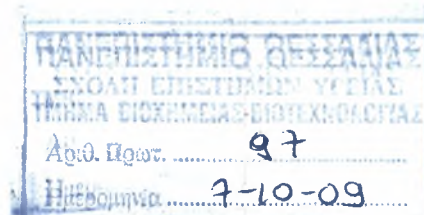




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος

Μεταπτυχιακή διατριβή

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΜΕ
ΤΗΝ ΞΑΝΘΙΝΗ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ**

ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΚΑ

Βιολόγος



Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7647/1
Ημερ. Εισ.: 16-12-2009
Δωρεά: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
547.6
ΤΣΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087139

Μεταπτυχιακή διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ

**ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ
ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΞΑΝΘΙΝΗ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ**

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Κουρέτας Δημήτριος – Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Κομιώτης Δημήτριος – Αναπ. Καθηγητής Οργανικής Χημείας

Λιαδάκη Καλλιόπη – Λέκτορας Φαρμακολογίας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, που με εμπιστεύτηκε στο συγκεκριμένο θέμα και για την κατανόησή του στα προβλήματα που αντιμετώπισα στην πορεία της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Χρύσα Σπανού και κ. Άρη Βεσκούκη για την άρτια επιμέλεια του πειραματικού μέρους της εργασίας μου και για την προθυμία τους να με βοηθήσουν και να με κατευθύνουν κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου για το ευχάριστο και ταυτόχρονα επικοινωνιακό κλίμα συνεργασίας που δημιουργούν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

Περιεχόμενα εικόνων	5
Περιεχόμενα πινάκων	5
Περιεχόμενα διαγραμμάτων	6
Συντομογραφίες	6
Περίληψη	7
Abstract	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Είδη και ποικιλίες σταφυλιών	9
1.2 Χημική σύσταση του κρασιού και των σταφυλιών	10
1.3 Πολυφαινόλες	10
1.3.1 Φλαβονοειδή	11
1.4 Ελεύθερες ρίζες	13
1.4.1 Ορισμός και δράση των ελευθέρων ριζών	13
1.4.2 Οξειδωτικό στρες	15
1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	16
1.5.1 Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών	17
1.5.2 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολών	17
1.5.3 Αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών	18
1.6 Οξειδάση της ξανθίνης	19
1.6.1 Οξειδάση της ξανθίνης και άσκηση	20
1.6.2 Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης	21
1.7 Σταφύλια – Στέμφυλα – Βόστρυχοι	23
1.8 Σκοπός του πειράματος	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Υλικά	26
2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	26
2.1.2 Εκχυλίσματα	26
2.2 Μέθοδος	28
Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων στη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης με την ξανθίνη ως υπόστρωμα.	28
2.2.1 Αρχή της μεθόδου	28
2.2.2 Υπολογισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό.	28
2.2.3 Εκτίμηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης.	30
2.2.4 Στατιστική ανάλυση	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	44

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών
- Εικόνα 2: Χημική δομή των φλαβονοειδών
- Εικόνα 3: Η διαταραχή της ισορροπίας στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικής άμυνας οδηγεί στο οξειδωτικό στρες
- Εικόνα 4: Εξουδετέρωση μίας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό
- Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελευθέρων ριζών
- Εικόνα 6: Δομή της οξειδάσης της ξανθίνης
- Εικόνα 7: Αντιδράσεις που καταλύει η οξειδάση της ξανθίνης
- Εικόνα 8: Το μονοπάτι του καταβολισμού των πουρινών
- Εικόνα 9: Η αλλοπουρινόλη ως αναστολέας της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης.
- Εικόνα 10: Βότρυς της αμπέλου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1: Κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες
- Πίνακας 2: Είδος αναστολής των φλαβονοειδών στην οξειδάση της ξανθίνης
- Πίνακας 3: Εκχυλίσματα βοστρύχων
- Πίνακας 4: Εκχυλίσματα στέμφυλων και οίνου
- Πίνακας 5: Εκχυλίσματα σταφυλιών (καρπών)
- Πίνακας 6: Το μίγμα της αντίδρασης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υποστρώματος, στην οποία το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό
- Πίνακας 7: Αποτελέσματα για την κατασκευή της καμπύλης ταχύτητας ενζύμου/συγκέντρωσης υποστρώματος
- Πίνακας 8: Το μίγμα της αντίδρασης για την εκτίμηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης
- Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων βοστρύχων στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης
- Πίνακας 10: Αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων στέμφυλων και οίνου στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης
- Πίνακας 11: Αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών) στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης
- Πίνακας 12: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), στέμφυλων και βοστρύχων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη ταχύτητας ενζύμου/συγκέντρωσης υποστρώματος

Διάγραμμα 2: Συγκεντρώσεις IC₅₀ εκχυλισμάτων βοστρύχων

Διάγραμμα 3: Συγκεντρώσεις IC₅₀ εκχυλισμάτων στέμφυλων

Διάγραμμα 4: Συγκεντρώσεις IC₅₀ εκχυλισμάτων σταφυλιών

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

Από προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι το κρασί και τα σταφύλια έχουν αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά τους. Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν αντιϊικές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν ως αντιοξειδωτικά συμβάλλοντας εν μέρει στην πρόληψη ασθενειών, που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Το ένζυμο αυτό έχει έντονη δράση κατά τη διάρκεια της άσκησης καθώς συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών καταλύοντας την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με παράλληλη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), στέμφυλων και βοστρύχων πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Συνολικά, μελετήθηκε η επίδραση 10 εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), 6 εκχυλισμάτων στέμφυλων, 9 εκχυλισμάτων βοστρύχων και 1 εκχυλίσματος οίνου στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν αναστολή στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Από τη σύγκριση δε των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα διαφορετικά μέρη των φυτών προκύπτει ότι τα πιο δραστικά είναι τα εκχυλίσματα βοστρύχων. Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να επιδρούν στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης τα καθιστά πιθανά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, η αναστολή του ενζύμου μπορεί να αναστείλει όχι μόνο την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και του ουρικού οξέος, του σημαντικότερου αντιοξειδωτικού μορίου του πλάσματος του αίματος. Λαμβάνοντας, έτσι, υπόψη το διπλό αυτό ρόλο του ενζύμου ιδιαίτερα κατά την άσκηση, η χορήγηση των μορίων που μελετήθηκαν ως αντιοξειδωτικών πριν την άσκηση χρήζει προσοχής και περαιτέρω διερεύνησης.

ABSTRACT

Previous studies have observed that wine and grapes possess antioxidant and chemopreventive properties, which have been attributed to their polyphenolic content. It has also been demonstrated that polyphenols have antiviral, anti-allergic and anti-inflammatory properties whereas they may act as antioxidants partly preventing diseases relative to oxidative stress. In the present study, the effects of various plant extracts in xanthine oxidase (XO) activity were examined. This enzyme plays an important role during exercise as it participates in purine degradation pathway. It catalyzes the conversion of hypoxanthine to xanthine as well as the conversion of xanthine to uric acid accompanied by free radical generation. The aim of the present project was the study of the effects of grape, stem and skin extracts rich in polyphenolic compounds in XO activity. Briefly, the effects of 10 grape, 6 stem, 9 skin extracts and 1 wine extract were studied. From the results obtained, all the extracts inhibited XO activity and stem extracts were the most potent. However, XO inhibition results not only in inhibition of free radicals but also in inhibition of uric acid production, the most abundant antioxidant molecule of human plasma. Due to the dual role of XO the use of various phytochemicals as antioxidant supplements before exercise is not probably advisable and should be reconsidered.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Είδη και ποικιλίες σταφυλιών

Τα σταφύλια είναι φρούτα της αμπέλου και ανήκουν στο γένος *Vitis* της οικογένειας *Vitaceae*, η οποία περιλαμβάνει περίπου 1.000 είδη. Το γένος *Vitis* εμφανίζεται πιο συχνά στο βόρειο ημισφαίριο αλλά και την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, τη Νότια Αμερική και τη Νότια Αφρική. Υπάρχουν, επίσης, είδη που συναντώνται μόνο στις βορειοανατολικές Ηνωμένες Πολιτείες και το Μεξικό. Πληροφορίες σχετικά με την προέλευση της συντριπτικής πλειονότητας των ποικιλιών είναι ανεπαρκείς ή ανύπαρκτες. Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκαν γενετικοί χημικοί δείκτες για τη διερεύνηση της προέλευσης των ποικιλιών. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν αναλύσεις των ισομερών μορφών ενζύμων καθώς και μελέτη της κατανομής των διαφόρων ανθοκυανών, φλαβονοειδών και μη-φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων. Οι τεχνικές κλωνοποίησης του DNA χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, για τον καθορισμό των βαθμών ομοιότητας μεταξύ των ειδών.

Συγκεκριμένα, η ποικιλία σταφυλιών από την οποία πιστεύεται ότι ξεκίνησε η παραγωγή του κρασιού είναι η *Vitis vinifera*, που διαδόθηκε από τις περιοχές νότια του Καυκάσου, τη Μεσοποταμία, την Παλαιστίνη, την Αίγυπτο και σταδιακά επεκτάθηκε σε όλη τη Μεσόγειο. Η ποικιλία αυτή θεωρείται μία από τις καλύτερες για την παραγωγή κρασιού στην Ευρώπη (Soleas et al. 1997, Van de Wiel et al. 2001). Υπάρχουν περίπου 15.000 ποικιλίες αμπέλου αλλά δεν υπάρχει σύστημα ταξινόμησης. Στη Γαλλία μόνο έχουν γίνει προσπάθειες για την ορθολογική οργάνωση των τοπικών ποικιλιών σε σχετικές ομάδες ανάλογα με τις ιδιότητές τους.

Η καλλιέργεια των σταφυλιών και η παραγωγή του κρασιού συνδέεται άμεσα με την ιστορία του ανθρώπου. Δεν είναι γνωστό πότε ακριβώς ο άνθρωπος άρχισε να παράγει κρασί, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι η ανακάλυψη της οινοποίησης έγινε πριν 6000 χρόνια σε περιοχές νότια του Καυκάσου. Η χημική σύνθεση του κρασιού επηρεάζεται βαθιά από οινολογικές τεχνικές, την ποικιλία των σταφυλιών από τα οποία προέρχεται και τους κλιματικούς παράγοντες.

Το κρασί θεωρείται ότι δρα ως τονωτικό, διεγερτικό, ακόμη και ως αναλγητικό. Ωστόσο έχει ενοχοποιηθεί, ιδιαίτερα όταν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες, για την συμβολή του σε ασθένειες όπως καρδιομυοπάθειες, κίρρωση του ήπατος, ακόμη και σε ορισμένες μορφές καρκίνου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις ότι

μικρή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και ιδιαίτερα κρασιού (1-2 ποτήρια την ημέρα) μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία και μάλιστα να προστατεύει κυρίως από καρδιαγγειακές παθήσεις και διάφορες μορφές καρκίνου (Bianchini & Vanio 2003). Η άποψη αυτή ξεκίνησε από την δεκαετία του 1970, όταν επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν τη συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση των θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις και την κατανάλωση μέτριας ποσότητας κρασιού καθημερινά (Van de Wiel et al. 2001). Με αφορμή αυτές τις παρατηρήσεις ξεκίνησε μία σειρά ερευνών με σκοπό την εξακρίβωση της πιθανής ευεργετικής δράσης του κρασιού και των συστατικών του κρασιού και των σταφυλιών, στα οποία αποδίδεται αυτή.

1.2. Χημική σύσταση του κρασιού και των σταφυλιών

Στο κρασί έχουν αναγνωριστεί περίπου 500 ουσίες, οι οποίες κυρίως παράγονται ως μεταβολικά παραπροϊόντα της ζύμωσης των σταφυλιών και οι περισσότερες από αυτές βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η ακριβής σύσταση του κρασιού και των σταφυλιών δεν είναι απόλυτα γνωστή. Εκτός από την αιθανόλη, το κρασί (ειδικά το κόκκινο) περιέχει πολυφαινόλες σε συγκεντρώσεις 1.0 - 1.8 μg/ml, που έχουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (Rice-Evans et al. 1996). Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα (κουμαρικό οξύ, κινναμωμικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και βανιλλικό οξύ), τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη) και τα φλαβονοειδή (κατεχίνη, επικατεχίνη). Η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη στο κόκκινο κρασί σε σχέση με το λευκό. Άλλες σημαντικές ενώσεις που βρίσκονται στο κρασί είναι το νερό, τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα, η γλυκερόλη και κάποιες αρωματικές ενώσεις. Κάθε μία από τις ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα, τη γεύση, το άρωμα και τα άλλα χαρακτηριστικά του κρασιού (Soleas et al. 1997, Van de Wiel et al. 2001).

1.3. Πολυφαινόλες

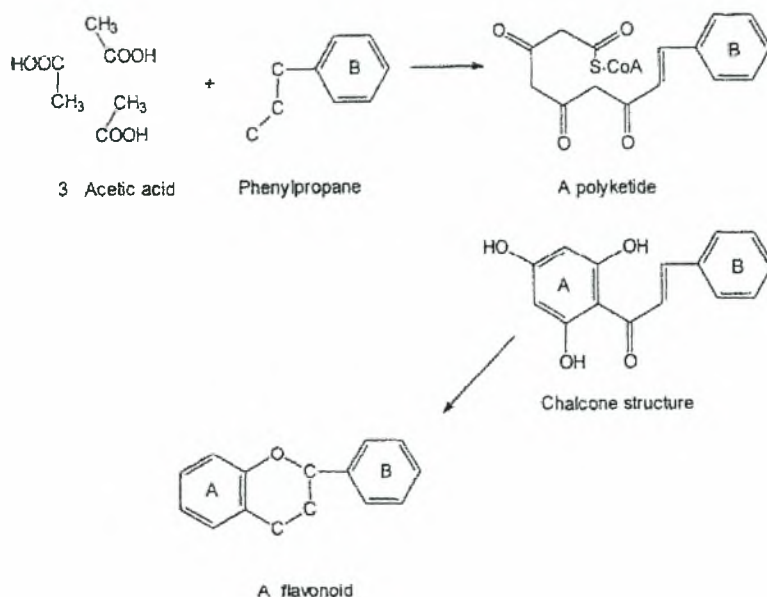
Οι πολυφαινόλες είναι φυτικές ουσίες και συμβάλλουν στην αύξηση, την ανάπτυξη και την άμυνα του φυτικού οργανισμού. Είναι χρωστικές και γευστικές ουσίες, σηματοδοτικά μόρια, ενώσεις που μπορούν να προστατεύσουν το φυτό από έντομα, μύκητες, βακτήρια και ιούς καθώς και από το οξειδωτικό στρες και την υπεριώδη ακτινοβολία. Οι περισσότερες πολυφαινόλες εμφανίζονται στη φύση με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών παρά ως ελεύθερες ενώσεις. Οι γνωστές

πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8.000 (Vermerris & Nicholson 2006).

Οι πολυφαινόλες είναι αρωματικές ενώσεις, που περιέχουν έναν τουλάχιστον αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες δεσμευμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και την προσβολή τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Είναι υπεύθυνες, επίσης, για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach et al. 2004). Στη φύση απαντώνται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή και τα κύρια σάκχαρα με τα οποία είναι συνδεδεμένες είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη. Ως προς τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια καθώς ορισμένες είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης 1994). Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που έχουν καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι βασικές κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα λιγνάνια και τα στιλβένια (Manach et al. 2004, Vermerris & Nicholson 2006). Οι κύριες διατροφικές πηγές τους είναι τα φρούτα και οι χυμοί τους, το τσάι, ο καφές και το κόκκινο κρασί. Τα λαχανικά, τα δημητριακά, η σοκολάτα, το ελαιόλαδο και τα όσπρια συμβάλλουν επίσης στη διατροφική πρόσληψη πολυφαινολών (Scalbert 2005).

1.3.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι υδατοδιαλυτές πολυφαινολικές ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα και σχηματίζουν αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο. Η βασική και πρόδρομη ένωση των φλαβονοειδών είναι ένα φαινυλοπροπάνιο, το οποίο παράγεται από τη σύνδεση τριών μορίων οξικού οξέος (Εικόνα 1). Τα φλαβονοειδή βρίσκονται στα φυτά και είναι υπεύθυνα για το χρώμα των λουλουδιών. Ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου (Εικόνα 2) διακρίνονται σε φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, φλαβανονόλες, ισοφλαβονοειδή, ανθοκυανιδίνες και προανθοκυανιδίνες (Di Carlo et al. 1999).

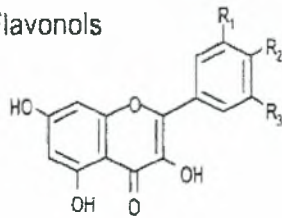


Εικόνα 1: Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών (Carlo et al. 1999)

Οι φλαβονόλες, στις οποίες ανήκουν η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η καιμπφερόλη βρίσκονται άφθονες στα φυτά αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Τροφές πλούσιες σε φλαβονόλες είναι τα κρεμμύδια, το μπρόκολο, το κόκκινο κρασί και το τσάι. Οι φλαβανόνες βρίσκονται κυρίως στην ντομάτα και τα αρωματικά φυτά όπως η μέντα αλλά υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή, οι φλαβόνες στο σέλινο ενώ οι φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη) βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και μαύρο τσάι καθώς και το κόκκινο κρασί (Manach et al. 2004). Οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται κυρίως στις φράουλες (Di Carlo et al. 1999).

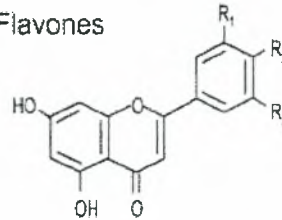
Τα ισοφλαβονοειδή είναι τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι ισοφλαβόνες, οι ισαφλαβάνες, οι ισοφλαβανόνες, οι κουμεστάνες και οι περοκαρπάνες. Έχουν προστατευτική δράση απέναντι στην αθηροσκλήρωση, την υπέρταση, την υπερλιπιδαιμία και την οστεοπόρωση (Watanabe et al. 2002). Οι ισοφλαβόνες (γενιστέϊνη και ντενζέϊνη) βρίσκονται στα όσπρια (κυρίως τη σόγια) και η δομή τους μοιάζει με αυτή των οιστρογόνων. Οι προανθοκυανιδίνες, που είναι γνωστές και ως ταννίνες είναι διμερή, ολιγομερή και πολυμερή των κατεχινών. Ονομάζονται προανθοκυανιδίνες γιατί όταν αντιδράσουν με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες (Manach et al. 2004).

Flavonols



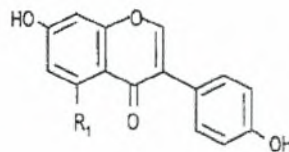
$R_2 = \text{OH}; R_1 = R_3 = \text{H}$: *Keampferol*
 $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: *Quercetin*
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: *Myricetin*

Flavones



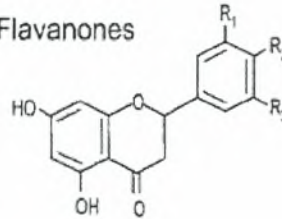
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: *Apigenin*
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: *Luteolin*

Isoflavones



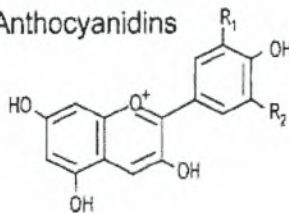
$R_1 = \text{H}$: *Daidzein*
 $R_1 = \text{OH}$: *Genistein*

Flavanones



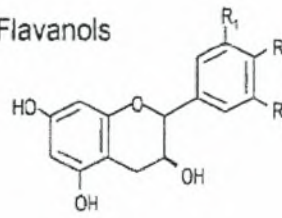
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: *Naringenin*
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: *Eriodictyol*
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$: *Hesperetin*

Anthocyanidins



$R_1 = R_2 = \text{H}$: *Pelargonidin*
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$: *Cyanidin*
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: *Delphinidin*
 $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$: *Petunidin*
 $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: *Malvidin*

Flavanols



$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: *Catechins*
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: *Gallocatechin*

Εικόνα 2: Χημική δομή των флаβονοειδών

1.4. Ελεύθερες ρίζες

1.4.1. Ορισμός και δράση των ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά και ασταθή μόρια, τα οποία μπορούν να παραχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό κατά το μεταβολισμό. Η πολύ υψηλή δραστικότητά τους αποδίδεται στα ασύζευκτα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας (Halliwell 1997, 2001). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^\bullet), του υδροξυλίου (OH^\bullet), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet), του αλκοξυλίου (RO^\bullet), του υδροπεροξυλίου (HO_2^\bullet), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet) και οι θειούχες ρίζες (RS^\bullet) (Halliwell 2001).

Οι σημαντικότερες βιολογικά ελεύθερες ρίζες προέρχονται από το οξυγόνο και αναφέρονται ως δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Valko et al. 2004). Οι ROS περιλαμβάνουν ρίζες ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot}) και μη ρίζες (υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2 , και η μονήρης κατάσταση του οξυγόνου, 1O_2). Άλλες ελεύθερες ρίζες είναι κάποιες δραστικές μορφές αζώτου, όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}) και το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\cdot}) (Halliwell 2001).

Οι ελεύθερες αυτές ρίζες συμμετέχουν σε φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως είναι η κυτταρική αναπνοή, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η παραγωγή προσταγλανδινών, η φαγοκυττάρωση και η ανοσολογική απόκριση. Αλλά έχει βρεθεί επίσης ότι πολλές ασθένειες όπως ο καταρράκτης, η περιοδοντίτιδα, οι δερματίτιδες, ο καρκίνος, το άσθμα, οι αθηρωματικές πλάκες και διάφορες εγκεφαλικές βλάβες σχετίζονται με τις ROS. Επιπλέον, ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και τη μολυσμένη ατμόσφαιρα (Halliwell 1997).

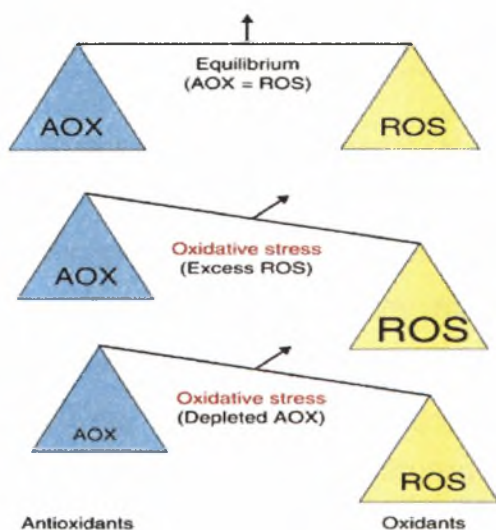
Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους αλλά και με μακρομόρια, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας, η οποία συνήθως είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με τα αντιδρώντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντίδραση ανάμεσα σε δύο άτομα υδρογόνου, που οδηγούν στο σχηματισμό του διατομικού υδρογόνου. Χαρακτηριστική είναι η δράση της πολύ δραστικής ρίζας του υδροξυλίου OH^{\cdot} , η οποία όταν σχηματίζεται *in vivo* αντιδρά άμεσα με μόρια που βρίσκονται γύρω της και 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^{\cdot} και H^{\cdot} (Halliwell 2001, Mylonas & Kouretas 1999).

Η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) παράγεται από τα φαγοκύτταρα με σκοπό την καταστροφή παθογόνων βακτηρίων. Επιπλέον, μικρές ποσότητες των ριζών αυτών, που εντοπίζονται εξωκυτταρικά, παράγονται ως διακυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλά κύτταρα (Torres et al. 2002). Το H_2O_2 έχει επιβλαβή δράση συμμετέχοντας στην παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών OH^{\cdot} . 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.

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).

1.4.2.Οξειδωτικό στρες

Οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού σε όφελος των πρώτων (Εικόνα 3) (Halliwell 2001).

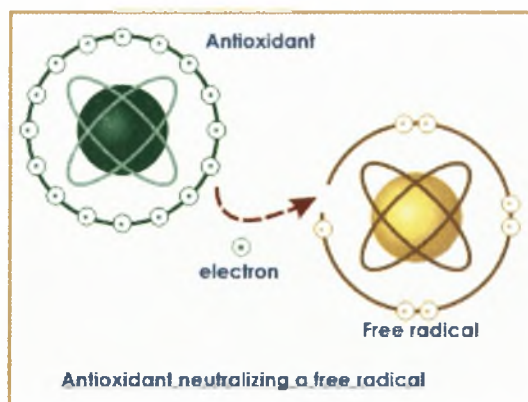


Εικόνα 3. Η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και την αντιοξειδωτική άμυνα οδηγεί στο οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η ηλιακή ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση καθώς επίσης και από το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ, το άγχος και τη διατροφή. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί την καταστροφή του DNA, τη λιπιδική υπεροξειδωση των μεμβρανών και την οξείδωση των πρωτεϊνών και εμπλέκεται σε ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson, του Alzheimer και οι καρδιαγγειακές παθήσεις.

1.5.Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα, έχει την ιδιότητα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος (Εικόνα 4) (Halliwell 2001). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους ενζυμικούς και τους μη ενζυμικούς.



Εικόνα 4: Εξουδετέρωση μίας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό

Στους ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν ένζυμα, που είτε δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, είτε μειώνουν την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT). Οι αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 1. (Blochina et al. 2003).

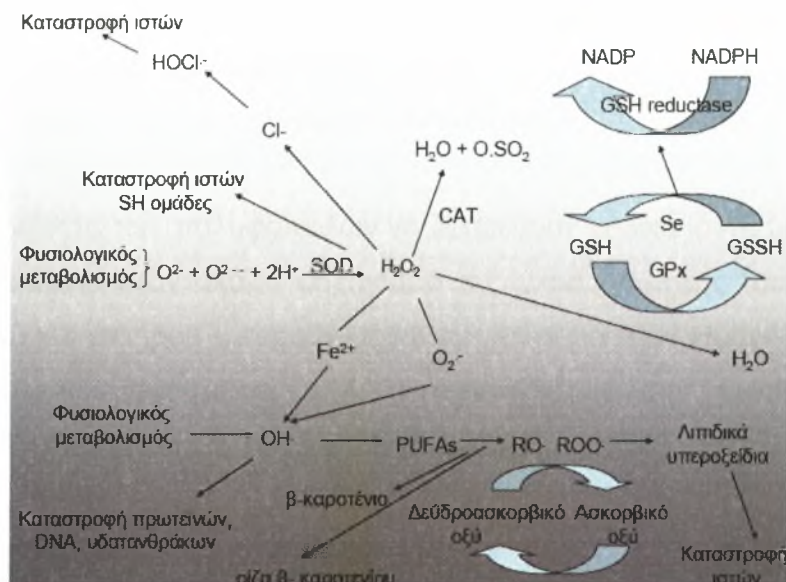
Πίνακας 1. Κυριότερα ένζυμα, που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες

Ένζυμο	Αντίδραση που καταλύει
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	$GSH + R^{\cdot} \rightarrow GSSG + R$
Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR)	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$
Καταλάση (CAT)	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + H_2O$

GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη

Στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ανήκουν διατροφικά συστατικά όπως η βιταμίνη E, το β-καροτένιο, το ασκορβικό οξύ, το συνένζυμο Q

και οι μεταλλοθειονίνες. Στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών αυτών ανήκουν και οι πολυφαινόλες (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών έναντι των ελευθέρων ριζών (Bahorun et al. 2006)

1.5.1. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών

Στις πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές δράσεις. Έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL (Low Density Lipoprotein) και να προάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων γεγονός που συμβάλλει στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (Soleas et. al. 1997, Nijveldt et al. 2001). Παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική και αντιική δράση (Yilmaz et.al. 2004, Nijveldt et al. 2001). Ωστόσο, μελέτες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς αντικαρκινικούς και χημειοπροστατευτικούς παράγοντες (Ren et al. 2003).

1.5.2. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολών

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)



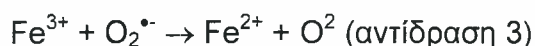
PPH : Πολυφαινόλες

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).



Έχει, επίσης, βρεθεί ότι ορισμένες πολυφαινόλες αναστέλλουν τη δράση ενζύμων, που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών όπως η κυκλοξυγενάση και η λιπooξυγενάση (Ferguson et al. 2001, Rice-Evans et al. 1996). Επίσης, αναστέλλουν την 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.

1.5.3. Αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών

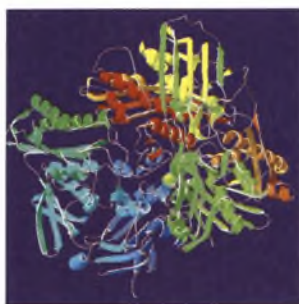
Η καρκινογενετική διαδικασία πραγματοποιείται σε τρία στάδια, το στάδιο της έναρξης (initiation), το στάδιο προαγωγής (promotion) και το στάδιο προόδου (progression) (Stoner and Mukhtar 1995). Στη φάση της έναρξης της καρκινογένεσης κάποιος μεταλλαξιγόνος παράγοντας προκαλεί βλάβες στο

γενετικό υλικό. Σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχει συσχετιστεί η κατανάλωση πολυφαινόλων με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης διάφορων μορφών καρκίνου. Πειράματα *in vivo* και *in vitro* δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες επιδρούν ποικιλοτρόπως στα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, δρουν και στα τρία στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας ως αναστολείς της δράσης του καρκινογόνου στη φάση της έναρξης και ως παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης στις φάσεις προαγωγής και προόδου.

1.6. Οξειδάση της Ξανθίνης (ΧΟ)

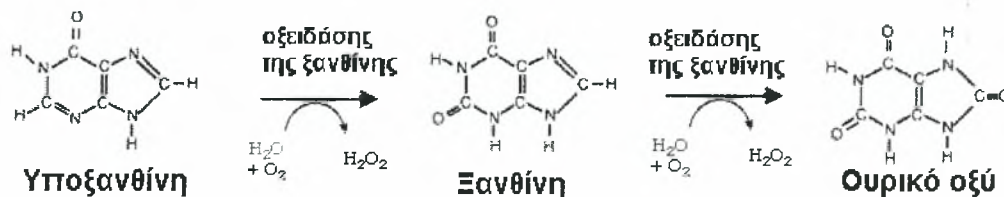
Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα κυτταροπλασματικό, οξειδοαναγωγικό ένζυμο, το οποίο βρίσκεται σε πολλούς ιστούς όπως το ήπαρ, το έντερο και ο πνεύμονας. Παίξει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πουρινών (Harrison 2002) και καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, ενώ ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (McCord and Fridovich 1968). Η οξειδάση της ξανθίνης συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Η συμμετοχή της οξειδάσης της ξανθίνης στην παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για τη μελέτη αυτού του ενζύμου. Ο ρόλος της στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις έχει επίσης ευρέως μελετηθεί (Cotelle 2001).

Η οξειδάση της ξανθίνης ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών του μολυβδαινίου. Είναι μια φλαβινοπρωτεΐνη (δεσμεύεται με FAD^+) και έχει μοριακό βάρος 270.000 kDa. Είναι αποένζυμο και χρησιμοποιεί ως συνένζυμο Mo (μολυβδαίνιο) και Fe (σίδηρο) με 2 και 8 θέσεις σύνδεσης αντίστοιχα. Οι θέσεις σύνδεσης για το Mo βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενώ οι θέσεις σύνδεσης με το Fe συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Enroth et al. 2000).



Εικόνα 6: Δομή της Οξειδάσης της Ξανθίνης

Πρόσφατα, παρουσιάστηκε η κρυσταλλική δομή της δεϋδρογενάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης (Enroth et al. 2000) (Εικόνα 6). Το ένζυμο στα θηλαστικά συντίθεται ως δεϋδρογενάση της ξανθίνης και μπορεί να μετατραπεί σε οξειδάση της ξανθίνης με οξείδωση των σουλφιδρυλικών ομάδων ή με πρωτεόλυση. Η μετατροπή αυτή έχει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς εμπλέκεται σε ασθένειες που σχετίζονται με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες (McCord et al. 1982).

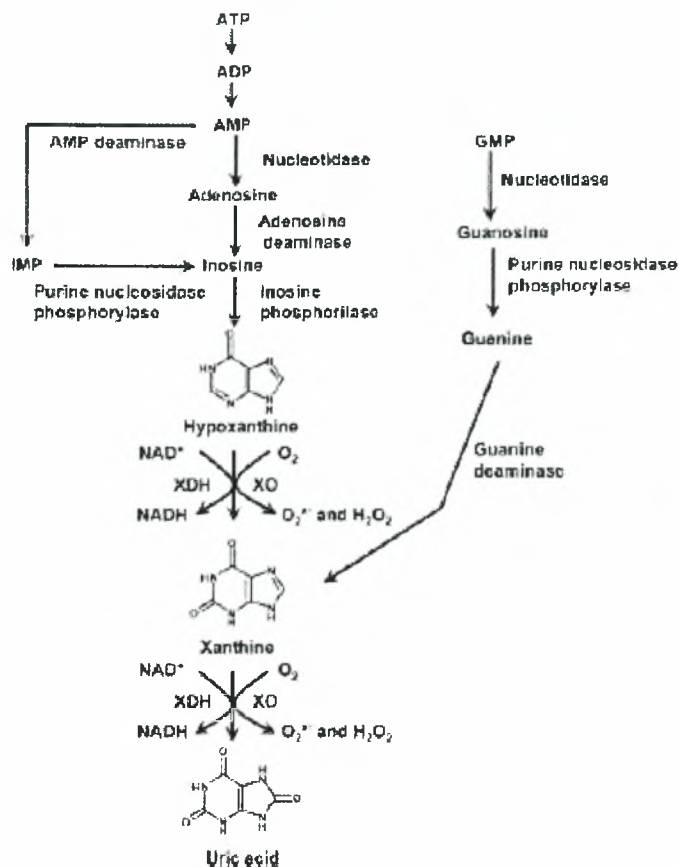


Εικόνα 7: Αντιδράσεις που καταλύει η οξειδάση της ξανθίνης

Το ουρικό οξύ είναι ένα ισχυρό αναγωγικό μέσο με σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς εξουδετερώνει τις ρίζες RO₂[·], OH[·], το όζον και το υποχλωριώδες οξύ. Έχει επίσης βρεθεί ότι στο ουρικό οξύ οφείλεται το 50-60% αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος του αίματος προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA από οξειδωτικές βλάβες (Wayner et al. 1987). Υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (υπερουριχαιμία) προκαλούν ουρική αρθρίτιδα, μια ασθένεια κατά την οποία άλατα ουρικού οξέος κρυσταλλώνονται και καταστρέφουν τις αρθρώσεις και τους νεφρούς (Tausche et al. 2006).

1.6.1. Οξειδάση της ξανθίνης και άσκηση

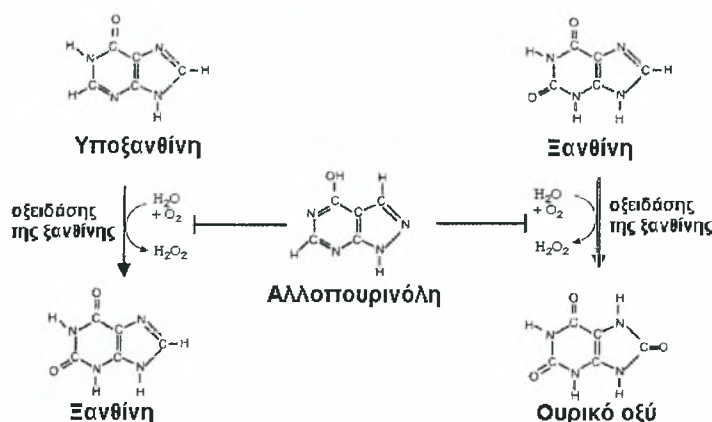
Κατά τη διάρκεια της άσκησης το ATP μετατρέπεται σε ADP και AMP λόγω των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων του οργανισμού. Τα επίπεδα του AMP αυξάνονται συνεχώς με αποτέλεσμα να ευνοείται η μετατροπή της δεϋδρογενάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης. Η υποξανθίνη αποτελεί το υπόστρωμα της οξειδάσης της ξανθίνης και μέσω της δράσης της μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά παράγονται ουρικό οξύ και ελεύθερες ρίζες (ROS) (Εικόνα 8). Έτσι, η οξειδάση της ξανθίνης εμπλέκεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης και συνεπώς στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 8. Το μονοπάτι του καταβολισμού των πουρινών

1.6.2. Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης αποτελεί την κύρια πηγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση (Hellsten et al. 1998). Οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης μειώνουν την παραγωγή του ουρικού οξέος και των ελευθέρων ριζών και δρουν είτε στην περιοχή πρόσδεσης των πουρινών, όπως η αλλοπουρινόλη, είτε στην περιοχή του συμπαραγόντα FAD. Επίσης, οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης σχετίζονται με τη θεραπεία ασθενειών, οι οποίες οφείλονται στην αυξημένη συγκέντρωση ουρικού οξέος (π.χ. ουρική αρθρίτιδα) (Tausche et al. 2006). Υπάρχουν αναστολείς που είναι ανάλογα πουρινών, όπως η αλλοπουρινόλη, η οξυπουρινόλη και η τισοπουρίνη (Imanaga et al. 2005). Η αλλοπουρινόλη είναι δομικό ανάλογο της υποξανθίνης (Εικόνα 9) (Kelley and Beardmore 1970). Χρησιμοποιείται για την ελεγχόμενη παραγωγή ουρικού οξέος στην ουρική αρθρίτιδα και την υπερουριχαιμία αλλά έχει αναφερθεί ότι προκαλεί τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις (εωσινοφιλία, ηπατίτιδα).



Εικόνα 9. Η αλλοπουρινόλη ως αναστολέας της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης

Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης (Cotelle 2001, Lin et al. 2006, Nagao et al. 1999). Πολλές μελέτες, που αφορούν στις φυσικές πολυφαινόλες των φυτών ή σε εκχυλίσματα δείχνουν ότι θα μπορούσαν να είναι καλή πηγή αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι ανταγωνιστικοί, μη ανταγωνιστικοί ή μικτοί αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 2) (Cotelle 2001).

Πίνακας 2. Είδος αναστολής των φλαβονοειδών στην οξειδάση της ξανθίνης

Classes of flavonoids	Compounds	Type inhibition
Flavanol	Catechin	Uncompetitive
	Epicatechin	Mixed
	Epigallocatechin	Mixed
	Epigallocatechin gallate	Competitive
	Epicatechin gallate	Mixed
Flavone	luteolin	Mixed
	5,6,7-trihydroxyflavone	Non competitive
	3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone	Competitive
	7,3',4',5'-tetrahydroxyflavone	Competitive
	3,7,3',4',5'-penta-hydroxyflavone	Competitive
Flavapone	7,4'-dihydroxyflavanone	Mixed
Chalcone	4,2',4'-trihydroxychalcone	Mixed
Dihydrochalcone	Fisetin	Mixed
Flavanol	Quercetin	Mixed [56-64], Competitive
	Myricetin	Mixed
	Kaempferol	Mixed
	Isohammetin	Mixed

1.7. Σταφύλια-Στέμφυλα-Βόστρυχοι

Η ποιότητα του οίνου εξαρτάται από την ποιότητα της πρώτης ύλης, δηλαδή του σταφυλιού. Ο βότρυς του σταφυλιού αποτελείται από δύο κύρια μέρη, το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας ή τσαμπί και τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Βότρυς της αμπέλου

Κατά μέσο όρο, η σύνθεση του σταφυλιού κυμαίνεται στις παρακάτω αναλογίες:

βόστρυχας 3-7% κατά βάρος και 30% κατ' όγκο

ράγες 93 -97% κατά βάρος και 70% κατ' όγκο

Τα σταφύλια (*Vitis vinifera*) περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινόλων και ιδιαίτερα φλαβονοειδών. Η ποσότητα και η σύνθεση των βιολογικά ενεργών μορίων που υπάρχουν στα σταφύλια και τα προϊόντα τους ποικίλουν ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, την ωριμότητα, τις συνθήκες της εποχής, την περιοχή παραγωγής και την απόδοση του φρούτου. Οι κυριότερες πολυφαινόλες των κόκκινων και των λευκών σταφυλιών είναι οι ανθοκυανίνες και οι φλαβανόλες αντίστοιχα. Γενικά, τα κόκκινα σταφύλια περιέχουν περισσότερες πολυφαινόλες σε σχέση με τα λευκά. Τα γίγαρτα και ο φλοιός τους είναι επίσης μια σημαντική πηγή φλαβονοειδών και συγκεκριμένα περιέχουν προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες σε σημαντικές ποσότητες. Η σύσταση των γιγάρτων είναι πολύ περισσότερο μεταβλητή από τη σύσταση του φλοιού (Girar et al. 1998).

Το πιο διαδεδομένο εμπορικό παράγωγο του σταφυλιού είναι το κρασί. Η διαδικασία οινοποίησης μετασχηματίζει τις υπάρχουσες στο σταφύλι πολυφαινόλες και ως αποτέλεσμα οι κύριες πολυφαινόλες στο κρασί είναι οι φλαβανόλες, οι ανθοκυανίνες, οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι συμπυκνωμένες ταννίνες και η ρεσβερατρόλη (Girar et al. 1998). Το ποσό των φλαβονοειδών, που εξάγεται κατά την οινοποίηση εξαρτάται από πολλούς

παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος επαφής του φλοιού, η ανάμειξη, η σύσταση σε αιθανόλη και το pH (Soleas et al. 1997). Οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση, τη γεύση, την αίσθηση στη γλώσσα και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του κρασιού.

1.8. Σκοπός του πειράματος

Τα σταφύλια και οι περιεχόμενες σε αυτά πολυφαινολικές ενώσεις έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Διάφορες ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών έχουν μελετηθεί για τη σύστασή τους και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των περιεχόμενων πολυφαινολικών συστατικών τους (Ren et al. 2003). Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων διάφορων εκχυλισμάτων σταφυλιών (*Vitis vinifera*). Τα εκχυλίσματα προέχονταν από διαφορετικά τμήματα ελληνικών ποικιλιών σταφυλιών (βόστρυχοι, στέμφυλα, καρποί) και έχουν ήδη μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Οι βόστρυχοι και τα στέμφυλα των σταφυλιών είναι παραπροϊόντα του κρασιού και η εκμετάλλευσή τους για την παραγωγή αντιοξειδωτικών παραγόντων είναι πολύ σημαντική. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως υπόστρωμα. Το ένζυμο αυτό είναι η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση αλλά συμβάλλει επίσης και στην παραγωγή του ουρικού οξέος, του σημαντικότερου αντιοξειδωτικού του πλάσματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

KH_2PO_4 (SIGMA, USA)

Na_2HPO_4 (Panreac, Spain)

EDTA (Panreac, Spain)

Ξανθίνη (SIGMA, USA)

Οξειδάση της ξανθίνης (γάλα βοδιού) (SIGMA, USA)

Αλλοπουρινόλη (SIGMA, USA)

2.1.2. Εκχυλίσματα

Τα 22 εκχυλίσματα, που εξετάστηκαν προέρχονταν από διάφορα τμήματα των σταφυλιών. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν 9 εκχυλίσματα βοστρύχων (Πίνακας 3), 5 εκχυλίσματα στέμφυλων (Πίνακας 4), 1 κλάσμα εκχυλίσματος στέμφυλων (Πίνακας 4), 10 εκχυλίσματα σταφυλιών (καρπών) (Πίνακας 5) καθώς και 1 εκχύλισμα οίνου (Πίνακας 4).

Πίνακας 3. Εκχυλίσματα βοστρύχων

Εκχυλίσματα βοστρύχων

Βηλάνα Σητείας 2003

Αθήρι Σαντορίνης 2003

Λιαστά Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2004

Βοηδόματο Σαντορίνης 2003

Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (1)

Αθήρι Σαντορίνης 2004

Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (1)

Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (2)

Ασύρτικο Σαντορίνης 2003

Πίνακας 4. Εκχυλίσματα στέμφυλων και οίνου

Εκχυλίσματα στέμφυλων

Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (1)

Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004

Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (2)

Λιαστά Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2003 (2)

Ασύρτικο Ρόδου 2003

Υδρολυμένο κλάσμα Στέμφυλων Λιαστών Μανδηλαριάς

Εκχύλισμα Οίνου

Εκχύλισμα Οίνου Κοστιφάλι Ηρακλείου

Πίνακας 5. Εκχυλίσματα σταφυλιών (καρπών)

Εκχυλίσματα σταφυλιών

Ασύρτικο Σαντορίνης 2003

Μανδηλαριά Ηρακλείου 2004 (ώριμο)

Κοστιφάλι Ηρακλείου 2004 (πρώιμο)

Μανδηλαριά Ρόδου 2003

Αγιωργίτικο Νεμέας 2004

Υδατικό Τυρνάβου

Μεθανολικό Μανδηλαριάς Σαντορίνης

Υδατικό Μανδηλαριάς Σαντορίνης

Μεθανολικό Ασύρτικο Σαντορίνης

Υδατικό Ασύρτικο Σαντορίνης

2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ

Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης με την ξανθίνη ως υπόστρωμα

2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με τη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης. Η παρατήρηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων έγινε φασματοφωτομετρικά με βάση τη μεταβολή του ρυθμού παραγωγής του ουρικού οξέος, το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση στα 295 nm σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.2. Υπολογισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος, στην οποία το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό

Για τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης ενός φυτικού εκχυλίσματος στη δραστικότητα ενός ενζύμου απαιτείται η κατασκευή καμπύλης ταχύτητας ενζύμου (V) / συγκέντρωσης υποστρώματος (S) για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του υποστρώματος, στην οποία η αντίδραση πραγματοποιείται με τη μέγιστη ταχύτητα (V_{max}). Στη συγκέντρωση αυτή του υποστρώματος το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό. Στη συνέχεια εξετάζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος στην επιλεγμένη συγκέντρωση του υποστρώματος και έτσι υπολογίζεται η συγκέντρωση IC_{50} , στην οποία το εκχύλισμα μειώνει κατά 50% τη δραστικότητα του ενζύμου που μελετάται.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν (ρυθμιστικό διάλυμα, ξανθίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και οξειδάση της ξανθίνης) για να γίνει η καμπύλη ενζύμου-υποστρώματος. Με βάση την καμπύλη αυτή υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ξανθίνης, στην οποία το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό. Η αντίδραση βασίστηκε στη μεταβολή της παραγωγής του ουρικού οξέος για 4 min στα 295 nm. Ο υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης ανά λεπτό υπολογίστηκε στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

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

Ρυθμιστικό διάλυμα (μl)	403	403	403	403	403	403
Διάλυμα ξανθίνης (μl)	80 (0.64μM)	80 (0.96μM)	80 (1.92μM)	80 (4.8μM)	80 (9.6μM)	80 (19.2μM)
Οξειδάση της ξανθίνης (μl)	17	17	17	17	17	17
Τελικός όγκος αντίδρασης (μl)	500	500	500	500	500	500

Στον επόμενο πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό της καμπύλης ταχύτητας ενζύμου / συγκέντρωσης υποστρώματος [V]/[S].

Πίνακας 7. Αποτελέσματα για την κατασκευή της καμπύλης ταχύτητας ενζύμου/συγκέντρωσης υποστρώματος

Συγκέντρωση ξανθίνης μM (S)	Δabs/min	Ταχύτητα (V) μmol/min/mg ενζύμου
0,64	0,009	0,009
0,96	0,018	0,018
1,92	0,035	0,036
4,8	0,038	0,038
9,6	0,038	0,038
19,2	0,038	0,038

Δabs/min: Ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό

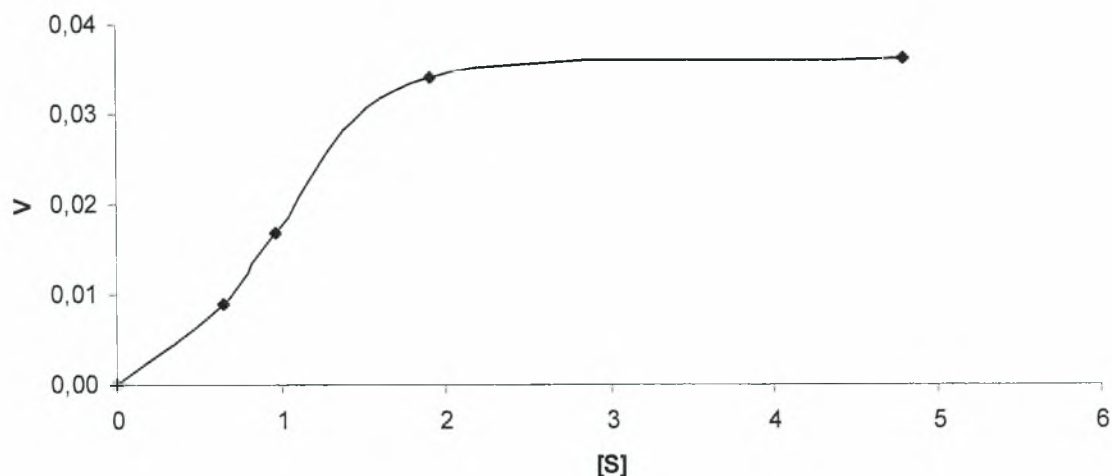
Η συγκέντρωση 4,8 μM της ξανθίνης είναι η επιθυμητή καθώς το ένζυμο αρχίζει να βρίσκεται σε κορεσμό. Σε αυτή τη συγκέντρωση η δράση του ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

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

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

Μοριακή απορροφητικότητα του προϊόντος (ουρικού οξέος): 9600.

Η ποσότητα του ενζύμου στην κυβέττα ήταν 0.054mg.



Διάγραμμα1. Καμπύλη ταχύτητας ενζύμου / συγκέντρωσης υποστρώματος

2.2.3. Εκτίμηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

Η αντίδραση περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 33 mM pH 7.5 με EDTA 0.1 mM, ξανθίνη (4.8 μM) και το προς μελέτη εκχύλισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινούσε αμέσως μετά την προσθήκη 17 μL οξειδάσης της ξανθίνης 2.55 u/mL αραιωμένης σε H₂O. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται το μίγμα της αντίδρασης και παρουσιάζονται ενδεικτικά δύο τυχαίες συγκεντρώσεις ενός εκχυλίσματος. Ο ρυθμός παραγωγής του ουρικού οξέος προσδιοριζόταν σε θερμοκρασία δωματίου στα 295 nm για 4 min. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

Πίνακας 8. Το μίγμα της αντίδρασης για την εκτίμηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

	Μάρτυρας	Δείγμα	Δείγμα
Εκχύλισμα (μl)	-	80 (50μg/ml)	80 (100μg/ml)
Ρυθμιστικό διάλυμα (μl)	403	323	323
Διάλυμα ξανθίνης (μl)	80	80	80
Οξειδάση της ξανθίνης (μl)	17	17	17

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η αλλοπουρινόλη, η οποία είναι ένας γνωστός και ισχυρός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης. Η συγκέντρωση

IC₅₀ της αλλοπουρινόλης ήταν πολύ μικρή και συγκεκριμένα υπολογίστηκε στα 2.1μM.

Υπολογισμοί

Η αναστολή της παραγωγής του ουρικού οξέος υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Αναστολή} = \frac{\overline{X \Delta_{\text{ABS control}}} - \overline{X \Delta_{\text{ABS δείγμα}}}}{\overline{X \Delta_{\text{ABS control}}}} \times 100$$

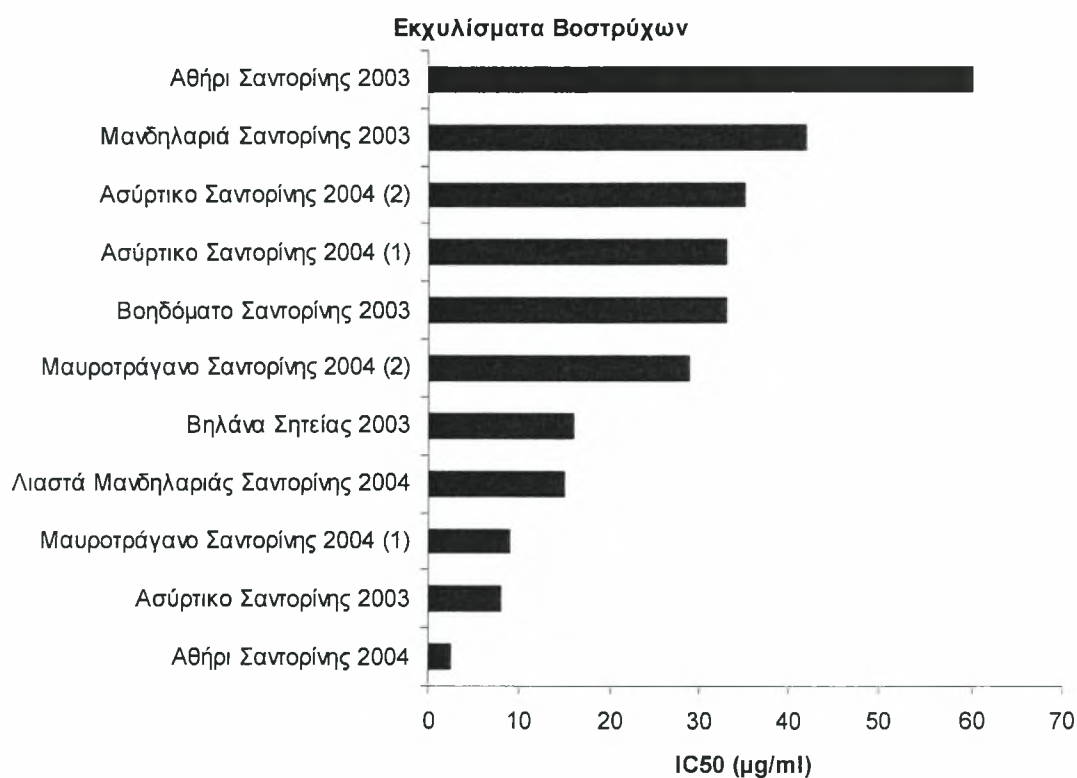
2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett. Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Το επίπεδο στατιστική σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα βοστρύχων

Όλα τα εκχυλίσματα βοστρύχων, που μελετήθηκαν ανέστειλαν τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 1). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προήρθε από τους βόστρυχους του φυτού Αθήρι Σαντορίνης 2004, ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν αυτό που προήρθε από τους βόστρυχους του φυτού Αθήρι Σαντορίνης 2003 με τιμές IC_{50} 2,5 $\mu\text{g/ml}$ και 60 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (διάγραμμα 2). 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 ($r = 0.740-0.984$).



Διάγραμμα 2. Συγκεντρώσεις IC_{50} των εκχυλισμάτων βοστρύχων

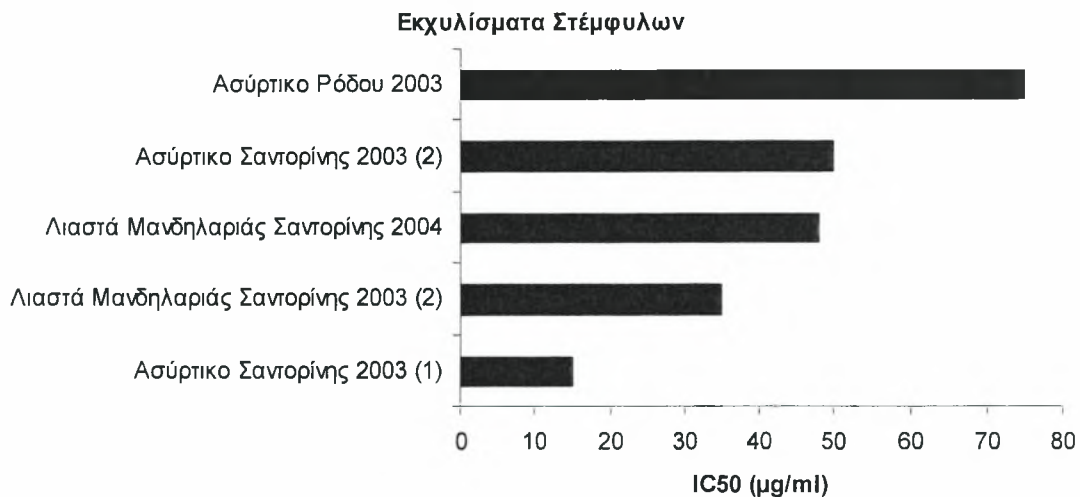
Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων βοστρύχων στη δραστικότητα της οξειδάσης της ζανθίνης

Εκχυλίσματα βοστρύχων	IC ₅₀ (µg/ml)	r	% αναστολή											
			1	2	5	10	20	30	50	80	100	200		
Αθήρι Σαντορίνης 2004	2,5	0,740	34*	49*	55*	58*	58*	58*	-	91*	-	-	-	
Ασύρτικο Σαντορίνης 2003	8	0,960	-	-	35*	55*	66*	-	-	78*	-	-	-	
Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (1)	9	0,973	-	-	25*	58*	74*	-	-	91*	-	-	-	
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004	15	0,970	-	-	23*	-	55*	-	-	65*	-	86*	100*	
Βηλάνα Σητείας 2003	16	0,958	-	-	25*	33*	54*	-	-	72*	86*	-	-	
Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2004 (2)	29	0,984	-	-	11	24*	42*	-	-	67*	83*	-	-	
Βοηδόματο Σαντορίνης 2003	33	0,916	-	-	NI	NI	NI	48*	-	50*	69*	-	-	
Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (1)	33	0,876	-	-	16	27*	33*	-	-	69*	77*	-	-	
Ασύρτικο Σαντορίνης 2004 (2)	35	0,951	-	-	NI	11	26*	-	-	71*	85*	-	-	
Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003	42	0,957	-	-	-	NI	27*	-	-	56*	67*	-	-	
Αθήρι Σαντορίνης 2003	60	0,880	-	-	NI	-	-	-	-	38*	88*	80*	96*	

NI: αναστολή < 10%, *: στατιστικά σημαντικές τιμές (P< 0,05), r: συντελεστής γραμμικής συσχέτισης spearman

3.2. Αποτελέσματα στέμφυλων

Τόσο τα 5 εκχυλίσματα στέμφυλων όσο και το ένα υδρολυμένο κλάσμα στέμφυλων Λιαστών Μανδηλαριάς, που μελετήθηκαν ανέστειλαν τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 2). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από τα στέμφυλα του Ασύρτικου Σαντορίνης ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν αυτό που προέκυψε από τα στέμφυλα του Ασύρτικου Ρόδου με τιμές IC_{50} 15 $\mu\text{g/ml}$ και 75 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα (διάγραμμα 3). Η τιμή IC_{50} του υδρολυμένου κλάσματος από τα στέμφυλα των Λιαστών Μανδηλαριάς ήταν 300 $\mu\text{g/ml}$. Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση ($r = 0.936-0.983$). Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα οίνου είχε τιμή IC_{50} 35 $\mu\text{g/ml}$.



Διάγραμμα 3. Συγκεντρώσεις IC_{50} των εκχυλισμάτων στέμφυλων

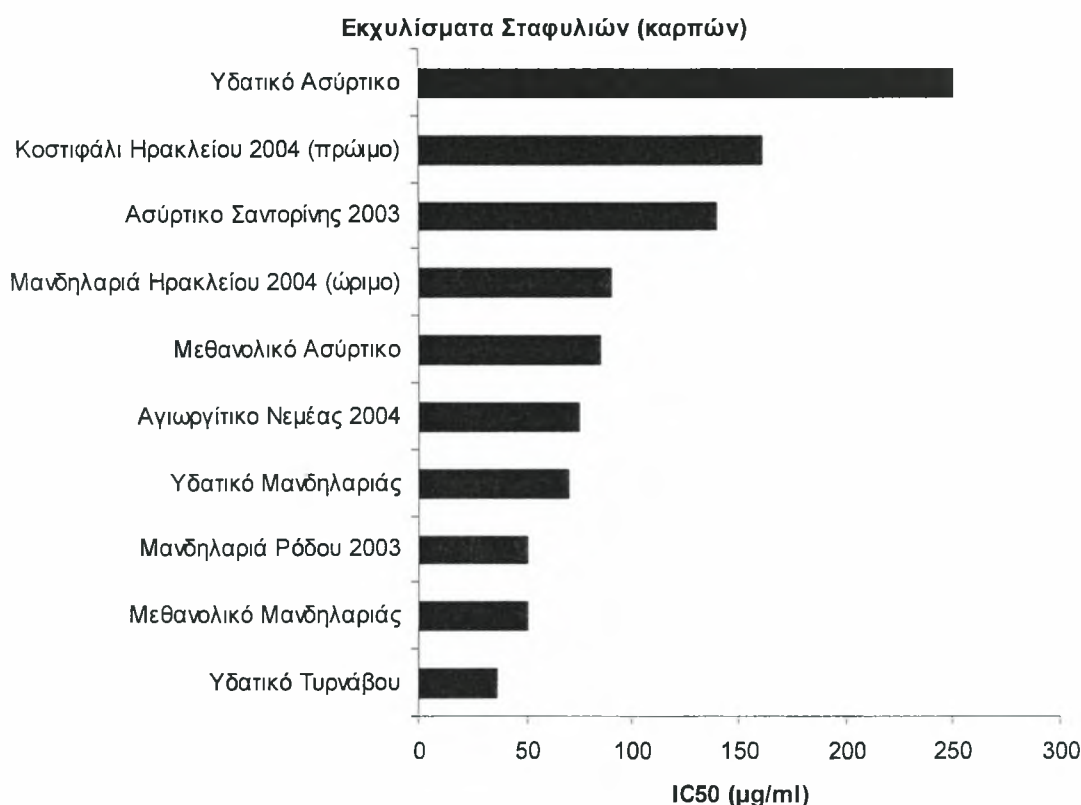
Πίνακας 10. Αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων στέμφυλων και οίνου στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

Εκχυλίσματα στέμφυλων	IC ₅₀ (μg/ml)	r	% αναστολή μg/ml											
			5	10	20	50	80	100	200	400	500			
Ασύρτικο Σαντορίνης 2003 (1)	15	0,952	19	36*	56*	83*	94*	-	-	-	-	-	-	
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2003	35	0,983	-	12	41*	56*	-	-	-	-	-	-	-	
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2004	48	0,935	-	31*	39*	51*	68*	69*	-	-	-	-	-	
Ασύρτικο Σαντορίνης 2003	50	0,936	-	20	30*	50*	65*	63*	-	-	-	-	-	
Ασύρτικο Ρόδου 2003	75	0,981	-	NI	17	31*	55*	72*	-	-	-	-	-	
Υδρολυμένο κλάσμα στέμφυλων Λιαστά Μανδηλαριάς	300	0,972	-	-	-	-	-	-	12	34*	67*	79*	-	
Οίνου Κοσσιφάλι Ηρακλείου	35	0,982	-	28*	40*	61*	74*	81*	-	-	-	-	-	

NI: αναστολή < 10%, *: στατιστικά σημαντικές τιμές (P< 0,05), r: συντελεστής γραμμικής συσχέτισης spearman

3.3. Αποτελέσματα σταφυλιών

Όλα τα εκχυλίσματα σταφυλιών που εξετάστηκαν ανέστειλαν τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Πίνακας 3). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν το υδατικό Τυρνάβου ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν το υδατικό Ασύρτικο με τιμές IC_{50} 36 $\mu\text{g/ml}$ και 250 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Με βάση τις τιμές του παράγοντα γραμμικής συσχέτισης (r) της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και του ποσοστού αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου, η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων παρουσίασε υψηλή γραμμική συσχέτιση ($r = 0.926-0.983$).



Διάγραμμα 4. Συγκεντρώσεις IC_{50} των εκχυλισμάτων σταφυλιών

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών) στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

Εκχυλίσματα σταφυλιών	IC ₅₀ (μg/ml)	r	% αναστολή											
			0.5	5	25	40	50	100	150	200	300	500		
Υδατικό Τυρνάβου	36	0,926	-	20*	-	-	-	59*	67*	-	-	-	-	-
Μεθανολικό Μανδηλαριάς Σαντορίνης	50	0,970	NI	25*	-	-	-	-	62*	-	-	-	-	84*
Μανδηλαριά Ρόδου 2003	50	0,983	-	-	NI	19	50*	50*	73*	85*	-	-	-	-
Υδατικό Μανδηλαριάς Σαντορίνης	70	0,972	NI	30*	-	-	-	59*	90*	-	-	-	-	-
Αγιωργίτικο Νεμέας 2004	75	0,972	-	33*	-	-	-	-	65*	79*	91*	-	-	-
Μεθανολικό Ασύρτικο Σαντορίνης	85	0,970	-	NI	-	-	-	40*	52*	-	-	-	-	78*
Μανδηλαριά Ηρακλείου 2004 (ώριμο)	90	0,983	-	33*	-	-	-	-	54*	67*	73*	86*	-	-
Ασύρτικο Σαντορίνης 2003	140	0,960	-	18	-	-	-	-	30*	54*	58*	-	-	79*
Κοσσιφάλι Ηρακλείου 2004 (πρώιμο)	160	0,954	-	25*	-	-	-	-	38*	49*	55*	68*	-	-
Υδατικό Ασύρτικο Σαντορίνης	250	0,970	-	NI	-	-	-	21	40*	-	-	-	-	64*

NI: αναστολή < 10%, *: στατιστικά σημαντικές τιμές (P< 0,05), r: συντελεστής γραμμικής συσχέτισης spearman

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Διάφορες ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών έχουν μελετηθεί για τη σύστασή τους και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των περιεχόμενων πολυφαινολικών συστατικών τους. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων διάφορων εκχυλισμάτων σταφυλιών (*Vitis vinifera*). Τα εκχυλίσματα προέρχονταν από διαφορετικά τμήματα (βόστρυχοι, στέμφυλα, καρποί) ελληνικών ποικιλιών σταφυλιών και έχουν ήδη μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες (Ren et al. 2003). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης διάφορων εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως υπόστρωμα.

Έχει παρατηρηθεί ότι το κρασί και τα σταφύλια έχουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν (Meyer et al. 1997, Torres et al. 2002). Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν αντιοξειδωτικά συμβάλλοντας εν μέρει στην πρόληψη ασθενειών, που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες (Manach et al. 2004). Μία ακόμη ιδιότητα των πολυφαινολικών ενώσεων, που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η ανασταλτική δράση τους στην οξειδάση της ξανθίνης (Cotelle 2001, Lin et al. 2006, Nagao et al. 1999).

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση 10 εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), 6 εκχυλισμάτων στέμφυλων, 9 εκχυλισμάτων βοστρύχων και 1 εκχυλίσματος οίνου στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν παρουσίασαν αναστολή στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Το εύρος τιμών του IC₅₀ των εκχυλισμάτων των σταφυλιών κυμαίνεται από 36 μg/ml έως 250 μg/ml, των εκχυλισμάτων στέμφυλων από 15 μg/ml έως 75 μg/ml και των εκχυλισμάτων βοστρύχων από 2.5 μg/ml έως 60 μg/ml. Συνεπώς, από την σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα διαφορετικά μέρη του φυτού που μελετήθηκαν προκύπτει ότι τα πιο δραστικά είναι τα εκχυλίσματα βοστρύχων.

Η παρατηρούμενη αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης από τα φυτικά εκχυλίσματα αποδίδεται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Η διαφορετική δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται στη διαφορετική σύστασή τους, αφού προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών. Η χημική ανάλυση ίδιων

ποικιλιών σταφυλιών, μεταγενέστερων όμως ετών, με τη μέθοδο HPLC (Πίνακας 12) έδειξε ότι υπάρχουν αρκετές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στις περιεχόμενες πολυφαινόλες (παράρτημα). 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, όπως φαίνεται από το δείκτη της συνολικής ποσότητας πολυφαινολών (TPC, total polyphenolic content) (Πίνακας 12).

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). Παρά το γεγονός αυτό, έχει βρεθεί ότι οι παραπάνω πολυφαινόλες δεν είναι τόσο δραστικές απέναντι στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Nagao et al. 1999). Επιπροσθέτως, πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η кемπφερόλη και ορισμένα πολυφαινολικά οξέα δεν υπάρχουν στα εκχυλίσματα των σταφυλιών σε σημαντικά ποσά. Ειδικότερα, φλαβονοειδή όπως οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης (Lin et al. 2006, Nagao et al. 1999).

Ακόμη, η ποικιλία των πολυφαινολών που εμφανίζεται στα εκχυλίσματα στέμφυλων και των βοστρύχων είναι μεγαλύτερη από αυτή των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), όπως συμβαίνει στην περίπτωση των στυλβενίων (Πίνακας 12) (Anastasiadi et al. 2009). Συνεπώς, η διαφορά στην ανασταλτική δράση των διαφορετικών εκχυλισμάτων οφείλεται στη διαφορετική χημική τους σύσταση.

Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων στην οξειδάση της ξανθίνης οδηγεί τόσο στη μείωση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών όσο και στη μείωση του παραγόμενου ουρικού οξέος. Σε παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με τη μεγάλη παραγωγή ουρικού οξέος (π.χ. ουρική αρθρίτιδα), η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης από φυτικά εκχυλίσματα και ενώσεις που προέρχονται από αυτά θα μπορούσε να έχει θετικές επιδράσεις. Ωστόσο, εξαιτίας της πλειοτροπικής δράσης

των εκχυλισμάτων και των πολυφαινολών δε φαίνεται να μπορεί να αντικατασταθεί η χορήγηση της αλλοπουρινόλης με φυτικά εκχυλίσματα.

Είναι επίσης άξιο αναφοράς ότι η δράση της οξειδάσης της ξανθίνης είναι πιο έντονη κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η δράση των παραπάνω ουσιών στην οξειδάση της ξανθίνης έχει ως αποτέλεσμα τόσο τη μείωση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών όσο και τη μείωση του παραγόμενου ουρικού οξέος, που είναι ένα απ' τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά του πλάσματος. Από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης μετά από χορήγηση αλλοπουρινόλης μείωσε την απόδοση επιμύων στο κολύμπι (Veskoukis et al. 2008). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αναστολή του ενζύμου μπορεί να διαταράξει την ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος με αποτέλεσμα η δράση τέτοιων αντιοξειδωτικών μορίων να μην έχει θετικά αποτελέσματα στον οργανισμό κατά τη διάρκεια της άσκησης. Το προς τα πού κλείνει αυτή η ισορροπία εξαρτάται από τη χρονική στιγμή της χορήγησης των εκχυλισμάτων καθώς και από τη συγκέντρωσή τους. Έτσι, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων και πώς αυτή επηρεάζει την αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι εκχυλίσματα στέμφυλων και βοστρύχων, δηλαδή τμημάτων της αμπέλου μη εκμεταλλεύσιμων για καταναλωτικούς σκοπούς παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης. Είναι γνωστό ότι οι βόστρυχοι και τα στέμφυλα των σταφυλιών είναι παραπροϊόντα της οινοποίησης και η εκμετάλλευσή τους μπορεί να είναι ωφέλιμη για το περιβάλλον. Η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών θεωρείται μια από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες και το 2006 άγγιξε τους 69 εκατομμύρια τόνους (FAOSTAT, 2007). Περίπου το 80% της ποσότητας των σταφυλιών χρησιμοποιείται στην οινοποιία οπότε υπολογίζεται ότι ο όγκος των απορριμμάτων των σταφυλιών ανέρχεται στους 10 εκατομμύρια τόνους μέσα σε λίγες εβδομάδες από την έναρξη της καλλιεργητικής περιόδου. Ίσως, λοιπόν, να χρειάζεται επαναπροσδιορισμός της χρήσης των παραπροϊόντων της οινοποίησης των σταφυλιών λόγω των ποικίλων βιολογικών ιδιοτήτων τους.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Bianchini F and Vanio H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? *European Journal of Cancer Prevention*, 2003, 12:417-425.
- Blochina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review, *Annals of Botany*, 2003, 91:179-194.
- Carlo GD, Mascolo N, Izzo A, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 1999, 4:337-353.
- Cotelle N. Role of Flavonoids in Oxidative stress, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2001, 1:569-590.
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97:10723-8.
- Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 2001, 475:89-111.
- Girar B and Mazza G. Functional grape and citrus products. *In factional Foods Biochemical and Processing Aspects*, 1998, 139-192.
- Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*, 1997, 55:44-49.
- Halliwell B. Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*, 2001.
- Harisson R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med*, 2002, 33:774-97.
- Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA. Urate uptake and lowered levels in human muscle after high- intensity intermittent exercise. *Am J Physiol*, 1998, 274:600-606.
- Imanaga T, Kobayashi D, Hirayama M, Maeda T, Tamai I. Involvement of uric transporter in increased renal clearance of the xanthine Oxidase inhibitor oxypurinol induced by a uricosuric agent, benzbromarone. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2005, 33:1791-5.

- Kelley WN and Beardmore TD. Allopurinol: Alteration in Pyrimidine Metabolism In man, *Science*,1970, 169:388 – 390.
- Lin PY & Lai HM. Bioactive compounds in legumes and their germinated products, *J Agric Food Chem*, 2006, 54:3807-3814.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 2004, 727-47.
- McCord JM and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968, 243:5753-5760.
- Meyer AS, Yi OS, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN. Inhibition of human low- density lipoprotein oxidation in relation to composition and phenolic antioxidants in grapes (*Vitis Vinifera*), *J. Agric Food Chem*, 1997, 45:1638-1643.
- Mylonas C and Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue Damage, *In Vivo*, 1999,13:295-310.
- Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63:1787-1790.
- Nijveldt R. Van Nood Els, Van Hoorn EC, P. Boelens G. Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *American Society for Clinical Nutrition*, 2001, 74:48-25.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medical Research Reviews*, 2003, 23:519-534.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, 20:933-956.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45:287-306.
- Soleas GJ, Diamandidis ER, Goldberg DM. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1997, 11:287-313.
- Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents, *J.Cell Biochemistry* 1995, Suppl, 22:169-80.

- Tausche AK, Unger S, Richter K, Wunderlich C, Grässler J, Roch B, Schröder HE. Hyperuricemia and gout: diagnosis and therapy. *Internist (Berl)*, 2006, 47:509–20.
- Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bober R. Valorization of grape (*Vitis Vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric Food Chem*, 2002, 50:7548-7555.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, 266:37-56.
- Van de Wiel A, Van Golde PH, Hart HC. Blessings of the grape, *European Journal of Internal Medicine*, 2001, 12:484-48.
- Vermerris W. and Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. Netherlands, 2006, Springer.
- Veskokoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008, 33:1140-54.
- Watanabe S, Uesugi S, Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynaecological problems and possible immune potentiation, *Biomed Pharmacother*, 2002, 56:302-312.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15:422-433.
- Καράταγλης Σ. Φυσιολογία Φυτών, 1994, Εκδόσεις Art of text.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 12. Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών), στέμφυλων και βοστρύχων

	Εκχυλίσματα Σταφυλιών (καρποί)				Εκχυλίσματα Στέμφυλων				Εκχυλίσματα Βοστρύχων						
	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασσύρτικο		Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασύρτ. Σαντορίνη	Ασσύρτικο	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασσύρτικο	Λίστα Μανδηλαριά	Μαυροτράγανο	Αθήρι Σαντορίνη 2003	Αθήρι Σαντορίνη 2004
Σύνιστατικά															
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
Υδρο-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
Υδρο-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 B3	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 B2	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
<i>trans</i> -Καφρατικό 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
<i>trans</i> -Ρεοβαταρόλη	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
αQ 3-O-γλακτοσίδη	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
αQ 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
αQ 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