



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΛΕΝΗ ΤΖΑΝΑΚΟΥΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Επίδραση εκχυλισμάτων σταφυλιών στην ενζυμική
δραστικότητα της καταλάσης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων: **Δημήτριος Κουρέτας**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον **κ. Δημήτριο Κουρέτα**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την κατανόηση σε ότι προέκυψε κατά την διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους υποψήφιους διδάκτορες **Χρύσα Σπανού** και **Άρη Βεσκούκη** για την επίβλεψη μου κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, την καθοδήγηση και την υπομονή, για την βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της συγγραφής της πτυχιακής εργασίας, για την προθυμία τους να απαντούν σε όλες τις απορίες μου καθώς και για τη συμβολή τους στις νέες γνώσεις που αποκόμισα κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου, για την καλλιέργεια ενός ευχάριστου και ταυτόχρονα παραγωγικού κλίματος συνεργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες	10
1.1.1 Γενικά	10
1.1.2 Πηγές ελευθέρων ριζών	15
1.2 Οξειδωτικό στρες	18
1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	19
1.3.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	20
1.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	22
1.4 Πολυφαινόλες	24
1.4.1 Ταξινόμηση	25
Α. Φλαβονοειδή	26
I. Φλαβόνες	26
II. Φλαβονόλες	27
III. Φλαβανόλες	27
IV. Φλαβανόνες	27
V. Ισοφλαβόνες	28
VI. Ανθοκυανίνες	28
B. Μη Φλαβονοειδή	29
I. Φαινολικά οξέα	29
II. Στυλβένια	30
Γ. Λιγνάνια	30
1.4.2 Βιοσύνθεση	31
1.4.3 Βιοδιαθεσιμότητα	32
1.4.4 Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών	34
Α. Αντιοξειδωτική δράση	35
B. Προ-οξειδωτική δράση	37
1.5 Καταλάση	38
1.6 Υπεροξειδίο του υδρογόνου	39
1.7 Μέρη και χημική σύσταση των σταφυλιών	40
1.7.1 Σταφυλή	40
1.7.2 Βόστρυχος	40
1.7.3 Ράγα	41
1.7.4 Φλοιός	41
1.7.5 Σάρκα	41
1.7.6 Γίγαρτα	42
1.7.7 Στέμφυλα	42
1.8 Ποικιλίες σταφυλιών	43
1.8.1 Μανδηλαριά	43
1.8.2 Ασσύρτικο	43
1.8.3 Βηλάνα	43
1.8.4 Αθήρι	44
1.8.5 Βοηδόματο	44
1.8.6 Μαυροτράγανο	44
1.8.7 Κοτσιφάλι	45
1.8.8 Αγιωργίτικο	45
1.9 Σκοπός του πειράματος	46

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1 Υλικά	47
2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	47
2.1.2 Εκχυλίσματα	47
2.2 Μέθοδος	48
2.2.1 Αρχή της μεθόδου	48
2.2.2 Πειραματική διαδικασία	48
2.2.2.1 Προετοιμασία αιμολύματος ως πηγής του ενζύμου	48
2.2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό	48
2.2.2.3 Εκτίμηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της καταλάσης	50
2.2.3 Υπολογισμός αναστολής και IC ₅₀	51
2.2.4 Στατιστική ανάλυση	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
3.1 Αποτελέσματα καρπών	52
3.2 Αποτελέσματα βοστρύχων	52
3.3 Αποτελέσματα στεμφύλων	53
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.** Σχηματισμός ελευθέρων ριζών
- Εικόνα 2.** Εξωγενείς κι ενδογενείς πηγές ROS
- Εικόνα 3.** Εξουδετέρωση μίας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό
- Εικόνα 4.** Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελευθέρων ριζών
- Εικόνα 5.** Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς
- Εικόνα 6.** Χημική δομή φλαβονών
- Εικόνα 7.** Χημική δομή φλαβονολών
- Εικόνα 8.** Χημική δομή φλαβανολών
- Εικόνα 9.** Χημική δομή φλαβανονών
- Εικόνα 10.** Χημική δομή ισοφλαβονών
- Εικόνα 11.** Χημική δομή ανθοκυανιδινών
- Εικόνα 12.** Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων
- Εικόνα 13.** Βασική χημική δομή στυλβενίων
- Εικόνα 14.** Βασική χημική δομή λιγνανίων
- Εικόνα 15.** Βιοσύνθεση φυτικών πολυφαινολών από διαφορετικά μονοπάτια
- Εικόνα 16.** Η δομή της καταλάσης
- Εικόνα 17.** Συμμετοχή των αντιοξειδωτικών ενζύμων στην εξουδετέρωση των ROS
- Εικόνα 18.** Ράγα σταφυλιού
- Εικόνα 19.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Μανδηλαριά
- Εικόνα 20.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Ασσύρτικο
- Εικόνα 21.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Βηλάνα
- Εικόνα 22.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Αθήρι
- Εικόνα 23.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Βοηδόματο
- Εικόνα 24.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Μαυροτράγανο
- Εικόνα 25.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Κοτσιφάλι
- Εικόνα 26.** Τα σταφύλια της ποικιλίας Αγιωργίτικο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Κατηγορίες πολυφαινολών
- Πίνακας 2.** Χημική σύσταση σταφυλιών
- Πίνακας 3.** Εκχυλίσματα καρπών
- Πίνακας 4.** Εκχυλίσματα βοστρύχων
- Πίνακας 5.** Εκχυλίσματα στεμφύλων

Πίνακας 6. Συστατικά της αντίδρασης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό

Πίνακας 7 & 8. Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

Πίνακας 9. Αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης εκχυλισμάτων καρπών στη δραστηριότητα της καταλάσης

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης εκχυλισμάτων βοστρύχων στη δραστηριότητα της καταλάσης

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης εκχυλισμάτων στεμφύλων στη δραστηριότητα της καταλάσης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Καμπύλη ταχύτητας ενζύμου και συγκέντρωσης υποστρώματος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Σύγκριση όλων των εκχυλισμάτων σταφυλιών που μελετήθηκαν συναρτήσει των τιμών IC₅₀

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

GR: ρεδοκτάση της γλουταθειόνης

GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρασί και τα σταφύλια αποτελούν βασικά στοιχεία της Μεσογειακής διατροφής. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με την ευεργετική επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου. Μεταξύ των ερμηνειών που έχουν διατυπωθεί είναι και οι σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών συστατικών του κρασιού. Οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι εμπλέκονται σε προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος και οι μικροβιακές λοιμώξεις. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστηριότητα της καταλάσης, ενός ενζύμου που καταλύει τη διάσπαση και αδρανοποίηση του, επιβλαβούς για τα βιομόρια, υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συνολικά, μελετήθηκαν 27 διαφορετικά εκχυλίσματα διαφόρων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (λευκά και κόκκινα σταφύλια) του είδους *Vitis vinifera*, από 5 διαφορετικά μέρη της Ελλάδας (Σαντορίνη, Ρόδος, Νεμέα, Σητεία, Ηράκλειο). Τα τμήματα από τα οποία προήρθαν τα εκχυλίσματα είναι οι καρποί, οι βόστρυχοι και τα στέμφυλα. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα είχαν ανασταλτική δράση απέναντι στην καταλάση. Πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τους βόστρυχους είναι τα πιο ισχυρά, έπειτα ακολουθούν τα εκχυλίσματα στεμφύλων και τέλος των καρπών. Τα εκχυλίσματα αυτά θεωρούνται αντιοξειδωτικά λόγω των περιεχόμενων πολυφαινολικών ενώσεων. Παρόλα αυτά η ανασταλτική δράση τους στην καταλάση τα καθιστά πιθανά προοξειδωτικά μόρια καθώς η καταλάση είναι ένας σημαντικός ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός του οργανισμού ιδιαίτερα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και κατά την άσκηση. Έτσι, λοιπόν, η δράση των αντιοξειδωτικών δεν είναι πάντα η επιθυμητή και γι' αυτό η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή ιδιαίτερα πριν την άσκηση.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι γνώσεις γύρω από την αρχή της εξέλιξης της καλλιέργειας της αμπέλου και της παρασκευής του οίνου δεν είναι αρκετά σαφείς. Ωστόσο, φαίνεται ότι η χρήση καρπού της αμπέλου απ' τον άνθρωπο άρχισε από την 7^η ή 6^η π.Χ. χιλιετία, δηλαδή απ' τις αρχές της Νεολιθικής περιόδου. Η καλλιέργεια όμως της αμπέλου άρχισε αργότερα, περί την 5^η π.Χ. χιλιετία, όταν άρχισαν και οι μεταναστεύσεις λαών που κατοικούσαν νοτίως της οροσειράς του Καυκάσου (ανατολική Μ. Ασία, Περσία, Αρμενία) προς τις ακτές της Ανατολικής Μεσογείου. Περί τα τέλη της 5^{ης} π.Χ. χιλιετίας η καλλιέργεια της αμπέλου είχε εξαπλωθεί σε Μεσοποταμία, Συρία, Αίγυπτο και Αιγαίο (Κ. Λαζαράκης, 2006).

Η ποικιλία σταφυλιών από την οποία πιστεύεται ότι ξεκίνησε η παραγωγή του κρασιού είναι η *Vitis Vinifera*. Η ποικιλία αυτή θεωρείται μία από τις καλύτερες για την παραγωγή κρασιού στην Ευρώπη (Δημήτριος Ευστ. Σταύρακας 1997, G.Soleas et al. 1997, A.Van de Wiel et al. 2001). Οι ιθαγενείς ποικιλίες σταφυλιών αποτελούν ενδεχομένως πολύτιμο θησαυρό για τους καλλιεργητές και τους παραγωγούς αλλά μπορούν να φανούν χρήσιμες και σε τομείς όπως η ιατροφαρμακευτική και αλλού. Οι Έλληνες παραγωγοί επενδύουν όλο και περισσότερο σε ντόπιες ποικιλίες σταφυλιών και αρχίζουν να πειραματίζονται τόσο με τα καθιερωμένα ήδη όσο και με άλλα που κινδυνεύουν να εκλείψουν.

Το κρασί δεν είναι ένα κοινό ποτό αλλά και ένα διατροφικό προϊόν που, ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της ιατρικής, το θεωρούσε απαραίτητο για τον άνθρωπο όταν ήταν υγιής αλλά ακόμα κι όταν αρρώσταινε. Όλοι οι ερευνητές συμφωνούν ότι δύο με τρία ποτηράκια κρασί την ημέρα είναι παράγοντας μακροβιότητας. Ο ίδιος ερευνητής που ανακάλυψε ότι η ασπιρίνη θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο καρδιακής νόσου, σήμερα υποστηρίζει ότι δύο ποτήρια κόκκινο κρασί την ημέρα εμποδίζουν να δημιουργηθούν θρόμβοι στα τοιχώματα των αρτηριών. Οι ουσίες που ανιχνεύονται στα σταφύλια και το κρασί είναι πολύ σπουδαίες για τον ανθρώπινο οργανισμό και ανήκουν σε περισσότερες από είκοσι κατηγορίες, όπως αμινοξέα, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, άλατα, σάκχαρα, εστέρες, φαινολικές ενώσεις, μέταλλα, ένζυμα και ένα πλήθος άλλων συστατικών. Οι βιταμίνες που υπάρχουν στο κρασί, βρίσκονται σε αρμονική αναλογία και ανεβάζουν την αξία του ως διατροφικού προϊόντος. Επίσης, τα ποσοστά των αμινοξέων στο κόκκινο κρασί είναι σχεδόν ίδια με αυτά του ανθρώπινου αίματος. Το κρασί διευκολύνει την απορρόφηση των πρωτεϊνών κατά την πέψη διεγείροντας την παραγωγή γαστρικών υγρών. Η ταννίνη που βρίσκεται στα κόκκινα κρασιά δυναμώνει τις ίνες των εντέρων και διεγείρει τη σύσπασή τους. Τα λευκά κρασιά, διευκολύνουν την

έκκριση της χολής και των παγκρεατικών ουσιών. Οι διάφορες σημαντικές ιδιότητες που έχουν το κρασί και τα σταφύλια τους έδωσαν τη θέση τους στην «Πυραμίδα της Μεσογειακής Διατροφής» που υιοθέτησε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. Με αφορμή όλα αυτά το ενδιαφέρον μεγαλώνει όλο και περισσότερο κι έτσι διενεργούνται διάφορες μελέτες με σκοπό την εξακρίβωση της δράσης του κρασιού, ποια φυσικά συστατικά του κρασιού και των σταφυλιών ευθύνονται γι' αυτή και ποιος ο ακριβής τους ρόλος στην υγεία και τη διατροφή.

1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

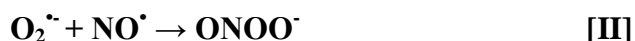
1.1.1 Γενικά

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, δηλαδή περιττό αριθμό ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στοιβάδα και 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 & Kouretas, 1999). Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής, γι' αυτό οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια με σκοπό να συζευχθούν, να συμπληρωθεί η εξωτερική τους στοιβάδα κι έτσι να αποκτήσουν σταθερότητα. Από τη στιγμή που η διαδικασία αυτή αρχίζει, παίρνει μορφή αλυσίδας. Στην προσπάθεια τους αυτή, οι ελεύθερες ρίζες δανείζονται ηλεκτρόνια από φυσιολογικά μόρια του οργανισμού (λιπίδια των μεμβρανών, πρωτεΐνες, ένζυμα, υδατάνθρακες, νουκλεϊνικά οξέα) και τελικά τα οδηγούν στην καταστροφή προκαλώντας την οξειδωσή τους (Sen and Packer, 2000).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά και ασταθή μόρια, τα οποία μπορούν να παραχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό κατά το μεταβολισμό και αντιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με μακρομόρια, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Η πολύ υψηλή δραστικότητά τους αποδίδεται στα ασύζευκτα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας, η οποία συνήθως είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με τα αντιδρώντα (Mylonas & Kouretas 1999). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πιο απλή ελεύθερη ρίζα, που είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, η οποία όταν ενωθεί με ένα άλλο μονοσθενές υδρογόνο οδηγεί στο σχηματισμό δισθενούς υδρογόνου (II),



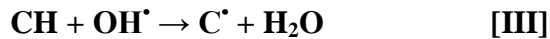
και το σουπεροξειδικό ανιόν αντιδρά με μονοξείδιο του αζώτου (III).



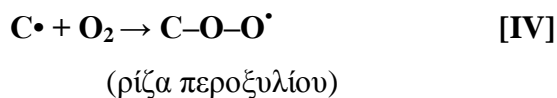
Σε όλες τις περιπτώσεις, σχηματίζεται μία μη ρίζα που συνήθως είναι λιγότερο δραστική από τις ρίζες από τις οποίες προέρχεται (π.χ. το H_2 είναι χημικά λιγότερο δραστικό από το H^{\bullet}), αλλά όχι πάντα. Για παράδειγμα, το $ONOO^{\bullet-}$ είναι πιο ζημιογόνο στους ανθρώπινους ιστούς είτε από το $O_2^{\bullet-}$ είτε από το NO^{\bullet} .

Τα περισσότερα βιολογικά μόρια είναι μη ρίζες. Όταν μία ελεύθερη ρίζα αντιδρά με μία μη ρίζα, παράγεται μία νέα ελεύθερη ρίζα. Για παράδειγμα, η ρίζα OH^{\bullet} αντιδρά με

υδρογονάνθρακες (συμπεριλαμβάνοντας τις πλευρικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων από τα λιπίδια της μεμβράνης) για να αποσπάσει H^\bullet και να αφήσει πίσω μία ρίζα με κέντρο τον άνθρακα ([III]).



Αυτή η διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει την αλυσιδωτή αντίδραση των ελεύθερων ριζών της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Μία δραστική ελεύθερη ρίζα όπως η OH^\bullet αποσπά υδρογόνο από μία πλευρική αλυσίδα λιπαρού οξέος όπως παραπάνω. Οι ρίζες που προκύπτουν με κέντρο τον άνθρακα αντιδρούν με το οξυγόνο ([IV]).



Οι ρίζες περοξυλίου προσβάλλουν τις πρωτεΐνες της μεμβράνης και μπορούν επίσης να προσβάλλουν τις πλευρικές αλυσίδες των γειτονικών λιπαρών οξέων. Έτσι, η προσβολή ενός μόνου OH^\bullet μπορεί να προκαλέσει οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων πολλαπλών λιπαρών οξέων σε υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων. Οι πλευρικές αλυσίδες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ουσιώδεις στη ρευστότητα των μεμβρανών, είναι οι πιο επιρρεπείς στην επίθεση ελεύθερων ριζών και στην επακόλουθη υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Halliwell 1997, 2001).

Ένα διαφορετικό παράδειγμα αποτελεί η ρίζα OH^\bullet το οποίο προσδίδει στη βάση πουρίνης γουανίνη στο DNA, οπότε πάλι παράγεται μια νέα ρίζα, μία ρίζα 8-υδροξυγουανίνης ([VI]).



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), οι οποίες προέρχονται από το άζωτο,
- γ)** οι δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS), οι οποίες προέρχονται από το χλώριο, και
- δ)** οι δραστικές μορφές θείου (reactive sulfur species, RSS), οι οποίες προέρχονται από το θείο.

Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέλθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles and Jacob, 2002). Επιπροσθέτως, οι ROS διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

- i) ρίζες που έχουν ως κεντρικό μόριο το οξυγόνο (το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εγκαθίσταται στο O), όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet})
- ii) παράγωγα οξυγόνου (με κεντρικό μόριο το οξυγόνο) που δεν είναι ρίζες αλλά είναι αρκετά δραστικά (π.χ. υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)) (Halliwell and Gutteridge, 1995, 1998).

Άλλα είδη είναι οι θειούχες ρίζες (RS^{\bullet}) με κέντρο το θείο, το τριχλωρομεθύλιο (CCl_3^{\bullet}) με κέντρο τον άνθρακα, και το οξείδιο του αζώτου (NO^{\bullet}), που είναι μία ελεύθερη ρίζα στην οποία το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εντοπίζεται μεταξύ δύο διαφορετικών ατόμων (Halliwell et al 1980).



Εικόνα 1. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται συνέχεια μέσα στο σώμα καθώς παράγονται από τους αερόβιους οργανισμούς κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης) στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την παραγωγή της ενέργειας. Ένα μέρος αυτού του οξυγόνου σχηματίζει τις ελεύθερες ρίζες που περιέχουν ένα ή δύο άτομα οξυγόνου. Αυτό συμβαίνει κατά τη διαδικασία μεταφοράς των ηλεκτρονίων για την παραγωγή ATP, εξαιτίας της διαφυγής των ηλεκτρονίων από τα μιτοχόνδρια, οπότε και παράγονται ROS, ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και υδροξυλίου (OH^{\bullet}). Αυτά τα είδη οδηγούν στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), από το οποίο παράγονται επιπλέον υδροξυλικές ρίζες ως αντίδραση που φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Fe^{2+} (Cleveland JL, Kastan MB 2000).

Εάν οι ελεύθερες ρίζες δεν αδρανοποιηθούν μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες σε διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς του οργανισμού, καθώς μπορούν να επιτεθούν και να επέμβουν στη δομή των κρίσιμων συστατικών του κυττάρου που βρίσκονται κοντά τους, όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και η ευαίσθητη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά συνέπεια, καταστρέφουν ένζυμα και παράγουν τοξικά προϊόντα τα οποία προκαλούν βλάβες στην κυτταρική λειτουργία, στη φυσιολογική δομή του DNA, των λιπιδίων και των λευκωμάτων.

Η βλάβη που προκαλείται στο DNA των γονιδίων από τις ελεύθερες ρίζες οφείλεται στην οξειδωση των βάσεων του νουκλεϊκού οξέως (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη), οι οποίες κρατούν ενωμένη τη διπλή έλικα των μορίων του DNA. Η πιο συχνή βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες είναι η οξειδωση των ενώσεων που σχηματίζουν τα λίπη. Οι ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό είναι τοξικές μορφές των μεταβολιτών του ενεργού οξυγόνου. Η ελεύθερη ρίζα που παράγεται σε μεγάλη ποσότητα είναι υπεροξείδιο του οξυγόνου O_2 . Αυτό αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 και σχηματίζει μια επικίνδυνη και ισχυρή υδροξυλική ρίζα.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες σε πάρα πολλές μεταβολικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται μέσα στο σώμα. Συμμετέχουν σε φυσιολογικές διαδικασίες και λειτουργίες του κυττάρου, όπως σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως είναι η κυτταρική αναπνοή, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η παραγωγή προσταγλανδινών, η φαγοκυττάρωση και η ανοσολογική απόκριση σε καταστάσεις λοίμωξης κ.α. 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. Έχει αποδειχθεί ότι οι ROS συμβάλλουν στη ρύθμιση μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την ανοσία και την απόπτωση (Thompson, 1995, Uckun, 1999). Επίσης, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), στην αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al, 2002).

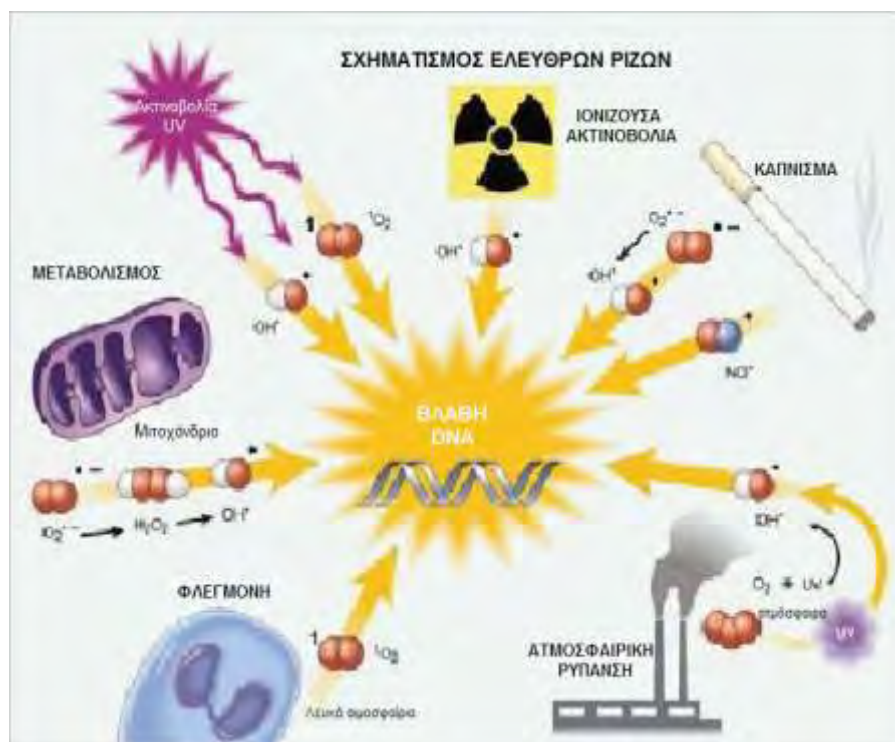
Η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι μια φυσιολογική δραστηριότητα με κύρια πηγή τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μέρος του αμυντικού μηχανισμού και χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος για να καταστρέψουν βλαβερά βακτηρίδια και ιούς καταστρέφοντας τις κυτταρικές τους μεμβράνες. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν σχεδόν με όλα τα συστατικά του κυττάρου και έχει βρεθεί ότι είναι επιβλαβείς για τα βιομόρια. Πιο συγκεκριμένα προκαλούν οξειδωση των πρωτεϊνών, του DNA καθώς και υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η οξειδωση αυτή αλλάζει τη δομή των λιπιδίων τα οποία φτιάχνουν τις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται η λειτουργία των μεμβρανών. Όταν οι ελεύθερες ρίζες είναι πάρα πολλές και δεν απομακρύνονται εφόσον δεν χρειάζονται πλέον, τότε αυτές επιτίθενται όχι μόνο στα βακτήρια αλλά και στα υγιή κύτταρα προκαλώντας βλάβες στις μεμβράνες τους. Έτσι οι ελαττωματικές μεμβράνες δεν μπορούν να προστατεύσουν τα

κύτταρα και τα καρδιακά και νευρικά κύτταρα υποβαθμίζουν τις λειτουργίες τους (P. Atkins & L. Jones, 2002).

1.1.2 Πηγές ελευθέρων ριζών

Οι πηγές παραγωγής των ελευθέρων ριζών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις ενδογενείς και τις εξωγενείς (Εικ. 2). Οι εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών κατατάσσονται σε **περιβαλλοντικές** (ατμοσφαιρικοί και περιβαλλοντικοί ρύποι (τοξικά χημικά εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, προϊόντα πετρελαίου), κάπνισμα, όζον, αλκοόλ, τοξίνες, συντηρητικά τροφών και ποτών (κακή διατροφή και παχυσαρκία)), **φυσικές** (ηλεκτρομαγνητική, η ηλιακή και η υπεριώδης ακτινοβολία) και **βιολογικές** (παθογόνοι μικροοργανισμοί) (Kanner and Lapidot, 2001).

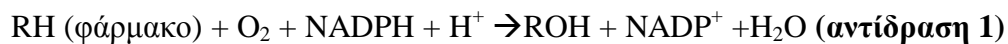
Όσον αφορά στις ενδογενείς πηγές για το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η φλεγμονή, το στρες, η έντονη σωματική δραστηριότητα (π.χ. προπονήσεις των αθλητών) (Halliwell 1997).



Εικόνα 2: Εξωγενείς κι ενδογενείς πηγές ROS

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 ξеноβιοτικών 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 οξειδωση του φαρμάκου.

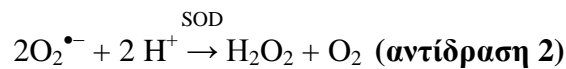


Μια ακόμη πηγή $O_2^{\bullet-}$ αποτελούν οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις όπου η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) παράγεται από τα φαγοκύτταρα με σκοπό την καταστροφή παθογόνων βακτηρίων. Μεγάλος αριθμός ROS απελευθερώνεται από τα λευκοκύτταρα, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα (Picardo and Passi, 1997). Ακόμη, ελεύθερες ρίζες παράγονται και στα υπεροξειδισώματα. Σε αυτά τα κυστίδια τα λιπαρά οξέα υφίστανται μια ειδική οξειδωτική διαδικασία, κατά την οποία παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) απευθείας από το $O_2^{\bullet-}$. 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 ξανθίνης, θειόλες και η αιμοσφαιρίνη κι άλλα που μπορούν να αυτοοξειδωθούν και να σχηματίσουν ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) (Picardo and Passi, 1997). Επιπλέον, μικρές ποσότητες των ριζών αυτών, που εντοπίζονται εξωκυτταρικά, παράγονται ως διακυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλά κύτταρα (Torres et al. 2002).

Υπεροξείδιο 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 συμμετέχει στην παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών OH^\bullet μέσω της αντίδρασης Fenton και να έχει επιβλαβή δράση (αντίδραση 2). Παράγεται στα υπεροξειδιοσώματα από το $\text{O}_2^{\bullet-}$ με τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Ωστόσο, μπορεί να έχει ευεργετικές δράσεις αφού χρησιμοποιείται από το ένζυμο θυρεοειδική δισμουτάση για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών και μερικές φορές δρα ως διακυτταρικό σηματοδοτικό μόριο.



Το OH^\bullet αποτελεί την πιο δραστική ρίζα κι έχει την ικανότητα, όταν σχηματίζεται *in vivo*, να αντιδρά άμεσα με πολλά μόρια που βρίσκονται γύρω της στο κύτταρο και να τα καταστρέφει. Η ρίζα υδροξυλίου, συνήθως, παράγεται όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία διασπά τους δεσμούς O-H του νερού με ταυτόχρονη παραγωγή των ριζών OH^\bullet και H^\bullet (Halliwell 2001, Mylonas & Kouretas 1999). 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 $\text{O}_2^{\bullet-}$ αλληλεπιδρά με το H_2O_2 (αντίδραση 4) παρουσία μετάλλων ιόντων σιδήρου ή χαλκού (Picardo and Passi, 1997).



Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet)

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου, NO^\bullet , η οποία παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη οδηγεί μαζί με τη ρίζα του σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$ στο σχηματισμό του περοξυνιτρίτη, ενός ιδιαίτερα επιβλαβούς μορίου. Ωστόσο, είναι από τα πιο διαδεδομένα σηματοδοτικά μόρια και συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ένας από τους παράγοντες που ρυθμίζει τη χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων, την αρτηριακή πίεση, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αγγειογένεση (Halliwell 2001). Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για την πρόκληση παθολογικών καταστάσεων όπως οι παθήσεις του αμφιβληστροειδούς και ο καταρράκτης, η περιοδοντίτιδα, οι δερματίτιδες και οι μυκητιάσεις, ο καρκίνος, ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος (π.χ. άσθμα), οι καρδιαγγειακές παθήσεις και το έμφραγμα, οι αθηρωματικές πλάκες και η αρτηριοσκλήρυνση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης, η γήρανση των

κυττάρων, διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson και διάφορες άλλες εγκεφαλικές βλάβες (Halliwell, 2001).

1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Στον οργανισμό υπάρχουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες εξουδετερώνονται από τους αμυντικούς του μηχανισμούς. Σε περίπτωση όμως που η συγκέντρωσή τους αυξηθεί πολύ λόγω υπερβολικής έκθεσης σε κάποιον ή κάποιους από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν, τότε αυτός δεν μπορεί να τις αντιμετωπίσει. Έτσι, οι ρίζες μπορεί να προκαλέσουν επικίνδυνες μεταλλάξεις και να καταστρέψουν τα κύτταρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις εμφανίζεται το οξειδωτικό στρες, οπότε οι οξειδωτικοί μηχανισμοί υπερτερούν των αντίστοιχων αντιοξειδωτικών. Συνεπώς, ως **οξειδωτικό στρες** ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού ή αλλιώς η διαταραχή στην προοξειδωτική – αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ του πρώτου, οδηγώντας σε πιθανή βλάβη (Halliwell 2001).

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου, καρδιαγγειακών νοσημάτων, δερματικών παθήσεων και πρόωρης γήρανσης του δέρματος και γενικά διαταραχών με μεγάλη συχνότητα στους σύγχρονους πληθυσμούς καθώς μπορεί να προκαλέσει την καταστροφή του DNA, τη λιπιδική υπεροξείδωση των μεμβρανών και την οξείδωση των πρωτεϊνών. Επίσης, εμπλέκεται σε ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson και του Alzheimer.

Πιο συγκεκριμένα το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από :

1. Μειωμένα αντιοξειδωτικά π.χ. μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα ένζυμα αντιοξειδωτικής άμυνας ή τοξικοί παράγοντες που μειώνουν τέτοιες άμυνες.
2. Αυξημένη παραγωγή ROS/RNS, π.χ. με έκθεση σε ανεβασμένα επίπεδα τοξινών που είναι οι ίδιες δραστικά είδη ή μεταβολίζονται για να παράγουν τέτοια είδη, είτε με υπερβολική ενεργοποίηση φυσικών παραγωγικών συστημάτων ROS/RNS.

Και να επιφέρει :

1. **Προσαρμογή** : για παράδειγμα με αυξημένη λειτουργία των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων.

2. Τραυματισμό ιστού : μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε όλους τους μοριακούς στόχους - DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια.

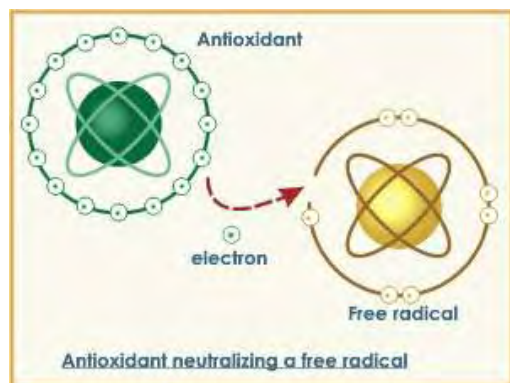
3. Κυτταρικό θάνατο : μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς,

i. **Νέκρωση :** το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του (π.χ. αντιοξειδωτικά όπως καταλάση ή GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου) στον περιβάλλοντα χώρο επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα.

ii. **Απόπτωση :** ενεργοποιείται ο εγγενής «μηχανισμός αυτοκτονίας» του κυττάρου· τα κύτταρα που αποπίπτουν δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση, γενικά, δεν προκαλεί βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα.

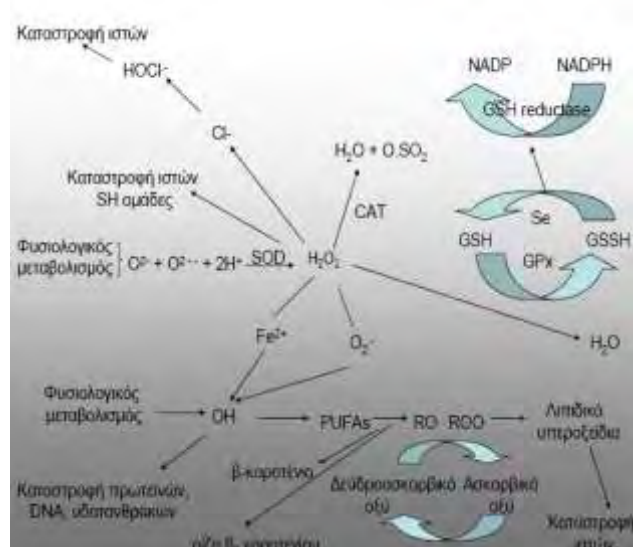
1.3 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Καθώς η προστασία από την επιβλαβή δράση των ελεύθερων ριζών καθίσταται αναγκαία, ο οργανισμός έχει αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς για να εμποδίζει τη βλάβη που μπορούν να προκαλέσουν οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ελέγχονται με εξαιρετική ακρίβεια μέσα στο κύτταρο. Οι οργανισμοί του ζωικού βασιλείου αμύνονται με τα αντιοξειδωτικά που σχηματίζουν στον οργανισμό τους (ενδογενή) και με εκείνα που λαμβάνουν με την τροφή τους (εξωγενή), ενώ τα φυτά με τις βιταμίνες και τα φλαβονοειδή που περιέχονται στα φρούτα, στα άνθη, στους σπόρους και τα φύλλα.



Εικόνα 3. Εξουδετέρωση μίας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό

Ως **αντιοξειδωτικό** χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ουσία που, όταν εμφανίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με εκείνες ενός οξειδωσιμου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell, 2001). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους **ενζυμικούς** και τους **μη ενζυμικούς**.

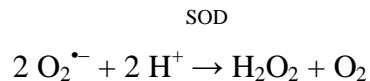


Εικόνα 4. Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελεύθερων ριζών

1.3.1 ENZYMΙΚΑ ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Στους ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν ένζυμα, που είτε δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, είτε μειώνουν την παραγωγή τους στο ενδοκυττάριο περιβάλλον (Blochina et al. 2003).

α) Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD): αποτελεί έναν από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Η SOD καταλύει την αυτοοξείδωση του $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντά σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων, τους συμπράγοντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο απαντούν τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZnSOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD (Papras, 1999).

Η SOD καταστρέφει τις $O_2^{\bullet-}$ με τη διαδοχική οξείδωση και την αναγωγή του μετάλλου του ενεργού κέντρου. Η CuZnSOD είναι ένα ένζυμο με μοριακό βάρος περίπου 32 kDa, το οποίο αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες. Φέρει στο ενεργό κέντρο ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου και η ενζυμική της δραστηριότητα είναι σχετικά ανεξάρτητη από το pH στο εύρος 5 – 9,5. Εκτός από το κυτταρόπλασμα απαντά και στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων.

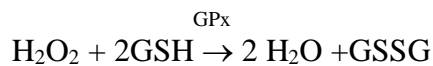
Η MnSOD είναι ένα ομοτετραμερές, με μοριακό βάρος 95 kDa, το οποίο περιέχει από ένα άτομο μαγγανίου στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας. Απαντάται στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων, όπου και απομακρύνει τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$ που σχηματίζονται τόσο στη θεμέλια ουσία όσο και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

Η εξωκυττάρια SOD είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη, η οποία φέρει χαλκό και ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο και έχει υψηλή συγγένεια για ορισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες, όπως η ηπαρίνη και η θευική ηπαράνη. Η ρύθμισή της στους ιστούς των θηλαστικών φαίνεται να διενεργείται από τις κυτταροκίνες και όχι από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Ε. Γιαννακοπούλου, 2009). Σε όλα τα κύτταρα, κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή Mn-SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers and Lennon, 2000).

β) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR): Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας αναχθείσας (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη NADPH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστηριότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH (Ε. Γιαννακοπούλου, 2009).

γ) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx): Σήμερα είναι πλέον γνωστές τέσσερις διαφορετικές *GPxs* (*GPxs1-4*) στα θηλαστικά, φέρουν όλες στην ενεργό θέση κυστεΐνη συνδεδεμένη με σελήνιο και συνεπώς η δράση τους εξαρτάται από την επάρκεια της τροφής σε σελήνιο.

Η μορφή που έχει ως συμπράγοντα το σελήνιο είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια κι έχει την ικανότητα να μετατρέπει τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων και το H₂O₂ σε H₂O και σταθερές αλκοόλες. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη και τη μετατρέπει στην οξειδωμένη μορφή της:



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). Τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων (Ε. Γιαννακοπούλου, 2009).

δ) Καταλάση (CAT): Είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό και οξυγόνο. Τα ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H₂A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



ε) Υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης. Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης ανάγει τόσο το H_2O_2 όσο και τα αλκυλ-υδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης, τη θειορεδοξίνη και τη NADPH (Chae Hz et al, 1994, Kwon Sj, 1994).

1.3.2 ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι μικρά μόρια, που μπορούν να λάβουν ή να δώσουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων 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) Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ): 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) και ασκεί τη δράση του είτε μεταφέροντας ένα άτομο υδρογόνου σε λιπιδικές ρίζες είτε εξουδετερώνοντας τη μονήρη κατάσταση του οξυγόνου. Επίσης, λειτουργεί ως συμπάρογοντας ενζύμου ενισχύοντας τη δράση της βιταμίνης E και της GSH (Fang et al, 2002) και φαίνεται να σχετίζεται με την πρόληψη ορισμένων καρκίνων, καρδιαγγειακών νοσημάτων, αλλά και του απλού κρυολογήματος.

β) 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 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 αυτοοξειδωση 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. Επίσης, ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C, συμμετέχει στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών ουσιών και παράλληλα είναι ικανή να εξουδετερώνει απευθείας τις ROS (May et al, 1996).

γ) Καροτενοειδή: Πρόκειται για χρωστικές, που υπάρχουν στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δε συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση υπάρχουν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο (Edge R et al, 1997). 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 (Gioannucci, 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 υπερίσχυσης 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). Επιπλέον μπορεί να μετατρέψει το ανιόν σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίου υδρογόνου. (Edge et al., 1997). Ορισμένα καροτενοειδή αποτελούν πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης A (ρετινόλη), η οποία έχει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Keys and Zimmerman, 1999).

δ) Μεταλλοθειονίνες: Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό stress. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του Cu^{2+} και του Zn^{2+} , στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, πλούσιων σε κυστεΐνη με ποσοστό που κυμαίνεται από 23-33%, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων, με δυνατότητα δέσμευσης 4-10 ατόμων βαρέων μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, τα οποία είναι πολύ τοξικά σε αυξημένες συγκεντρώσεις, όπως ο Cu (E. Γιαννακοπούλου, 2009).

ε) 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. Περιέχει μια μακριά, άπολη πολυακόρεστη ανθρακική αλυσίδα (μέχρι 50 άνθρακες), που επιτρέπει τη μεταφορά

ηλεκτρονίων μέσω των άπολων μεμβρανών που περιβάλλουν πολλές υποκυτταρικές δομές και κατόπιν διοχετεύει τα ηλεκτρόνια σε άλλες πιο απομακρυσμένες ενώσεις και τελικά στο οξυγόνο (McMurry, 1999).

στ) α-Τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε) και 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 α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή από τις 8 διαφορετικές μορφές της βιταμίνης Ε στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Halliwell and Gutteridge, 1995).

1.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Σχεδόν όλα τα φυτά και πολλοί μικροοργανισμοί περιέχουν διάφορα είδη και διαφορετικές ποσότητες φαινολικών συστατικών (Στ. Καράταγλης 1999). Στη φύση υπάρχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός φαινολικών και πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών. Ο μεγάλος αριθμός και η ποικιλία των φαινολών τις καθιστούν αρκετά ενδιαφέρονσα ομάδα των δευτερογενών φυτικών προϊόντων. Μερικές χιλιάδες μόρια με πολυφαινολική δομή έχουν ταυτοποιηθεί σε ανώτερα φυτά και μερικές εκατοντάδες σε εδάδιμα (I. Καλαϊτζάκης 1995, Cl. Manach et al 2004).

Σήμερα για τις περισσότερες από αυτές τις ενώσεις γνωρίζουμε ότι είναι παραπροϊόντα του μεταβολισμού, όπως φυτικές ορμόνες, οξειδοαναγωγικοί συμπαραγόντες, χρωστικές των φλαβονοειδών κ.λ.π. (Στ. Καράταγλης 1999). Οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται για να προστατέψουν το φυτό από το φωτοσυνθετικό στρες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου, τις πληγές, τα φυτοφάγα ζώα, ενώ εμπλέκονται και στην άμυνα κατά της υπερϊόδους ακτινοβολίας ή της επίθεσης από παθογόνα. Μία ομάδα τους, οι ανθοκυανίνες είναι πολύ διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και είναι υπεύθυνες για το χρώμα πολλών φρούτων, λαχανικών και λουλουδιών. Μία άλλη ομάδα, οι κατεχίνες συμβάλλουν στη γεύση του τσαγιού και του κρασιού, ενώ οι ταννίνες είναι στυπτικά συστατικά πολλών τροφίμων. Τα φαινολικά συστατικά των φρούτων και λαχανικών αποτελούν υποστρώματα για την ενζυμική αμαύρωση των τροφίμων, ενώ η σταθερότητα της ποιότητας πολλών τροφίμων εξαρτάται από την παρουσία διαφόρων φαινολικών συστατικών που δρουν ως αντιοξειδωτικά (Yang et al 2001, Α. Βαφοπούλου 2003) .

Οι φαινόλες είναι μόρια, τα οποία φέρουν στη δομή τους τουλάχιστον μία υδροξυλική ομάδα προσκολλημένη σε αρωματικό δακτύλιο. Στη φύση απαντώνται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη κ.ά. Ως προς τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές (κυρίως καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες), ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή και περιγράφονται ως τα πιο σταθερά βιοχημικά στοιχεία (I. Καλαϊτζάκης 1995, Στ. Καράταγλης 1999, Yang et al 2001).

Οι πολυφαινόλες αποτελούν άφθονα και σημαντικά θρεπτικά μικροσυστατικά της ανθρώπινης διατροφής στη βιβλιογραφία και εμφανίζονται πολλά στοιχεία για το ρόλο τους στην πρόληψη ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ακόμη, έχουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Manach et al, 2004).

1.4.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να χωριστούν σε τουλάχιστον δέκα διαφορετικές τάξεις ανάλογα με τη χημική δομή τους (Yang et al 2001). Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται οι πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή (Πίν. 1).

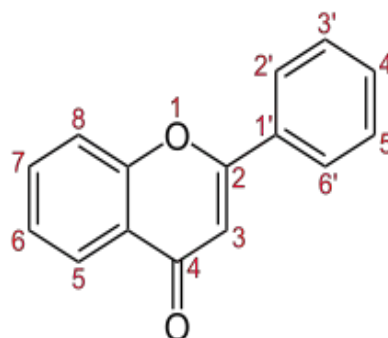
Πίνακας 1: Κατηγορίες πολυφαινολών (Vermerris & Nicholson, 2006)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΟΜΑΔΑ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ		ΔΟΜΗ
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΦΛΑΒΟΝΕΣ	Λουτεΐνη, Απιγενίνη		C ₁₅
	ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ	Κερκετίνη, Καμπφερόλη, Μυρικετίνη, Ρουτίνη		
	ΦΛΑΒΟΝΟΝΕΣ			
	ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ	Κατεχίνη, Επικατεχίνη, Γαλλοκατεχίνη, Προανθοκυανιδίνες		
	ΦΛΑΒΑΝΟΝΕΣ	Ναρινγκίνη, Εριοδικτυόλη, Εσπεριδίνη, Ταξιφολίνη		
	ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ (ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΕΣ, ΙΣΟΦΛΑΒΑΝΕΣ, ΙΣΟΦΛΑΒΑΝΟΝΕΣ, ΚΟΥΜΕΣΤΑΝΕΣ, ΠΤΕΡΟΚΑΡΠΑΝΕΣ)	Ντενζεΐνη, Γενιστεΐνη, Γλυκιτεΐνη		
	ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΔΙΝΕΣ - ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ	Πελαργονιδίνη, Κυανιδίνη, Δελφινιδίνη, Πετουνιδίνη, Μαλβιδίνη		
ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	Υδροξυβενζοϊκά οξέα	Γαλλικό, Ελλαγικό, Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	C ₆ - C ₁
		Υδροξυκινναμικά οξέα	Καφεϊκό, Φερουλικό, Κουμαρικό οξύ	C ₆ - C ₃
	ΣΤΙΑΒΕΝΙΑ	Ρεσβερατρόλη		C ₆ - C ₃ - C ₆
	ΛΙΓΝΑΝΙΑ	Ματαιρεσινόλη, Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη		Διμερή ή ολιγομερή

A. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Μία από τις μεγαλύτερες τάξεις των φυτικών φαινολικών ενώσεων είναι τα παράγωγα του φλαβανίου ή φλαβονοειδή, τα οποία έχουν πάρει το όνομά τους από το κίτρινο χρώμα μερικών ενώσεων της ομάδας αυτής. Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 5000 ενώσεις, οι οποίες δομικά σχετίζονται με την ένωση φλαβόνη. Τα παράγωγα αυτά μπορούν να διαιρεθούν σε έναν αριθμό υποομάδων, σύμφωνα με το στάδιο οξειδωσής τους στον κεντρικό ετεροδακτύλιο του φλαβανίου (I. Καλαϊτζάκης 1995).

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα (C₁₅) σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο που αποτελείται από τρεις άνθρακες (C6-C3-C6) (Σχ. 1). Η δομή αυτή είναι αποτέλεσμα της συνένωσης δύο προϊόντων που προέρχονται από δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια. Ο ένας αρωματικός δακτύλιος και η

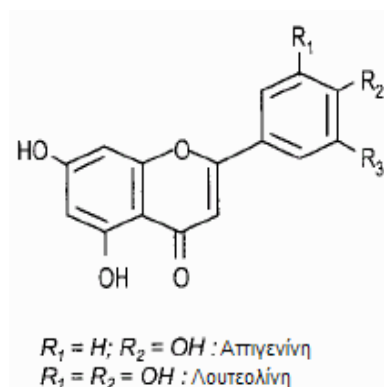


Εικόνα 5. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς

γέφυρα των τριών ατόμων του άνθρακα, είναι μια φαινυλοπροπανική ομάδα που προέρχεται μέσω φαινυλαλανίνης από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Τα 6 άτομα του άνθρακα του άλλου αρωματικού δακτυλίου προέρχονται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες και οι υδροξυλικές ομάδες βρίσκονται συνήθως στις θέσεις 5, 7, 4'. Τα περισσότερα φλαβονοειδή που υπάρχουν στη φύση συναντώνται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών. Ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου τα φλαβονοειδή ταξινομούνται κυρίως σε **φλαβόνες**, **φλαβονόλες**, **φλαβονόνες**, **φλαβανόλες**, **φλαβανόνες**, **ισοφλαβονοειδή** και **ανθοκυανιδίνες** (Στ. Καράταγλης 1999).

I. **Φλαβόνες**

Οι φλαβόνες είναι πιο άφθονες στα φρούτα και οι πηγές τους είναι κρεμμύδι, φλούδα φρούτων, μούρα, κόκκινα σταφύλια, τσάι, μπρόκολο, λεμόνι, ελιά, σέλινο, κόκκινη πιπεριά και μαϊντανός. Συναντώνται λιγότερο από τις φλαβονόλες και αποτελούνται κυρίως από γλυκοζίδια λουτεολίνης και απιγενίνης (Εικ.6). Δημητριακά όπως το



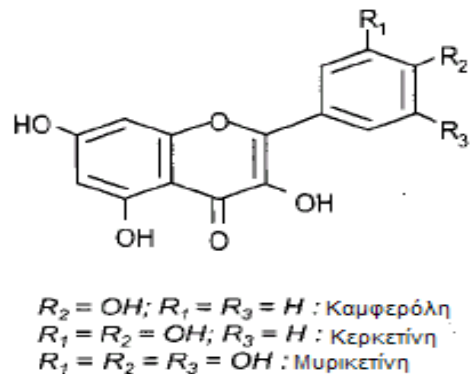
R₁ = H; R₂ = OH : Απιγενίνη
R₁ = R₂ = OH : Λουτεολίνη

Εικόνα 6. Χημική δομή φλαβονών

σιτάρι περιέχουν C-γλυκοζίδια των φλαβονών (King HGC, 1962, Feng Y et al, 1988, Sartelet H, 1996). Η φλούδα των εσπεριδοειδών περιέχει μεγάλες ποσότητες πολυμεθοξυλιωμένων φλαβονών, όπως τανγκερετίνη, νομπιλετίνη και σινενσετίνη που είναι και τα πιο υδροφοβικά φλαβονοειδή (Shahidi F et al, 1995).

II. Φλαβονόλες

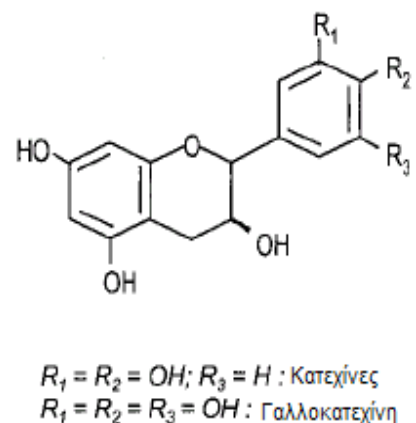
Η κερκετίνη είναι η κύρια φλαβονόλη της διατροφής, παρούσα σε φρούτα, λαχανικά και ποτά. Είναι ιδιαίτερα άφθονη στα κρεμμύδια και στο τσάι. Η κερκετίνη συνήθως συναντάται ως O-γλυκοζίδια, με D-γλυκόζη ως το πιο συχνό υπόλειμμα σακχάρου (Εικ.7). Έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 170 διαφορετικά γλυκοζίδια κερκετίνης. (Chung S Yang et al., 2001)



Εικόνα 7. Χημική δομή φλαβονολών

III. Φλαβανόλες

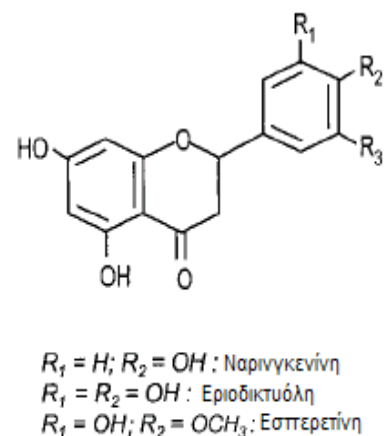
Οι κύριες φλαβανόλες είναι οι κατεχίνες, οι οποίες είναι άφθονες στο τσάι, στο κόκκινο κρασί και στη σοκολάτα (Εικ.8). Οι κατεχίνες του σταφυλιού και της σοκολάτας είναι κυρίως (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη, ενώ οι κατεχίνες του τσαγιού έχουν τους γαλλικούς εστέρες των κατεχινών ως κύρια συστατικά. Οι προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερείς φλαβανόλες (4 – 11 μονάδες) που βρίσκονται σε φυτικά υλικά όπως οι σπόροι σταφυλιού. Το κόκκινο κρασί περιέχει περισσότερα φλαβονοειδή από ότι ο χυμός σταφυλιού διότι η διαδικασία οινοποίησης εξάγει κάποια από τα φλαβονοειδή από τους σπόρους και τη σάρκα των σταφυλιών.



Εικόνα 8. Χημική δομή φλαβανολών

IV. Φλαβανόνες

Βρίσκονται στις τομάτες και σε κάποια αρωματικά φυτά όπως η μέντα, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις βρίσκονται μόνο στα εσπεριδοειδή. Οι κύριες αγλυκόνες φλαβανόνες είναι ναρινγκενίνη στο γκρέιπφρουτ, εσπερετίνη στα πορτοκάλια και εριοδικτυόλη στα λεμόνια (Εικ.9). Οι φλαβανόνες γενικά γλυκοζυλιώνονται από ένα δισακχαρίτη

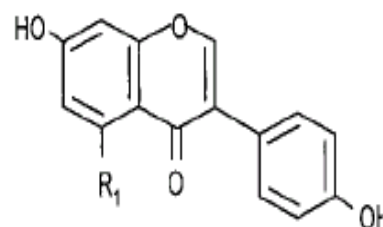


Εικόνα 9. Χημική δομή φλαβανονών

όπως η νεοεσπεριδόση η οποία προσδίδει πικρή γεύση (ναρινγκίνη) ή μία άγευστη ρουτινόζη (Manach et al., 2004).

V. Ισοφλαβόνες

Έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και αν και δεν είναι στεροειδή, έχουν υδροξυλικές ομάδες σε διάταξη ανάλογη με αυτή των υδροξυλίων στο μόριο της οιστραδιόλης (Εικ.10). Αυτό παρέχει ψευδοορμονικές ιδιότητες στις ισοφλαβόνες, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να δεσμεύονται στους υποδοχείς οιστρογόνων και κατά συνέπεια ταξινομούνται ως φυτοοιστρογόνα, τα οποία εμφανίζουν οιστρογονική, αντιοιστρογονική, αντικαρκινική, αντιϊική, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δράση (Mazur et al., 1998). Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και κυρίως στη σόγια και τα προϊόντα της. Τα τρία κύρια μόρια των ισοφλαβονών είναι γενιστεΐνη, ντενζεΐνη και γλυκιτεΐνη (Manach et al., 2004).

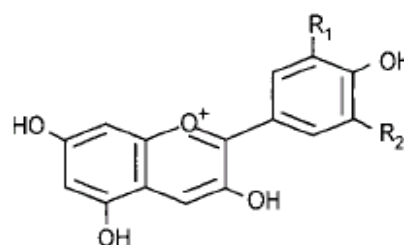


$R_1 = H$: Ντενζεΐνη
 $R_1 = OH$: Γενιστεΐνη

Εικόνα 10. Χημική δομή ισοφλαβονών

VI. Ανθοκυανίνες

Η πιο διαδεδομένη ομάδα των φλαβονοειδών χρωστικών είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για πάρα πολλά από τα κόκκινα, ροζ και μπλε χρώματα που παρατηρούνται σε διάφορα φυτικά όργανα. Αποτελούν την γλυκοσυλιωμένη μορφή των ανθοκυανιδινών (Εικ.11), οι οποίες απουσία σακχάρου είναι ασταθή μόρια. Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές διαλυμένες στο χυμό των κενотоπίων των επιδερμικών



$R_1 = R_2 = H$: Πελαργονιδίνη
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Κυανιδίνη
 $R_1 = R_2 = OH$: Δελφινιδίνη
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Πετουνιδίνη
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Μαλβιδίνη

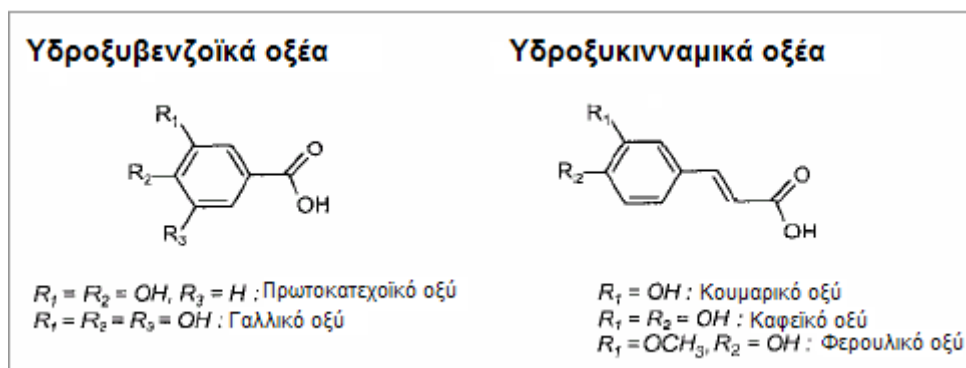
Εικόνα 11. Χημική δομή ανθοκυανιδινών

ιστών των λουλουδιών και των φρούτων. Η βιοσύνθεσή τους επηρεάζεται από την παρουσία της άμεσης ακτινοβολίας, την έλλειψη αζώτου, φωσφόρου, θείου καθώς και από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτές υπάρχουν σε διαφορετικές χημικές μορφές, με ή χωρίς χρώμα, αναλόγως το pH (Mazza G et al, 1993, Στ. Καράταγλης 1999). Αν και είναι ασταθείς με τη μορφή αγλυκόνης (ανθοκυανιδίνες), όταν υπάρχουν στα φυτά είναι ανθεκτικές στο φως, στο pH και σε συνθήκες οξείδωσης που πιθανόν να τις υποβαθμίζουν. Όσον αφορά στη διατροφή, ανθοκυανίνες βρίσκονται στο κόκκινο κρασί, σε κάποιες ποικιλίες δημητριακών και σε κάποια φυλλώδη και ριζώδη λαχανικά (μελιτζάνες,

λάχανο, φασόλια, κρεμμύδια, ραδίκια), ενώ είναι πιο άφθονες στα φρούτα. Η πιο συνηθισμένη ανθοκυανιδίνη στα τρόφιμα είναι η κυανιδίνη (Mannach et al., 2004).

B. ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

I. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ



Εικόνα 12. Βασική χημική δομή των δύο κατηγοριών φαινολικών οξέων.

Τα φαινολικά οξέα τα οποία αποτελούνται από έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο διακρίνονται σε υδροξυβενζοϊκά (C6-C1) και υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) και είναι παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέως, αντίστοιχα (Εικ. 12). Είναι άφθονα στις τροφές και ίσως υπολογίζονται περίπου στο ένα τρίτο των φαινολικών ενώσεων της διατροφής. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται ως εστέρες, οι οποίοι είναι είτε διαλυτοί και συσσωρεύονται στα κενοτόπια των κυττάρων είτε αδιάλυτοι ως συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των υδροξυβενζοϊκών οξέων είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ, τα οποία δεν βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες σε εδώδιμα φυτά, ενώ τα υδροξυκινναμικά οξέα που συναντώνται πιο συχνά είναι το καφεϊκό και φερουλικό οξύ (Soleas et al., 1997, Manach et al., 2004).

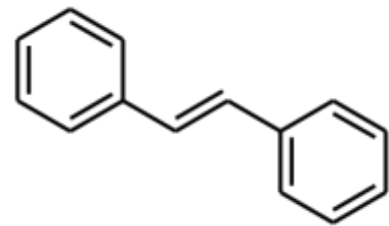
Το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε πολλά φρούτα όπως μήλο, δαμάσκηνο, τομάτα, και σταφύλι είτε σε ελεύθερη είτε σε εστεροποιημένη μορφή (Manach et al., 2004). Στο καφεϊκό οξύ έχουν αποδοθεί διάφορες βιολογικές δράσεις όπως αντιοξειδωτική δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, προ-οξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση, δεσμεύοντας μεταλλαξιγόνες ενώσεις. Μαζί με τις εστεροποιημένες μορφές του θεωρείται ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη (Da Cunha et al., 2004) και αντικαρκινική δράση (Stagos et al., 2005).

Το φερουλικό οξύ παράγεται από την μεθυλίωση μιας υδροξυλομάδας του καφεϊκού οξέος. Ενώνεται μέσω εστερικών δεσμών με την ημικυτταρίνη του κυτταρικού τοιχώματος

και είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ που βρίσκεται στους κόκκους των δημητριακών απαρτίζοντας το 90% της περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες καθώς επίσης και στα σταφύλια, στα αχλάδια και σε διάφορα άλλα φρούτα (Manach et al., 2004). Παρουσιάζει σημαντική ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, ωστόσο η αντιοξειδωτική του ικανότητα είναι μικρότερη από αυτή του καφεϊκού οξέος. Επιπλέον δεν παρουσιάζει ικανότητα χηλικής δέσμευσης ιόντων μετάλλων χαλκού και σιδήρου όπως το καφεϊκό οξύ (Psotova et al., 2003).

II. ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ

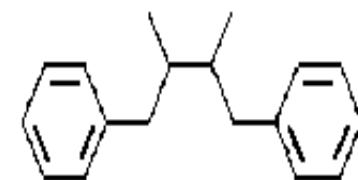
Τα στιλβένια είναι μία ακόμη ομάδα φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών και περιέχουν 2 φαινολικές ενώσεις συνδεδεμένες με ένα 2-C μεθυλικό δεσμό (Εικ. 13). Απαντώνται στη φύση σε μία μάλλον περιορισμένη κατανομή. Τα περισσότερα στιλβένια στα φυτά δρουν σαν αντιμυκητιακές φυτοαλεξίνες, ενώσεις οι οποίες συνήθως συντίθενται μόνο ως ανταπόκριση σε μόλυνση ή τραυματισμό. Το πιο εκτεταμένα μελετημένο στιλβένιο είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται στα σταφύλια, στο κρασί και στα φυστίκια (Chung S Yang et al., 2001) και έχει παρατηρηθεί ότι έχει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως είναι η αναστολή του σχηματισμού ελεύθερων ριζών. Εμφανίζει αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, οιστρογονική δράση και μπορεί να λειτουργήσει σαν ανοσοκατασταλτικός παράγοντας (Nishenametla et al, 2006).



Εικόνα 13. Βασική χημική δομή στιλβενίων.

Γ. ΛΙΓΝΑΝΙΑ

Τα λιγνάνια ανήκουν στην ομάδα των φυτοοιστρογόνων μαζί με τα φλαβονοειδή. Είναι διφαινολικές ενώσεις που περιέχουν μία 2,3 - διβενζυλβουτανική δομή που σχηματίζεται από το διμερισμό 2 μορίων κιναιμικού οξέος, κάτι που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα (Εικ. 14) (Chung S Yang et al, 2001).



Εικόνα 14. Βασική χημική δομή λιγνανίων

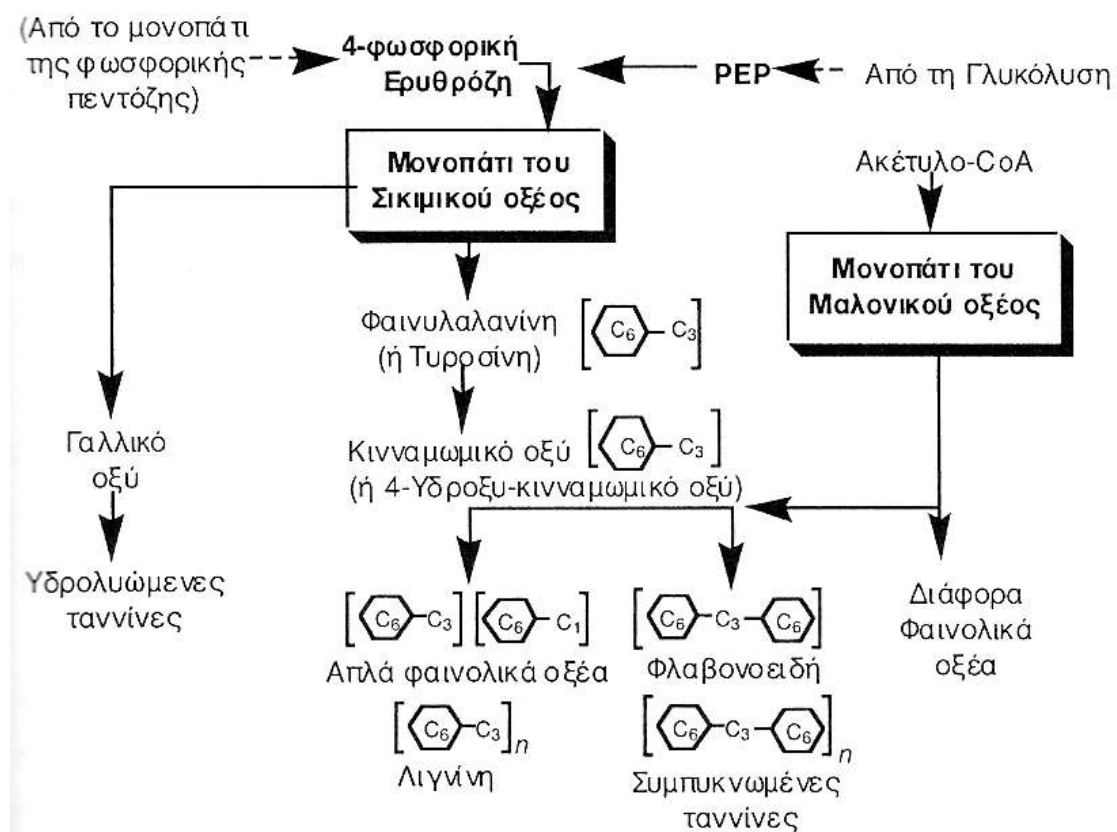
Βρίσκονται κυρίως στους φυτικούς κόκκους, στα φρούτα και τα λαχανικά. Απομονώνονται από τα ξυλώδη μέρη των φυτών, τα επικαλύμματα των σπόρων και τους αλεσμένους κόκκους. Οι σπόροι του λιναριού και του σουσαμιού είναι από τις πιο γνωστές πηγές των λιγνανίων. Άλλες πηγές αποτελούν τα δημητριακά (ρύζι, σιτάρι, βρώμη, κριθάρι)

σπόροι κολοκύθας, σόγια, μπρόκολα, φασόλια και μερικά είδη μούρων (Milder IE et al 2005). Φυτικά λιγνάνια είναι η ματαιρεσινόλη και η σεκοΐσολαρισιρεσινόλη, ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη και η εντερολακτόνη. Οι χαμηλές ποσότητες ματαιρεσινόλης και σεκοΐσολαρισιρεσινόλης που προσλαμβάνονται ως μέρος της κανονικής διατροφής δεν εξηγούν τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της εντεροδιόλης και εντερολακτόνης που κλασικά υπολογίζονται στο πλάσμα και την ουρία. Έτσι, αναμφίβολα υπάρχουν άλλα λιγνάνια φυτικής προέλευσης που είναι πρόδρομοι της εντεροδιόλης και εντερολακτόνης και που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί (Heinonen S et al, 2001). Μία από τις πιο γνώστες δράσεις τους είναι η αναστολή της προκαλούμενης από ορμόνη καρκινογένεσης αφού δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webb et Cullough, 2005).

1.4.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η βιοσύνθεση είναι μία ενδογενώς ελεγχόμενη διαδικασία που συμβαίνει τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης των φυτών όσο και όταν αυτά ανταποκρίνονται σε συνθήκες στρες, όπως μόλυνση, τραυματισμό και ακτινοβολία UV. Επιπλέον, η διαδικασία της βιοσύνθεσης ρυθμίζεται και από άλλους εξωγενείς παράγοντες όπως το φως και η θερμοκρασία (Naczk and Shahidi, 2004). Τα δευτερογενή φυτικά προϊόντα μπορούν να καταταγούν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον τρόπο της βιοσύνθεσης : **τερπένια, φαινόλες και συστατικά που περιέχουν άζωτο ή αλκαλοειδή**. Η Εικ. 15 δείχνει σε απλοποιημένη μορφή τα μονοπάτια που παίρνουν μέρος για τη βιοσύνθεση των δευτερογενών προϊόντων και τη συσχέτισή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό (Στ. Καράταγλης 1999).

Τα φαινολικά συστατικά είναι αρωματικά συστατικά που σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού του **σικιμικού οξέος** ή του μονοπατιού του **μαλονικού οξέος** κατά διάφορους τρόπους. Το μονοπάτι του **σικιμικού οξέος** συμμετέχει στη βιοσύνθεση των περισσότερων φυτικών φαινολών. Η βιοσυνθετική αυτή πορεία ανακαλύφθηκε από τον Davis με έρευνες σε αυξοτροφικά βακτήρια και η ονομασία της οφείλεται στο σικιμικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται ενδιάμεσως. Η σημασία της πορείας αυτής δεν οφείλεται μόνο στο σχηματισμό των φαινολών αλλά κυρίως επειδή προμηθεύει τον αρωματικό δακτύλιο για το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη) (Εικ. 15). Το μονοπάτι του **μαλονικού οξέος** αν και είναι σημαντική πηγή των φαινολικών δευτερογενών προϊόντων στους μύκητες και τα βακτήρια, είναι μικρότερης σημασίας στα ανώτερα φυτά (I. Καλαϊτζάκης 1995, Στ. Καράταγλης 1999).



Εικόνα 15. Βιοσύνθεση φυτικών πολυφαινολών από διαφορετικά μονοπάτια

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος αρχίζει από απλούς υδατάνθρακες, οι οποίοι προέρχονται από τη γλυκόλυση (PEP) και από το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (4-P-ερυθρόζη), και προχωράει προς αρωματικά αμινοξέα. Με τις βιοσυνθετικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται στο μονοπάτι του σικιμικού οξέος σχηματίζονται:

1. Τα αρωματικά αμινοξέα τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη
2. Τα κινναμικά οξέα, τα οποία προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη
3. Τα φαινυλοκαρβοξυλικά οξέα και
4. Οι π-βενζοκινόνες (Στ. Καράταγλης 1999).

Η φαινυλαλανίνη που παράγεται στα φυτά μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος είναι κοινός πρόδρομος των περισσότερων φαινολικών ενώσεων στα ανώτερα φυτά όπως των υδροξυκινναμικών οξέων (C6-C3) και των φλαβονοειδών (C6-C3-C6). Το πρώτο στάδιο για την βιοσύνθεσή τους προϋποθέτει το σχηματισμό της φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό (G.Soleas et al. 1997) και τη μετατροπή της σε κινναμικό οξύ μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Στην συνέχεια τα υδροξυκινναμικά οξέα και τα φλαβονοειδή παράγονται μέσω του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλοπροπανοειδή και του ειδικού μονοπατιού για τα φλαβονοειδή (Y. Sakihama et al. 2002). Πολλές ομάδες των

δευτερογενών φυτικών φαινολικών προϊόντων προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη, όπως για παράδειγμα τα οξέα: **κινναμικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, χλωρογενικό, πρωτοκατεχικό και γαλλικό** και θεωρούνται σπουδαία όχι μόνο γιατί είναι άφθονα σε ελεύθερη μορφή, αλλά διότι μετατρέπονται σε διάφορα παράγωγα τα οποία περιλαμβάνουν τις **φυτοαλεξίνες, τις κουμαρίνες, τη λιγνίνη, διάφορα φλαβονοειδή** όπως οι **ανθοκυανίνες, κ.λ.π.**

1.4.3 ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες για την απορρόφηση, τη φαρμακοκινητική, το μεταβολισμό και την απέκκριση των διατροφικών πολυφαινολών στους ανθρώπους καθώς και για τη συμπεριφορά τους στο γαστρεντερικό σύστημα (Catherine A. Rice et al., 1997). Οι πολυφαινόλες αν και είναι το πιο κοινό στοιχείο στην ανθρώπινη διατροφή δεν είναι απαραίτητα και το πιο δραστικό εντός του οργανισμού επειδή απορροφούνται φτωχά από το έντερο, μεταβολίζονται υψηλά ή εξαλείφονται ταχύτατα. Αυτή η φτωχή απορρόφηση κάποιων πολυφαινολών είναι που οδηγεί και σε ανεπαρκή συμπεράσματα στις κλινικές δοκιμές (Kidd PM, 2009). Επιπλέον, οι μεταβολίτες που βρίσκονται στο αίμα και στα όργανα στόχους και που επιφέρουν πεπτική ή ηπατική δραστηριότητα ίσως διαφέρουν από τις πρωταρχικές ουσίες όσον αφορά τη βιολογική δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό είναι ουσιαστικής σημασίας η εκτεταμένη γνώση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών ώστε να κατανοηθούν οι επιδράσεις τους στην υγεία.

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών συμβαίνει μέσω ενός κοινού μονοπατιού (Scalbert A et al, 2000). Οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο. Ωστόσο, οι περισσότερες πολυφαινόλες βρίσκονται στα τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοζιτών ή πολυμερών που δεν μπορούν να απορροφηθούν με την αρχική τους μορφή. Αυτές οι ουσίες, όπως π.χ. τα γλυκοζίδια των φλαβονοειδών πρέπει να υδρολυθούν από τα ένζυμα του εντέρου ή από την μικροχλωρίδα του κόλου προτού να απορροφηθούν. Όταν εμπλέκεται η χλωρίδα, η αποτελεσματικότητα της απορρόφησης συχνά μειώνεται διότι η χλωρίδα υποβιβάζει επιπλέον τις αγλυκόνες και αυτό απελευθερώνει και παράγει διάφορα απλά αρωματικά οξέα κατά τη διαδικασία. Στοιχεία έδειξαν ότι για να απορροφηθούν τα υδροξυαρωματικά οξέα, τα βενζοϊκά, τα φαινυλακεταμικά και τα υδροξυκινναμικά, απαιτείται διαχωρισμός των πολυφαινολών στο γαστρεντερικό σύστημα σε μορφές χαμηλότερης μοριακής μάζας πριν την απορρόφηση και μετατροπή σε υδροξυαρωματικά οξέα (Catherine A. Rice et al., 1997).

Κατά τη διάρκεια της πορείας της απορρόφησης, οι πολυφαινόλες συζεύγγονται στο λεπτό έντερο και αργότερα στο ήπαρ. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει κυρίως μεθυλίωση,

δράση κατά της οστεοπόρωσης, η προ-οξειδωτική, η αντιοξειδωτική, η μεταλλαξιγόνος και αντιμεταλλαξιγόνος και η χημειοπροστατευτική. Δράσεις που μπορεί να οφείλονται στο ότι δεσμεύοντας οι πολυφαινόλες τις ελεύθερες ρίζες, τις εμποδίζουν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA και μεταλλάξεις που αποτελούν σημαντικό βήμα για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας (Ferguson et al 2001, R. J. Nijveldt et al 2001, W. Ren et al 2003, Y.Yilmaz et al 2004).

A) ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η χαρακτηριστική χημική δομή των πολυφαινολών τις καθιστά ιδανικά μόρια με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Οι δύο βασικές προϋποθέσεις για το χαρακτηρισμό των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικών μορίων, είναι η παρεμπόδιση ή/και καθυστέρηση της οξείδωσης του υποστρώματος από χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα και η δευτερογενής ρίζα που προκύπτει μετά τη δέσμευση της αρχικής ελεύθερης ρίζας να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans et al., 1996). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ότι δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και ότι μπορούν να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Blokchina et al., 2003, Ferguson, 2001).

Οι πολυφαινόλες δρουν κυρίως ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες και δημιουργούν πολυφαινολικές ρίζες, οι οποίες στην πλειοψηφία τους είναι σταθερές και έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ώστε να μην είναι δραστικό και ικανό να οδηγήσει σε νέα σειρά αντιδράσεων (Ferguson et al. 2001) (αντιδράσεις 1, 2)



PPH : Πολυφαινόλες

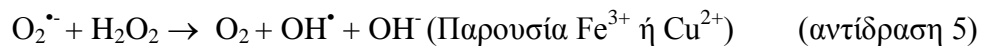
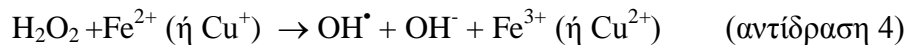
RO* : Ελεύθερες ρίζες

PP* : Πολυφαινολικές ρίζες



Η ικανότητα των πολυφαινολών να δεσμεύουν χηλικά ιόντα μετάλλων (Fe^{2+} και Cu^{2+}) αποτελεί έναν ακόμα μηχανισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Τα ιόντα χαλκού και σιδήρου μπορούν μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και της αντίδρασης Fenton

(αντιδράσεις 3, 4, 5) να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al. 2001).



Ορισμένες πολυφαινόλες αναστέλλουν τη δράση ενζύμων, που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών όπως η κυκλοξυγενάση, η λιποοξυγενάση (Ferguson et al. 2001, Rice-Evans et al. 1996) και η οξειδάση της ξανθίνης, η οποία μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ και παράγει $\text{O}_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (Cotelle 2001). Ορισμένες πολυφαινόλες επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως μεταλλοθειονίνες, οι οποίες στη συνέχεια δεσμεύουν χαλκό και σίδηρο και εμποδίζουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Ferguson et al. 2001). Επίσης, επιδρούν στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (APE), το οποίο βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων, που κωδικοποιούν για αντιοξειδωτικά ένζυμα. Λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους οι πολυφαινόλες μπορούν και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Δρουν ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες και οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών (αντίδραση 6). Με αυτό τον τρόπο εμποδίζουν τις ελεύθερες ρίζες να οξειδώσουν είτε τα λιπίδια είτε άλλα μόρια και να προκαλέσουν κυτταρικές αλλοιώσεις.



Όπου : RO^{\bullet} : η ελεύθερη ρίζα, PPH: η πολυφαινόλη, PP^{\bullet} : η φαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό και να οδηγήσει σε μία νέα σειρά αντιδράσεων. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (αντίδραση 7) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



Από την άλλη μεριά τα φλαβονοειδή αντιδρούν άμεσα με το δραστικό τμήμα της ρίζας δεσμεύοντας έτσι και διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου. Οι υδροξυλικές ομάδες των φλαβονοειδών είναι πολύ δραστικές και αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, ενώ οι ρίζες των

φλαβονοειδών που παράγονται είναι λιγότερο δραστικές από τις αρχικές ελεύθερες ρίζες (αντίδραση 8) (Nijveldt et al., 2001).



B) ΠΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι πολυφαινόλες εκτός από αντιοξειδωτική παρουσιάζουν και προοξειδωτική δράση. Αυτό επιτυγχάνεται συμμετέχοντας άμεσα ή έμμεσα στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών και κατ' επέκταση στην οξείδωση διαφόρων κυτταρικών υποστρωμάτων (Cotelle, 2001). Όταν μία πολυφαινόλη αντιδρά με μία ελεύθερη ρίζα, η ρίζα που παράγεται είναι οξειδοαναγωγικά ασταθής και ικανή να αντιδράσει περαιτέρω. Η ικανότητα των πολυφαινολών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες συνήθως συνοδεύεται από το σχηματισμό σταθερών φαινολικών ριζών ή ριζών που αντιδρούν με άλλες ρίζες και οδηγούν στον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων παραγωγής νέων ελευθέρων ριζών με τη δημιουργία αδρανών προϊόντων. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις που όταν κάποια φλαβονοειδή δεσμεύουν μία ελεύθερη ρίζα, η φαινολική ρίζα που παράγεται, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να μην είναι σταθερή, να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο ή τη γλουταθειόνη (GSH) και να οδηγήσει στην παραγωγή ριζών σουπεροξειδίου O_2^\bullet . Το σουπεροξείδιο με τη σειρά του μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , το οποίο μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγεί στον σχηματισμό των ιδιαίτερα δραστικών ριζών υδροξυλίου OH^\bullet (Y.Sakihama et al. 2002).

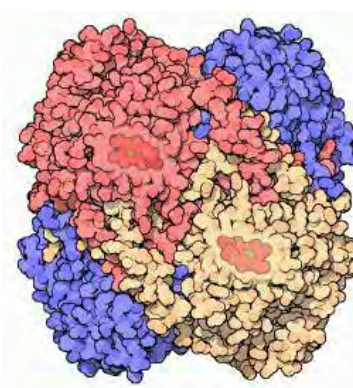
Τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι ποικίλες τάξεις των φυτικών πολυφαινολών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, των κουρκουμινοειδών και των ταννινών, είναι ικανές να καταλύουν τη διάσπαση του οξειδώσιμου κυτταρικού DNA ιδιαίτερα με την παρουσία μεταβατικών μεταλλικών ιόντων όπως ο χαλκός και ο σίδηρος. Για παράδειγμα, η ρεσβερατρόλη είναι ικανή να κινητοποιεί ενδογενή ιόντα χαλκού οδηγώντας σε οξειδωτικό σπάσιμο του κυτταρικού DNA, όπως και το καφεϊκό οξύ (S. H. Bhat et al, 2007). Παρουσία O_2 , μέταλλα όπως ο χαλκός (Cu) και ο σίδηρος (Fe), συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανακύκλωσης των φαινολικών ριζών, οι οποίες καταλήγουν σε σχηματισμό ROS και άλλων οργανικών ριζών οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, στα λιπίδια και σε άλλα βιολογικά μόρια (Y.Sakihama et al. 2002, G. Galati et O'Brien 2004).

Η προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών φαίνεται να είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι δομικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών τα οποία είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική τους δράση είναι σημαντικά και για την προ-οξειδωτική. Η προοξειδωτική δραστηριότητα

πιστεύεται ότι είναι ευθέως ανάλογη ως προς τον συνολικό αριθμό των υδροξυλικών ομάδων των πολυφαινολών, ενώ η γλυκοσυλίωση και η μεθυλίωση των υδροξυλικών ομάδων μετριάζει την προοξειδωτική συμπεριφορά τους (Kelly E. Heim et al, 2002). Η προοξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση βρίσκονται σε μία ισορροπία, η οποία εξαρτάται από την ικανότητά τους να ανάγουν τα μέταλλα και να τα δεσμεύουν χηλικά καθώς και από την ικανότητά τους να αντιδρούν με το O₂. Η αντίδραση με το O₂ εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική ισχύ και τον χρόνο ημιζωής της φαινολικής ρίζας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ημιζωής της φαινολικής ρίζας τόσο πιθανότερο είναι η ρίζα να αλληλεπιδράσει με το O₂ και να οδηγήσει στον σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών (Y.Sakihama et al. 2002).

1.5 ΚΑΤΑΛΑΣΗ

Η καταλάση (Εικ. 16) είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες αποτελούν μέρος της ενεργού θέσης του ενζύμου κι έτσι επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂ και να καταλύει τη διάσπαση του σε νερό και οξυγόνο. Τα ιδανικό pH της καταλάσης είναι το ουδέτερο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να καταλύσει, σε κανονική θερμοκρασία, τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, με ταχύτητα 83.000 μορίων το δευτερόλεπτο. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ. Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. (Halliwell and Gutteridge, 1998)

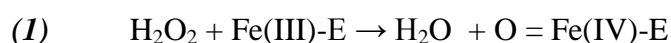


Εικόνα 16. Η δομή της καταλάσης

Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη:

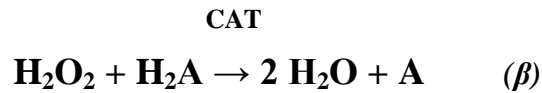


Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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

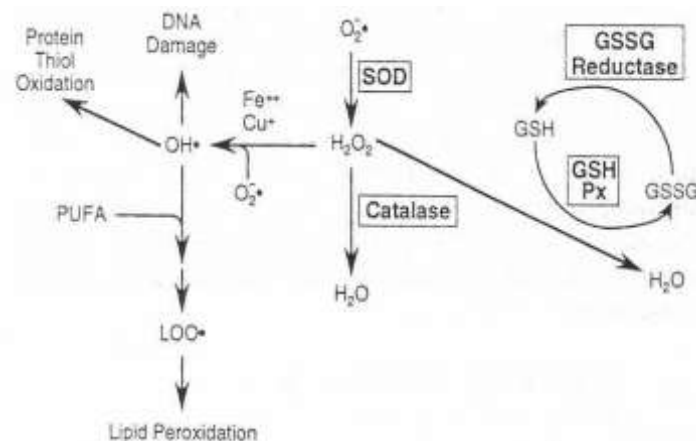
Με την αντίδραση (α), η καταλάση εμποδίζει τη μετατροπή του H_2O_2 σε υδροξυλικές ρίζες. Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 προς όφελος του οργανισμού, για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρήση αιθανόλης ως υπόστρωμα, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Απουσία καταλάσης οι αντιδράσεις (α) και (β) πραγματοποιούνται αυθόρμητα αλλά με πολύ αργό ρυθμό.

Μόρια που αναστέλλουν την καταλάση *in vitro* είναι το σουρικό οξύ, το αζίδιο του νατρίου, η υποξανθίνη καθώς και η ξανθίνη (Van Pilsum, 1953). Ωστόσο, ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης δεν έχει καθοριστεί ακόμη πλήρως.

1.6 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H_2O_2)



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

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι μέλος της οικογένειας των δραστικών μορφών του οξυγόνου (ROS), που σχηματίζονται με μερική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται συνεχώς ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και μέσω αντιδράσεων με φάρμακα και τοξίνες του περιβάλλοντος (Εικ.17). Είναι ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό καθώς μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή χημική βλάβη του DNA, του RNA, των πρωτεϊνών και των ακόρεστων λιπιδίων. 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). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν ενοχοποιηθεί για διάφορες παθολογικές διεργασίες, όπως η επιμόλυνση τραυμάτων, ο καρκίνος, οι φλεγμονώδεις νόσοι και το γήρας. Το κύτταρο διαθέτει διάφορους προστατευτικούς μηχανισμούς που χρησιμεύουν στην ελαχιστοποίηση των τοξικών δυνατοτήτων αυτών των ενώσεων (Pamela C. Champe, Richard A. Harvey, 1997). Πέρα από την οξειδωτική του δράση το H_2O_2 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).

1.7 ΜΕΡΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ

1.7.1 ΣΤΑΦΥΛΗ

Η σταφυλή είναι η γονιμοποιηθείσα ταξιανθία που αποτελεί την καρποταξία της αμπέλου με επιμέρους καρπούς, τις ράγες. Οι ωοθήκες των ανθέων μετατρέπονται σε ράγες και οι σπερμοβλάστες σε γίγαρτα (Σταύρακας, 1997).

1.7.2 ΒΟΣΤΡΥΧΟΣ

Ο βόστρυχος είναι ο κύριος άξονας ή ράχη της σταφυλής μαζί με τις διακλαδώσεις του. Το τμήμα της ράχης από το σημείο πρόσφυσης στο βλαστό μέχρι την πρώτη διακλάδωσή της ονομάζεται μίσχος (1-12cm). Οι πιο λεπτές διακλαδώσεις του βοστρύχου είναι οι ποδίσκοι, οι οποίοι καταλήγουν σε μία διόγκωση, την κολλύρα, στην οποία προσκολλάται η ράγα κι έτσι στο εσωτερικό της στέλνονται οι αγγειακές δέσμες. Ο βόστρυχος αποτελεί το 2-5% του βάρους της σταφυλής (Σταύρακας, 1997). Η χημική του σύσταση είναι φτωχή σε σάκχαρα (<10g/1000g) με σημαντική περιεκτικότητα σε εξουδετερωμένα οξέα γιατί περιέχει μεγάλη ποσότητα ανόργανων ιόντων. Είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε πολυφαινόλες και η συμμετοχή του στην εκχύλιση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής και την αύξηση της ενεργούς οξύτητας (pH) (Τσακίρης, 1998). Ο βόστρυχος είναι ο «σκελετός» που φέρει τις ράγες και ο αγωγός που μεταφέρει ουσίες από τα φύλλα και το ριζικό σύστημα του πρέμνου (Σταύρακας, 1997).

1.7.3 ΡΑΓΑ

Η ράγα (Εικ.18) είναι ο καρπός της αμπέλου, ο οποίος προέρχεται από τους ιστούς της ωθήκης και φέρεται πάνω στην κολλύρα του ποδίσκου που είναι η τελευταία διακλάδωση του βοστρύχου. Η ράγα είναι σαρκώδης και απ' έξω προς τα μέσα περιλαμβάνει το φλοιό, τη σάρκα και τη φλοιώδη μεμβράνη η οποία περιβάλλει τα γίγαρτα (Σταύρακας, 1997).



Εικόνα 18.Ράγα σταφυλιού

1.7.4 ΦΛΟΙΟΣ

Ο φλοιός αποτελείται από την επιδερμίδα και μερικά στρώματα κυττάρων κάτω από αυτήν. Τα στρώματα των κυττάρων προς την επιδερμίδα είναι λεπτά και γίνονται παχύτερα προς το εσωτερικό. Τα σταφύλια που προορίζονται για οινοποίηση έχουν συνήθως σκληρή φλούδα και χυμώδη σάρκα αντίθετα με τα επιτραπέζια που έχουν φλούδα λεπτή και σάρκα τραγανή. Η επιδερμίδα σχηματίζεται από ένα μόνο στρώμα κυττάρων και καλύπτεται από ένα κηρώδες επικάλυμμα, το οποίο αποτελείται κατά τα 2/3 από ολεανικό οξύ και κατά το 1/3 από διάφορες άλλες ενώσεις, όπως αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα και αλδεΐδες. Η φλούδα περιέχει πολύ μικρή ποσότητα σακχάρων. Είναι πλούσια σε κυτταρίνη, πηκτίνες και πρωτεΐνες. Περιέχει κυρίως κιτρικό και λίγο τρυγικό οξύ. Η φλούδα είναι εξίσου πλούσια με τους βόστρυχους σε πολυφαινόλες. Οι ερυθρές ποικιλίες περιέχουν διπλάσια ποσότητα πολυφαινόλων από αυτή των λευκών ποικιλιών. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται σε δύο ή τρία στρώματα κυττάρων κάτω από την επιδερμίδα, αν και σε ορισμένες ποικιλίες υπάρχουν και στη σάρκα. Η παρουσία αρωματικών ενώσεων είναι χαρακτηριστικό της φλούδας. Με βάση τα αρωματικά συστατικά τους, οι ποικιλίες των σταφυλιών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στις αρωματικές ποικιλίες όπως τα μοσχάτα και σε ποικιλίες που δεν έχουν χαρακτηριστικό άρωμα. Τα αρώματα των αρωματικών ποικιλιών είναι γνωστά και ανήκουν στα τερπένια. Βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα όταν τα σταφύλια φτάσουν σε πλήρη ωρίμανση (Τσακίρης, 1998).

1.7.5 ΣΑΡΚΑ

Η σάρκα αποτελείται από μεγάλα κύτταρα. Κάτω από τη λεπτή κυτταρική μεμβράνη υπάρχει ένας πολύ λεπτός ιστός κυτταροπλάσματος με τον πυρήνα προς τα τοιχώματα και ολόκληρο το εσωτερικό του καταλαμβάνεται από τον κυτταρικό χυμό (γλεύκος). Τα σημαντικότερα σάκχαρα της σάρκας είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Η περιεκτικότητα σε

σάκχαρα ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και το βαθμό ωρίμανσης. Οι ράγες που είναι πιο κοντά στις κληματόβεργες είναι πιο πλούσιες σε σάκχαρα. Τα οξέα του γλεύκους είναι κυρίως το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό. Τα οξέα και οι βάσεις έχουν αντίθετη κατανομή στα διάφορα μέρη της ράγας. Από τα ανόργανα ιόντα, το κάλιο, εκφρασμένο σε οξείδιο, αποτελεί το 50% του συνόλου των ανόργανων ιόντων. Τα αζωτούχα συστατικά βρίσκονται σε μορφή ανόργανη (NH₄⁺) ή σε οργανική ως αμινοξέα, πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες. Συνήθως οι ποικιλίες του αμπελιού που είναι πλούσιες σε οξέα και αμινοξέα (Τσακίρης, 1998).

1.7.6 ΓΙΓΑΡΤΑ

Τα γίγαρτα είναι τα κουκούτσια των σταφυλιών και προέρχονται από την ανάπτυξη της ωοθήκης που γονιμοποιήθηκε. Κάθε ράγα περιέχει 4 γίγαρτα αλλά συχνά υπάρχουν λιγότερα. Τα γίγαρτα των Ευρωπαϊκών ποικιλιών (*V. Vinifera L.*) αποτελούν το 1-7% ή και περισσότερο του βάρους της ράγας (Σταύρακας, 1997). Η σύστασή τους σε γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια είναι: νερό 25-45, σάκχαρα - πολυσακχαρίτες 34-36, έλαια 13-20, ταννίνες 4-6, αζωτούχα συστατικά 4-6,5, ανόργανα συστατικά 2-4, λιπαρά οξέα 1. Ορισμένα από τα συστατικά που βρίσκονται στην περιφέρεια, όπως τα φαινολικά, τα αζωτούχα και τα φωσφορούχα, είναι ιδιαίτερα διαλυτά κατά τη διάρκεια της εκχύλισης (Τσακίρης, 1998).

1.7.7 ΣΤΕΜΦΥΛΑ

Τα στέμφυλα είναι το σύνολο από φλούδες, κουκούτσια, βόστρυχους και τα υπόλοιπα της οινοποίησης (πίνακας 1) (Τσακίρης, 1998).

Πίνακας 1. Χημική σύσταση των σταφυλιών (Τσέτουρας, 1998)

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ					
ΒΟΣΤΡΥΧΟΣ		ΡΑΓΑ		ΦΛΟΙΟΣ	
Νερό	65-85%	Φλοιός	7-12%	Νερό	75-80%
Σάκχαρα	1%	Σάρκα	83-87%	Όξινα συστατικά	1-1,5%
Ταννίνες	2-4%	Γίγαρτα	2-6%	Ανόργανες ενώσεις	1,5-2%
Αζωτούχες ουσίες	1-1,5%			Ταννίνες	1-2%
Ανόργανες ουσίες	2-2,5%			Αζωτούχες ενώσεις	1,5-2%
Ρητίνες	1%			Διάφορες ουσίες	10-15%
ΓΙΓΑΡΤΟ			ΣΑΡΚΑ		
Νερό	36-40%	Νερό 65-80%			
Ελαιώδεις ουσίες	10-20%	Ζυμώσιμα σάκχαρα 17-25%			
Τανίνες	5-8%				
Αζωτούχες ουσίες	5%				
Όξινα συστατικά	1%				
Υδρογονάνθρακες	34-36%				
Ανόργανες ουσίες	2-4%				

1.8 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ

1.8.1 ΜΑΝΔΗΛΑΡΙΑ

Η ποικιλία Μανδηλαριά (Εικ.19) είναι από τις πιο πλούσιες σε σκούρο χρώμα ποικιλίες αμπέλου, γηγενής του αιγαιοπελαγίτικου χώρου και η πιο δημοφιλής. Καλλιεργούνταν αρχικά στις Κυκλάδες και τα Δωδεκάνησα, τη Ρόδο και την Κρήτη, περιοχές από τις οποίες επεκτάθηκε η καλλιέργειά της στην Πελοπόννησο, την Αττική, τη Βοιωτία, την Εύβοια, τη Θεσσαλία και τη Μακεδονία, καταλαμβάνοντας συνολικά μια έκταση που ξεπερνά τα 15.000 στρέμματα. Στη Σαντορίνη, παράγονται τα περισσότερα τοπικά κόκκινα κρασιά. Έχει σχετικά χαμηλή οξύτητα, στερείται έντασης αρωμάτων και γεύσεων και δίνει κρασιά μέσου έως χαμηλού αλκοολικού τίτλου, μέτριας οξύτητας, πλούσια σε χρώμα. Η Μανδηλαριά λειτουργεί ως μέσο χρωματισμού σε πολλά μίγματα κρασιών.



Εικόνα 19. Τα σταφύλια της ποικιλίας Μανδηλαριά

1.8.2 ΑΣΣΥΡΤΙΚΟ

Η ποικιλία Ασύρτικο (Εικ.20) είναι ποικιλία του Αιγαίου. Καλλιεργείται σε μεγάλη έκταση στην Σαντορίνη αλλά και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας (Χαλκιδική, Στερεά Ελλάδα). Το μοναδικό ηφαιστειογενές έδαφος της Σαντορίνης προσδίδει στην ποικιλία ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που μεταδίδονται στο κρασί. Χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα να ωριμάζει σε προχωρημένο βαθμό χωρίς να ελλατώνεται η οξύτητα κι έτσι τα κρασιά διαθέτουν αρκετά οξέα που τα ισορροπούν. Τα σταφύλια είναι μέτρια ως μεγάλα, κυλινδρικά, πυκνόραγα. Οι ράγες είναι μεγάλες σφαιρικές, με φλοιό μέτριου πάχους, διάφανο, κιτρινόχρυσο και σάρκα εύχμη, μαλακιά.



Εικόνα 20. Τα σταφύλια της ποικιλίας Ασύρτικο

1.8.3 ΒΗΛΑΝΑ

Η ποικιλία Βηλάνα (Εικ.21) είναι η πιο σημαντική λευκή ποικιλία της Κρήτης. Καλλιεργείται στους νομούς Ηρακλείου και Λασιθίου και σποραδικά στους νομούς Ρεθύμνης και Χανίων και καταλαμβάνει συνολικά μια έκταση κοντά στα 3.500 στρέμματα. Η Βηλάνα είναι καλύτερη όταν οινοποιείται αναγωγικά, καθώς οξειδώνεται πολύ εύκολα.



Εικόνα 21. Τα σταφύλια της ποικιλίας Βηλάνα

1.8.4 ΑΘΗΡΙ

Η ποικιλία Αθήρι (Εικ.22) αποτελεί μία από τις παλαιότερες λευκές ποικιλίες των νησιών του Αιγαίου. Καλλιεργείται κυρίως στις Κυκλάδες, τα Δωδεκάνησα και την Κρήτη αλλά τα τελευταία χρόνια η καλλιέργειά της έχει επεκταθεί σε όλη την Ελλάδα. Μπορεί να προσαρμοστεί και να αποδώσει ικανοποιητικά σε διάφορα εδάφη. Τα σταφύλια της είναι συνήθως μετρίου μεγέθους, κυλινδροκωνικού σχήματος και μέτριας πυκνότητας. Οι ράγες είναι μετρίου μεγέθους, σφαιρικού σχήματος. Ο φλοιός έχει πρασινοκίτρινο χρώμα, η επιδερμίδα του είναι λεπτή και ελαστική και η σάρκα είναι μαλακή, άχρωμη και χυμώδης, με λεπτό χαρακτηριστικό άρωμα.



Εικόνα 22. Τα σταφύλια της ποικιλίας Αθήρι

1.8.5 ΒΟΗΔΟΜΑΤΟ

Η ποικιλία Βοηδόματο (Εικ.23) καλλιεργείται σε διάφορες ελληνικές περιοχές όπως Κρήτη, Μεσσηνία, Αρκαδία, Θράκη, αλλά στη Σαντορίνη ωριμάζει στα μέσα Αυγούστου, τουλάχιστον είκοσι μέρες νωρίτερα από ό,τι αλλού. Είναι ποικιλία πολύ ζωνρή και παραγωγική, ευαίσθητη στις ασθένειες και ανθεκτική στην ξηρασία. Αποκτά βαθύ χρώμα, με σταφύλια μεγάλα, που έχουν φλοιό κυανομέλανο, υψηλά επίπεδα σακχάρων και μικρή οξύτητα.



Εικόνα 23. Τα σταφύλια της ποικιλίας Βοηδόματο

1.8.6 ΜΑΥΡΟΤΡΑΓΑΝΟ

Η ποικιλία Μαυροτράγανο (Εικ.24) είναι παραδοσιακή σε ορισμένα μέρη της Σαντορίνης. Πρόκειται για ένα κλήμα μετρίως παραγωγικό και σχετικά ευαίσθητο στην ανυδρία, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα μπορεί να επιτευχθούν σε λιγότερο ξηρές περιοχές της Ελλάδας. Η ωρίμανση ολοκληρώνεται στο δεύτερο μισό του Αυγούστου. Δεν είναι ιδιαίτερα παραγωγική ποικιλία με τρία - τέσσερα τσαμπιά ανά πρέμνο στην καλύτερη περίπτωση.



Εικόνα 24. Τα σταφύλια της ποικιλίας Μαυροτράγανο

1.8.7 ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ

Η ποικιλία Κοτσιφάλι (Εικ.25) είναι εκλεκτή έγχρωμη ελληνική ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στην Κρήτη και σποραδικά στις Κυκλάδες. Οι περισσότερες καλλιεργούμενες εκτάσεις (περίπου 11.500 στρέμματα) βρίσκονται στο νομό Ηρακλείου της Κρήτης. Τα σταφύλια της είναι συνήθως μετρίου μεγέθους, πυκνόρραγα και έχουν κυλινδροκωνικό σχήμα. Οι ράγες είναι μετρίου μεγέθους και ελλειψοειδούς σχήματος. Χαρακτηριστικό της ποικιλίας είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα που εύκολα αποκτούν τα σταφύλια και η έλλειψη σταθερότητας του χρώματος των παραγόμενων οίνων.



Εικόνα 25. Τα σταφύλια της ποικιλίας Κοτσιφάλι

1.8.8 ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ

Η ποικιλία Αγιωργίτικο (Εικ.26) θεωρείται μία καλύτερες στον κόσμο και ίσως η σημαντικότερη κόκκινη ελληνική ποικιλία από άποψη διεθνούς αναγνώρισης. Δίνει κρασιά με βαθύ κόκκινο χρώμα και έντονα χαρακτηριστικά. Τα σταφύλια της είναι μεσαίου μεγέθους, πυκνόρραγα, κυλινδροκωνικού σχήματος. Πολλές φορές παρατηρούνται και πτερυγωτά σταφύλια. Οι ράγες είναι σφαιρικές και έχουν μικρό έως μέτριο μέγεθος. Ο φλοιός τους είναι κυανομέλανου χρώματος, και η σάρκα μαλακιά, άχρωμη και χυμώδης. (Τσέτουρας 1998, Λαζαράκης 2005).



Εικόνα 26. Τα σταφύλια της ποικιλίας Αγιωργίτικο

1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με την ευεργετική επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου. Έναυσμα της παρούσας εργασίας ήταν προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα των σταφυλιών φαίνεται να έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, χημειοπροστατευτικές, αλλά και άλλες ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης 27 διαφορετικών εκχυλισμάτων διαφόρων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (λευκά και κόκκινα σταφύλια) στην ενζυμική δραστηριότητα της καταλάσης του αίματος. Η καταλάση είναι ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που ενεργοποιείται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και ειδικά κατά την άσκηση. Για την επίτευξη του στόχου παρατηρήθηκε η αναστολή εξουδετέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από την καταλάση.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

KH₂PO₄ (SIGMA,USA)

Na₂HPO₄ (Panreac,Spain)

H₂O₂ (Merck, Germany)

2.1.2. Εκχυλίσματα

Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν διαχωρισμένα ανάλογα με το τμήμα των σταφυλιών (καρποί (Πίν. 3), βόστρυχοι (Πίν. 4), στέμφυλα (Πίν. 5)) από το οποίο προήλθαν.

Πίνακας 3. Εκχυλίσματα καρπών

A/A	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΚΑΡΠΩΝ
1	Μεθανολικό Μανδηλαριάς
2	Υδατικό Μανδηλαριάς
3	Υδατικό Ασύρτικο
4	Μεθανολικό Ασύρτικο
5	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003
6	Μανδηλαριά Ηρακλείου 2004 (ώριμο)
7	Κοτσιφάλι Ηρακλείου 2004 (πρώιμο)
8	Μανδηλαριά Ρόδου 2003
9	Αγιωργίτικο Νεμέας 2004
10	Εκχύλισμα Οίνου Κοτσιφάλι Ηρακλείου

Πίνακας 4. Εκχυλίσματα βοστρύχων

A/A	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΒΟΣΤΡΥΧΩΝ
1	Βηλάνα Σητείας 2003
2	Αθήρι Σαντορίνης 2003
3	Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004
4	Βοηδόματο Σαντορίνης 2003
5	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (1)
6	Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003
7	Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (1)
8	Αθήρι Σαντορίνης 2004
9	Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (1)
10	Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (2)
11	Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (2)
12	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003

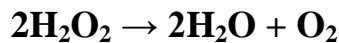
Πίνακας 5. Εκχυλίσματα στέμφυλων

A/A	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ
1	Ασύρτικο Ρόδου 2003
2	Λιαστά Μανδηλαριάς Σαντορίνη 2004
3	Ασύρτικο Σαντορίνης 2003
4	Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003 (2)
5	Υδρολυμένο κλάσμα Στέμφυλων Λιαστά Μανδηλαριάς

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ

2.2.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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



Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με την δράση του ενζύμου καταλάση. Η εκτίμηση της ανασταλτικής ή επαγωγικής δράσης των εκχυλισμάτων στη δραστηριότητα του ενζύμου έγινε φασματοφωτομετρικά όπου παρατηρήθηκε η μεταβολή του ρυθμού διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από την καταλάση με απορρόφηση στα 240 nm σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.2.2.1 Προετοιμασία αιμολύματος ως πηγής του ενζύμου

Ως πηγή της 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 που συλλέχθηκε αντιπροσώπευε το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αιμόλυμα αραιωμένο κατά 40 φορές.

2.2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό

Για τη μελέτη της επίδρασης ενός εκχυλίσματος στη δραστηριότητα 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}). Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 . Το μείγμα της αντίδρασης (3ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων καλίου και νατρίου (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) συγκέντρωσης 67 mM με pH 7.4, 4 μl αραιωμένου αιμολύματος και

H₂O₂ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (6, 15, 24, 30 και 45mM), όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.4. Η αντίδραση ξεκινά αμέσως μετά την προσθήκη H₂O₂. Ο ρυθμός διάσπασης του H₂O₂ προσδιορίστηκε σε θερμοκρασία δωματίου στα 240 nm για 2 min και ακολούθησε υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης / λεπτό ($\Delta_{\text{ABS}}/\text{min}$) καθώς και της ταχύτητας της αντίδρασης. Ο υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης / λεπτό υπολογίζεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης.

Πίνακας 6. Συστατικά της αντίδρασης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υποστρώματος, στην οποία το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό

	3mM	6mM	9mM	15mM	24mM	30mM	36mM
Ρυθμιστικό δ/μα	2995μl	2994μl	2993μl	2991μl	2988μl	2986μl	2984μl
Αιμόλυμα	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
H ₂ O ₂	1μl	2μl	3μl	5μl	8μl	10μl	12μl
Υτελ.	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

Στον επόμενο πίνακα (Πίν. 2.5) φαίνονται τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό της καμπύλης ταχύτητας ενζύμου / συγκέντρωσης υποστρώματος [V]/[S]. Η συγκέντρωση υποστρώματος που το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό είναι τα 30 mM.

Πίνακας 7. Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

Συγκέντρωση υποστρώματος [S] mM	$\Delta_{\text{ABS}}/\text{min}$	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

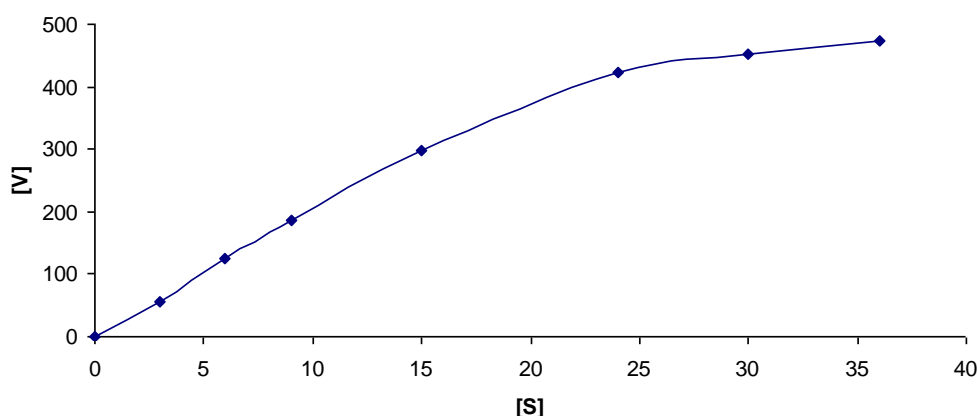
Ο υπολογισμός της ταχύτητας του ενζύμου έγινε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

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

$\Delta_{\text{abs}}/\text{min}$: Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης / λεπτό.

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

Η ποσότητα του ενζύμου στην κυβέττα είναι **0.0092mg**.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη ταχύτητας ενζύμου και συγκέντρωσης υποστρώματος

2.2.2.3 Εκτίμηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της καταλάσης

Αρχικά στα δείγματα προστίθεται το αιμόλυμα και στη συνέχεια το εκχύλισμα. Αφού προστεθούν όλοι οι απαιτούμενοι όγκοι, ακολουθεί ανάδευση στο vortex για 1 λεπτό και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Έπειτα, το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου μεταφέρεται σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV) και προστίθενται 10μl 30% H₂O₂ (Πίν. 8). Τέλος, η κυψελίδα ανακινείται δύο φορές, τοποθετείται στο φωτόμετρο και μετράται η απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα. Για κάθε εκχύλισμα επιλέχθηκαν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (5 - 200μg/ml). Ορισμένα εκχυλίσματα απορροφούσαν στα 240nm και έτσι δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η δράση τους.

Πίνακας 8. Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος

	Control	C ₁ (5μg/ml)	C ₂ (10μg/ml)	C ₃ (20μg/ml)	C ₄ (50μg/ml)	C ₅ (100μg/ml)	C ₆ (200μg/ml)
Ρυθμιστικό δ/μα	2986 μl	2886μl	2886μl	2886μl	2886μl	2886μl	2886μl
Αιμόλυμα	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
Εκχύλισμα	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
H ₂ O ₂	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl
Ντελ.	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

Επίσης, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του ενζύμου με το αζίδιο του νατρίου ως μάρτυρα ισχυρής ανασταλτικής δράσης και ανέστειλε τη δραστικότητά της με τιμή IC₅₀ στη συγκέντρωση 0.35μM.

2.2.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ IC₅₀

Η % αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της καταλάσης που προκαλείται από ένα εκχύλισμα υπολογίζεται από τον τύπο:

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

Όπου:

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

M.O. $\Delta_{\text{ABS C}_x}$: Μέσος όρος της μεταβολής της απορρόφησης 3 δειγμάτων (επαναλήψεων) του εξεταζόμενου εκχυλίσματος σε συγκεκριμένη συγκέντρωση.

IC₅₀: είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στην οποία η δραστηριότητα της καταλάσης, μειώνεται κατά 50%. Ο υπολογισμός της τιμής IC₅₀ γίνεται εξετάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος στη συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό και η αντίδραση πραγματοποιείται με τη μέγιστη ταχύτητα (V_{max}). Η τιμή IC₅₀ υπολογίζεται από την καμπύλη του ποσοστού αναστολής του κάθε δείγματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωσή του. Για κάθε εκχύλισμα προσδιορίστηκε η τιμή IC₅₀. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι η δράση του εκχυλίσματος.

2.2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση υπολογίζονται οι μέσες τιμές (\bar{x}) και οι τυπικές αποκλίσεις (s) για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση της μεθόδου one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett, ώστε να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών. 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. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΡΠΩΝ

Μελετήθηκαν συνολικά 10 εκχυλίσματα προερχόμενα από τους καρπούς των σταφυλιών. Από αυτά, τα 9 ανέστειλαν τη δραστηριότητα της καταλάσης, ενώ το εκχύλισμα **Οίνου** δεν παρουσίασε καμία αναστολή. Από τα εκχυλίσματα που παρουσίασαν αναστολή, το πιο δραστικό ήταν το **Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003**, ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν το εκχύλισμα **Υδατικό Ασσύρτικο** με τιμές IC_{50} **40 $\mu\text{g/ml}$** και **214 $\mu\text{g/ml}$** αντίστοιχα (Πίν. 9). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης εκχυλισμάτων καρπών στη δραστηριότητα της καταλάσης

Εκχυλίσματα Σταφυλιών	Συγκέντρωση IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης (Spearman) r
Μεθ. Μανδηλαριάς	200	0,952
Υδ. Μανδηλαριάς	98	0,974
Υδ. Ασσύρτικο	214	0,755
Μεθ. Ασσύρτικο	80	0,536
Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003	40	0,967
Μανδηλαριά Ηρακλείου 2004 (ώριμο)	50	0,957
Κοτσιφάλι Ηρακλείου 2004 (πρώιμο)	55	0,675
Μανδηλαριά Ρόδου 2003	>50	0,800
Αγιωργίτικο Νεμέας 2004	>50	0,965
Οίνος Κοτσιφάλι Ηρακλείου	Καμία επίδραση	

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΟΣΤΡΥΧΩΝ

Μελετήθηκαν 12 εκχυλίσματα προερχόμενα από τους βόστρυχους των σταφυλιών, τα οποία παρουσίασαν αναστολή της δραστηριότητας της καταλάσης. Το πιο δραστικό ήταν το **Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003**, ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν το εκχύλισμα **Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004** με τιμές IC_{50} **1,5 $\mu\text{g/ml}$** και **27 $\mu\text{g/ml}$** αντίστοιχα (Πίν. 10). Επίσης, στην περίπτωση των βοστρύχων, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης εκχυλισμάτων βοστρύχων στη δραστικότητα της καταλάσης

Εκχυλίσματα Βοστρύχων	Συγκέντρωση IC ₅₀ (μg/ml)	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης (Spearman) r
Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003	1,5	0,984
Ασσύρτικο Σαντορίνης 2004 (1)	2,5	0,845
Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003 (1)	4	0,883
Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (1)	4,5	0,913
Αθήρι Σαντορίνης 2004	5	0,894
Αθήρι Σαντορίνης 2003	8	0,635
Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (2)	9	0,768
Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003	11	0,957
Βηλάνα Σητείας 2003	15	0,927
Ασσύρτικο Σαντορίνης 2004 (2)	18	0,905
Βοηδόματο Σαντορίνης 2003	22	0,737
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004	27	0,721

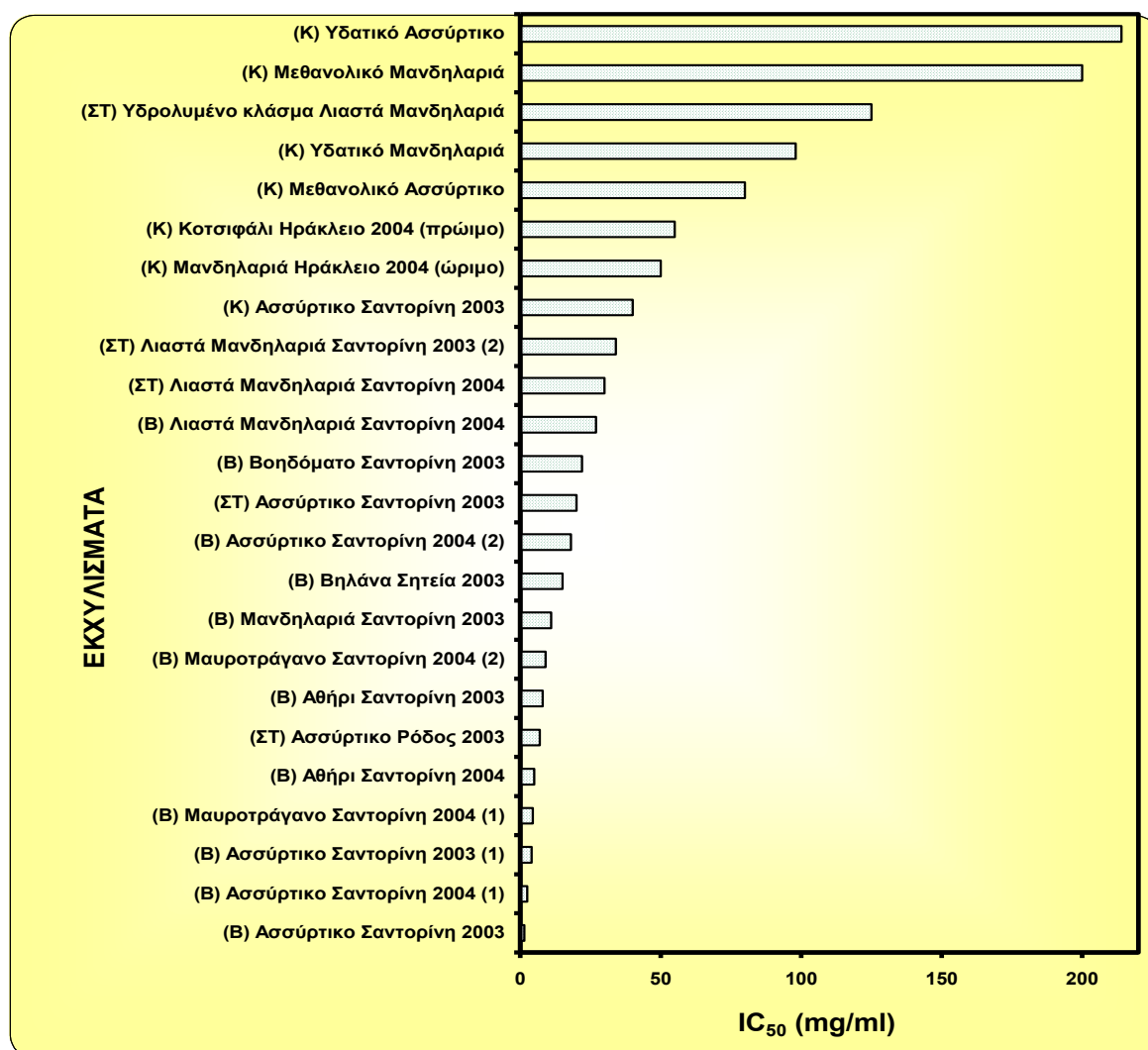
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ

Μελετήθηκαν 5 εκχυλίσματα προερχόμενα από τα στέμφυλα των σταφυλιών, τα οποία ανέστειλαν τη δραστικότητα της καταλάσης. Το πιο δραστικό ήταν το **Ασσύρτικο Ρόδου 2003**, ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν το εκχύλισμα **Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003 (2)** με τιμές IC₅₀ **7 μg/ml** και **34 μg/ml** αντίστοιχα (Πίν. 11). Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν πολύ υψηλή γραμμική συσχέτιση (r = 0.945 - 0.990). Αυτό σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σχεδόν ανάλογα αυξάνεται και η ανασταλτική δράση του ενζύμου. Το υδρολυμένο κλάσμα **Λιαστά Μανδηλαριά** παρουσίασε επίσης αναστολή, αλλά σε σχέση με τα άλλα εκχυλίσματα που προέρχονται από στέμφυλα ήταν το λιγότερο δραστικό με τιμή IC₅₀ **125 μg/ml**.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης εκχυλισμάτων στεμφύλων στη δραστικότητα της καταλάσης

Εκχυλίσματα Στεμφύλων	Συγκέντρωση IC ₅₀ (μg/ml)	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης (Spearman) r
Ασσύρτικο Ρόδου 2003	7	0,946
Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003	20	0,984
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004	30	0,945
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003 (2)	34	0,990
Υδρολυμένο κλάσμα Λιαστά Μανδηλαριά	125	0,894

3.4 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 1. Σύγκριση όλων των εκχυλισμάτων σταφυλιών που μελετήθηκαν συναρτήσει των τιμών IC₅₀

Αν σε ένα γράφημα συγκρίνουμε όλα τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν τότε μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι γενικά τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τους βόστρυχους είναι τα πιο ισχυρά σε σχέση με τα υπόλοιπα. Έπειτα ακολουθούν τα εκχυλίσματα στεμφύλων και τέλος των καρπών. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί και απ' ευθείας από το εύρος των τιμών IC₅₀ οι οποίες κυμαίνονται από 1.5 – 27 mg/ml για τα εκχυλίσματα των βοστρύχων, 7 - 34 mg/ml για τα εκχυλίσματα στεμφύλων και 40 - 214 mg/ml για τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τους καρπούς. Εξαιρεση αποτελεί το **υδρολυμένο κλάσμα Λιαστά Μανδηλαριά**, το οποίο αν και προέρχεται από τα στέμφυλα προκάλεσε αναστολή 50% σε συγκέντρωση 125 μg/ml, αρκετά υψηλότερη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα στεμφύλων (Γράφημα 1).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων συγκεκριμένων τμημάτων διαφόρων ελληνικών ποικιλιών σταφυλιών (Αγιωργίτικο, Αθήρι, Ασσύρτικο, Βηλάνα, Βοηδόματο, Μανδηλαριά, Μαυροτράγανο, Κοτσιφάλι) του είδους *Vitis vinifera* από 5 διαφορετικά μέρη της Ελλάδας (Σαντορίνη, Ρόδος, Νεμέα, Σητεία, Ηράκλειο) στη δραστικότητα της καταλάσης. Τα τμήματα από τα οποία προήρθαν τα εκχυλίσματα είναι οι **καρποί** (ράγες), οι **βόστρυχοι** (κύριος άξονας του τσαμπιού μαζί με τις διακλαδώσεις του) και τα **στέμφυλα** (φλούδες, κουκούτσια και βόστρυχοι). Μελετήθηκαν συνολικά 27 εκχυλίσματα σταφυλιών. Από αυτά, τα 10 προήρθαν από τις ράγες των σταφυλιών, τα 12 από τους βόστρυχους και τα υπόλοιπα 5 από τα στέμφυλα.

Στην πρώτη ομάδα, τα 9 ανέστειλαν τη δραστικότητα της καταλάσης, ενώ το εκχύλισμα **K₂** (Κοτσιφάλι Ηρακλείου) δεν παρουσίασε καμία αναστολή. Από τα εκχυλίσματα που παρουσίασαν αναστολή, την ισχυρότερη δράση εμφάνισε το **ΣΤ₅** (Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003) και τη μικρότερη το εκχύλισμα **Υδατικό Ασσύρτικο**. Στη δεύτερη ομάδα με τα εκχυλίσματα βοστρύχων και τα 12 εκχυλίσματα παρουσίασαν κάποια ανασταλτική επίδραση στη δραστικότητα της καταλάσης με ισχυρότερο το **B₅** (Ασσύρτικο Σαντορίνης 2003) και λιγότερο δραστικό το εκχύλισμα **B₁₂** (Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004). Στην τελευταία ομάδα, επίσης, και τα 5 εκχυλίσματα συνέβαλαν στην αναστολή της καταλάσης με πιο δραστικό το **Σ₈** (Ασσύρτικο Ρόδος 2003) και λιγότερο δραστικό το υδρολυμένο κλάσμα **ΣΝ₁** (Λιαστά Μανδηλαριά).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η διαφορά στη δραστικότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων οφείλεται στο ότι αυτά προέρχονται τόσο από διαφορετικές ποικιλίες όσο και από διαφορετικά τμήματα της ίδιας ποικιλίας σταφυλιών (καρποί, βόστρυχοι, στέμφυλα). 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. Σύμφωνα με τη σύστασή τους, τα εκχυλίσματα περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία από πολυφαινόλες, οι οποίες ανήκουν στις ομάδες των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και των στυλβενίων. Συγκεκριμένα, τα στυλβένια, trans-ρεσβερατρόλη και ε-βινιφερίνη και τα φαινολικά οξέα, γαλλικό και καφεϊκό οξύ εντοπίστηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Παράρτημα).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα βοστρύχων είναι πιο δραστικά σε σχέση με τα εκχυλίσματα που προήρθαν από τα υπόλοιπα τμήματα των σταφυλιών. Σύμφωνα με την ποιοτική τους σύσταση, τα εκχυλίσματα σταφυλιών (καρπών) είναι πλούσια σε κατεχίνες ((+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη) ενώ τα εκχυλίσματα βοστρύχων και στέμφυλων περιέχουν αυτές τις πολυφαινόλες σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Anastasiadi et al. 2009). Επιπροσθέτως, πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η кемπερόλη και ορισμένα πολυφαινολικά οξέα δεν υπάρχουν στα εκχυλίσματα των σταφυλιών σε σημαντικά ποσά. Ακόμη, η ποικιλία των πολυφαινολών που εμφανίζεται στα εκχυλίσματα στεμφύλων και βοστρύχων είναι μεγαλύτερη από αυτή των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), όπως συμβαίνει στην περίπτωση των στιλβενίων (Anastasiadi et al. 2009). Συνεπώς, η διαφορά στην ανασταλτική δράση των διαφορετικών εκχυλισμάτων οφείλεται στη διαφορετική χημική τους σύσταση.

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών που εξετάστηκαν, παρά το ότι είναι αντιοξειδωτικά όπως έχει δείχθει από *in vitro* δοκιμασίες, δεν είχαν ανάλογη δράση καθώς ανέστειλαν τη δραστηριότητα της καταλάσης. Η καταλάση είναι ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα και συμβάλλει στην εξουδετέρωση του H₂O₂, το οποίο είναι ιδιαίτερα επιβλαβές απέναντι στα βιομόρια. Επιπλέον, η δράση του ενζύμου είναι πιο έντονη κατά την άσκηση, η οποία προκαλεί μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών και οδηγεί στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Nikolaidis et al. 2006, Veskoukis et al. 2008). Αν ανασταλεί η δράση της καταλάσης, το H₂O₂ δεν αποικοδομείται κι έτσι μπορεί να οξειδώσει βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) μέσα στο κύτταρο.

Κατά συνέπεια, αν και ειπώθηκε ότι τα φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από σταφύλια έχουν αντιοξειδωτική δράση λόγω των περιεχόμενων σε αυτά πολυφαινολών, παρόλα αυτά, τα εκχυλίσματα στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν είχαν ανάλογη δράση καθώς ανέστειλαν τη δραστηριότητα της καταλάσης. Έτσι, τα εκχυλίσματα αυτά έδρασαν ευνοώντας το οξειδωτικό στρες και όχι την αντιοξειδωτική άμυνα. Απαιτείται, λοιπόν, μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά ένζυμα που ενεργοποιούνται κατά την άσκηση κυρίως με *in vivo* έρευνες ώστε να διασαφηνιστεί αν η χορήγησή τους πριν την άσκηση θα έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σταφυλιών

Συστατικά	Εκχυλίσματα Σταφυλιών (καρποί)			Εκχυλίσματα Στέμφυλων				Εκχυλίσματα Βοστρύχων						
	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασσύρτικο	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασύρτ. Σαντορίνη	Ασσύρτικο	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασσύρτικο	Λιαστά Μανδηλαριά	Μαυροτράγανο	Αθήρι Σαντορίνη 2003	Αθήρι Σαντορίνη 2004
Γαλλικό οξύ	1.98	2.24	1.03	20.44	13.64	22.21	10.78	11.49	12.84	41.44	12.84	8.33	8.9	7.25
(+)-Κατεχίνη	102.20	95.92	151.67	10.96	9.32	47.4	105.57	46.74	85.81	95.39	85.81	66.28	36.49	51.05
(-)-Επικατεχίνη	55.14	40.49	31.35	15.04	8.72	12.5	37.39	11.14	0.43	4.34	0.43	5.21	2.69	4.02
Προανθοκυανιδίνη Β3	21.01	20.35	24.51	4.12	3.61	5.22	9.96	20.54	31.55	26.01	31.55	21.04	20.01	14.9
Προανθοκυανιδίνη Β2	16.14	17.40	10.63	7.83	3.22	21.32	24.01	0	0	5.15	0	3.36	2.55	2.49
Επιγαλλοκατεχίνη	60.57	30.57	30.39	1.47	0.53	12.21	2.93	5.61	7.78	3.14	7.78	2.68	4.02	2.37
trans-Καφταρικό οξύ	0.25	1.05	4.31	0.12	6.40	0.44	0	16.11	1.62	4.87	1.62	2.33	0.4	9.39
trans-Ρεσβατραρόλη	0.007	0	0	0.24	2.00	0.29	0.33	5.47	17.56	12.62	17.56	4.85	3.86	8.59
ε-Βινιφερίνη	0.33	0.57	0.17	2.00	7.55	1.41	0.83	12.79	31.42	20.15	31.42	15.82	8.73	12.07
aQ 3-O-γαλακτοσίδη	3.32	2.73	3.49	3.96	4.63	4.25	1.56	12.06	6.63	8.20	6.63	11.04	4.55	13.63
aQ 3-O- γλυκοσίδη	1.74	1.08	1.12	2.68	2.62	4.63	7.29	3.86	4.61	2.06	4.61	5.84	3.01	4.95
aQ 3-O- ραμνοσίδη	0.92	0	4.73	0.87	1.78	1.9	3.34	0.90	0.46	0.34	0.46	0.63	0.9	1.34
Κερκετίνη	0	0	0	3.83	3.26	3.52	4.75	0.80	0.60	3.40	0.6	0.96	0.49	0.5
Κεμπφερόλη	0	0	0	1.53	0.06	0.54	0.54	0	0.20	0.32	0.2	0.17	0.03	0.07
Καφεϊκό οξύ	0	0	0	0	0.36	0.23	0.05	0.51	0	0.34	0	0.05	0.07	0.01
Συριγγικό οξύ	0	0	0	0.95	4.16	0.25	0.17	0.14	0.07	0.46	0.07	0.01	0.18	0
p-Κουμαρικό οξύ	0	0	0	0	0.47	0.26	0.25	0.12	0.08	0.04	0.08	0.07	0.04	0.01
Φερουλικό οξύ	0	0	0	0	0.06	0.09	0	0	0.03	0.04	0.03	0	0.06	0
TPC*	472.4	467.4	492.7	376.71	207.79	167	465.3	494.2	536.8	484.3	537	584	559	464

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol* 1996;81:943–55.

Allan H. Conney, (2003), Enzyme Induction and Dietary Chemicals as Approachers to Cancer Chemoprevention: The Seventh DeWitt S. Goodman Lecture, *Cancer Research* 63:7005-7031

Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, Nychas GJ et al. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J Agric Food Chem*, 2009, 57:457-463.

Anne S. Tsao, Edward S. Kim and Waun Ki Hong, (2004), Chemoprevention of Cancer, *A Cancer Journal for Clinicians* 54:150-180

Barry Halliwell (2001) Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V., (2003), Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review, *Annals of Botany*, 91:179-194

Catherine A. Rice – Evans, Nicholas J. Miller and George Paganga, (1997), Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in plant Science*, Vol. 2, No. 4, 152-160

CHAE HZ, CHUNG SJ, RHEE SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994, 269:27670–27678

Chung S Yang, Janelle M Landau, Mou-Tuan Huang and Harold L Newmark, (2001), Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds, *Annual Review of Nutrition* 21:381-406

Claudine Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-747

Da Cunha F.M., Duma D., Asseuy J., Buzzi F. C., Niero R., Campos M. M., Calixto J.B., (2004), Caffeic Acid Derivatives: In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory properties, *Free Radical Research*, 88No11:1241-1253
Das S, Das DK. Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov.* 2007 Jun;2(2):133-8.

EDGE R, McGARVEY DJ, TRUSCOTT TG. The carotenoids as antioxidants – A review. *J Photochem Photobiol B* 1997, 41:189–200

Feng Y, McDonald CE, Vick BA. C-glycosylflavones from hard red spring wheat bran. *Cereal Chem* 1988;65:452–6.

- Ferguson Lynnette R**, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111
- G. J. Soleas, E.R. Diamandidis, D.M. Goldberg**, (1997), Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11:287-313
- Gary D. Stoner, Mark A. Morse, and Gary J. Kelloff**, (1997), Perspectives in Cancer Chemoprevention, *Environ Health Perspect* 105(Suppl 4):945-954
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.**, (2002), Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, et al.** In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem* 2001;49:3178–86.
- Imad Shureiqi, Pavan Reddy, Dean E. Brenner**, (2000), Chemoprevention: general perspective, *Critical Reviews in Oncology/ Hematology* 33:157-167
- Judith J. Smith, Patricia Tully, and Rose Mary Padberg**, (2005), Chemoprevention: A Primary Cancer Prevention Strategy, *Seminars in Oncology Nursing*, Vol 21, No 4: 243-251
- Kelly E. Heim, Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya**. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Department of Animal and Nutritional Sciences, University of New Hampshire, USA, 2002
- Kidd PM**. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts, *Cell biology. Altern Med Rev*. 2009 Sep;14(3):226-46.
- King HGC**. Phenolic compounds of commercial wheat germ. *J Food Sci* 1962;27:446–54.
- Mazur W.M., Duke J.A., Wahala K., Rasku S., Adlercreutz H.**, (1998), Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans, *Nutritional Biochemistry*, 9:193-200
- KWON SJ, PARK JW, CHOI WK, KIM IH, KIM K**. Inhibition of metalcatalysed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 201:8–15
- Mazza G, Maniati E**. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.
- Muhammad A. Soobrattee, Theeshan Bahorun and Okezie I. Aruoma**, (2006), Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer, *Biofactors*, 27:19-35

- Nichenametla S.N., Taruscio T.G., Barney D.L., Exon J.H, (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.
- Pamela C. Champe, Richard A. Harvey**, Βιοχημεία, 2^η Έκδοση – 1^η ελληνική, Εκδόσεις «Γρ. Παρισιάνου», Αθήνα 1997
- Psotova J., Lasovsky J., Vicar J., (2003)**, Metal-Chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics, *Biomed.Papers*, 147(2) :147-153
- R.J. Nijveldt, Els van Nood, D.EC van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, P.AM van Leeuwen, (2001)**, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996)**, Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- S. Azam, N. Hadi, N. U. Khan and S. M. Hadi**. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties *Toxicology in Vitro* Volume 18, Issue 5, October 2004, Pages 555-561
- Sartelet H, Serghat S, Lobstein A, et al.** Flavonoids extracted from Fonio millet (*Digitalaria exilis*) reveal potent antithyroid properties. *Nutrition* 1996;12:100–6.
- Scalbert A, Williamson G.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073S–85S.
- S.H. Bhat^a, A.S. Azmi^a and S.M. Hadi** Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties *Toxicology and Applied Pharmacology* Volume 218, Issue 3, 1 February 2007, Pages 249-255
- Shahidi F, Naczk M.** Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc, 1995.
- Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005)**, Assessment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *In Vivo*: 741-747

- Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K and Kouretas D, (2005)**, Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek Varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15:1013-1022
- Stagos D., Karaberis E., Kouretas D., (2005)**, Assessment of antioxidant/anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *in vivo* 19: 741–748
- Undurti N. Das, (2002)**, A radical approach to cancer, *Med Sci Monit*, 8(4): RA79-92
- W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, (2003)**, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medical Research Reviews*, 23 No4:519-534
- 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
- www.wineandgrapes.gr/.../limnio.php**
- Y. Sakihama, M.F. Cohen, S. C. Grace, H. Yamasaki, (2002)**, Plant phenolic antioxidants and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177:67-80
- Yilmaz Y. and Toledo R.T., (2004)**, Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends in Food Science & Technology*, 15:422-433
- Αργύρης Ν. Τσακίρης**, Οινολογία, Από το σταφύλι στο κρασί, Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα, **1998**
- Δημήτριος Ευστ. Σταύρακας**, Μαθήματα Γενικής Αμπελουργίας, Τεύχος πρώτο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, **1997**
- Ε. Γιαννακοπούλου**, Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί κλινική σημασία, *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2009, 26 (1) : 23-35
- Κωνσταντίνος Λαζαράκης**, Τα ελληνικά κρασιά, Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα **2006**
- Παναγιώτης Α. Τσέτουρας**, Οινοτεχνία, Η επιστήμη του κρασιού στην πράξη, Β' έκδοση, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα **2008**
- Παναγιώτης Α. Τσέτουρας**, Τα μυστικά του καλού κρασιού, Β' έκδοση, **1998**
- Σ. Καράταγλης**, Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text, **1994**