

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ

Τίτλος διδακτορικής διατριβής: «Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα και φυτικές πολυφαινόλες από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*)»

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:
Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής (Επιβλέπων)
Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής
Σταθόπουλος Κων/νος, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικών και υδατικών) και πολυφαινολικών κλασμάτων 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, φερούλικό 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 πολυφαινολών 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 δόσοεξαρτώμενα 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.