

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



Διπλωματική Εργασία

***Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων ψυχανθών στη
δραστικότητα της καταλάσης με το υπεροξείδιο του
υδρογόνου ως υπόστρωμα***

Κανάκη Μαρία



Λάρισα 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

*Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων ψυχανθών στη
δραστικότητα της καταλάσης με το υπεροξείδιο του
υδρογόνου ως υπόστρωμα*

Κανάκη Μαρία



Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7872/1
Ημερ. Εισ.: 03-12-2009
Δωρεά: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087141

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτρης, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων (Επιβλέπων)

Στάγκος Δημήτρης, Διδάσκων ΠΔ 407/80

Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορας

Φαρμακολογίας




Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πρωτίστως για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασία καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις, καθώς και για την κατανόηση σε ότι προέκυψε κατά την διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Χρύσα Σπανού και Άρη Βεσκούκη για την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά τους τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
Συντομογραφίες.....	6
Περίληψη.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Ψυχανθή.....	8
1.1.1. Σημασία των ψυχανθών στη διατροφή.....	9
1.2. Πολυφαινόλες.....	10
1.2.1. Φλαβονοειδή.....	11
1.2.2. Φαινολικά οξέα	14
1.2.3. Λιγνάνια.....	14
1.2.4. Στιλβένια.....	15
1.3. Ελεύθερες ρίζες.....	16
1.3.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	16
1.3.1.1. Ενδογενείς πηγές.....	16
1.3.1.2. Εξωγενείς πηγές.....	19
1.3.2. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.....	19
1.3.2.1. Θετικές επιδράσεις.....	19
1.3.2.2. Αρνητικές επιδράσεις.....	19
1.4. Οξειδωτικό στρες.....	20
1.5. Αντιοξειδωτικά.....	21
1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	21
1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	22
1.6. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών.....	25
1.7. Προοξειδωτική δράση πολυφαινολών.....	26
1.8. Καταλάση.....	26
1.8.1. Γενικές πληροφορίες και πρωτεϊνική δομή.....	26
1.8.2. Μηχανισμός δράσης της καταλάσης.....	27
1.8.3. Υπεροξείδιο του υδρογόνου.....	28
1.8.4. Αναστολείς της καταλάσης.....	29
1.9. Ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας <i>Leguminosae</i>	29
1.10. Σκοπός του πειράματος.....	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35

2.1 Υλικά.....	35
2.1.1. Εκχυλίσματα.....	35
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια.....	35
2.2. Μέθοδοι.....	36
2.2.1. Αρχή της μεθόδου.....	36
2.2.2. Προετοιμασία αιμολύματος.....	36
2.2.2. Πειραματική διαδικασία.....	36
2.2.3.1. Προσδιορισμός του υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό.....	36
2.2.3.2. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων στην δραστικότητα της καταλάσης.....	38
2.2.4. Υπολογισμοί.....	39
2.2.5. Στατιστική ανάλυση.....	39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
3.1. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της καταλάσης.....	40
3.2. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στην δραστικότητα της καταλάσης.....	41
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Άνθος ψυχανθούς

Εικόνα 2: Φυμάτια ψυχανθών

Εικόνα 3: Διάφορα όσπρια που καταναλώνονται παγκοσμίως

Εικόνα 4: Πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής

Εικόνα 5: Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών

Εικόνα 6: Χημική δομή φλαβονοειδών

Εικόνα 7: Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων

Εικόνα 8: Χημική δομή των φυτικών λιγνανίων

Εικόνα 9: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης

Εικόνα 10: Ενδογενείς πηγές ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

Εικόνα 11: Εξωγενείς κι ενδογενείς πηγές ROS

Εικόνα 12: Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Εικόνα 13: Αντίδραση αντιοξειδωτικού μορίου με ελεύθερη ρίζα

Εικόνα 14: Χημική δομή του β-καροτένιου.

Εικόνα 15: Η δομή της καταλάσης

Εικόνα 16: Μονοπάτια παραγωγής ROS και εξουδετέρωσής τους από αντιοξειδωτικά ένζυμα

Εικόνα 17: Συμμετοχή των αντιοξειδωτικών ενζύμων στην εξουδετέρωση των ROS

Εικόνα 18: *Phaseolus vulgaris*, πόα και σπέρματα

Εικόνα 19: *Vicia faba*, πόα και σπέρματα

Εικόνα 20: *Lathyrus laxiflorus*, πόα

Εικόνα 21: *Vicia tenuifolia*, πόα και καρποί

Εικόνα 22: *Lens culinaris*, σπέρματα και πόα

Εικόνα 23: *Lupinus albus*, σπέρματα και πόα

Εικόνα 24: *Lotus edulis*, πόα και καρποί

Εικόνα 25: *Lotus longisiliquosus*, πόα

Εικόνα 26: *Tetragonolobus purpureus*, πόα και καρποί

Εικόνα 27: *Lathyrus sativus*, πόα

Εικόνα 28: *Lathyrus clymenum*, σπέρματα και πόα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατηγορίες πολυφαινολών

Πίνακας 2: Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα

Πίνακας 3: Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

Πίνακας 4: Ποσότητες που προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης

Πίνακας 5: Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της καταλάσης

Πίνακας 6: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της καταλάσης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη ταχύτητας ενζύμου και συγκέντρωσης υποστρώματος

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NO[•]: ρίζα μονοξειδίου του αζώτου

O₂^{•-}: ανιόν σουπεροξειδίου

OH[•]: ρίζα υδροξυλίου

RO[•]: ρίζα αλκοξυλίου

ROO[•]: ρίζα περοξυλίου

ROS/RNS: reactive oxygen species/reactive nitrogen species (δραστικές μορφές οξυγόνου/δραστικές μορφές αζώτου)

CAT: καταλάση

SOD: υπεροξειδική δισμουτάση

GPx: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη

PP[•]: φαινολική ρίζα

PPH: πολυφαινόλη

Περίληψη

Οι καρποί των ψυχανθών, τα όσπρια, καταναλώνονται ευρέως και αποτελούν βασικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής. Τα όσπρια είναι εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών, αμύλου και ιχνοστοιχείων ενώ περιέχουν σημαντικές ποσότητες φυτοχημικών ουσιών. Η σημαντικότερη κατηγορία φυτοχημικών ουσιών είναι οι πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν ως αντιοξειδωτικά. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*. Σε προηγούμενες εργασίες βρέθηκε ότι αυτά τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, ωστόσο η επίδρασή τους στη δραστηριότητα της καταλάσης δεν έχει μελετηθεί. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων στη δραστηριότητα της καταλάσης, ενός ενζύμου που καταλύει τη διάσπαση και αδρανοποίηση του, επιβλαβούς για τα βιομόρια, υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συνολικά, μελετήθηκαν 18 υδατικά και 18 μεθανολικά εκχυλίσματα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ορισμένα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δραστηριότητα της καταλάσης. Τα εκχυλίσματα αυτά θεωρούνται αντιοξειδωτικά λόγω των περιεχόμενων πολυφαινολικών ενώσεων. Παρόλα αυτά η ανασταλτική δράση που επέδειξαν στην καταλάση τα καθιστά πιθανά προαντιοξειδωτικά μόρια καθώς η καταλάση είναι ένας σημαντικός ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός του οργανισμού, που η δράση του εντείνεται κατά την άσκηση. Η δράση λοιπόν των αντιοξειδωτικών μορίων, ιδιαίτερα κατά τη χορήγησή τους πριν την άσκηση, δεν είναι πάντα η επιθυμητή και γι' αυτό η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή.

1. Εισαγωγή

1.1. Ψυχανθή

Τα ψυχανθή (legumes), εντάσσονται στην οικογένεια *Leguminosae* και περιλαμβάνουν περισσότερα από 18.000 είδη. Αποτελούν μια από τις τρεις μεγαλύτερες τάξεις των αγγειόσπερμων φυτών. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό γνώρισμα τους είναι ο καρπός των μελών της καθώς και η χαρακτηριστική μορφολογία των ανθών τους.



Εικόνα 1: Άνθος ψυχανθούς

Τα ψυχανθή έχουν στις ρίζες τους σφαιρικά εξογκώματα, τα φυμάτια, ειδικά όργανα του φυτού μέσα στα οποία κατοικούν συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Τα φυμάτια διαχωρίζονται από το φυτικό κυτόπλασμα με μεμβράνες προερχόμενες από την πλασματική μεμβράνη του φυτού. Ο σχηματισμός των φυματίων επάγεται από τα ίδια τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Τσέκου, 2004). Κατά τη συμβίωση τα βακτήρια προσλαμβάνουν το ατμοσφαιρικό άζωτο, το οποίο τα φυτά δεν είναι ικανά να προσλαμβάνουν από την ατμόσφαιρα, κι έτσι τροφοδοτούν το φυτό με αζωτούχες ενώσεις απαραίτητες για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών του. Από την άλλη, το φυτό τροφοδοτεί τα βακτήρια με οργανικές ενώσεις που παράγονται με τη φωτοσύνθεση.



Εικόνα 2: Φυμάτια ψυχανθών

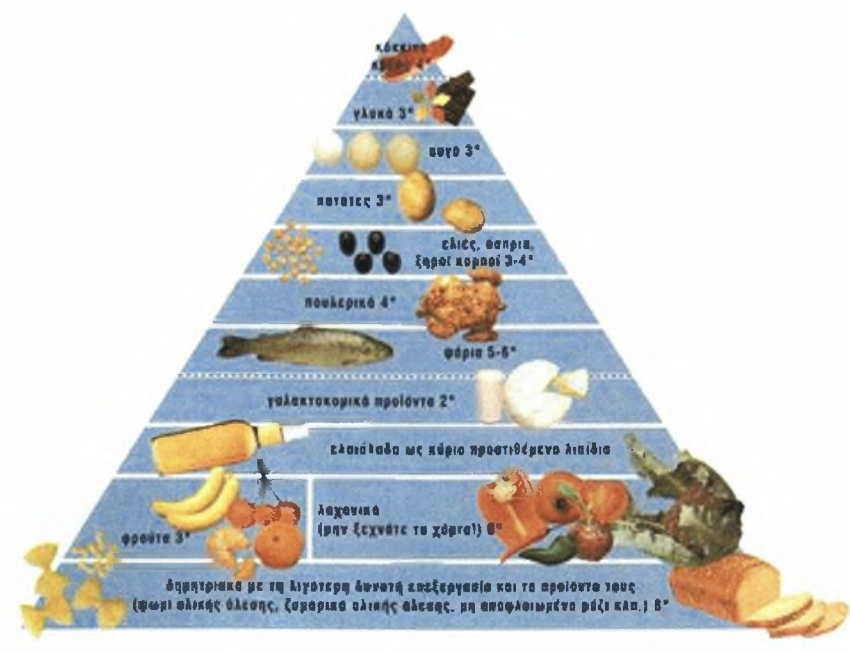
1.1.1. Σημασία των ψυχανθών στη διατροφή

Οι καρποί των ψυχανθών, όπως τα μπιζέλια, τα φιστίκια και τα φασόλια, είναι εδώδιμοι. Οι καρποί αυτοί θεωρούνται αναπόσπαστο τμήμα της Μεσογειακής διατροφής. Είναι πολύ θρεπτικά καθώς αποτελούν σημαντική πηγή αμύλου, φυτικών ινών, ανόργανων στοιχείων, όπως Ca, Fe, K, Mg και Zn, βιταμινών καθώς και πρωτεϊνών (Guillon and Champ, 2002). Για το λόγο αυτό θεωρούνται συμπληρώματα πρωτεϊνών, ιδιαίτερα όταν υπάρχει έλλειψη κρέατος. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν βιοδραστικούς ρόλους, αποτελώντας πρόδρομους βιολογικά δραστικών πεπτιδίων συμμετέχοντας έτσι σε ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες (Marcello, 2006).



Εικόνα 3: Διάφορα όσπρια που καταναλώνονται παγκοσμίως

Επίσης, τα ψυχανθή διαθέτουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και απομακρύνουν την κακή χοληστερόλη (LDL) από το αίμα βελτιώνοντας την αναλογία HDL και LDL χοληστερόλης. Είναι παγκοσμίως αποδεκτό ότι τα ψυχανθή έχουν οφέλη σε πολλές ασθένειες όπως διαβήτη, παχυσαρκία, καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς και πολλοί τύποι καρκίνου. Επιπλέον, θεωρείται ότι τα ψυχανθή έχουν τόσο αντιοξειδωτικές όσο και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται σε κάποια από τα συστατικά τους, τις πολυφαινόλες (Spanou et al, 2007). Παρόλα αυτά, λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση εκχυλισμάτων ψυχανθών στο οξειδωτικό στρες και πιο συγκεκριμένα στα αντιοξειδωτικά ένζυμα του οργανισμού.



Εικόνα 4: Πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής

1.2. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που εντοπίζεται στα περισσότερα τρόφιμα της καθημερινής διατροφής και κυρίως στα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια, τα σταφύλια και το κρασί. Αποτελούν δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασης των φυτών σε περιβαλλοντικές πιέσεις, την προσβολή από παθογόνα και την υπεριώδη ακτινοβολία. Οι πολυφαινόλες θεωρούνται επίσης υπεύθυνες και για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach et al, 2004).

Όλες οι πολυφαινόλες έχουν έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο, ο οποίος φέρει τουλάχιστον μια υδροξυλική ομάδα συνδεδεμένη με άνθρακα ή δραστικά παράγωγα, όπως καρβοξυλικές ή μεθοξυλικές ομάδες καθώς επίσης κι άλλες δομές μη αρωματικού δακτυλίου. Στη φύση απαντώνται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι κυρίως γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και αραβινόζη. Ως προς τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης, 1994).

Ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν καθώς και τα δομικά στοιχεία που ενώνουν τον έναν δακτύλιο με τον

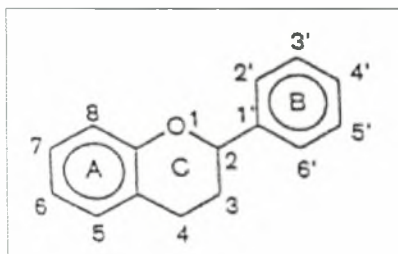
άλλο. Επίσης μπορούν να ενώνονται με υδατάνθρακες ή με οργανικά οξέα (Manach et al, 2004). Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή, τα οποία με τη σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα και τα στυλβένια.

Πίνακας 1: Κατηγορίες πολυφαινολών (Vermerris & Nicholson, 2006)

Structure	Class
C ₆	simple phenolics
C ₆ - C ₁	phenolic acids and related compounds
C ₆ - C ₂	acetophenones and phenylacetic acids
C ₆ - C ₃	cinnamic acids, cinnamyl aldehydes, cinnamyl alcohols
C ₆ - C ₃	coumarins, isocoumarins, and chromones
C ₁₅	chalcones, aurones, dihydrochalcones
C ₁₅	flavans
C ₁₅	flavones
C ₁₅	flavanones
C ₁₅	flavanonols
C ₁₅	anthocyanidins
C ₁₅	anthocyanins
C ₃₀	biflavonyls
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	benzophenones, xanthenes, stilbenes
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	quinones
C ₁₈	betacyanins
Lignans, neolignans	dimers or oligomers
Lignin	polymers
Tannins	oligomers or polymers
Phlobaphenes	polymers

1.2.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια από τις μεγαλύτερες ομάδες των φυτικών φαινολικών παραγώγων. Όπως και τα απλά φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή προέρχονται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη (Καράταγλης, 1994). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια γέφυρα που αποτελείται από τρεις άνθρακες (C6-C3-C6).

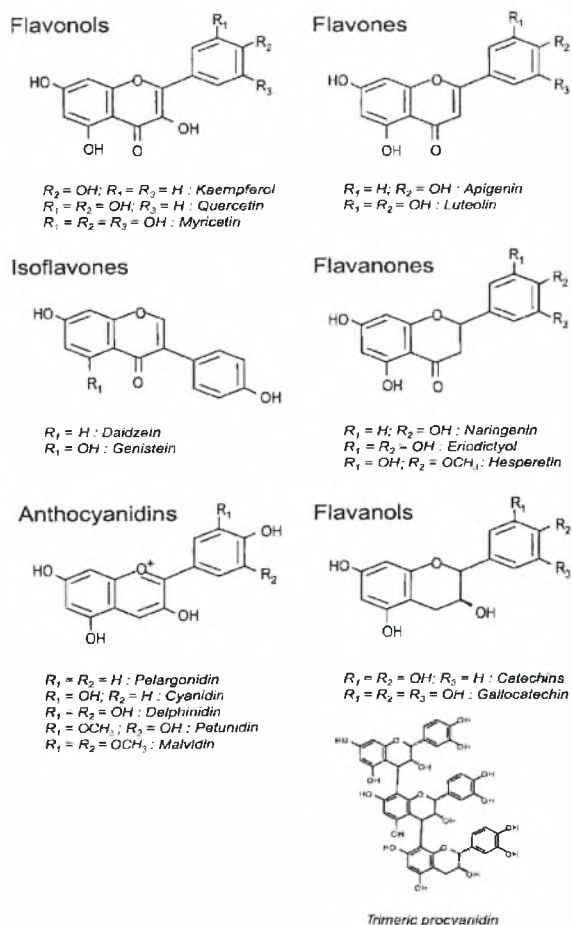


Εικόνα 5: Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών. A, B είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώ C είναι ο ανθρακικός πυρανικός δακτύλιος. (Van de Wiel et al, 2001)

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Οι υδροξυλικές ομάδες βρίσκονται συνήθως στις θέσεις 5, 7, 4', χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να βρεθούν και σε άλλες θέσεις. Τα περισσότερα φλαβονοειδή βρίσκονται στη φύση κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών. Τα σάκχαρα είναι συνήθως συνδεδεμένα με τις υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται στον Α δακτύλιο της δομής των φλαβονοειδών, ωστόσο πιο συχνά το σάκχαρο είναι συνδεδεμένο με την υδροξυλική ομάδα του άνθρακα που βρίσκεται στην θέση 3 της γέφυρας. Ανάλογα με το σάκχαρο που συμμετέχει διαφοροποιούνται και οι ιδιότητές τους (Καράταγλης, 1994).

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται στις εξής υποκατηγορίες :

a. **Φλαβονόλες:** Αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή, τα οποία ωστόσο βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στα φυτά. Η βιοσύνθεσή τους προάγεται από το ηλιακό φως και γι αυτό παράγονται κυρίως στο εξωτερικό τμήμα των φυτών (Καράταγλης, 1994). Ομοίως με τις φλαβόνες, προστατεύουν τα κύτταρα από την UV-B ακτινοβολία.



Εικόνα 6: Χημική δομή φλαβονοειδών (Manach et al, 2004)

- b. Φλαβόνες:** Είναι, συνήθως, γλυκοσυλιωμένα από ένα δισακχαρίδιο στη θέση 7 και είναι λιγότερο διαδεδομένες από τις φλαβονόλες. Αποτελούνται κυρίως από γλυκοσίδια λουτεολίνης και απιγενίνης. Η μόνη διαφορά τους από τις φλαβονόλες είναι η έλλειψη ενός –OH υποκαταστάτη στην 3-θέση. Εκκρίνονται από τις ρίζες των ψυχανθών στη ριζόσφαιρα, οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια των ριζικών τους φυματίων.
- c. Ισοφλαβόνες:** Διαθέτουν OH-ομάδες στις θέσεις 7 και 4' σε ανάλογη διαμόρφωση με αυτές που περιέχονται στην οιστραδιόλη κι εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Γι' αυτό το λόγο παρουσιάζουν ψευδο-ορμονικές ιδιότητες, έχοντας την ικανότητα να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων, χωρίς όμως να είναι στεροειδή. Είναι μόρια ευαίσθητα στη ζέστη κι υπάρχουν σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή. Διαφέρουν από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας που εμφανίζουν στη δομή τους, της μεγάλης συχνότητας υποκατάστασής τους και από το γεγονός ότι στο φυτό βρίσκονται σε ελεύθερη κατάσταση παρά ως γλυκοσίδια.
- d. Φλαβανόνες:** Είναι άχρωμες ενώσεις. Εμφανίζουν έλλειψη του διπλού δεσμού στη 2,3-θέση και είναι ισομερή με τις χαλκόνες, οι οποίες αποτελούν ενδιάμεσο πρόδρομο των περισσότερων φλαβονοειδών. Συνήθως είναι γλυκοσυλιωμένες με ένα δισακχαρίδιο στη θέση 7 (Manach et al, 2004).
- e. Ανθοκυανιδίνες:** Είναι η πιο διαδεδομένη ομάδα των φλαβονοειδών χρωστικών, υπεύθυνες για πολλά χρώματα στα φυτά. Είναι γλυκοζίτες που έχουν τα σάκχαρα συνήθως στη θέση 3 (Καράταγλης, 1994). Χωρίς τα σάκχαρα τους, οι ανθοκυανίνες είναι γνωστές ως ανθοκυανιδίνες. Η βιοσύνθεση των ανθοκυανινών επηρεάζεται από την παρουσία άμεσης ακτινοβολίας. Σε μερικά είδη φυτών η έλλειψη αζώτου, φωσφόρου ή θείου οδηγεί στη συσσώρευση ανθοκυανινών, ενώ σε άλλα είδη η βιοσύνθεσή τους αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες.
- f. Φλαβανόλες:** Υπάρχουν σε δύο μορφές: μονομερή μορφή (κατεχίνες) και πολυμερή μορφή (προανθοκυανιδίνες) και σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή δεν είναι γλυκοσυλιωμένες. Οι προανθοκυανιδίνες γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες είναι υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή, που αποτελούνται από μονομερή φλαβαν-3-όλης. Η οξειδωτική συμπίκνωση συμβαίνει μεταξύ του ατόμου C4 του ετεροδακτυλίου και των ατόμων C6 ή C8 των γειτονικών ενώσεων (Champ, 2002). Ανάλογα με τη χημική τους δομή και το βαθμό πολυμερισμού, οι προανθοκυανιδίνες μπορούν ή όχι να διαλυθούν σε

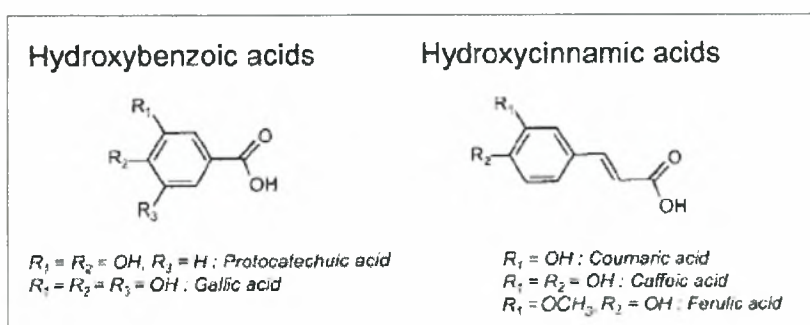
υδατικό οργανικό διαλύτη. Κατεργαζόμενες με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες.

1.2.2. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα έχουν απλούστερη μορφή από τα φλαβονοειδή. Αποτελούνται κι αυτά από ένα αρωματικό δακτύλιο και διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες.

1. **Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος:** όπως είναι το υδροξυβενζοϊκό οξύ (C6-C1), το οποίο είναι συστατικό πολύπλοκων δομών όπως είναι οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford and Scalbert, 2000). Βρίσκονται πιο συχνά σαν απλοί εστέρες με καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη και περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το σιριγγικό οξύ. Τα μόρια των υδατοδιαλυτών ταννινών είναι μικρότερα από αυτά των συμπυκνωμένων ταννινών και σε όζινες συνθήκες διαχωρίζονται σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα.
2. **Παράγωγα του κινναμικού οξέος:** όπως είναι το υδροξυκινναμικό οξύ (C6-C3), το οποίο είναι πιο κοινό από το υδροξυβενζοϊκό οξύ. Περιλαμβάνουν κυρίως το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Το μεγαλύτερο ποσοστό τους βρίσκεται στη φλούδα των φρούτων και των λαχανικών, αλλά υπάρχουν και στο υπόλοιπο φυτό.

Τα φαινολικά οξέα εμφανίζουν ποικίλες θετικές επιδράσεις καθώς έχει βρεθεί ότι έχουν αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, που οφείλονται στην εξουδετέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (Nishenametla et al, 2006).

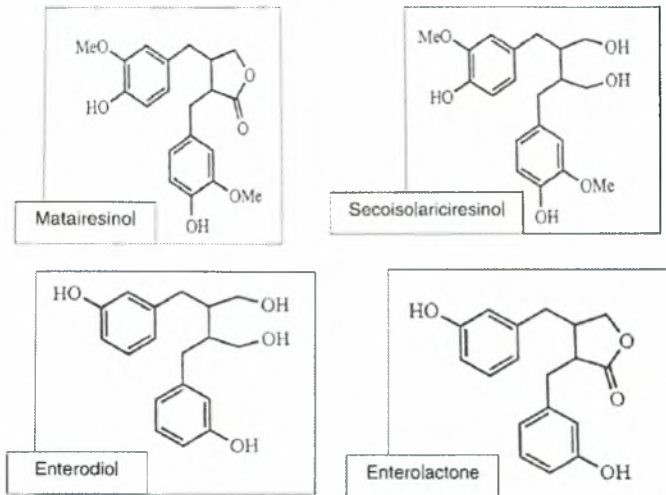


Εικόνα 7: Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων, υδροξυβενζοϊκά-υδροξυκινναμικά οξέα (Manach et al, 2004)

1.2.3. Λιγνάνια

Τα λιγνάνια σχηματίζονται από δύο μονάδες φαινυλοπροπανίου, γεγονός που τα κατατάσσει στην οικογένεια των ψευδο-ορμονών των φυτών, αφού η δομή τους μοιάζει με του οιστρογόνου (Manach et al, 2004). Τα φυτικά λιγνάνια μεταβολίζονται

από την εντερική μικροχλωρίδα σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη. Μία από τις πιο γνωστές δράσεις τους είναι η αναστολή της προκαλούμενης από ορμόνες καρκινογένεσης, αφού δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν κι αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webb and McCullough, 2005).

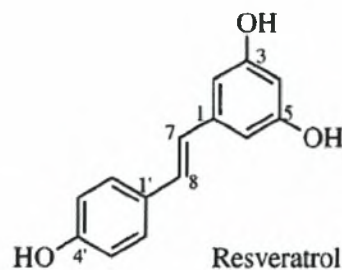


Εικόνα 8: Χημική δομή των φυτικών λιγανίων, ματαιρεσινόλη και σεκοΐσολαρισεσινόλη και των ζωικών παραγώγων τους εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (Webb and McCullough, 2005)

1.2.4. Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι μη φλαβονοειδή κι αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου. Όπως συμβαίνει και με τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια αποτελούν ποικιλία ενώσεων που διαφέρουν α) ως προς την θέση και τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με τους αρωματικούς δακτυλίους, β) ως προς τον βαθμό κατά τον οποίο οι ομάδες αυτές συνδέονται με σάκχαρα, μεθυλομάδες, μεθοξυλομάδες και άλλα κατάλοιπα, γ) ως προς τη στερεοχημική τους διαμόρφωση και δ) ως προς την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε αντιδράσεις για το σχηματισμό πολυμερών (Soleas et al, 1997).

Stilbenes



Εικόνα 9: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης

1.3. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (Jenkins, 1988). Οι ρίζες προκύπτουν είτε από την απώλεια ($X \rightarrow e^- + X^{\bullet+}$) είτε από την προσθήκη ($Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$) ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Mylonas and Kouretas, 1999). Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής, γι αυτό το λόγο οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια προκαλώντας την οξειδωσή τους (Sen and Packer, 2000). Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να συμπληρωθεί η εξωτερική τους στιβάδα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες κατατάσσονται α) οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), οι οποίες προέρχονται από το οξυγόνο, β) οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) από το άζωτο, γ) οι δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) από το χλώριο και τέλος δ) οι δραστικές μορφές θείου (reactive sulfur species, RSS) από το θείο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles and Jacob, 2002).

Οι ROS διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες, i) ρίζες που έχουν ως κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και το ιόν υδροξυλίου (OH^{\bullet}) αλλά και ii) παράγωγα οξυγόνου (με κεντρικό μόριο το οξυγόνο) που δεν είναι ρίζες αλλά είναι αρκετά δραστικά (π.χ. υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2 και υποχλωριώδες οξύ $HOCl$) (Halliwell and Gutteridge, 1995, 1998).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι επιβλαβείς για τα βιομόρια αλλά έχει παρατηρηθεί ότι συμμετέχουν και σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως σε σηματοδοτικά μονοπάτια, σε μηχανισμούς ανταπόκρισης σε καταστάσεις λοίμωξης κ.α.

1.3.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι πηγές παραγωγής των ROS χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις ενδογενείς και τις εξωγενείς.

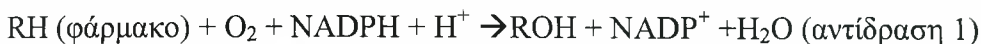
1.3.1.1 Ενδογενείς πηγές

Ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

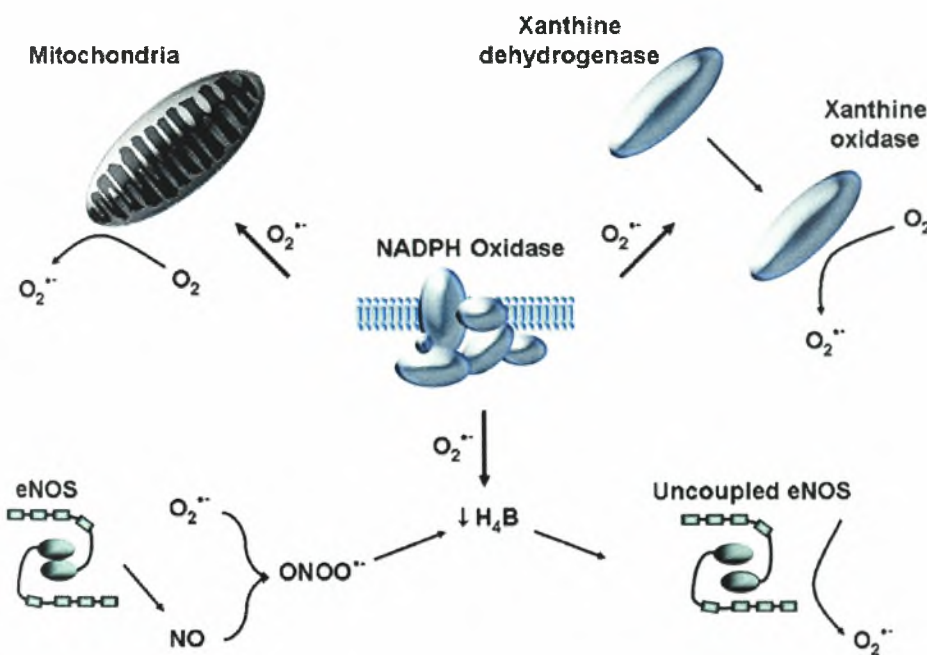
Στα αερόβια κύτταρα, η πιο σημαντική πηγή $O_2^{\bullet-}$ είναι η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Εκεί παράγεται ενέργεια μέσω 4 αλυσιδωτών

αντιδράσεων, ανάγοντας το οξυγόνο σε νερό. Μερικά από τα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από αυτή την αλυσίδα κι αντιδρούν απευθείας με το οξυγόνο κι έτσι σχηματίζεται το $O_2^{\bullet-}$ μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα (Harman, 2000).

Επιπλέον, $O_2^{\bullet-}$ παράγεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο από το κυτόχρωμα P450 κατά το μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών. Στο σύστημα αυτό τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADPH ή από το NADH στο οξυγόνο μέσω μιας αλυσίδας που συμπεριλαμβάνει φλαβοπρωτεΐνες, πρωτεΐνες που περιέχουν ανόργανο σίδηρο και κυτοχρώματα (αντίδραση 1). Σε αυτή την περίπτωση όμως ανάγεται ένα μόνο από τα δύο άτομα οξυγόνου σε νερό ενώ το άλλο χρησιμοποιείται για την οξείδωση του φαρμάκου.



Μια ακόμη πηγή $O_2^{\bullet-}$ αποτελούν οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Μεγάλος αριθμός ROS απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα (Picardo and Passi, 1997). Ακόμη, ελεύθερες ρίζες παράγονται και στα υπεροξειδισώματα. Πιο αναλυτικά, σε αυτά τα κυτίδια τα λιπαρά οξέα υφίστανται μια ειδική οξειδωτική διαδικασία, κατά την οποία παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) απευθείας από το $O_2^{\bullet-}$.



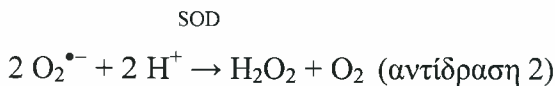
Εικόνα 10: Ενδογενείς πηγές ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

Τέλος, στις ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται διάφορα μόρια μεταξύ των οποίων είναι ανηγμένες μορφές ριβοφλαβινών και τα παράγωγά τους,

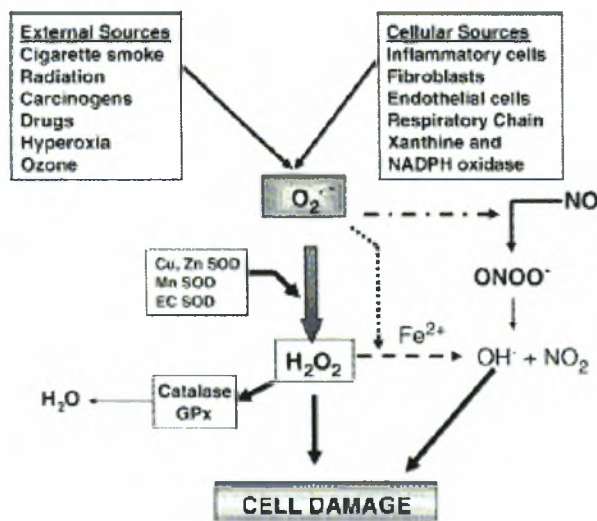
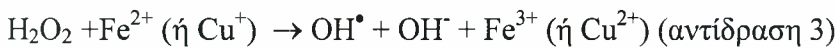
κατεχολαμίνες, ένζυμα όπως η οξειδάση της ζανθίνης,θειόλες και η αιμοσφαιρίνη κι άλλα που μπορούν να αυτοοξειδωθούν και να σχηματίσουν ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) (Picardo and Passi, 1997).

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet})

Το $O_2^{\bullet-}$ αποτελεί πρόγονο άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως H_2O_2 και OH^{\bullet} (Stief, 2003). Κατά συνέπεια, όπου παράγεται $O_2^{\bullet-}$ και υπάρχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις παράγονται και οι παραπάνω ρίζες. Το H_2O_2 αποτελεί τη λιγότερο δραστική μορφή οξυγόνου, αλλά μπορεί να παράγει OH^{\bullet} μέσω της αντίδρασης Fenton. Παράγεται στα υπεροξειδιοσώματα από το $O_2^{\bullet-}$ με τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).



Το OH^{\bullet} αποτελεί την πιο δραστική ρίζα κι έχει την ικανότητα να αντιδρά με πολλά μόρια στο κύτταρο. Παράγεται είτε με την αντίδραση Fenton, όπου το H_2O_2 αλληλεπιδρά με Fe^{2+} ή Cu^+ (αντίδραση 3), είτε με την αντίδραση Heber-Weiss, όπου το $O_2^{\bullet-}$ αλληλεπιδρά με το H_2O_2 (αντίδραση 4) παρουσία μετάλλων ιόντων σιδήρου ή χαλκού (Picardo and Passi, 1997).



Εικόνα 11: Εξωγενείς κι ενδογενείς πηγές ROS

1.3.1.2 Εξωγενείς πηγές

Οι εξωγενείς πηγές κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, τις περιβαλλοντικές, τις φυσικές και τις βιολογικές.

Στις περιβαλλοντικές-χημικές πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, το κάπνισμα, το όζον, το αλκοόλ, οι τοξίνες, τα συντηρητικά τροφών και ποτών (Kanner and Lapidot, 2001).

Στις φυσικές πηγές ανήκουν η ηλεκτρομαγνητική, η ηλιακή και η υπεριώδης ακτινοβολία. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η άσκηση σχετίζεται με την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Michailidis et al, 2007, Nikolaidis et al, 2006) και μάλιστα όσο πιο μεγάλη είναι η ένταση της άσκησης τόσο πιο έντονη είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών (Palmer et al, 2003).

Ως βιολογικές πηγές θεωρούνται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι προκαλούν την ενεργοποίηση των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων και κατ' επέκταση την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

1.3.2. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

1.3.2.1. Θετικές επιδράσεις

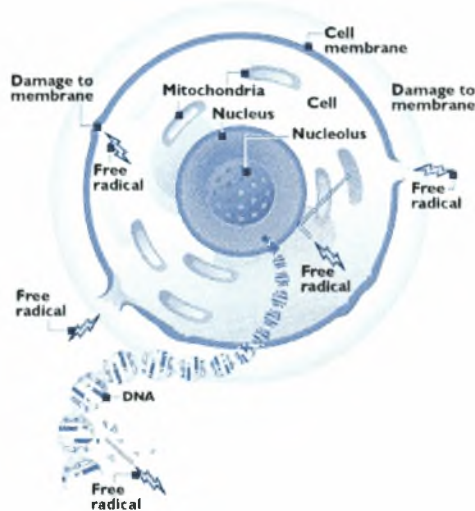
Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται ευεργετικές όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς συμβάλλουν στη σωστή λειτουργία του. Παράγονται από τα φαγοκύτταρα και δρουν ενάντια στα παθογόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Οι ROS είναι πολύ δραστικές ενώ παράλληλα δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση, γεγονός το οποίο τις καθιστά ικανές να καταστρέφουν τα παθογόνα ακόμη κι όταν αυτά μεταλλάσσονται. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται να συμμετέχουν σε μονοπάτια της διακυτταρικής επικοινωνίας. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι οι ROS συμβάλλουν στη ρύθμιση μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Thompson, 1995, Uckun, 1999). Επίσης, οι ROS συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), στην αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al, 2002).

1.3.2.2. Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν σχεδόν με όλα τα συστατικά του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα προκαλούν οξείδωση των πρωτεϊνών, του DNA καθώς και υπεροξείδωση των λιπιδίων. Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για αρκετές

ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος, η γήρανση, η αρτηριοσκλήρυνση και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson (Halliwell, 2001).

Cross section of a cell



Εικόνα 12: Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

1.4. Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών στον οργανισμό κατά την οποία υπερισχύουν οι πρώτες. Προκαλείται λόγω:

A) της μείωσης των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων,

B) της αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαρκή έκθεση των κυττάρων σε τοξίνες ή άλλα είδη ελεύθερων ριζών και σε αυξημένα επίπεδα O_2 .

Κάποιες από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες είναι:

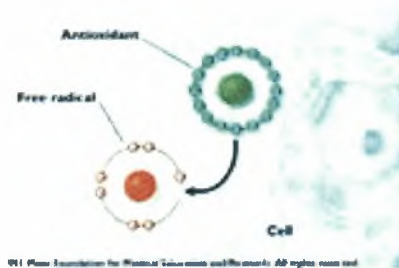
1. Ο οργανισμός ή τα κύτταρα επιβιώνουν σε συνθήκες απορρύθμισης των αμυντικών συστημάτων, τα οποία μπορεί να τον προστατεύουν πλήρως ή μερικώς από την οξειδωτική βλάβη. Με αυτό τον τρόπο αυξάνονται και σταθεροποιούνται σε υψηλά επίπεδα τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και μόρια.
2. Κυτταρικός θάνατος: Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει παραγωγή υπεροξειδίων και ελεύθερων ριζών, ουσίες οι οποίες αντιδρούν με οργανικά

υποστρώματα του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Το κύτταρο μπορεί να επιβιώσει από τις βλάβες του οξειδωτικού στρες. Στην αντίθετη περίπτωση:

- α) το κύτταρο οδηγείται σε **νέκρωση**, διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο λύεται αυτομάτως κι απελευθερώνει όλα του τα συστατικά με αποτέλεσμα να μεταδίδεται η οξειδωτική κατάσταση και στα γειτονικά κύτταρα, είτε
- β) το κύτταρο οδηγείται σε **απόπτωση**, σταδιακή διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο σηματοδοτεί το θάνατό του ώστε να επιβιώσουν τα γειτονικά κύτταρα.

1.5. Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα έχει την ιδιότητα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell, 2001). Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά.

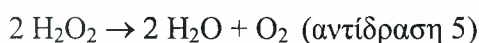


Εικόνα 13: Αντίδραση αντιοξειδωτικού μορίου με ελεύθερη ρίζα

1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

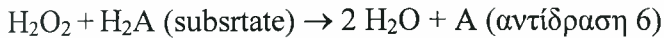
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Τα ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη :



Επίσης, η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

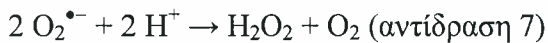
CAT



Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί έναν από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στις ρίζες $\text{O}_2^{\bullet-}$. Η SOD καταλύει την αυτοοξείδωση του $\text{O}_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

SOD

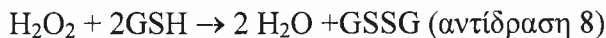


Υπάρχουν τρεις μορφές SOD, η εξωκυττάρια SOD, αυτή που περιέχει μαγνήσιο (Mn-SOD) και βρίσκεται στα μιτοχόνδρια κι αυτή που εξαρτάται από χαλκό και ψευδάργυρο (Cu-Zn-SOD) και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Papas, 1999). Σε όλα τα κύτταρα, κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $\text{O}_2^{\bullet-}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή Mn-SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers and Lennon, 2000).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η GPx, υπάρχει σε δύο μορφές, μία εκ των οποίων έχει ως συμπράγοντα το σελήνιο. Είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια κι έχει την ικανότητα να μετατρέπει τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων και το H_2O_2 σε H_2O και σταθερές αλκοόλες. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη και τη μετατρέπει στην οξειδωμένη μορφή της:

GPx



Η GPx και η CAT έχουν την ίδια δράση πάνω στο υπεροξειδίο. Ωστόσο, η απόδοση της GPx εξαρτάται από την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ROS κάτι που δε συμβαίνει για την CAT (Antunes et al, 2002).

1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι μικρά μόρια, που μπορούν να λάβουν ή να δώσουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Πιο

συγκεκριμένα ασκούν τη δράση τους είτε εμποδίζοντας την οξειδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες είτε περιορίζοντας το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών (Scalbert et al, 2005). Η αντίδραση αυτή οδηγεί σε οξειδωση του αντιοξειδωτικού, σχηματίζοντας μια ρίζα, η οποία είναι σχετικά αδρανής και δεν μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια. Στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών ανήκουν διάφορα διατροφικά συστατικά όπως η βιταμίνη E, το β-καροτένιο, το ασκορβικό οξύ και οι πολυφαινόλες.

α-Τοκοφερόλη (Βιταμίνη E) και τοκοτριενόλες

Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες ασκούν τη δράση τους μεταφέροντας ένα άτομο υδρογόνου στην 6-υδροξυλική ομάδα του δακτυλίου ή εξουδετερώνοντας τη μονήρη κατάσταση του οξυγόνου και άλλες ελεύθερες ρίζες (Gregory, 1996). Η τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Halliwell and Gutteridge, 1995).

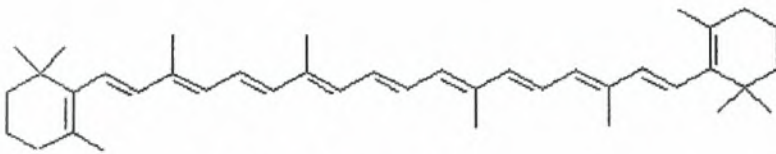
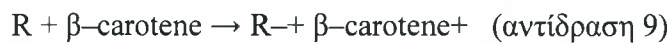
Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, εξαιρετικός δότης ηλεκτρονίου, με δράση τόσο στον εξωκυττάριο χώρο όσο και στο κυτταρόπλασμα. Έχει δειχθεί ότι είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό έναντι των ROS (Evans, 2000). Ασκεί τη δράση του είτε μεταφέροντας ένα άτομο υδρογόνου σε λιπιδικές ρίζες είτε εξουδετερώνοντας τη μονήρη κατάσταση του οξυγόνου. Επίσης, λειτουργεί ως συμπάραγοντας ενζύμου ενισχύοντας τη δράση της βιταμίνης E και της GSH (Fang et al, 2002). Πιο συγκεκριμένα αναγεννά τις οξειδωμένες μορφές της βιταμίνης E και την GSH από GSSG. Το ασκορβικό οξύ φαίνεται να σχετίζεται με την πρόληψη ορισμένων καρκίνων, καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς και του απλού κρυολογήματος.

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα λιποδιαλυτών μορίων, τα οποία φαίνεται να έχουν την δυνατότητα να εμποδίζουν ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες, όπως η αρτηριοσκλήρυνση, ο καταρράκτης, ο εκφυλισμός των μυών λόγω γήρανσης και διάφοροι τύποι καρκίνου (Giovannucci, 1995). Ακόμη, τα καροτενοειδή και ιδιαίτερα το λυκοπένιο και το β-καροτένιο, αναστέλλουν το σχηματισμό οξειδωμένων προϊόντων LDL χοληστερόλης ή και τις βλαβερές συνέπειες της υπερϊώδους ακτινοβολίας (Weisburger, 1999). Ένα από τα σημαντικότερα καροτενοειδή είναι το β-καροτένιο και έχει την ικανότητα να δίνει ηλεκτρόνια αντί

για άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες κι έτσι μετατρέπεται σε ρίζα καροτεϊνικού κατιόντος (Liebler 1993, Lee et al. 2003)



Εικόνα 14: Χημική δομή του β-καροτένιου

Επιπλέον το β-καροτένιο μπορεί να μετατρέψει το ανιόν σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο υδρογόνου μέσω της αντίδρασης 10 (Edge et al., 1997):



Τέλος, ορισμένα καροτενοειδή αποτελούν πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης Α (ρετινόλη), η οποία έχει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Keys and Zimmerman, 1999).

Θειόλες

Οι θειόλες είναι μόρια που διαθέτουν σουλφυδρυλικά κατάλοιπα (-SH) στο ενεργό τους κέντρο. Συντίθενται από τα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση καθώς και στην ανοσολογική αντίδραση (Sen and Packer, 2000).

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι η μεγαλύτερη παρούσα θειόλη στον οργανισμό. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Λόγω της σουλφυδρυλομάδας που έχει στο μόριό της προστατεύει ένζυμα και λιπίδια από αυτοοξείδωση κι αποτελεί ένα σύστημα μεταφοράς αμινοξέων από το περιβάλλον μέσα στα κύτταρα. Δρα ως υπόστρωμα της GPx κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Η GSH, επίσης, ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C, συμμετέχει στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών και παράλληλα είναι ικανή να εξουδετερώνει απευθείας τις ROS (May et al, 1996). Σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες παρατηρείται, συνήθως, μείωση του λόγου της ανηγμένης προς την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH/GSSG) καθώς και μείωση των επιπέδων των ολικών θειολών.

Το λιποϊκό οξύ είναι μία θειόλη, που αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση και αποτελεί συνένζυμο ορισμένων οξειδωτικών αποκαρβοξυλιώσεων.

Μεταλλοθειονίνη

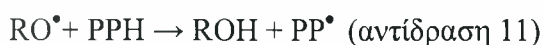
Η μεταλλοθειονίνη είναι μια πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους με ποσοστό κυστεΐνης, που κυμαίνεται από 23-33% με δυνατότητα δέσμευσης 4-10 ατόμων βαρέων μετάλλων. Τα μέταλλα αυτά είναι πολύ τοξικά σε αυξημένες συγκεντρώσεις.

Συνένζυμο Q (ουβικινόνη)

Το συνένζυμο Q παίζει σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Είναι ένας από τους δυο κινητούς μεταφορείς ηλεκτρονίων του συστήματος και παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες. Πιο αναλυτικά, η ουβικινόνη περιέχει μια μακριά, άπολη πολυακόρεστη ανθρακική αλυσίδα (μέχρι 50 άνθρακες), που επιτρέπει τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των άπολων μεμβρανών που περιβάλλουν πολλές υποκυτταρικές δομές. Η ουβικινόνη διοχετεύει κατόπιν τα ηλεκτρόνια σε άλλες, πιο απομακρυσμένες ενώσεις και τελικά στο οξυγόνο (McMurry, 1999).

1.6. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες έχουν ιδανική δομή για την αδρανοποίηση των ελεύθερων ριζών και η αντιοξειδωτική τους δράση υπερτερεί της δράσης των βιταμινών A και E. Οι διάφορες πολυφαινόλες εμφανίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω των φαινολικών τους ομάδων, οι οποίες λειτουργούν σαν δέκτες ηλεκτρονίων για να σχηματίσουν σταθερές φαινοξυλικές ρίζες που σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης (Scalbert et al, 2005). Επιπλέον, οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών περιλαμβάνουν και την ικανότητά τους να δρουν σαν δότες υδρογόνου (αντίδραση 11) καθώς και να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, όπως το σίδηρο και το χαλκό, μειώνοντας την ικανότητά τους να προάγουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα των ROS (Hajji et al, 2006).



Έτσι εμποδίζουν, έμμεσα, τις ελεύθερες ρίζες να οξειδώσουν είτε τα λιπίδια είτε άλλα μόρια και να δημιουργήσουν προβλήματα στα κύτταρα. Επιπρόσθετα,

ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά ενισχύοντας την δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ferguson et al, 2002).

1.7. Προοξειδωτική δράση πολυφαινολών

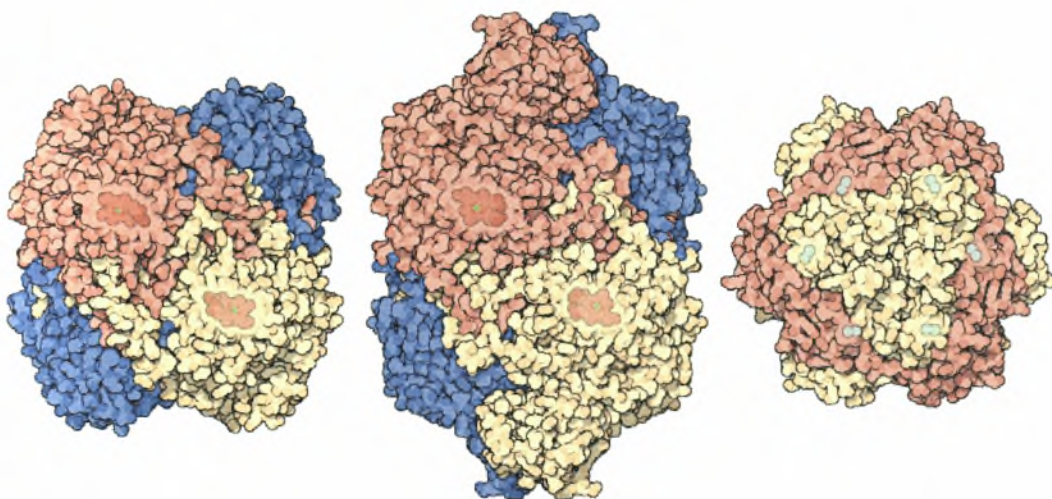
Παρά το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Αντί να προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες, συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στο σχηματισμό τους και κατ' επέκταση στην οξείδωση διαφόρων κυτταρικών υποστρωμάτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, όταν μία πολυφαινόλη αντιδρά με μία ελεύθερη ρίζα, αντί να σχηματίζεται μια σταθερή φαινολική ρίζα, η ρίζα που παράγεται είναι ασταθής και ικανή να αντιδράσει περαιτέρω (Cotelle, 2001).

Στις προ-οξειδωτικές δράσεις των πολυφαινολών συμπεριλαμβάνεται η αναστολή κάποιων ενζύμων όπως τελομεράση, κυκλοοξυγενάση, λιποξυγενάση, κάποιων μεταλλοπρωτεασών καθώς και του πρωτεασώματος και του κυτοχρώματος P450, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη μετάδοση σήματος μέσω ενδο- και διακυτταρικών μονοπατιών (Cotelle, 2001).

1.8 Καταλάση

1.8.1 Γενικές πληροφορίες και πρωτεϊνική δομή

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Halliwell and Gutteridge, 1998). Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Τα ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο.

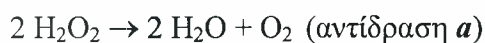


Εικόνα 15: Η δομή της καταλάσης

1.8.2 Μηχανισμός δράσης της καταλάσης

Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη :

CAT



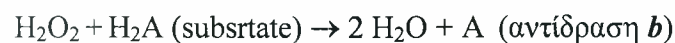
Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



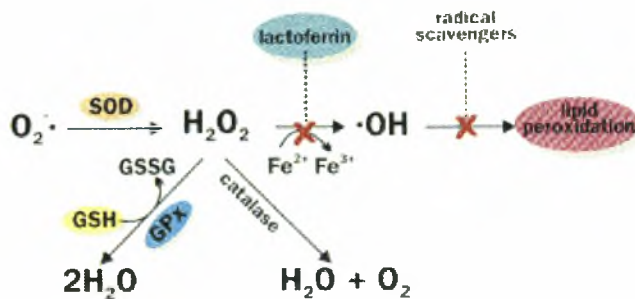
(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο)

Με την αντίδραση *a*, η καταλάση εμποδίζει τη μετατροπή του H_2O_2 σε υδροξυλικές ρίζες. Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 προς όφελος του οργανισμού, για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρήση αιθανόλης ως υπόστρωμα, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



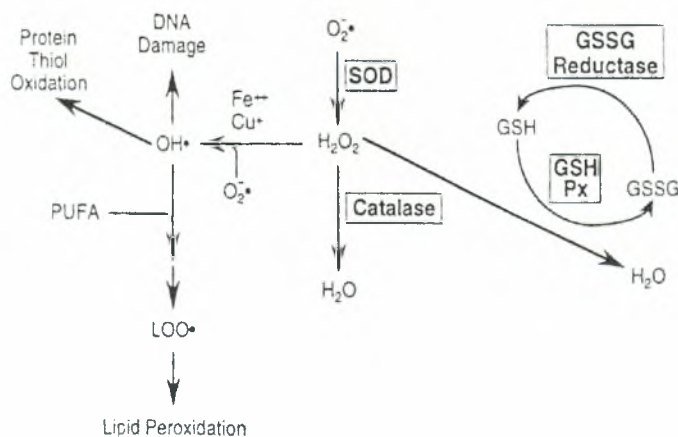
Απουσία καταλάσης οι αντιδράσεις *a* και *b* πραγματοποιούνται αυθόρμητα αλλά με πολύ αργό ρυθμό.



Εικόνα 16: Μονοπάτια παραγωγής ROS και εξουδετέρωσής τους από αντιοξειδωτικά ένζυμα

1.8.3. Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Οι παραπάνω αντιδράσεις είναι ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό καθώς το H_2O_2 αποτελεί μια δραστική μορφή οξυγόνου (ROS), κι επομένως θεωρείται τοξικό για τον οργανισμό, αφού μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA, το RNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Το H_2O_2 παράγεται ως παραπροϊόν από τη δράση ορισμένων οξειδωτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια σημαντικών φυσιολογικών αντιδράσεων του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα κατά την οξείδωση λιπαρών οξέων και κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση. Παράγεται από το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) με τη βοήθεια του ενζύμου SOD και σε αντίθεση με το $O_2^{\bullet-}$ το H_2O_2 μπορεί να διαχέεται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι λιγότερο δραστικό από το $O_2^{\bullet-}$ και γενικά θεωρείται ρίζα χαμηλής δραστικότητας αλλά μπορεί να συνδυαστεί με Fe^{2+} και Cu^+ προς την παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών ριζών OH^{\bullet} (αντίδραση Fenton), όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (§1.5.1).



Εικόνα 17: Συμμετοχή των αντιοξειδωτικών ενζύμων στην εξουδετέρωση των ROS (Mylonas and Kouretas, 1999)

Πέρα από την οξειδωτική του δράση το H₂O₂ συμμετέχει και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Το ένζυμο θυρεοειδική υπεροξειδάση χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο ως υπόστρωμα για την παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών. Επιπλέον, συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια και συμβάλλει στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Thompson 1995, Uckun, 1999).

1.8.4. Αναστολείς της καταλάσης

Μόρια όπως το ουρικό οξύ, το αζίδιο του νατρίου, η υποξανθίνη καθώς και η ξανθίνη αναστέλλουν την καταλάση *in vitro* (Van Pilsun, 1953). Παρόλα αυτά ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης δεν έχει καθοριστεί ακόμη πλήρως.

1.9. Ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*

Phaseolus vulgaris

Το γένος *Phaseolus* έχει 50 είδη φυτών τα οποία προέρχονται από την Αμερική. Πιο χαρακτηριστικό είναι το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), που καλλιεργείται ευρύτατα σε εύκρατες περιοχές. Είναι ένα φυλλώδες, ετήσιο φυτό που φτάνει τα 2-3m. Πολλά είδη *Phaseolus* καταναλώνονται ως τρόφιμα. Τα φύλλα τους καταναλώνονται ως σαλάτα, ενώ οι καρποί τους μαγειρεύονται.



Εικόνα 18: *Phaseolus vulgaris*, σπέρματα και πόα

Vicia faba

Το γένος *Vicia* έχει 140 ανθοφόρα φυτά, τα οποία είναι γνωστά ως βίκoi και προέρχονται από την Ευρώπη, την Ασία και την Αφρική. Το είδος *Vicia faba* είναι μία από τις πιο σημαντικές χειμερινές καλλιέργειες στη Μέση Ανατολή. Είναι μονοετές φυτό και φτάνει το 1m. Οι καρποί των *Vicia faba* είναι γνωστοί ως κουκιά,

είναι εδώδιμοι και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής. Η θρεπτική αξία τους είναι υψηλή και θεωρείται σε ορισμένες περιοχές ανώτερη από αυτή των μπιζελιών ή άλλων οσπρίων. Τα φύλλα του φυτού είναι πτεροειδή και ο καρπός είναι ένα πλατύ σκληρό περικάρπιο οσπρίου με μια πλατιά χνουδωτή επιφάνεια που μέσα περιέχει 3-8 σπόρους.



Εικόνα 19: *Vicia faba*, πόα και σπέρματα

Lathyrus laxiflorus

Το γένος *Lathyrus* έχει 160 είδη και αναπτύσσεται στην Ευρώπη, την Αμερική, την Ασία και την Αφρική. Άλλα είδη είναι ετήσια και άλλα πολυετή και φτάνουν τα 0,4m. Τα φυτά *Lathyrus* σχηματίζουν σπόρους οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Οι λοβοί περιέχουν συνήθως 4 έως 7 σπόρους που είναι μικροί, συνήθως στρογγυλοί και έντονα χρωματισμένοι.



Εικόνα 20: *Lathyrus laxiflorus*, πόα

Vicia tenuifolia

Το φυτό *Vicia tenuifolia* φτάνει κι αυτό το 1m αλλά, σε αντίθεση με το *Vicia faba*, είναι πολυετές φυτό. Συναντάται σε ορεινές περιοχές. Τα φύλλα του αποτελούνται από τα λεπτά γραμμικά φυλλάκια και τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα.



1 Feinblättrige Wicke, *Vicia tenuifolia*.
2 Haiwicke, *V. dumetorum*.



Εικόνα 21: *Vicia tenuifolia*, πόα και καρποί

Lens culinaris

Το φυτό *Lens culinaris* ή αλλιώς φακή είναι ένα μονοετές φυτό της οικογένειας των ψυχανθών. Είναι θαμνώδες φυτό και φτάνει περίπου τα 38cm ύψος ενώ το σχήμα του καρπού του είναι φακοειδές, από όπου και πήρε το όνομά του. Σχηματίζει σπόρους οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Ο λοβός δεν ξεπερνά τα 3 εκατοστά και περιέχει 2 μικρούς σπόρους. Οι φακές περιέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών και τα αμινοξέα λυσίνη, ισολευκίνη μεθιονίνη και κυστεΐνη. Επιπλέον, εκτός από τις πρωτεΐνες περιέχουν και σημαντικά ποσά βιταμίνης B1, φολικού οξέος και φυτικών ινών.



Εικόνα 22: *Lens culinaris*, σπέρματα και πόα

Lupinus albus

Το φυτό *Lupinus albus* ή αλλιώς λευκός λυκίσκος είναι μονοετές όσπριο, ανθεκτικό σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, το οποίο καλλιεργείται κυρίως στη Μεσόγειο. Το ύψος του φτάνει στο 1,2m και είναι πλούσιο σε αμινοξέα, πρωτεΐνες και φλαβονοειδή.



Εικόνα 23: *Lupinus albus*, σπέρματα και πόα

Lotus edulis και *Lotus longisiliquosus*

Το γένος *Lotus* έχει 150 είδη φυτών κι εμφανίζεται κυρίως στη Μεσόγειο. Το *Lotus edulis* είναι μονοετές φυτό, φτάνει στο 0,5m ύψος περίπου και καταναλώνεται ως τρόφιμο. Ανθίζει κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού μέχρι την αρχή του Φθινοπώρου και τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα. Τα περισσότερα είδη έχουν φύλλα με τρία φυλλάρια το καθένα.



Εικόνα 24: *Lotus edulis*, πόα και καρποί



Εικόνα 25: *Lotus longisiliquosus*, πόα

Tetragonolobus purpureus

Το φυτό *Tetragonolobus purpureus* είναι μονοετές, χνουδωτό φυτό και φτάνει τα 0,3m ύψους. Τα άνθη είναι πορφυρού χρώματος σχηματίζουν σπόρους, οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Οι λοβοί περιέχουν τους σπόρους οι οποίοι είναι κυματοειδείς και χωρίς τριχίδια.



Εικόνα 26: *Tetragonolobus purpureus*, πόα και καρποί

Lathyrus sativus και *Lathyrus clymenum*

Τα φυτά *Lathyrus sativus* και *Lathyrus clymenum* ανήκουν κι αυτά στο γένος *Lathyrus*. Αναπτύσσονται ιδιαίτερα στη Μεσόγειο. Όπως και τα περισσότερα ψυχανθή, παράγουν καρπούς με υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών.



Εικόνα 27: *Lathyrus sativus*, πόα



Εικόνα 28: *Lathyrus clymenum*, σπέρματα και πόα

1.10. Σκοπός του πειράματος

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι εκχυλίσματα ελληνικών ψυχανθών έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα, τα οποία προέρχονται από ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* από διαφορετικά μέρη της Ελλάδας. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ενζυμική δραστηριότητα της καταλάσης. Η καταλάση είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα οδηγώντας στην εξουδετέρωση του H_2O_2 μετατρέποντάς το σε H_2O και O_2 .

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Εκχυλίσματα

Συνολικά μελετήθηκαν 18 υδατικά και 18 μεθανολικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από διαφορετικά τμήματα ποικιλιών ψυχανθών (Πίνακας 1). Τα υπέργεια τμήματα των φυτών (πόα), τα σπέρματα, οι καρποί και τα περικάρπια αφού ξηράνθηκαν πολτοποιήθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση σε μεθανόλη (2/1 w/v) και νερό (2/1 w/v) σε θερμοκρασία δωματίου για 48h. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη και επαναδιάλυσή τους σε νερό.

Πίνακας 2: Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών

Μεθανολικά εκχ. (AAM)	Υδατικά εκχ. (AAW)	Φυτό	Τμήμα φυτού
13	13	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Πόα
9	9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Σπέρματα
16	16	<i>Vicia faba</i>	Πόα
6	6	<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i>	Πόα
1	1	<i>Vicia tenuifolia</i> subsp. <i>stenophylla</i>	Καρποί
7	7	<i>Vicia tenuifolia</i> subsp. <i>stenophylla</i>	Πόα
18	18	<i>Lens culinaris</i>	Πόα
10	10	<i>Lens culinaris</i>	Σπέρματα
3	3	<i>Lupinus albus</i>	Σπέρματα
17	17	<i>Lupinus albus</i>	Πόα
12	12	<i>Lotus edulis</i>	Περικάρπιο
15	15	<i>Lotus edulis</i>	Πόα
15K	15K	<i>Lotus edulis</i>	Καρποί
5	5	<i>Lotus longisiliquosus</i>	Πόα
14	14	<i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καρποί
19	19	<i>Tetragonolobus purpureus</i>	Πόα
11	11	<i>Lathyrus sativus</i>	Πόα
8	8	<i>Lathyrus clymenum</i>	Σπέρματα

2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

KH₂PO₄ (SIGMA,USA)

Na₂HPO₄ (Panreac,Spain)

H₂O₂ (Merck, Germany)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η εκτίμηση της ανασταλτικής ή επαγωγικής δράσης των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα του ενζύμου της βασίστηκε στη μεταβολή του ρυθμού κατανάλωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από την καταλάση.

2.2.2. Προετοιμασία αιμολύματος

Ως πηγή καταλάσης χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Αρχικά, το ολικό αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (EDTA) και φυγοκεντρήθηκε στα 1370 g, για 10 min, στους 4 °C. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο (πλάσμα) και έμειναν τα ερυθροκύτταρα ως ίζημα. Ακολούθως, προστέθηκε απιονισμένο νερό (1:1 v/v), το σωληνάριο ανακινήθηκε βίαια και φυγοκεντρήθηκε στα 4020 g, για 15 min, στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αντιπροσώπευε το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων έμειναν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μ L). Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αιμόλυμα αραιωμένο κατά 40 φορές.

2.2.3. Πειραματική διαδικασία

2.2.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό

Για τη μελέτη της επίδρασης ενός εκχυλίσματος στη δραστικότητα της καταλάσης είναι απαραίτητο αρχικά να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό, δηλαδή κατά την οποία δρα με τη μέγιστη ταχύτητα (V_{max}).

Διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υποστρώματος όπου η καταλάση δρα με τη μέγιστη ταχύτητα. Το μείγμα της αντίδρασης (3ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου και νατρίου (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) με pH 7.4 και 4 μ l αραιωμένου αιμολύματος και H_2O_2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3, 6, 9, 15, 24, 30 και 45mM). Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη H_2O_2 . Ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 προσδιορίστηκε σε θερμοκρασία δωματίου στα 240 nm για 2 min και ακολούθησε υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό (Δ_{ABS}/min) καθώς

και της ταχύτητας της αντίδρασης. Ο υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό υπολογίστηκε στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης.

Η συγκέντρωση υποστρώματος που το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό είναι τα 30mM.

Πίνακας 3: Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

Συγκέντρωση υποστρώματος [S] mM	ΔABS/min	Ταχύτητα [V] mmol/min/mg ενζύμου
3	0,008	56
6	0,018	125
9	0,027	188
15	0,043	299
24	0,061	424
30	0,065	451
36	0,068	472

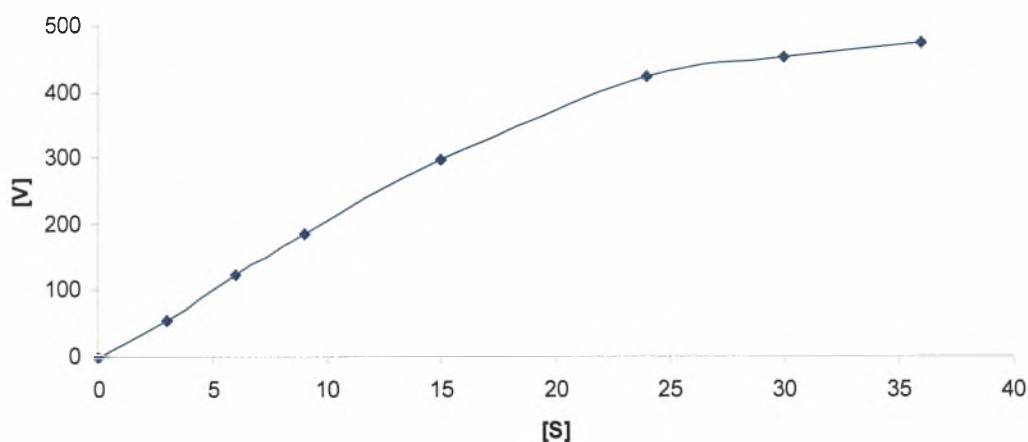
Ο υπολογισμός της ταχύτητας του ενζύμου έγινε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$V = 1 \times 1000 \times \frac{\text{Όγκος κυψελίδας (0.5ml)}}{\text{Μοριακή απορροφητικότητα υποστρώματος}} \times \frac{\text{Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης / λεπτό}}{\text{Ποσότητα ενζύμου στην κυβέττα (mg)}}$$

Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης/λεπτό: Δabs/min.

Μοριακή απορροφητικότητα του υποστρώματος (H₂O₂): 40 mol/L.

Η ποσότητα του ενζύμου στην κυβέττα είναι 0.0092mg.



Διάγραμμα 1 : Καμπύλη ταχύτητας ενζύμου και συγκέντρωσης υποστρώματος

2.2.3.2. Επίδραση φυτικών εκχυλίσμάτων στη δραστηριότητα της καταλάσης

Για κάθε εκχύλισμα επιλέχθηκαν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για παράδειγμα 50, 75, 100, 150, 200, 400 και 500 $\mu\text{g/ml}$. Ορισμένα εκχυλίσματα απορροφούσαν στα 240nm και έτσι δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η δράση τους.

Πίνακας 4: Συστατικά της αντίδρασης

	control	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
Buffer pH 7.4	2986 μl	2886 μl	2886 μl	2886 μl	2886 μl	2886 μl	2886 μl	2886 μl
Αιμ.αρ. 1/40	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
Εκχύλισμα	-	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
H ₂ O ₂	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
Ντελ.	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

Αρχικά προστέθηκαν το ρυθμιστικό διάλυμα, το αιμόλυμα και το εκχύλισμα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ακολούθως, τα δείγματα αναδεύτηκαν κι επώαστηκαν στους 37°C για 10 min. Μετά το τέλος της επώασης προστέθηκαν στο μείγμα της αντίδρασης 10 μl 30% w/v H₂O₂ στην κυβελίδα και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 240nm (UV) για 130 δευτερόλεπτα. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος

Επίσης πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του ενζύμου με το αζίδιο του νατρίου ως μάρτυρα ανασταλτικής δράσης. Το αζίδιο του νατρίου είναι ισχυρός αναστολέας της

καταλάσης. Προκάλεσε αναστολή στη δραστικότητα της καταλάσης με τιμή IC_{50} στην συγκέντρωση 0.35 μ M.

2.2.4. Υπολογισμοί

Υπολογισμός αναστολής

Το ποσοστό της αναστολής υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή CAT} = \frac{\text{M.O. } \Delta_{\text{ABS control}} - \text{M.O. } \Delta_{\text{ABS C}_x}}{\text{M.O. } \Delta_{\text{ABS control}}} \times 100$$

Όπου:

M.O. $\Delta_{\text{ABS control}}$: Μέσος όρος της μεταβολής της απορρόφησης του control.

M.O. $\Delta_{\text{ABS C}_x}$: Μέσος όρος της μεταβολής της απορρόφησης του εκχυλίσματος.

Υπολογισμός της τιμής IC_{50}

Για κάθε εκχύλισμα προσδιορίστηκε η τιμή IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που μειώνει τη δραστικότητα της καταλάσης κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη είναι η δράση του εκχυλίσματος. Η τιμή IC_{50} υπολογίζεται από την καμπύλη του ποσοστού αναστολής του κάθε δείγματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωσή του.

2.2.5. Στατιστική ανάλυση

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0,05$.

3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της καταλάσης

Από τα 18 μεθανολικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, αναστολή στη δραστικότητα της καταλάσης εμφάνισαν τα 5, ενώ τα υπόλοιπα δεν εμφάνισαν καμία δράση (Πίνακας 11). Η τιμή IC₅₀ ήταν δυνατό να προσδιοριστεί μόνο στα 2 από αυτά καθώς τα υπόλοιπα 3 απορροφούσαν στα 240nm. Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα του φυτού *Lathyrus laxiflorus*, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα του φυτού *Vicia faba* με τιμές IC₅₀ 200μg/ml και 490μg/ml, αντίστοιχα. Τα άλλα 3 εκχυλίσματα που εμφάνισαν δράση (πόα *Lotus longisiliquosus*, *Phaseolus vulgaris*, καρποί *Lotus edulis*) έφτασαν σε ποσοστά αναστολής 34%, 38% και 40% αντίστοιχα, στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Πίνακας 5: Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της καταλάσης

Μεθανολικά Εκχυλίσματα	IC ₅₀ (μg/ml)
Πόας <i>Phaseolus vulgaris</i>	Καμία επίδραση
Σπερμάτων <i>Phaseolus vulgaris</i>	> 500 (στα 500μg/ml είχε 36% αναστολή)*
Πόας <i>Vicia faba</i>	490
Πόας <i>Les culinaris</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lathyrus laxiflorus</i>	200
Σπερμάτων <i>Lens culinaris</i>	Καμία επίδραση
Περικαρπίου <i>Lotus edulis</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lotus edulis</i>	Καμία επίδραση
Καρπών <i>Lotus edulis</i>	> 500 (στα 500μg/ml είχε 40% αναστολή)*
Σπερμάτων <i>Lupinus albus</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lupinus albus</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lotus longisiliquosus</i>	> 500 (στα 500μg/ml είχε 34% αναστολή)*
Καρπών <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία επίδραση
Σπερμάτων <i>Lathyrus clymenum</i>	-
Καρπών <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία επίδραση
Πόα <i>Lathyrus sativus</i>	Καμία επίδραση

* στατιστικά σημαντική αναστολή (p < 0,05)

3.2. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της καταλάσης

Από τα 18 υδατικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, αναστολή στη δραστικότητα της καταλάσης εμφάνισαν μόνο 5, ενώ τα υπόλοιπα δεν εμφάνισαν καμία δράση. (Πίνακας 12). Η τιμή IC₅₀ ήταν δυνατό να προσδιοριστεί μόνο στα 3 από αυτά καθώς τα υπόλοιπα 2 απορροφούσαν στα 240nm. Τα εκχυλίσματα αυτά (πόα *Lathyrus laxiflorus*, *Lotus edulis*, *Vicia faba*) είχαν τιμή IC₅₀ 120, 450 και 480 µg/ml αντίστοιχα. Τα άλλα 2 εκχυλίσματα που εμφάνισαν δράση (*Phaseolus vulgaris*, *Lupinus albus*) έφτασαν σε αναστολή 23% και 38% αντίστοιχα, στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Πίνακας 6: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της καταλάσης

Υδατικά Εκχυλίσματα	IC ₅₀ (µg/ml)
Πόας <i>Phaseolus vulgaris</i>	> 200 (στα 200µg/ml είχε 23% αναστολή)*
Σπερμάτων <i>Phaseolus vulgaris</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Vicia faba</i>	480
Πόας <i>Les culinaris</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lathyrus laxiflorus</i>	120
Σπερμάτων <i>Lens culinaris</i>	Καμία επίδραση
Περικαρπίου <i>Lotus edulis</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lotus edulis</i>	450
Καρπών <i>Lotus edulis</i>	Καμία επίδραση
Σπερμάτων <i>Lupinus albus</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Lupinus albus</i>	> 500 (στα 500µg/ml είχε 38% αναστολή)*
Πόας <i>Lotus longisiliquosus</i>	Καμία επίδραση
Καρπών <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία επίδραση
Σπερμάτων <i>Lathyrus clymenum</i>	Καμία επίδραση
Καρπών <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία επίδραση
Πόας <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία επίδραση
Πόα <i>Lathyrus sativus</i>	-

* στατιστικά σημαντική αναστολή (p < 0,05)

4. Συζήτηση

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι εκχυλίσματα ελληνικών ψυχανθών έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Spanou et al, 2007). Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, δρουν αντιοξειδωτικά συμβάλλοντας στην πρόληψη διάφορων ασθενειών, που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες (Manach et al, 2004). Σε αυτή την εργασία μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα, τα οποία προέρχονται από ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* από διαφορετικά μέρη της Ελλάδας. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων αυτών στην ενζυμική δραστηριότητα της καταλάσης..

Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη η πιθανή επίδραση των πολυφαινολών στη δραστηριότητα της καταλάσης. Είναι όμως γνωστό ότι τόσο η καταλάση όσο και οι πολυφαινόλες ανήκουν στους αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Η καταλάση είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο, που συμμετέχει σε ένα μονοπάτι αδρανοποίησης των ROS. Πιο συγκεκριμένα, μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο και αναστέλλει την επιβλαβή δράση του στα βιομόρια.

Συνολικά, μελετήθηκαν 18 υδατικά και 18 μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών (Πίνακας 1). Η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων δεν είχε επίδραση στη δραστηριότητα της καταλάσης. Μερικά μόνο από τα εκχυλίσματα και ειδικότερα πέντε υδατικά και πέντε μεθανολικά ανέστειλαν τη δράση του ενζύμου. Αναλυτικότερα, δράση έδειξαν τα υδατικά εκχυλίσματα της πόας των φυτών *Vicia faba*, *Lathyrus laxiflorus*, *Lotus edulis*, *Phaseolus vulgaris* και *Lupinus albus*. Όσον αφορά στα μεθανολικά, δράση έδειξαν τα εκχυλίσματα πόας των φυτών *Vicia faba*, *Lathyrus laxiflorus* και *Lotus longisiliquosus* καθώς και καρπών και σπερμάτων των φυτών *Lotus edulis* και *Phaseolus vulgaris*, αντίστοιχα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η διαφορά στη δραστηριότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων οφείλεται στο ότι αυτά προέρχονται τόσο από διαφορετικά φυτά όσο και από διαφορετικά τμήματα του ίδιου φυτού (πόα, σπέρματα, καρποί, περικάρπιο). Επιπλέον, μεταξύ των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων η διαφορετική δράση τους απέναντι στην καταλάση αποδίδεται στο γεγονός ότι η διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων στο νερό

και τη μεθανόλη δεν είναι η ίδια. Δηλαδή, ορισμένες πολυφαινόλες οι οποίες έχουν δράση στα υδατικά εκχυλίσματα μπορεί να μην υπάρχουν στα μεθανολικά διότι δεν είναι δυνατή η διάλυσή τους σε μεθανόλη.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα της πόας από τα φυτά *Vicia faba* και *Lathyrus laxiflorus* ανέστειλαν την καταλάση ανεξάρτητα από το διαλύτη και μάλιστα ήταν τα πιο δραστικά. Για το λόγο αυτό θα ήταν σκόπιμο να βρεθεί η ακριβής σύστασή τους σε πολυφαινόλες ώστε να αποκαλυφθεί ποιες από αυτές είναι καίριες για την αναστολή της καταλάσης.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τόσο το υδατικό όσο και το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* ήταν το πιο δραστικό απέναντι στην καταλάση. Από προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας, φαίνεται να επιβεβαιώνεται το παραπάνω αποτέλεσμα. Ειδικότερα, το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* μείωσε τη δραστηριότητα της καταλάσης μετά από δύωρη επώασή του με κύτταρα της καρκινικής σειράς Hep2 (Spanou et al., 2009 *in press*). Παρά, λοιπόν, το γεγονός ότι τέτοιου είδους εκχυλίσματα θεωρούνται αντιοξειδωτικά λόγω των περιεχόμενων πολυφαινολικών ενώσεων, τα προηγούμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν έχουν προοξειδωτική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, τα φυτικά εκχυλίσματα θεωρείται ότι έχουν αντιοξειδωτική δράση λόγω των περιεχόμενων σε αυτά πολυφαινολικών ενώσεων. Παρόλα αυτά, τα εκχυλίσματα ψυχανθών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν είχαν ανάλογη δράση καθώς ανέστειλαν τη δραστηριότητα της καταλάσης. Η καταλάση είναι ένα από τα πιο βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και είναι υπεύθυνη για την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο ανήκει στην κατηγορία των δραστικών μορφών οξυγόνου και είναι δραστικό και επιβλαβές απέναντι στα βιομόρια. Η δράση της καταλάσης, όπως και άλλων ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας (SOD, GPx), είναι πιο έντονη κατά την άσκηση. Αυτό συμβαίνει διότι η άσκηση προκαλεί υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (H_2O_2) συμβάλλοντας στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Nikolaidis et al, 2006, Veskoukis et al, 2008). Αν ανασταλεί η δράση της καταλάσης, το H_2O_2 δεν αποικοδομείται κι έτσι μπορεί να οξειδώσει βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) μέσα στο κύτταρο.

Αφού τα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα θεωρούνται αντιοξειδωτικά θα μπορούσαν να χορηγηθούν με τη μορφή σκευασμάτων για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής

άμυνας του οργανισμού ιδιαίτερα μετά την άσκηση. Τα αποτελέσματα, όμως, αυτής της εργασίας δεν είναι προς αυτή την κατεύθυνση. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα εκχυλίσματα ψυχανθών στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ανέστειλαν την αντιοξειδωτική δράση της καταλάσης. Έτσι, τα εκχυλίσματα αυτά επηρέασαν την καταλάση ευνοώντας το οξειδωτικό στρες και όχι την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Απαιτείται, λοιπόν, μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά ένζυμα, που ενεργοποιούνται κατά την άσκηση και προσοχή κατά τη χορήγηση σκευασμάτων φυτικών εκχυλισμάτων ως αντιοξειδωτικών πριν την άσκηση

5. Βιβλιογραφία

- Antunes F**, Derick H, Cadenas E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*, 33(9):1260-7.
- Champ MMJ**. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses, *British Journal of Nutrition*, 88:307s-319s.
- Clifford MN**, Scalbert A. (2000). Ellagitannins - occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric*, 80:1118–25.
- Cotelle N**. (2001). Role of flavonoids in Oxidative stress. *Current Topics in Medical Chemistry*, 1:569-590
- Edge R**, Garvey MC, Truscott TG. (1997). The carotenoids as antioxidants - a review. *J Photochem Photobiol B Biol* 41(3):189–200.
- Evans WJ**. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, 72(S):647-52.
- Fang YZ**, Yang S, Wu GY. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18:872–879.
- Ferguson PL**, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ. (2002). A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research International Research Conference on Food, Nutrition & Cancer.
- Giles GI**, Jacob C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem*, 383: 375-88.
- Giovannucci E**. (1995). Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC..Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 87(23):1767–77.
- Gregory JF**. (1996). Vitamins. In: Fennema OR, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker. p 431–530.
- Guillon F**, Champ MMJ. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88:293s-306s.
- Hajji HE**, Nkhili E, Tomao V, Dangles O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Radic Res*, 40:303–20.
- Halliwell B**, Gutteridge JMC. (1995). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*, 8(2):89-193.

- Halliwell B. (2001).** Free radicals and other reactive species in disease, Encyclopedia of life sciences.
- Halliwell B. Gutteridge JMC (1998).** Free radicals in biology and chemistry, Oxford Science Publications
- Harman D. (2000).** Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*, 928:1–21.
- Jenkins RR. (1988).** Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med*, 5: 156-70
- Kanner J, Lapidot T. (2001).** The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 31:1388–95.
- Keys SA, Zimmerman WF. (1999).** Antioxidant activity of retinol, glutathione and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Exp. Eye Res*, 68:693-702.
- Lee JH, Ozcelik B, Min DB. (2003).** Electron donation mechanisms of β -carotene as a free radical scavenger. *J Food Sci*, 68(3):861–5.
- Liebler DC. (1993).** Antioxidant reactions of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 691:20–31.
- Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, et al. (2002).** Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci*, 959: 396-411.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47.
- Marcello D. (2006).** Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, 77:67-82
- May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. (1996).** Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med*, 20 (4): 543-51.
- McMurry J. (1999).** Cornell University, Οργανική Χημεία τόμος II , Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D. (2007).** Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc*, 39:1107-1113.
- Mylonas C, Kouretas D. (1999).** Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 13: 295-309.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. (2006). A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:161-183

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 38:1443-1450.

Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, et al. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol*, 89:100-7.

Papas AM. (1999). Other antioxidants. In: Papas AM, editor. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 231–48.

Picardo M, Passi S. (1997). Free radicals, in: J.D. Bos (Ed.), Skin immune system (SIS), CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 207-226.

Powers SK, Lennon SL. (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 58:1025-33.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:287-306.

Sen CK, Packer L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*, 72:653S-69S.

Soleas GJ, Diamandidis ER, Goldberg DM. (1997). Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11:287-313.

Spanou C, Stagos D, Aligainnis N, Kouretas D. (2009). Influence of potent antioxidant Leguminosae family plant extracts on growth and antioxidant defence system of Hep2 cancer cell line. *Journal of Medicinal Food*, in press.

Spanou C, Stagos D, Tousias L, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D. (2007). Assessment of Antioxidant Activity of Extracts from Unique Greek Varieties of Leguminosae Plants Using In Vitro Assays, *Anticancer Research* 27:3403-3410.

Stief TW. (2003). The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth*, 60:567–72.

Thompson C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 1456-1462.

Uckun. (1999). Bruton's tyrosine kinase as an inhibitor of the Fas/CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem*, 274:1646-1656.

Van de Wiel A, Van Golde P.H.M, Hart H.Ch. (2001). Blessings of the grape, *European Journal of Internal Medicine*, 12:484-48.

Van Pilsom JF. (1953). Inhibition of Uricase by Xanthine. *J.Biol.Chem*, 204:613-21.

Vermerris W Nicholson R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. Netherlands, Springer.

Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 33:1140-1154.

Webb A, McCullough M. (2005). Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, 51:117-131.

Weisburger JH. (1999). Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem Toxicol*, 37:943-8.

Καράταγλης Σ. Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text 1994

Τσέκου IB. Φυσιολογία φυτών 2004