

Μελέτη βιολογικής δράσης σε
ουσίες που περιέχονται σε
εκχυλίσματα από ελληνικές
ποικιλίες σταφυλιών

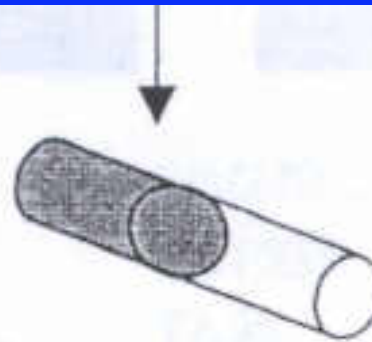
Αντιμεταλλαξιγόνο δράση

- ανίχνευση ουσιών που προστατεύουν το DNA από μεταλλαξιγόνα που προκαλούν μεταλλάξεις μέσω οξειδωτικών μηχανισμών
- βλάβες στο DNA που προκαλούνται από οξειδωτικές ουσίες ευθύνονται για διάφορες ασθένειες (καρκίνο, επιτάχυνση της γήρανσης, νευροεκφυλιστικές ασθένειες κ.α.)
- τεστ του Ames
- χρωματιδιακές ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων (sister chromatid exchanges)

Τεστ του Ames

- στηρίζεται στη χρήση βακτηρίων *Salmonella typhimurium* που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη
- χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων και αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών
- προσθήκη μεταλλαξιγόνου ουσίας στο θρεπτικό υλικό προκαλεί επαναμεταλλάξεις με αποτέλεσμα τα βακτήρια να αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που δεν έχει ιστιδίνη
- ταυτόχρονη προσθήκη της αντιμεταλλαξιγόνου ουσίας και μεταλλαξιγόνου ουσίας μειώνει τον αριθμό των αποικιών που δίνει η μεταλλαξιγόνος ουσία

2 ml molten top agar
with biotin and trace of histidine



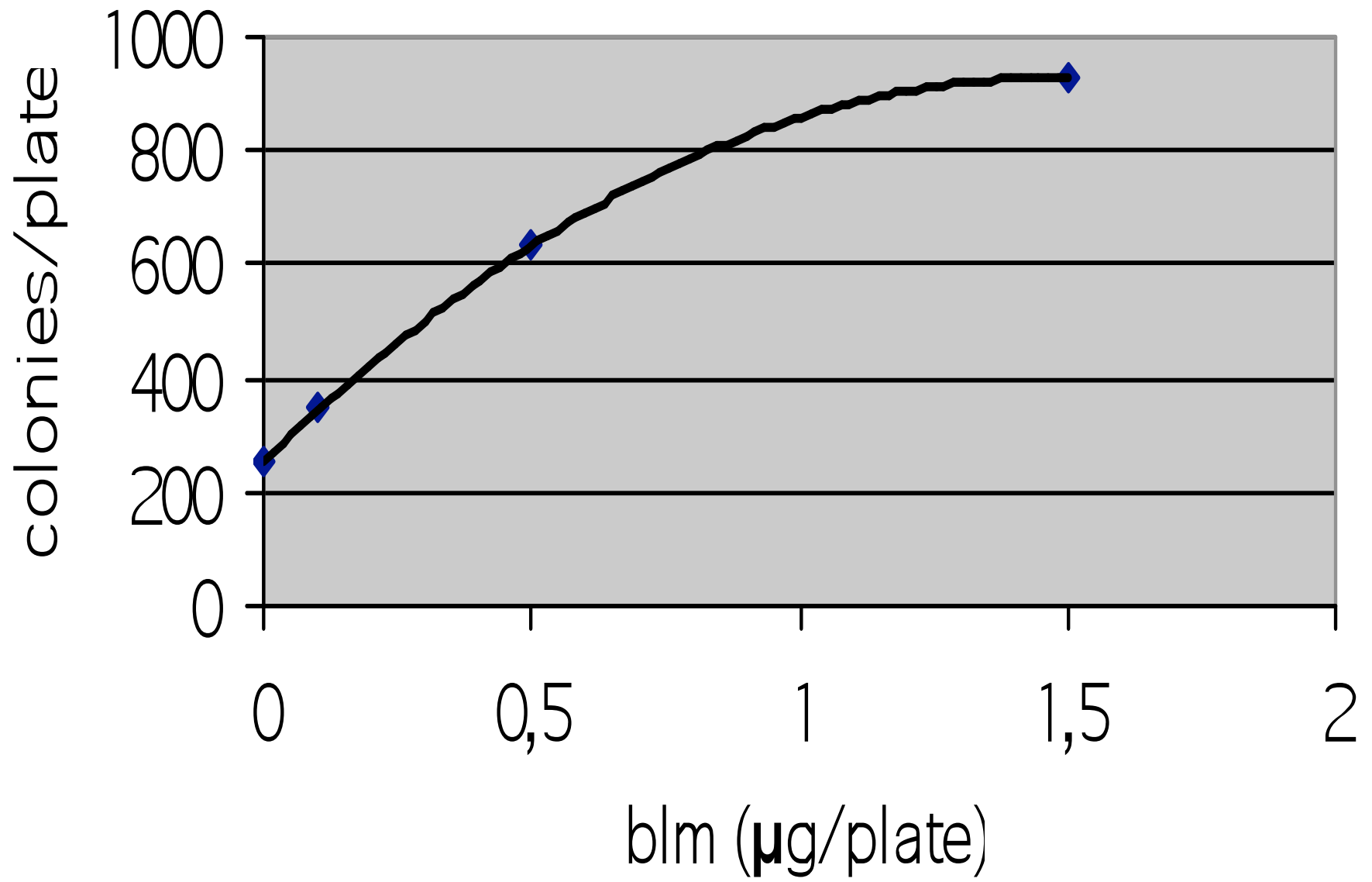
glucose minimal agar



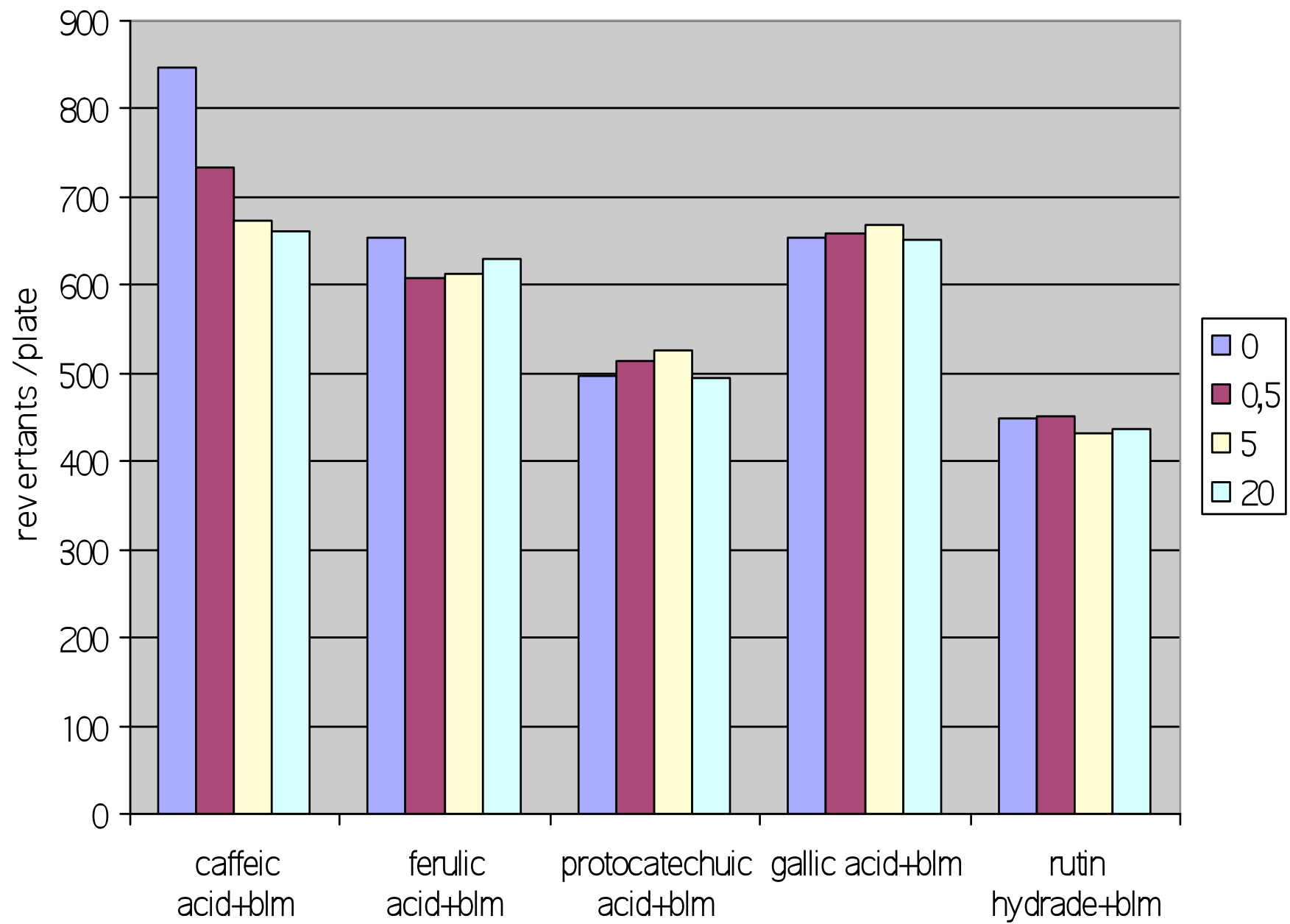
37° C for 48 hr

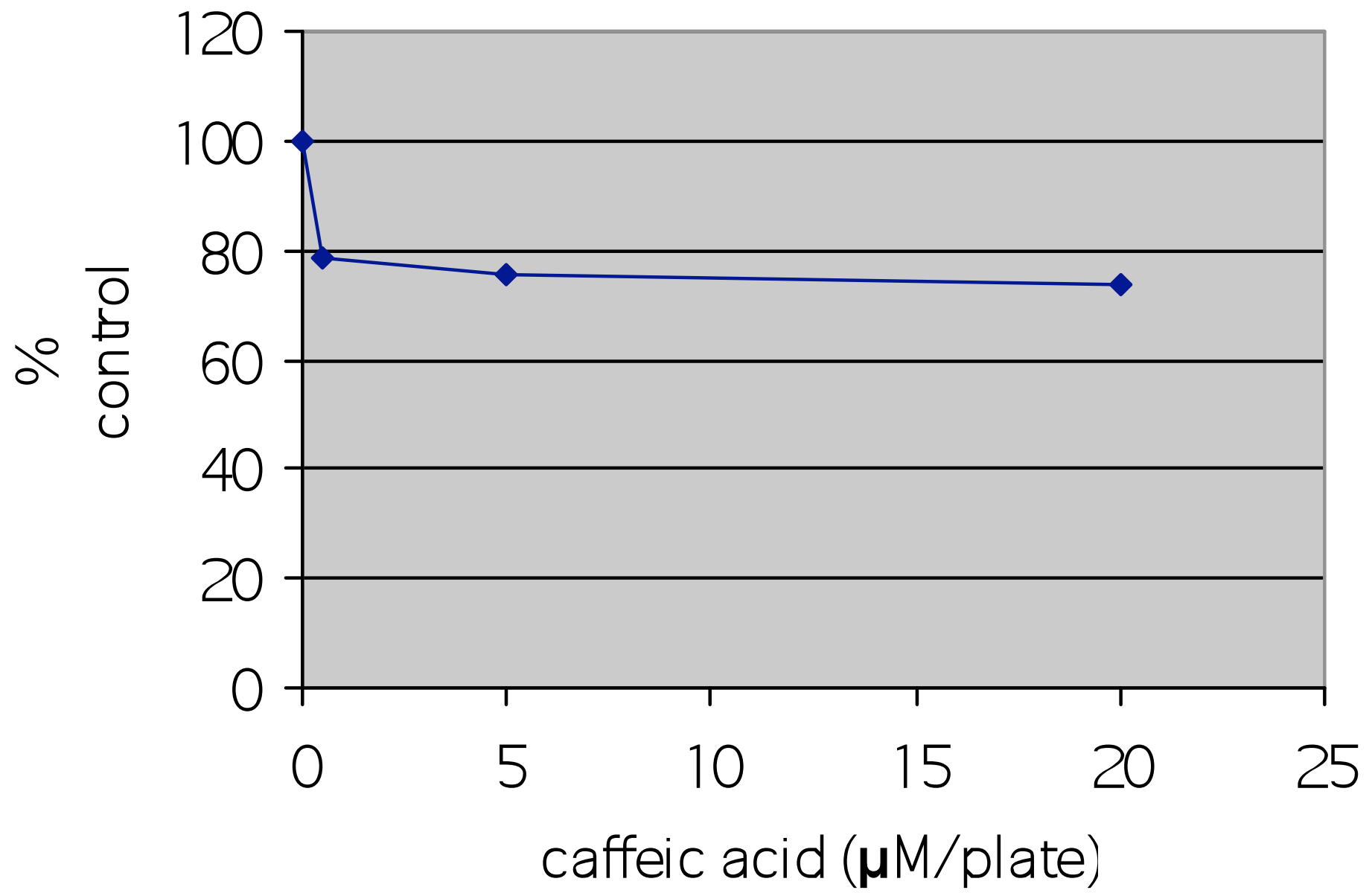
count number of revertant
histidine-independent colonies

- *Salmonella typhimurium* TA 102 (προκαλούνται μεταλλάξεις από ουσίες που δρουν μέσω οξειδωτικών μηχανισμών)
- μεταλλαξιγόνο ουσία bleomycin (γλυκοπεπτίδιο, απομονώθηκε από το *Streptomyces verticillus*, αντικαρκινικό φάρμακο)
- δράση της bleomycin (παρουσία ιόντων Fe^{++} ενεργοποιεί το $O_2 \rightarrow$ ρίζες οξυγόνου \rightarrow προκαλούν μεταλλάξεις)



- πολυφαινολικά οξέα που περιέχονται στα σταφύλια (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ)
- φλαβονοειδές, ρουτίνη





Χρωματιδικές ανταλλαγές (sister chromatid exchanges)

- Χρωματιδικές ανταλλαγές είναι η ανταλλαγή ομόλογων χρωμοσωμικών τμημάτων ανάμεσα σε δύο αδελφές χρωματίδες
- φυσιολογικό φαινόμενο, συμβαίνει κατά τον διπλασιασμό του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου
- ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI, proliferation rate index)

Εφαρμογές χρωματιδιακών ανταλλαγών

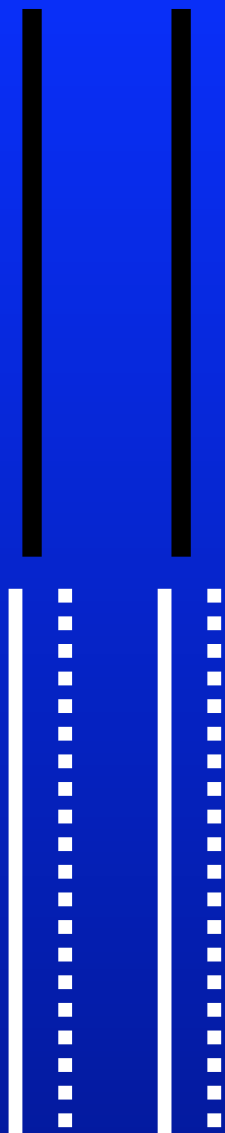
- εντοπισμό μεταλλαξιγόνων - καρκινογόνων ουσιών
- προσθήκη μιας μεταλλαξιγόνου ουσίας στην καλλιέργεια των κυττάρων αυξάνει τον αριθμό των ανταλλαγών
- εντοπισμό αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών
- προσθήκη μεταλλαξιγόνου + αντιμεταλλαξιγόνου ουσίας μειώνει τον αριθμό των ανταλλαγών που προκαλεί η μεταλλαξιγόνος ουσία

Μέθοδος

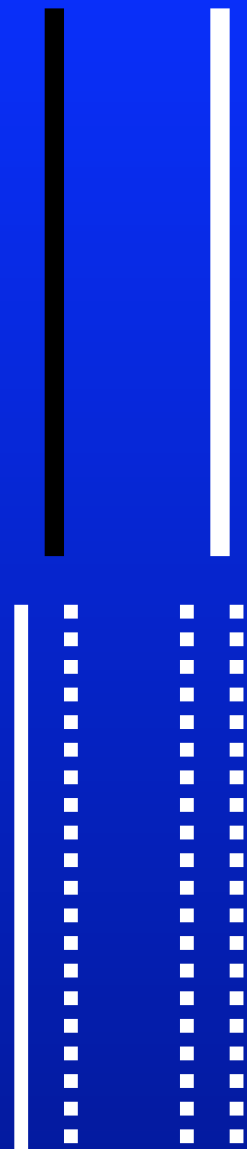
- 10 σταγ. αίμα, καλλιεργητικό υλικό RPMI(4ml), fetal bovine serum(0,8ml), φυτοαιμογλουτινίνη (0,1ml)
- βρωμοδεοξουριδίνη Brdu (χημικό ανάλογο της θυμιδίνης)
- επώαση 37⁰ C, 72 ώρες
- προσθήκη κολχικίνης στις 70 ώρες
- απομόνωση χρωμοσωμάτων, στερεοποίηση σε αντικειμενοφόρους
- χρώση των χρωμοσωμάτων (Hoechst 33258, υπερ. φως, Giemsa)
- παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο

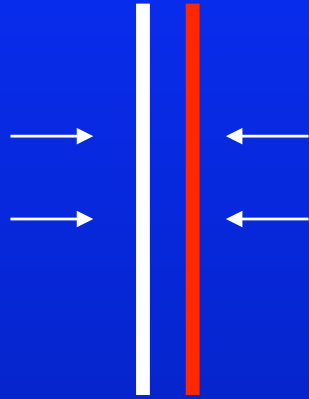


1η



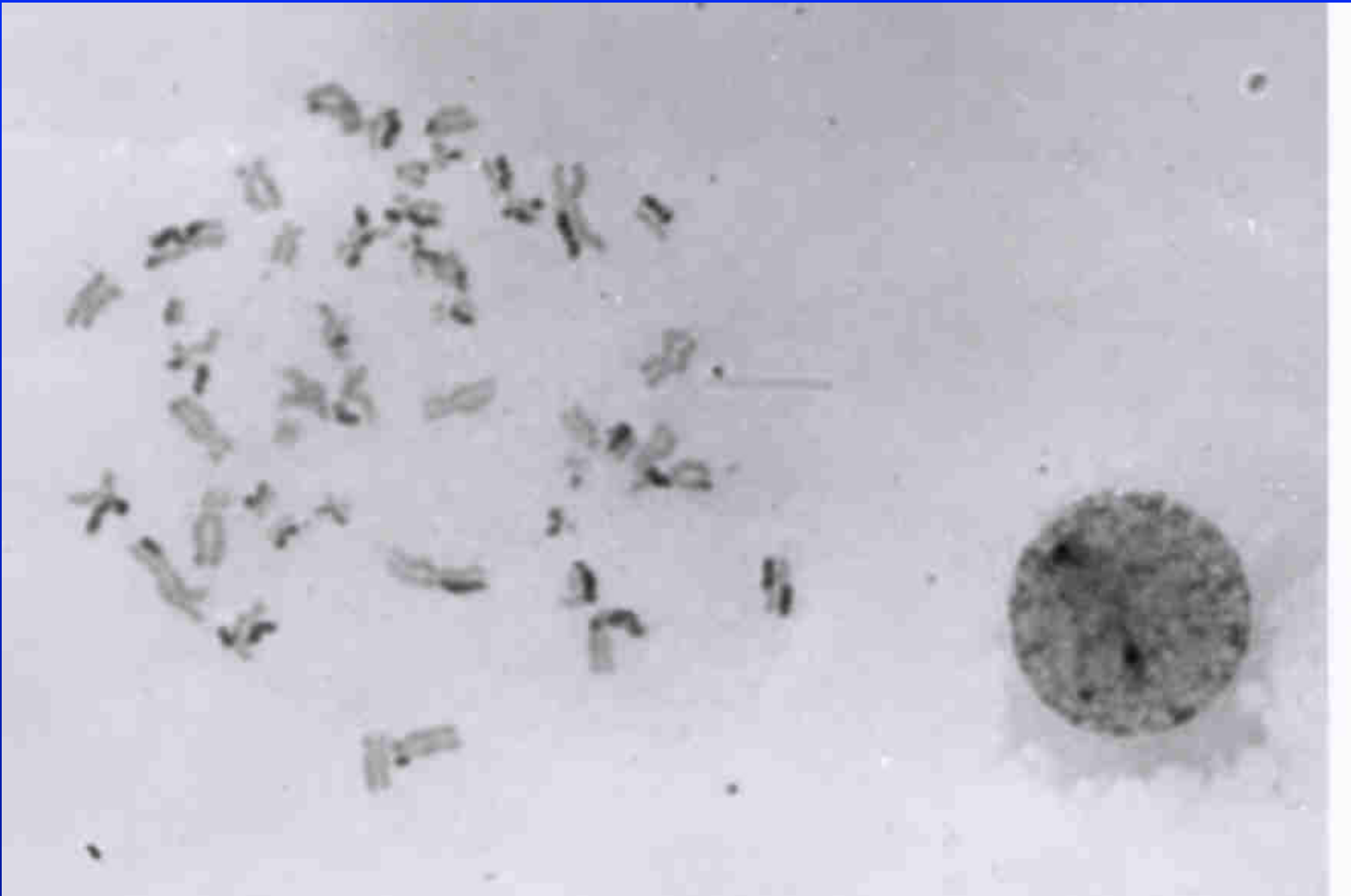
2η





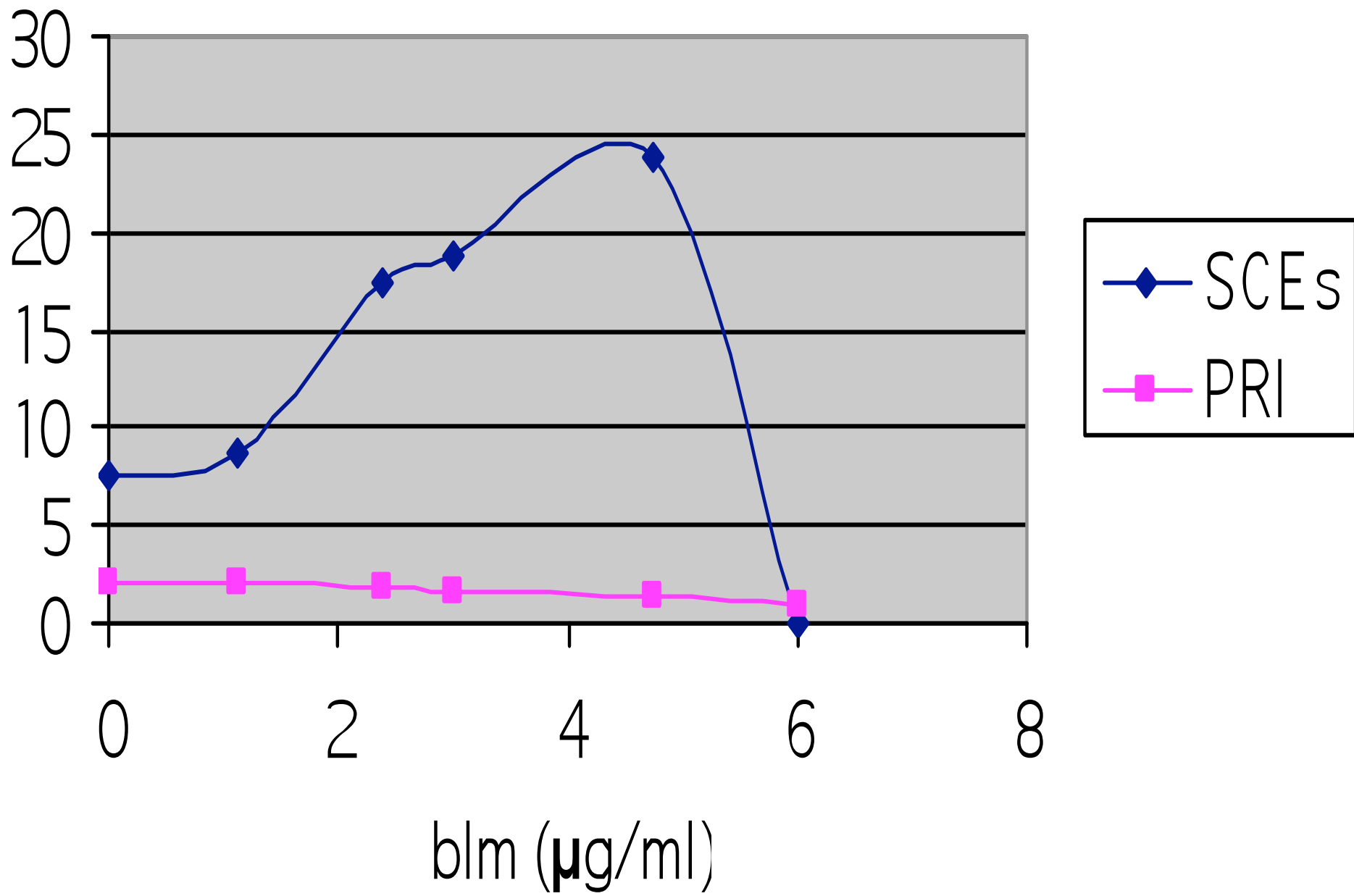






- μετράμε τις ανταλλαγές σε 30 κύτταρα και υπολογίζουμε τον μέσο όρο
- υπολογισμός PRI, στα 100 κύτταρα πόσα είναι στην 1η, 2η, 3η μιτωτική διαίρεση

$$PRI=(M_1+2M_2+3M_3)/100$$



Αντικαρκινική δράση

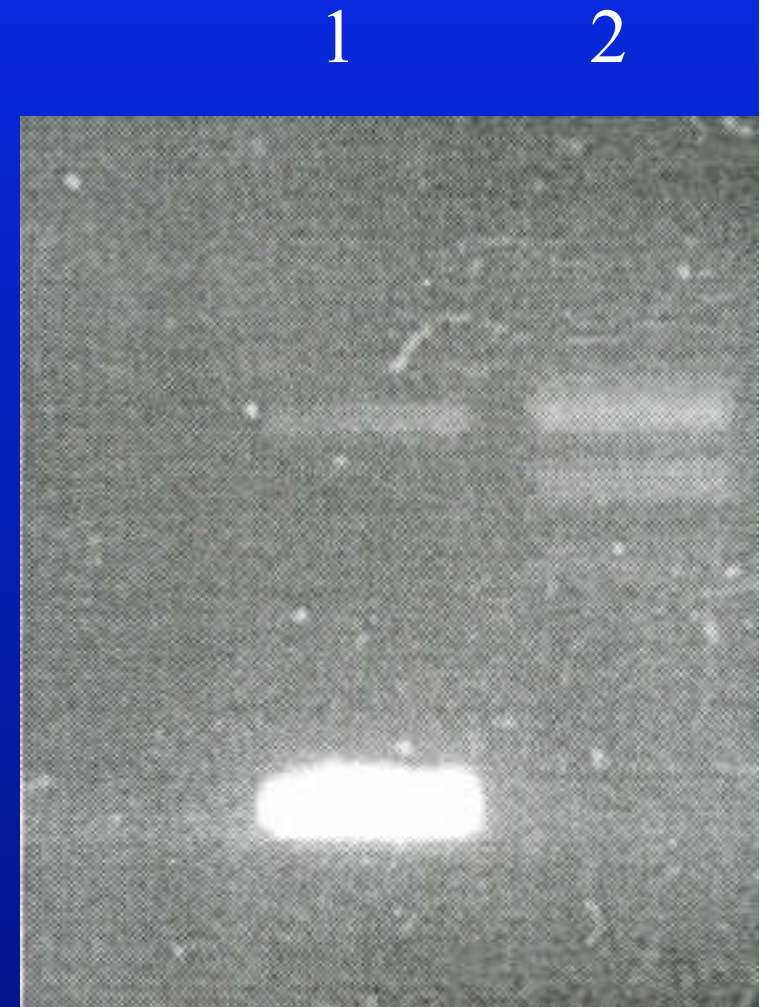
- ανίχνευση ουσιών που αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που έχουν αυξημένη λειτουργία κατά την καρκινογένεση

Ενζυμικός προσδιορισμός τοποϊσομεράσης

- επώαση τοποϊσομεράσης
παρουσία υπερελικωμένου
πλασμιδίου
- ηλεκτροφόρηση σε πηκτή
αγαρόζης 1%

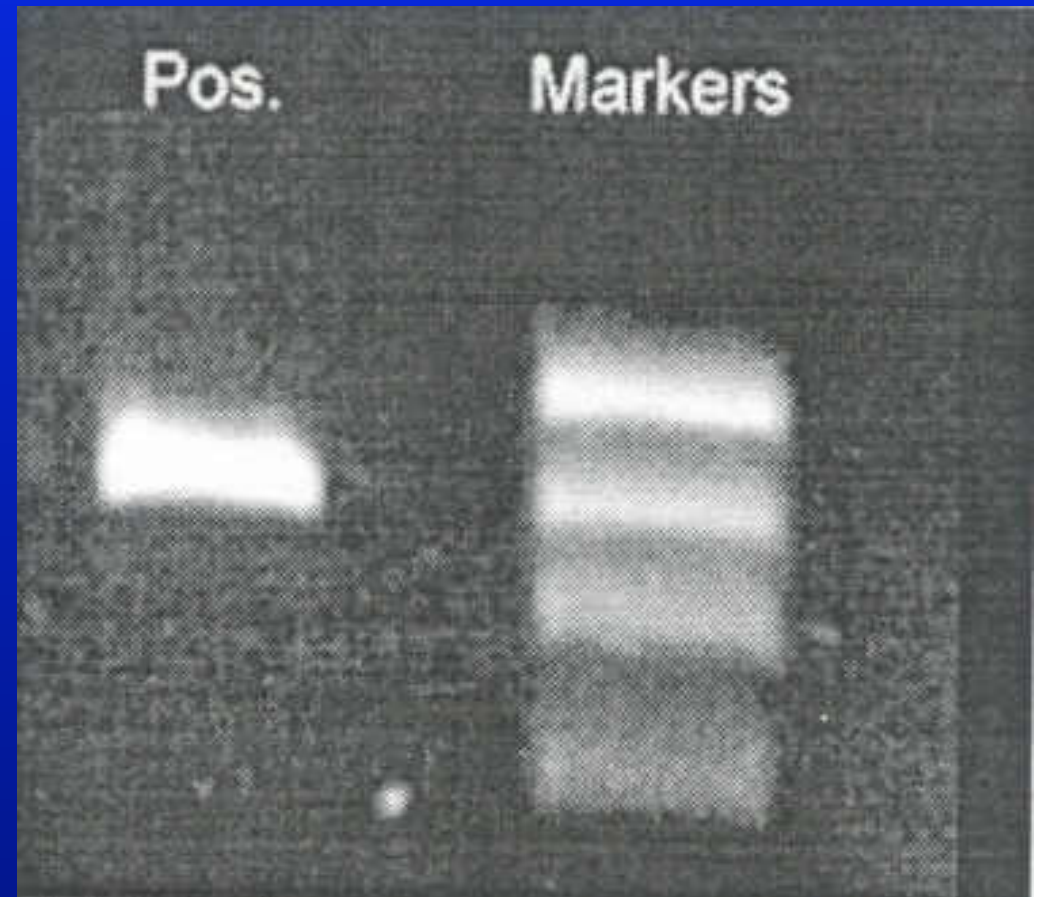
Form I

Form II



DNA πολυμεράση

- αντίδραση PCR σε ανθρώπινο DNA



Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC)

- ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση των πολυαμινών (μετατρέπει την ορνιθίνη σε πουτρεσκίνη)
- απαραίτητο για την κυτταρική ανάπτυξη & διαφοροποίηση
- συμμετέχει στη διαδικασία της καρκινογένεσης
- καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλά επίπεδα ODC
- προσδιορίζουμε με μετρητή υγρού σπινθηρισμού το ραδιενεργό CO_2 που απελευθερώνεται από ραδιενεργά σημασμένη ορνιθίνη

Μελέτη οιστρογονικής δράσης

- ανίχνευση ουσιών με οιστρογονική δράση (φυτοοιστρογόνα)
- διαγονιδιακά ψάρια (zebrafish)
- ένωση του γονιδίου βιτελλογενίνη (ορμονοεξαρτώμενο) με ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μια φθορίζουσα πρωτεΐνη
- μια ουσία με οιστρογονική δράση θα προκαλέσει φθορισμό του ψαριού

