



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Επίδραση εκχυλισμάτων ψυχανθών στην ενζυμική
δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης



ΖΗΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8181/1
Ημερ. Εισ.: 27-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΖΗΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087088



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση εκχυλισμάτων ψυχανθών στην ενζυμική
δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Επιμέλεια Εργασίας: Ζήκου Μαρία

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Κουρέτας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Λιαδάκη Καλλιόπη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Στάγκος Δημήτριος: Διδάσκων ΠΔ 407/80
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα.

Ευχαριστίες

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον καθηγητή μου κύριο Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, το οποίο μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις για την μετέπειτα πορεία μου.

Στη συνέχεια θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες Σπανού Χρύσα και Βεσκούκη Άρη για την καθοδήγηση, επίβλεψη και βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία και για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε.

*Στους γονείς μου
Αναστάσιο και Χρυσούλα*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	9
<u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	10
1.1. Ψυχανθή	10
1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά των ψυχανθών	10
1.1.2. Ψυχανθή και διατροφή	11
1.1.3. Ψυχανθή και αντιδιατροφικοί παράγοντες	13
1.1.4. Φυτοχημικές ενώσεις και ψυχανθή	14
1.2. Πολυφαινόλες	14
1.2.1. Φαινολικά οξέα	15
1.2.2. Φλαβονοειδή	16
1.2.3. Στυλβένια	19
1.2.4. Λιγνάνια	20
1.2.5. Απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών	21
1.2.6. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών	21
1.3. Ελεύθερες ρίζες	22
1.3.1. Πηγές ελευθέρων ριζών	24
1.3.1.α. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών	24
1.3.1.β. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών	25
1.3.2. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα	25
1.4. Οξειδωτικό στρες	26
1.5. Αντιοξειδωτικά	27
1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	27
1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	29
1.6. Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)	30
1.6.1. Γενικές πληροφορίες	30
1.6.2. Πρωτεϊνική δομή	31
1.6.3. Μηχανισμός δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης	33
1.6.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της υπεροξειδικής δισμουτάσης	33
1.6.5. Γενικές πληροφορίες-Δράση της πυρογαλλόλης	34
1.6.6. Δραστηκότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης	35
1.7. Ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας <i>Leguminosae</i>	37
1.8. Σκοπός	42
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	43
2.1. Υλικά	43
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	43
2.1.2. Προετοιμασία αιμολύματος	43
2.1.3. Εκχυλίσματα ελληνικών ψυχανθών	43
2.2. Μέθοδοι	45

2.2.1. Αρχή της μεθόδου	45
2.2.2. Συστατικά της αντίδρασης	45
2.2.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό	46
2.2.4. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης	48
2.2.5. Υπολογισμός επαγωγής της SOD-PC ₅₀	49
2.2.6. Στατιστική ανάλυση	50
<u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	51
3.1. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης	51
3.2. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης	52
<u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	54
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	57

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1. Όσπρια
- Εικόνα 2. Πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής
- Εικόνα 3. Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων
- Εικόνα 4. Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων
- Εικόνα 5. Βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών
- Εικόνα 6. Βασικές χημικές δομές της οικογένειας των φλαβονοειδών
- Εικόνα 7. Η χημική δομή των φλαβονολών (καιμφερόλη, κερκετίνη) και των φλαβόνων (απιγενίνη, λουτεολίνη).
- Εικόνα 8. Χημική δομή γενιστεΐνης
- Εικόνα 9. Γενικός χημικός τύπος ανθοκυανινών
- Εικόνα 10. Χημική δομή της ρεσβερατρόλης
- Εικόνα 11. Χημική δομή λιγνανών και των ζωικών παραγώγων τους
- Εικόνα 12. Ελεύθερη ρίζα
- Εικόνα 13. Παραγωγή ROS από σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου
- Εικόνα 14. Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών
- Εικόνα 15. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών οδηγεί στη δημιουργία οξειδωτικού στρες
- Εικόνα 16. Εξουδετέρωση μιας ελεύθερης ρίζας από μία αντιοξειδωτική ουσία
- Εικόνα 17. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά
- Εικόνα 18. Η δράση της SOD
- Εικόνα 19. Δομή της κυτταροπλασματικής μορφής της SOD (Cu/Zn-SOD)
- Εικόνα 20. Δομή της μιτοχονδριακής μορφής της SOD(Mn-SOD)
- Εικόνα 21. Δομή της εξωκυττάριας μορφής της SOD
- Εικόνα 22. Δομή της πυρογαλλόλης
- Εικόνα 23. *Phaseolus vulgaris* (A) Πόα και (B) Σπέρματα
- Εικόνα 24. Πόα *Vicia tenuifolia*
- Εικόνα 25. *Lotus edulis*: (A) Πόα και (B) Καρπός
- Εικόνα 26. *Vicia faba*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα
- Εικόνα 27. *Lupinus albus*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα
- Εικόνα 28. Πόα και σπέρματα του *Lotus longisiliquosus*
- Εικόνα 29. *Lens culinaris*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα
- Εικόνα 30. *Lathyrus sativus*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα
- Εικόνα 31. Πόα *Lathyrus laxiflorus*
- Εικόνα 32. Πόα *Lathyrus clymenum*
- Εικόνα 33. *Tetragonolobus purpureus*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Αντιδιατροφικοί παράγοντες ψυχανθών.
- Πίνακας 2.** Δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS) και τα κύρια χαρακτηριστικά τους.
- Πίνακας 3.** Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).
- Πίνακας 4.** Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae*.
- Πίνακας 5.** Πίνακας ποσοτήτων για την εύρεση της μέγιστης ταχύτητας.
- Πίνακας 6.** Επιλογή συγκέντρωσης πυρογαλλόλης στην οποία το ένζυμο δρα με τη μέγιστη ταχύτητα.
- Πίνακας 7.** Πίνακας ποσοτήτων για την εύρεση επίδρασης των εκχυλισμάτων στην δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.
- Πίνακας 8.** Πίνακας ποσοτήτων για την εύρεση επίδρασης των εκχυλισμάτων στην δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης απουσία ενζύμου.
- Πίνακας 9.** Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.
- Πίνακας 10.** Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1.** Καμπύλη ταχύτητας και συγκέντρωσης πυρογαλλόλης.
- Διάγραμμα 2.** Συγκεντρώσεις PC₅₀ υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών.
- Διάγραμμα 3.** Συγκεντρώσεις PC₅₀ μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NSP: μη-διαθέσιμοι υδατάνθρακες

NO[•]: ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου

O₂^{•-}: ανιόν του σούπεροξειδίου

¹O₂: μονήρης κατάσταση του οξυγόνου

O₃ : Όζον

OH[•]: ρίζα του υδροξυλίου

H₂O₂: υπεροξείδιο του υδρογόνου

RO[•]: ρίζα του αλκοξυλίου

ROO[•]: ρίζα του υπεροξυλίου

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

HOCl: Υποχλωριώδες οξύ

CAT: καταλάση

SOD: υπεροξειδική δισμουτάση

GPX: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG: γλουταθειόνη οξειδωμένη

PUFAs: polyunsaturated fatty acids (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψυχανθή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα δικοτυλήδων φυτών που ανήκουν στην οικογένεια *Leguminosae*. Οι καρποί τους, τα όσπρια, που καταναλώνονται ως τρόφιμα αποτελούν σημαντικό τμήμα της Ελληνικής και Μεσογειακής διατροφής. Είναι πλούσια σε υδατάνθρακες (κυρίως άμυλο) και πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, ανόργανα στοιχεία, όπως Ca, Fe, K, Mg και Zn, βιταμίνες και φυτοχημικές ουσίες. Η σημαντικότερη κατηγορία αυτών των φυτοχημικών ουσιών είναι οι πολυφαινόλες. Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινολικές ουσίες έχουν θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν ως αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά φυτικά εκχυλίσματα, που προέρχονται από διάφορα ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* που καλλιεργούνται σε όλη την Ελλάδα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα αυτά παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων πολυφαινολών στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες. Από τα 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών που μελετήθηκαν προκύπτει ότι μόνο τρία από κάθε ομάδα έδειξαν επαγωγή στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης εκ των οποίων τρία ανέστειλαν και την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης. Η ικανότητά τους να επηρεάζουν τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης τα καθιστά σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων.

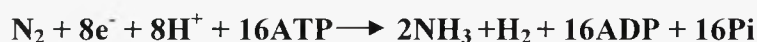
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ψυχανθή

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια *Leguminosae*, που αποτελεί ομάδα δικοτυλήδονων φυτών και περιλαμβάνει πάνω από 18.000 είδη, κατανεμημένα σε 650 γένη περίπου (Duranti, 2006). Η οικογένεια *Leguminosae* χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία και χωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες: τη *Mimosoideae* (80 γένη και 3200 είδη), τη *Caesalpinioideae* (170 γένη και 14000 είδη) και τη *Faboideae* (470 γένη και 14000 είδη) (Kurlovich & Ropyev, 1995). Η *Mimosoideae* και η *Faboideae* είναι σε μεγάλο βαθμό μονοφυλετικές ενώ η *Caesalpinioideae* φαίνεται να είναι παραφυλετική. Η οικογένεια των *Leguminosae* είναι συγγενική με την οικογένεια των *Cercideae*. Οι οικογένειες αυτές είναι αναγνωρίσιμες από τα άνθη τους (Martin et al, 2003).

1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά των ψυχανθών

Η μορφολογία των ψυχανθών περιλαμβάνει κυρίως ποώδη μονοετή ή πολυετή φυτά, αλλά και θάμνους, φρυγανώδη φυτά και δένδρα. Τα ψυχανθή έχουν ισχυρό πασσαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Στην κύρια ρίζα και στις διακλαδώσεις της παρατηρούνται εξογκώσεις, που ονομάζονται φυμάτια. Στα φυμάτια γίνεται συμβιωτική δέσμευση του αζώτου από τα βακτήρια *Rhizobium* ή *Bradyrhizobium* (Γαλάτης, 2003). Τα *Rhizobium* δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό μοριακό άζωτο και το μετατρέπουν σε νιτρικά ιόντα, που μπορούν να απορροφηθούν από τα ψυχανθή. Τη βιολογική αυτή μετατροπή καταλύει το πολυενζυμικό σύστημα της νιτρογονάσης ή αζωτάσης (Τσέκος, 2004). Στη βιολογική αζωτοδέσμευση το N_2 ανάγεται σε NH_3 σύμφωνα με την εξής αντίδραση:



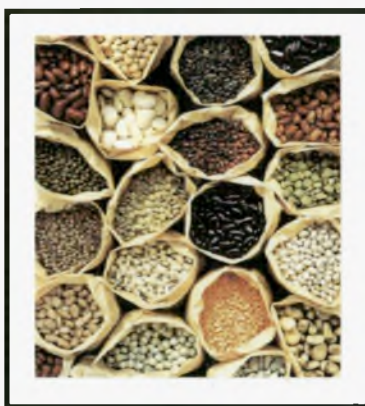
Οι βλαστοί τους εμφανίζουν συνήθως διακλαδώσεις και μπορεί να είναι λείοι ή τριχωτοί με όρθια, έρπουσα ή αναρριχώμενη ανάπτυξη. Τα δύο φύλλα είναι συνήθως απλά, εκφύονται αντίθετα στον πρώτο κόμβο του βλαστού, ενώ τα υπόλοιπα είναι σύνθετα κατ' εναλλαγή. Τα φύλλα αποτελούνται από τρία ή περισσότερα φυλλάρια περιτόληκτα ή αρτιόληκτα, που διαφέρουν σε υφή, σχήμα, αριθμό και μέγεθος ανάλογα με το είδος και την ποικιλία. Σε μερικά είδη το ακραίο φυλλάριο ή το ζεύγος

των φυλλαρίων μπορεί να αντικαθίσταται από απλή ή διακλαδιζόμενη έλικα. Στη βάση του σύνθετου φύλλου διακρίνεται ένα ζευγάρι μικρότερων φυλλαρίων, που ονομάζονται παράφυλλα και ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος.

Οι ταξιανθίες είναι επάκριες ή μασχαλαιές και τα άνθη τους είναι διατεταγμένα σε κεφαλές ή βότρυς. Το άνθος των ψυχανθών περιλαμβάνει ένα σωληνοειδή κάλυκα που καταλήγει σε πέντε ανισομήκη ή σχεδόν ισομήκη δόντια και στεφάνη που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών ειδών. Το μεγαλύτερο είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους, ελεύθερα το ένα από το άλλο που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους πέταλα που αποτελούν την τρόπιδα. Στο εσωτερικό της τρόπιδας βρίσκονται δέκα στήμονες, των οποίων τα νήματα μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι (Τσέκος, 2004).

1.1.2. Ψυχανθή και διατροφή

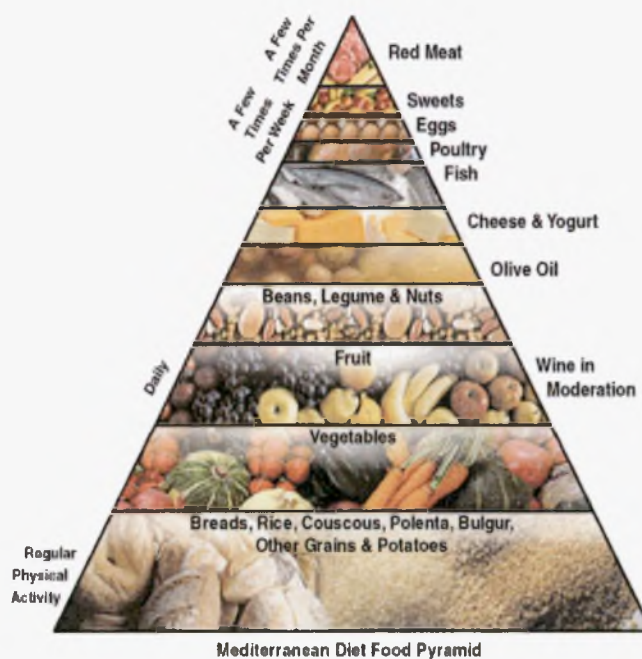
Τα ψυχανθή καλλιεργούνται για παραγωγή ξηρού χόρτου (σανός), σπόρου για την κτηνοτροφία και σπόρου για ανθρώπινη κατανάλωση. Οι καρποί των ψυχανθών ονομάζονται όσπρια. Τα πιο σημαντικά ψυχανθή που καλλιεργούνται για το σπόρο τους και που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από την κτηνοτροφία είναι τα μπιζέλια, τα κτηνοτροφικά κουκιά, τα λούπινα και η σόγια, σπόροι με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Τα ψυχανθή που καλλιεργούνται για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι τα όσπρια και πιο συγκεκριμένα φασόλια, ρεβίθια, φακές, κουκιά, λαθούρι, μπιζέλια, σόγια, φάβα (Εικόνα 1) (Duranti M., 2006).



Εικόνα 1. Όσπρια

Τα όσπρια είναι πλούσια σε υδατάνθρακες (κυρίως άμυλο) και πρωτεΐνες (17-30%), φτωχά σε λιπαρά (1-2%), φυτικές ίνες, ανόργανα στοιχεία, όπως Ca, Fe, K, Mg

και Zn και βιταμίνες (Guillon & Champ, 2002) και αποτελούν σημαντικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής. Η Μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή πρόσληψη πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών με την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, κόκκινου κρασιού, παρθένου ελαιόλαδου και οσπρίων (Trichoroulou & Vasilopoulou, 2000) (Εικόνα 2). Τα όσπρια αποτελούν ιδανική πηγή πρωτεΐνης (Duranti M., 2006) χωρίς την παρουσία κορεσμένων λιπαρών οξέων, όπως συμβαίνει με το κόκκινο κρέας και παράλληλα είναι ιδανικό υποκατάστατο κρέατος για τους φυτοφάγους. Όμως, επειδή το αμινοξύ μεθειονίνη απουσιάζει από τα όσπρια, για να υπάρχει πληρότητα αμινοξέων θα πρέπει αυτά να συνοδεύονται με δημητριακά (όπως το ρύζι) ή ξηρούς καρπούς (όπως τα αμύγδαλα ή τα φυστίκια). Ωστόσο, η σόγια αποτελεί το μοναδικό όσπριο, που έχει πληρότητα αμινοξέων και είναι αντίστοιχη τροφή με το κρέας. Οι φακές και τα μαυρομάτικα φασόλια είναι καλή πηγή μη αιμικού σιδήρου και ενδείκνυνται για όσους πάσχουν από αναιμία. Τα όσπρια επίσης περιέχουν διάφορες φυτοχημικές ουσίες όπως οι πολυφαινόλες και για αυτό έχουν πολύ μεγάλη αξία στη διατροφή του ανθρώπου. Συμβάλλουν στη μείωση της χοληστερίνης, της παχυσαρκίας, της πιθανότητας εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακών παθήσεων (Duranti M., 2006).



Εικόνα 2. Πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής.

1.1.3. Ψυχανθή και αντιδιατροφικοί παράγοντες

Οι περισσότερες φυτικές πρωτεΐνες περιέχουν αντιδιατροφικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (Πίνακας 1) (Καράταγλης, 1994). Οι κυριότεροι αντιδιατροφικοί παράγοντες στα ψυχανθή είναι οι παρεμποδιστές πρωτεασών, οι λεκτίνες (Wiseman & Cole, 1988) οι ταννίνες (Marquardt, 1989) και οι μη διαθέσιμοι υδατάνθρακες (Smits & Annison, 1996) που μειώνουν αρκετά τη θρεπτική αξία των ψυχανθών. Οι λεκτίνες ή αιμογλουτινίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες και βρίσκονται στα περισσότερα ψυχανθή (Wiseman & Cole, 1988). Τα σπέρματα *Phaseolus* είναι πολύ πλούσια σε λεκτίνες. Τα μπιζέλια έχουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αιμογλουτινών σε σχέση με τους σπόρους φάβας και τα λούπινα (Wiseman & Cole, 1988). Οι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες (NSP) είναι οι μη-διαθέσιμοι υδατάνθρακες. Οι NSP είναι υπεύθυνοι για τη μικρή παραμονή της τροφής στον πεπτικό σωλήνα και για τη μειωμένη πεπτικότητα του αμύλου, των πρωτεϊνών και των λιπών (Roberfroid, 1993).

Πίνακας 1. Αντιδιατροφικοί παράγοντες

Αντιδιατροφικοί παράγοντες	Διατροφικές πηγές
Παρεμποδιστές τρυψίνης	Σπόροι σόγιας, μπιζελιού, φάβας, φασολιών
Παρεμποδιστές χυμοτρυψίνης	Σπόροι σόγιας, μπιζελιού, φάβας, φασολιών
Παρεμποδιστές αμυλάσης	Στα περισσότερα ψυχανθή
Ολιγοσακχαρίτες	Στα περισσότερα ψυχανθή
Συμπυκνωμένες ταννίνες	Σπόροι φάβας, σόργου, μπιζελιού, ελαιοκράμβης, κριθάρι
Λεκτίνες (αιμογλουτινίνες)	Σπόροι σόγιας, μπιζελιού, φάβας, φασολιών
Αντιγονικές πρωτεΐνες	Σπόροι σόγιας, μπιζελιού
Λιναμαρίνη	Λιναρόσποροι και περιστασιακά στο σόργο
Φυτίνη	Γενικά στα φυτά
Αλκαλοειδή (κινολιζιδίνη)	Λούπινα, πατάτες
Σαπωνίνες	Μηδικάλευρο
Γκοσσυπόλη	Βαμβακάλευρο
Μη διαθέσιμοι υδατάνθρακες	Σπόροι σόγιας, μπιζελιού, φάβας, κριθάρι, σιτάρι
Concavalin A	Σπόροι <i>Concavalia ensiformis</i> (καναβαλία)
ODAP	Σπόροι <i>Lathyrus sativus</i> , <i>Lathyrus cicera</i>
Γλυκοσινοειδή / μυροσινάση	Σπόροι ελαιοκράμβης

1.1.4. Φυτοχημικές ενώσεις στα ψυχανθή

Τα φυτά παράγουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων, οι οποίες εμφανίζονται να μην έχουν άμεση λειτουργική δράση στην αύξηση και στην ανάπτυξη τους. Αυτές οι ενώσεις ονομάζονται φυτοχημικές και αποτελούν τους δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού (Τσέκος 2004).

Οι φυτοχημικές ενώσεις θεωρούνται ότι είναι τα μη-λειτουργικά τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Προστατεύουν τα φυτά από τα βακτήρια, τους ιούς και τους μύκητες και συμβάλλουν στα φωτεινά και ζωηρά χρώματα που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά. (Τσέκος 2004). Οι ουσίες αυτές μπορούν να αποτελέσουν ιατρικά φάρμακα, δηλητήρια, αρωματικές ουσίες και βιομηχανικά υλικά (Agosta 1996). Η κατανάλωση φυτοχημικών ουσιών ως τμήμα της διατροφής του ανθρώπου μπορεί να αποτρέψει διάφορες ασθένειες όπως τις καρδιακές παθήσεις και τον καρκίνο (Dekker, 2004; Oleszek, 2003).

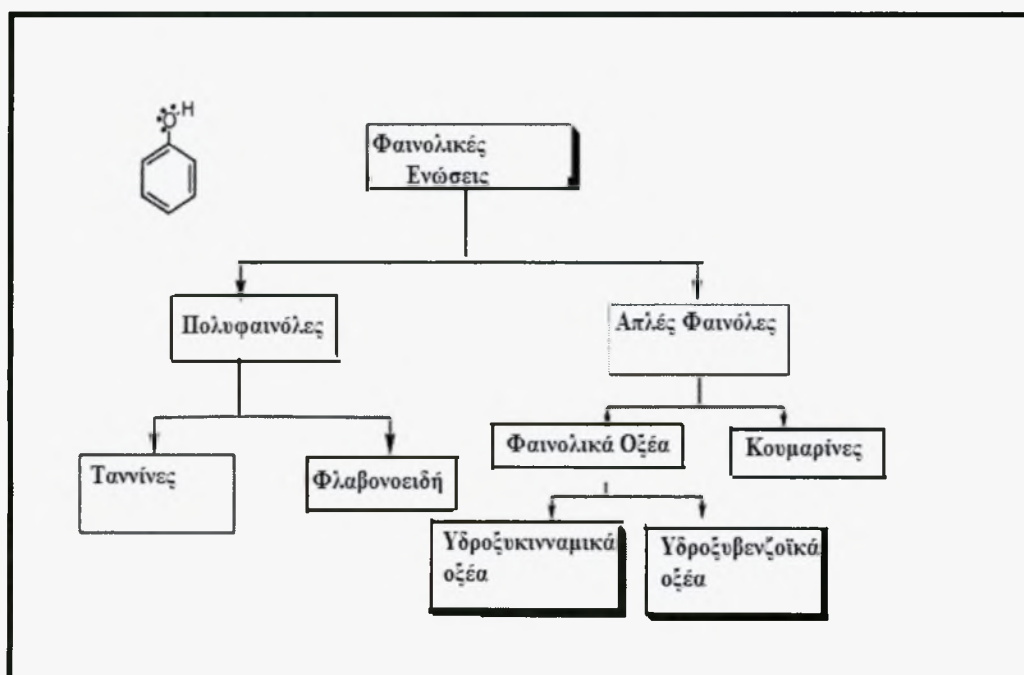
Οι σημαντικότερες φυτοχημικές ενώσεις που περιέχονται στα ψυχανθή είναι οι πολυφαινόλες, όπως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες, τα φλαβονοειδή και κυρίως οι ισοφλαβόνες (Vasilopoulou E. et al., 2005).

Συγκεκριμένα, τα όσπρια αποτελούν πλούσιες πηγές σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ταννίνες. Τα φασόλια περιέχουν ισοφλαβόνη, όπως και η σόγια στην οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντενζεΐνης και γενιστεΐνης (Manach C. et al. 2004). Οι ισοφλαβόνες παρουσιάζουν ευεργετική δράση απέναντι στην οστεοπόρωση, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Wendy L. Hall et al., 2005).

1.2. Πολυφαινόλες

Τα κυριότερα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών αποτελούν οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι φυτικές ουσίες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την άμυνα του φυτού και το προστατεύουν από έντομα, μύκητες, βακτήρια και ιούς (Vermerris & Nicholson, 2006). Περιέχουν μία φαινολική ομάδα - έναν αρωματικό δακτύλιο βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι υδροξυλικές ομάδες μπορεί να είναι ενωμένες με μόρια γλυκόζης ή άλλα σάκχαρα (γλυκοζίτες ή γλυκοσίδες), ενώ πολλές περιλαμβάνουν αμίνες, οργανικά οξέα, λιπίδια και άλλα συστατικά. Οι περισσότερες πολυφαινόλες εμφανίζονται με τις μορφές γλυκοζιτών ή εστέρων (Vermerris & Nicholson, 2006).

Οι φυτικές φαινόλες συντίθενται μέσω δύο βιοσυνθετικών μονοπατιών. Το πρώτο είναι το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το δεύτερο του μηλονικού οξέος. Η βιοσύνθεση πολλών φυτικών φαινολών, όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή γίνεται μέσω του πρώτου μονοπατιού, όπου παράγεται η φαινυλαλανίνη και αποτελεί την κοινή πρόδρομη ένωση για την σύνθεσή τους (Ilja et al., 2005). Οι φυτικές πολυφαινόλες υπάρχουν ως απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα ή ως πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Ένας τρόπος κατηγοριοποίησης των φαινολικών ενώσεων είναι ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που έχουν. Διακρίνονται σε απλές φαινόλες, όταν έχουν έναν φαινολικό δακτύλιο και σε πολυφαινόλες όταν έχουν δύο ή περισσότερους. Στις απλές φαινόλες ανήκουν τα φαινολικά οξέα και οι κουμαρίνες ενώ στις πολυφαινόλες τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες, τα λιγνάνια και τα στυλβένια (Εικόνα 3) (Robins, 2003, Manach et al., 2004).

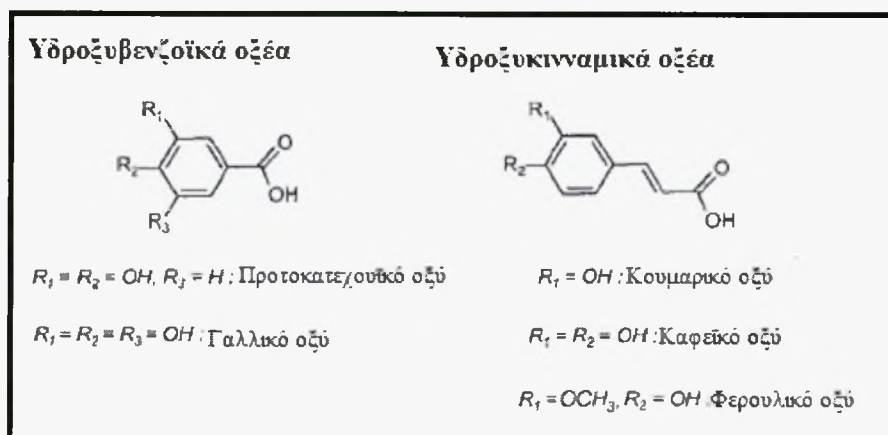


Εικόνα 3. Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων.

1.2.1. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από έναν αρωματικό, βενζοϊκό δακτύλιο και διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6-C1) και στα υδροξυκιναμικά οξέα (C6-C3), τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέως αντίστοιχα (Εικόνα 4). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα που περιλαμβάνουν το γαλλικό, το συριγγικό και το βανιλικό οξύ είναι συστατικά υδρολυόμενων ταννινών ενώ τα

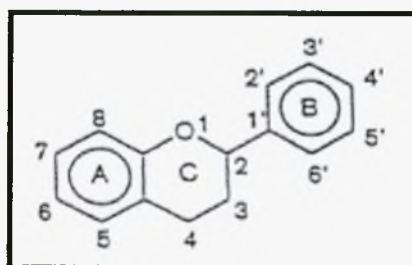
υδροξυκινναμικά οξέα τα οποία βρίσκονται συνήθως με τη μορφή των γλυκοσιδίων και περιλαμβάνουν το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι χαμηλού θρεπτικού ενδιαφέροντος, αφού η περιεκτικότητα των φυτών σε αυτά είναι μικρή με εξαίρεση τα κόκκινα φρούτα, τα κρεμμύδια, τα σκουρόχρωμα ραπανάκια και το τσάι. Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στα εξωτερικά μέρη των ώριμων φρούτων (Manach et al., 2004).



Εικόνα 4. Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων.

1.2.2. Φλαβονοειδή

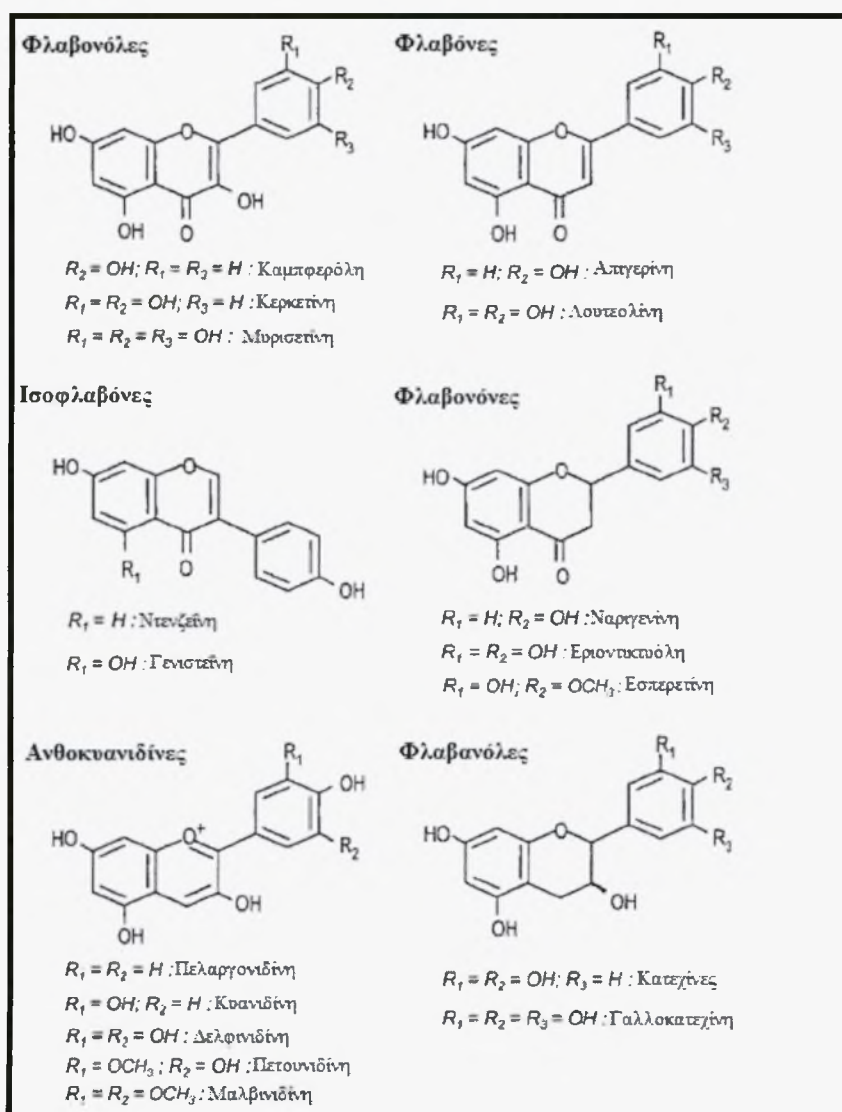
Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων είναι τα φλαβονοειδή. Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων και συνιστούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς περιέχει 15 άτομα άνθρακα σε μία διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους, που συνδέονται με μία γέφυρα με 3 άτομα άνθρακα (ανθρακικός πυρανικός δακτύλιος) (C6-C3-C6) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία παρουσιάζοντας αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν

αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Kenneth et al. 1999). Τα φλαβονοειδή ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του κεντρικού πυρανικού τους δακτυλίου χωρίζονται σε 6 κατηγορίες: στις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις ανθοκυανίνες και τις φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες (Εικόνα 6) (Manach et al. 2004).

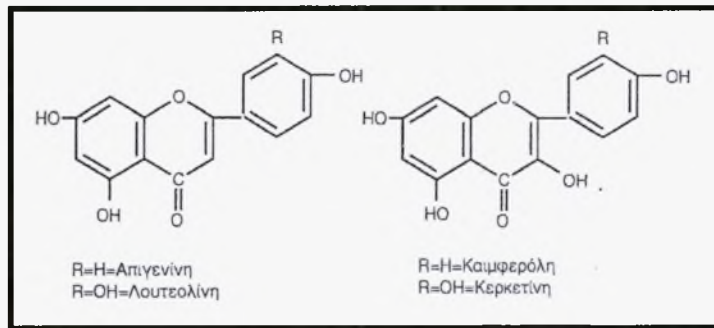


Εικόνα 6. Βασικές χημικές δομές της οικογένειας των φλαβονοειδών (Manach C. et al., 2004).

Οι φλαβονόλες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό φλαβονοειδών στα τρόφιμα και οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη και η καμπφερόλη (Εικόνα 7). Πηγή πλούσια σε φλαβονόλες είναι τα κρεμμύδια, το μπρόκολο, τα batόμουρα, το κόκκινο κρασί και το τσάι. Βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή και

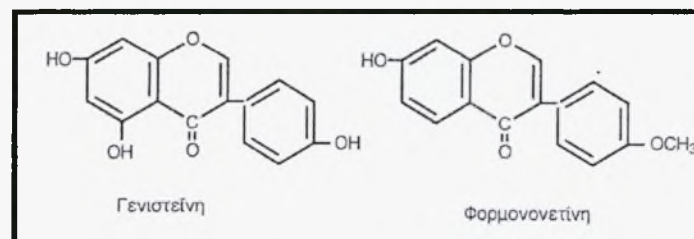
συσσωρεύονται στην επιδερμίδα και στα φύλλα του φυτού εφόσον η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach et al. 2004).

Οι *φλαβόνες* υπάρχουν σε μικρότερο ποσοστό στα φρούτα και στα λαχανικά σε σχέση με τις φλαβονόλες. Αποτελούνται από γλυκοσίδια λουτεολίνης και απιγενίνης (Εικόνα 7) και πιο σημαντικές πηγές τους είναι ο μαϊντανός και το σέλινο (Manach et al. 2004).



Εικόνα 7. Η χημική δομή των φλαβονολών (καιμπερόλη, κερκετίνη) και των φλαβόνων (απιγενίνη, λουτεολίνη).

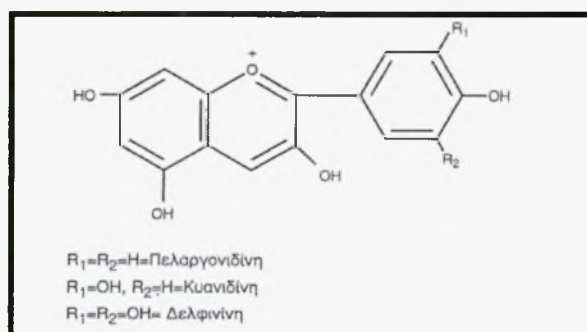
Οι *ισοφλαβόνες* παρουσιάζουν πολλές δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Παρόλα αυτά δεν είναι στεροειδή αλλά έχουν OH-ομάδες στις θέσεις C7 και C4' σε ανάλογη διαμόρφωση με αυτή που περιέχεται στο μόριο της οιστραδιόλης. Λόγω της δομής τους έχουν ιδιότητες ψευδοορμονών και δεσμεύονται από τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Γι' αυτό το λόγο αρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή. Η σόγια αποτελεί την κυριότερη πηγή. Τα κυριότερα μόρια ισοφλαβονών είναι η γενιστεΐνη (Εικόνα 8), η ντεντζεΐνη και γλυσιτεΐνη και διαφέρουν από τις φλαβόνες στο ότι ο ένας δακτύλιος βρίσκεται σε διαφορετική θέση στο χώρο (Manach et al. 2004).



Εικόνα 8. Χημική δομή γενιστεΐνης

Οι φλαβανόνες έχουν βρεθεί στην ντομάτα, σε αρωματικά φυτά και τα εσπεριδοειδή. Οι κυριότερες φλαβανόνες είναι η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη και είναι γλυκοσυλιωμένες με ένα δισακχαρίτη στη θέση C7 (Manach et al., 2004).

Οι ανθοκυανίνες εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και των φρούτων και προσδίδουν ροζ, κόκκινο, μπλε, και μωβ χρώμα. Έχουν μία OH-ομάδα στη θέση C-3 (Εικόνα 9). Μέσα στο φυτό είναι πολύ ανθεκτικές στο φως, το pH και σε καταστάσεις οξείδωσης. Οι κυριότερες πηγές ανθοκυανινών είναι το κόκκινο κρασί, κάποιες ποικιλίες δημητριακών, τα φασόλια, τα κρεμμύδια, το λάχανο, τα ραπανάκια και οι μελιτζάνες. Η κυανιδίνη αποτελεί την πιο κύρια εκπρόσωπό τους (Manach et al., 2004).



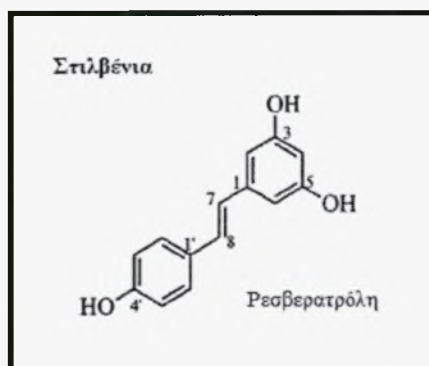
Εικόνα 9. Γενικός χημικός τύπος ανθοκυανινών.

Στις φλαβανόλες ανήκουν οι κατεχίνες και οι προανθοκυανιδίνες. Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλά είδη φρούτων, στο κόκκινο κρασί, το πράσινο τσάι και τη σοκολάτα. Οι προανθοκυανιδίνες είναι γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες και είναι διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή των κατεχινών. Σε αντίθεση με τις άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών οι φλαβανόλες δεν βρίσκονται γλυκοσυλιωμένες στα τρόφιμα (Manach et al., 2004).

1.2.3. Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο φαινυλικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου (Yang et al., 2001). Η ρεσβερατρόλη είναι το κυριότερο στιλβένιο (Εικόνα 10). Έχει τρία υδροξύλια σε αντιδιαμετρικές θέσεις των δύο βενζολικών δακτυλίων. Οι δακτύλιοι βρίσκονται σε *trans*-δομή της αιθυλενικής ομάδας που τους ενώνει. Η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Ovesna et al,

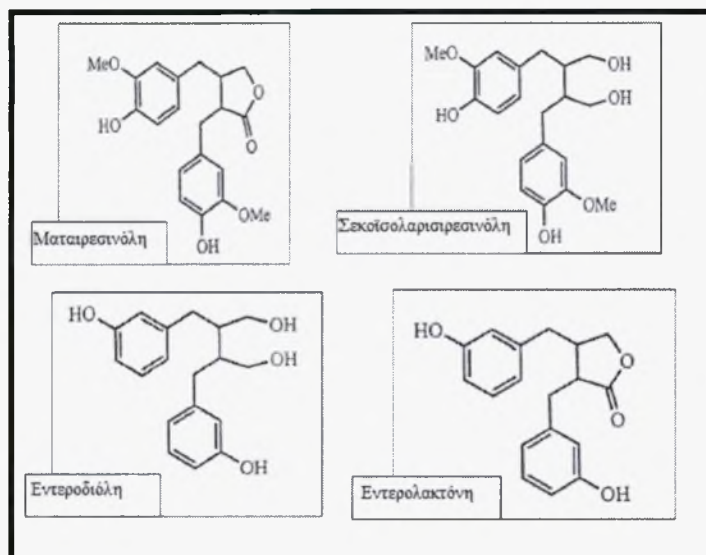
2006), καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Wu et al., 2001) και ισχυρή αντικαρκινική δράση (Soleas et al., 2002).



Εικόνα 10. Χημική δομή της ρεσβερατρόλης.

1.2.4. Λιγνάνια

Τα λιγνάνια ανήκουν στην ομάδα των φυτοιστρογόνων μαζί με τα φλαβονοειδή και τις κουμεστάνες. Εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα. Φυτικές λιγνάνες είναι η ματαιρεσινόλη και η σεκοΐσολαρισεσινόλη και μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και σε εντερολακτόνη (Εικόνα 11) μέσω της εντερικής μικροχλωρίδας. Εντοπίζονται στα ψυχανθή, τα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά (Manach et al., 2004).



Εικόνα 11. Χημική δομή λιγνανών και των ζωικών παραγώγων τους.

1.2.5. Απορρόφηση, μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών

Η απορρόφηση των πολυφαινολών γίνεται στο λεπτό έντερο και εξαρτάται από τη χημική δομή, το βαθμό γλυκοζυλίωσης, το μοριακό βάρος και τη διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων (Zern et al., 2005). Οι γλυκοζίτες συνήθως υδρολύονται στις αντίστοιχες αγλυκόνες τους πριν απορροφηθούν. Στο κόλον οι αγλυκόνες απορροφούνται από το επιθήλιο του εντέρου και μεθυλιώνονται ή συζεύγνυνται με γλυκουρονικό οξύ ή θειικό εστέρα στο ήπαρ. Το κυριότερο όργανο για το μεταβολισμό των πολυφαινολών είναι το ήπαρ (Scalbert & Williamson, 2000).

1.2.6. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις. Αποτελούν τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στην διατροφή και προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες και την καταστροφή του DNA. Παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιακή δράση και δρουν κατά της οστεοπόρωσης (Y.Yilmaz et al., 2004, R.J.Nijveldt et al., 2001). Αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και επιδρούν ευεργετικά στα λιπίδια του πλάσματος, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τον κίνδυνο της αθηροσκλήρωσης (Visioli Francesco et al., 2000). Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση λόγω των αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους (C.S.Yang et al., 2001). Επηρεάζουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και μειώνουν την ανάπτυξη των όγκων (I.T. Johnson, 2007).

Φαινολικές ουσίες όπως η γενιστεΐνη, η λουτεΐνη, αποτελούν αντικαρκινικούς παράγοντες καθώς αναστέλλουν τη δράση των τοποϊσομερασών (M.Webb & S.Ebeler, 2004). Οι ισοφλαβόνες και οι λιγνάνες προστατεύουν από τον καρκίνο του στήθους και του προστάτη ενώ η κερκετίνη είναι ισχυρά αντιοξειδωτικό, μειώνει τη χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας (LDL), την αγγειοδιαστολή του αίματος, αναστέλλει την δράση των ιών όπως ο έρπης. Η ναριγκίνη ανήκει στην ομάδα των φλαβονολών και ενισχύει το μεταβολισμό των οξέων και των λιπιδίων στο ήπαρ, αυξάνοντας την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του ήπατος, προστατεύει το στομάχι από το έλκος.

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και δρουν ενάντια στο οξειδωτικό στρες, στη φλεγμονή, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε χρόνιες πνευμονικές παθήσεις (Ilja CW Arts & Peter CH Hollman, 2005). Δρουν κατά της συσσωμάτωσης αναστέλλοντας την φωσφοδιεστεράση (Giulia Di

Carlo et al., 1999) και παρουσιάζουν αντιαλλεργική δράση. Η δράση τους αυτή οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν ένζυμα τα οποία αυξάνουν την παραγωγή της ισταμίνης (Giulia Di Carlo et al.,1999).

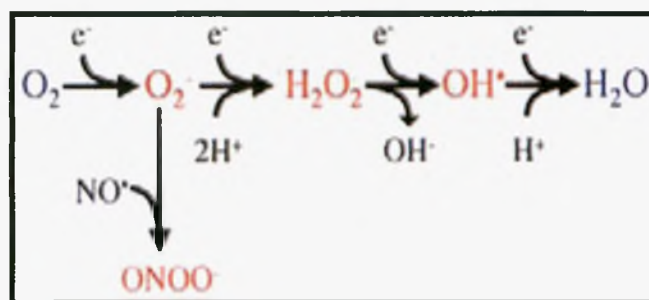
1.3. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Εικόνα 12) (Halliwell B., 2001). Ως εκ τούτου είναι εξαιρετικά δραστικές και ασταθείς (Bulkley G., 1990). Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με άλλες ελεύθερες ρίζες ή άλλα μόρια για να αποκτήσουν ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στιβάδα. Στην προσπάθειά τους να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα αντιδρούν με βασικά βιομόρια, όπως τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, τις πρωτεΐνες και το DNA (Mylonas & Kouretas 1999).



Εικόνα 12.Ελεύθερη ρίζα

Στις ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (Πίνακας 2), που προέρχονται από σταδιακή αναγωγή του οξυγόνου καθώς και οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) (Πίνακας 3) (Halliwell, 2001). Στην πρώτη περίπτωση με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου σχηματίζεται το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), με ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο σχηματίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ ένα τρίτο ηλεκτρόνιο οδηγεί στο σχηματισμό της υδροξυλικής ρίζας (OH^{\bullet}). Όταν το οξυγόνο προσλάβει και τέταρτο ηλεκτρόνιο ανάγεται πλήρως σε νερό (Εικόνα 13) (Halliwell & Gutteridge, 1995, 1998).



Εικόνα 13. Παραγωγή ROS από σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου.

Πίνακας 2. Δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS) και τα κύρια χαρακτηριστικά τους.

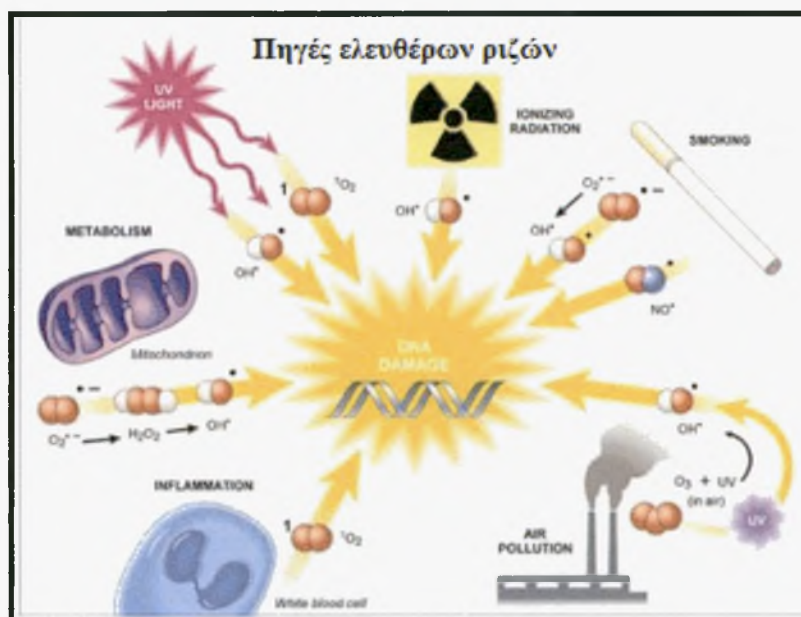
<i>Ρίζες</i>	<i>Κοινά χαρακτηριστικά τους</i>
$O_2^{\bullet -}$ Ανιόν του υπεροξειδίου	Παράγεται από ενζυμικά συστήματα μέσω αντιοξειδωτικών αντιδράσεων και μη ενζυμικά στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Η SOD καταλύει τη μετατροπή του σε H_2O_2 .
OH^{\bullet} Υδροξυλική ρίζα	Ισχυρά δραστική ρίζα που αντιδρά με όλα τα μόρια. Παράγεται από H_2O_2 παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης (Fe^{2+}).
RO_2^{\bullet} Υπεροξυλική ρίζα RO^{\bullet} Αλκοξυλική ρίζα	Οργανικές ρίζες που παράγονται σαν ενδιάμεσα μόρια κατά τη διάσπαση υπεροξειδίων και λιπιδίων, τα οποία προκύπτουν μετά από αντίδραση των λιπιδίων με ρίζες.
<i>Μη ρίζες</i>	<i>Κοινά χαρακτηριστικά τους</i>
H_2O_2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου	Παράγεται από $O_2^{\bullet -}$ καθώς και από άλλες οξειδάσες. Υψηλά επίπεδα H_2O_2 προσβάλλουν συστήματα παραγωγής ενέργειας των κυττάρων.
HOCl Υποχλωριώδες οξύ	Ισχυρό οξειδωτικό. Παράγεται από ουδετερόφιλα σε περιοχές φλεγμονής από τη δράση μυελοπεροξειδάσης.
O_3 Όζον	Βλαπτικό αέριο μόριο. Καταστρέφει αντιοξειδωτικά του πλάσματος όπως βιταμίνες D και E και το ουρικό οξύ.
1O_2 Μονήρες οξυγόνο	Το spin ενός από τα ηλεκτρόνια των δύο εξώτερων τροχιακών είναι ανεστραμμένο. Ενεργοποιεί την αλυσιδωτή αντίδραση ριζών με τελική παραγωγή υπεροξειδίων λιπιδίων και οργανικών οξέων.

Πίνακας 3. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS).

<i>Ρίζες</i>	<i>Μη ρίζες</i>
$NO^{\bullet}, NO_2^{\bullet}$	$HNO_2, NO^+ / NO^-, N_2O_4, N_2O_3, ONOO^{\bullet}, ONOOH, NO_2^+, ROONO$

1.3.1. Πηγές ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές (Εικόνα 14) (Kohen & Nyska 2002).



Εικόνα 14. Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.

1.3.1.α. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Μια από τις κυριότερες πηγές ενδογενούς παραγωγής ROS είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, κατά την οποία ένα ποσοστό του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS (Di Meo & Venditti 2001). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού και απελευθερώνονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από τα μιτοχόνδρια (Kohen & Nyska 2002)

Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν επίσης, τα λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ιωσινοφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα) κατά τη διαδικασία αντιμετώπισης εξωγενών μικροοργανισμών που εισβάλλουν στον οργανισμό (Kohen & Nyska 2002).

Άλλες πηγές ROS είναι ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης που εμπλέκεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την διάρκεια της άσκησης, η συνθάση του οξειδίου του αζώτου και η υπεροξειδική δισμουτάση, η οποία καταλύει τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Kohen & Nyska 2002).

Τα υπεροξειδιοσώματα συμβάλλουν επίσης στην παραγωγή ελευθέρων ριζών έχοντας εξειδικευμένα ένζυμα, τα οποία μεσολαβούν σε αντιδράσεις οξείδωσης.

(Alberts B. et al., 2000). Ακόμα στις ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών ανήκουν και μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες, αιμοσφαιρίνες και μυοσφαιρίνες μέσω της αυτοοξειδωσής τους (Cutler R., 1994).

Το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 αποτελεί μια πολύ σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών. Κατά την αντίδραση οξειδωσης ενός υποστρώματος (φάρμακο), ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το NADPH και ταυτόχρονα παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου ως παραπροϊόντα (Κουρέτας Δημήτριος, Βιοχημική Τοξικολογία 2003).

Πολλές ασθένειες τέλος όπως διάφοροι τύποι καρκίνου, καρδιοπάθειες και διαβήτης θεωρούνται πηγές ελευθέρων ριζών. Οι ROS είναι σημαντικές για το στάδιο της έναρξης μιας ασθένειας ή παράγονται κατά τη διάρκειά της (Kohen & Nyska 2002).

1.3.1.β. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Στις εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η ρύπανση του περιβάλλοντος, τα εντομοκτόνα, το άγχος, η έντονη άσκηση (αερόβια ή αναερόβια), η ιονίζουσα και υπεριώδης ακτινοβολία καθώς και συντηρητικά τροφών και φάρμακα (Suzuki et al. 1995, Asami. et al., 1996, Poulsen et al., 1993, Kohen & Nyska 2002).

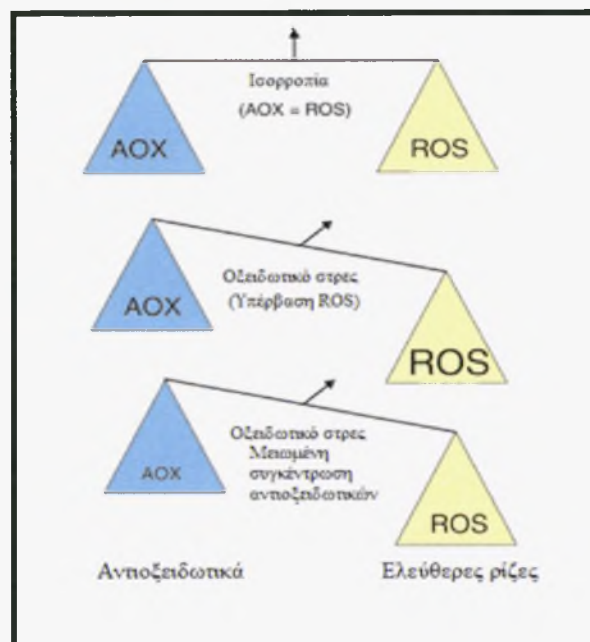
1.3.2. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα

Οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού γιατί παίρνουν μέρος ρυθμίζοντας μοριακούς μηχανισμούς που συνδέονται με το μεταβολισμό, το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Hensley et al., 2002). Σε μικρές ποσότητες επάγουν την συστολή των μυϊκών ινών. Συμμετέχουν και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το NO το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική αναπνοή και την πίεση του αίματος. Τέλος οι ελεύθερες ρίζες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση, ειδικά σε κατάσταση φλεγμονής (Finaud et al., 2006).

Εκτός όμως από αυτές τις θετικές επιδράσεις που έχουν στον ανθρώπινο οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες είναι υπεύθυνες για την υπεροξειδωση λιπιδίων (Mylonas & Kouretas 1999) που έχει σαν αποτέλεσμα την οξειδωτική βλάβη μεμβρανών, την οξειδωση των πρωτεϊνών και του DNA (Halliwell, 2001).

1.4. Οξειδωτικό στρες

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει μία ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Όταν η ισορροπία αυτή διαταραχθεί προκαλείται οξειδωτικό στρες το οποίο ορίζεται ως η έλλειψη ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (Εικόνα 15). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη (Halliwell B.,2001).

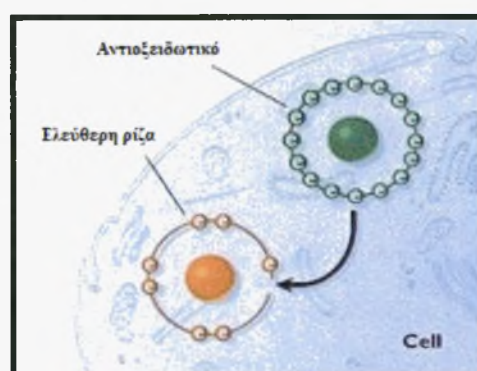


Εικόνα 15. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών οδηγεί στη δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου ROS, από μείωση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών που μπορεί να οφείλεται σε διάφορες μεταλλάξεις στα αντιοξειδωτικά ένζυμα ή σε μείωση της πρόσληψης αντιοξειδωτικών από τη διατροφή. Ακόμη μπορεί να προκληθεί τόσο από ενδογενείς (κυτταρικός θάνατος, φλεγμονή) όσο και από εξωγενείς παράγοντες (διατροφή, το κάπνισμα, ακτινοβολία). Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε ασθένειες όπως οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές νόσοι (Halliwell B., 2001).

1.5. Αντιοξειδωτικά

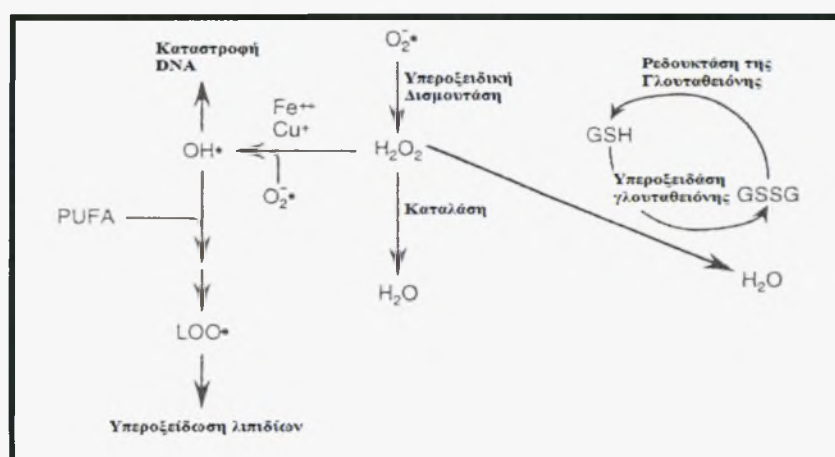
Επειδή οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με όλα τα κυτταρικά οργανίδια προκαλώντας την καταστροφή τους, τα κύτταρα διαθέτουν ένα εκτεταμένο αντιοξειδωτικό δίκτυο για την προστασία των κυτταρικών συστατικών από την οξειδωτική καταστροφή. Ως αντιοξειδωτική ουσία χαρακτηρίζεται κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Εικόνα 16). Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στα ενζυμικά και στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (Kohen & Nyska 2002).



Εικόνα 16. Εξουδετέρωση μιας ελεύθερης ρίζας από μία αντιοξειδωτική ουσία.

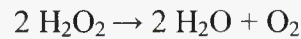
1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα πιο σημαντικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) (Mylonas C. & Kouretas D. 1999) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά (Mylonas C. & Kouretas D. 1999).

Η καταλάση (CAT) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση:



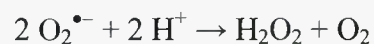
Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα αλλά εντοπίζεται επίσης στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Στα θηλαστικά βρίσκεται σε τέσσερις υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες φέρει μια ομάδα αίμης στο κέντρο (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα εξαρτώμενο από το σελήνιο ένζυμο, που βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και είναι άφθονο στην καρδιά, στους πνεύμονες και στον εγκέφαλο. Τουλάχιστον 4 ισομορφές της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης έχουν ανακαλυφθεί στα θηλαστικά, μερικές εκ των οποίων εντοπίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Tham et al, 1994). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μετατρέπει τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων και το H_2O_2 σε H_2O και σταθερές αλκοόλες, μέσω οξειδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) (Mylonas C. & Kouretas D. 1999). Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$.

Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης βρίσκεται στο ήπαρ και αποτελείται από δύο υπομονάδες με ένα μόριο FAD σε κάθε ενεργό κέντρο. Ουσιαστικά το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό των κυττάρων σύμφωνα με την αντίδραση:



Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένας από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στα ανιόντα σουπεροξειδίου (Mylonas & Kouretas, 1999). Εμφανίζεται σε τρεις μορφές: την κυτταροπλασματική μορφή (Cu-ZnSOD) τη μιτοχονδριακή (MnSOD), και μία νέα μορφή που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και εντοπίζεται εξωκυτταρικά (Mylonas & Kouretas, 1999). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει τη μετατροπή του $\text{O}_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:



1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Εκτός από τους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας, υπάρχουν και μη ενζυμικοί μηχανισμοί, οι οποίοι χωρίζονται σε ενδογενείς (ουρικό οξύ, γλουταθειόνη, μελατονίνη, συνένζυμο Q10) και σε διαιτητικούς ή εξωγενείς όπως βιταμίνη C, σελήνιο, βιταμίνη E, καροτενοειδή και πολυφαινόλες.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των θειολών. Βρίσκεται στους ιστούς και υπάρχει σε δύο μορφές, την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG). Συντίθεται στο κυτταροπλάσμα και δρα ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στην εξουδετέρωση των ROS μέσω της αντίδρασης $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$.

Πολυφαινόλες

Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των πολυφαινολών προκύπτουν από την ικανότητα που έχουν να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών τους υδρογόνων. Οι υδροξυλικές ομάδες των φαινολικών δακτυλίων τους δρουν ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες ($\text{RO}^\bullet + \text{PPH} \rightarrow \text{ROH} + \text{PP}^\bullet$). Με αυτό τον τρόπο παράγονται φαινολικές ρίζες οι οποίες είναι σταθερές (Ferguson et al., 2001). Και με την ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα όπως σίδηρο και χαλκό εμποδίζουν την δημιουργία ελευθέρων ριζών μέσω της αντίδρασης Fenton (Frei & Higdon, 2003).

Συνένζυμο Q10 (ουβικινόνη)

Το συνένζυμο Q10 παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Olson RE & Rundey H, 1993) και αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό δρώντας κατά την υπεροξειδωση λιπιδίων και βοηθώντας την ενεργοποίηση της βιταμίνης E (Frei B et al., 1990).

Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά. Έχει ανιχνευτεί στην πλειοψηφία των φυτικών κυττάρων και οργανιδίων. Μπορεί να δεσμεύσει το ανιόν σουπεροξειδίου, την ρίζα υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο και να μειώσει το

H₂O₂ σε νερό μέσω της αντίδρασης της ασκορβικής υπεροξειδάσης (Nocton & Foyer, 1998).

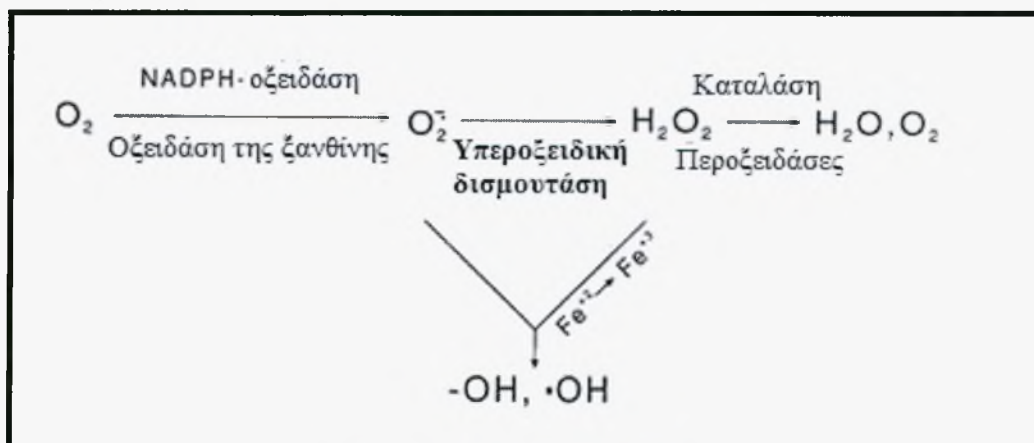
Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E ανήκει στην οικογένεια των τοκοφερολών. Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αποτελεί το κυριότερο λιπόφιλο αντιοξειδωτικό των κυτταρικών μεμβρανών και προστατεύει από την λιπιδική υπεροξειδωση (Blokina Olga et al., 2003).

1.6 Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

1.6.1. Γενικές πληροφορίες

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο στοιχείο για τους αερόβιους οργανισμούς καθώς είναι ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων κατά την αναπνοή. Γίνεται όμως τοξικό όταν προσλαμβάνεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές που υπάρχουν στον αέρα (Ruomei Gao et al., 1998). Το επιζήμιο αποτέλεσμα του οξυγόνου οφείλεται στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών που προέρχονται από αυτό (Ruomei Gao et al., 1998). Αυτή η ιδέα δεν ήταν εντελώς αποδεκτή μέχρι που το 1968 ανακαλύφθηκε η SOD, ένα ένζυμο που εμποδίζει τις ρίζες υπεροξειδίου, (οι οποίες παράγονται από την οξειδάση της ξανθίνης) (Εικόνα 18) και αναστέλλει την αεροβική μείωση του κυτοχρώματος c (Mccord & Fridovich, 1969). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε όλα τα αεροβικά οργανίδια και σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα που είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες (Blokina, 2002).

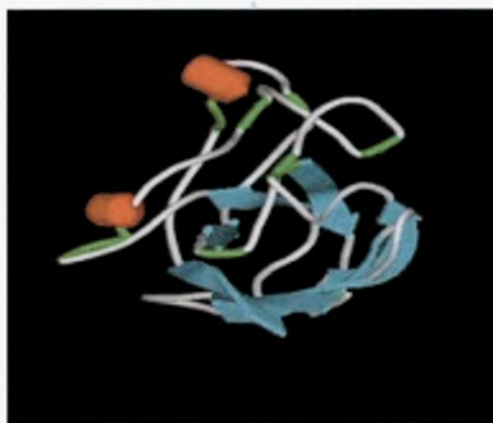


Εικόνα 18. Η δράση της SOD.

Το ένζυμο αυτό αποτελεί καταλύτη της γρηγορότερης ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, εξουδετερώνοντας το $O_2^{\cdot -}$ προς H_2O_2 (Klug D, et al, 1972). Συνεπώς, η απώλεια της δραστηριότητας του συγκεκριμένου ενζύμου μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων του $O_2^{\cdot -}$ και να οδηγήσει στη καταστροφή βιομορίων. (Oury TD, et al, 1994).

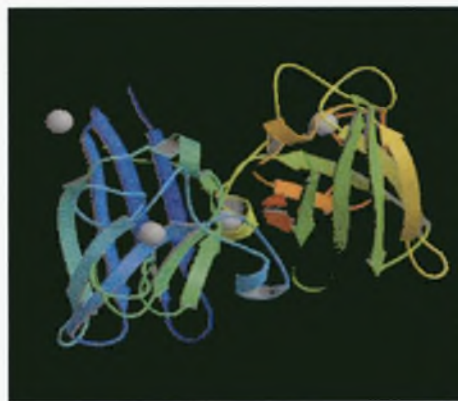
1.6.2. Πρωτεϊνική δομή

Στον άνθρωπο έχουν ανακαλυφθεί τρεις τύποι του ενζύμου, ο καθένας με διαφορετική κατανομή και στοιχεία μετάλλων (Fridovich I., 1995). Ο πρώτος τύπος είναι το Cu/Zn-SOD (Εικόνα 19), είναι ένα ομοδιμερές 32 kDa, και αποτελεί περίπου το 70% των δισμουτασών του υπεροξειδίου. Μπορεί να βρεθεί σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων στα περισσότερα όργανα. Η κυτταρική του εντόπιση είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια (Crapo JD, et al, 1992).



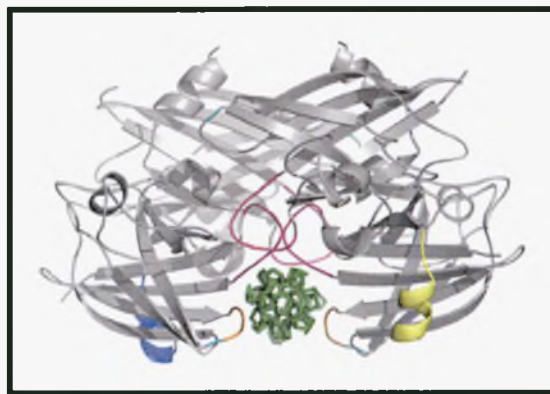
Εικόνα 19. Δομή της κυτταροπλασματικής μορφής της SOD (Cu/Zn-SOD).

Η δεύτερη ισομορφή των SOD είναι το Mn-SOD (Εικόνα 20), ένα ομοτετραμερές 96 kDa που περιέχει ένα άτομο μαγγανίου ανά υπομονάδα (Whittaker JW, 2000). Αυτή η μορφή αποτελεί το 15% περίπου των SOD και ανευρίσκεται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια επιθηλιακών κυττάρων και φαγοκυττάρων (Whittaker JW., 2000, Marklund SL., 1984). Το συγκεκριμένο ένζυμο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των $O_2^{\cdot -}$ που παράγονται στα μιτοχόνδρια (Li Y., et al, 1995). Η μορφή αυτή της SOD είναι πολύ σημαντική γιατί αποτρέπει την απόπτωση των κυττάρων που δημιουργείται από την επίδραση των ακτίνων X.



Εικόνα 20. Δομή της μιτοχονδριακής μορφής της SOD(Mn-SOD).

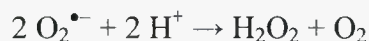
Η τρίτη μορφή είναι η εξωκυττάρια-SOD, η οποία αποτελεί την κύρια ισομορφή στο πλάσμα και στο διάμεσο ιστό και είναι το μόνο ένζυμο που εξουδετερώνει τις ρίζες $O_2^{\cdot -}$ στον εξωκυττάριο χώρο (Marklund SL., 1984, Oury TD, et al,1995). Πρόκειται για μια τετραμερή γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 135 kDa, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (Εικόνα 21). Αποτελεί το 0,5-17% των SOD και ο ρόλος του είναι πολύ σημαντικός λόγω της εξωκυττάριας κατανομής του στους ιστούς. Παρέχει αποτελεσματική προστασία από το οξειδωτικό στρες στο συνδετικό ιστό και στις ίνες κολλαγόνου, ενώ αποτελεί ρυθμιστή του αγγειακού τόνου μέσω πρόληψης της μετατροπής του μονοξειδίου του αζώτου σε υπεροξυνιτρικό (Oury TD,et al.,1994, Oury TD,et al.,1996).



Εικόνα 21. Δομή της εξωκυττάριας μορφής της SOD.

1.6.3. Μηχανισμός δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Η υπεροξειδική δισμουτάση καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:



Το υπόστρωμα που χρησιμοποιεί είναι τα ανιόντα του σουπεροξειδίου. Εκτός από αυτό το υπόστρωμα όμως, ο πρώτος τύπος της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Cu/Zn-SOD) μπορεί να χρησιμοποιήσει και το H_2O_2 ως υπόστρωμα αντιδρώντας με την ανηγμένη μορφή του χαλκού (Cu^+). Ένα άλλο πιθανό υπόστρωμα αποτελεί και το υπεροξυνιτρικό το οποίο οδηγεί σε σχηματισμό νιτρικών ομάδων που ακολούθως μεταφέρονται σε τυροσίνες διαφόρων πρωτεϊνών (Ischiropoulos H, et al., 1992). Το κύριο υπόστρωμα όμως αποτελούν τα ανιόντα σουπεροξειδίου.

1.6.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Η υπεροξειδική δισμουτάση έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας χρήσιμος ανιχνευτής για την μελέτη της συμμετοχής των ριζών σε αντιδράσεις που εμπλέκεται το οξυγόνο όπως οι αυτοοξειδώσεις. Το υπεροξειδικό ανιόν έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην αυτοοξείδωση της αδρεναλίνης, της πυρογαλλόλης, της 6-υδροξυ-ντοπαμίνης (Marklund S. & Marklund G., 1974) και της αιματοξυλίνης (Flobe L. & Otting F., 1984). Η δραστηριότητα της SOD μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση της αναστολής της αυτοοξείδωσης της αιματοξυλίνης μέσω φασματοφωτομετρίας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου να αναστέλλει την αυτοοξείδωση της αιματοξυλίνης (Martin J.P.Jr, et al., 1987).

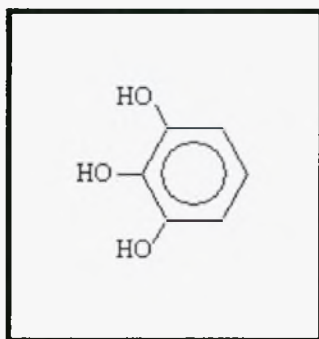
Μία άλλη μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας της SOD βασίζεται στη δυνατότητα του $O_2^{\bullet -}$ να μειώνει το κυτόχρωμα C. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της SOD μετράται από την ικανότητα της να αναστέλλει τη μείωση του κυτοχρώματος C. Στη μέθοδο αυτή ως πηγή $O_2^{\bullet -}$ χρησιμοποιείται η οξειδάση της ξανθίνης (Beauchamp C. & Fridovich I., 1971).

Ένας άλλος τρόπος για τον προσδιορισμό της SOD βασίζεται στην ικανότητα της να αναστέλλει την αυτοοξείδωση της επινεφρίνης σε αλκαλικό περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή όμως παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, λόγω της ύπαρξης και άλλων μορίων (ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης) που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αυτοοξείδωση της επινεφρίνης (Misra & Fridovich, 1972).

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία για την μέτρηση της SOD χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου φασματομετρικού προσδιορισμού της πυρογαλλόλης (Ruomei Gao et al., 1998). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου να αναστέλλει την αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης (Marklund S. & Marklund G., 1974).

1.6.5. Γενικές πληροφορίες – Δράση της πυρογαλλόλης

Η πυρογαλλόλη ή το πυρογαλλικό οξύ, $C_6H_3(OH)_3$, είναι μια τριυδροξυφαινόλη (Εικόνα 22) που παράγεται από το γαλλικό οξύ όταν επιδρά σε αυτό θερμότητα. Το διάλυμα του πυρογαλλικού οξέος δίνει ένα πράσινο χρώμα παρουσία διαλύματος θειικού σιδήρου, κόκκινο χρώμα παρουσία χλωριούχου σιδήρου, και όταν έρχεται σε επαφή με τον αέρα και τα αλκάλια μετατρέπεται γρήγορα σε μαύρο χρώμα (Marklund Stefan & Marklund Gudrun, 1974).



Εικόνα 22. Δομή της πυρογαλλόλης

Η αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης μπορεί να ανασταλεί από την SOD (Ruomei Gao et al., 1998). Το ποσοστό επί τοις εκατό της αναστολής εξαρτάται από την ποσότητα της SOD, το pH του συστήματος και από τη συγκέντρωση της πυρογαλλόλης. Έχει βρεθεί ότι σε pH 7,87, η αντίδραση αναστέλεται περίπου 99% από την SOD, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του υπεροξειδικού ανιόντος, το ενδιάμεσο προϊόν της αυτοοξειδωσης στην αντίδραση (Ruomei Gao et al., 1998).

Ο ρυθμός της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης καταλύεται από μερικά μεταλλικά ιόντα, όπως Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} . Μετά από πρόσθεση EDTA αυτή η επίδραση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, αλλά η παρεμβολή του Fe^{2+} ακόμα υπάρχει. Με την παρουσία του EDTA, ο ρυθμός είναι ανεξάρτητος από την συγκέντρωση των χηλικών και μεταλλικών ιόντων και δεν επηρεάζει σημαντικά την αυτοοξειδωση μέχρι να ξεπεραστεί η χηλική ιδιότητα (Ruomei Gao et al., 1998).

Η αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης έχει ερευνηθεί με την παρουσία EDTA σε pH από 7,9- 10,6. Σε pH 7,9 η αντίδραση αναστέλλεται κατά 99% από την SOD, γεγονός που υποδεικνύει μια εξάρτηση στην συμμετοχή του υπεροξειδικού ανιόντος στην αντίδραση. Σε υψηλό pH κυριαρχούν ανεξάρτητοι από το υπεροξειδικό ανιόν μηχανισμοί, όπως και η SOD μετουσιώνεται (Marklund Stefan & Marklund Gudrun, 1974).

Τέλος η καταλάση δεν έχει επίδραση στην αυτοοξειδωση, αλλά μειώνει την κατανάλωση του οξυγόνου στο μισό, δείχνοντας ότι το H_2O_2 είναι το σταθερό προϊόν του οξυγόνου και ότι το H_2O_2 δεν εμπλέκεται στον αυτοοξειδωτικό μηχανισμό (Marklund Stefan & Marklund Gudrun, 1974).

1.6.6. Δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Η δραστικότητα της SOD αυξομειώνεται ανάλογα με την ηλικία του ατόμου, τον ιστό και το είδος της άσκησης. Πειράματα που έγιναν σε επίμυες έδειξαν ότι μεγαλύτερη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσιάζεται στο ήπαρ και στη συνέχεια στα επινεφρίδια, στους νεφρούς και στη καρδιά. Το μικρότερο ποσοστό δραστικότητας εμφανίζεται στον εγκέφαλο και το πάγκρεας (Anuradha Nandi & I.B Chatterjee, 1988). Τα ίδια πειράματα έδειξαν ότι η δραστικότητα αυτή επηρεάζεται από την ηλικία των επιμυών και αυξάνεται στους νεφρούς και στο ήπαρ καθώς αυξάνεται η ηλικία τους, στα πρώτα στάδια της ζωής τους, ενώ μειώνεται στα ερυθροκύτταρα (Anuradha Nandi & I.B Chatterjee, 1988).

Η καρδιά των ηλικιωμένων ατόμων αυξάνει κατακόρυφα τη δραστικότητα της SOD, ίσως λόγω του ότι εκτίθεται συνεχώς σε μεγαλύτερα ποσά $O_2^{\bullet-}$ σε σχέση με τα νεαρά άτομα (Navarro Arevalo et al., 1999). Τα επίπεδα της SOD είναι υψηλότερα στην καρδιά παρά στους σκελετικούς μύες (Navarro Arevalo et al., 1999).

Η δράση της SOD, όπως και άλλων ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας (CAT, GPx) είναι πιο έντονη κατά την άσκηση. Αυτό συμβαίνει διότι η άσκηση προκαλεί υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (H_2O_2) συμβάλλοντας στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Nikolaidis et al, 2006, Veskokakis et al, 2008). Σε συνθήκες έντονης άσκησης στα νεαρά άτομα αυξάνεται η δραστικότητα της SOD στους σκελετικούς μύες ενώ σε συνθήκες ηρεμίας παρουσιάζονται υψηλότερα επίπεδα SOD στα μεγαλύτερα άτομα. Όταν η άσκηση φθάνει σε εξαντλητικά επίπεδα, μόνο τα νεαρά άτομα έχουν τη δυνατότητα

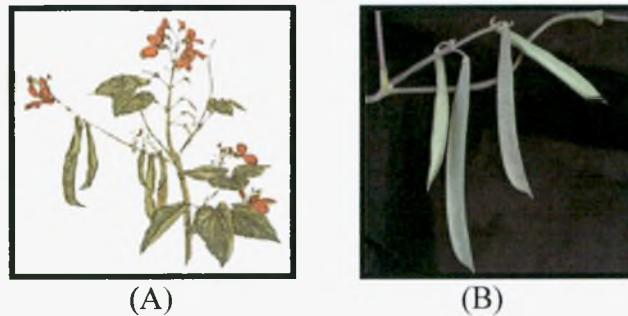
απόκρισης στο οξειδωτικό στρες (Navarro Arevalo et al., 1999). Η οξεία άσκηση συνδέεται με πολλαπλάσια επίπεδα SOD κυρίως στους μαραθωνοδρόμους (Nuray Oztasan et al., 2004).

Θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψιν ότι τα αποτελέσματα για την απόκριση και την δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης στον οργανισμό μπορούν να διαφοροποιηθούν γιατί εξαρτώνται από το είδος της άσκησης, την ηλικία, τον ιστό, και το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται.

1.7. Ελληνικά ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*

1) *Phaseolus vulgaris*

Το γένος *Phaseolus* ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών *Fabaceae* και αποτελείται από περίπου 50 είδη φυτών. Πιο χαρακτηριστικό από όλα είναι το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) (Εικόνα 23) το οποίο είναι ένα φυλλώδες ετήσιο φυτό και καλλιεργείται παγκοσμίως σε τροπικά, ημιτροπικά και ήπια κλίματα. Πολλά είδη *Phaseolus* καταναλώνονται και ως τρόφιμα.



Εικόνα 23. *Phaseolus vulgaris* (A) Πόα και (B) Σπέρματα

2) *Vicia tenuifolia*

Το φυτό *Vicia tenuifolia* (Εικόνα 24) είναι ένα πολυετές φυτό το οποίο συναντάται σε ορεινές περιοχές. Τα φύλλα του αποτελούνται από λεπτά γραμμικά φυλλάκια και τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα.



Εικόνα 24. Πόα *Vicia tenuifolia*

3) *Lotus edulis*

Το γένος *Lotus* (Εικόνα 25) ανήκει στην οικογένεια φυτών *Leguminosae* και προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου. Ο καρπός του φυτού *Lotus edulis*.



(A)



(B)

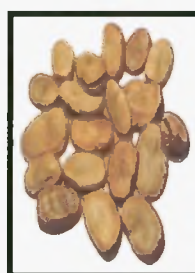
Εικόνα 25. *Lotus edulis*: (A) Πόα και (B) Καρπός

4) *Vicia faba*

Το φυτό *Vicia faba* (Εικόνα 26) είναι ένα είδος ψυχανθούς της οικογένειας *Fabaceae* που προέρχεται από τη Βόρεια Αφρική και την Νοτιοδυτική Ασία. Είναι ετήσιο φυτό και τα φύλλα του είναι πτεροειδή με 2-7 φυλλάκια και έχουν γκριζοπράσινο χρώμα. Οι καρποί είναι γνωστοί ως κουκιά, καταναλώνονται ως τρόφιμα και είναι σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής.



(A)

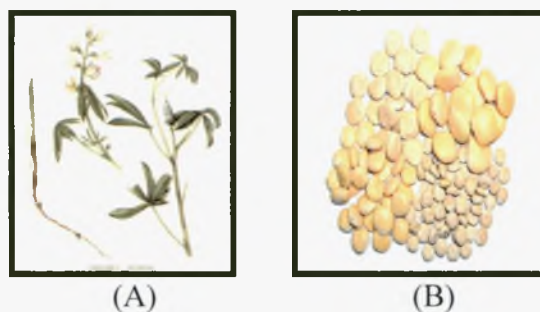


(B)

Εικόνα 26. *Vicia faba*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα

5) *Lupinus albus*

Το φυτό *Lupinus albus* (Εικόνα 27) είναι μέλος του γένους *Lupinus* της οικογένειας *Fabaceae*. Πρόκειται για ένα παραδοσιακό όσπριο που καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου και είναι γνωστό ως λυκίσκος. Ανήκει στα ετήσια φυτά και καταναλώνεται ως τρόφιμο.



Εικόνα 27. *Lupinus albus*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα

6) *Lotus longisiliquosus*

Το *Lotus longisiliquosus* (Εικόνα 28) ανήκει στο γένος *Lotus* και προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου.



Εικόνα 28. Πόα και σπέρματα του *Lotus longisiliquosus*.

7) *Lens culinaris*

Το γένος *Lens* ανήκει στην οικογένεια Fabaceae. Το φυτό *Lens culinaris* (Εικόνα 29) δίνει ως καρπούς τις φακές και προέρχεται από την Ασία. Ανήκει στα ετήσια φυτά, καλλιεργείται σε θερμό κλίμα και τροπικές ζώνες. Οι φακές είναι άφθονες σε πρωτεΐνες και αμινοξέα.



Εικόνα 29. *Lens culinaris*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα

8) *Lathyrus sativus*

Το *Lathyrus sativus* (Εικόνα 30) αναπτύσσεται στην περιοχή της Μεσογείου και ο καρπός του είναι η γνωστή φάβα.



(A)



(B)

Εικόνα 30. *Lathyrus sativus*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα

9) *Lathyrus laxiflorus* και *Lathyrus clymenum*

Το γένος *Lathyrus* περιλαμβάνει κυρίως τα ανθοφόρα φυτά της οικογένειας ψυχανθών *Fabaceae*. Υπάρχουν 160 είδη τα οποία εντοπίζονται στην Ευρώπη, στη Βόρεια Αμερική, στην Ασία, στην Ανατολική Αφρική και στην Νότια Αμερική. Χωρίζονται σε ετήσια και ολοετή που μπορεί να είναι αναρριχώμενα ή θαμνώδη. Σχηματίζουν σπόρους οι οποίοι αναπτύσσονται στους λοβούς. Το *Lathyrus laxiflorus* (Εικόνα 31) είναι μη εδώδιμο ψυχανθές ενώ το *Lathyrus clymenum* (Εικόνα 32) είναι εδώδιμο.



Εικόνα 31. Πόα *Lathyrus laxiflorus*



Εικόνα 32. Πόα *Lathyrus clymenum*

10) *Tetragonolobus purpureus*

Το *Tetragonolobus purpureus* (Εικόνα 33) είναι μονοετές φυτό και τα άνθη του είναι πορφυρού χρώματος.



(A)



(B)

Εικόνα 33. *Tetragonolobus purpureus*: (A) Πόα και (B) Σπέρματα

1.8. Σκοπός

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης βιολογικών ιδιοτήτων διαφόρων εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών. Έχει βρεθεί ότι τα εκχυλίσματα αυτά των ψυχανθών, της οικογένειας *Leguminosae*, έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδόθηκαν στα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά τους, τις πολυφαινόλες. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων ψυχανθών στην ενζυμική δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Το ένζυμο αυτό αποτελεί έναν από τους κυριότερους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στα ανιόντα σουπεροξειδίου.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Tris (Merck, Γερμανία)

HCl (37%, Riedel, Γερμανία)

DTPA (Sigma-Aldrich, Γερμανία)

Πυρογαλλόλη (Sigma-Aldrich, Γερμανία)

2.1.2. Προετοιμασία αιμόλυματος

Ως πηγή SOD 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. Στη συνέχεια, προστέθηκε απιονισμένο νερό (1:1 v/v), το σωληνάριο ανακινήθηκε βίαια και φυγοκεντρήθηκε στα 4020 g, για 15 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αντιπροσώπευε το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων έμειναν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μl). Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αιμόλυμα αραιωμένο κατά 10 φορές.

2.1.3. Εκχυλίσματα ελληνικών ψυχανθών

Στην παρούσα εργασία, συνολικά μελετήθηκαν 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από διαφορετικά τμήματα ποικιλιών ψυχανθών (Πίνακας 4). Τα υπέργεια τμήματα των φυτών (πόα), τα σπέρματα, οι καρποί και τα περικάρπια αφού ξηράνθηκαν πολτοποιήθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση σε μεθανόλη (2/1 w/v) και νερό (2/1 w/v) σε θερμοκρασία δωματίου για 48h. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη και επαναδιάλυση τους σε νερό.

Πίνακας 4. Υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae*

Τμήματα του φυτού από το οποίο προήλθαν τα υδατικά εκχυλίσματα	Τμήματα του φυτού από το οποίο προήλθαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα
Πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i>	Πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i>
Πόα <i>Lupinus albus</i>	Πόα <i>Lupinus albus</i>
Καρποί <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καρποί <i>Tetragonolobus purpureus</i>
Πόα <i>Vicia faba</i>	Πόα <i>Vicia faba</i>
Πόα <i>Phaseolus vulgaris</i>	Πόα <i>Phaseolus vulgaris</i>
Πόα <i>Lotus edulis</i>	Πόα <i>Lotus edulis</i>
Πόα <i>Lens culinaris</i>	Πόα <i>Lens culinaris</i>
Καρποί <i>Lotus edulis</i>	Καρποί <i>Lotus edulis</i>
Περικάρπιο <i>Lotus edulis</i>	Περικάρπιο <i>Lotus edulis</i>
Σπέρματα <i>Lens culinaris</i>	Σπέρματα <i>Lens culinaris</i>
Σπέρματα <i>Phaseolus vulgaris</i>	Σπέρματα <i>Phaseolus vulgaris</i>
Πόα <i>Lotus longisiliquosus</i>	Πόα <i>Lotus longisiliquosus</i>
Πόα <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Πόα <i>Tetragonolobus purpureus</i>
Σπέρματα <i>Lupinus albus</i>	Σπέρματα <i>Lupinus albus</i>
Πόα <i>Vicia tenuifolia</i>	Πόα <i>Vicia tenuifolia</i>
Καρποί <i>Vicia tenuifolia</i>	Καρποί <i>Vicia tenuifolia</i>
Σπέρματα <i>Lathyrus clymenum</i>	-
-	Πόα <i>Lathyrus sativus</i>

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι ένας από τους κυριότερους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η πυρογαλλόλη όταν έρχεται σε επαφή με το O_2 της ατμόσφαιρας αυτοοξειδώνεται παρουσία ριζών $O_2^{\bullet-}$. Παρουσία της SOD (πηγή της SOD είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα) αναστέλλεται η αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης λόγω μετατροπής των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 . Η εκτίμηση της ανασταλτικής ή επαγωγικής δράσης ενός εκχύλισματος βασίστηκε στην μεταβολή του ρυθμού αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης. Ένας παράγοντας (εκχύλισμα) που αναστέλλει τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης αυξάνει την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης ενώ ένας παράγοντας που επάγει την δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης αναστέλλει την αυτοοξείδωσή της πυρογαλλόλης. Όσοι από αυτούς τους παράγοντες εμφάνισαν αναστολή στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης επανεξετάστηκαν απουσία ενζύμου για να μελετηθεί εάν αυτή η αναστολή οφείλεται στον ίδιο τον παράγοντα και τα συστατικά του ή στην αλληλεπίδραση του με την υπεροξειδική δισμουτάση.

2.2.2. Συστατικά της αντίδρασης

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν διάλυμα Tris-HCl DTPA buffer (pH 8.2) για τη ρύθμιση του pH, διάλυμα πυρογαλλόλης (8mM), αραιωμένο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και αραιωμένο εκχύλισμα.

Διαλύματα

Tris-HCl DTPA buffer (pH 8.2)

MB Tris: 121.14

MB DTPA: 393,35

Για να φτιαχτεί 500 mL του buffer Tris-HCl 0,05 mM που περιέχει 1 mM DTPA ζυγίστηκε 3.03 g Tris και 196.6 mg DTPA και διαλύθηκαν σε 400 mL H_2O . Συμπληρώθηκε ο όγκος στα 500 mL και ρυθμίστηκε το pH σε 8,2 με την προσθήκη HCl 1 N.

Διάλυμα πυρογαλλόλης (8 mM)

Για τελική συγκέντρωση πυρογαλλόλης στην αντίδραση (κυψελίδα 1000 μL) 0,8 mM φτιάχτηκε διάλυμα 8 mM. Για 20 mL διαλύματος πυρογαλλόλης 8 mM ζυγίστηκε 20,18 mg πυρογαλλόλης και διαλύθηκε σε 20 mL H_2O . Το διάλυμα αυτό πρέπει να ετοιμάζεται κάθε φορά, την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Το διάλυμα ετοιμαζόταν λίγο πριν την προσθήκη του στην αντίδραση.

Αραίωση αιμόλυματος

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αιμόλυμα αραιωμένο κατά 10 φορές. Για 1000 μl αραιωμένου αιμόλυματος προστέθηκε 100 μl αιμόλυματος σε 900 μl H_2O . Η ποσότητα SOD στο αιμόλυμα είναι η εξής: 1 unit ενζύμου SOD αντιστοιχεί σε 36 μl αιμόλυματος. Στα 30 μl αιμόλυματος που μπαίνουν στην αντίδραση αντιστοιχούν σε 0,83 units. Το MB της συνολικής SOD είναι 32500. Τα 0,83 units αντιστοιχούν σε 0,027 mg SOD.

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

Για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης ενός φυτικού εκχυλίσματος προσδιορίζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό, δηλαδή δρα με την μέγιστη ταχύτητα (V_{max}). Υπόστρωμα της SOD είναι οι ρίζες $\text{O}_2^{\bullet-}$. Η πυρογαλλόλη είναι το μέσο για να γίνει αντιληπτή η δράση της SOD στο υπόστρωμα.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υποστρώματος που η υπεροξειδική δισμουτάση δρα με τη μέγιστη ταχύτητα δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mM) (Πίνακας 5). Το μείγμα της αντίδρασης (1ml) περιείχε Tris-HCl 0.05 mM (pH 8.2) με 1 mM DTPA, αιμόλυμα αραιωμένο 1/10 και πυρογαλλόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Προστέθηκε το αιμόλυμα, ακολούθησε ανάδευση και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 min. Ακολούθως προστέθηκε η πυρογαλλόλη και μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης στα 420 nm για 190 sec. Στην συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός

της μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό ($\Delta\text{ABS}/\text{min}$) και της ταχύτητας της αντίδρασης (Πίνακας 6). Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

Πίνακας 5. Ποσότητες που προστέθηκαν στην αντίδραση

Συγκέντρωση Πυρογαλλόλης	0,2mM	0,4mM	0,6mM	0,8mM	1mM	1,2mM
Buffer pH 8.2	870 μl	870 μl	870 μl	870 μl	870 μl	870 μl
Αιμ. αρ. 1/10	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl
Πυρογαλλόλη	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Vτελ.	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

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

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

Ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό: $\Delta\text{abs}/\text{min}$.

Μοριακή απορροφητικότητα της πυρογαλλόλης : 2,47 mmol/L.

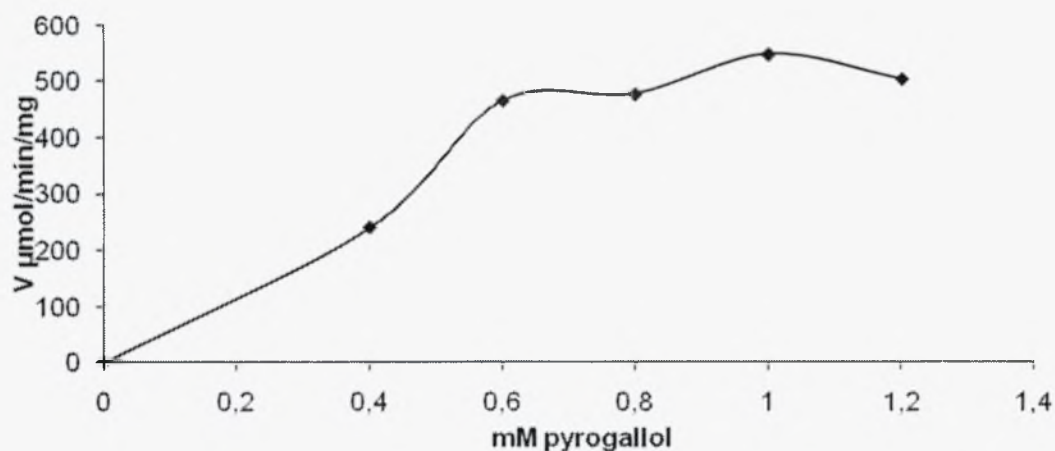
Η ποσότητα του ενζύμου στην κυβέττα είναι 0,027 mg.

Πίνακας 6. Τιμές της ταχύτητας σε διάφορες συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης

Συγκέντρωση πυρογαλλόλης (mM)	$\Delta\text{ABS}/\text{min}$	Ταχύτητα [V] $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ενζύμου
0,2	0	0
0,4	0,011	240
0,6	0,021	465
0,8	0,022	477
1	0,024	547
1,2	0,022	502

Με τα παραπάνω στοιχεία έγινε η καμπύλη ταχύτητας και συγκέντρωσης πυρογαλλόλης (Διάγραμμα 1). Η συγκέντρωση της πυρογαλλόλης **0,8mM** είναι η συγκέντρωση στην οποία το ένζυμο είναι σε κορεσμό και δρα με την μέγιστη ταχύτητα (V_{max}). Σε αυτή τη συγκέντρωση πυρογαλλόλης εξετάστηκε η επίδραση

των εκχυλισμάτων (σε αυτή τη συγκέντρωση η δράση του ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος $O_2^{\bullet-}$).



Διάγραμμα 1. Καμπύλη ταχύτητας και συγκέντρωσης πυρογαλλόλης

2.2.4. Επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης πραγματοποιήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία. Προστέθηκαν οι παρακάτω όγκοι με την ακόλουθη σειρά (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Όγκοι που προστέθηκαν στην αντίδραση

	control	C (μg/ml)
Buffer pH 8,2	870μl	770μl
Εκχύλισμα	-	100μl
Αιμόλμ. 1/10	30μl	30μl
Πυρογαλλόλη	100μl	100μl
Υτελ.	1ml	1ml

Το μείγμα της αντίδρασης (1ml) περιείχε Tris-HCl 0.05 mM (pH 8.2) με 1 mM DTTPA, αιμόλυμα αραιωμένο 1/10, πυρογαλλόλη 0.8mM και το εκχύλισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (100, 200, 400, 600, 800, 1200, 1400, 1600 μg/ml). Προστέθηκε το αιμόλυμα, ακολούθησε ανάδευση και παρέμεινε σε θερμοκρασία

δωματίου για τουλάχιστον 5 min. Ακολούθως προστέθηκε η πυρογαλλόλη και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 420 nm για 190 sec. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν επαγωγή στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης εξετάστηκαν απουσία ενζύμου και έλαβε μέρος η εξής πειραματική διαδικασία. Προστέθηκαν οι παρακάτω όγκοι με την ακόλουθη σειρά (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Όγκοι που προστέθηκαν στην αντίδραση

	control	C(μg/ml)
Buffer pH 8.2	900μl	800μl
Εκχύλισμα	-	100μl
Πυρογαλλόλη	100μl	100μl
Υτελ.	1ml	1ml

2.2.5. Υπολογισμός επαγωγής-PC₅₀

Στο πείραμα μετρήθηκε η μεταβολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης στα 420nm για 190sec.

Τύπος υπολογισμού της επαγωγής

Για κάθε δείγμα υπολογιζόταν ο μέσος όρος της μεταβολής της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης. Η επαγωγή της υπεροξειδικής δισμουτάσης υπολογιζόταν από τον τύπο:

$$\% \text{ επαγωγή SOD} = \frac{\text{M.O. } \Delta_{\text{ABS control}} - \text{M.O. } \Delta_{\text{ABS } C_x}}{\text{M.O. } \Delta_{\text{ABS control}}} \times 100$$

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

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

Το control περιέχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από διάλυμα εκχυλίσματος. Σε κάθε εκχύλισμα προσδιορίστηκε το PC₅₀, το οποίο εκφράζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί κατά 50% επαγωγή του ενζύμου.

2.2.6. Στατιστική ανάλυση

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

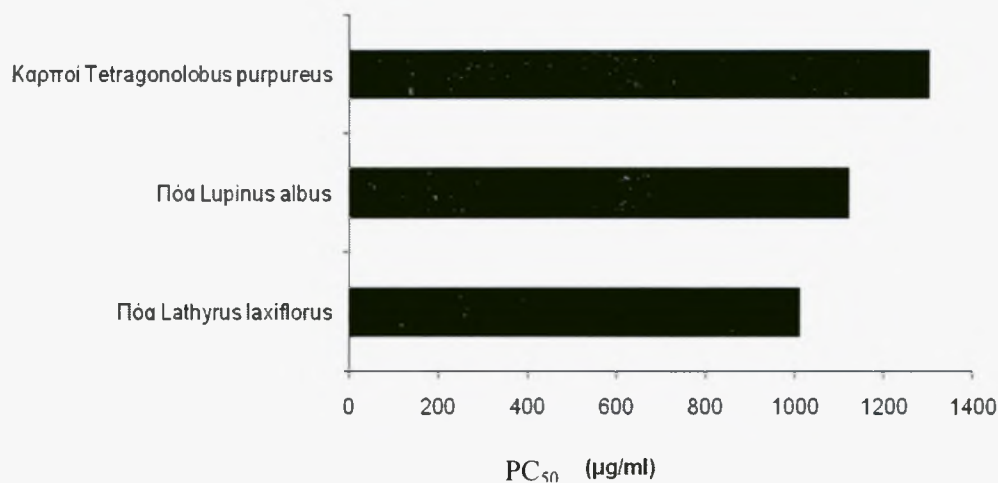
3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Από τα 17 υδατικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν επαγωγή στη δραστικότητα της SOD εμφάνισαν 3 ενώ 14 εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία δράση. Το εύρος των τιμών PC₅₀ κυμαινόταν από 1010μg/ml έως 1300μg/ml (Διάγραμμα 2). Το πιο δραστικό εκχύλισμα με τιμή PC₅₀ 1010μg/ml ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα *Lathyrus laxiflorus*. Ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα με τιμή PC₅₀ 1300μg/ml ήταν το εκχύλισμα που προέκυψε από καρπούς του *Tetragonolobus purpureus*. Τα τρία υδατικά εκχυλίσματα τα οποία εμφάνισαν επαγωγή στη δραστικότητα της SOD ξαναμελετήθηκαν απουσία ενζύμου. Το εκχύλισμα που προέκυψε από την πόα *Lupinus albus* εμφάνισε αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της SOD

Υδατικά Εκχυλίσματα (μg/ml)	PC ₅₀ (μg/ml) Επαγωγή της SOD	%Αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης
Πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i>	1010	-
Πόα <i>Lupinus albus</i>	1120	17*
Καρποί <i>Tetragonolobus purpureus</i>	1300	-
Πόα <i>Vicia faba</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Phaseolus vulgaris</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Lotus edulis</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Lens culinaris</i>	Καμία Δράση	-
Καρποί <i>Lotus edulis</i>	Καμία Δράση	-
Περικάρπιο <i>Lotus edulis</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Lens culinaris</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Phaseolus vulgaris</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Lotus longisiliquosus</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Lupinus albus</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία Δράση	-
Καρποί <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Lathyrus clymenum</i>	Καμία Δράση	-



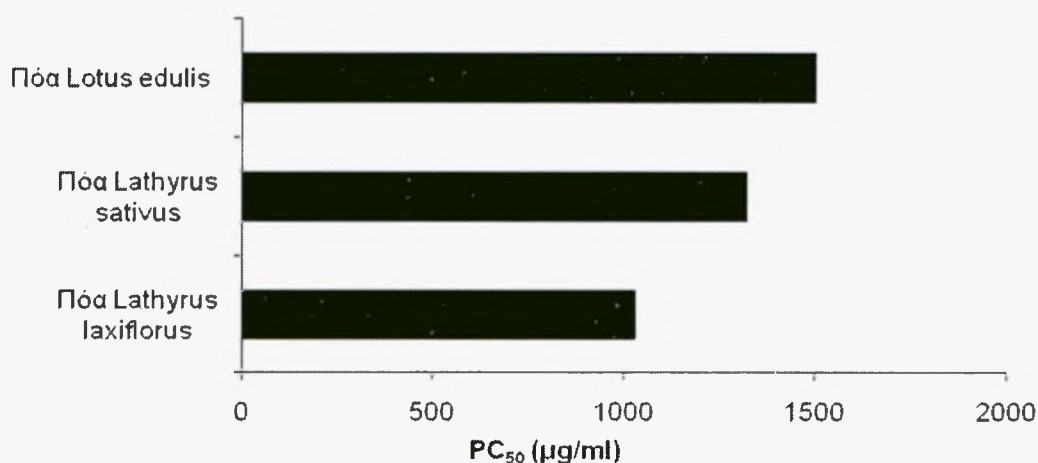
Διάγραμμα 2. Συγκεντρώσεις PC₅₀ υδατικών εκχυλισμάτων ψυχανθών

3.2. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Από τα 17 μεθανολικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν επαγωγή στη δραστικότητα της SOD εμφάνισαν 3 ενώ 14 εκχυλίσματα δεν εμφάνισαν καμία δράση (Πίνακας 10). Αυτά τα τρία εκχυλίσματα ήταν εκχυλίσματα που προέκυψαν από την πόα *Lathyrus laxiflorus*, την πόα *Lathyrus sativus* και την *Lotus edulis*. Το εύρος των τιμών PC₅₀ κυμαινόταν από 1030µg/ml έως 1500µg/ml (Διάγραμμα 3). Το πιο δραστικό εκχύλισμα με τιμή PC₅₀ 1030µg/ml ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα *Lathyrus laxiflorus*. Ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν το εκχύλισμα που προέκυψε από την πόα *Lotus edulis* με τιμή PC₅₀ 1500µg/ml. Τα τρία υδατικά εκχυλίσματα τα οποία εμφάνισαν επαγωγή στη δραστικότητα της SOD ξαναμελετήθηκαν απουσία ενζύμου. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την πόα *Lotus edulis* και την *Lathyrus laxiflorus* εμφάνισαν αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών στη δραστικότητα της SOD

Μεθανολικά Εκχυλίσματα (μg/ml)	PC ₅₀ (μg/ml) Επαγωγή της SOD	%Αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης
Πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i>	1030	22*
Πόα <i>Lathyrus sativus</i>	1320	-
Πόα <i>Lotus edulis</i>	1500	15*
Πόα <i>Vicia faba</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Phaseolus vulgaris</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Lupinus albus</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Lens culinaris</i>	Καμία Δράση	-
Καρποί <i>Lotus edulis</i>	Καμία Δράση	-
Περικάρπιο <i>Lotus edulis</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Lens culinaris</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Phaseolus vulgaris</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Lotus longisiliquosus</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία Δράση	-
Σπέρματα <i>Lupinus albus</i>	Καμία Δράση	-
Πόα <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία Δράση	-
Καρποί <i>Vicia tenuifolia</i>	Καμία Δράση	-
Καρποί <i>Tetragonolobus purpureus</i>	Καμία Δράση	-



Διάγραμμα 3. Συγκεντρώσεις PC₅₀ μεθανολικών εκχυλισμάτων ψυχανθών

4.Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα αυτά παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Spanou C.et al. 2008) οι οποίες αποδόθηκαν στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Οι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες ενώ παράλληλα δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Manach C.et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα (υδατικά και μεθανολικά) που προέρχονται από διάφορα ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae* που καλλιεργούνται σε όλη την Ελλάδα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης αυτών των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Συνολικά μελετήθηκαν 17 υδατικά και 17 μεθανολικά εκχυλίσματα ψυχανθών (Πίνακας 4).

Από τα 17 υδατικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν επαγωγή στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης εμφάνισαν μόνο 3, τα εκχυλίσματα πόας του φυτού *Lathyrus laxiflorus*, *Lupinus albus* και το εκχύλισμα καρπών *Tetragonolobus purpureus*. Τα υπόλοιπα δεν εμφάνισαν καμία δράση (Πίνακας 9). Το εύρος των τιμών του PC₅₀ κυμαινόταν από 1010μg/ml έως 1300μg/ml (Διάγραμμα 2). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα του φυτού *Lathyrus laxiflorus*, ενώ το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από τους καρπούς του φυτού *Tetragonolobus purpureus*, με τιμές PC₅₀ 1010μg/ml και 1300μg/ml, αντίστοιχα. Όσον αφορά στα μεθανολικά, δράση έδειξαν τα εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lathyrus laxiflorus*, *Lathyrus sativus* και *Lotus edulis*. Το εύρος των τιμών του PC₅₀ κυμαινόταν από 1030μg/ml έως 1500μg/ml (Διάγραμμα 3). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από την πόα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* ενώ το λιγότερο δραστικό ήταν το εκχύλισμα που προέκυψε από την πόα του φυτού *Lotus edulis* και με τιμές PC₅₀ 1030μg/ml και 1500μg/ml, αντίστοιχα. Η

παρατηρούμενη επαγωγή της υπεροξειδικής δισμουτάσης αποδίδεται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις.

Τα εκχυλίσματα τα οποία εμφάνισαν επαγωγή στη δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ξαναμελετήθηκαν και απουσία του ενζύμου. Από τα υδατικά το εκχύλισμα που προέκυψε από την πόα *Lupinus albus* και από τα μεθανολικά αυτά που προέκυψαν από την πόα *Lotus edulis* και την *Lathyrus laxiflorus* εμφάνισαν αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης απουσία ενζύμου. Τα εκχυλίσματα αυτά έχουν διπλή δράση, συγκεκριμένα εκτός από επαγωγή στην SOD παρουσιάζουν και αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες σουπεροξειδίου. Πολυφαινόλες όπως κερκετίνη, μιρικετίνη και ρουτίνη έχει βρεθεί ότι δεσμεύουν τις ρίζες σουπεροξειδίου (Jadwiga Robak & Ryszard J. Gryglewski, 1988).

Η διαφορά στη δραστικότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων οφείλεται στο ότι αυτά προέρχονται τόσο από διαφορετικά φυτά όσο και από διαφορετικά τμήματα του ίδιου του φυτού (πόα, σπέρματα, καρποί, περικάρπιο). Επιπλέον μεταξύ των υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων η διαφορετική δράση τους απέναντι στην υπεροξειδική δισμουτάση αποδίδεται στο γεγονός ότι η διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων στο νερό και τη μεθανόλη δεν είναι ίδια. Δηλαδή, ορισμένες πολυφαινόλες οι οποίες έχουν δράση στα υδατικά εκχυλίσματα μπορεί να μην υπάρχουν στα μεθανολικά διότι δεν είναι δυνατή η διάλυση τους σε μεθανόλη.

Υπήρχαν μεθανολικά εκχυλίσματα φυτών που δεν παρουσίασαν καμία δράση ενώ τα αντίστοιχα υδατικά παρουσίασαν επαγωγική δράση και το ανάποδο. Συγκεκριμένα τα υδατικά εκχυλίσματα που προήλθαν από τους καρπούς του φυτού *Tetragonolobus purpureus* και από την πόα του φυτού *Lupinus albus* είχαν κάποια δράση ενώ τα αντίστοιχα μεθανολικά δεν είχαν καμία. Το μόνο εκχύλισμα το οποίο είχε δράση και ως υδατικό και ως μεθανολικό και αποτελούσε και στις δυο περιπτώσεις το πιο δραστικό, είναι το εκχύλισμα από την πόα του φυτού *Lathyrus laxiflorus*. Ως μεθανολικό εμφάνισε και αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης απουσία ενζύμου. Θα ήταν σκόπιμο λόγω της δραστικότητας του να βρεθεί η ακριβής σύσταση του σε πολυφαινόλες.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα παρουσίασαν επαγωγική δραστικότητα στην υπεροξειδική δισμουτάση, και ορισμένα από αυτά εμφάνισαν και αναστολή στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης. Όμως οι συγκεντρώσεις, στις οποίες τα εκχυλίσματα προκάλεσαν

επαγωγή στην SOD είναι πολύ μεγάλες (1mg/ml) για να επιτευχθούν στον οργανισμό. Για αυτό το λόγο απαιτείται περαιτέρω μελέτη στα καθαρά μόρια που υπάρχουν στα εκχυλίσματα.

Η SOD είναι ένα από τα πιο βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και είναι υπεύθυνη για την εξουδετέρωση των ριζών σουπεροξειδίου, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των δραστικών μορφών οξυγόνου και είναι δραστικές και επιβλαβείς απέναντι στα βιομόρια. Η δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης, όπως και άλλων ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας (GPx, καταλάση), είναι πιο έντονη κατά την άσκηση. Αυτό συμβαίνει γιατί η άσκηση προκαλεί υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου συμβάλλοντας στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Nikolaidis et al, 2006, Veskoukis et al, 2008). Συνεπώς η SOD μπορεί να οδηγήσει στην υπέρμετρη παραγωγή H_2O_2 . Απαιτείται λοιπόν και η μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως της καταλάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.-Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α.(2003). Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Καράταγλης Σ. (1994). Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text .
- Κουρέτας Δημήτριος (2003). Βιοχημική Τοξικολογία.
- Τσέκου ΙΒ. (2004). Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις αδερφών Κυριακίδη.
- Agosta WC, Lu Q, Bovonsombat P. (1996). Novel Photochemical Hydrolysis of o-Acetylphenylacetoneitriles to Amides. *J Org Chem*. May 31; 61(11):3729-3732.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2000). Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Anuradha Nandi & Chatterjee I. B. (1988). "Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues" *J. Biosci.*, 13, 305-315
- Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tomioka, Y., Itoh, H., Kasai, H. (1996). Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res*. 56:2546 –2549.
- Beauchamp Charles & Fridovich Irwin (1971). "Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels" *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Blokhina Olga, Virolainen Eija, Fagerstedt Kurt. V. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a review. *Annals of Botany* 91:179-194.
- Bulkley G. (2002). Free radicals and reactive oxygen species. The evolution of a scientific concept. *Cosmos Journals*.
- C.S. Yang, J.M. Landau, M. Huang, H. Newmark,(2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annual Review of Nutrition*, 21:381-406.

- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, et al. (1992). Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;89:10405-10409.
- Cutler R. (1994). Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology*,. Orlando, FL: *Academic Press*, vol 6 pp 381-395.
- Dekker M. (2004). Phytochemicals in health and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 37, 12:2082.
- Di Meo S, Venditti P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*; 10: 125-40.
- Duranti M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Filoterapia*, 77:67-82.
- Ferguson LR. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. 36(4):327-58.
- Flobe L. & Otting F. (1984). ‘Superoxide Dismutase Assays’, *Methods in enzymology*, 105, 93-104,
- Frei B, Kim MC, Ames BN. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:4879±4883.
- Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*;64:97-112.
- G. Di Carlo, N. Mascolo, A. Izzo, F. Capasso, (1999). Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353.
- Guillon F, Champ MMJ. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88:293s-306s.
- Hall WL, Vafeiadou K, Hallund J, Bügel S, Koebnick C, Reimann M, Ferrari M, Branca F, Talbot D, Dadd T, Nilsson M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Minihane AM, Williams CM. (2005). Soy-isoflavone-enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular disease risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. *Am J Clin Nutr*. Dec; 82(6):1260-8; quiz 1365-6.

- Halliwell B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease, Encyclopedia of life sciences.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). Free Radical in Biology and Medicine (2nd edition). *Oxford: Clarendon Press*, pp136-158.
- Halliwell B. and Gutteridge JMC. (1995). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 8(2):89-193
- Halliwell B. and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. *New York: Oxford Science Publications.*
- Hensley, K., and Floyd, R.A. (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.*; 397:377-383.
- I.T. Johnson, (2007). Phytochemicals and cancer, *Proceedings of the Nutrition Society*, 66:207-215.
- Ilja CW Arts and Peter CH Hollman (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am J Clin Nutr.*, 81:317S–25S.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298:431-437.
- Jadwiga Robak & Ryszard J. Gryglewski, (1988). Flavonoids are Scavengers of superoxide anions. Department of Pharmacology, Copernicus Academy of Medicine 31-531 Cracow, Poland *Biochemical Pharmacology, Vol. 37. No. 5.* pp. 837-441.
- Kenneth D. R. Setchell² and Aedin Cassidy (1999). Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health, Clinical Mass Spectrometry, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229 and *School of J. Nutr.* 129: 758S–767S.
- Klug D, Rabani J, Fridovich I. (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem.* Aug 10; 247(15):4839-42.
- Kohen Ron and Nyska Abraham. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology*, vol 30, no 6, pp 620–650.

- Kurlovich B.S., Ropyev S.I. (1995). The gene bank and breeding of grain legumes, *The N.I Vavilov Institute of Plant Industry*, 111:438.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*; 11:376-381.
- Lijnen P, Petrov V, van Pelt J, Fagard R. (2008). Inhibition of superoxide dismutase induces collagen production in cardiac fibroblasts. *Am J Hypertens*. Oct; 21(10):1129-36.
- M.R. Webb, S.E. Ebeler, (2004). Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochemical Society*, 384:527-541.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79:727-47
- Marklund Stefan and Marklund Gudrun (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase ,*Eur. J. Biochem.* 47,469-474
- Marquardt R.R. (1989). Dietary effects of tannins, vicine and convicine. In *Recent Advances of Research in Antinutritional factors in Legume seeds*, pp 141-155 [J.Huisman, A.F.B van der Poel and I.E.Liener, editors]. Wageningen:Pudoc.
- Martin F. Wojciechowski, Johanna Mahn, Bruce Jones (2006). "Fabaceae". To Δέντρο της Ζωής Web.
- Martin J.P.Jr, Dailey M & Sugarman E. (1987). "Negative and Positive Assays of Superoxide Dismutase Based on Hematoxylin Autooxidation", *Arch. Biochem. Biophys.* 255, 329-336.
- Maurizio Paci, Alessandro Desideri, and Giuseppe Rotilio, (1988). " Cyanide Binding to Cu,Zn Superoxide Dismutase" *The journal of biological chemistry* 263, 162-166.
- Mc Cord J, and Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*; 244: 6049-6055.
- Misra, H. and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.

- Mylonas C., Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage, in vivo, 13:295-310.
- Nakane T., Asayama K., Koderia K. (1998). Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases : immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free radic Biol Med*; 25:504-11.
- Navarro-Arevalo Ana, Canavate Consuelo, Maria Jesus Sanchez-del-Pino. (1999). Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mechanisms of aging and development*, 108:207-217.
- 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.
- Nocton G, Foyer CH. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:249-279.
- Oleszek W. (2002). Dietary phytochemicals and human health. *Phytochemistry Reviews*, 1: 163-166.
- Olson RE, Rudney H. (1993). Biosynthesis of ubiquinone. *Vitam Horm*; 40:1±43.
- Oury TD, Chang LY, Day BJ, et al. (1995). Compartmentalization of radical reactions. In: Davies KJA, Ursini FS, (eds). *The Oxygen Paradox. Padova, CLEUP University Press*,:195-207.
- Oury TD, Chang L-Y, Marklund SL, et al. (1994). Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest*; 70:889-898.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*;75:617-636.
- Ovesna Z, et al. (2006). "Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines", *Oncol Rep* 16:617-624.
- Oztazan N., Taysi S., Gumustekin K., Altinkaynak K., Aktas O., Timur H., Siktar E., Keles S., Akar S., Akcay F., Dane S., Gul M. (2004). Endurance

training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rats. *Eur J Appl Physiol.*, 91: 622-627.

- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.-D. & Remacle, J. (1990). Mech. Ageing Dev. 51,283-297.
- Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. (1993). Increased oxidative DNA damage after 30 days of vigorous exercise. *J Toxicol Environ Health*; 40:459-462.
- 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.
- Roberfroid M. (1993). Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33:103-148.
- Robins RJ. Phenolic acids in food (2003). An overview of analytical methodology. *J.Agric. Food Chem.*, 51:2866-87.
- Ruomei Gao , Zhuobin Yuan , Zhiqiang Zhao , Xiurui Gao (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45,41-45.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:287-306.
- Scalbert A., Williamson G. (2000). Dietary Intake Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 130 (8S),pp 2073S-2085S.
- Smits Coen H.M and Annison Geoffrey, (1996). Non-starch plant polysaccharide in broiler nutrition towards a physiologically valid approach to their determination. *World Poultry Science Journal*.52:203-221.
- Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP. (2002). "A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols", *Clin Biochem*. 35:119-124.
- Spanou C., Bourou G., Dervishi A., Aligiannis N., Angelis A., Komiotis D., Skaltsounis A.-L., Kouretas D. (2008). Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from greek legume plant extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:6967-6976.

- Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S. (1995). Changes in urinary level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med*; 18:431– 436.
- Tham DM, Whitin JC, Kim KK, et al. (1998). Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol*; 275:G1463-1471.
- Trichopoulou A., Vasilopoulou E. (2000). Mediterranean diet and longevity. *Br.J.Nutr.*84:205-209.
- Van Heugten E, Trottier NL, Van Kempen TA. (2001). Adipic acid increases plasma lysine but does not improve the efficiency of lysine utilization in swine. *J Anim Sci. Sep*; 79(9):2406-11.
- Vasilopoulou E, Georga K, Joergensen MB, Naska A and Trichopoulou A. (2005). The antioxidant properties of Greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu. *Curr Med Chem – Immun, Endoc & Metab Agents* 5(1): 33-45.
- Vermerris W. & Nicholson R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. Netherlands, Springer.
- Veskokoukis 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.
- Visioli Francesco, Luisa Borsani, Claudio Galli. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res*, 47:419-425.
- Whittaker JW. (2000). Manganese superoxide dismutase. *Metal Ions Biol Syst*; 37:587-611.
- Wiseman J. and Cole D.J.A (1988). European legumes in diets for non-ruminants. *In Recent Advances In Animal Nutrition*, pp.13-37 [W. Haresign and D.J.A. Cole, editors]. London: Butterworths.
- Wu JM, et al. (2001). "Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review)", *Int. J. Mol. Med.* 8:3-17.
- Y. Yilmaz and R.T. Toledo, (2004). Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends in Food Science & Technology*, 15:422-433.

- Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Ann. Rev. Nutr.*, 21:381-406.
- Zern TL, Fernandez ML. (2005). Cardioprotective effect of dietary polyphenols. *J. Nutr*, 135:2291-4.

