίες είναι ικανές να οξειδώνουν βιολογικά μακρομόρια όπως λιπίδια και πρωτεΐνες (Halliwell και Cross 1994; Uppu και συν., 1995). Επίσης, το O₃ αντιδρά με οργανικές ενώσεις που έχουν διπλό δεσμό C=C και σχηματίζει τα οργανικά οζονίδια, τα οποία με ύδωρ υδρολύονται (οζονόλυση) προς καρβονυλικές ενώσεις (Σχήμα 4.3). Έτσι έχει αναφερθεί ότι η έκθεση στο O₃ προκαλεί αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών καθώς και στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής αντικατάστασης και αποικοδόμησης (Berlett και Stadtman 1997). Το O₃ μπορεί να αντιδράσει με αμινοξέα σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά προτίμησης Cys>Trp=Met>Tyr>His (Mudd και συν., 1969). Μία σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι η οξείδωση της SP-A από το O₃ παρεμποδίζει τη λειτουργία της, όπως για παράδειγμα παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα να αλληλεπιδρά με τα μακροφάγα των κυψελίδων (Oosting και συν., 1992), να διεγείρει την έκκριση κυτοκινών από τα THP-1 μακροφάγα κύτταρα (Wang και συν., 2002; Janic και συν., 2003), να αναστέλλει την έκκριση φωσφατιδυχολίνης και του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα κύτταρα τύπου II (Oosting και συν., 1991).

Έχει προταθεί ότι αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ και ένζυμα όπως η καταλάση, η δισμουτάση του σουπεροξειδίου και η



Σχήμα 4.2 (i) Η φωτοαποικοδόμηση του NO₂ από το ηλιακό φως οδηγεί στο σχηματισμό NO και O. (ii) Το ατομικό οξυγόνο αντιδρά με μοριακό οξυγόνο και παράγει όζον. (iii) Το όζον αντιδρά αυθόρμητα με NO και αναγεννά το NO₂. (iv) Οργανικές ενώσεις όπως τα αλκυπεροξύλια (RO₂) αντιδρούν με NO και οδηγούν σε μία αύξηση του λόγου NO₂/NO και της συγκέντρωσης του O₃.



Σχήμα 4.3 Το O₃ αντιδρά με οργανικές ενώσεις που έχουν διπλό δεσμό και σχηματίζει οργανικά οζονίδια, τα οποία με ύδωρ υδρολύονται (οζονόλυση) προς καρβονυλικές ενώσεις.

υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μπορούν να προστατεύσουν τον πνεύμονα από τις βλάβες που προκαλούνται μετά από έκθεση στο O₃ (Heffner και Repine 1991). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι χορήγηση σε ανθρώπους φυτικών αντιοξειδωτικών, όπως τα καροτενοειδή, προστατεύει από τις βλαβερές συνέπειες του O₃ στον πνεύμονα (Samet και συν., 2001; Steck-Scott και συν., 2004).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται στα σταφύλια στην προκαλούμενη από το O₃ οξείδωση της SP-A. Μία πιθανή ανασταλτική δράση των εξεταζόμενων ουσιών ίσως να δείχνει ένα μηχανισμό προστασίας φυτικών αντιοξειδωτικών από ρυπαντές της ατμόσφαιρας.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 ΥΛΙΚΑ

4.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια

Η χημική ουσία 1,1-διφαινύλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) ήταν από την εταιρεία Sigma (Η.Π.Α.). Τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία), και Sigma (Η.Π.Α.).

4.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.2.i Απομόνωση ανθρώπινης SP-A

Ανθρώπινη SP-A απομονώθηκε από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) 6 ασθενών με κυψελιδική πρωτεϊνώση. Το BAL απομονώθηκε από τους ασθενείς με βρογχοσκόπηση που έγινε από το κλινικό προσωπικό της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου 'The Pennsylvania State' στις Η.Π.Α. Χρησιμοποιήθηκε BAL από ασθενείς με πρωτεϊνώση γιατί σε αυτά τα άτομα η SP-A βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις ενώ σε υγιή άτομα η συγκέντρωσή της είναι πολύ μικρή. Αρχικά απομονώθηκε ο επιφανειοδραστικός παράγοντας από το BAL χρησιμοποιώντας

βουτανόλη (Haagsman και συν., 1987). Μετά την απομόνωση, το ίζημα αποξηράνθηκε με αέριο άζωτο και ομογενοποιήθηκε δύο φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα (20mM n-οκτύλ β-D-γλυκοκυρανοσίδιο, 10mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7,4). Στη συνέχεια το ίζημα που προέκυψε διαλυτοποιήθηκε για 48 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-HCl, pH 7,4). Μετά το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε σε 155.000xg για 30 λεπτά στους 4⁰C, και το υπερκείμενο που περιείχε την SP-A συλλέχτηκε, μοιράστηκε σε σωλήνες των 1,5ml και διατηρήθηκε στους -80⁰C. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε θάλαμο με 4⁰C θερμοκρασία.

4.2.2.ii Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Σε κάθε δείγμα SP-A έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με το Microassay kit της εταιρείας Bio-Rad (H.Π.Α.). Η μέθοδος αυτή, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου κατά Bradford (Bradford 1976), στηρίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από τις πρωτεΐνες. Η χρωστική δεσμεύεται κυρίως σε βασικά (ιδιαίτερα στην αργινίνη) και αρωματικά αμινοξέα. Το παραγόμενο σύμπλοκο δίνει μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά στα 595nm. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα που έχουν συγκέντρωση πρωτεΐνης <25μg/ml και συνολική ποσότητα πρωτεΐνης 1-20μg. Στη μέθοδο αυτή αναμιγνύονται 100μl του αντιδραστηρίου της χρωστικής (Dye Reagent) με 25μl του δείγματος της SP-A και 375μl απιονισμένου νερού. Μετά από ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μετριέται η οπτική απορρόφηση στα 595nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη από ορό βοδιού. Επίσης εξετάστηκε αν οι προς μελέτη πολυφαινόλες επηρέαζαν τη μέθοδο συγκρίνοντας τις τιμές σε δείγματα που περιείχαν μία συγκεκριμένη συγκέντρωση SP-A με δείγματα που περιείχαν SP-A στην ίδια

συγκέντρωση αλλά και τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες. Βρέθηκε ότι καμία από τις πολυφαινόλες δεν επηρέαζε τα αποτελέσματα της μεθόδου.

4.2.2.iii Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS και χρώση με νιτρικό άργυρο

Τα δείγματα της SP-A υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS για να ελεγχθεί η καθαρότητά τους. Με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος εξαιτίας της παρουσίας του ανιονικού απορρυπαντικού SDS μέσα στην πηκτή. Το SDS αποδιατάσσει τις ανώτερες δομές των πρωτεϊνών και τους προσδίδει φορτίο ανάλογο με το μοριακό τους βάρος. Στη συνέχεια με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου οι πρωτεΐνες διανύουν απόσταση ανάλογη με το φορτίο τους και κατά συνέπεια με το μοριακό τους βάρος. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε είναι ασυνεχές κατά Laemmli (Laemmli 1970). Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη:

- i) Πηκτή επιστοιβαξης: 6% ακρυλαμίδιο, 0,2% δις-ακρυλαμίδιο, 0,5% SDS σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,125M Tris-HCl pH 6,8. Ο πολυμερισμός γίνεται με 0,02%v/v TEMED και 0,8%w/v υπερθειικό αμμώνιο.
- ii) Πηκτή διαχωρισμού: 4-15% ακρυλαμίδιο, 0,33% δις-ακρυλαμίδιο, 0,5% SDS σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8,9. Ο πολυμερισμός γίνεται με 0,02%v/v TEMED και 0,8%w/v υπερθειικό αμμώνιο.

Το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι: 25mM Tris-HCl pH 8,9, 0,192M γλυκίνη, 0,1% SDS. Σε 30μl δείγμα της SP-A προστίθενται 10μl διαλύματος φόρτωσης (2% SDS, 0,1M Tris-HCl pH 6,8 και 10% γλυκερόλη) και θερμαίνεται για 10 λεπτά στους 95⁰C. Στη συνέχεια γίνεται η ηλεκτροφόρηση στα 90V για 1 ώρα. Ακολουθεί χρώση με νιτρικό άργυρο, η οποία στηρίζεται στην αναγωγή των ιόντων Ag⁺ προς μεταλλικό Ag, ο οποίος επειδή έχει σκούρο χρώμα βάφει τις πρωτεΐνες. Αρχικά οι πρωτεΐνες

μονιμοποιούνται στην πηκτή με 125 ml διάλυμα μονιμοποίησης (40%v/v αιθανόλη, 10%v/v οξικό οξύ) για 30 λεπτά. Μετά η πηκτή τοποθετείται σε 125ml διαλύματος επώασης (30%v/v αιθανόλη, 7% οξικό νάτριο, 0,2% θειοθειικό νάτριο, 0,25%v/v γλουταραλδεϋδη) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια γίνονται 4 πλύσεις της πηκτής (5 λεπτά η κάθε πλύση) με απιονισμένο νερό. Μετά η πηκτή τοποθετείται σε 250ml διαλύματος νιτρικού αργύρου (0,1% νιτρικός άργυρος, 0,02%v/v φορμαλδεϋδη) για 40 λεπτά, ξεπλένεται αμέσως με απιονισμένο νερό, εμβαπτίζεται σε 125ml διαλύματος εμφάνισης (2,5% ανθρακικό νάτριο, 0,01%v/v φορμαλδεϋδη) για 5-15 λεπτά, η χρώση σταματάει με εμβάπτιση σε 125ml διαλύματος EDTA (1,5%) για 15 λεπτά, τέλος γίνεται πλύση με απιονισμένο νερό για 15 λεπτά και φωτογραφίζεται η πηκτή.

4.2.2.iv Πειραματική διάταξη παραγωγής O₃

Για την παραγωγή του O₃, χρησιμοποιήθηκε μία ειδική πειραματική διάταξη (Σχήμα 4.4). Το σύστημα αποτελείται από δύο δοχεία, ένα δοχείο μάρτυρα το οποίο δέχεται μόνο φιλτραρισμένο αέρα και ένα δοχείο (δοχείο έκθεσης στο O₃) που δέχεται φιλτραρισμένο αέρα και O₃. Τα δύο δοχεία βρίσκονται μέσα σε έναν επωαστικό θάλαμο με 37,5⁰C. Ο ρυθμός ροής όλων των αερίων ελέγχεται από ειδικές συσκευές. Ο φιλτραρισμένος αέρας που είναι εμπλουτισμένος με 5% CO₂ πριν εισέλθει στα δύο δοχεία περνάει μέσα από έναν υγροποιητή με ρυθμό 15 λίτρα ανά λεπτό. Ο υγροποιητής είναι ένα δοχείο όγκου 2lt με θερμαινόμενη βάση που περιέχει 1,5lt απιονισμένο νερό. Στα συγκεκριμένα πειράματα η θερμοκρασία του νερού ήταν 50,2⁰C έτσι ώστε να γίνεται πλήρης κορεσμός με υγρασία του αέρα στους 37,5⁰C και σε πίεση 760mm Hg. Η συνολική ποσότητα των υδρατμών που διέρχονταν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος μέσα στο δοχείο



Σχήμα 4.4 Απεικονίζεται η πειραματική διάταξη παραγωγής του O₃. (1) Υπεριώδης αναλυτής O₃, (2) καταγραφείς που δείχνουν τη ροή του φιλτραρισμένου αέρα, του διοξειδίου του άνθρακα και του οξυγόνου, (3) γεννήτρια παραγωγής O₃, (4) ηλεκτρικός τροφοδότης της γεννήτρια παραγωγής O₃, (5) συσκευή που ελέγχει τη ροή των αερίων, (6) ρυθμιστές της ροής του φιλτραρισμένου αέρα προς το δοχείο μάρτυρα, (7) ρυθμιστές της ροής του φιλτραρισμένου αέρα και του O₃ προς το δοχείο έκθεσης στο O₃, (8) ρυθμιστής θερμοκρασίας του υγροποιητή του δοχείου μάρτυρα, (9) ρυθμιστής θερμοκρασίας του υγροποιητή του δοχείου έκθεσης στο O₃, (10) επωαστικός θάλαμος, (11) δοχείο μάρτυρα, (12) υγροποιητής του δοχείου μάρτυρα, (13) υγροποιητής του δοχείου έκθεσης στο O₃, (14) δοχείο έκθεσης στο O₃.

μάρτυρα και στο δοχείο έκθεσης ήταν 172,8ml. Η ακριβής υγροποίηση του αέρα που εισέρχεται στα δοχεία είναι σημαντική, έτσι ώστε να προστατευτούν τα διαλύματα με την πρωτεΐνη από εξάτμιση αλλά και να μην εισέλθουν υδρατμοί μέσα στα δείγματα και αλλάξει ο όγκος τους άρα και η συγκέντρωσή τους.

Το O₃ παράγεται με ηλεκτρική εκκένωση από μία γεννήτρια που δέχεται οξυγόνο. Η ροή του οξυγόνου στην ηλεκτρική γεννήτρια ελέγχεται από ειδικές συσκευές. Με αυτό το σύστημα μπορεί να παραχθεί O₃ από 0,1 έως 10ppm. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η συγκέντρωση του O₃ στο δοχείο έκθεσης ελέγχεται συνεχώς από έναν υπεριώδη αναλυτή O₃ (Umstead και συν., 2002).

4.2.2.v Έκθεση της SP-A στο O₃ παρουσία φυτικών πολυφαινόλων

Διαλύματα όγκου 100μl που περιείχαν την πρωτεΐνη SP-A σε συγκέντρωση 50μg/ml τοποθετήθηκαν σε δίσκους με 24 οπές και εκτέθηκαν σε O₃ 1ppm για 4 ώρες. Η επίδραση οκτώ πολυφαινόλων (του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού οξέος, του *p*-κουμαρικού οξέος, του γαλλικού οξέος, του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, της (+)-κατεχίνης, της (-)-επικατεχίνης και της ρουτίνης) εξετάστηκε στην επαγόμενη από το O₃ οξειδωση της SP-A. Κάθε πολυφαινόλη εξετάστηκε σε 4 συγκεντρώσεις (5, 25, 50 και 100μM) και τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κάθε ένα από τα οποία υπήρχαν τρία δείγματα για κάθε συγκέντρωση. Κάθε πείραμα περιελάμβανε αρνητικούς μάρτυρες (δηλαδή δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και τοποθετούνταν στο δοχείο μάρτυρα στο οποίο διοχετεύονταν φιλτραρισμένος αέρας), θετικούς μάρτυρες (δηλαδή δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και τοποθετούνταν στο δοχείο έκθεσης στο οποίο διοχετεύονταν O₃) και δείγματα που περιείχαν SP-A και πολυφαινόλες και τοποθετούνταν στο δοχείο έκθεσης καθώς και δείγματα που περιείχαν SP-A και πολυφαινόλες (στη μεγαλύτερη από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις) και

τοποθετούνταν στο δοχείο στο οποίο διοχετεύονταν φιλτραρισμένος αέρας. Επιπλέον, λόγω του ότι οι πολυφαινόλες ήταν διαλυμένες σε μεθανόλη (η τελική συγκέντρωση της οποίας κατά την έκθεση στο O₃ ήταν 1%v/v) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιείχαν SP-A και μεθανόλη.

Μετά την έκθεση στο O₃ τα διαλύματα της SP-A πρωτεΐνης μεταφέρθηκαν σε σωλήνες των 0,5ml και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους με το Microassay kit της εταιρείας Bio-Rad. Στη συνέχεια γινόταν σε όλα τα δείγματα προσδιορισμός της οξείδωσης της SP-A.

4.2.2.vi Προσδιορισμός των καρβονυλικών ομάδων της SP-A πρωτεΐνης

Η οξείδωση των δειγμάτων της SP-A προσδιορίστηκε με το Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit της εταιρείας Intergen (Η.Π.Α.). Η μέθοδος αυτή είναι μία παραλλαγή της μεθόδου που είχε περιγραφεί από το Levine και τους συνεργάτες του (Levine και συν., 1994). Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων που έχουν εισαχθεί στις πρωτεΐνες μέσω της οξείδωσής τους. Σε 5μl από το διάλυμα της SP-A με συγκέντρωση 50μg/ml προστίθενται 5μl διαλύματος SDS 12% το οποίο προκαλεί αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προστίθενται 5μl διαλύματος 2,4-δινιτροφαιλυδραζίνης (DNPH) 0,5X και τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 25⁰C. Η 2,4-δινιτροφαιλυδραζίνη αντιδρά και συνδέεται με τις καρβονυλικές ομάδες της πρωτεΐνης με τη μορφή 2,4-δινιτροφαιλυδραζόνης (DNP). Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 7μl διαλύματος ουδετεροποίησης (2M Tris, 30%v/v γλυκερόλη) και στα δείγματα προστίθενται 228μl ρυθμιστικού διαλύματος PB (0,016M NaH₂PO₄, 0,16M Na₂HPO₄ pH 7,5).

Επίσης, σε αυτό το στάδιο των πειραμάτων εξετάστηκε αν οι προς μελέτη ουσίες παρεμποδίζουν την αντίδραση του DNPH με τις καρβονυλικές ομάδες.

Έτσι πραγματοποιήθηκε η αντίδραση οξειδωμένων δειγμάτων SP-A (αρνητικοί μάρτυρες) με το DNPH (ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω) ενώ σε άλλα δείγματα προστέθηκε οξειδωμένη SP-A, πολυφαινόλες και DNPH. Καμία από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες δεν επηρέαζε την αντίδραση του DNPH με τις καρβονυλικές ομάδες της SP-A. Ενώ μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (Ασσύρτικου και Μανδηλαριάς) καθώς και τα πολυφαινολικά κλάσματά τους παρεμπόδιζαν την αντίδραση του DNPH με τις καρβονυλικές ομάδες της SP-A και άρα δεν ήταν δυνατό να εξεταστούν με αυτή τη μέθοδο. Επίσης, δεν ήταν δυνατό να εξεταστούν οι πολυφαινόλες κερκετίνη και ρεσβερατρόλη γιατί αυτές οι πολυφαινόλες ήταν διαλυμένες σε DMSO το οποίο επειδή είναι υγρόφιλο απορροφούσε νερό και έτσι άλλαζε η συγκέντρωση της SP-A και των ουσιών κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο όζον.

Στη συνέχεια έγινε σταθεροποίηση και ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο dot-blot.

4.2.2.vii Σταθεροποίηση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο του dot-blot

Για αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε μία συσκευή dot-blot με 96 οπές της εταιρείας Bio-Rad (Η.Π.Α.). Αρχικά στη συσκευή προσαρμόζεται μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία έχει υγρανθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα PB pH 7,5 για 5 λεπτά ενώ κάτω από τη μεμβράνη τοποθετείται διηθητικό χαρτί και η συσκευή συνδέεται με κενό αέρος για να μπορεί να γίνει αναρρόφηση των δειγμάτων και να προσκολληθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη. Από κάθε δείγμα τοποθετούνται από 100μl (τα οποία περιέχουν 100ng SP-A) σε δύο διαφορετικές οπές. Στη συνέχεια η κάθε οπή πλένεται 4 φορές με 100μl διάλυμα PB pH 7,5. Μετά τις πλύσεις ανοίγονται δύο οπές στη μεμβράνη και γίνεται αναρρόφηση των

δειγμάτων για 5 λεπτά και η μεμβράνη εμβαπτίζεται για 1 ώρα σε 100ml διαλύματος παρεμπόδισης που αποτελείται από 1%w/v BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,2 (0,05M Na₂HPO₄, 0,015M KH₂PO₄, 0,62M NaCl, η ρύθμιση του pH γίνεται με προσθήκη NaOH 10N). Μετά η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα 0,5% Tween-20 (διαλυμένο σε PBS pH 7,2) για 5 λεπτά και επωάζεται για 1 ώρα σε διάλυμα που περιέχει αντίσωμα (αντι-DNP) κουνελιού σε αραιώση 1:600, το οποίο συνδέεται με τις ομάδες της 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνης (DNP). Το αντίσωμα είναι αραιωμένο σε διάλυμα PBS pH 7,2 που περιέχει 1%w/v BSA και 0,05% Tween-20. Μετά η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα 0,5% Tween-20 (διαλυμένο σε PBS pH 7,2) και επωάζεται για 1 ώρα σε διάλυμα που περιέχει ένα δεύτερο αντίσωμα (αντι-αντι-DNP IgG) γίδας σε αραιώση 1:1200, το οποίο συνδέεται με το πρώτο αντίσωμα. Το αντίσωμα είναι αραιωμένο σε διάλυμα PBS pH 7,2 που περιέχει 1%w/v BSA και 0,05% Tween-20. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι επίσης συνδεδεμένο με το ένζυμο horseradish peroxidase. Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα 0,5% Tween-20 (διαλυμένο σε PBS pH 7,2) και η μεμβράνη επωάζεται για 1 λεπτό με διάλυμα που περιέχει ουσίες χημειοφθορισμού (τη λουμινόλη και μία δεύτερη ουσία που ενισχύει τη λουμινόλη). Η λουμινόλη μετατρέπεται από το σύμπλοκο DNP/πρώτο αντίσωμα/δεύτερο αντίσωμα/υπεροξειδάση (πρόκειται για μία αντίδραση οξείδωσης με καταλύτη το H₂O₂) σε μία ουσία που εκπέμπει φως μήκους κύματος 428nm. Η μεμβράνη στερεώνεται σε κασέτα εμφάνισης και εκτίθεται για 1 λεπτό σε φιλμ XAR (Eastman Kodak, Η.Π.Α.) σε σκοτεινό θάλαμο. Μετά την εμφάνισή του το φιλμ σαρώνεται ηλεκτρονικά και γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της οξείδωσης κάθε δείγματος με το λογισμικό Quantity One της εταιρείας Bio-Rad

(Η.Π.Α.). Το λογισμικό αυτό υπολογίζει την οξείδωση κάθε δείγματος προσδιορίζοντας την οπτική πυκνότητα πολλαπλασιασμένη επί το εμβαδό των κηλίδων (dots) που σχηματίζουν τα πρωτεϊνικά δείγματα πάνω στο φιλμ.

4.2.2.viii Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της οξείδωσης για κάθε δείγμα SP-A καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0,05$. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής ή της επαγωγής της οξείδωσης που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Η % αναστολή της οξείδωσης της SP-A υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{oξ}_{\theta\mu} - \text{oξ}_{\delta}) / (\text{oξ}_{\theta\mu} - \text{oξ}_{\alpha\mu}) \times 100$$

$\text{oξ}_{\alpha\mu}$: η οξείδωση του αρνητικού μάρτυρα

$\text{oξ}_{\theta\mu}$: η οξείδωση του θετικού μάρτυρα

oξ_{δ} : η οξείδωση του δείγματος

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση δειγμάτων SP-A και προσδιορισμός της οξειδωσής τους

Ανθρώπινη SP-A απομονώθηκε από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) 6 ασθενών (AP1-AP6) με κυψελιδική πρωτεΐνωση. Η οξείδωση της SP-A σε αυτά τα δείγματα προσδιορίστηκε με το Oxyblot Oxidized Protein Detection kit. Οι αντίστοιχες κηλίδες (dots) καθώς και οι τιμές που υπολογίστηκαν από την ανάλυση της οπτικής πυκνότητας των κηλίδων που προέκυψαν ύστερα από σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο του dot-blot παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.5. Σε κάποια δείγματα (AP3, AP5 και AP6) η SP-A ήταν οξειδωμένη σε μεγάλο βαθμό, για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα AP1, AP2 και AP4 στα οποία η SP-A ήταν λιγότερο οξειδωμένη. Αυτό πιθανώς οφείλεται ότι στα άτομα με κυψελιδική πρωτεΐνωση η SP-A συσσωρεύεται στους πνεύμονες όπου και οξειδώνεται.

4.3.2 Καμπύλη οξειδωσης της SP-A από το O₃

Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης SP-A, αυξανόμενες συγκεντρώσεις SP-A (25, 50, 100 και 200μg/ml) εκτέθηκαν σε 1ppm O₃ για 4 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι η οξείδωση αυξάνει καθώς η συγκέντρωση της SP-A μειώνεται. Πιο κατάλληλη συγκέντρωση θεωρήθηκαν τα 50μg/ml γιατί σε αυτή τη συγκέντρωση υπήρξε μία επαρκής αύξηση της οξειδωσης της SP-A ενώ παράλληλα μετά από αυτή σχηματιζότανε ένα πλατό (Σχήμα 4.6). Επιπλέον σε υγιή άτομα η συγκέντρωση της SP-A στο BAL κυμαίνεται από 10-100μg/ml.

4.3.3 Επίδραση φυτικών πολυφαινολών στην επαγόμενη από το O₃ οξείδωση της SP-A

Τα φλαβονοειδή (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και ρουτίνη ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την επαγόμενη από το O₃ οξείδωση της SP-A. Η (+)-κατεχίνη

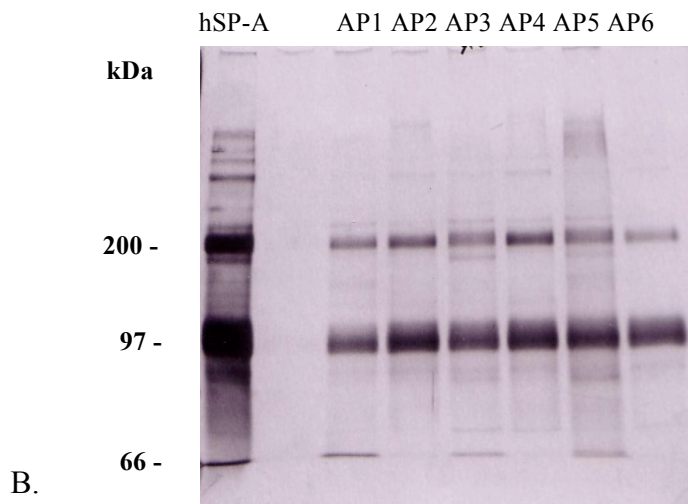
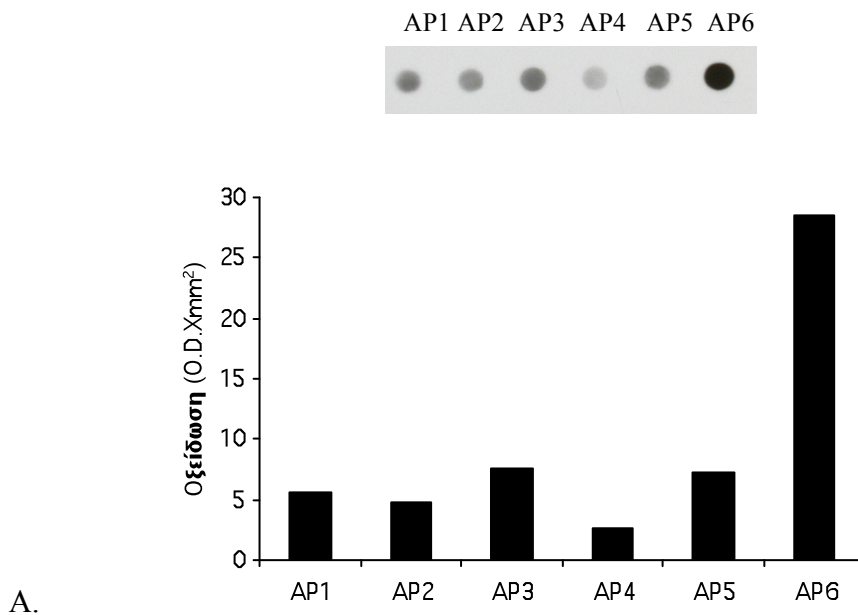
παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη αναστολή ($r = -0,75$, $p < 0,01$) κατά 25, 47 και 62% ($p < 0,05$) σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 μM αντίστοιχα (Σχήμα 4.7 και 4.15A). Η (-)-επικατεχίνη μείωσε δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,84$, $p < 0,01$) (το σχηματισμό καρβονυλικών ομάδων κατά 35, 43, 49 και 60% ($p < 0,01$) σε συγκεντρώσεις 5, 25, 50 και 100 μM αντίστοιχα (Σχήμα 4.8 και 4.15A). Επίσης, η ρουτίνη ανέστειλε δοσοεξαρτώμενα ($r = -0,73$, $p < 0,01$) την οξειδωση της SP-A από το O_3 κατά 38, 40 και 51% ($p < 0,05$) σε συγκεντρώσεις 25, 50 και 100 μM αντίστοιχα (Σχήμα 4.9 και 4.15A).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, πρωτοκατεχοϊκό οξύ και γαλλικό οξύ, ανέστειλαν την οξειδωση της SP-A που εκτέθηκε στο O_3 . Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ανέστειλε σημαντικά ($p < 0,05$) την οξειδωση της SP-A σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Έτσι η αναστολή ήταν 25% στα 5 μM ($p < 0,05$) αλλά έφτασε σε πλατό στα 50 μM (43% αναστολή, $p < 0,05$) (Σχήμα 4.10 και 4.15B). Το γαλλικό οξύ δεν είχε καμία επίδραση στα 5 μM , αλλά όπως και στο πρωτοκατεχοϊκό οξύ, η ανασταλτική του δράση έφτασε σε ένα πλατό στα 50 μM (33% αναστολή, $p < 0,05$) (Σχήμα 4.11 και 4.15B).

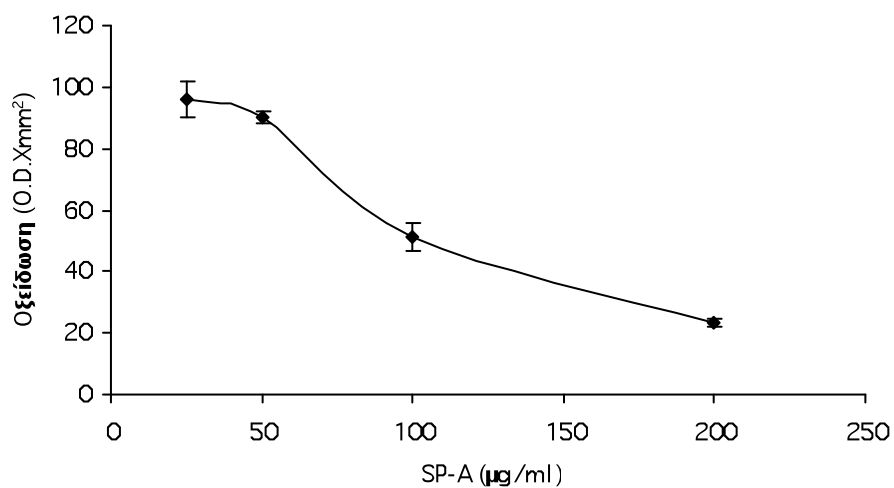
Επιπλέον, τα υδροξυκινναμικά οξέα ανέστειλαν την επαγόμενη από το O_3 οξειδωση της SP-A αλλά έδειξαν ένα διαφορετικό πρότυπο αναστολής σε σύγκριση με τα φλαβονοειδή και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Συγκεκριμένα, υπήρχε μία άριστη μέση συγκέντρωση στην οποία η αναστολή ήταν μέγιστη ενώ στις μικρότερες και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική αναστολή. Έτσι το καφεϊκό οξύ παρουσίασε στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) αναστολή κατά 34 και 38% στα 25 και 50 μM αντίστοιχα ενώ στα 5 και στα 100 μM δεν άσκησε καμία σημαντική επίδραση (Σχήμα 4.12 και 4.15Γ). Επίσης, το κουμαρικό οξύ παρουσίασε μέγιστη σημαντική αναστολή κατά 39% στα 25 μM ($p < 0,05$), ενώ στα 50 και στα 100 μM

υπήρξε μόνο μία τάση προς αναστολή ($p<0,15$) και στα 5 μ M δεν ασκήθηκε καμία επίδραση (Σχήμα 4.13 και 4.15Γ). Το φερουλικό οξύ δεν επηρέασε την επαγόμενη από το O₃ οξείδωση της SP-A στα 5, 50 και 100 μ M, ενώ στα 25 μ M παρουσίασε μία τάση προς αναστολή κατά 32% ($p<0,1$) (Σχήμα 4.14 και 4.15Γ).

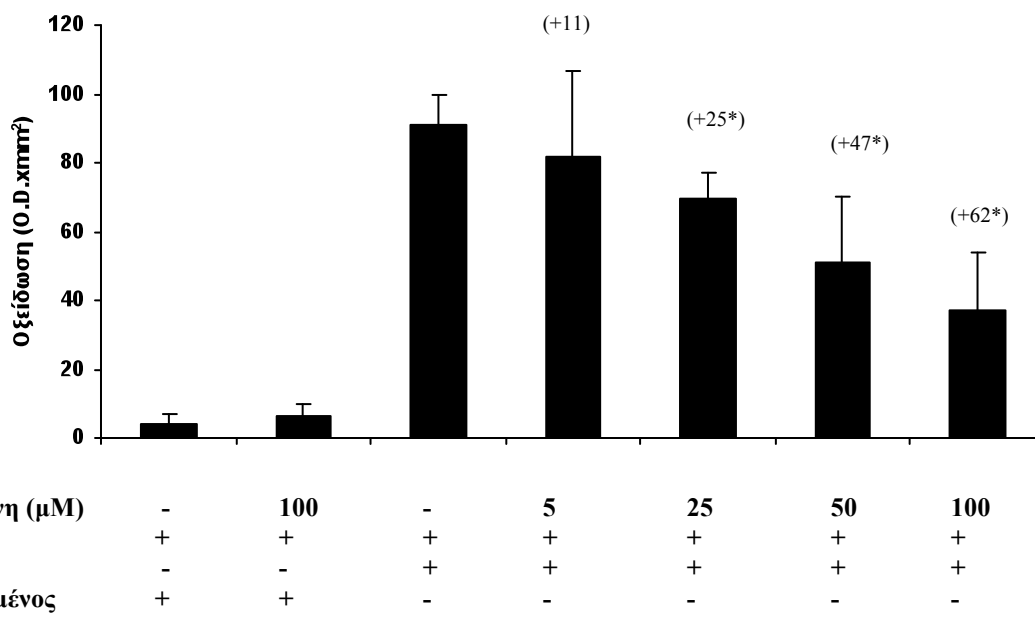
Καμία από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες δεν επηρέασε την οξείδωση της SP-A παρουσία μόνο φιλτραρισμένου αέρα (Σχήματα 4.7-4.14). Επίσης, η μεθανόλη, που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, σε συγκέντρωση 1%v/v δεν επηρέασε την οξείδωση της SP-A από το όζον.



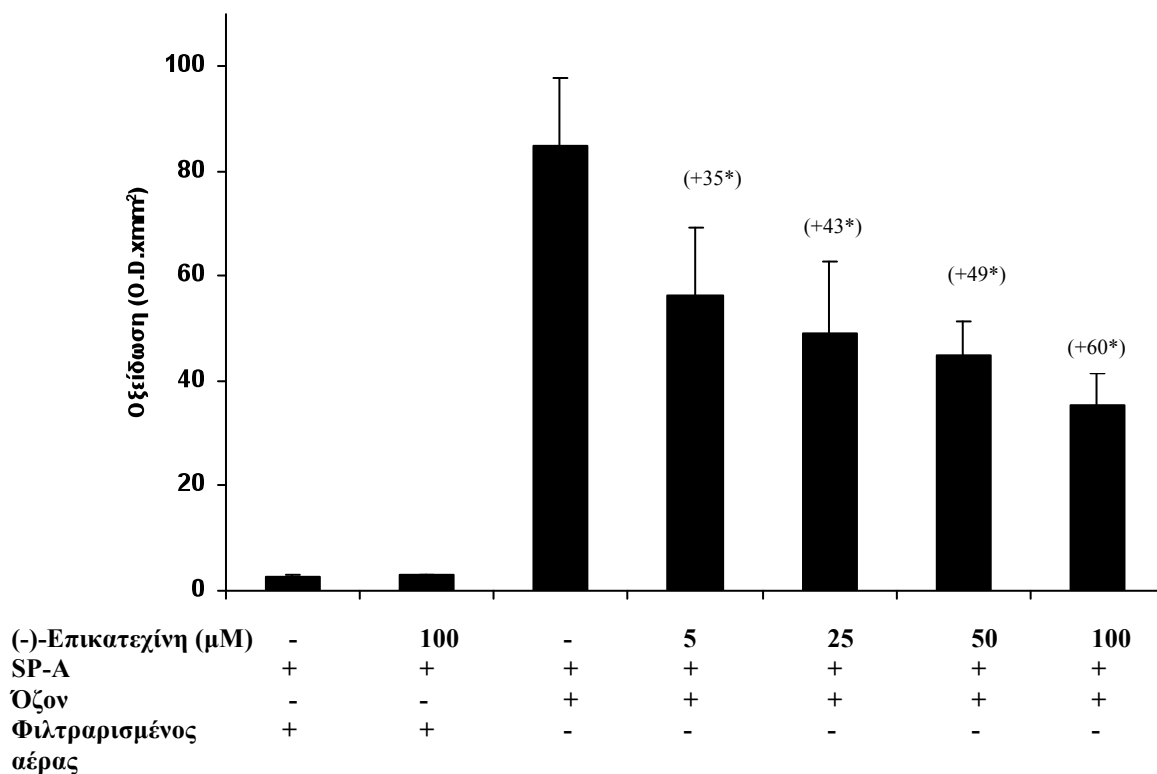
Σχήμα 4.5 SP-A δείγματα από 6 ασθενείς με πρωτεΐνωση (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5 και AP6) υποβλήθηκαν σε 4-15% SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και σε χρώση με νιτρικό άργυρο. Επιπλέον, η οξειδωσή τους προσδιορίστηκε με το Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit με σκοπό να επιλεγούν για τα πειράματα τα δείγματα με μικρή οξειδωση. Επιλέχθηκαν τα δείγματα AP1, AP2 και AP4. (A) Παρουσιάζεται το φιλμ με τις κηλίδες (dots) των δειγμάτων καθώς και οι τιμές της οξειδωσης όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα Quantity One. 100ng πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν για κάθε κηλίδα. (B) SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 1μg από κάθε δείγμα SP-A πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης διαβάθμισης 4-15% μετά από επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά στους 95⁰.



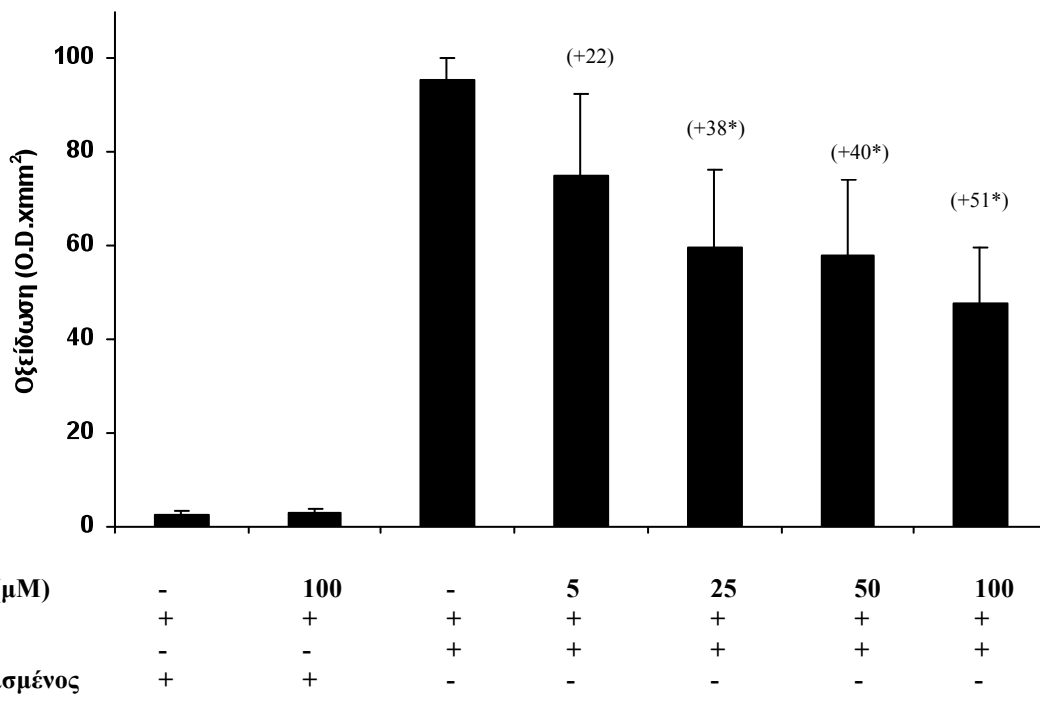
Σχήμα 4.6 Καμπύλη οξείδωσης της SP-A από το O₃. 25, 50, 100 και 200µg/ml της SP-A εκτέθηκαν στο O₃ (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα.



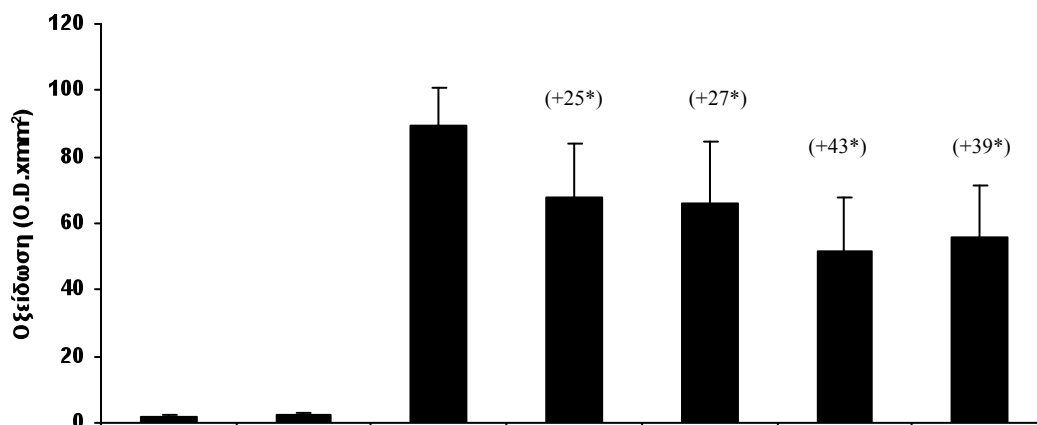
Σχήμα 4.7 Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξειδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής της οξειδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.



Σχήμα 4.8 Επίδραση της (-)-επικατεχίνης στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής της οξείδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.

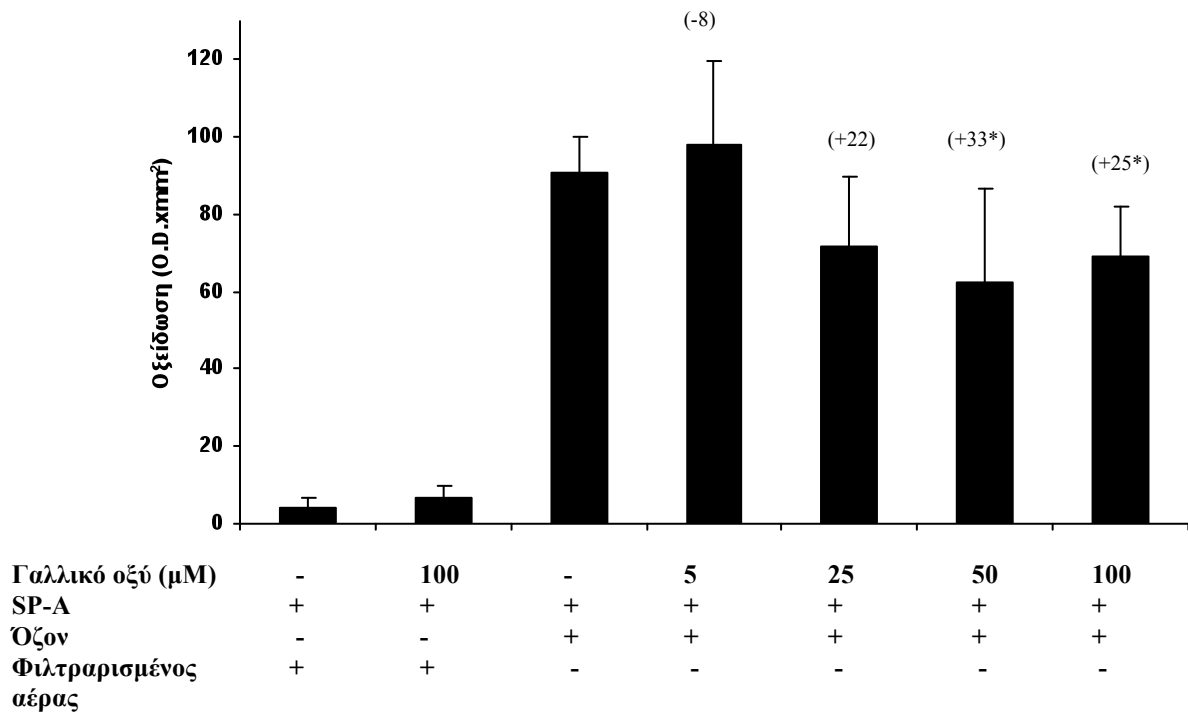


Σχήμα 4.9 Επίδραση της ρουτίνης στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής της οξείδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.

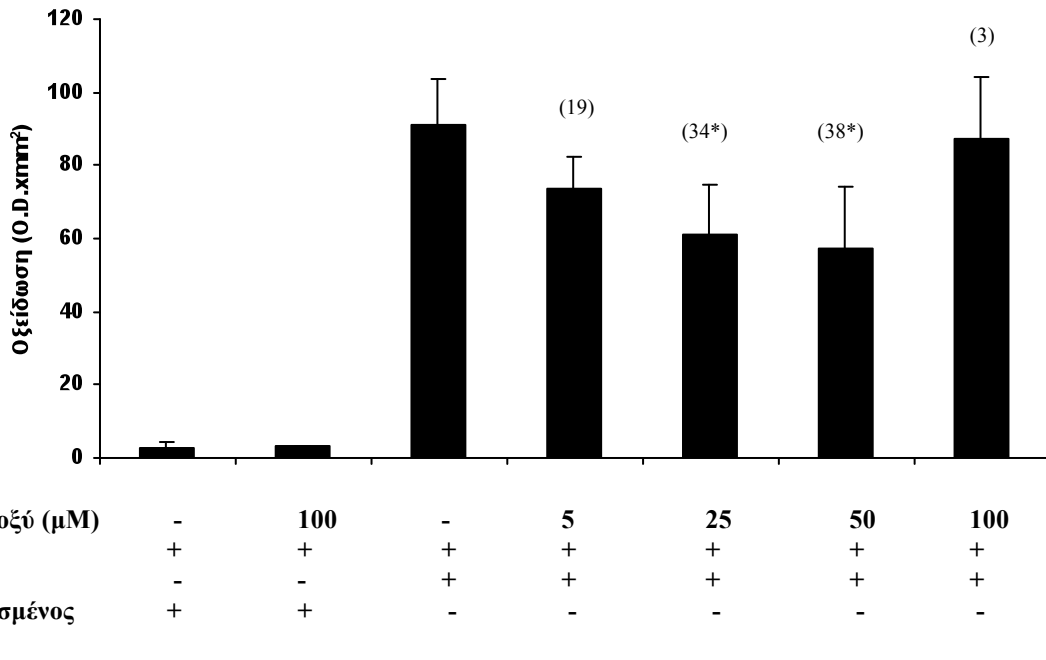


Πρωτοκατεχοϊκό οξύ (μM)	-	100	-	5	25	50	100
SP-A	+	+	+	+	+	+	+
Όζον	-	-	+	+	+	+	+
Φιλτραρισμένος αέρας	+	+	-	-	-	-	-

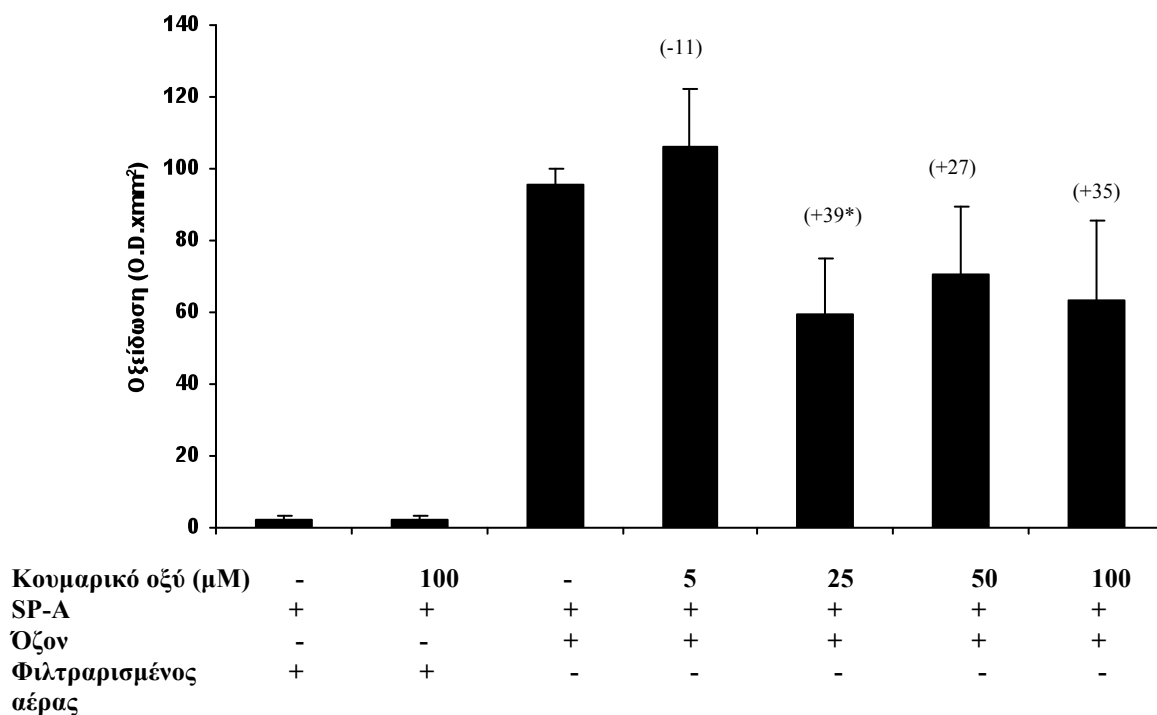
Σχήμα 4.10 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής της οξείδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. **p*<0.05 σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.



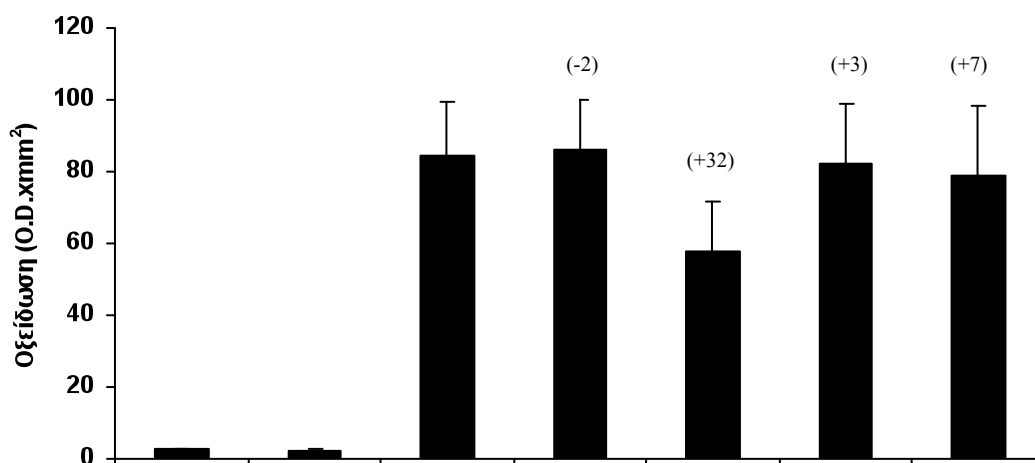
Σχήμα 4.11 Επίδραση του γαλλικού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής ή επαγωγής της οξείδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (οι θετικές τιμές σημαίνουν αναστολή ενώ οι αρνητικές τιμές επαγωγή). * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.



Σχήμα 4.12 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής της οξείδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.

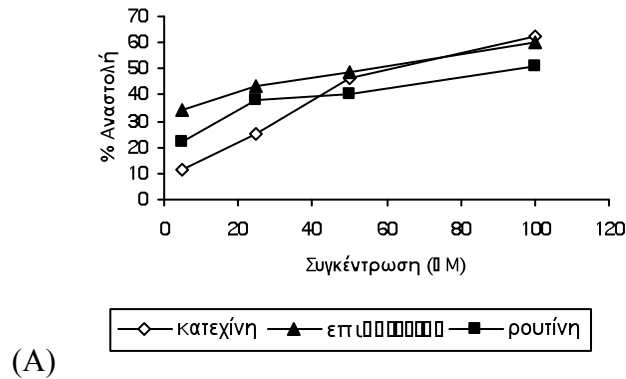


Σχήμα 4.13 Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξειδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής ή επαγωγής της οξειδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (οι θετικές τιμές σημαίνουν αναστολή ενώ οι αρνητικές τιμές επαγωγή). * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.

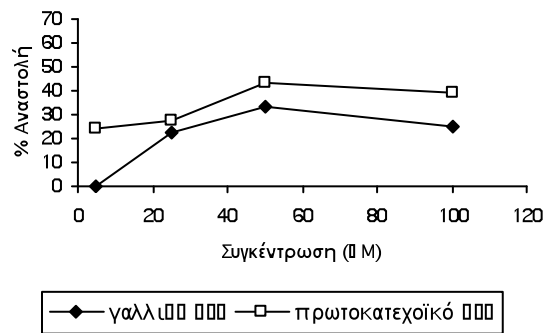


Φερουλικό οξύ (μM)	-	100	-	5	25	50	100
SP-A	+	+	+	+	+	+	+
Όζον	-	-	+	+	+	+	+
Φιλτραρισμένος αέρας	+	+	-	-	-	-	-

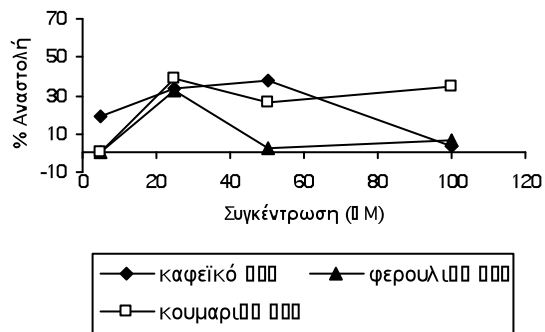
Σχήμα 4.14 Επίδραση του φερουλικού οξέος στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Η SP-A εκτέθηκε στο όζον (1ppm) για 4 ώρες. Η οξείδωση εκφράζεται ως το γινόμενο της οπτικής πυκνότητας (O.D.) επί το εμβαδόν (mm²) των κηλίδων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα. Θετικός μάρτυρας ήταν τα δείγματα που περιείχαν μόνο SP-A και εκτέθηκαν στο όζον. Μέσα στην παρένθεση φαίνεται το % ποσοστό αναστολής ή επαγωγής της οξείδωσης των δειγμάτων σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα (οι θετικές τιμές σημαίνουν αναστολή ενώ οι αρνητικές τιμές επαγωγή). * $p < 0.05$ σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.



(A)



(B)



(Γ)

Σχήμα 4.15 Απεικονίζεται η % αναστολή των φυτικών πολυφαινολών στην επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων σε κάθε ένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πνεύμονες είναι ένα από τα φυσικά όρια επαφής ανάμεσα στο εξωτερικό περιβάλλον και το σώμα. Για το λόγο αυτό, οι πνεύμονες είναι ευάλωτοι σε μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τα βακτήρια, οι ιοί, τα αλλεργιογόνα και οι μύκητες καθώς επίσης και στους ρυπαντές της ατμόσφαιρας. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία όλων αυτών των τοξικών παραγόντων. Για παράδειγμα, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί προκαλούν φλεγμονή των αεραγωγών (στη φλεγμονή παράγονται ΔΜΟ από τα φαγοκύτταρα), ενώ οι χημικές ουσίες που ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα μπορούν να οξειδώσουν τα βιολογικά μακρομόρια άμεσα μέσω της παραγωγής ΔΜΟ (Kelly και συν., 2003). Το όζον, ένα δραστικό μόριο και από τις κύριες ουσίες που μολύνουν την ατμόσφαιρα, μετατρέπεται σε ΔΜΟ ικανές να οξειδώσουν λιπίδια και πρωτεΐνες (Pryor 1994) επηρεάζοντας τη λειτουργία και τις ιδιότητές τους. Για παράδειγμα, η οξείδωση της πρωτεΐνης SP-A, που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία, στο μεταβολισμό, τη φυσική ανοσία και τη δομή του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα (Floros και Phelps 2002), από το όζον προκαλεί αλλαγή στις λειτουργικές και βιοχημικές της ιδιότητες (Oosting και συν., 1991).

Μία σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι τροφές πλούσιες σε φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν από ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Kerry και συν., 1997; Yang και συν., 2001). Οι πνεύμονες (μαζί με το γαστρεντερικό σύστημα, το ήπαρ, το δέρμα, τον προστάτη και το μαστό) θεωρούνται από τα πιο πιθανά όργανα στα οποία μπορεί να ασκούν χημειοπροστατευτική δράση οι πολυφαινόλες (Chung και συν., 2002). Έτσι για παράδειγμα επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη καροτενοειδών (μία κατηγορία φυτικών αντιοξειδωτικών) συνδέεται με βελτιωμένη λειτουργία των

πνευμόνων (Schuneman και συν., 2002), ενώ η χορήγηση ενός μίγματος από ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και καροτενοειδή σε άτομα που εκτέθηκαν σε όζον προστατεύει τη φυσιολογική λειτουργία των πνευμόνων (Samet και συν., 2001). Επίσης, μία άλλη μελέτη (Paola και συν., 2005), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα στα οποία προκλήθηκε οξεία φλεγμονή μετά από χορήγηση καραγενίνης, έδειξε ότι πολυφαινόλες από το τσάι μείωναν τις βλάβες καθώς και τη διάχυση ουδετερόφιλων κυττάρων στους πνεύμονες. Στη μελέτη αυτή ως πιθανός μηχανισμός προστασίας προτάθηκε η μείωση της παραγωγής των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 τα οποία παίζουν ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής και στην άμυνα του οργανισμού μέσω των T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, άλλη μελέτη (Misra και συν., 2003) έδειξε ότι η χορήγηση τσαγιού μείωσε την οξείδωση των πρωτεϊνών των μικροσωματίων του πνεύμονα σε ινδικά χοιρίδια που εκτέθηκαν σε καπνό από τσιγάρο. Αυτή η προστατευτική δράση αποδόθηκε στις κατεχίνες που υπάρχουν στο τσάι. Έτσι στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η πιθανή ανασταλτική δράση φυτικών πολυφαινόλων έναντι της επαγόμενης από το όζον οξείδωση της SP-A, ως ένας προστατευτικός μηχανισμός των φυτικών τροφικών αντιοξειδωτικών από ρυπαντές της ατμόσφαιρας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαφορετικές κατηγορίες πολυφαινόλων ανέστειλαν την οξείδωση της SP-A από το όζον αλλά δείχνοντας διαφορετικά πρότυπα αναστολής (Σχήμα 4.15), όπως αποδείχτηκε με τον προσδιορισμό του σχηματισμού των καρβονυλικών ομάδων που είναι από τις πιο αξιόπιστους δείκτες της πρωτεϊνικής οξείδωσης (Stadtman και Levine 2000). Τα φλαβονοειδή ((+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και ρουτίνη) ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την οξείδωση της SP-A. Επίσης, σε άλλη μελέτη (Pannala και συν., 1997) κατεχίνες ανέστειλαν την επαγόμενη από το νιτρώδες υπεροξείδιο οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής

πυκνότητας (LDL). Η (-)-επικατεχίνη ήταν η πιο δραστική από τις τρεις ουσίες, αναστέλλοντας κατά 35% στη συγκέντρωση των 5μM το σχηματισμό καρβονυλικών ομάδων από το όζον. Στα 5 και στα 25μM η (-)-επικατεχίνη ήταν πιο δραστική από την (+)-κατεχίνη, ενώ στα 50 και στα 100μM η ανασταλτική τους δράση ήταν σχεδόν παρόμοια (Σχήμα 4.15A). Η (-)-επικατεχίνη και η (+)-κατεχίνη είναι στερεοϊσομερή. Ο C3 του C δακτυλίου στην (-)-επικατεχίνη βρίσκεται στην R μορφή ενώ στην (+)-κατεχίνη βρίσκεται στην S μορφή (Σχήμα 1.12). Συνεπώς, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η R μορφή ήταν πιο δραστική από την S. Επιπλέον, η (-)-επικατεχίνη είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα όπως έδειξαν τα πειράματα με τη ρίζα DPPH της παρούσας μελέτης (Πίνακας 2.1). Η ρουτίνη ήταν λιγότερο δραστική από την (-)-επικατεχίνη σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, ενώ ήταν πιο δραστική από την (+)-κατεχίνη στα 5 και στα 25μM και λιγότερο δραστική στα 50 και τα 100μM (Σχήμα 4.15A). Η διαφορά ανάμεσα στη χημική δομή της ρουτίνης και των δύο κατεχινών είναι ότι η ρουτίνη έχει ένα 2,3 διπλό δεσμό, μια 4-κετο ομάδα και μια υδατανθρακική ομάδα (ρουτινόζη) στο C δακτύλιο (Σχήμα 1.12). Πιστεύεται ότι ο 2,3 διπλός δεσμός και η 4-κετο ομάδα ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, η αντικατάσταση όμως της 3-OH από μια υδατανθρακική ομάδα ελαττώνει την αντιοξειδωτική τους δράση γιατί διαταράσσει τον επίπεδο προσανατολισμό του B δακτυλίου με το υπόλοιπο του μορίου (Rice-Evans και συν., 1996). Η επίπεδη διάταξη του μορίου των πολυφαινολών αυξάνει τη σταθερότητα της φαινολικής ρίζας και κατά συνέπεια την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Heim και συν., 2002).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ) ανέστειλαν την οξείδωση της SP-A. Ωστόσο, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα αλλά ήταν λιγότερο δραστικά από τα φλαβονοειδή και η δράση τους έφτασε σε πλατό στα 50μM (Σχήμα

4.15B). Το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ήταν πιο δραστικό από το γαλλικό οξύ και εμφάνισε στατιστικά σημαντική αναστολή σε μικρή συγκέντρωση (5 μ M). Η διαφορά ανάμεσα στη χημική δομή του γαλλικού και του πρωτοκατεχοϊκού οξέος είναι ότι το πρώτο έχει τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις 3-, 4- και 5-, ενώ το δεύτερο έχει μόνο δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3- και 4- (Σχήμα 1.11). Όπως έδειξε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής τους δράσης με τη μέθοδο του DPPH (Πίνακας 2.1), το γαλλικό οξύ έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το πρωτοκατεχοϊκό οξύ γιατί μπορεί να διαθέσει περισσότερα άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Άρα υπάρχει μια αντίφαση ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των δύο υδροξυβενζοϊκών οξέων και στην ανασταλτική ικανότητά τους έναντι της οξείδωσης της SP-A. Μία εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι ότι οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την οξείδωση της SP-A όχι μόνο εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες αλλά και συνδεδεμένες με την SP-A την προστατεύουν από οξείδωση. Άρα το πρωτοκατεχοϊκό οξύ μπορεί να αλληλεπιδρά πιο αποτελεσματικά με τις πρωτεΐνες. Ήταν χαρακτηριστικό ότι στα πειράματα που έγιναν με την τοποϊσομεράση I στην παρούσα μελέτη (Κεφάλαιο 5), το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ανέστειλε τη δράση του ενζύμου ενώ το γαλλικό οξύ όχι.

Τα υδροξυκιναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και κουμαρικό οξύ) παρουσίασαν ένα διαφορετικό πρότυπο αναστολής σε σύγκριση με τα φλαβονοειδή και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Η μέγιστη ανασταλτική δράση τους εμφανίστηκε σε μεσαίες συγκεντρώσεις ενώ στις χαμηλότερες και τις υψηλότερες δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αναστολή (Σχήμα 4.15Γ). Μεταξύ των τριών υδροξυκιναμικών οξέων πιο δραστικό ήταν το καφεϊκό οξύ, αφού παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή στα 25 και 50 μ M, ενώ το *p*-κουμαρικό οξύ μόνο στα 25 μ M και το φερουλικό οξύ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή

(Σχήματα 4.12-4.14). Η διαφορά στη χημική τους δομή είναι ότι το καφεϊκό οξύ έχει δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3-, και 4-, ενώ το κουμαρικό οξύ μόνο μία στη θέση 4- και το φερουλικό οξύ έχει μια υδροξυλομάδα στη θέση 4- και μια μεθόξυ ομάδα στη θέση 3- (Σχήμα 1.11). Η *ορθο*-δυϊδροξυ δομή του καφεϊκού οξέος θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας για την αντιοξειδωτική δράση γενικότερα των πολυφαινολών, επειδή αυξάνει τη σταθερότητα της φαινολικής ρίζας διευκολύνοντας τις μετατοπίσεις ηλεκτρονίων μέσα στο μόριο της πολυφαινόλης (Rice-Evans και συν., 1996). Όσον αφορά το πρότυπο αναστολής των υδροξυκινηματικών οξέων, έχει αναφερθεί και σε άλλες περιπτώσεις αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως με την (-)-γαλλική-3-επιγαλλοκατεχίνη (Levites και συν., 2002α), με εκχύλισμα από τσάι (Levites και συν., 2002β), με τη βιταμίνη C (Halliwell 1996), την απομορφίνη και τη ντοπαμίνη (Gassen και συν., 1998). Οι παραπάνω ουσίες σε μικρότερες συγκεντρώσεις παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση ενώ σε μεγαλύτερες δεν είχαν καμία επίδραση ή έδειξαν ακόμη και προ-οξειδωτική δράση. Αν και ως τώρα δεν έχει δοθεί κάποια σαφής εξήγηση για τη δράση αυτή, θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι οι πολυφαινόλες σε μικρές συγκεντρώσεις δεν μπορούν να αναστείλουν την οξείδωση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτο-οξειδώνονται με αποτέλεσμα να καταργείται η αντιοξειδωτική τους δράση.

Ήταν αξιοσημείωτο ότι η σειρά δραστηριότητας των εξεταζόμενων πολυφαινολών όσον αφορά την προστασία της πρωτεΐνης SP-A από την επαγόμενη από το όζον οξείδωση είναι: (-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη = ρουτίνη = πρωτοκατεχοϊκό οξύ > γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ > κουμαρικό οξύ > φερουλικό οξύ. Ενώ η σειρά δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των πολυφαινολών όπως προέκυψε από τη μέθοδο του DPPH (Κεφάλαιο 2) είναι: γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ = (-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη > ρουτίνη > πρωτοκατεχοϊκό οξύ > φερουλικό οξύ >

κουμαρικό οξύ. Δηλαδή, υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στις δύο σειρές δραστηριότητας και αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η μέθοδος του DPPH δείχνει μόνο την ικανότητα των πολυφαινόλων να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, ενώ ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι πολυφαινόλες προστατεύουν την SP-A από την επαγόμενη από το όζον οξείδωση θα μπορούσε να είναι ή η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται ή/και η σύνδεση των πολυφαινόλων με την SP-A. Οι πολυφαινόλες είναι μόρια με πολλαπλές θέσεις σύνδεσης (κάθε φαινολικός δακτύλιος αποτελεί και μία πιθανή θέση σύνδεσης), και έτσι μπορούν να συνδέονται σε περισσότερα από ένα σημεία της πρωτεΐνης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί (Asquith και Butler 1986; Hagerman και Butler 1981) ότι οι πολυφαινόλες συνδέονται κατά προτίμηση σε περιοχές των πρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε προλίνη και έχουν μία ελικοειδή διαμόρφωση είτε τύπου κολλαγόνου είτε τυχαίου σπειράματος. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η SP-A έχει μία περιοχή τύπου κολλαγόνου (Σχήμα 4.1) που περιέχει μία σειρά από 23 τριάδες Gly-Y-X (όπου X είναι μία προλίνη και Y μία υδροξυπρολίνη). Η περιοχή αυτή μαζί με την καρβοξυτελική περιοχή και την υδροφοβή περιοχή του 'αυχένα' παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία της SP-A (Floros και Phelps 2002). Η σύνδεση πολυφαινόλων-πρωτεϊνών γίνεται κυρίως μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών (υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και υδρογονικών δεσμών) (Haslam 1999; Jobstl και συν., 2004; Richard και συν., 2005). Επίσης όμως έχει αναφερθεί (Chen και Hagerman 2004) ότι σε οξειδωτικές συνθήκες οι πολυφαινόλες σχηματίζουν και ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες διατηρούν την αντιοξειδωτική τους δράση και μετά το σχηματισμό του συμπλόκου πολυφαινόλης-πρωτεΐνης (Riedl και Hagerman 2001).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστείλουν την επαγόμενη από το όζον οξείδωση

της SP-A, μίας πρωτεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και τη φυσική ανοσία του πνεύμονα. Έτσι, αν και υπάρχουν εύλογοι περιορισμοί στην εξαγωγή συμπερασμάτων από *in vitro* πειράματα σε ολόκληρους οργανισμούς, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας σε συνδυασμό με αποτελέσματα από άλλες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε φυτικές τροφές θα μπορούσαν να προστατεύσουν από τις δυσμενείς επιδράσεις ρυπαντών της ατμόσφαιρας στους πνεύμονες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ
(*VITIS VINIFERA*) ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ
ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗ I

*Stagos D., Kazantzoglou G., Magiatis P., Mitaku S.,
Anagnostopoulos K., 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 15:1013-1022; 2005*

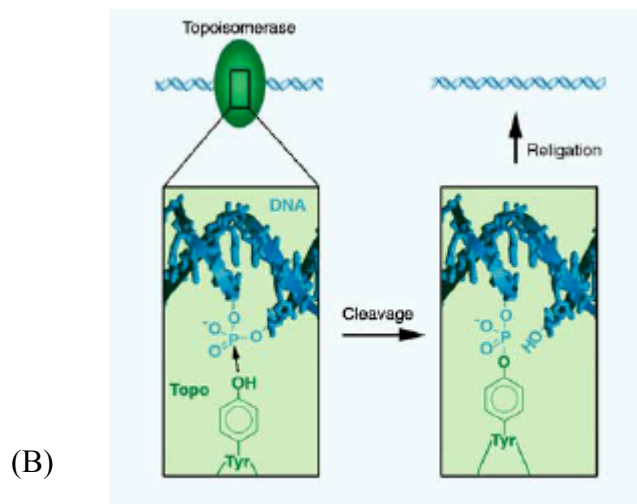
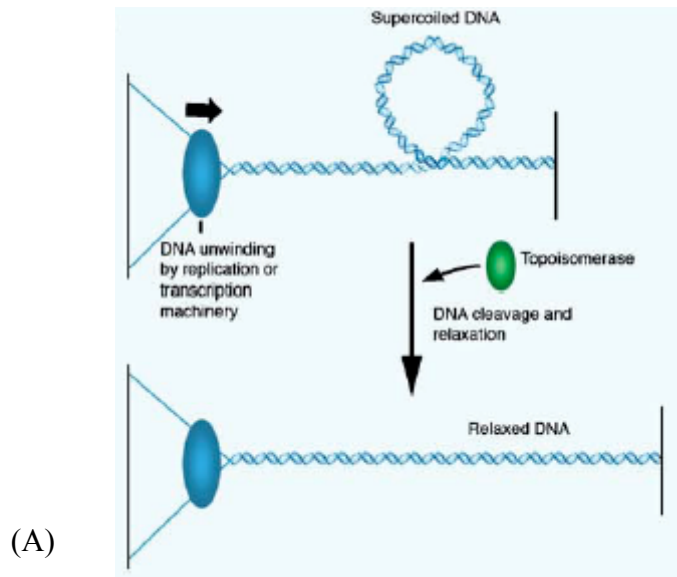
**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ
(*VITIS VINIFERA*) ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ
ENZΥΜΟΥ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗ I**

5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η πρωτοταγής δομή, δηλαδή η ακολουθία των βάσεων του DNA καθορίζει τη γενετική σύσταση ενός οργανισμού. Ωστόσο, η τοπολογική (γεωμετρική) διαμόρφωση, της δίκλωνης έλικας καθορίζει στην ουσία κάθε λειτουργία του γενώματος (Wang 1996). Στα κύτταρα η τοπολογία του DNA καθορίζεται από ένζυμα που ονομάζονται τοποϊσομεράσες (Τριανταφυλλίδης 1992; Liu 1994). Τα ένζυμα αυτά χρειάζονται για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό του DNA καθώς επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή των χρωμοσωμάτων, τη συσπείρωση και αποσυσπείρωσή τους και το διαχωρισμό τους μετά την κυτταρική διαίρεση (Wang 1996; Li και Liu 2001). Όλα τα κύτταρα περιέχουν δύο κατηγορίες τοποϊσομερασών, την I και τη II. Γενικά, ο μηχανισμός δράσης των τοποϊσομερασών περιλαμβάνει: i) τη σύνδεση του ενζύμου με το DNA, ii) τη δημιουργία εγκοπών (nicks) στους κλώνους του DNA και πέρασμα των κλώνων διαμέσου των εγκοπών με αποτέλεσμα την αλλαγή του βαθμού υπερελίκωσης του DNA και iii) την επανασύνδεση των κομμένων κλώνων και την αποδέσμευση του ενζύμου (Σχήμα 5.1A) (Wang 1996). Ωστόσο, οι δύο κατηγορίες τοποϊσομερασών διαφέρουν στο μηχανισμό δράσης και τις φυσικές τους ιδιότητες. Η κατηγορία I περιλαμβάνει τις βακτηριακές τοποϊσομεράσες I και III καθώς επίσης τις ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες I και III. Οι τοποϊσομεράσες της κατηγορίας I είναι μονομερή, λειτουργούν χωρίς μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και αλλάζουν τη διαμόρφωση της δίκλωνης έλικας του DNA επιτρέποντας το πέρασμα του ενός κλώνου του DNA

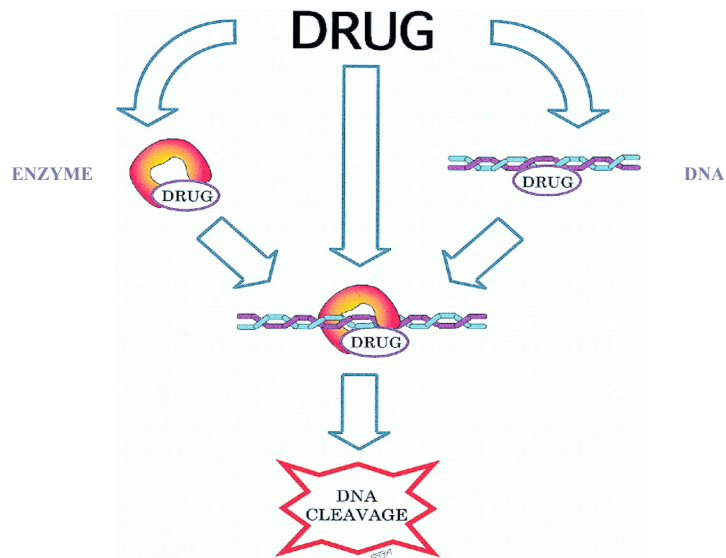
διαμέσου μιας παροδικής εγκοπής που δημιουργούν στο συμπληρωματικό κλώνο (Σχήμα 5.1B) με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το βαθμό υπερελίκωσης του μορίου (Leppard και Champroux 2005). Οι τοποϊσομεράσες της κατηγορίας II περιλαμβάνουν τη DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV που βρίσκονται στα βακτήρια καθώς και την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II. Οι τοποϊσομεράσες της κατηγορίας II είναι πολυμερείς πρωτεΐνες, απαιτούν ATP για την καταλυτική τους δράση και δρουν επιτρέποντας το πέρασμα του ενός κλώνου του DNA διαμέσου παροδικών εγκοπών που δημιουργούν και στους δύο κλώνους του DNA με αποτέλεσμα να ρυθμίζουν την υπερ- ή υποελίκωση της δίκλωνης έλικας (Liu 1994).

Επειδή οι ευκαρυωτικές τοποϊσομεράσες ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες αποτελούν στόχο αντικαρκινικών (Li και Liu 2001) και αντιμικροβιακών φαρμάκων (Chakraborty και Majumder 1988). Γενικά, υπάρχουν δύο κατηγορίες αναστολέων των τοποϊσομερασών I και II. Οι αναστολείς που ανήκουν στην κατηγορία I, οι οποίοι ονομάζονται και 'δηλητήρια' (poisons), σταθεροποιούν το σύμπλεγμα (cleavable complex) που σχηματίζεται ανάμεσα στις τοποϊσομεράσες και το DNA με αποτέλεσμα να μη μπορεί το ένζυμο να αποδεσμευτεί και να συνεχίζει να προκαλεί κοψίματα στους κλώνους του DNA (Σχήμα 5.2) που καταλήγουν τελικά σε μεταλλαξιγένεση (Froelich-Ammon και Osheroff 1995). Οι αναστολείς της κατηγορίας II ή καταλυτικοί αναστολείς, απλώς εμποδίζουν τη σύνδεση των τοποϊσομερασών με το DNA με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της καταλυτικής τους δράσης (Bailly 2000). Πιστεύεται ότι η αναστολή των τοποϊσομερασών από φυτικά εκχυλίσματα είναι ίσως ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Ye και συν., 1999). Επιπλέον, αρκετές πολυφαινόλες έχουν αναφερθεί ως αναστολείς των τοποϊσομερασών (Chowdhury και συν., 2002; Constantinou και συν., 1995; Boege και συν., 1996).



Σχήμα 5.1 (A) Καθώς η δίκλωνη έλικά ξετυλίγεται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής ή της μεταγραφής του DNA δημιουργούνται υπερέλικες λόγω των οποίων αναπτύσσονται ισχυρές τάσεις στο μόριο. Οι τοποϊσομεράσες με τη δράση τους απομακρύνουν τις υπερέλικες προστατεύοντας από θραύση τους κλώνους του DNA. (B) Μηχανισμός της καταλυτικής δράσης της τοποϊσομεράσης I. Η τοποϊσομεράση I συνδέεται στο DNA και η τυροσίνη του ενεργού κέντρου λόγω της πυρηνόφιλης δράσης της δημιουργεί μία εγκοπή στον ένα από τους δύο κλώνους μέσα από την οποία περνάει ο συμπληρωματικός του κλώνος. Στη συνέχεια επανασυνδέονται τα κομμένα άκρα του κλώνου και το ένζυμο απομακρύνεται (Leppard και Champroux 2005).

Κατά συνέπεια σε αυτό το πειραματικό μέρος εξετάστηκε η επίδραση εκχυλισμάτων, πολυφαινολικών κλασμάτων και πολυφαινολών από τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου Ασύρτικο και Μανδηλαριά Σαντορίνης στην ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I από σπέρμα σιταριού και στην ανθρώπινη τοποϊσομεράση I. Πιθανή αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών από τις εξεταζόμενες ουσίες ίσως αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς της χημειοπροστατευτικής τους δράσης.



Σχήμα 5.2 Η ουσία (drug), που δρα ως αναστολέας ‘δηλητήριο’ (poison) των τοποϊσομερασών, μπορεί να συνδεθεί με το ένζυμο (αριστερά) ή με το DNA (δεξιά) ή με το σύμπλεγμα ενζύμου-DNA (κέντρο) με αποτέλεσμα οι τοποϊσομεράσες να μην μπορούν να αποδεσμευτούν από το DNA και να προκαλούν θραύσεις στη δίκλωνη αλυσίδα. (Από Froelich-Ammon και Osheroff 1995).

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 ΥΛΙΚΑ

5.2.1.i Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).

5.2.1.ii Ένζυμα

Η τοποϊσομεράση I από σπέρμα σιταριού ήταν από την εταιρεία Promega (Η.Π.Α.). Η ανθρώπινη τοποϊσομεράση I ήταν από την εταιρεία Topogen (Η.Π.Α.).

5.2.1.iii Πλασμίδιο

Το πλασμίδιο pBR322 ήταν από την εταιρεία New England Biolabs (Μ.Β.).

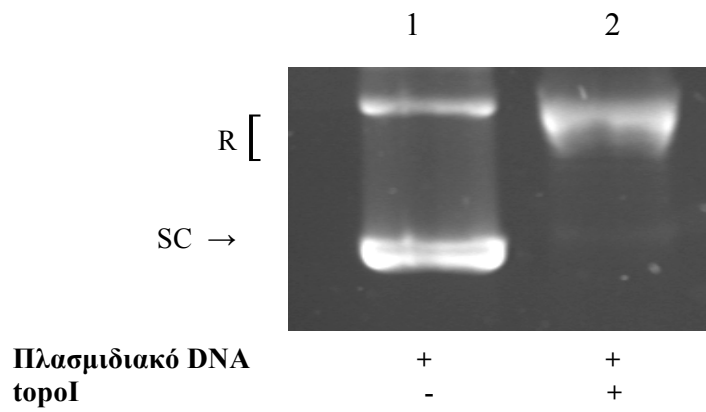
5.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.2.i Χαλάρωση πλασμιδιακού DNA από τη δράση τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού (DNA relaxation assay)

Για την ανίχνευση ουσιών που είναι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I χρησιμοποιείται η μέθοδος χαλάρωσης υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA (DNA relaxation assay). Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι όταν το υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA επωαστεί με τοποϊσομεράση I τότε λόγω της δράσης του ενζύμου μειώνεται ο αριθμός των ελίκων του DNA και αυτό μετατρέπεται σε μια πιο χαλαρή μορφή. Το υπερελικωμένο και το χαλαρωμένο DNA έχουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε μία πηκτή αгарόζης, γιατί το υπερελικωμένο DNA είναι πιο συμπαγές και διαπερνά ευκολότερα τους πόρους της πηκτής. Έτσι σε μια πηκτή αгарόζης το υπερελικωμένο DNA κινείται πιο γρήγορα από το χαλαρωμένο και είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δύο μορφών του DNA (Σχήμα 5.3). Μία ουσία που είναι

αναστολέας της καταλυτικής δράσης του ενζύμου προκαλεί επανεμφάνιση του υπερελικωμένου DNA.

Για τη μελέτη της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού χρησιμοποιήθηκε με κάποιες παραλλαγές η μέθοδος του Dynan και των συνεργατών του (1981). 0,2μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA pBR322 επώαστηκαν με 1μονάδα του ενζύμου τοποϊσομεράση I (ως μονάδα του ενζύμου ορίστηκε εκείνη η ποσότητα που απαιτείται για να μετατρέψει 0,5μg υπερελικωμένου DNA σε χαλαρή μορφή στις συνθήκες της αντίδρασης) από σπέρμα σιταριού στους 37⁰C για 30 λεπτά. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε επίσης ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH 7,5, 20% γλυκερόλη, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA και 1mM DTT. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl και η αντίδραση έγινε σε σωλήνες των 0,5ml. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 5μl διαλύματος φόρτωσης (30% γλυκερόλη και 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) σε πηκτή αγαρόζης 0,8% και σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE pH 8,0 (40mM Tris-οξικό οξύ, 2mM EDTA) στα 5V/cm για 90 λεπτά. Ακολούθησε χρώση των ζωνών του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά και αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό για 30 λεπτά. Οι πηκτές αφού τοποθετήθηκαν σε συσκευή εκπομπής UV φωτογραφήθηκαν με κάμερα Polaroid DS-34 ή με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Η.Π.Α.) έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα περιελάμβανε έναν αρνητικό μάρτυρα (pBR322 DNA χωρίς το ένζυμο ή τις εξεταζόμενες ουσίες), ένα θετικό μάρτυρα (pBR322 DNA με τοποϊσομεράση I) καθώς και δείγματα που περιείχαν το pBR322 την τοποϊσομεράση I



Σχήμα 5.3 Όταν το υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA επωαστεί με τοποϊσομεράση I (σειρά 2), μετατρέπεται λόγω της δράσης του ενζύμου σε χαλαρωμένο DNA. Οι δύο μορφές μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. SC: υπερελικωμένο DNA. R: χαλαρωμένο DNA. topoI: τοποϊσομεράση I.

και τις εξεταζόμενες ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Επίσης, επειδή ορισμένες από τις εξεταζόμενες ουσίες ήταν διαλυμένες σε κάποιο διαλύτη (μεθανόλη, αιθανόλη ή DMSO), εξετάστηκε αν οι διαλύτες επηρεάζουν τη δράση της τοποϊσομεράσης I. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιείχαν το pBR322, την τοποϊσομεράση I και το διαλύτη. Για την εξέταση κάθε ουσίας έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα (n = 3). Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στη δράση της τοποϊσομεράσης I προσδιορίστηκε από την εξίσωση (1):

$$\% \text{ Αναστολή} = (S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0) \times 100 \quad (1)$$

Όπου S_{control} είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα αρνητικός μάρτυρας. S_0 είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στο δείγμα θετικός μάρτυρας και S είναι το % ποσοστό του υπερελικωμένου DNA στα δείγματα που περιείχαν τις εξεταζόμενες ουσίες και την τοποϊσομεράση I.

5.2.2.ii Μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA από τη δράση ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (DNA relaxation assay)

0,2μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA pBR322 επώαστηκαν με 1 μονάδα του ενζύμου (ως μονάδα του ενζύμου ορίστηκε εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να μετατρέψει 0,5μg υπερελικωμένου DNA σε χαλαρή μορφή στις συνθήκες της αντίδρασης) ανθρώπινη τοποϊσομεράση I στους 37⁰C για 30 λεπτά. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε επίσης ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl pH 7,9, 5% γλυκερόλη, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Spermidine και 0,1% BSA. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20μl και η αντίδραση έγινε σε σωλήνες των 0,5ml. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 5μl διαλύματος φόρτωσης (30% γλυκερόλη και 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% και σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE pH 8,0 (40mM Tris-οξικό οξύ, 2mM EDTA) στα 5V/cm

για 90 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την τοποϊσομεράση από το σπέρμα σιταριού. Επίσης κατά τον ίδιο τρόπο έγινε ο σχεδιασμός και η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

5.2.2.iii Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές ($n = 3$) του % ποσοστού των μορφών του πλασμιδιακού DNA (δηλαδή υπερελικωμένης, και χαλαρής) για κάθε συγκέντρωση εξεταζόμενης ουσίας καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ του % ποσοστού της υπερελικωμένης μορφής του DNA και της συγκέντρωσης των ουσιών με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1 Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού

Τα εκχυλίσματα, μεθανολικά και υδατικά, και από τις δύο ποικιλίες ανέστειλαν την καταλυτική δράση της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης από σπέρμα σιταριού. Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) καθώς και το μεθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Ασύρτικο (άσπρα σταφύλια) ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα ($r = 0,94, 0,88$ και $0,82$ αντίστοιχα) τη δράση της τοποϊσομεράσης I (Σχήματα 5.4-5.6 και Πίνακες 5.1-5.3 αντίστοιχα). Επίσης, ήταν χαρακτηριστικό ότι και τα τρία αυτά εκχυλίσματα παρουσίασαν μεγάλη αναστολή ήδη από τη συγκέντρωση των $50\mu\text{g/ml}$ ($66, 79$ και 78% αντίστοιχα, $p < 0,01$) ενώ στη συγκέντρωση των $200\mu\text{g/ml}$ η αναστολή ήταν σχεδόν πλήρης. Σε

αντίθεση, το υδατικό εκχύλισμα από τα άσπρα σταφύλια στα 50 και στα 100mg/ml δεν έδειξε αναστολή, ενώ στα 200μg/ml ανέστειλε κατά 96% τη δράση της τοποϊσομεράσης I (Σχήμα 5.7 και Πίνακας 5.4). Γενικά, η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων σε αυτή τη μέθοδο ήταν: Υδατικό Μανδηλαριάς = Μεθανολικό Ασύρτικου > Μεθανολικό Μανδηλαριάς > Υδατικό Ασύρτικου.

5.3.2 Επίδραση των πολυφαινολικών κλασμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού

Το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα ανέστειλε τη δράση της τοποϊσομεράσης I, όπως και το ίδιο το εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, στα 20μg/ml ανέστειλε κατά 84% ($p<0,05$) τη δράση της τοποϊσομεράσης I ενώ στα 10μg/ml δεν παρουσίασε αναστολή (Σχήμα 5.8 και Πίνακας 5.5). Αντίθετα όμως, το μεθανολικό κλάσμα από το υδατικό εκχύλισμα δεν παρουσίασε αναστολή στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, δηλαδή στα 10, 20 και 50μg/ml (Πίνακας 5.6).

Το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα ανέστειλε τη μετατροπή της υπερελικωμένης μορφής του DNA σε χαλαρή μορφή λόγω της δράσης της τοποϊσομεράσης I κατά 70% ($p<0,05$) στα 50μg/ml (Σχήμα 5.9 και Πίνακας 5.7) όπως και το ίδιο το εκχύλισμα.

5.3.3 Επίδραση των πολυφαινολών στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού

Από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες η κερκετίνη ανέστειλε τη δράση του ενζύμου κατά 43, 94 και 97% σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 50μM αντίστοιχα (Σχήμα 5.10 και Πίνακας 5.8). Το καφεϊκό οξύ ανέστειλε κατά 86 και 96% τη δράση της τοποϊσομεράσης I σε συγκεντρώσεις 20 και 50μM αντίστοιχα (Σχήμα 5.11 και Πίνακας 5.9). Επίσης, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ παρουσίασε αναστολή κατά 82 και 94% σε συγκεντρώσεις 20 και 50μM αντίστοιχα (Σχήμα 5.12 και Πίνακας 5.10). Σε

αντίθεση, το φερουλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ και η ρουτίνη δεν ανέστειλαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, δηλαδή στα 10, 20 και 50μM, τη δράση της τοποϊσομεράσης I (Πίνακας 5.11). Η *trans*-ρεσβερατρόλη ήταν διαλυμένη σε DMSO, η μέγιστη συγκέντρωση της οποίας στην τελική αντίδραση ήταν 8%. Σε αυτή τη συγκέντρωση το DMSO παρεμπόδιζε τη δράση της τοποϊσομεράσης I και για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατή η εξέταση της *trans*-ρεσβερατρόλης.

5.3.4 Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I

Τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την καταλυτική δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I και παρουσίασαν περίπου την ίδια σειρά δραστηριότητας όπως και στα πειράματα με την τοποϊσομεράση I από σπέρμα σιταριού: Υδατικό Μανδηλαριάς > Μεθανολικό Ασύρτικου > Μεθανολικό Μανδηλαριάς > Υδατικό Ασύρτικου. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα ανέστειλαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I σε σύγκριση με την τοποϊσομεράση από σπέρμα σιταριού. Το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα από τα κόκκινα σταφύλια καθώς και το μεθανολικό εκχύλισμα από τα άσπρα σταφύλια ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα τη δράση του ενζύμου ($r = 0,93, 0,95$ και $0,95$ αντίστοιχα, $p < 0,01$). Η αναστολή των παραπάνω εκχυλισμάτων ήταν μεγάλη στα 200μg/ml (76, 65 και 84% αντίστοιχα, $p < 0,05$) και σχεδόν πλήρης στα 400μg/ml (Σχήματα 5.13-5.15 και Πίνακες 5.12-5.14 αντίστοιχα). Αντίθετα, το υδατικό εκχύλισμα από τα άσπρα σταφύλια δεν παρουσίασε σημαντική αναστολή στα 200μg/ml ενώ στα 800μg/ml ανέστειλε κατά 93% ($p < 0,05$) τη δράση του ενζύμου (Σχήμα 5.16 και Πίνακας 5.15).

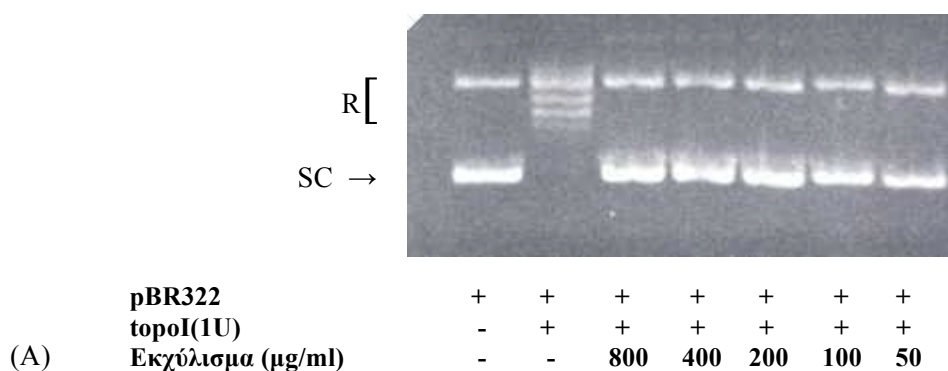
5.3.5 Επίδραση των πολυφαινολικών κλάσμάτων από την ποικιλία Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I

Από τα πολυφαινολικά κλάσματα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα ανέστειλε τη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I δόσοεξαρτώμενα ($r = 0,96$, $p < 0,01$). Σε συγκεντρώσεις 20, 50, 200 και 400 $\mu\text{g/ml}$ η αναστολή ήταν 51, 62, 84 και 96% αντίστοιχα (Σχήμα 5.17 και Πίνακας 5.16). Τα άλλα δύο όμως πολυφαινολικά κλάσματα δεν ανέστειλαν την καταλυτική δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (Πίνακας 5.17).

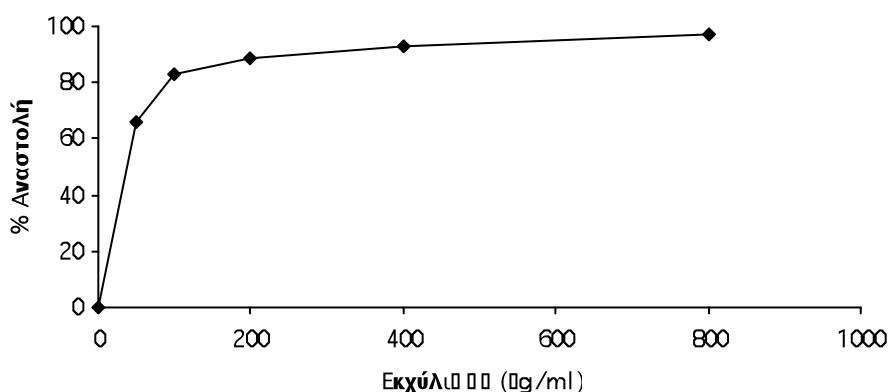
Πίνακας 5.1 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	70±3*	30±3*
DNA+topoI ^b	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	46±4*	54±4*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 100μg/ml	58±3*	42±3*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	62±3*	38±3*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 400μg/ml	65±5*	35±5*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 800μg/ml	68±2*	32±2*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^bΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).



(A)



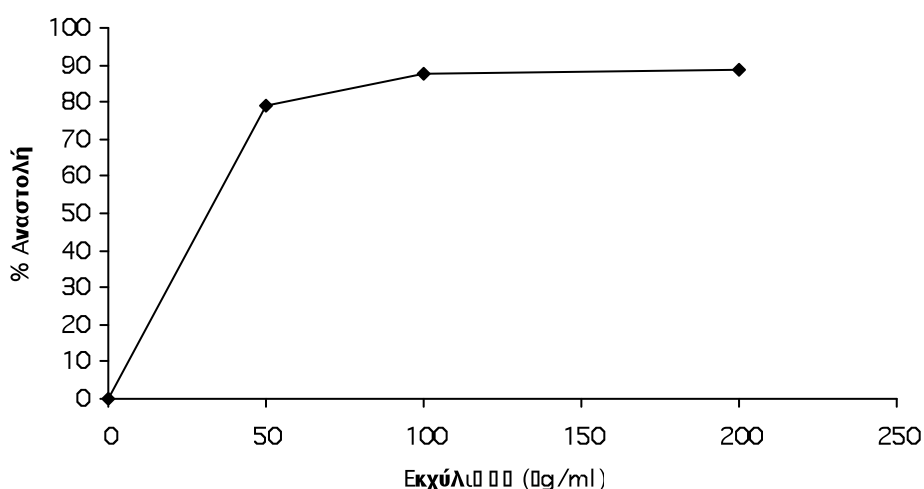
(B)

Σχήμα 5.4 (A) Επώαση τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού με pBR322 DNA και μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 0,8% πηκτή αγαρόζης. (B) Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στη δράση του ενζύμου. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.1. SC: υπερελικωμένη μορφή του DNA. R: χαλαρές μορφές του DNA.

Πίνακας 5.2 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	72±7*	28±7*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	57±4*	43±4*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 100μg/ml	63±3*	37±3*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	64±2*	36±2*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

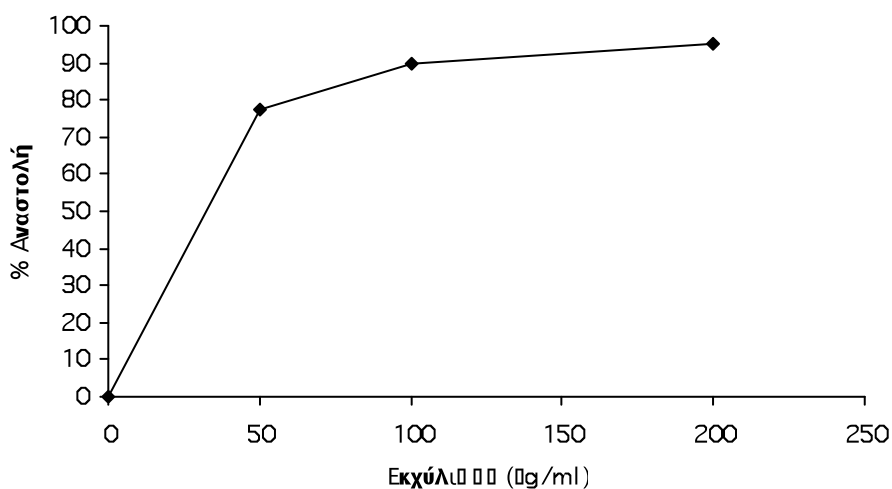


Σχήμα 5.5 Απεικονίζεται η % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.3 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	85±8*	15±8*
DNA+topoI ^β	45±6	55±6
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	76±6*	24±6*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 100μg/ml	81±4*	19±4*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	83±3*	17±3*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση της οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

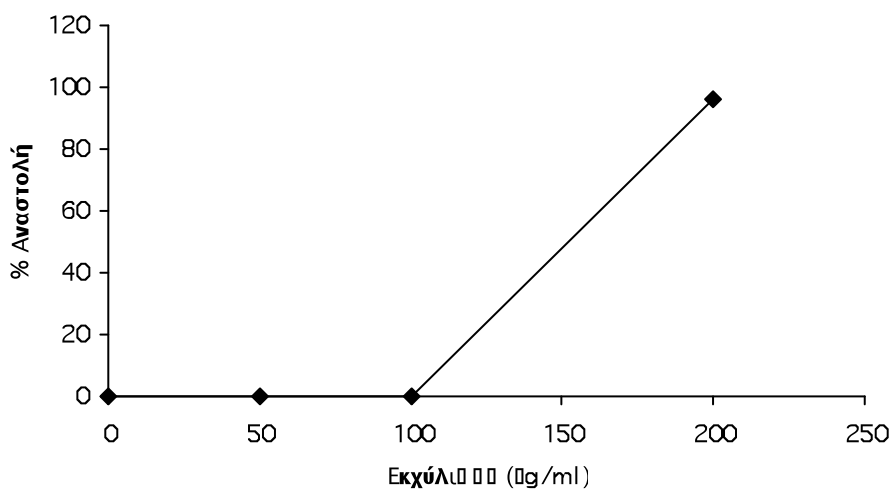


Σχήμα 5.6 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του 5.3.

Πίνακας 5.4 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	84±4*	16±4*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 100μg/ml	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	81±2*	19±2*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

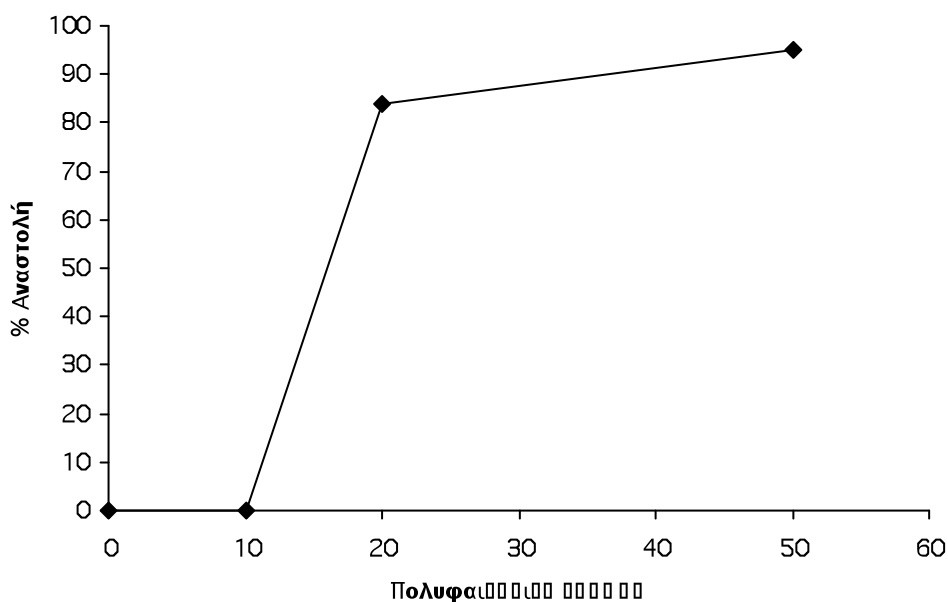


Σχήμα 5.7 Απεικονίζεται η % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.5 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	80±5*	20±5*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 10μg/ml	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 20μg/ml	67±3*	33±3*
DNA+topoI+Κλάσμα 50μg/ml	76±3*	24±3*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 5.8 Απεικονίζεται η % αναστολή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.6 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

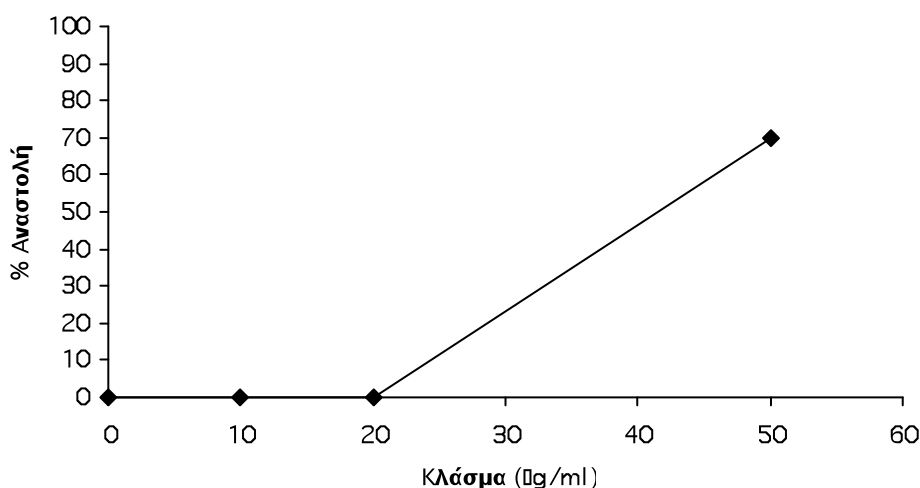
	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	84±8*	16±8*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 10μg/ml	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 20μg/ml	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 50μg/ml	-	100

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 5.7 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	77±5*	23±5*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 10μg/ml	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 20μg/ml	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 50μg/ml	54±6*	46±6*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

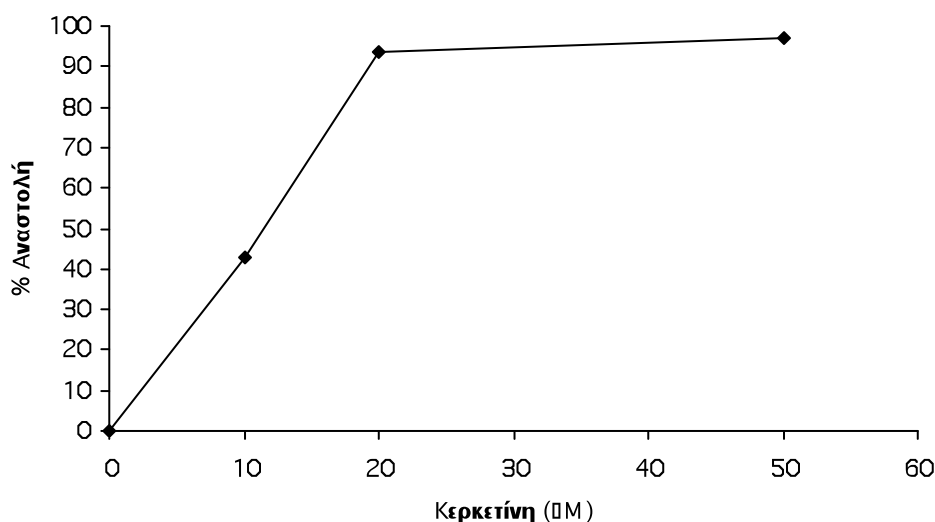


Σχήμα 5.9 Απεικονίζεται η % αναστολή του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.8 Επίδραση της κερκετίνης στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	72±5*	28±5*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Καφεϊκό οξύ 10μM	-	100
DNA+topoI+Καφεϊκό οξύ 20μM	62±2*	38±2*
DNA+topoI+Καφεϊκό οξύ 50μM	69±4*	31±4*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

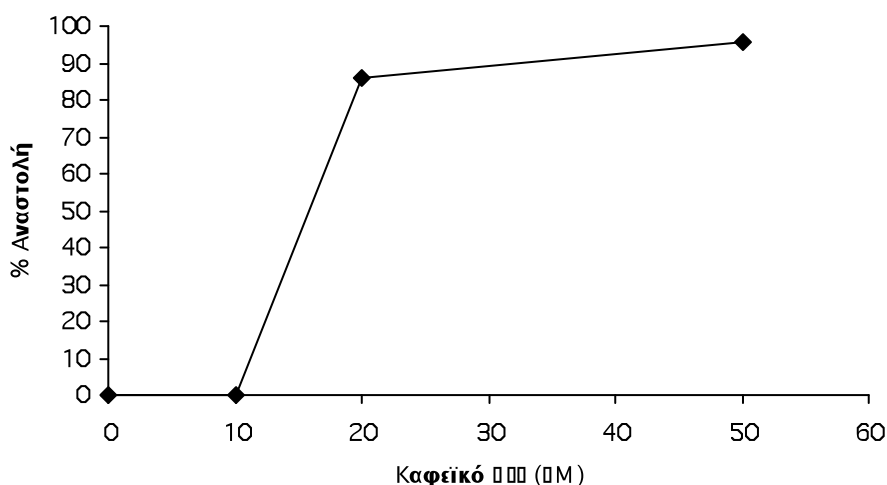


Σχήμα 5.10 Απεικονίζεται η % αναστολή της κερκετίνης στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.8.

Πίνακας 5.9 Επίδραση του καφεϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	72±5*	28±5*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Καφεϊκό οξύ 10μM	-	100
DNA+topoI+Καφεϊκό οξύ 20μM	62±2*	38±2*
DNA+topoI+Καφεϊκό οξύ 50μM	69±4*	31±4*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

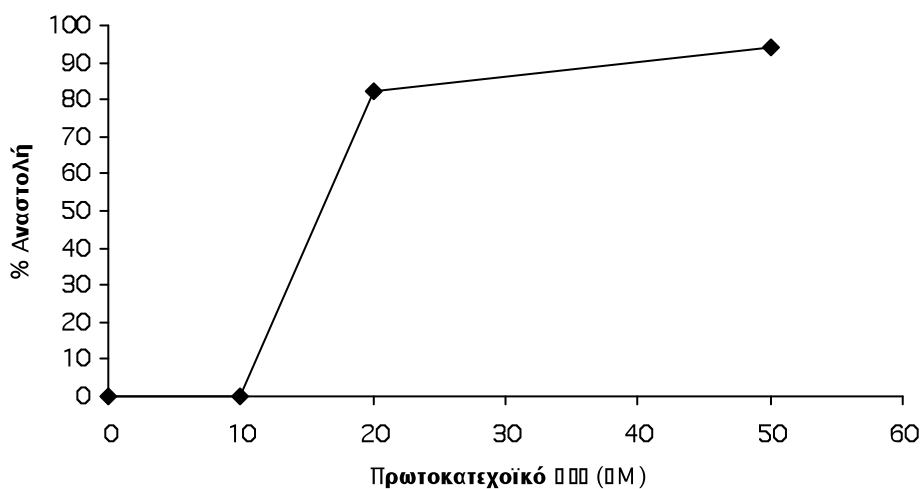


Σχήμα 5.11 Απεικονίζεται η % αναστολή του καφεϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.9.

Πίνακας 5.10 Επίδραση του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	84±6*	16±6*
DNA+topoI ^b	-	100
DNA+topoI+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 10μM	-	100
DNA+topoI+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 20μM	69±3*	31±3*
DNA+topoI+Πρωτοκατεχοϊκό οξύ 50μM	79±5*	21±5*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^bΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 5.12 Απεικονίζεται η % αναστολή του πρωτοκατεχοϊκού οξέος στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.10.

Πίνακας 5.11 Επίδραση του φερουλικού οξέος, του κουμαρικού οξέος, του γαλλικού οξέος και της ρουτίνης στη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού.

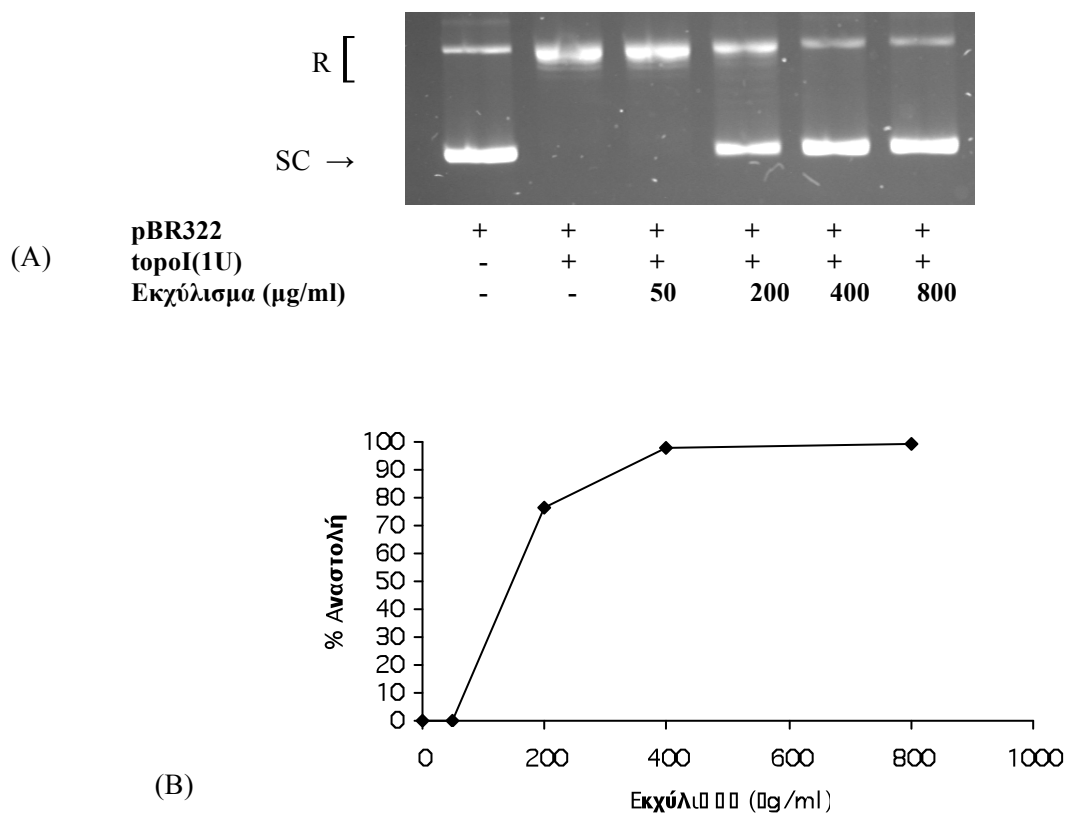
	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	83±7*	16±6*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Φερουλικό οξύ 10μM	-	100
DNA+topoI+Φερουλικό οξύ 20μM	-	100
DNA+topoI+Φερουλικό οξύ 50μM	-	100
DNA+topoI+Κουμαρικό οξύ 10μM	-	100
DNA+topoI+Κουμαρικό οξύ 20μM	-	100
DNA+topoI+Κουμαρικό οξύ 50μM	-	100
DNA+topoI+Γαλλικό οξύ 10μM	-	100
DNA+topoI+Γαλλικό οξύ 20μM	-	100
DNA+topoI+Γαλλικό οξύ 50μM	-	100
DNA+topoI+Ρουτίνη 10μM	-	100
DNA+topoI+Ρουτίνη 20μM	-	100
DNA+topoI+Ρουτίνη 50μM	-	100

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας 5.12 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	79±10*	21±10*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	60±4*	40±4*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 400μg/ml	77±10*	23±10*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 800μg/ml	78±2*	22±2*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των ισοτοπικών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.ii. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

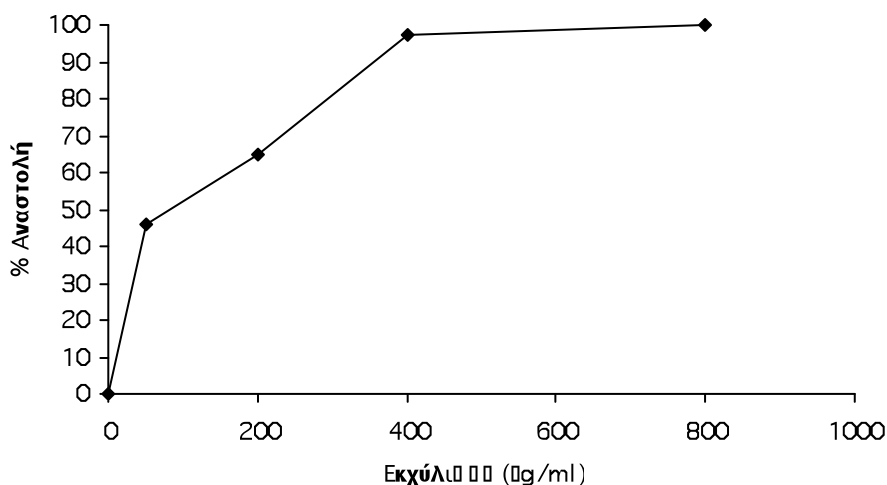


Σχήμα 5.13 (A) Επώαση ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I με pBR322 DNA και μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πηκτική αгарόζης. (B) Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στη δράση του ενζύμου. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.12. SC: υπερελικωμένη μορφή του DNA. R: χαλαρές μορφές του DNA.

Πίνακας 5.13 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	74±3*	26±3*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	34±6*	66±6*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	48±7*	52±7*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 400μg/ml	72±4*	28±4*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 800μg/ml	74±5*	26±5*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.ii. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

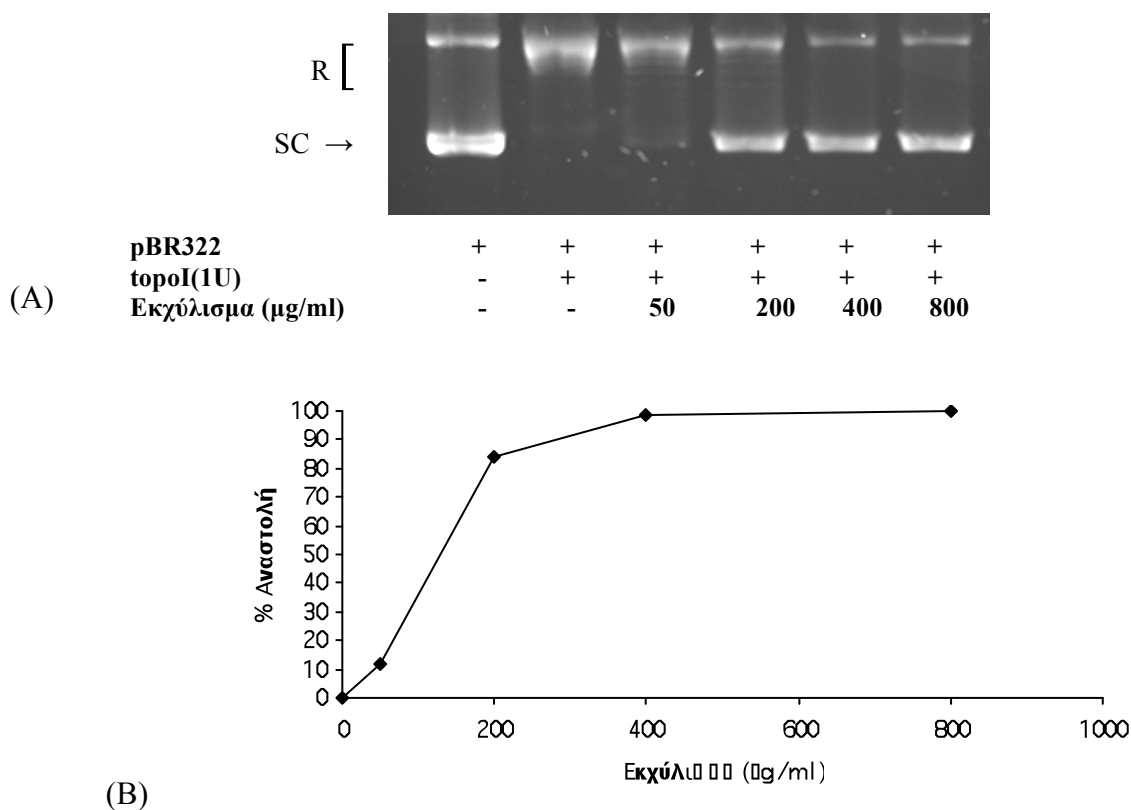


Σχήμα 5.14 Απεικονίζεται η % αναστολή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς (κόκκινα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.13.

Πίνακας 5.14 Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	76±3*	24±3*
DNA+topoI ^b	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	9±2	91±2
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	64±5*	36±5*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 400μg/ml	75±3*	25±3*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 800μg/ml	76±2*	24±2*

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^bΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.ii. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. **p*<0,05 σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

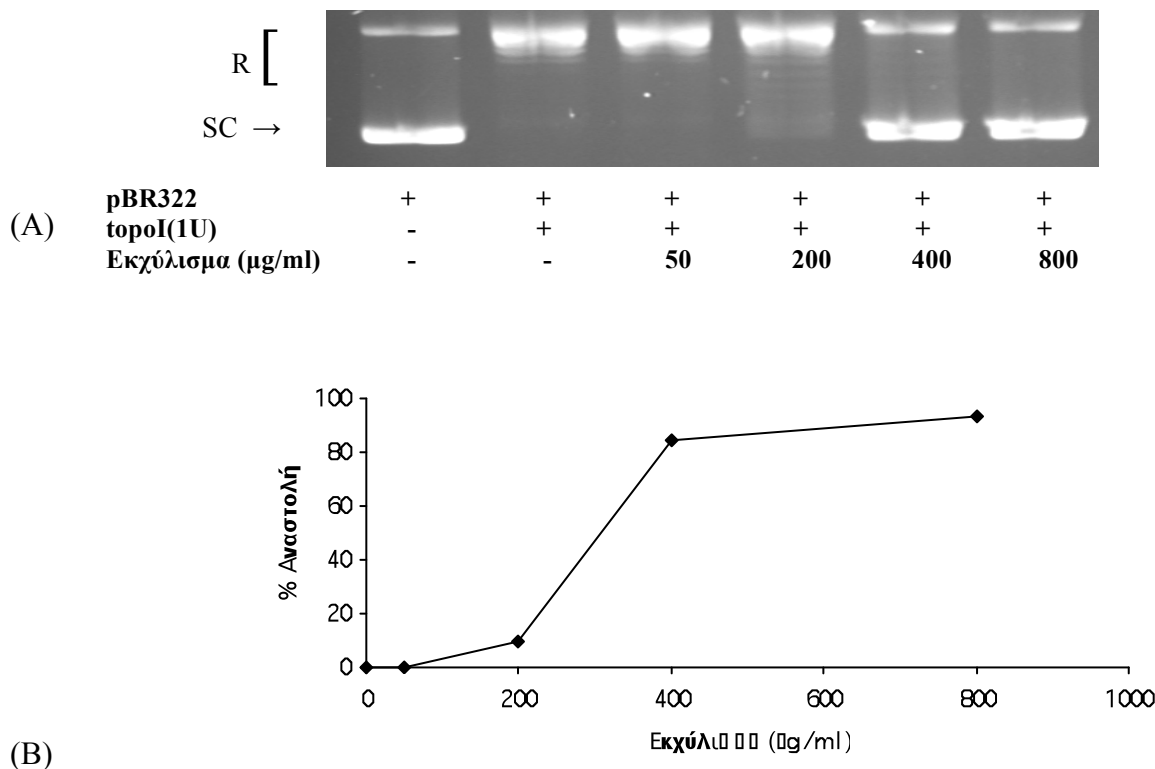


Σχήμα 5.15 (A) Επώαση ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I με pBR322 DNA και μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πηκτική αгарόζης. (B) Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στη δράση του ενζύμου. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.14. SC: υπερελικωμένη μορφή του DNA. R: χαλαρές μορφές του DNA.

Πίνακας 5.15 Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια) στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	78±2*	22±2*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 50μg/ml	-	100
DNA+topoI+Εκχύλισμα 200μg/ml	8±2	92±2
DNA+topoI+Εκχύλισμα 400μg/ml	66±7*	34±7*
DNA+topoI+Εκχύλισμα 800μg/ml	73±5*	27±5*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.ii. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).

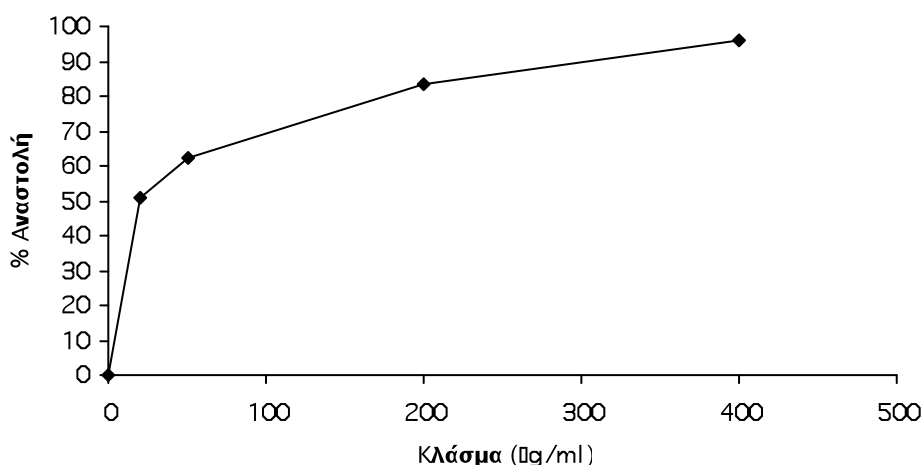


Σχήμα 5.16 (A) Επώαση ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I με pBR322 DNA και υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου (άσπρα σταφύλια). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πηκτική αгарόζης. (B) Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στη δράση του ενζύμου. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.15. SC: υπερελικωμένη μορφή του DNA. R: χαλαρές μορφές του DNA.

Πίνακας 5.16 Επίδραση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^α	R ^α
Αρνητικός μάρτυρας	79±5*	24±3*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+Κλάσμα 20μg/ml	40±6*	60±6*
DNA+topoI+Κλάσμα 50μg/ml	49±4*	51±4*
DNA+topoI+Κλάσμα 200μg/ml	66±7*	34±7*
DNA+topoI+Κλάσμα 400μg/ml	76±5*	24±5*

^αΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.ii. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες).



Σχήμα 5.17 Απεικονίζεται η % αναστολή του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς έναντι της δράσης της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I. Ο υπολογισμός της % αναστολής έγινε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2.i και με βάση τις τιμές του πίνακα 5.16.

Πίνακας 5.17 Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος από το υδατικό εκχύλισμα και του μεθανολικού κλάσματος από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς στη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I.

	% Ποσοστό του DNA	
	SC ^a	R ^a
Αρνητικός μάρτυρας	73±9*	27±9*
DNA+topoI ^β	-	100
DNA+topoI+MK από το YE 50μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το YE 100μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το YE 200μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το YE 400μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το ME 50μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το ME 100μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το ME 200μg/ml	-	100
DNA+topoI+MK από το ME 400μg/ml	-	100

^aΟι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του % ποσοστού του υπερελικωμένου DNA και των χαλαρών μορφών του που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το % ποσοστό των μορφών του DNA προσδιορίστηκε με ανάλυση οπτικής πυκνότητας από το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer 3.0 της Media Cybernetics. ^βΗ συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I ήταν 1U και η αντίδραση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.2.i. topo I: τοποϊσομεράση I; SC: υπερελικωμένο DNA; R: χαλαρές μορφές του DNA. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο pBR322 DNA και τοποϊσομεράση I (θετικοί μάρτυρες). MK: μεθανολικό κλάσμα. YE: υδατικό εκχύλισμα. ME: μεθανολικό εκχύλισμα.

5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα εκχυλίσματα και από τις δύο ποικιλίες ανέστειλαν τη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I καθώς και αυτής από σπέρμα σιταριού σε συγκεντρώσεις που έχουν φυσιολογική σημασία (50-200μg/ml). Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αναστολή της τοποϊσομεράσης I είναι ίσως ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από σταφύλια που έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες (Singh και συν., 2004; Agarwal και συν., 2000α; Agarwal και συν., 2000β; Bagchi και συν., 2002). Η σειρά της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων ήταν σχεδόν παρόμοια στα δύο είδη της τοποϊσομεράσης I, γεγονός που δείχνει ότι η αναστολή και των δύο τοποϊσομερασών οφείλονταν στα ίδια συστατικά των εκχυλισμάτων. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα ήταν πιο ισχυροί αναστολείς της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού σε σύγκριση με την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I, καθώς στην πρώτη περίπτωση σχεδόν πλήρης αναστολή παρατηρήθηκε στα 200μg/ml των εκχυλισμάτων ενώ στη δεύτερη στα 400μg/ml. Δηλαδή, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Suzuki και συν., 2001), φυτοχημικά συστατικά αναστέλλουν σε διαφορετικό βαθμό τοποϊσομεράσες I που προέρχονται από διαφορετικά είδη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ανίχνευση ουσιών που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση I θεωρείται σημαντική, γιατί αν και έχουν αναγνωριστεί αρκετές ουσίες (π.χ. amsacrine, teniposide και doxorubicin) που αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II και οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία (Liu 1989) δεν συμβαίνει το ίδιο με την τοποϊσομεράση I. Ωστόσο, επειδή η συγκέντρωση της τοποϊσομεράσης I δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου θεωρείται πιο κατάλληλος στόχος για αντικαρκινικά φάρμακα σε σύγκριση με την τοποϊσομεράση II (Sobhani και συν., 2002). Για παράδειγμα, ο πιο σημαντικός αναστολέας της

τοποϊσομεράσης I και ένα από τα πιο αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα είναι η καμπτοθεκίνη (Hsiang και συν., 1985).

Από τα πολυφαινολικά κλάσματα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ήταν πιο ισχυρός αναστολέας των τοποϊσομερασών I σε σύγκριση με αυτό καθαυτό το εκχύλισμα. Η ισχυρή ανασταλτική δράση του κλάσματος οξικού αιθυλεστέρα πιθανώς οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες ιδιαίτερα σε κερκετίνη (Πίνακας 1.1), που είναι ισχυρός αναστολέας των τοποϊσομερασών. Ωστόσο, το μεθανολικό κλάσμα από το ίδιο εκχύλισμα δεν ανέστειλε τη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού, ενώ και το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς δεν παρουσιάστηκε πιο δραστικό από το ίδιο το εκχύλισμα. Επιπλέον, και τα δύο αυτά κλάσματα δεν ανέστειλαν τη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I ενώ τα αντίστοιχα εκχυλίσματά τους παρουσίασαν αναστολή. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα των πολυφαινολικών κλασμάτων δείχνουν ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των τοποϊσομερασών I οφείλεται όχι μόνο στις πολυφαινόλες αλλά και σε άλλα συστατικά τους, αφού ορισμένα από τα πολυφαινολικά κλάσματα ήταν λιγότερα δραστικά από τα εκχυλίσματα.

Από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, το καφεϊκό οξύ, που ανήκει στα υδροξυκινναμικά οξέα, ανέστειλε την καταλυτική δράση της ευκαρυωτικής τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού κατά 85% σε συγκέντρωση 20μM. Τα άλλα δύο υδροξυκινναμικά οξέα, το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ δεν εμφάνισαν αναστολή. Η διαφορά στη δομή τους είναι ότι το καφεϊκό οξύ έχει δύο υδροξύλια στις θέσεις 3,4 (κατεχολική δομή) ενώ το κουμαρικό οξύ έχει μόνο ένα υδροξύλιο και στο φερουλικό οξύ το ένα από τα δύο υδροξύλια έχει αντικατασταθεί από μία μεθύλυ ομάδα (Σχήμα 1.11). Άρα, τα αποτελέσματα δείχνουν πως η κατεχολική δομή είναι

ίσως απαραίτητη για την ανασταλτική δράση των υδροξυκινναμικών οξέων. Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ανέστειλε τη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού κατά 80% στα 20μM. Το γαλλικό οξύ δεν επηρέασε τη δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι το γαλλικό οξύ ανέστειλε την τοποϊσομεράση I από θύμο αδένα βοδιού αλλά σε συγκέντρωση >1000mM (Suzuki και συν., 2001). Από τα φλαβονοειδή, η κερκετίνη ανέστειλε την δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού όπως ήταν αναμενόμενο αφού είναι γνωστή η ανασταλτική της δράση έναντι του συγκεκριμένου ενζύμου από άλλες μελέτες (Constantinou και συν., 1995). Η ρουτίνη δεν ανέστειλε την καταλυτική δράση της τοποϊσομεράσης I από σπέρμα σιταριού. Επιπλέον, η ρουτίνη σε άλλη μελέτη δεν ανέστειλε και την ανθρώπινη τοποϊσομεράση I (Boege και συν., 1996). Πιστεύεται ότι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις C3, C7, C3' και C4' καθώς και η καρβονυλομάδα C4 και ο διπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων C2 και C3 απαιτούνται για την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών έναντι της τοποϊσομεράσης I (Constantinou και συν., 1995). Η ρουτίνη στη θέση C3 αντί για υδροξυλομάδα έχει το σάκχαρο ρουτινόζη (Σχήμα 1.12). Επιπλέον, γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή δεν ανέστειλαν τη δράση ενός άλλου ενζύμου, της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης, σε αντίθεση με τα μη γλυκοσυλιωμένα (Zhang και Das 1994). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη δεν είναι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I (Constantinou και συν., 1995; Suzuki και συν., 2001; Boege και συν., 1996). Συμπερασματικά, από τις πολυφαινόλες που ανιχνεύτηκαν στα εκχυλίσματα μόνο η κερκετίνη αποτελεί αναστολέα των τοποϊσομερασών. Η κερκετίνη όμως βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στα εκχυλίσματα και στα κλάσματα αμπέλου. Άρα τα αποτελέσματα από τις πολυφαινόλες, όπως και αυτά από τα πολυφαινολικά κλάσματα, δείχνουν ότι

η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης I οφείλεται πιθανώς σε άλλα συστατικά τους και όχι στις πολυφαινόλες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η πρόσληψη φυτοχημικών συστατικών είτε μέσω της δίαιτας είτε με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής με σκοπό την προστασία από διάφορες ασθένειες (π.χ. καρκίνος, καρδιοπάθειες), θεωρείται μια από τις σημαντικότερες σύγχρονες στρατηγικές πρόληψης (Morse και Stoner 1993). Η αμπέλος είναι ένα από τα φυτά του οποίου ο καρπός (τα σταφύλια) και το κύριο προϊόν του (το κρασί) παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (Soleas και συν., 1997). Η χημική σύσταση των σταφυλιών επηρεάζεται σημαντικά από το έδαφος και τις κλιματικές συνθήκες κατά συνέπεια διαφορετικές ποικιλίες μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες (Macheix και συν., 1990; Soleas και συν., 1997). Αν και είναι γνωστές αρκετές από τις βιολογικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων από σταφύλια και των συστατικών τους, οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλονται δεν είναι γνωστοί και η διερεύνησή τους θεωρείται σημαντική (De Flora και συν., 2001). Επιπλέον, οι μελέτες που αφορούν τη σύσταση ελληνικών ποικιλιών αμπέλου σε βιολογικά δραστικά συστατικά και την εξέταση των βιολογικών ιδιοτήτων τους είναι περιορισμένες. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων και πολυφαινολικών κλασμάτων από δύο ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*) καθώς και των μονομερών φυτικών πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν σε αυτά. Οι δύο ποικιλίες ήταν: Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) και Ασσύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια). Μελετήθηκαν οι εξής βιολογικές ιδιότητες:

1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων ουσιών.
2. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών σε μεταλλάξεις που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι: i) επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τον

οξειδωτικό παράγοντα MMC, ii) πρόκληση μεταλλάξεων σε βακτηριακά κύτταρα (*S. typhimurium* TA102) από τις μεταλλαξιγόνες ουσίες μπλεομυκίνη και H₂O₂ και iii) αύξηση των SCEs από τη μεταλλαξιγόνο ουσία MMC σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

3. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στην προκαλούμενη από το όζον οξείδωση της πρωτεΐνης SP-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα.
4. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση I. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά είδη τοποϊσομεράσης I: i) ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I από σιτάρι και ii) ανθρώπινη τοποϊσομεράση I.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα

6.1. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων ουσιών με τη μέθοδο του DPPH έδειξε τα εξής:

- i) Τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε μικρές συγκεντρώσεις . Οι τιμές του IC₅₀ για τα εκχυλίσματα ήταν μεταξύ 25 και 52μg/ml και για τα κλάσματα μεταξύ 19 και 92μg/ml. Με βάση το δεδομένο ότι 1kg σταφυλιών αποδίδει 23-100gr εκχυλίσματος και 2-10gr κλάσματος (Σχήμα 1.10), συμπεραίνεται ότι οι συγκεντρώσεις στις οποίες τα εκχυλίσματα παρουσίασαν την αντιοξειδωτική τους δράση έχουν φυσιολογική σημασία.
- ii) Τα μεθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα υδατικά και τα εκχυλίσματα της ποικιλίας Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια) ήταν πιο δραστικά από αυτά της ποικιλίας Ασσύρτικο (άσπρα σταφύλια).
- iii) Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σειρά αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων δεν ήταν σύμφωνη με τη σειρά που προκύπτει από την περιεκτικότητά τους σε μονομερείς πολυφαινόλες. Επιπρόσθετα, το μεθανολικό κλάσμα από το μεθανολικό εκχύλισμα έχει τιμή IC₅₀ 92μg/ml, που είναι

μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή (25μg/ml) του μεθανολικού εκχυλίσματος. Άρα συμπεραίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων δεν οφείλεται μόνο στις μονομερείς πολυφαινόλες που περιέχουν αλλά και σε άλλες ουσίες ή σε μια συνεργική δράση των πολυφαινολών με άλλες ουσίες των εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματα αμπέλου περιέχουν ολιγομερείς και πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών (π.χ. προκυανιδίνες) που παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Torres και συν., 2002).

- iv) Οι πολυφαινόλες, με εξαίρεση το κουμαρικό οξύ, εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας τη ρίζα DPPH. Επίσης, οι τιμές IC₅₀ ορισμένων πολυφαινολών (του καφεϊκού οξέος, του γαλλικού οξέος, της (-)-επικατεχίνης και της κερκετίνης) ήταν κοντά στα 10μM, δηλαδή σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στους οργανισμούς μέσω της δίαιτας.
- v) Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, το γαλλικό οξύ ήταν πιο δραστικό από το πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο ότι το γαλλικό οξύ διαθέτει μια περισσότερη υδροξυλομάδα από το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και άρα μπορεί να διαθέσει περισσότερα άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.
- vi) Η σειρά δραστικότητας των υδροξυκινναμικών οξέων ήταν: καφεϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > κουμαρικό οξύ. Η κατεχολική δομή (δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3,4) του καφεϊκού οξέος φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο για την ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση (Σχήμα 1.11).
- vii) Η κερκετίνη ήταν πιο δραστική από τη γλυκοσυλιωμένη της μορφή, τη ρουτίνη. Πιστεύεται ότι η προσθήκη σακχάρων ελαττώνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών γιατί ελαττώνει τον αριθμό των υδροξυλομάδων που μπορούν να δώσουν άτομα υδρογόνου για την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, ενώ επίσης

διαταράσσεται η επίπεδη στερεοδιάταξη της πολυφαινόλης (Heim και συν., 2002).

- viii) Η (-)-επικατεχίνη εμφάνισε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από το στερεοϊσομερές της, την (+)-κατεχίνη.
- ix) Η *trans*-ρεσβερατρόλη, αν και έχει παρουσιάσει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (Dong 2003; Jang και συν., 1997), εμφάνισε μικρή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες πολυφαινόλες.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στη μεταλλαξιγόνο δράση οξειδωτικών παραγόντων είναι τα εξής:

- i) Τα εκχυλίσματα και των δύο ποικιλιών αμπέλου ανέστειλαν σε μικρές συγκεντρώσεις τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης στα βακτηριακά κύτταρα καθώς και τις επαγόμενες από τη MMC θραύσεις του πλασμιδιακού DNA, ενώ επίσης τα μεθανολικά εκχυλίσματα ανέστειλαν την προκαλούμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση στα βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων αμπέλου έναντι των βλαβών που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες ίσως να είναι ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η χημειοπροστατευτική τους δράση που έχει παρατηρηθεί σε άλλες *in vivo* και *in vitro* μελέτες (Singh και συν., 2004; Agarwal και συν., 2000α).
- ii) Τα εκχυλίσματα ενίσχυσαν την αύξηση των SCEs που προκαλούσε η MMC σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, δηλαδή έδειξαν προ-οξειδωτική δράση. Επίσης τα υδατικά εκχυλίσματα ενίσχυσαν τη δράση του H₂O₂ στα κύτταρα *S. typhimurium* TA102. Ήταν όμως ενδιαφέρον ότι σε αυτές τις περιπτώσεις τα εκχυλίσματα από μόνα τους δεν παρουσίασαν μεταλλαξιγόνο δράση αλλά μόνο παρουσία των μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Δηλαδή, η προ-οξειδωτική δράση των

εκχυλισμάτων ίσως ήταν εκλεκτική αφού δεν παρουσιάστηκε σε φυσιολογικά κύτταρα αλλά σε κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η εκλεκτική προ-οξειδωτική δράση φυτοχημικών συστατικών ίσως είναι ένας σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας, ο οποίος οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση (Malik και συν., 2003; Piwocka και συν., 1999).

- iii) Τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στο τεστ του Ames στα πειράματα με τη μπλεομυκίνη και προ-οξειδωτική δράση στα πειράματα με το H₂O₂. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν διαφορετική επίδραση έναντι της MMC στα πειράματα με το πλασμιδιακό DNA και σε εκείνα με τις SCEs. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι θα πρέπει ίσως να χρησιμοποιούνται περισσότεροι από ένας οξειδωτικοί παράγοντες με την ίδια μέθοδο ή περισσότερες από μια μέθοδοι με τον ίδιο οξειδωτικό παράγοντα για να εκτιμηθεί η χημειοπροστατευτική δράση φυτοχημικών ουσιών.
- iv) Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε καμία από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, γιατί οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών εκείνων που έδειξαν παρόμοια δράση ήταν πολύ μικρότερες από τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εκχυλίσματα. Επιπλέον, τα πολυφαινολικά κλάσματα είτε δεν ανέστειλαν είτε ενίσχυσαν τη δράση των μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Άρα τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ουσίες στις οποίες οφείλεται η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων απουσιάζουν από τα κλάσματα. Επίσης ότι οι ουσίες αυτές δεν είναι οι εξεταζόμενες πολυφαινόλες ή ότι υπάρχει μία συνεργική δράση μεταξύ των πολυφαινολών και ουσιών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα και απουσιάζουν από τα κλάσματα.

- v) Τα πολυφαινολικά κλάσματα ενίσχυσαν τη μεταλλαξιγόνο δράση των οξειδωτικών παραγόντων αλλά δεν παρουσίασαν μεταλλαξιγένεση από μόνα τους, και άρα τα κλάσματα φαίνεται να δρούσαν συνεργικά και όχι αθροιστικά με τους μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Δηλαδή, η προ-οξειδωτική δράση παρουσιάστηκε μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων, γεγονός που όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.
- vi) Από τα υδροξυκιναμικά οξέα μόνο το καφεϊκό οξύ ήτανε δραστικό. Ανέστειλε τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης στα βακτηριακά κύτταρα σε μικρή συγκέντρωση (1μM) δείχνοντας μια πιθανή χημειοπροστατευτική δράση. Ωστόσο, ενίσχυσε τη δράση της MMC τόσο στα πειράματα με τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα όσο και στα πειράματα με το πλασμιδιακό DNA δείχνοντας προ-οξειδωτική δράση, σε μεγάλες όμως συγκεντρώσεις (>50μM) που δεν μπορούν να επιτευχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της διαίτας. Το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ σε καμία μέθοδο δεν επηρέασαν τη δράση των μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Η διαφορά στη δραστικότητα ανάμεσα στο καφεϊκό οξύ και τα άλλα δύο υδροξυκιναμικά οξέα πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη κατεχολικής δομής στο καφεϊκό οξύ.
- vii) Από τα εξεταζόμενα φλαβονοειδή (δηλαδή την κερκετίνη, τη ρουτίνη, την (+)-κατεχίνη και την (-)-επικατεχίνη) μόνο η κερκετίνη παρουσίασε αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Γενικότερα, η κερκετίνη ήταν η μοναδική από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες που ανέστειλε τη δράση του H₂O₂ στα βακτηριακά κύτταρα καθώς και τη δράση της MMC στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αν και σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>50μM). Η δράση αυτή της κερκετίνης πιθανώς οφείλεται στο ότι διαθέτει τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά που καθιστούν

μια πολυφαινόλη ισχυρό αντιοξειδωτικό, όπως η κατεχολική δομή στο Β δακτύλιο, η 4-καρβονυλομάδα, ο 2,3 διπλός δεσμός και η 3-OH στο C δακτύλιο, η 5-OH και η 7-OH στον Α δακτύλιο (Σχήμα 1.12), ενώ παράλληλα παρουσιάζει και ισχυρές χηλικές ιδιότητες.

viii) Τα εξεταζόμενα υδροξυβενζοϊκά οξέα, το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, δεν παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε καμία μέθοδο, παρά το γεγονός ότι ιδιαίτερα το γαλλικό οξύ στη μέθοδο με το DPPH παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο ότι οι μοναδικές από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες που παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση, δηλαδή το καφεϊκό οξύ και η κερκετίνη διαθέτουν όχι μόνο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση αλλά παράλληλα και ισχυρές χηλικές ιδιότητες.

ix) Στη μέθοδο με το πλασμιδιακό DNA το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ έδειξαν προ-οξειδωτική δράση. Γενικότερα, πιστεύεται (Sakihama και συν., 2002; Yamanaka και συν., 1997; Li και Trush 1994; Li και συν., 2000) ότι η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών παρουσία Cu^{2+} και Fe^{3+} (στην αντίδραση της MMC με το πλασμιδιακό DNA συμμετέχουν ιόντα Fe) οφείλεται στην ικανότητα τους να ανάγουν αυτά τα ιόντα σε Cu^{1+} και Fe^{2+} , τα οποία στη συνέχεια παίρνουν μέρος στην αντίδραση Fenton.

x) Ορισμένες από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες ενίσχυσαν τη δράση της MMC και της μπλεομυκίνης. Συγκεκριμένα, η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη ενίσχυσαν τη δράση της μπλεομυκίνης στα βακτηριακά κύτταρα, ενώ το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και η ρουτίνη ενίσχυσαν τη δράση της MMC στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτές οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να δοκιμαστούν σε χημειοθεραπευτικά σχήματα καθώς η MMC και η μπλεομυκίνη χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα ενώ επίσης

φυτικές πολυφαινόλες έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες (Weiss και συν., 1988; Ferry και συν., 1996; Wang 2001). Ιδιαίτερα όσον αφορά τα φλαβονοειδή, έχει προταθεί (Sugihara και συν., 2003) ότι χρειάζονται τις ακόλουθες υδροξυλομάδες για να ενισχύσουν τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης: i) το C7-υδροξύλιο στον Α δακτύλιο ii) το C4'-υδροξύλιο στο Β δακτύλιο και iii) το C3-υδροξύλιο στο C δακτύλιο (Σχήμα 1.12). Όμως στην παρούσα μελέτη η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη που διαθέτουν τα τρία αυτά υδροξύλια δεν επηρέασαν τη δράση της μπλεομυκίνης. Η κερκετίνη όμως, η οποία εκτός από τα τρία υδροξύλια έχει επιπλέον την C4 καρβονυλομάδα και ένα 2,3 διπλό δεσμό στο C δακτύλιο (Σχήμα 1.12), ενίσχυσε τη δράση της μπλεομυκίνης. Συνεπώς τα αποτελέσματα δείχνουν πως και αυτά τα χαρακτηριστικά ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της μεταλλαξιγένεσης της μπλεομυκίνης από τα φλαβονοειδή.

Η μελέτη της επίδρασης των εξεταζόμενων ουσιών στη δράση της τοποϊσομεράσης I έδειξε τα εξής:

- i) Τα εκχυλίσματα και από τις δύο ποικιλίες ανέστειλαν τη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I καθώς και αυτής από σπέρμα σιταριού. Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αναστολή της τοποϊσομεράσης I είναι ίσως ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από σταφύλια που έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες (Singh και συν., 2004; Agarwal και συν., 2000α; Bagchi και συν., 2002).
- ii) Το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα από το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς ήταν πιο ισχυρός αναστολέας των τοποϊσομερασών I σε σύγκριση με αυτό καθαυτό το εκχύλισμα. Η ισχυρή ανασταλτική δράση του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα πιθανώς οφείλεται στην κατά πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητά του

σε πολυφαινόλες (ιδιαίτερα σε κερκετίνη που είναι ισχυρός αναστολέας των τοποϊσομερασών) σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα και τα άλλα κλάσματα.

iii) Τα αποτελέσματα από το μεθανολικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος καθώς και από το μεθανολικό κλάσμα του υδατικού εκχυλίσματος δείχνουν ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των τοποϊσομερασών I οφείλεται όχι μόνο στις πολυφαινόλες αλλά και σε άλλα συστατικά τους, αφού αυτά τα πολυφαινολικά κλάσματα ήταν λιγότερα δραστικά από τα εκχυλίσματα από τα οποία προήλθαν.

iv) Το καφεϊκό οξύ ανέστειλε τη δράση της τοποϊσομεράσης I ενώ τα άλλα δύο υδροξυκινναμικά οξέα, το φερουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ δεν εμφάνισαν αναστολή. Η διαφορά στη δομή τους είναι ότι το καφεϊκό οξύ έχει δύο υδροξύλια στις θέσεις 3,4 (κατεχολική δομή) ενώ το κουμαρικό οξύ έχει μόνο ένα υδροξύλιο και στο φερουλικό οξύ το ένα από τα δύο υδροξύλια έχει αντικατασταθεί από μία μεθύλυ ομάδα (Σχήμα 1.11). Άρα, τα αποτελέσματα δείχνουν πως η κατεχολική δομή είναι ίσως απαραίτητη για την ανασταλτική δράση των υδροξυκινναμικών οξέων.

v) Από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ ανέστειλε την τοποϊσομεράση I, ενώ το γαλλικό οξύ δεν επηρέασε τη δράση του ενζύμου.

vi) Η κερκετίνη ήταν ισχυρός αναστολέας της τοποϊσομεράσης I σε αντίθεση με τη γλυκοσυλιωμένη μορφή της, τη ρουτίνη. Όπως έχουν δείξει και άλλες μελέτες (Zhang και Das 1994), η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών παρεμποδίζει την ανασταλτική δράση τους έναντι των ενζύμων.

Τα συμπεράσματα από τη μελέτη της επίδρασης των εξεταζόμενων ουσιών στην προκαλούμενη από το όζον οξειδωση της πρωτεΐνης SP-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα ήταν τα εξής:

- i) Οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστείλουν την επαγόμενη από το όζον οξείδωση της SP-A, μίας πρωτεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και στη φυσική ανοσία του πνεύμονα. Έτσι, αν και υπάρχουν εύλογοι περιορισμοί στην εξαγωγή συμπερασμάτων από *in vitro* πειράματα σε ολόκληρους οργανισμούς, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας σε συνδυασμό με αποτελέσματα από άλλες μελέτες (Samet και συν., 2001; Paola και συν., 2005) δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε φυτικές τροφές θα μπορούσαν να προστατεύσουν από τις δυσμενείς επιδράσεις ρυπαντών της ατμόσφαιρας στους πνεύμονες. Δύο από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, η (-)-επικατεχίνη και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή στα 5μM, δηλαδή σε συγκέντρωση στην οποία μπορούν να βρεθούν οι πολυφαινόλες στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της δίαιτας.
- ii) Τα φλαβονοειδή ((+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και ρουτίνη) ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την οξείδωση της SP-A. Η (-)-επικατεχίνη ήταν η πιο δραστική από τις τρεις ουσίες, και γενικότερα από όλες τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, αναστέλλοντας κατά 35% στη συγκέντρωση των 5μM το σχηματισμό καρβονυλικών ομάδων από το όζον.
- iii) Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ) ανέστειλαν την οξείδωση της SP-A αλλά ήταν λιγότερο δραστικά από τα φλαβονοειδή και η δράση τους έφτασε σε πλατό στα 50μM. Μεταξύ των δύο υδροξυβενζοϊκών οξέων μεγαλύτερη αναστολή παρουσίασε το πρωτοκατεχοϊκό οξύ.
- iv) Τα υδροξυκιναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και κουμαρικό οξύ) παρουσίασαν ένα διαφορετικό πρότυπο αναστολής σε σύγκριση με τα φλαβονοειδή και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Η μέγιστη ανασταλτική δράση τους εμφανίστηκε σε μεσαίες συγκεντρώσεις ενώ στις χαμηλότερες και τις υψηλότερες

δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αναστολή. Αυτό το πρότυπο αναστολής έχει αναφερθεί και σε άλλες περιπτώσεις αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως με την (-)-γαλλική-3-επιγαλλοκατεχίνη (Levites και συν., 2002α), με εκχύλισμα από τσάι (Levites και συν., 2002β), με τη βιταμίνη C (Halliwell 1996), την απομορφίνη και τη ντοπαμίνη (Gassen και συν., 1998). Αν και ως τώρα δεν έχει δοθεί κάποια σαφής εξήγηση για τη δράση αυτή, θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι οι πολυφαινόλες σε μικρές συγκεντρώσεις δεν μπορούν να αναστείλουν την οξείδωση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτό-οξειδώνονται με αποτέλεσμα να καταργείται η αντιοξειδωτική τους δράση.

ν) Η σειρά δραστηριότητας των εξεταζόμενων πολυφαινολών όσον αφορά τη προστασία της πρωτεΐνης SP-A από την επαγόμενη από το όζον οξείδωση είναι:

(-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη = ρουτίνη = πρωτοκατεχοϊκό οξύ > γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ > κουμαρικό οξύ > φερουλικό οξύ. Ενώ η σειρά δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των πολυφαινολών όπως προέκυψε από τη μέθοδο του DPPH είναι: γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ = (-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη > ρουτίνη > πρωτοκατεχοϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > κουμαρικό οξύ. Υπάρχουν διαφορές δηλαδή ανάμεσα στις δύο σειρές δραστηριότητας και αυτό οφείλεται στο ότι η μέθοδος του DPPH δείχνει μόνο την ικανότητα των πολυφαινολών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, ενώ ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι πολυφαινόλες προστατεύουν την SP-A από την επαγόμενη από το όζον οξείδωση θα μπορούσε να είναι ή η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται ή/και η σύνδεση των πολυφαινολών με την SP-A. Έχει αναφερθεί (Asquith και Butler 1986; Hagerman και Butler 1981) ότι οι πολυφαινόλες συνδέονται κατά προτίμηση σε περιοχές των πρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε προλίνη και έχουν μία ελικοειδή διαμόρφωση είτε τύπου κολλαγόνου είτε τυχαίου

σπειράματος. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η SP-A έχει μία περιοχή τύπου κολλαγόνου (Σχήμα 4.1) που περιέχει μία σειρά από 23 τριάδες Gly-Y-X (όπου X είναι μία προλίνη και Y μία υδροξυπρολίνη). Η περιοχή αυτή μαζί με την καρβοξυτελική περιοχή και την υδρόφοβη περιοχή του 'αυχένα' παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία της SP-A (Flores και Phelps 2002).

Τέλος, ορισμένα γενικότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

- i) Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την άποψη ότι η προστατευτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων αμπέλου δεν οφείλεται πιθανώς μόνο στη δράση των πολυφαινόλων, αλλά στην αλληλεπίδραση και τη συνεργική δράση πολλών φυτοχημικών συστατικών, η συνολική δράση των οποίων οδηγεί σε οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (Liu 2004; Glei και συν., 2002).
- ii) Μόνο δύο από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες μπόρεσαν να αναστείλουν τις προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες βλάβες στο DNA. Ενώ τρεις πολυφαινόλες ήταν αναστολείς του ενζύμου τοποϊσομεράση I και επτά πολυφαινόλες ανέστειλαν την επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A. Άρα οι χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων ίσως να μην οφείλονται μόνο στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες αλλά κυρίως στην αλληλεπίδρασή τους με διάφορες πρωτεΐνες, όπως έχουν δείξει και τα αποτελέσματα άλλων πρόσφατων μελετών (Sang και συν., 2005).

Πίνακας 6.1 Βιολογική δράση εκχυλισμάτων, πολυφαινολικών κλάσμάτων και φυτικών πολυφαινολών από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου.

	DPPH	<i>S. typhimurium</i> TA102		<i>S. typhimurium</i> TA102		SCE (MMC)		Πλασμιδιακό DNA		TopoI	TopoI	SP-A
	(IC ₅₀) ^a	(μπλεομυκίνη)		(H ₂ O ₂)				(MMC)		(σιτάρι)	(ανθρώπινη)	(όζον)
		Αναστολή	Επαγωγή	Αναστολή	Επαγωγή	Αναστολή	Επαγωγή	Αναστολή	Επαγωγή	Αναστολή	Αναστολή	Αναστολή
Εκχυλίσματα												
Μεθανολικό Ασύρτικου	35	+++	-	++++	-	-	+	++	-	++++	++++	ΔΕ
Υδατικό Ασύρτικου	52	+	-	-	-	-	+	+	-	++++	++++	ΔΕ
Μεθανολικό Μανδηλαριάς	25	+++	-	+++	-	-	++	+	-	++++	++++	ΔΕ
Υδατικό Μανδηλαριάς	40	+++	-	-	++++	-	++	+	-	++++	++++	ΔΕ
Πολυφαινολικά κλάσματα												
Μανδηλαριάς												
Μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα	92	-	-	-	++++	-	-	-	-	+++	-	ΔΕ
Μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα	46	-	-	-	-	-	++	-	++++	-	-	ΔΕ
Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα από υδατικό εκχύλισμα	19	-	++	-	-	-	+++	-	++++	++++	++++	ΔΕ
Πολυφαινόλες												
Καφεϊκό οξύ	11	+++	-	-	-	-	++	-	++++	++++	ΔΕ	+
Φερουλικό οξύ	_{-β}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ΔΕ	-
Κουμαρικό οξύ	_{-β}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ΔΕ	+
Γαλλικό οξύ	7	-	-	-	-	-	++++	-	++	-	ΔΕ	+
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	29	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	ΔΕ	++
(+)-Κατεχίνη	14	-	-	-	-	-	-	-	-	_{-γ}	ΔΕ	+++
(-)-Επικατεχίνη	11	-	-	-	-	-	-	-	-	_{-γ}	ΔΕ	+++
Κερκετίνη	12	-	+	+	-	+++	-	-	ΔΕ	++++	ΔΕ	ΔΕ
Ρουτίνη	21	-	-	-	-	-	+	-	ΔΕ	-	ΔΕ	++
<i>Trans</i> -Ρεσβερατρόλη	_{-β}	-	++	-	++	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ

^a Στα εκχυλίσματα και τα κλάσματα οι μονάδες συγκέντρωσης του IC₅₀ είναι μg εκχυλίσματος ανά ml, ενώ στις πολυφαινόλες οι μονάδες συγκέντρωσης του είναι μM. ^β Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (50μM) η αναστολή του φερουλικού οξέος ήταν 32%, της *trans*-ρεσβερατρόλης ήταν 25%, ενώ το κουμαρικό οξύ στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή. ^γ Δεδομένα από βιβλιογραφία. Τα σύμβολα δείχνουν το % στατιστικά σημαντικό ποσοστό της Αναστολής/Επαγωγής: (+), 20-40%; (++) , 41-60%; (+++) , 61-80%; (++++), >81%. ΔΕ: δεν εξετάστηκε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικών και υδατικών) και πολυφαινολικών κλάσμάτων από δύο ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) και Ασσύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια), καθώς και μονομερών φυτικών πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν σε αυτά. Οι φυτικές πολυφαινόλες που εξετάστηκαν ήταν: τρία υδροξυκιναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και κουμαρικό οξύ), δύο υδροξυβενζοϊκά οξέα (γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ), τέσσερα φλαβονοειδή (κερκετίνη, ρουτίνη, (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη) και η *trans*-ρεσβερατρόλη. Μελετήθηκαν οι εξής βιολογικές ιδιότητες: 1) Η αντιοξειδωτική δράση των εξεταζόμενων ουσιών με τη μέθοδο του DPPH). 2) Η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών σε μεταλλάξεις που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι: α) επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τον οξειδωτικό παράγοντα μιτομυκίνη C, β) πρόκληση μεταλλάξεων σε βακτηριακά κύτταρα (*S. typhimurium* TA102) από τις μεταλλαξιγόνες ουσίες μπλεομυκίνη και H₂O₂ και γ) αύξηση των SCEs από τη μεταλλαξιγόνο ουσία μιτομυκίνη C σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. 3) Η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στην προκαλούμενη από το όζον οξείδωση της πρωτεΐνης SP-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα. 4) Η επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση I.

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο του DPPH έδειξαν τα εξής: i) Τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε μικρές συγκεντρώσεις (τιμές του IC₅₀ 19-92 μg/ml). ii) Ορισμένα πολυφαινολικά κλάσματα είχαν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλίσματα από τα οποία προήλθαν, άρα η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων δεν οφείλεται μόνο στις πολυφαινόλες που περιέχουν τα εκχυλίσματα, αλλά και σε άλλες ουσίες ή σε μια συνεργική δράση των πολυφαινολών μεταξύ τους καθώς και με άλλες ουσίες των εκχυλισμάτων. iii) Η σειρά δραστηριότητάς των φυτικών πολυφαινολών ήταν γαλλικό οξύ > καφεϊκό οξύ = κερκετίνη = (-)-επικατεχίνη > (+)-κατεχίνη > ρουτίνη > πρωτοκατεχοϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > *trans*-ρεσβερατρόλη > κουμαρικό οξύ και οι τιμές IC₅₀ ορισμένων από αυτές (του καφεϊκού οξέος, του γαλλικού οξέος, της (-)-επικατεχίνης και της κερκετίνης) ήταν σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στους οργανισμούς μέσω της δίαιτας.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στη μεταλλαξιγόνο δράση οξειδωτικών παραγόντων είναι τα εξής: i) Τα εκχυλίσματα και των δύο ποικιλιών αμπέλου ανέστειλαν σε μικρές συγκεντρώσεις τη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης στα βακτηριακά κύτταρα καθώς και τις επαγόμενες από τη μιτομυκίνη C θραύσεις του πλασμιδιακού DNA, ενώ επίσης τα μεθανολικά εκχυλίσματα ανέστειλαν την προκαλούμενη από το H₂O₂ μεταλλαξιγένεση στα βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων αμπέλου έναντι των βλαβών που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες ίσως να είναι ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η χημειοπροστατευτική τους δράση. ii) Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε καμία από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, γιατί οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών εκείνων που έδειξαν ανασταλτική δράση ήταν πολύ μικρότερες από τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εκχυλίσματα. Άρα η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων, ή δεν οφείλεται στις πολυφαινόλες ή υπάρχει μία συνεργική δράση μεταξύ των πολυφαινολών ή μεταξύ των πολυφαινολών και άλλων ουσιών των εκχυλισμάτων. iii) Από τις πολυφαινόλες, ανασταλτική δράση παρουσίασαν το καφεϊκό οξύ έναντι της επαγόμενης από μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεσης στα βακτηριακά κύτταρα και η κερκετίνη έναντι της επαγόμενης από H₂O₂ μεταλλαξιγένεσης στα βακτηριακά κύτταρα αλλά και έναντι της μιτομυκίνης C στη μέθοδο με τις SCEs. Η ανασταλτική δράση αυτών των πολυφαινολών οφείλεται πιθανώς στο ότι διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση αλλά παράλληλα και ισχυρές χηλικές ιδιότητες.

Η μελέτη της επίδρασης των εξεταζόμενων ουσιών στη δράση της τοποϊσομεράσης I έδειξε τα εξής: i) Τα εκχυλίσματα και από τις δύο ποικιλίες ανέστειλαν τη δράση της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I καθώς και αυτής από σπέρμα σιταριού, άρα η αναστολή αυτού του ενζύμου είναι ίσως ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από σταφύλια που έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες. ii) Ορισμένα από τα πολυφαινολικά κλάσματα ήταν λιγότερα δραστικά από τα εκχυλίσματα από τα οποία προήλθαν άρα η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των τοποϊσομερασών I οφείλεται όχι μόνο στις πολυφαινόλες αλλά και σε άλλα συστατικά τους. iii) Από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες το καφεϊκό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και η κερκετίνη ανέστειλαν τη δράση της τοποϊσομεράσης I.

Τα συμπεράσματα από τη μελέτη της επίδρασης των πολυφαινόλων στην προκαλούμενη από το όζον οξειδωση της πρωτεΐνης SP-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα ήταν τα εξής: i) τα φλαβονοειδή ((+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και ρουτίνη) ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την οξειδωση της SP-A. ii) Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχοϊκό οξύ) ανέστειλαν την οξειδωση της SP-A αλλά ήταν λιγότερο δραστικά από τα φλαβονοειδή και η δράση τους έφτασε σε πλατό στα 50μM. iii) Τα υδροξυκιναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και κουμαρικό οξύ) παρουσίασαν ανασταλτική δράση σε μεσαίες συγκεντρώσεις ενώ στις χαμηλότερες και τις υψηλότερες δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αναστολή. Άρα οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστείλουν την επαγόμενη από το όζον οξειδωση της SP-A, μίας πρωτεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και τη φυσική ανοσία του πνεύμονα, και κατά συνέπεια θα μπορούσαν να προστατεύσουν από τις δυσμενείς επιδράσεις ρυπαντών της ατμόσφαιρας στους πνεύμονες.

ABSTRACT

In the present study, extracts (methanolic and water) and fractions enriched in polyphenols from two Greek grape varieties, Mandilaria Santorini (red grapes) and Assyrtiko Santorini (white grapes), as well as monomeric plant polyphenols present in them were tested for their biological activity. The tested plant polyphenols were: three hydroxycinnamic acids (cafeic acid, ferulic acid and coumaric acid), two hydroxybenzoic acids (gallic acid and protocatechuic acid), four flavonoids (quercetin, rutin, (+)-catechin and (-)-epicatechin) and *trans*-resveratrol. The following biological properties were investigated: 1) The antioxidant activity by using the DPPH method. 2) The effect of the tested compounds on mutagenicity induced by oxidative factors. In this case, the following methods were used: i) DNA strand breakages induced by mitomycin C in plasmid DNA, ii) mutations induced by bleomycin and hydrogen peroxide in bacterial cells (*Salmonella typhimurium* TA102) and iii) SCEs induced by mitomycin C in cultures of human lymphocytes. 3) The effect of tested compounds on ozone-induced oxidation of SP-A protein (which is one of the major proteins of lung surfactant). 4) The effect of tested compounds on the activity of topoisomerase I enzyme.

The results from the DPPH method showed the following: i) The extracts and the fractions exhibited strong antioxidant activity in low concentrations (IC₅₀ values between 19-92 µg/ml). ii) Some of the polyphenol enriched fractions had less antioxidant activity than their corresponding extracts, and so the results suggested that the antioxidant activity of extracts is not attributed only to the polyphenols but also to other compounds or to a synergistic effect between polyphenols or between polyphenols and other compounds present in extracts. iii) The potential order of the polyphenols was: gallic acid > caffeic acid = quercetin = (-)-epicatechin > (+)-catechin > rutin > protocatechuic acid > ferulic acid > *trans*-resveratrol > coumaric acid. Moreover, the IC₅₀ values some of them were in concentrations which can be achieved in the human organism through the diet.

The conclusions coming from the effects of the tested compounds on the mutagenic activity induced by oxidative factors were the following: i) The extracts from both grape varieties inhibited at low concentrations the bleomycin-induced mutagenicity in bacterial cells as well as the mitomycin C-induced DNA strand breakages in plasmid DNA. Furthermore, the methanolic extracts inhibited the hydrogen peroxide-induced

mutagenicity in bacterial cells. Thus, the results indicated that the inhibitory activity of grape extracts against DNA mutations induced by oxidative factors may be one of the mechanisms accounting for their chemopreventive action. ii) The antimutagenic activity of extracts could not be attributed to any of the tested polyphenols, since the concentrations of those polyphenols exerted antimutagenic activity were much lower than the concentrations of the polyphenols in the extracts. Consequently, the inhibitory activity of extracts may not be attributed to the polyphenols or there may be a synergistic activity between polyphenols or between the polyphenols and some other compounds of the extracts. iii) From the tested polyphenols, caffeic acid inhibited the bleomycin-induced mutagenicity in bacterial cells and quercetin inhibited the hydrogen peroxide-induced mutagenicity in bacterial cells as well as the mitomycin C-induced SCEs in human lymphocytes. The inhibitory activity of these polyphenols could probably be attributed not only to their strong antioxidant properties but also to their metal chelating properties.

The results from the effects of the tested compounds on topoisomerase I activity showed the following: i) The extracts from both grape varieties inhibited the catalytic activity of both topoisomerase I from wheat germ and human topoisomerase I. Therefore, the inhibition of this enzyme may be one of the mechanisms accounting for the anticarcinogenic activity of grape extracts observed in other studies. ii) Some of the polyphenol enriched fractions were less potent than their corresponding extracts. Thus, the inhibitory activity of extracts against topoisomerase I may be due not only to the polyphenols but also to other compounds present in extracts. iii) From the tested polyphenols, caffeic acid, quercetin and protocatechuic acid exerted inhibition against the activity of topoisomerase I.

The conclusions resulting from the effects of the tested compounds on ozone-induced oxidation of SP-A were the following: i) The flavonoids, (+)-catechin, (-)-epicatechin and rutin, inhibited in a dose-dependent manner the SP-A oxidation. ii) The hydroxybenzoic acids, gallic acid and protocatechuic acid, inhibited SP-A oxidation but they were less potent than the flavonoids and their inhibitory activity reached a plateau at 50 μ M. iii) The hydroxycinnamic acids, caffeic acid, ferulic acid and coumaric acid, exhibited inhibition at medium concentrations, while there was not statistically significant inhibition at high concentrations. In general, these results suggested that plant polyphenols could inhibit the ozone-induced oxidation of SP-A, which plays an important role in normal lung function and innate host defense.

Therefore, plant polyphenols found in dietary foods could possibly protect from the detrimental effects of air pollutants on lungs.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, **2003**.

Ντόζη-Βασιλειάδου Ι, Μουρελάτος Δ. Κυτταρογενετικές μέθοδοι για τη βελτίωση και καθοδήγηση της χημειοθεραπείας. Σε: Εξελίξεις και προοπτικές στην έρευνα βελτίωσης της χημειοθεραπείας του καρκίνου. University Studio Press: Θεσσαλονίκη, **1989**.

Τοσσίδης Ι. Γενική και Ανόργανη Χημεία. Εκδόσεις Ζήτη: Θεσσαλονίκη, **1990**.

Τριανταφυλλίδης Κ. Κλασική και Μοριακή Γενετική. Εκδόσεις Κυριακίδη: Θεσσαλονίκη, **1992**.

Τσακόπουλος Μ, Vander A, Sherman J, Luciano D. Φυσιολογία του Ανθρώπου. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη: Αθήνα, **2001**.

B. ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergent O, Cillard P, Morel I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radic Biol Med.* **1999** 26:1457-1466.

Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolffram S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol.* **1996** 81:943-955.

Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* **1997** 29:95-120.

Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol Carcinog.* **2000a** 28:129-138.

Agarwal C, Sharma Y, Zhao J, Agarwal R. A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1 arrest and differentiation. *Clin Cancer Res.* **2000b** 7:2921-2930.

Alarcon De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology.* **1994** 48:56-62.

Alcaraz MJ, Ferrandiz ML. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *J Ethnopharmacol.* **1987** 21209-21229.

Ames BN, Lee FD, Durston WE. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1973** 70:2281-2285.

Aris RM, Christian D, Hearne PQ, Kerr K, Finkbeiner WE, Balmes JR. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am Rev Respir Dis*. **1993** 148(5):1363-1372.

Asquith TN, Butler LG. Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry*. **1986** 25:1591-1593.

Austin CA, Patel S, Ono K, Nakane H, Fisher LM. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase-II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem J*. **1992** 282:883-889.

Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, Crouch E, King RJ. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med*. **2001** 163(2):389-397.

Ayrton AD, Lewis DF, Walker R, Ioannides C. Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: investigation into possible mechanisms of action. *Food Chem Toxicol*. **1992** 30: 289-295.

Azmi AS, Bhat SH, Hadi SM. Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: implications for anticancer properties. *FEBS Lett*. **2005** 579: 3131-3135.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. **2000** 148:187-197.

Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Pruess HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol*. **2002** 40:717-726.

Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem*. **2000** 7:39-58.

Baldasano JM, Valera E, Jimenez P. Air quality data from large cities. *Sci Total Environ*. **2003** 307:141-165.

Bell JR, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr*. **2000** 71:103-108.

Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. II. Extension of age range. *Mutat Res*. **1989** 212:149-154.

Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr*. **2005** 24:172-183.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. **1997** 271: 20313-20316.

Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.* **1998** 24:133–138.

Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* **2002** 957:210–229.

Bhattacharya K, Yadava S, Papp T, Schiffmann D, Rahman Q. Reduction of chrysotile asbestos-induced genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes by garlic extract. *Toxicol Lett.* **2004** 153:327-332.

Blau H, Riklis S, Van Iwaarden JF, McCormack FX, Kalina M. Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A. *Am J Physiol.* **1997** 272:L1198-L1204.

Boege F, Straub T, Kehr A, Boesenberg C, Christiansen K, Andersen A, Jakob F, Kohrle J. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem.* **1996** 271:2262-2270.

Boffetta P, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study. *Epidemiology.* **1990** 1:342-348.

Borron, P, McIntosh JC, Korfhagen TR, Whitsett JA, Taylor J, Wright JR. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2000** 278(4):L840-L847.

Boulton DW, Walle UK, Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol.* **1998** 50:243–249.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976** 72:248-254.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* **1995** 28:25-30.

Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* **1995** 18:1033-1077.

Breinhold V, Lauridson ST, Dragsted LO. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolising and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica.* **1999** 29:1227-1240.

Brodie AE, Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* **1987** 148:120-125.

Bruns G, Stroh H, Veldman GM, Latt SA, Floros J. The 35 kd pulmonary surfactant-associated protein is encoded on chromosome 10. *Hum Genet.* **1987** 76:58-62.

Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol.* **1998** 36:617-621.

Burdette JE, Chen SN, Lu ZZ, Xu H, White BE, Fabricant DS, Liu J, Fong HH, Farnsworth NR, Constantinou AI, Van Breemen RB, Pezzuto JM, Bolton JL. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *J Agric Food Chem.* **2002** 50:7022-7028.

Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci.* **1992** 13:245-251.

Byrnes RW, J. Templin, Sem D, Lyman S, Petering DH. Intracellular DNA strand scission and growth inhibition of Ehrlich ascites tumor. *Cancer Res.* **1990** 50:5275-5286.

Byrnes RW, Petering DH. Repair of bleomycin-induced DNA double-strand breakage in Ehrlich ascites tumor cells. *Radiat Res.* **1993** 134:343-348.

Cadet J, Ravanat JL, Buchko GW, Yeo HC, Ames BN. Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol.* **1994** 234:79-88.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer.* **2000** 87:595-600.

Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr.* **2001** 73:920-926.

Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric.* **2000** 80:1044–1062.

Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, Del Rio JA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agr Food Chem.* **2000** 48:1738–1745.

Chakraborty AK, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun.* **1988** 152:605-611.

Chakraborty T, Ghosh S, Datta S, Chakraborty P, Chatterjee M. Vanadium suppresses sister-chromatid exchange and DNA-protein crosslink formation and restores antioxidant status and hepatocellular architecture during 2-acetylaminofluorene-induced experimental rat hepatocarcinogenesis. *J Exp Ther Oncol.* **2003** 3:346-362.

- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **1979** 59:527-605.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* **2000** 130:1963–1970.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* **1993** 13:2165-2170.
- Chen X, Ahn DU. Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *J Am Oil Chem Soc.* **1998** 75:1717–1721.
- Chen Y, Hagerman AE. Quantitative examination of oxidized polyphenol-protein complexes. *J Agric Food Chem.* **2004** 52:6061-6067.
- Cheng F, Breen K. On the ability of four flavonoids, baiciclein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biomaterials.* **2000** 13:77–83.
- Chou EJ, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH. *Am J Cardiol.* Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. **2001** 5:553-555.
- Chowdhury AR, Sharma S, Mandal S, Goswami A, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem J.* **2002** 366:653-661.
- Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod.* **1992** 55:179–183.
- Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM. Tea and cancer prevention: Studies in animals and humans. *Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health. Role of Flavonoids in the Diet.* **2002** 3268S-3274S.
- Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric.* **2000** 80:1118–1125.
- Clifford MN. Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *J Food Sci Agric.* **2000** 80:1063–1072.
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* **1999** 79:362–372.
- Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2000** 164:206–215.

Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J Mol Med.* **2000** 78:333-336.

Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod.* **1995** 58:217-225.

Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Bioch.* **1996** 7:66-76.

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol.* **1999** 277:120-126.

Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol.* **2001** 63:521-554.

Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2002** 11:815-821.

Dangles O, Dufour C, Bret S. Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J Chem Soc.* **1999** 2:737-744.

Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab.* **1997** 41: 353-357.

De Beer D, Joubert E, Gelderblom WC, Manley M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J Agric Food Chem.* **2003** 51:902-909.

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albin A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res.* **2001** 480-481:9-22.

De Flora S, Ramel C. Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Basic Life Sci.* **1990** 52:461-462.

Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. Plant Flavonoids in Biology and Medicine. *Progress in Clinical and Biological Research.* **1986** 213:481-489.

Deprez S, Mila I, Huneau J-F, Tomé D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal.* **2001** 3:957-967.

Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, Koren HS. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1991** 4:72-81.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences.* **1999** 65:337-353.

Ding J, Umstead TM, Floros J, Phelps DS. Factors affecting SP-A-mediated phagocytosis in human monocytic cell lines. *Respir Med.* **2004** 98:637-650.

Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res.* **2003** 523-524:145-150.

Dorr RT. New findings in the pharmacokinetic, metabolic, and drug-resistance aspects of mitomycin C. *Semin Oncol.* **1988** 15:32s-41s.

Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, Steele GM. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr.* **1998** 52:733-766.

Dynan WS, Jendrisak JJ, Hager DA, Burgess RR. Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I (nicking-closing enzyme). *J Biol Chem.* **1981** 256:5860-5865.

Eaton-Evans J. Osteoporosis and the role of diet. *Br J Biomed Sci.* **1994** 51:358-370.

Edenharder R, 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. *Mutat Res.* **2003** 540:1-18.

Ekmekci A, Sayl A, Donmez H, Bal F. In vitro effects of prostaglandin E1 and indomethacin on mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in mitogen-stimulated human lymphocytes. *Mutat Res.* **1995** 328:49-53.

Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **1988** 9:331-332.

Evans HJ. SCEs and disease states in man. In: SCE. Wolff W ed. John Wiley publications: New York, USA, **1982**.

Farzarah F, Panayotou GN, Bowler LD, Hardas BD, Broom T, Walther C, Shall S. ADP-ribosylation is involved in the integration of foreign DNA into the mammalian cell genome. *Nucleic Acid Res.* **1988** 16:1319-1326.

Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* **1997** 61:2103-2110.

Ferguson LR, Lim IF, Pearson AE, Ralph J, Harris PJ. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. *Mutat Res.* **2003** 542:49-58.

Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* **2001** 475:89-111.

Ferrer M, Sanchez-Lamar A, Luis Fuentes J, Barbe J, Llagostera M. Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using Salmonella assay. *Mutat Res.* **2002** 517:251-254.

Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res.* **1996** 2:659-668.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* **2000** 408:239-247.

Floros J, Phelps DS. Pulmonary surfactant protein A: Structure, expression and its role in innate host defense. In: Surfactant Update Intensive Care Medicine, volume 6. Nakos G, Lekka M, eds. University of Ioannina : Ioannina, Greece, **2002**.

Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* **1998** 421:277-279.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* **1995** 12:1061-80.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* **1993** 341:454-457.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* **1995** 64:97-112.

Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis.* **1998** 19:2151-2158.

Froelich-Ammon SJ, Osheroff N. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem.* **1995** 270:21429-21432.

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* **2000** 48:3597-3604.

Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary Polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact.* **2000** 17:311-349.

Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control.* **1999** 10:71-75.

Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*. **2003** 115:13-23.

Gassen M, Gross A, Youdim MB. Apomorphine enantiomers protect cultured pheochromocytoma (PC12) cells from oxidative stress induced by H₂O₂, and 6-hydroxydopamine. *Movement Dis*. **1998** 13:242-248.

Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1997** 94:14138-14143.

Gichner T, Pospisil F, Veleminsky J, Volkeova V, Volke J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiol*. **1987** 32:55-62.

Glei M, Liegibel UM, Ebert MN, Bohm V, Pool-Zobel BL. beta-Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2002** 179:65-73.

Gorham JL. The stilbenoids. *Progr Phytochem*. **1980** 6:203-252.

Graefe EU, Wittig J, Mueller S, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. **2001** 41:492-499.

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

Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol*. **2002** 168:5989-5992.

Haagsman HP, Hawgood S, Sargeant T, Buckley D, White RT, Drickamer K, Benson BJ. The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem*. **1987** 262:13877-13880.

Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem*. **1981** 256:4494-4497.

Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. **2000** 486:10-13.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. **1994** 102:5-12.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*. **1984** 1:1396-1397.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press: London, **1998**.

Halliwell B. Vitamin C, antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res.* **1996** 25:439-454.

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: Plant flavonoids in biology and medicine. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, **1986**.

Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen.* **1990** 15:145-182.

Haslam E. Practical polyphenolics- From structures to molecular recognition and physiological action. Haslam E edr. Cambridge Univ. Press: Cambridge, **1999**.

Hatch FT, Lightstone FC, Colvin ME. Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity. *Environ Mol Mutagen.* **2000** 35(4):279-299.

Heffner JE, Repine JE. Antioxidants and the lung, In: Crystal RG, West JB, eds. The lung: scientific foundations. Raven Press: New York, **1991**.

Heim KE, Tagliafero AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Bioch.* **2002** 13:572-584.

Helsby NA, Williams J, Kerr D, Gescher A, Chipman JK. The isoflavones equol and genistein do not induce xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse and in human cells. *Xenobiotica.* **1997** 27(6):587-596.

Hertog MG, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, D. Kromhout D. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiology Biomark Prev.* **1996** 5:673-677.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* **1993** 342:1007-1011.

Hill DL, Grubbs CJ. Retinoids and cancer prevention. *Annu Rev Nutr.* **1992** 12:161-181.

Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci.* **1994** 55:1061-1069.

Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* **1997** 51:305-310.

Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* **1995** 62:1276-1282.

Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J.* **2002** 43:236–241.

Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science.* **1997** 278:1073-1077.

Hour TC, Liang YC, Chu IS, Lin JK. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food Chem Toxic.* **1999** 37:569-579.

Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* **1985** 260:14873-14878.

Huang FL, Roop DR, De Luca LM. Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea. *In Vitro Cell Dev Biol.* **1986** 22:223.

Huang MT, Ferraro T, Ho CT. Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. In: Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT eds. American Chemical Society: Washington, DC, **1994**.

Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* **1991** 51:813-819.

Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2000** 64:1813-1820.

Jackson RS. Chemical constituents of grapes and wine. In Wine Science: Principles and applications. Taylor SL ed. Academic Press: San Diego, **1993**.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* **1997** 275:218-20.

Janic B, Umstead TM, Phelps DS, Floros J. An in vitro cell model system for the study of the effects of ozone and other gaseous agents on phagocytic cells. *J Immunol Methods.* **2003** 272:125-134.

Jobstl E, O'Connell J, Fairclough JP, Williamson MP. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromol.* **2004** 5(3):942-949.

Jordan VC. The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. *Cancer.* **1992** 70:977s-982s.

Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J.* **1998** 335:85–94.

Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci*. **1999** 19:8114-21.

Kamei H, Koide T, Kojimam T, Hasegawa M, Terabe K, Umeda T, Hashimoto Y. Flavonoid-mediated tumor growth suppression demonstrated by in vivo study. *Cancer Biother Radiopharm*. **1996** 11:193-196.

Katiyar SK, Mukhtar H. Tea consumption and cancer. *World Rev Nutr Diet*. **1996** 79:154-84.

Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr*. **2000** 130:53-56.

Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: Chemical induction of cancer modulation and combination of effects. Arcos J, Argus M, Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, **1997**.

Kelly FJ, Mudway IS. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids*. **2003** 25:375-396.

Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther*. **1998** 78:167-209.

Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA, Elliott BE. Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: induction of high-frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment. *J Cell Physiol Suppl*. **1984** 3:87-97.

Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*. **1997** 13593-102.

Kim SY, Gao JJ, Kang HK. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. *Biol Pharm Bull*. **2000** 23:451-455.

Kitts DD, Lim KT. Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS). *J Toxicol Environ Health*. **2001** 64:357-371.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. **1996** 312:478-481.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. **2002** 76: 560-568.

Kobayashi S, Ueda K, Komano T. The effects of metal ions on the DNA damage induced by hydrogen peroxide. *Agric Biol Chem*. **1990** 54:69-74.

Koptides M, Umstead TM, Floros J, Phelps DS. Surfactant protein A activates NF-kappa B in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol.* **1997** 273: L382-L388.

Kourakis A, Mouratidou M, Kokkinos G, Barbouti A, Kotsis A, Mourelatos D, Dozi-Vassiliades J. Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses. *Mutat Res.* **1992** 279:145-148.

Kremlev SG, Umstead TM, Phelps DS. Effects of surfactant protein A and surfactant lipids on lymphocyte proliferation in vitro. *Am J Physiol.* **1994** 267 : L357-L364.

Kremlev SG, Umstead TM, Phelps DS. Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. *Am J Physiol.* **1997** 272:L996-L1004.

Kuenzig W, Chau J, Norkus E, Holowaschenko H, Newmark H, Mergens W, Conney AH. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis.* **1984** 5:309-13.

Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* **1976** 24:117-191.

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* **1999** 38:133-142.

Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M, Attali P. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* **1991** 101:635-639.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970** 227:680-685.

Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem.* **2001** 49:3341-3348.

Larramendy ML, Lopez-Larrazza D, Vidal-Rioja L, Bianchi NO. Effect of the metal chelating agent o-phenanthroline on the DNA and chromosome damage induced by bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **1989** 49: 6583-6586.

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

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

Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-

kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med.* **2001** 7:1291-1297.

Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 154-160.

Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* **2000** 92:154-160.

Lea AGH, Bridle P, Timberlake CF, Singleton VL. The procyanidins of white grapes and wines. *Am J Enol Vitic.* **1979** 30:289-300.

Lee H, Wang HW, Su HY, Hao NJ. The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline. *Mutagenesis.* **1994** 9 : 101-106.

Lee M-J, Wang Z-Y, Li H, et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1995** 4:393-399.

Lempereur I, Rouau X, Abecassis J. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *J Cereal Sci.* **1997** 25:103-110.

Leppard JB, Champoux JJ. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma.* **2005** 114:75-85.

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

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1994** 233:346-357.

Levites Y, Amit T, Youdim BHM, Mandel S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem.* **2002a** 277:30574-30580.

Levites Y, Youdim BHM, Maor G, Mandel S. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Bioch Pharm.* **2002b** 63:21-29.

Li AS, Bandy B, Tsang SS, Davison AJ: DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. *Free Radic Res.* **2000** 33:551-566.

Li TK, Liu LF. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2001** 41:53-77.

Li W, Zhao C, Xia C, Antholine WE, Petering DH. Comparative binding properties of metallobleomycins with DNA 10-mers. *Biochemistry.* **2001** 40:7559-7568.

- Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* **1994** 54:1895s-1898s.
- Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem.* **1989** 58:351-375.
- Liu LF. DNA topoisomerases: Biochemistry and molecular biology. In: *Advances in Pharmacology*. Academic Press: New York, **1994**.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* **2003** 78:517S-520S.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* **2004** 134:3479S-3485S.
- Llopiz N, Puiggros F, Cespedes E, Arola L, Ardevol A, Blade C, Salvado MJ. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *J Agric Food Chem.* **2004** 52:1083-1087.
- Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem Toxicol.* **2001** 39:1205-1210.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. *Fruit Phenolics*. CRC Press: Boca Raton, FL, **1990**.
- Malik A, Azam S, Hadi N, Hadi SM. DNA degradation by water extract of green tea in the presence of copper ions: implications for anticancer properties. *Phytother Res.* **2003** 17:358-363.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **2004** 79:727-747.
- Matito C, Mastorakou F, Centelles JJ, Torres JL, Cascante M. Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur J Nutr.* **2003** 42:43-49.
- Matsuoka A, Furuta A, Ozaki M, Fukuhara K, Miyata N. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat Res.* **2001** 494:107-113.
- Matsuoka A, Takeshita K, Furuta A, Ozaki M, Fukuhara K, Miyata N. The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol. *Mutat Res.* **2002** 521:29-35.
- Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, et al. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* **2003** 784:137-144.
- McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* **1993** 26:351-357.

McCormack FX, Kuroki Y, Stewart JJ, Mason RJ, Voelker DR. Surfactant protein A amino acids Glu195 and Arg197 are essential for receptor binding, phospholipid aggregation, regulation of secretion, and the facilitated uptake of phospholipid by type II cells. *J Biol Chem.* **1994** 269:29801-29807.

McCormack FX, Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest.* **2002** 109:707-712.

McIntosh JC, Mervin-Blake S, Conner E, Wright JR. Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *Am J Physiol.* **1996** 271:L310-L319.

Melo Cavalcante AA, Rubensam G, Picada JN, Gomes da Silva E, Fonseca Moreira JC, Henriques JA. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environ Mol Mutagen.* **2003** 41:360-369.

Mirvish SS. Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: Inhibition of tumor induction and development. Zedeck MS, Lipkin M eds. Plenum: New York, USA, **1981**.

Misra A, Chattopadhyay R, Banerjee S, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB. Black tea prevents cigarette smoke-induced oxidative damage of proteins in guinea pigs. *Nutrient Inter Tox.* **2003** 2622-2628.

Mizushina Y, Saito A, Tanaka A, Nakajima N, Kuriyama I, Takemura M, Takeuchi T, Sugawara F, Yoshida H. Structural analysis of catechin derivatives as mammalian DNA polymerase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005** 333:101-109.

Moraes EC, Keyse SM, Tyrrell RM. Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis.* **1990** 11:283-293.

Morse MA, Eklind KI, Hecht SS, Jordan KG, Choi CI, Desai DH, Amin SG, Chung FL. Structure activity relationships for inhibition of 4-methylnitrosamino-1-(pyridyl)-1-dutanone (NKK) lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. *Cancer Res.* **1991** 51:1846-1850.

Morse MA, Stoner GD. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis.* **1993** 14:1737-1746.

Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Res.* **2000** 455:29-60.

Mourelatos D, Dozi-Vassiliades J, Tsigalidou-Balla V, Granitsas A. Enhancement by methylxanthines of sister-chromatid exchange frequency induced by cytostatics in normal and leukemic human lymphocytes. *Mutat Res.* **1983** 121:147-152.

Mudd JB, Leavitt R, Ongun A, McManus TT. Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos Environ.* **1969** 3: 669-682.

Mueller RF, Young ID. Emery's elements of medical genetics. Churchill Livingstone: Leeds, UK, **2001**.

Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7, 12-dimethyl benz (a) anthracene-benzo (a) pyrene-, 3-methyl cholanthrene- and N-methyl-N-nitrosourea - induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* **1988** 48:2361- 2365.

Murthy KNC, Singh RP, Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem.* **2002** 50:5909-5914.

Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* **1999** 13:295-309.

Nakayama T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res.* **1994** 54:1991s–1993s.

Nepka C, Asproдини E, Kouretas D. Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* **1999** 24: 183-189.

Oosting RS, van Greevenbroek MM, Verhoef J, van Golde LM, Haagsman HP. Structural and functional changes of surfactant protein A induced by ozone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **1991** 261: L77-L83.

Oosting RS, Van Iwaarden JF, Van Bree L, Verhoef J, Van Golde LM, Haagsman HP. Exposure of surfactant protein A to ozone in vitro and in vivo impairs its interactions with alveolar cells. *Am J Physiol.* **1992** 262: L63-L68.

Painter RB. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat Res.* **1980** 70:337-341.

Palaniyar N, McCormack FX, Possmayer F, Harauz G. Three-dimensional structure of rat surfactant protein A trimers in association with phospholipid monolayers. *Biochemistry.* **2000** 39:6310-6316.

Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997** 232(1):164-168.

Paola R, Mazzon E, Muia C, Genovese T, Menegazzi M, Zaffini R, Suzuki H, Cuzzocrea S. Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. *Respir Res.* **2005** 6:66-78.

Paper DH. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med.* **1998** 64:686-695.

Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun.* **2002** 296:631–636

- Paz MM, Kumar GS, Glover M, Waring MJ, Tomasz M. Mitomycin dimers: polyfunctional cross-linkers of DNA. *J Med Chem.* **2004** 47:3308-3319.
- Penketh PG, Hodnick WF, Belcourt MF, Shyam K, Sherman DH, Sartorelli AC. Inhibition of DNA cross-linking by mitomycin C by peroxidase-mediated oxidation of mitomycin C hydroquinone. *J Biol Chem.* **2001** 276:34445-34452.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature.* **1974** 251:156-158.
- Phelps DS, Taeusch HW, Jr Benson B, Hawgood S. An electrophoretic and immunochemical characterization of human surfactant-associated proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1984** 791:226-238.
- Phelps DS. Surfactant regulation of host defense function in the lung: a question of balance. *Pediatr Pathol Mol Med.* **2001** 20:269-272.
- Pignatelli B, Friesen M, Walker EA. The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation. *IARC Sci Publ.* **1980** 31:95-109.
- Piwocka K, Zablocki K, Wieckowski MR, Skierski J, Feiga I, Szopa J, Drela N, Wojtczak L, Sikora E. A novel apoptosis-like pathway, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp Cell Res.* **1999** 249:299-307.
- Powis G, Briehl M and Oblong J. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacology and Therapeutics.* **1995** 68:149-173
- Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* **1988** 48:4776-4782.
- Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med.* **1994** 17:451-465.
- Putman E, van Golde, LM, Haagsman HP. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung.* **1997** 175:75-103.
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G. Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food composition survey. *Z Ernahrungswiss.* **1998** 37:190-197.
- Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis.* **1989** 10:1833-1839.
- Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol.* **2002** 40:1213-1232.
- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat

- colon tumor development. *Cancer Res.* **1987** 47:5340-5346.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* **2000** 130:2109S–2114S.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev.* **2003** 23:519-534.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **1992** 339:1523- 1526.
- Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology.* **1998** 9:184-188.
- Rice-Evans AC, Miller JN, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* **1996** 20:933-956.
- Richard T, Vitrac X, Merillon JM, Monti JP. Role of peptide primary sequence in polyphenol-protein recognition : An example with neurotensin. *Biochim Biophys Acta.* **2005** 1726:238-243.
- Riedl, KM, Hagerman AE. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks. *J Agric Food Chem.* **2001** 49:4917-4923.
- Robak J, Shridi F, Wolbis M, Krolikowska M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm.* **1988** 40:451-458.
- Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* **2003** 51(10):2866-2887.
- Rodriguez M. Mapping of Cu/H₂O₂-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem.* **1995** 270:17633-7640.
- Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agri Food Chem.* **1998** 46:1460-1464.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* **2002** 177:67-80.
- Samet JM, Hatch GE, Horstman D, Steck-Scott S, Arab L, Bromberg PA, Levine M, McDonnell WF, Devlin RB. Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* **2001** 164:819-825.
- Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antioxid Redox Signal.* **2005** 7:1704-1714.

- Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub MP. Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin. *Arch Biochem Biophys.* **1990** 283:107-113.
- Santana-Rios G, Orner GA, Amantana A, Provost C, Wu SY, Dashwood RH. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutat Res.* **2001** 495: 61-74.
- Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric.* **2000** 80:1094-117.
- Sasaki MS. Chromosome aberration formation and sister chromatid exchange in relation to DNA repair in human cells. *Basic Life Sci.* **1980** 15:285-313.
- Sasaki YF, Imanishi H, Ohta T, Shirasu Y. Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* **1989a** 226:103-110.
- Sasaki YF, Imanishi H, Ohta T, Watanabe M, Matsumoto K, Shirasu Y. Suppressing effect of tannic acid on the frequencies of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutat Res.* **1989b** 213:195-203.
- Sayer JM, Yagi H, Wood AW, Conney AH, Jerina DM. Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide and ellagic acid. *Am Chem Soc.* **1982** 104:5562-5564.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* **2000** 130:2073S-2085S.
- Scheline RR. CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds. CRC Press: Boca Raton, FL, **1991**.
- Schunemann HJ, McCann S, Grant BJ, Trevisan M, Muti P, Freudenheim JL. Lung function in relation to intake of carotenoids and other antioxidant vitamins in a population-based study. *Am J Epidemiol.* **2002** 155:463-471.
- Senderowicz AM. Flavopiridol: The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs.* **1999** 17:313-320
- Sestili P, Diamantini G, Bedini A, Cerioni L, Tommasini I, Tarzia G, 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.* **2002** 364:121-128.
- Shahidi F, Naczki M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, **1995**.

Shelley SA, Paciga JE, Paterson JF, Balis JU. Ozone-induced alterations of lamellar body lipid and protein during alveolar injury and repair. *Lipids*. **1989** 24:769-774.

Sies H. Oxidative stress. Oxidants and antioxidants. Academic Press: New York, **1991**.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med*. **1990** 43:334-344.

Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer*. **2004** 108:733-740.

Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JL, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids—a structure-activity relationship study. *Free Radic Res*. **2006** 40:433-442.

Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*. **2002** 11:1515-1520.

Sobhani AM, Ebrahimi SA, Mahmoudian M. An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *J Pharm Pharm Sci*. **2002** 5: 19-23.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*. **1997** 11:287-313.

Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol*. **1999** 19:5166-5169.

Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*. **1976** 36:2699-2702.

Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol*. **2003** 41:753-758.

Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci*. **2000** 899:191-208.

Steck-Scott S, Arab L, Craft NE, Samet JM. Plasma and lung macrophage responsiveness to carotenoid supplementation and ozone exposure in humans. *Eur J Clin Nutr*. **2004** 58:1571-1579.

Stubbe J, Kozarich JW, Wu W, Vanderwall DE. Bleomycins: A structural model for specificity. Binding and double strand cleavage. *Acc Chem Res*. **1996** 29:322-330.

Sugihara N, Kaneko A, Furuno K. Oxidation of flavonoids which promote DNA degradation induced by bleomycin-Fe Complex. *Biol Pharm Bull*. **2003** 26:1108-1114.

Sugihara N, Kaneko A, Furuno K. Synergistic effects of flavonoids and ascorbate on enhancement in DNA degradation induced by a bleomycin-Fe complex. *Free Radic Res.* **2005** 39:237-244.

Sun SY, Hail N, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Nat Cancer Inst.* **2004** 96:662-672.

Suter M, Richter C. Anti- and pro-oxidative properties of PADMA 28, a Tibetan herbal formulation. *Redox Rep.* **2000** 5:17-22.

Suzuki K, Yahara S, Hashimoto F, Uyeda M. Inhibitory activities of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate against topoisomerases I and II. *Biol Pharm Bull.* **2001** 24:1088-1090.

Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996** 93:1753-1758.

Takahashi K, Sekiguchi M, Kawazoe Y. Effects of vanillin and o-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in Escherichia coli. *Mutat Res.* **1990** 230:127-134.

Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K, Hara A, Sumida T, Tanaka T, Ogawa H. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis.* **1997** 18:957-965.

Taylor JH. The duplication of chromosomes. *Sci Am.* **1958** 198:36-42.

Teissedre PL, Landrault N. Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Res Int.* **2000** 33:461-467.

Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeiger E, Haseman JK, Spalding J, Caspary W, Resnick M, Stasiewicz S, Anderson B, et al. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science.* **1987** 236:933-941.

Thomas CE, Kalyanaraman B. Oxygen radicals and the disease process. Harwood Academic Publishers: Reading, UK, **1998**.

Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **1997** 37:771-785.

Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* **2000** 80:1073–1080.

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

Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J Agric Food Chem.* **2002** 50:7548-7555.

Trosko JE, Chang CC, Medcalf A. Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest.* **1983** 6:511-526.

Trosko JE, Chang CC. Stem cell theory of carcinogenesis. *Toxicol Lett.* **1989** 49:283-295.

Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV. Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta.* **1994** 1205:325-335.

Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res.* **1991** 64:91-100.

Uenobe F, Nakamura S, Miyazawa M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat Res.* **1997** 373:197-200.

Umstead TM, Phelps DS, Wang G, Floros J, Tarkington BK. In vitro exposure of proteins to ozone. *Toxic Mech Methods.* **2002** 12:1-16.

Undeger U, Aydin S, Basaran AA, Basaran N. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicol Lett.* **2004** 151:143-149.

Uppu RM, Cuento R, Squadrito GL, Pryor WA. What does ozone react with at the air/lung interface? Model studies using human red blood cell membranes. *Arch Biochem Biophys.* **1995** 319:257-266.

van Acker ABE, van den Berg DJ, Tromp M, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med.* **1996** 20:331-342.

van der Hoeven JC, Bruggeman IM, Debets FM. Genotoxicity of quercetin in cultured mammalian cells. *Mutat Res.* **1984** 136:9-21.

Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde, LM. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1990** 2:91-98.

Vazquez LG, Umstead TM, Davis SE, Phelps DS. Surfactant protein A increases matrix metalloproteinase-9 production by THP-1 cells. *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* **2003** 285:L899-L906.

Verweij J, den Hartigh J, Pinedo HM. Anticancer antibiotics. In: Cancer chemotherapy principles and practice. Chabner B, Collins JM eds. JB Lippincott Company: Philadelphia, USA, **1990**.

Vrijssen R, Michotte Y, Boeye A. Metabolic activation of quercetin mutagenicity. *Mutat*

Res. **1990** 232:243–248.

Waffo-Teguo P, Hawthorne ME, Cuendet M, Merillon JM, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Mehta RG. Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutr Cancer.* **2001** 40:173-179.

Wainfan E, Dizik M. Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver tRNA methyltransferase activities in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis.* **1987** 8:615-617.

Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res.* **1992** 52:2071s-2077s.

Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al-Mondhiry H, Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect.* **2002** 110:79-84.

Wang HK. Flavopiridol. National Cancer Institute. *Curr Opin Investig Drugs.* **2001** 2:1149-55.

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer.* **1999** 35:1517-1525.

Wang J, Eltoun IE, Lamartiniere CA. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett.* **2002** 186:11–8.

Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* **1996** 65:635-692.

Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **1985** 45:1-8.

Weiss RB, Greene RF, Knight RD, Collins JM, Pelosi JJ, Sulkes A, Curt GA. Phase I and clinical pharmacology study of intravenous flavone acetic acid (NSC 347512). *Cancer Res.* **1988** 48:5878-5882.

Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *BMJ.* **1995** 311:1657-1660.

Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP, Stossel TP. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J Clin Invest.* **1985** 75:1835-1841.

Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* **2002** 296:695-698.

Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res.* **2005** 582:155-162.

Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* **1995** 93:113-120.

- Yamagishi M, Osakabe N, Natsume N, Adachi T, Takizawa T, Kumon H, Osawa T. Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effects of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. *Food Chem Toxic.* **2001** 39:1279-1283.
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003** 307:230-236.
- Yamanaka N, Oda O, Nagao S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.* **1997** 405:186-190.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* **2001** 21:381-406.
- Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ, Bagchi D. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem.* **1999** 196:99-108.
- Yoshida D, Ikeda Y, Nakazawa S. Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selected human brain tumors. *J Neurooncol.* **1993** 16:109-15.
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* **1999** 68:468-472.
- Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis.* **1997** 18:451-456.
- Zakharov AF, Egolina NA. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma.* **1972** 38:341-365.
- Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis.* **1991** 12:2109-2114.
- Zhang K, Das NP. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione transferases. *Biochem Pharmacol.* **1994** 47:2063-2068.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1992** 89:2399-2403.
- Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion

protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*. **1999** 20:1737-1745.

U. S. Environmental Protection Agency. National ambient air quality standards for ozone, Final Rule. *Federal Register* **1997** 62:138.