

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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ
ΒΕΝΖΑΛΔΕΪΔΩΝ ΜΕ ΞΑΝΘΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΙ ΑΛΔΕΪΔΙΚΗ
ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΞΑΝΘΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ**

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΒΕΣΚΟΥΚΗΣ

**ΕΙΣΗΓΗΤΕΣ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΠΑΝΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΓΟΥΝΑΡΗΣ ΗΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2004



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

Αριθ. Εισ.: 4295/1

Ημερ. Εισ.: 08-03-2005

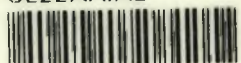
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΒΕΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087985

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΑΡΑΓΡΑΦΟΣ

ΣΕΛΙΔΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1.	Αλδεύδες	2
1.2.	Υδροξυλάσες Μολυβδαινίου	6
1.3.	Πολυφαινόλες	13
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1.1.	Χημικά	18
2.1.2.	Βιολογικά	19
2.2.	Παρασκευή Sorenson's Phosphate Buffer (SPB)	19
2.3.	Προετοιμασία για την απομόνωση Αλδεϋδικής Οξειδάσης	19
2.3.1.	Πρωτόκολλο Απομόνωσης Αλδεϋδικής Οξειδάσης από ινδικό χοιρίδιο	19
2.4.	Έλεγχος της δράσης των ενζύμων με τη βοήθεια υποστρωμάτων	21
2.4.1.	Έλεγχος της δράσης της Αλδεϋδικής Οξειδάσης με χρησιμοποίηση των 2-, 3-, 4-Νιτροβενζαλδεϋδη και 2-, 3-, 4-Μεθυλβενζαλδεϋδη ως υποστρωμάτων.	21
2.4.2.	Έλεγχος της δράσης της Ξανθικής Οξειδάσης με χρησιμοποίηση των 2-, 3-, 4-Νιτροβενζαλδεϋδη και 2-, 3-, 4-Μεθυλβενζαλδεϋδη ως υποστρωμάτων.	21
2.4.3.	Έλεγχος της δράσης της ξανθικής οξειδάσης που προέρχεται από το γάλα βοδιού χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως υπόστρωμα.	22
2.4.4.	Έλεγχος της δράσης της μικροβιακής ξανθικής οξειδάσης χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως υπόστρωμα.	22
2.5.	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford	23
2.6.	Υπολογισμός κινητικών σταθερών για την οξειδωση των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών από την ξανθική και αλδεϋδική οξειδάση.	24
2.7.	Μελέτη αναστολής από πολυφαινόλες χρησιμοποιώντας ξανθίνη ως υπόστρωμα	24
2.7.1.	Πρωτοκαχεϊκό οξύ	24
2.7.2.	Κατεκίνη	25
2.7.3.	Επικατεκίνη	25
2.7.4.	Γαλλικό οξύ	25
2.7.5.	Καφεϊκό οξύ	26
2.7.6.	Φερουλικό οξύ	26
2.7.7.	Ρουτίνη	27
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1.	Προσδιορισμός ποσότητας ενζύμου (Αλδεϋδική Οξειδάση)	28
3.2.	Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m , V_{max} και K_s των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών με τη χρήση της καμπύλης Lineweaver – Burk.	29
3.3.	Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m , V_{max} και K_s της ξανθίνης με ξανθική οξειδάση με τη χρήση της καμπύλης Lineweaver – Burk.	37
3.4.	Υπολογισμός της αναστολής, που προκλήθηκε από τις πολυφαινόλες στη δράση της ξανθικής οξειδάσης με υπόστρωμα την ξανθίνη.	39
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	45

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

1. Ο ρόλος της μονοάμινο οξειδάσης B στην απαμίνωση των βιογενών αμινών και συγκεκριμένα της 2-Φαινυλαιθυλαμίνης προς παρασκευή Φαινυλακεταλδεΐδης	3
2. Τα μεταβολικά μονοπάτια των αλδεϋδών	4
3. Οι δομές των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών που χρησιμοποιήθηκαν	5
4. Παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και ουρικού οξέος με την ξανθική οξειδάση ως καταλύτη	7
5. Οξειδωτική υδροξυλίωση της Υποξανθίνης σε Ξανθίνη και τελικά σε Ουρικό Οξύ με τη δράση της Ξανθικής Οξειδάσης (XO)	7
6. Οξείδωση της 6-Κινολινοαλδεϋδης από την αλδεϋδική οξειδάση. Η οξείδωση της αλδεϋδομάδας γίνεται ως δεύτερο βήμα	8
7. Οξείδωση του N-μεθυλ-νικοτιναμιδίου είτε προς N-μεθυλ-2-πυριδοно-5-καρβοξυαμίδιο είτε προς N-μεθυλ-4-πυριδοно-5-καρβοξυαμίδιο	9
8. Δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου με την πτερίνη, το μολυβδαίνιο και τα άτομα του θείου	9
9. Η δομή του συμπάραγοντα με το μολυβδαίνιο	10
10. Ο καταλυτικός μηχανισμός των υδροξυλασών μολυβδαινίου	11
11. Οι χημικές δομές των πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν	15
12. Βασική δομή των φλαβονοειδών	15
13. Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου Bradford	23
14. Πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας του ενζύμου (Αλδεϋδική Οξειδάση). (n=2)	28
15. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 2-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (A.O.). (n=2)	29
16. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 3-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (A.O.). (n=2)	29
17. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 4-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (A.O.). (n=2)	30
18. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 2-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (A.O.). (n=2)	30
19. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 3-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (A.O.). (n=2)	31
20. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 4-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (A.O.). (n=2)	31
21. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 2-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.O.). (n=2)	32
22. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 3-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.O.). (n=2)	32

23. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξειδωση της 4-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)	33
24. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξειδωση της 2-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)	33
25. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξειδωση της 3-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)	34
26. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξειδωση της 4-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)	34
27. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξειδωση της ξανθίνης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης από γάλα βοδιού (Ξ.Ο.). (n=2)	37
28. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξειδωση της ξανθίνης παρουσία Μικροβιακής Ξανθικής Οξειδάσης (Μ.Ξ.Ο.). (n=2)	38

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ

ΣΕΛΙΔΑ

1. Κατηγορίες Πολυφαινόλων και ορισμένα παραδείγματα σε κάποιες απ' αυτές	13
2. Σχηματική παράσταση της απομόνωσης Αλδεϋδικής Οξειδάσης από ινδικό χοιρίδιο	20
3. Πρωτόκολλο της μεθόδου Bradford	23
4. Οι κινητικές σταθερές των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών κατά την οξειδωσή τους με Αλδεϋδική Οξειδάση	35
5. Οι κινητικές σταθερές των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών κατά την οξειδωσή τους με Ξανθική Οξειδάση	35
6. Οι κινητικές σταθερές της ξανθίνης κατά την οξειδωσή της με Ξανθική Οξειδάση προερχόμενη από γάλα βοδιού	37
7. Οι κινητικές σταθερές της ξανθίνης κατά την οξειδωσή της με Μικροβιακή Ξανθική Οξειδάση	38
8. Αναστολή της οξειδωσης της ξανθίνης συγκέντρωσης 1×10^{-4} Μ στην κυβέττα από πολυφαινόλες με ξανθική οξειδάση από γάλα βοδιού στα 295nm. (n=2)	39

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΒΕΝΖΑΛΔΕΥΔΩΝ ΜΕ ΞΑΝΘΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΙ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΞΑΝΘΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αλδεΐδες είναι οργανικά μόρια, των οποίων η διασπορά στη φύση είναι πολύ έντονη. Είναι συστατικά των τροφών ενώ αποτελούν και το τελικό προϊόν της διάσπασης πολλών φαρμάκων στον οργανισμό από συγκεκριμένα ένζυμα. Προκαλούν πολύ συχνά κυτταροτοξικότητα, ειδικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλλά έχουν και ευεργετικές δράσεις, οι οποίες έγκεινται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού του κυττάρου όταν οι βλάβες είναι σημαντικές και κινδυνεύουν να προκαλέσουν μη αναστρέψιμες καταστάσεις. Η οξειδωσή τους προς σχηματισμό των αντίστοιχων οξέων συμβαίνει, εκτός των άλλων και από μια κατηγορία ενζύμων, τις υδροξυλάσες μολυβδαινίου, στις οποίες υπάγονται η ξανθική και η αλδεϋδική οξειδάση. Τα ένζυμα αυτά έχουν μία ποικιλία υποστρωμάτων, ανάμεσα στα οποία είναι οι αρωματικές αλδεΐδες, οι πουρίνες, οι πυριμιδίνες και οι N-ετεροκυκλικές ενώσεις. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η δράση των δύο παραπάνω ενζύμων σε έξι υποκατεστημένες βενζαλδεΐδες, τις 2-, 3- και 4-μεθυλβενζαλδεΐδη και τις 2-, 3- και 4-νιτροβενζαλδεΐδη μέσω του προσδιορισμού των κινητικών σταθερών (V_{max} , K_m και K_s) και βρέθηκε ότι αποτελούν υποστρώματά τους και μάλιστα κάποιες όπως η 3-νιτροβενζαλδεΐδη και η 3-μεθυλβενζαλδεΐδη είναι πολύ καλά υποστρώματα για την ξανθική οξειδάση ενώ άλλες με κύρια πάλι την 3-νιτροβενζαλδεΐδη είναι πολύ καλά υποστρώματα για την αλδεϋδική οξειδάση. Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός των κινητικών σταθερών της ξανθίνης κατά την οξειδωσή της με ξανθική οξειδάση, που προέρχεται τόσο από το γάλα βοδιού όσο και από μικροοργανισμούς και βρέθηκε ότι αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα και για τα δύο ένζυμα. Τέλος, εξετάστηκε η ανασταλτική δράση επτά πολυφαινολών στην ξανθική οξειδάση. Όλες έδειξαν αναστολή σε διαφορετικό βαθμό ενώ το φερουλικό οξύ και η ρουτίνη ήταν εκείνες που ανέστειλαν περισσότερο τη δράση της ξανθικής οξειδάσης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

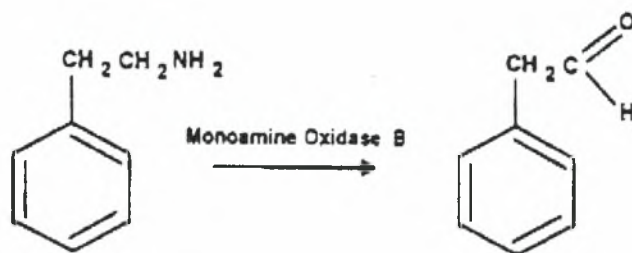
1.1. Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες είναι δραστικά οργανικά μόρια, τα οποία είναι διασπαρμένα στη φύση. Απαντώνται ως φυσικά συστατικά σε μια μεγάλη ποικιλία τροφών (1,2) ενώ συμβάλλουν είτε αποκλειστικά είτε σε μεγάλο βαθμό στο άρωμα και τη γεύση ορισμένων φρούτων (3,4). Χαρακτηριστικά αναφέρεται η παρουσία αλδευδών της trans ισομερούς μορφής κυρίως σε φρούτα και λαχανικά, όπως οι ντομάτες (5), ο αρακάς (6), το γκρέιπφρουτ (2) κτλ. Επιπλέον, η χαρακτηριστική γεύση του λεμονιού οφείλεται στην παρουσία αλδευδών (7,8). Έχουν παρατηρηθεί πάνω από 300 διαφορετικές αλδεΐδες ως συστατικά των τροφών (9). Η ακεταλδεΐδη και η φουρφουράλη καθώς και άλλες αλειφατικές αλδεΐδες και αρωματικά υποκατάστατα βενζαλδευδών αποτελούν συστατικά 150 και πλέον τροφικών παρασκευασμάτων. Η βανιλίνη (4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΐδη) συναντάται στον καρπό του φυτού της βανίλιας αλλά συντίθεται κιόλας σε μεγάλη κλίμακα στη βιομηχανία των τροφών για να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας βελτίωσης της γεύσης σε πολλά είδη τροφικών παρασκευασμάτων (10) αλλά και ως συντηρητικό των τροφών λόγω της αντιμικροβιακής της δράσης (11). Η διαφορετική κατανομή ως προς την ποσότητα μιας αλδεΐδης στις τροφές φαίνεται αν ληφθεί υπόψη η παρουσία της βενζαλδεΐδης στα λαχανικά σε συγκέντρωση 1,2 ppm ενώ στην κανέλλα μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 3000ppm (9).

Παρά το γεγονός ότι λίγα μόνο φάρμακα έχουν στη δομή τους αλδεΐδικές ομάδες υπάρχουν πολλά φάρμακα με αμινομάδες, τα οποία μετατρέπονται σε αλδεΐδες με τη δράση της μονοάμινο οξειδάσης (MAO). Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η προπρανολόλη (12), ένας αναστολέας των β αδρενεργικών υποδοχέων, που με τη δράση της μονοάμινο οξειδάσης μετατρέπεται σε προπιοναλδεΐδη (και κάποια άλλα ενδιάμεσα προϊόντα) και αυτή με τη βοήθεια οξειδωτικών ενζύμων μετατρέπεται σε προπιονικό οξύ. Επιπλέον, η έκθεση του οργανισμού σε εξωγενείς αλδεΐδες μπορεί να γίνει και μέσω της απορρόφησης μεταβολικών προδρόμων τους όπως είναι οι αλκοόλες. Αυτές μετατρέπονται στα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού τους, τα οργανικά οξέα, μέσω της μετατροπής τους σε αλδεΐδες. Μια αλδεΐδη ωστόσο μπορεί να μετατραπεί στην αντίστοιχη αλκοόλη μέσω της αλδεΐδικής ρεδοκτάσης ή / και της αλδεΐδικής δεϋδρογονάσης.

Ενδογενείς αρωματικές αλδεΐδες παράγονται όταν οι βιογενείς αμίνες (νευροδιαβιβαστές) απενεργοποιούνται με τη δράση της μονοάμινο οξειδάσης, η οποία καταλύει την οξειδωτική τους απαμίνωση και την περαιτέρω μετατροπή τους στο αντίστοιχο οξύ από τα οξειδωτικά ένζυμα. Ένα παράδειγμα αρωματικής αλδεΐδης με αυτή την προέλευση είναι η 3,4-διυδροξυφαινυλακεταλδεΐδη (DOPAL), που σχηματίζεται από τη διάσπαση της ντοπαμίνης. Έχει δείχτει ότι η αλδεΐδη αυτή συνδέεται με πρωτεϊνικές θειόλες και αμινομάδες με αποτέλεσμα να προκαλεί βλάβη στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, γεγονός που παρατηρείται στην παθολογία της νόσου του Parkinson (13). Η DOPAL διασπάται στον οργανισμό από την αλδεΐδική δεϋδρογονάση, που είναι το πιο ενεργό ένζυμο γι' αυτό το σκοπό. Επιπλέον, η ενδογενής αλδεΐδη 2-φαινυλαιθυλαμίνη είναι μία ενδογενής αμίνη, η οποία υπάρχει σε μεγάλα ποσά στον εγκέφαλο των θηλαστικών (14,15). Συντίθεται από

αποκαρβοξυλίωση της L-φαινυλαλανίνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (16) και μπορεί να δράσει ως ρυθμιστής στη νευροδιαβίβαση των κατεχολαμινών στον εγκέφαλο (17,18). Με τη δράση της μονοάμινο οξειδάσης B η 2-φαινυλαιθυλαμίνη μετατρέπεται στην αντίστοιχη αλδεΐδη, τη φαινυλακεταλδεΐδη (19,20), όπως φαίνεται στην εικόνα 1. Ακολουθεί η μετατροπή της σε φαινυλοξικό οξύ τόσο από την αλδεΐδική δεϋδρογονάση όσο και από ξανθική οξειδάση και αλδεΐδική οξειδάση (21). Η 2-φαινυλαιθυλαμίνη συναντάται και εξωγενώς σε σκευάσματα στη σοκολάτα ενώ μπορεί να προκαλέσει πονοκέφαλο και ημικρανίες λόγω αλλαγής στη ροή του αίματος και απελευθέρωσης νορεπινεφρίνης από τους νευρώνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (22,23). Άλλα σκευάσματα που περιέχουν 2-φαινυλαιθυλαμίνη είναι ένας μεγάλος αριθμός τυριών (24,25) καθώς και ορισμένα είδη κόκκινου κρασιού (26,27).



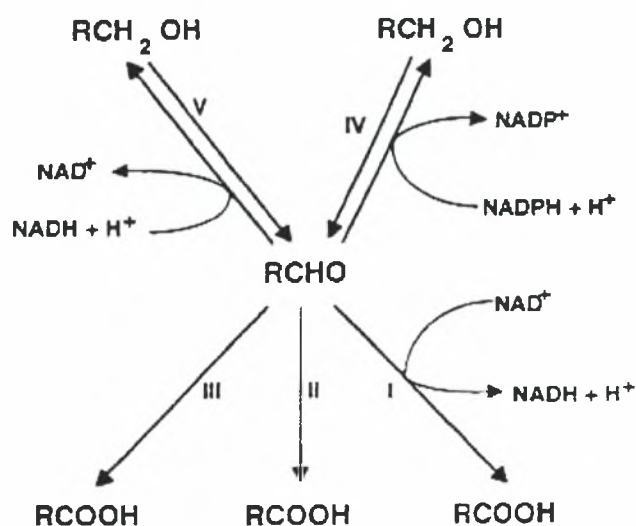
Εικόνα 1. Ο ρόλος της μονοάμινο οξειδάσης B στην απαμίνωση των βιογενών αμινών και συγκεκριμένα της 2-Φαινυλαιθυλαμίνης προς παρασκευή Φαινυλακεταλδεΐδης

Οι περισσότερες αλδεΐδες είναι μόρια, που καταστρέφουν τους ιστούς ενώ εμφανίζουν και τοξικότητα ως προς το γενετικό υλικό μέσω των σταυροσυνδέσεων, που είναι δυνατό να προκαλούν στο DNA. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που αποδεικνύουν την καρκινογενετική δράση των αλδεϋδών σε αρκετά είδη ζώων. Για παράδειγμα, η φορμαλδεΐδη προκαλεί καρκινώματα στο ρηνικό αναπνευστικό επιθήλιο σε αρουραίους (28,29) και ποντίκια (28) μετά από έκθεσή τους σε υψηλές, τοξικές συγκεντρώσεις (30). Ανάλογο αποτέλεσμα όσον αφορά την καρκινογένεση εμφανίζεται και με την ακεταλδεΐδη (31) με υψηλού βαθμού κυτταροτοξικότητα ενώ περιορισμένο καρκινογενετικό δυναμικό εμφανίζουν άλλες αλδεΐδες όπως η φορφυράλη (32) και η κροτοναλδεΐδη (33). Κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις αλδεϋδών μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου ενώ το αντίθετο αποτέλεσμα μπορούν να έχουν χαμηλότερες, μη τοξικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, το γεγονός ότι υψηλές δόσεις αλδεϋδών προκαλούν καρκινογένεση σε ζώα δεν προϋποθέτει απαραίτητα το ίδιο αποτέλεσμα και στον ανθρώπινο οργανισμό.

Αντίθετα με την κυτταροτοξική και καρκινογενετική δράση πολλών αλδεϋδών έχουν βρεθεί και κάποιες, οι οποίες παίζουν το ρόλο αντιμεταλλαξιγόνων παραγόντων καθώς επίσης μπορούν και να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένα παράδειγμα αντιμεταλλαξιγόνου παράγοντα είναι η 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεΐδη (βανιλίνη), η οποία ασκεί τη δράση της σε προβληματικά κύτταρα είτε προάγοντας τον ανασυνδυασμό και τη σύνδεση των ομόλογων περιοχών του DNA είτε αναστέλλοντας τη σύνδεση των μη ομόλογων τμημάτων μέσω της δράσης μιας κινάσης που εξαρτάται από το DNA (34). Μπορεί επιπλέον να περιορίσει την καταστροφή του κυττάρου που προκαλούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ιονίζουσα ακτινοβολία, όπως δείχτηκε σε καλλιέργεια κυττάρων χάμστερ ενώ εμπόδισε την εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών τόσο *in vitro* όσο

και *in vivo* όταν χρησιμοποιήθηκε μετά από την έκθεση των κυττάρων σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, ενώ έχει τη δυνατότητα να μειώνει των αριθμό μικρών όγκων στο έντερο που προκλήθηκαν από διάφορα καρκινογόνα (35,36). Επιπλέον, η προτοκατεχική αλδεϋδη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση επεμβαίνοντας κι αυτή είτε στο σηματοδοτικό μονοπάτι κινάσων που σχετίζονται με τη μίτωση είτε στον κύκλο της ουρίας αναστέλλοντας τη δράση της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης. Το γεγονός αυτό δίνει ελπίδες για τη μελλοντική έρευνα στο πεδίο της αντιμετώπισης του καρκίνου (37,38).

Ο μεταβολισμός των πιο κοινών αρωματικών αλδεϋδών έχει μελετηθεί σε ζώα και προκύπτει ότι το κύριο μεταβολικό προϊόν τους είναι το αντίστοιχο οξύ αν και *in vivo* πολλές φορές μπορούν να αναχθούν σε αλκοόλες. Η εικόνα 2 δείχνει τα μονοπάτια του μεταβολισμού των αλδεϋδών καθώς και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε καθένα από αυτά. Κατά τη μετατροπή της αλδεϋδης σε οξύ 3 είναι τα ένζυμα που μπορούν να δράσουν, η αλδεϋδική οξειδάση, η ξανθική οξειδάση και η αλδεϋδική δεϋδρογονάση. Κατά τη δράση της τελευταίας παρατηρείται αναγωγή ενός μορίου NAD^+ προς σχηματισμό NADH και H^+ . Η ίδια αντίδραση συμβαίνει και κατά τη μετατροπή της αλκοόλης σε αλδεϋδη μέσω της αλκοολικής δεϋδρογονάσης ενώ κατά τη μετατροπή της με τη δράση αλδεϋδικής ρεδοκτάσης παρατηρείται αναγωγή ενός μορίου NADP^+ προς σχηματισμό NADPH και H^+ .



Εικόνα 2. Τα μεταβολικά μονοπάτια των αλδεϋδών. I. Αλδεϋδική Δεϋδρογονάση

II. Αλδεϋδική Οξειδάση

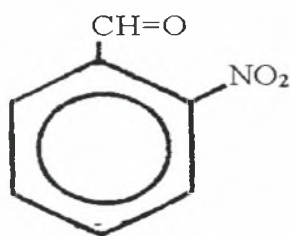
III. Ξανθική Οξειδάση

IV. Αλδεϋδική Αναγωγή

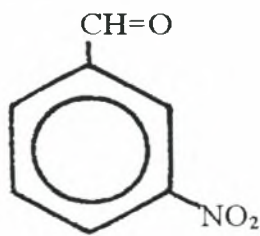
V. Αλκοολική Δεϋδρογονάση

Έχειδειχτείότιηκυτταροτοξικότηταπουπροκαλείταιτόσοαπότιςαλειφατικέςόσοκαιαπότιςαρωματικέςαλδεύδεςεξαρτάταιαπότηνέκτασητουμεταβολισμούτους.Οιαλδεύδεςπουδεμεταβολίζονταιπλήρωςείναιπιοτοξικέςαπόεκείνεςπουμεταβολίζονταικαλάμέχριτατελικάτουςπροϊόντα.Αυτόσυμβαίνειδιότιμπορούννασυνδεθούνμεενδοκυτταρικάμόρια-στόχους,όπωςμπορείπιθανόνναείναιπρωτεΐνεςμεαποφασιστικόρόλοστηβιωσιμότητατουκυττάρουκαιναπροκαλέσουνμηαναστρέψιμεςβλάβες,οιοποίεςαναφέρθηκανπαραπάνω.

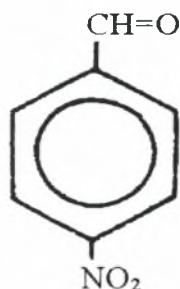
Οιχημικέςδομέςτωνυποκατεστημένωνβενζαλδευδώνπουχρησιμοποιήθηκαναπεικονίζονταιπαρακάτω,στηνεικόνα3.



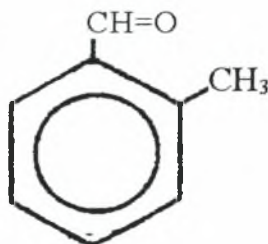
2-Νιτροβενζαλδεϋδη



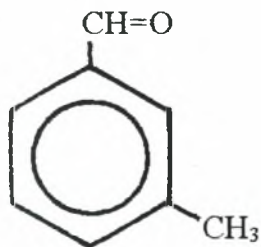
3-Νιτροβενζαλδεϋδη



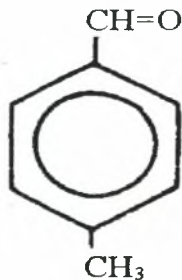
4-Νιτροβενζαλδεϋδη



2-Μεθυλβενζαλδεϋδη



3-Μεθυλβενζαλδεϋδη



4-Μεθυλβενζαλδεϋδη

Εικόνα 3. Οι δομές των υποκατεστημένων βενζαλδευδών που χρησιμοποιήθηκαν.

1.2. Υδροξυλάσες Μολυβδαινίου

Ο όρος υδροξυλάσες μολυβδαινίου (39) χρησιμοποιείται για τα ένζυμα ξανθική οξειδάση, ξανθική δεϋδρογονάση και αλδεϋδική οξειδάση, τα οποία είναι παρόμοια στη δομή και τις μοριακές ιδιότητες αλλά έχουν ιδιαιτερότητες ως προς τα υποστρώματά τους. Αποτελούνται από δύο παρόμοιες υπομονάδες και παρά το ότι κάθε υπομονάδα έχει ένα ενεργό κέντρο απαιτείται ο σχηματισμός διμερούς για να δράσουν. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 4 περιοχές. Μία περιοχή με ένα άτομο μολυβδαινίου, δύο περιοχές που η καθεμία έχει το σύμπλεγμα $Fe_2:S_2$ και μία ακόμα περιοχή, η οποία περιέχει ένα μόριο φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (FAD) (40).

Η κατανομή της αλδεϋδικής οξειδάσης στους ιστούς βρέθηκε με τη χρήση ορισμένων υποστρωμάτων όπως η μεθοτρεξάτη και η βανιλίνη ενώ της ξανθικής οξειδάσης βρέθηκε με τη βοήθεια ενός μόνο αλλά πολύ καλού υποστρώματος, της ξανθίνης. Έτσι, η δράση της αλδεϋδικής οξειδάσης βρέθηκε έντονη στο ήπαρ με διαφορετικά ισόένζυμα στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (41) ενώ η δράση της σε άλλα όργανα συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, των νεφρών και του λεπτού εντέρου είναι κατά 50% πιο ασθενής (41,42,43). Στο κουνέλι, μετά το ήπαρ η δράση της αλδεϋδικής οξειδάσης είναι εντονότερη στους πνεύμονες (43,44). Άλλοι ιστοί που παρουσιάζουν χαμηλότερη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου είναι η καρδιά, ο εγκέφαλος, το πάγκρεας και ο στόμαχος (43,44).

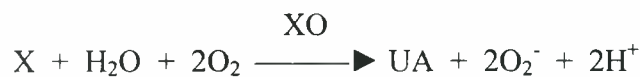
Η ξανθική οξειδάση είναι παρούσα σε υψηλά επίπεδα στο μαστικό γαλακτοπαραγωγό αδένια (43), στο λεπτό έντερο (42,44) και το ήπαρ (42). Έχει επίσης ανιχνευθεί στους νεφρούς, τους πνεύμονες, την επιδερμίδα και την καρδιά (43,45). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ύπαρξης της ξανθικής οξειδάσης στα τριχοειδή του εγκεφάλου (46) όπως και στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μακροφάγα του ποντικού και μάλιστα έχει παρατηρηθεί αύξηση στα επίπεδά της σε περιπτώσεις βακτηριακής μόλυνσης (47,48). Η ξανθική οξειδάση είναι απύσα από τον ανθρώπινο ορό αλλά παρούσα στον ορό του ποντικού, του αρουραίου και της αγελάδας (45). Εξετάστηκε επίσης και βρέθηκε ξανθική οξειδάση (49) στο γάλα της αγελάδας, της κασίικας και του προβάτου αλλά είναι απύσα από το ανθρώπινο γάλα. Τα ένζυμα του ήπατος και του γάλακτος είναι δεϋδρογονάσες εξαρτώμενες από το NAD^+ . Επιπλέον, στο ποντίκι η ξανθική οξειδάση δεν είναι παρούσα κατά τη γέννηση αλλά εμφανίζεται περίπου 3 εβδομάδες μετά. Και τα δύο ένζυμα έχουν βρεθεί στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (50).

Οι υδροξυλάσες μολυβδαινίου είναι διασπαρμένες στο ζωικό βασίλειο. Έχει βρεθεί ότι μονοκύτταροι οργανισμοί, όπως είναι τα βακτήρια, περιέχουν ξανθική οξειδάση (51) ενώ και τα δύο ένζυμα ανιχνεύθηκαν στα κοιλιοεντερικά (52). Η αλδεϋδική οξειδάση βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στο ινδικό χοιρίδιο, τον αρουραίο, το γουρούνι και το κουνέλι (53) ενώ ανιχνεύθηκε και στα έντομα και τους νεφρούς των πτηνών. Σχετικά με τα θηλαστικά, υψηλά επίπεδα ξανθικής οξειδάσης βρέθηκαν στον αρουραίο και το σκύλο, γεγονός που είναι πολύ χρήσιμο για την έρευνα καθώς φάρμακα που είναι υποστρώματα του ενζύμου μπορούν να χορηγηθούν και να μελετηθεί η δράση τους σ' αυτά τα ζώα. Η δράση και των δύο ενζύμων είναι ασθενέστερη στα ασπόνδυλα σε σχέση με τα σπονδυλωτά ενώ ανάμεσα στα τελευταία τα επίπεδά τους είναι χαμηλότερα στον άνθρωπο. Η ξανθική οξειδάση του ανθρώπινου ήπατος έχει βρεθεί ότι έχει παρόμοια ιδιαιτερότητα όσον αφορά κάποια υποστρώματα και ειδικότερα τις πουρίνες (53) σε σχέση με το ένζυμο του γάλακτος του βοδιού ενώ διαφέρουν σε σχέση με τις πυριμιδίνες.

Τόσο η αλδεϋδική όσο και η ξανθική οξειδάση καταλύουν την οξειδωση μιας μεγάλης κλίμακας πουρινών, πυριμιδινών και πτεριδινών. Έχει βρεθεί ότι τα ένζυμα

αυτά είναι περισσότερο αποτελεσματικά στο μεταβολισμό των N-ετεροκυκλικών ενώσεων (54,55). Η οξείδωση των αλδευδών συνήθως οφείλεται στην αλδεϋδική δεϋδρογονάση των μιτοχονδρίων (56,57) και η δράση της ξανθικής και της αλδεϋδικής οξειδάσης αγνοούνται. . Ωστόσο, πρόσφατα αποδείχτηκε ο σημαντικός τους ρόλος και στην οξείδωση των αρωματικών αλδευδών (55,58,59,60,61,62). Έχουν, επίσης, προστατευτικό ρόλο στον οργανισμό συμβάλλοντας στην αποτοξίνωσή του καθώς απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ (ιδιαίτερα η αλδεϋδική οξειδάση). Το καλύτερο υπόστρωμα της ξανθικής οξειδάσης είναι η ξανθίνη ενώ επίσης ικανοποιητικότατο υπόστρωμα είναι οι πουρίνες, η ακεταλδεϋδη, η πυριδινό - 2 - αλδεϋδη και η ινδολυλο - 3 - αλδεϋδη ενώ για την αλδεϋδική οξειδάση είναι οι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις και οι αρωματικές αλδεϋδες.

Επιπλέον, η ξανθική οξειδάση-με βέλτιστο pH στο 4.6-καταλύει, εκτός από την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από ξανθίνη και το σχηματισμό ουρικού οξέος από την υποξανθίνη, η οποία είναι μαζί με τη γουανίνη οι κύριες βάσεις που παράγονται κατά τη διάσπαση των νουκλεοτιδίων στα θηλαστικά. Αυτό είναι το τελευταίο βήμα στον καταβολισμό των νουκλεϊνικών οξέων. Οι αντιδράσεις αυτές φαίνονται στις εικόνες 4 και 5. Σ' αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια η αλδεϋδική οξειδάση φαίνεται πως δεν έχει ουσιαστική συμμετοχή.

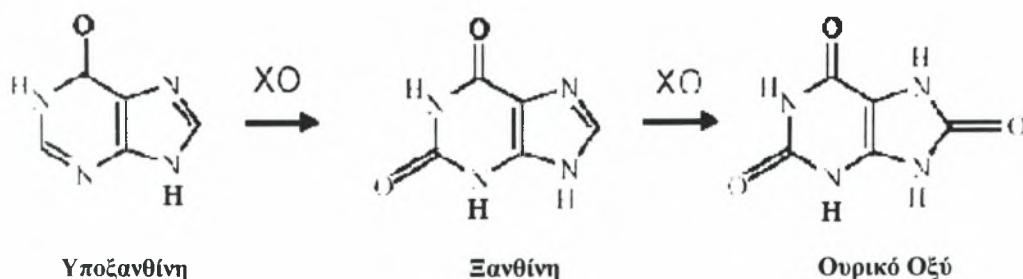


όπου: X: Ξανθίνη

X.O.: Ξανθική Οξειδάση

U.A.: Ουρικό Οξύ

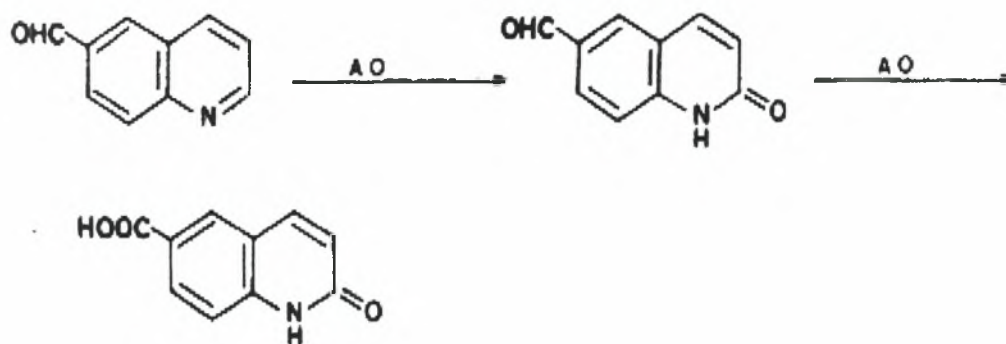
Εικόνα 4. Παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και ουρικού οξέος με την ξανθική οξειδάση ως καταλύτη



Εικόνα 5. Οξειδωτική υδροξυλίωση της Υποξανθίνης σε Ξανθίνη και τελικά σε Ουρικό Οξύ με τη δράση της Ξανθικής Οξειδάσης (XO)

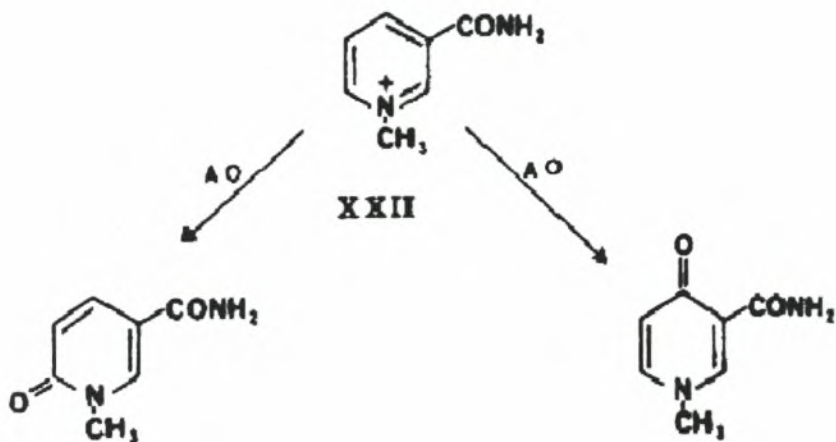
Οι αλειφατικές αλδεύδες είναι υποστρώματα των υδροξυλασών μολυβδαινίου καθώς οξειδώνονται στο αντίστοιχο οξύ και πιο συγκεκριμένα η τιμή της K_m για το ίδιο υπόστρωμα είναι χαμηλότερη κατά την οξείδωση με την αλδεϋδική παρά με την ξανθική οξειδάση (62). Η τιμή της V_{max} για την ξανθική οξειδάση μειώνεται με την αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας του υποστρώματος ενώ η K_m δεν αλλάζει πρακτικά (63,64). Όσον αφορά τις υποκατεστημένες βενζαλδεύδες, αυτές οξειδώνονται από την ξανθική οξειδάση αλλά η αντίδραση εμποδίζεται από την παρουσία ογκωδών υποκαταστατών στη θέση ortho (o) (65). Μάλιστα, όσο αυξάνεται το μέγεθος του υποκαταστάτη τόσο μειώνεται η δυνατότητα οξείδωσης του μορίου από το ένζυμο. Εξάλλου, η δραστηριότητα της ξανθικής οξειδάσης είναι σημαντικά μειωμένη στις ortho-υποκατεστημένες βενζαλδεύδες σε σχέση με τις meta- και τις para-υποκατεστημένες. Έχει βρεθεί ότι ενώ η αλδεϋδική δεϋδρογονάση (66) είναι δραστηκή για αλδεύδες πολύ μικρής αλυσίδας (έως 3 άτομα άνθρακα) η αλδεϋδική και η ξανθική οξειδάση είναι πιο ενεργές για αλδεύδες από 3-6 άτομα άνθρακα (67). Έτσι, αλδεύδες όπως η ο-χλωροβενζαλδεϋδη και η ο-νιτροβενζαλδεϋδη οξειδώνονται σε πολύ χαμηλότερους ρυθμούς απ' ότι η ίδια η βενζαλδεϋδη (64).

Μονοκυκλικές μη υποκατεστημένες ενώσεις όπως οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες αποτελούν υποστρώματα των ενζύμων. Ωστόσο, η συγγένειά τους για τα υποστρώματα είναι μεγαλύτερη όταν προστίθεται μία φαινυλομάδα, κάτι που ισχύει τόσο για την αλδεϋδική όσο και για την ξανθική οξειδάση ενώ η αλδεϋδική οξειδάση είναι πιο δραστηκή κατά την οξείδωση N-ετεροκυκλικών ενώσεων παρά αλδεϋδών. Αυτό σημαίνει ότι σε ένα μόριο που έχει το χαρακτήρα και των δύο αυτών μορίων, όπως είναι η 6-κινολινοαλδεϋδη, η οξείδωση της αλδεϋδομάδας λαμβάνει χώρα τελευταία (68). Το συγκεκριμένο παράδειγμα φαίνεται στην εικόνα 6.



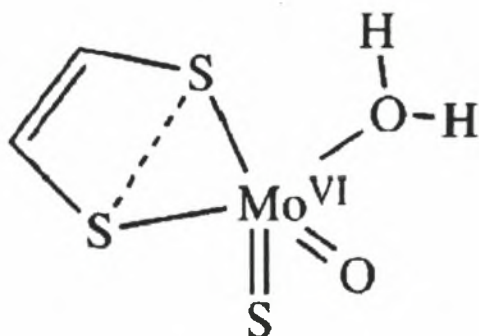
Εικόνα 6. Οξείδωση της 6-Κινολινοαλδεϋδης από την αλδεϋδική οξειδάση. Η οξείδωση της αλδεϋδομάδας γίνεται ως δεύτερο βήμα

Η ξανθική οξειδάση δεν καταλύει την οξείδωση των N-ετεροκυκλικών ενώσεων κάτω από pH 9,3 αλλά ακόμα και σε μεγαλύτερες τιμές pH δεν αποτελούν καλά υποστρώματα. Αντίθετα, η αλδεϋδική οξειδάση τα καταλύει σε ουδέτερο pH και πολλές φορές κάποια υποστρώματα οξειδώνονται σε δύο θέσεις, είτε στην ortho είτε στην para και η αναλογία των προϊόντων εξαρτάται από τη φύση του δακτυλίου και από το είδος. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η οξείδωση του N-μεθυλνικοτιναμιδίου προς δύο προϊόντα (69,70), όπως δείχνει η εικόνα 7.



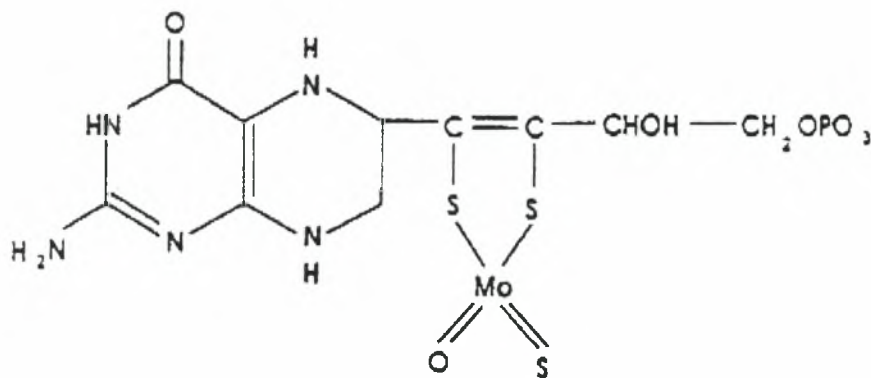
Εικόνα 7. Οξείδωση του N-μεθυλ-νικοτιναμιδίου είτε προς N-μεθυλ-2-πυριδο-5-καρβοξύ αμίδιο είτε προς N-μεθυλ-4-πυριδο-5-καρβοξύ αμίδιο

Οι υδροξυλάσες μολυβδαινίου καταλύουν την οξείδωση σε ένα άτομο άνθρακα με έλλειψη ενός ηλεκτρονίου, η οποία συμβαίνει κοντά σε ένα δακτύλιο του μορίου (π.χ. των N-ετεροκυκλικών ενώσεων) με άζωτο. Αποτελούνται από δύο ομοδιμερή που το καθένα περιέχει ένα σύμπλεγμα σιδήρου-θείου, $2\text{Fe}:2\text{S}$ και μία περιοχή ενός συμπράγοντα. Αυτός αποτελείται από ένα άτομο Mo^{+6} ενωμένο με πτερίνη, σχηματίζοντας τη μολυβδοπτερίνη. Επίσης, υπάρχει και μία άλλη περιοχή με συνδεδεμένο ένα μόριο φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (FAD). Τελικά, κάθε μονομερές έχει μοριακό βάρος περίπου 150.000. Η εικόνα 8 δείχνει τη δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου.



Εικόνα 8. Δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου με την πτερίνη, το μολυβδαίνιο και τα άτομα του θείου

Έχει προταθεί ότι η πτερίνη, ως συστατικό του συμπράγοντα, παίζει ρόλο στη διαμόρφωση οξείδωσης και αναγωγής του μολυβδαινίου κατά την αντίδραση της κατάλυσης (71,72). Έτσι, ο συμπράγοντας αποτελείται από την πτερίνη και το μολυβδαίνιο όπως φαίνεται στην εικόνα 9.



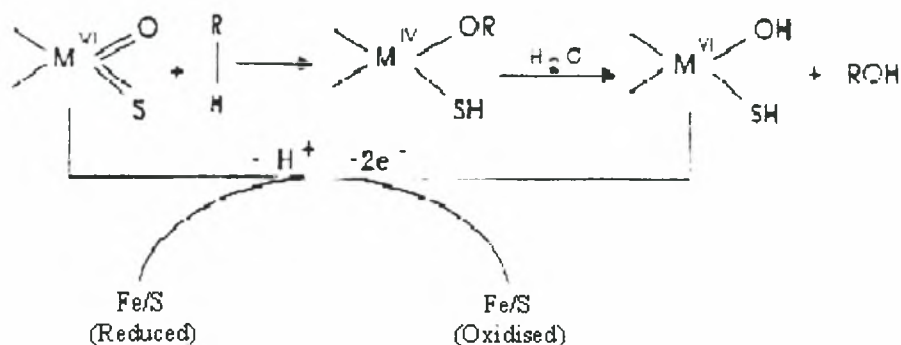
Εικόνα 9. Η δομή του συμπράγοντα με το μολυβδαίνιο

Το σύμπλοκο Fe/S φαίνεται ότι αποτελεί μία πηγή ηλεκτρονίων κατά τις αντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής. Η απομάκρυνση του μορίου του FAD τόσο από την ξανθική (73) όσο και από την αλδεϋδική οξειδάση (74) έδειξε ότι τα ένζυμα έχασαν την αναγωγική τους δραστηριότητα γεγονός που σημαίνει ότι αποτελεί την προσθετική ομάδα του ενζύμου που είναι υπεύθυνη για την αντίδραση με το οξυγόνο. Η αντίδραση με το οξυγόνο εμφανίζεται σε δύο διαφορετικές φάσεις. Στην πρώτη, που χαρακτηρίζεται από ταχεία οξείδωση, απομακρύνονται 5 από τα 6 ηλεκτρόνια του οξυγόνου για κάθε FADH₂. Στη δεύτερη, την αργή φάση απομακρύνεται και το εναπομείναν ηλεκτρόνιο. Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης παρατηρείται μία μεταφορά 2 ηλεκτρονίων προς το σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου ενώ στην αργή φάση οξειδώνεται το FADH και παράγονται ανιόντα υπεροξειδίου (73,75). Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται φαίνονται πιο κάτω.



Ο μηχανισμός δράσης των υδροξυλασών μολυβδαινίου έχει μελετηθεί λεπτομερέστερα με την ξανθική οξειδάση. Αφού όμως τα δύο ένζυμα είναι παρόμοια στη δομή, το πιο πιθανό είναι ότι η ξανθική και η αλδεϋδική οξειδάση έχουν τον ίδιο καταλυτικό μηχανισμό. Το υπόστρωμα αλληλεπιδρά με το κέντρο του μολυβδαινίου και μεταφέρονται δύο ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα προς το Mo⁺⁶, το οποίο ανάγουν σε Mo⁺⁴. Κατόπιν, το μόριο που δρα ως υπόστρωμα μεταφέρεται μέσω ενός διαμοριακού μεταφορέα ηλεκτρονίων στο φλαβινικό κέντρο, όπου αντιδρά με O₂ και παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η υδρόλυση του συμπλόκου μολυβδαίνιο-υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο ηλεκτρονίων. Αυτά διανέμονται στα οξειδοαναγωγικά κέντρα του ενζύμου, δηλαδή στο σύμπλοκο Fe/S. Το μολυβδαίνιο οξειδώνεται ξανά μέσω ενδοκυτταρικής μεταφοράς ηλεκτρονίων (76). Παρατηρούνται δηλαδή δύο ξεχωριστές υποαντιδράσεις. Η πρώτη είναι η οξείδωση του δότη των ηλεκτρονίων με ταυτόχρονη αναγωγή του ενζύμου και η άλλη

είναι η επανοξειδωση του ενζύμου με τη βοήθεια ενός δέκτη ηλεκτρονίων. Ο καταλυτικός αυτός μηχανισμός φαίνεται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10. Ο καταλυτικός μηχανισμός των υδροξυλασών μολυβδαινίου

Η μόνη διαφορά που παρατηρείται στον καταλυτικό μηχανισμό των δύο αυτών ενζύμων έγκειται στο ότι ενώ η ξανθική οξειδάση χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο κατά τη δεύτερη υποαντίδραση της επανοξειδωσής της, η αλδεϋδική οξειδάση χρησιμοποιεί NAD^+ . Έχουν παρατηρηθεί και εξεταστεί διαφορετικοί τεχνητοί δέκτες ηλεκτρονίων, οι οποίοι δρουν σε διαφορετικά σημεία του ενζύμου (77). Μεταξύ αυτών είναι το μοριακό οξυγόνο, η 2,6-διχλωροφαινολινδο-φαινόλη (DCIP), η οποία παίζει το ρόλο υποστρώματος που μπορεί να οξειδωθεί στο μολυβδαινικό κέντρο και το σιδηροκυανιούχο κάλιο, που δρα στο κέντρο Fe/S (78). *In vivo* η επανοξειδωση της αλδεϋδικής και της ξανθικής οξειδάσης γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης του FAD με οξυγόνο ή NAD^+ αντίστοιχα. Αν δεν παρατηρηθεί αυτή η αλληλεπίδραση, τότε το οξυγόνο μπορεί να μετατραπεί σε τεχνητό δότη ηλεκτρονίων για την αλδεϋδική οξειδάση και το σιδηροκυανιούχο κάλιο για την ξανθική οξειδάση.

Υπάρχουν μόρια, τα οποία μπορούν με διάφορους μηχανισμούς να αναστείλουν τη δράση της αλδεϋδικής και της ξανθικής οξειδάσης. Αυτό μπορεί να γίνει αν μπλοκαριστεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κέντρο του μολυβδαινίου στο σύμπλοκο Fe/S, τρόπος με τον οποίο δρουν οι κίνονες (μεναδιόνη, βενζοκινόνη) αναστέλλοντας την προερχόμενη από το ήπαρ κουνελιού (79) αλδεϋδική οξειδάση. Ωστόσο, η μεναδιόνη δεν αναστέλλει τη δράση της ξανθικής οξειδάσης. Επιπλέον, στεροειδή όπως η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη μπλοκάρουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των οξειδοαναγωγικών ομάδων της αλδεϋδικής οξειδάσης. Άλλοι αναστολείς των υδροξυλασών μολυβδαινίου δρουν στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, είτε αναστέλλοντας την πρόσδεση του υποστρώματος συναγωνιστικά είτε τροποποιώντας χημικά το κέντρο του μολυβδαινίου. Το αρσενικό είναι ένα στοιχείο που μπορεί να αναστείλει την ξανθική οξειδάση με τρόπο μη αντιστρεπτό και την αλδεϋδική οξειδάση αντιστρεπτά (80) αντιδρώντας με το θείο του μορίου.

Η μεθανόλη και η φορμαλδεϋδη σε υψηλές συγκεντρώσεις (πάνω από 1,5M) προάγουν μία σταδιακή μείωση στον ενζυμικό ρυθμό οξείδωσης από ξανθική οξειδάση του γάλακτος και ηπατική αλδεϋδική οξειδάση. Αυτή η αναστολή

πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ενός πρωτονίου, που δεν προορίζεται για μεταφορά, με το κέντρο του μολυβδαινίου του ενζύμου (81). Η ηπατική αλδεϋδική οξειδάση αναστέλλεται επίσης συναγωνιστικά *in vitro* από νευροδιαβιβαστές όπως η σεροτονίνη και η νοραδρεναλίνη (82) ενώ το προϊόν της οξείδωσης της φθαλαζίνης, η 1-φθαλαζινόνη, αποτελεί αναστολέα τόσο της ηπατικής αλδεϋδικής οξειδάσης από κουνέλι όσο και της ξανθικής οξειδάσης προερχόμενης από γάλα βοδιού (83). Οι πουρίνες είναι (σε αντίθεση με την ξανθική οξειδάση) αναστολείς της αλδεϋδικής οξειδάσης σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλώντας υπερβολική αναγωγή του ενζύμου Mo^{+3} και ελάττωση του ρυθμού οξείδωσης (84). Έχει παρατηρηθεί ανασταλτική δράση προκαλούμενη και από την ισοβανιλίνη (3-υδροξυ-4-μεθοξυβενζαλδεϋδη) και την πρωτοκατεχική αλδεϋδη (3,4-διυδροξυβενζαλδεϋδη) και μάλιστα είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της οξείδωσης της 2-υδροξυβενζαλδεϋδης από την αλδεϋδική οξειδάση (58,59).

1.3. Πολυφαινόλες

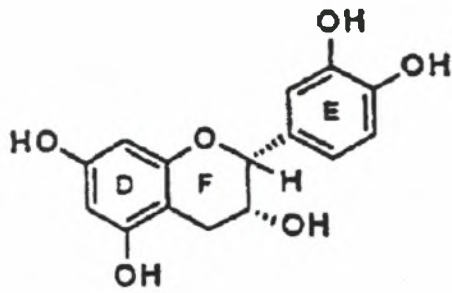
Οι φαινόλες (υδροξυβενζένια) και κυρίως οι πολυφαινόλες, μόρια που περιέχουν δύο ή περισσότερες φαινολικές ομάδες, είναι ευρέως κατανεμημένες στο φυτικό βασίλειο. Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και πολλές φορές είναι συνδεδεμένες με πολυσακχαρίτες ώστε να μπορούν να είναι υδατοδιαλυτές. Έχουν βρεθεί πάνω από 8000 πολυφαινολικές δομές στο μεταβολισμό των φυτών, από μόρια με 1 δακτύλιο (φαινόλη) έως μόρια πολύπλοκης δομής, όπως είναι οι τανίνες (85,86). Οι πολυφαινόλες μπορούν να διαιρεθούν σε 10 τουλάχιστον κατηγορίες. Κάποιες από αυτές φαίνονται στον πίνακα 1.

Κατηγορία πολυφαινολών	Παράδειγμα
Φαινολικά οξέα	Γαλλικό οξύ, Τανικό οξύ, Βανιλικό οξύ
Υδροξυκιναμικά οξέα	Φερουλικό οξύ, Καφεϊκό οξύ, p-Κουμαρικό οξύ
Κουμαρίνες – Ισοκουμαρίνες	Σκοπολετίνη
Στιλβένια	Ρεσβερατρόλη
Ανθρακινόνες	-
Φλαβονοειδή	Ρουτίνη, Κερκετίνη
Διαρυλεπτάνες	Κουρκουμίνη
Λιγνάνες - Νεολιγνάνες	-
Λιγνίνες	-

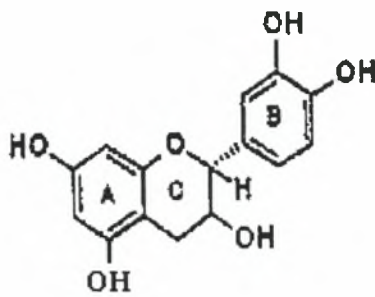
Πίνακας 1. Κατηγορίες Πολυφαινολών και ορισμένα παραδείγματα σε κάποιες απ' αυτές

Παρά το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες δε φαίνεται να παίζουν ρόλο στη θρέψη, ωστόσο πολλές από αυτές έχουν πολύ χρήσιμες ιδιότητες. Μπορεί να εμφανίζονται ως αντιοξειδωτικά, αντιμεταλλαξιγόνα, αντικαρκινογόνα και αντιφλεγμονώδη παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αποφυγή ασθενειών και την προστασία της σταθερότητας του γενώματος. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι ορισμένες δεν έχουν μεταλλαξιγόνες ιδιότητες κι ότι δεν παρεμβάλλονται σε σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες (δραστηριότητα των τοποϊσομερασών) μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται και να κατακρημνίζουν πρωτεΐνες και υδρογονάνθρακες μειώνοντας την ικανότητα της πέψης των τροφών (87).

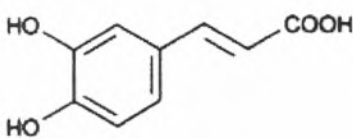
Στην εικόνα 11 απεικονίζονται οι χημικές δομές των πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν.



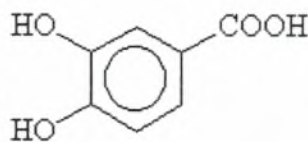
Επικατεκίνη



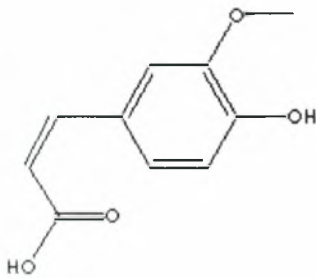
Κατεκίνη



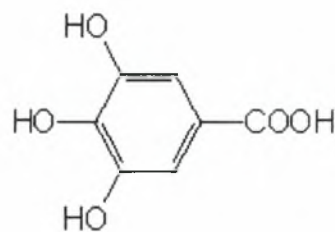
Καφεϊκό Οξύ



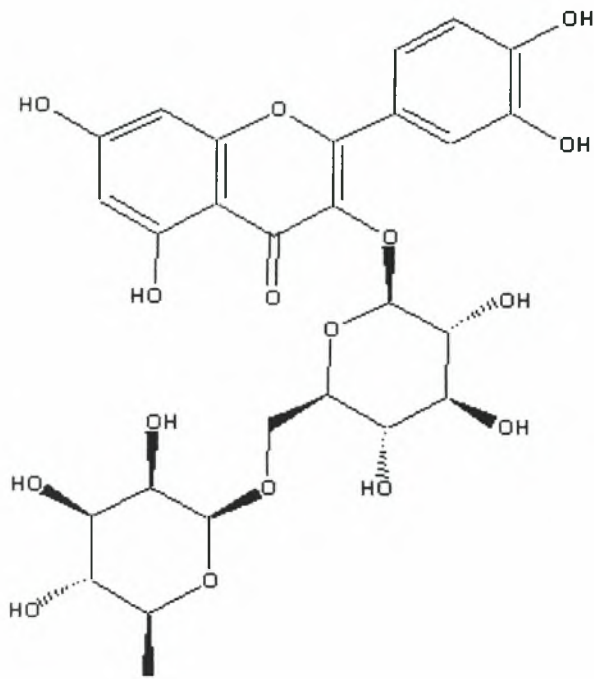
Πρωτοκαχεϊκό Οξύ



Φερουλικό Οξύ



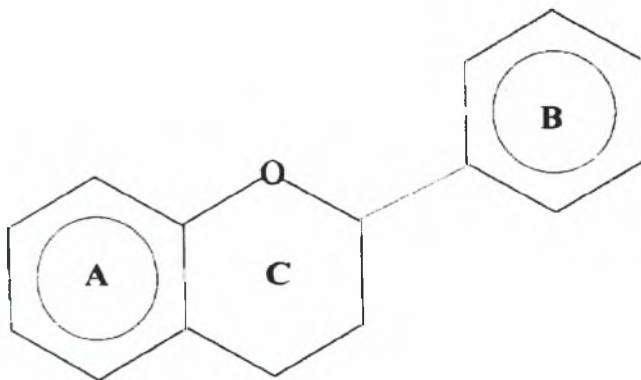
Γαλλικό Οξύ



Ρουτίνη

Εικόνα 11. Οι χημικές δομές των πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν.

Η μεγαλύτερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, η κύρια ομάδα χρωστικών που απαντώνται στα φυτά. Η κατηγορία αυτή περιέχει πάνω από 5000 γνωστά μόρια ενώ μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τα ισοφλαβονοειδή, τις κατεκίνες, τις ισοφλαβόνες, τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβανόνες. Επειδή οι ισοφλαβόνες και κάποιες άλλες πολυφαινόλες έχουν συγγένεια για τον υποδοχέα οιστρογόνου, συχνά αναφέρονται ως φυτοοιστρογόνα. Στην εικόνα 12 φαίνεται η βασική δομή των φλαβονοειδών.



Εικόνα 12. Βασική δομή των φλαβονοειδών

Οι πολυφαινόλες στο πλαίσιο των αντιμεταλλαξιγόνων ιδιοτήτων τους εμποδίζουν τη νιτροσυλίωση και την παραγωγή μορίων με άζωτο, τα οποία έχουν καρκινογόνο δράση μετά από πειράματα που έγιναν σε ζώα ενώ είναι πιθανόν καρκινογόνα και για τον άνθρωπο (88). Τα νιτρώδη και τα νιτρικά είναι μόρια που προάγουν το σχηματισμού τέτοιων μορίων, αντίδραση που συμβαίνει σε συνθήκες χαμηλού pH στο στόμαχο. Συγκεκριμένες πολυφαινόλες σε ικανές συγκεντρώσεις, όπως η κερκετίνη, η κατεκίνη και άλλες, αλλά όχι το φερουλικό και το καφεϊκό οξύ, έχουν την ικανότητα να καταλύουν αυτή την αντίδραση σχηματισμού νιτροσυλιωμένων μορίων σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές του ανθρώπινου στομάχου (89).

Σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες, είναι δεδομένο ότι μπορούν να προκαλέσουν βλάβες όχι μόνο στο DNA αλλά και στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Πολλές πολυφαινόλες θεωρούνται αντιοξειδωτικά. Προστασία από την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) ισοδυναμεί με προστασία από καρδιακές ασθένειες ενώ η αναστολή της οξειδωτικής καταστροφής του DNA μπορεί να αποβεί καθοριστική για την αποφυγή καρκινογένεσης και γενωμικής αστάθειας γενικότερα. Μελέτες έδειξαν ότι υψηλή κατανάλωση πολυφαινόλων οδήγησε σε μειωμένη εμφάνιση καρδιοαγγειακών παθήσεων (90,91) και καρκίνου (92,93). Προφανώς αυτή η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινόλων σχετίζεται με την καταστροφή των ελεύθερων ριζών ενώ συγκεκριμένες πολυφαινόλες προάγουν τη δράση ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού (τρανσφεράση της γλουταθειόνης) και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνουν το μεταβολισμό και την απέκκριση των ριζών. Επιπλέον, μπορούν να αναστείλουν τη δράση του κυτοχρώματος P450 ή άλλων ενζύμων, όπως η κυκλοξυγενάση και η λιποξεγενάση με οξειδωτική δράση. Ένζυμα, που κατά τη δράση τους παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι και η ξανθική οξειδάση και η πρωτεϊνική κινάση C. Οι πολυφαινόλες αναστέλλουν και αυτά τα ένζυμα προστατεύοντας τον οργανισμό από οξειδωτικό στρες. Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με το ότι δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες μετατρέποντάς τις σε σταθερά μόρια, όπως φαίνεται πιο κάτω.



όπου: RO η ελεύθερη ρίζα
 PPH η πολυφαινόλη
 ROH το σταθερό προϊόν της ρίζας
 PP η ρίζα από την πολυφαινόλη

Η ρίζα της πολυφαινόλης είναι σχετικά σταθερό μόριο και μπορεί να αντιδράσει και με άλλες ελεύθερες ρίζες.



όπου: ROPP το σταθερό προϊόν μετά τη δράση της πολυφαινόλης

Ωστόσο, σε υψηλές δόσεις οι πολυφαινόλες μπορούν να παίξουν το ρόλο οξειδωτικών τόσο για πρωτεΐνες όσο και για λιπίδια (93). Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να έχει και η παρουσία του NO (94). Έχουν παρατηρηθεί ρίζες συγκεκριμένων πολυφαινόλων-η κερκετίνη είναι μία από αυτές-οι οποίες προκάλεσαν κοψίματα στις αλυσίδες του DNA σε πυρήνες ηπατικών κυττάρων αρουραίου (95). Ενδοκυτταρικά αναγωγικά, όπως οιθειόλες, μπορούν να μειώσουν τις ρίζες που παράγονται από τις

φαινόλες και έτσι να τους επιτρέψουν να συνεχίσουν την αντιοξειδωτική τους δράση (90).

Η αυξημένη παραγωγή NO σε φλεγμονώδεις καταστάσεις οδηγεί σε παραγωγή υπεροξειδίου του αζώτου, που είναι πηγή οξειδωτικής καταστροφής του DNA και των λιποπρωτεϊνών, αλλά και αλδευδών και εποξειδίων. Με αυτό τον τρόπο η χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε αστάθεια του γενώματος. Πολλές πολυφαινόλες έχουν καθοριστική συμμετοχή στη δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (96). Μπορούν δηλαδή να αναστείλουν την επικοινωνία και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ενώ μερικές φορές επιδρούν απευθείας με κυτοκίνες ή υποδοχείς κυτοκινών. Επιπλέον, συμμετέχουν στο μονοπάτι σύνθεσης του NO αναστέλλοντας τη συνθάση του NO (97).

Οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι παίζουν σπουδαίο ρόλο και στην πρόκληση της απόπτωσης, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου προκειμένου ελαττωματικά κύτταρα να μη δώσουν απογόνους και να προστατευτεί ο οργανισμός από γενωμική αστάθεια και να μην οι επιβιώσουν μεταλλάξεις που δημιουργούνται (98). Σε πολυφαινόλες που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι σε ορισμένες συγκεντρώσεις προάγουν την απόπτωση, όπως έγινε με την κερκετίνη και άλλα φλαβονοειδή. Αυτά προκάλεσαν αναστολή της αύξησης και κυτταρικό θάνατο σε συγκεντρώσεις 1-100mM σε καλλιέργειες από κύτταρα με όγκο. Η δράση των φλαβονοειδών βασίζεται στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα με τη δράση της προκασπάσης-9 και της κασπάσης-3 (99). Η δυναμική των φλαβονοειδών στην πρόκληση της απόπτωσης εξαρτάται από την παρουσία υδροξυλομάδων στο δεύτερο φαινυλικό δακτύλιο. Ωστόσο, δεν εξαρτάται μόνο από τη δομή αλλά και από τα κύτταρα στα οποία στοχεύουν.

Μία μεγάλη ποικιλία πολυφαινολών μπορούν, επιπλέον, να επιδράσουν με τον υποδοχέα των οιστρογόνων και να προκαλέσουν την έκφραση γονιδίων παρόμοιων μ' αυτά των οιστρογόνων αλλά σε μικρότερο βαθμό. Τέτοιοι παράγοντες είναι πολύ χρήσιμοι σε περιπτώσεις βελτίωσης της γονιμότητας ή / και προστασίας των γυναικών από τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης (100) καθώς και από ορμονικούς καρκίνους, όπως αυτός του στήθους ή του προστάτη (101). Στα τρωκτικά και τον άνθρωπο ο υποδοχέας οιστρογόνων υπάρχει σε δύο τύπους, τον α και τον β. Πολλά φυτοοιστρογόνα δεσμεύονται πιο ισχυρά στο β παρά στον α. Πολυφαινόλες, όπως το φερουλικό και το p-κουμαρικό οξύ έχουν οιστρογονική δράση ενώ το γεγονός ότι η ρεσβερατρόλη είναι ένας αγωνιστής για τον υποδοχέα οιστρογόνου εξηγεί την προστατευτική δράση του κόκκινου κρασιού, του οποίου είναι συστατικό για καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο (102). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι παράγοντες που δρουν σαν οιστρογόνα σε ένα είδος, σε κάποιο άλλο μπορεί να εμφανίζουν αντιοιστρογονική δράση (103).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα παρακάτω υλικά, χημικά και βιολογικά, αποκτήθηκαν από τις ακόλουθες εταιρείες.

2.1.1. Χημικά

SIGMA-ALDRICH CO St Louis MO USA

Κατεκίνη, 98%
Επικατεκίνη
Σιδηροκυανιούχο κάλιο (III), Περίπου 99%
Κερκετίνη
Ρουτίνη
Ξανθίνη 99-100%

MERCK Schuchardt OHG, Germany

3-Υδροξυ 4-Μεθοξυβενζαλδεΰδη (Ισοβανιλίνη)
2-Μεθυλβενζαλδεΰδη
3-Μεθυλβενζαλδεΰδη
4-Μεθυλβενζαλδεΰδη
2-Νιτροβενζαλδεΰδη
3-Νιτροβενζαλδεΰδη
4-Νιτροβενζαλδεΰδη

MERCK Darmstadt, Germany

Χλωριούχο κάλιο (KCl)
Ένυδρο όξινο φωσφορικό δινάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)

PANREAC QUIMICA SA, Barcelona, Espana

Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)

RIEDEL de Haen, Germany

Θειικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

2.1.2. Βιολογικά

SIGMA-ALDRICH CO St Louis MO USA

Ξανθική Οξειδάση από γάλα βοδιού, 25 μονάδες 0,8 ml, 57mg πρωτεΐνης/ml διαλυμένη σε 2,3M (NH₄)₂SO₄ και 1mM σαλικυλικό νάτριο.

Μικροβιακή Ξανθική Οξειδάση, λυοφυλιωμένη σκόνη με σταθεροποιητές αλβουμίνη από ορό βοδιού και γλουταμινικό νάτριο, 3,6mg, 7,1 μονάδες/mg.

2.2. Παρασκευή Sorenson's Phosphate Buffer (SPB)

Χρησιμοποιούνται δύο διαλύματα, KH₂PO₄ και Na₂HPO₄*2H₂O. Το διάλυμα έχει pH 7 και συγκέντρωση 0,067M, όση είναι και η συγκέντρωση των δύο διαλυμάτων από τα οποία αποτελείται. Αρχικά διαλύονται 11,84g Na₂HPO₄*2H₂O σε 500ml νερού και 9,08g KH₂PO₄ επίσης σε 500ml νερού. Το πρώτο διάλυμα τοποθετείται στο πεχάμετρο και προστίθεται σιγά σιγά το δεύτερο μέχρι το pH φτάσει το 7. Στο τέλος προστίθενται 37,8mg EDTA συγκέντρωσης 10⁻⁴.

Επώαση των δύο ενζύμων (ξανθική και αλδεϋδική οξειδάση) σε buffer που στερούνταν μεταλλικών δακτυλίων οδήγησε σε απενεργοποίησή τους. Η προσθήκη EDTA στο buffer αυτό που χρησιμοποιήθηκε τα προστατεύει από την αδρανοποίηση.

2.3. Προετοιμασία για την απομόνωση Αλδεϋδικής Οξειδάσης

Φτιάχτηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

Χλωριούχο Κάλιο (KCl) 1,15% w/v, 100ml
Θεικό Αμμώνιο (NH₄)₂SO₄ (35,3g / 100ml)
EDTA 10⁻⁴M

2.3.1. Πρωτόκολλο Απομόνωσης Αλδεϋδικής Οξειδάσης από ινδικό χοιρίδιο.

Το ινδικό χοιρίδιο θανατώθηκε με μετατόπιση του αυχένα. Το ήπαρ του αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε λίγο KCl. Αφού καθαρίστηκε από υπολείμματα ιστών ζυγίστηκε και το βάρος του ήταν 24,80g. Αμέσως τοποθετήθηκε σε δοχείο με 85ml KCl και κόπηκε σε πολύ μικρά κομμάτια.

Ακολούθησε ομογενοποίηση, θέρμανση του προϊόντος σε υδατόλουτρο στους 55°C για 11min, όπου καταστράφηκαν οι πρωτεάσες, και φυγοκέντρωση στα 15000 x g στους 4°C για 45min. Το υπερκείμενο ζυγίστηκε και είχε όγκο 65ml. Σ' αυτό προστέθηκαν 22,95g θεικού αμμωνίου (35,3g / 100ml) και φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 6000 x g στους 4°C για 20min. Το υπερκείμενο χύθηκε το ίζημα διαλύθηκε με 5ml EDTA. Τελικά, το ένζυμο που απομονώθηκε χωρίστηκε σε 31 σωληνάκια erpendorf, που το καθένα περιείχε 300μl και τοποθετήθηκε στο ψυγείο.

Πίνακας 2. Σχηματική παράσταση της απομόνωσης Αλδευδικής Οξειδάσης από ινδικό γοιρίδιο

- Αφαίρεση του ήπατος του αρουραίου
- Τοποθέτησή του σε δοχείο με λίγο KCL
- Καθαρισμός του από υπολείμματα ιστών και ζύγισμα (24,80g)
- Τοποθέτησή του σε δοχείο με 85ml KCL
- Τεμαχισμός του σε πολύ μικρά κομμάτια
- Ομογενοποίηση
- Θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 55°C για 11min
- Φυγοκέντρηση στα 15000 x g στους 4°C για 45min
- Ζύγισμα του υπερκείμενου (65ml)
- Προσθήκη 22,95g θειικού αμμωνίου (35,3g / 100ml)
- Φυγοκέντρηση στα 6000 x g στους 4°C για 20min
- Το υπερκείμενο χύθηκε και το ίζημα διαλύθηκε με 5ml EDTA
- Το ένζυμο διατηρήθηκε σε σωληνάκια erppendorf στους -18 °C

2.4. Έλεγχος της δράσης των ενζύμων με τη βοήθεια υποστρωμάτων

2.4.1. Έλεγχος της δράσης της Αλδεϋδικής Οξειδάσης με χρησιμοποίηση των 2-, 3-, 4-Νιτροβενζαλδεϋδη και 2-, 3-, 4-Μεθυλβενζαλδεϋδη ως υποστρωμάτων.

Η μέτρηση έγινε στα 420nm με τις ακόλουθες συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Σιδηροκυανιούχο κάλιο 1mM

2000μl Sorenson's Phosphate Buffer

500μl Αλδεϋδη από κάθε αραιώση (υπόστρωμα)

Κυβέττα Αναφοράς (των 3ml)

500μl Σιδηροκυανιούχο κάλιο

1900μl Sorenson's Phosphate Buffer

500μl Αλδεϋδη από κάθε αραιώση (υπόστρωμα)

100μl Αλδεϋδική Οξειδάση

- Για τη μέτρησή τους φτιάχτηκε αρχικά ένα διάλυμα αλδεϋδης 6mM, το οποίο στην κυβέττα ήταν συγκέντρωσης 1mM και αραιώθηκε. Για τις Μεθυλβενζαλδεϋδες έγιναν οι αραιώσεις: 1προς5, 1προς7,5, 1προς10, 1προς15, 1προς20, 1προς25, 1προς50 και 1προς80. για τις 2-,3-Νιτροβενζαλδεϋδες έγιναν οι αραιώσεις 1προς5, 1προς10, 1προς15, 1προς20, 1προς30 και 1προς50 ενώ για την 4-Νιτροβενζαλδεϋδη έγινε επιπλέον η αραιώση 1προς40 με το αρχικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 3mM και στην κυβέττα 0,5mM.

2.4.2. Έλεγχος της δράσης της Ξανθικής Οξειδάσης με χρησιμοποίηση των 2-, 3-, 4-Νιτροβενζαλδεϋδη και 2-, 3-, 4-Μεθυλβενζαλδεϋδη ως υποστρωμάτων.

Η μέτρηση έγινε στα 420nm με τις ακόλουθες συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Σιδηροκυανιούχο κάλιο 1mM

2000μl Sorenson's Phosphate Buffer

500μl Αλδεϋδη από κάθε αραιώση (υπόστρωμα)

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Σιδηροκυανιούχο κάλιο 1mM

1900μl Sorenson's Phosphate Buffer

500μl Αλδεϋδη (υπόστρωμα)

100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

Η ποσότητα της ξανθικής οξειδάσης στην κυβέττα υπολογίστηκε στα 2,28mg.

- Για τις Μεθυλβενζαλδεϋδες και για τις 2-,3-Νιτροβενζαλδεϋδες φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 6mM με συγκέντρωση στην κυβέττα 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς5, 1προς10, 1προς15, 1προς20, 1προς25, 1προς30 και 1προς50. Για την 4-Νιτροβενζαλδεϋδη φτιάχτηκε διάλυμα με αρχική συγκέντρωση 3mM, που είχε συγκέντρωση στην κυβέττα 0,5mM

Η κυβέττα αναφοράς έμενε στο φασματοφωτόμετρο για 5λεπτά και σημειωνόταν η πρόοδος της αντίδρασης κάθε 15 δευτερόλεπτα. Ο χρόνος μηδέν ήταν τη στιγμή που έμπαινε το ένζυμο στην κυβέττα. Η ίδια μέθοδος διατηρήθηκε στις μετρήσεις και με τα δύο ένζυμα.

2.4.3. Έλεγχος της δράσης της ξανθικής οξειδάσης που προέρχεται από το γάλα βοδιού χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως υπόστρωμα.

Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις ακόλουθες συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Ξανθίνη από κάθε αραιώση (υπόστρωμα)

2500μl Sorenson's Phosphate Buffer

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Ξανθίνη (υπόστρωμα)

2400μl Sorenson's Phosphate Buffer

100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα ξανθίνης συγκέντρωσης 6mM με συγκέντρωση στην κυβέττα 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς5, 1προς7,5, 1προς10, 1προς15, 1προς20, 1προς25, 1προς30, 1προς40, 1προς50, 1προς75 και 1προς100.

2.4.4. Έλεγχος της δράσης της μικροβιακής ξανθικής οξειδάσης χρησιμοποιώντας την ξανθίνη ως υπόστρωμα.

Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις ακόλουθες συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Ξανθίνη από κάθε αραιώση (υπόστρωμα)

2500μl Sorenson's Phosphate Buffer

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Ξανθίνη (υπόστρωμα)

2450μl Sorenson's Phosphate Buffer

50μl Μικροβιακή Ξανθική Οξειδάση

(Η μικροβιακή ξανθική οξειδάση ήταν σε στερεή μορφή και διαλύθηκε σε 0,5ml EDTA 1mM). Η ποσότητα του ενζύμου στην κυβέττα υπολογίστηκε στα 0,36mg.

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα ξανθίνης συγκέντρωσης 6mM με συγκέντρωση στην κυβέττα 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς7,5, 1προς15, 1προς20, 1προς25, 1προς30 και 1προς40.

Η μέτρηση έγινε όπως αναφέρεται ανωτέρω.

2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

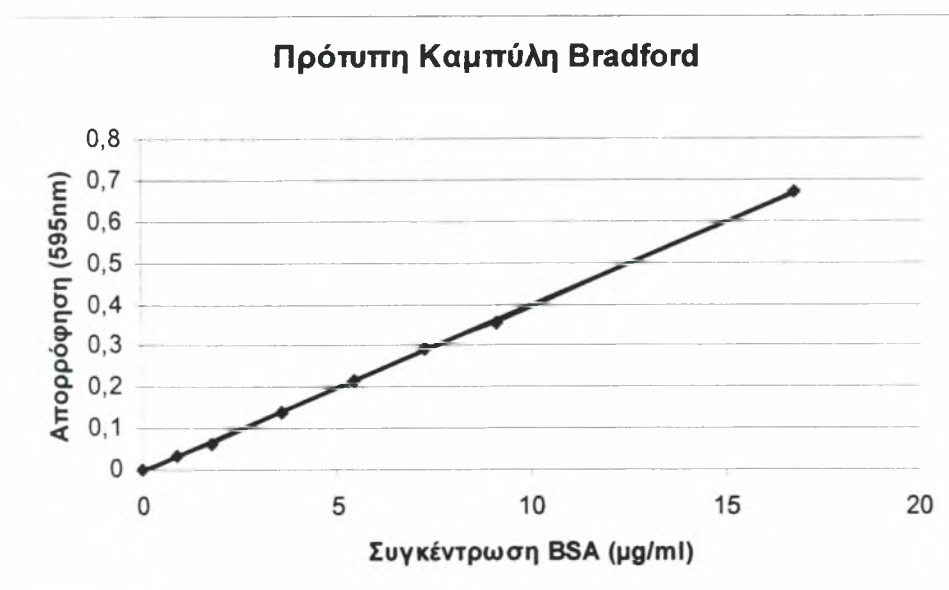
Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί το ποσοστό της αλδεϋδικής οξειδάσης που υπάρχει στο ένζυμο, το οποίο απομονώθηκε από το ινδικό χοιρίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν 7 σωληνάκια erpendorf καθένα από τα οποία περιείχε αλβουμίνη από τον ορό βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA) συγκέντρωσης 0,1 μg/μl, νερό και αντιδραστήριο Bradford. Τρία ακόμα σωληνάκια δεν είχαν BSA αλλά περιείχαν αντί γι' αυτή αλδεϋδική οξειδάση σε 3 διαφορετικές αραιώσεις (1προς120, 1προς150 και 1προς200). Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 595nm. Οι αραιώσεις του ενζύμου έγιναν μέχρι να μετρηθεί απορρόφηση ανάμεσα στα όρια των 7 πρώτων erpendorfs. Τελικά η απορρόφηση του διαλύματος που περιείχε το ένζυμο σε αραιώση 1προς200 βρέθηκε 0.638.

Ο πίνακας 4 δείχνει το πρωτόκολλο της μεθόδου.

Eppendorf	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA (μl)	0	10	20	40	60	80	100	200	-	-	-
H ₂ O (μl)	100	90	80	60	40	20	0	0	0	0	0
Αντιδραστήριο Bradford (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Αλδεϋδική Οξειδάση (μl)	-	-	-	-	-	-	-	-	100 (1/1 20)	100 (1/1 50)	100 (1/2 00)

Πίνακας 3. Πρωτόκολλο της μεθόδου Bradford

Η εικόνα 11 δείχνει μία πρότυπη καμπύλη που προέκυψε. Στον άξονα των τετμημένων τοποθετείται η συγκέντρωση της BSA στην κάθε κυβέττα σε μg/μl ενώ στον άξονα των τεταγμένων η απορρόφηση που έδειξαν τα διαλύματα κατά τη φωτομέτρησή τους.



Εικόνα 13. Πρότυπη καμπύλη της μεθόδου Bradford

2.6. Υπολογισμός κινητικών σταθερών για την οξείδωση των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών από την ξανθική και αλδεϋδική οξειδάση.

Ο ρυθμός οξείδωσης των διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος μετρήθηκε ανά 15 δευτερόλεπτα για 5 συνολικά λεπτά με μία συγκεκριμένη συγκέντρωση των ενζύμων. Με τη βοήθεια της παρακάτω εξίσωσης υπολογίστηκε η τιμή της ταχύτητας. Όσον αφορά τη μοριακή απορροφητικότητα του σιδηροκυανιούχου καλίου, ισούται με 2080 καθώς αυτή είναι η τιμή που αντιστοιχεί στην αναγωγή δύο μορίων σιδηροκυανιούχου καλίου κατά την οξείδωση ενός μορίου υποστρώματος. Οι μονάδες της ταχύτητας είναι $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

$$V = 1 \times 1000 \times \frac{\text{Όγκος της κυψελίδας (3ml)}}{\text{Μοριακή απορροφητικότητα του υποστρώματος}} \times \frac{\text{Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης / λεπτό}}{\text{Ποσότητα ενζύμου στην κυβέττα (mg)}}$$

Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$, η καμπύλη Lineweaver – Burk, $1/V$ προς $1/S$, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_m (Michaelis – Menten) και της V_{max} (Μέγιστης Ταχύτητας). Οι τιμές αυτές ισούνται με την αρνητική τιμή της γραμμής τάσης στον άξονα των x ($-1/K_m$) και τη θετική τιμή στον άξονα των y ($1/V$) αντίστοιχα κατά την προέκτασή της.

2.7. Μελέτη αναστολής από πολυφαινόλες χρησιμοποιώντας Ξανθίνη ως υπόστρωμα

2.7.1. Πρωτοκαχεϊκό οξύ

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα πρωτοκαχεϊκού οξέος συγκέντρωσης 6mM , το οποίο στην κυβέττα ήταν συγκέντρωσης 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς10 και 1προς100. Το διάλυμα της Ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση $6 \times 10^{-4}\text{M}$ και στην κυβέττα $0,1\text{mM}$. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500 μl Πρωτοκαχεϊκό οξύ
2000 μl Sorenson's Phosphate Buffer
500 μl Ξανθίνη

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500 μl Πρωτοκαχεϊκό οξύ
1900 μl Sorenson's Phosphate Buffer
500 μl Ξανθίνη
100 μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

2.7.2. Κατεκίνη

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα κατεκίνης (η οποία διαλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 5%) συγκέντρωσης 6mM, το οποίο στην κυβέττα ήταν συγκέντρωσης 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς10 και 1προς100 και 1προς1000. Το διάλυμα της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση $6 \times 10^{-4} \text{M}$ και στην κυβέττα η ξανθίνη ήταν συγκέντρωσης 0,1mM. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Κατεκίνη
2000μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Κατεκίνη
1900μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη
100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

2.7.3. Επικατεκίνη

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα επικατεκίνης (η οποία διαλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 5%) συγκέντρωσης 6mM ενώ στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς10 και 1προς100. Το διάλυμα της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση $6 \times 10^{-4} \text{M}$ και στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 0,1mM. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Επικατεκίνη
2000μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Επικατεκίνη
1900μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη
100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

2.7.4. Γαλλικό οξύ

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 6mM ενώ στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 1mM και έγινε επιπλέον η αραιώση: 1προς10. Το διάλυμα της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση $6 \times 10^{-4} \text{M}$ και στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 0,1mM. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Γαλλικό Οξύ
2000μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Γαλλικό Οξύ
1900μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη
100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

2.7.5. Καφεϊκό οξύ

• Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα καφεϊκού οξέος (το οποίο διαλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 5%) συγκέντρωσης 6mM ενώ στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς10, 1 προς100 και 1προς1000. Το διάλυμα της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση 6×10^{-4} M και στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 0,1mM. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Καφεϊκό Οξύ
2000μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Καφεϊκό Οξύ
1900μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη
100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

2.7.6. Φερουλικό οξύ

• Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα φερουλικού οξέος (το οποίο διαλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 5%) συγκέντρωσης 6mM ενώ στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς10 και 1προς100. Το διάλυμα της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση 6×10^{-4} M και στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 0,1mM. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Φερουλικό Οξύ
2000μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη

Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Φερουλικό Οξύ
1900μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη
100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

2.7.7. Ρουτίνη

- Φτιάχτηκε αρχικό διάλυμα ρουτίνης (η οποία διαλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 5%) συγκέντρωσης 6mM ενώ στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 1mM και έγιναν οι ακόλουθες αραιώσεις: 1προς10 και 1προς100. Το διάλυμα της ξανθίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση $6 \times 10^{-4} \text{M}$ και στην κυβέττα είχε συγκέντρωση 0,1mM. Η μέτρηση έγινε στα 295nm με τις παρακάτω συνθήκες.

Control (Σε κυβέττα των 3ml)

500μl Ρουτίνη
2000μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη

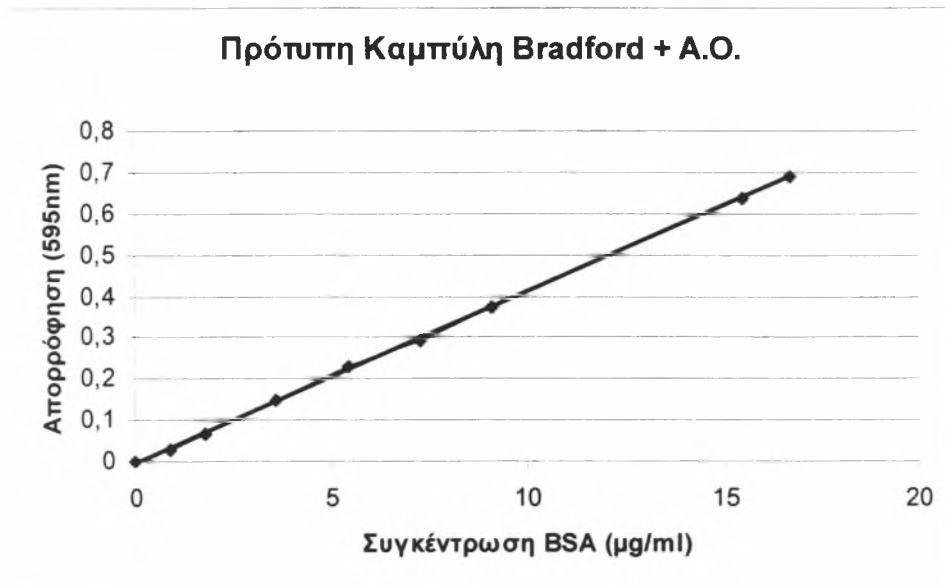
Κυβέττα Αναφοράς (Των 3ml)

500μl Ρουτίνη
1900μl Sorenson's Phosphate Buffer
500μl Ξανθίνη
100μl Ξανθική Οξειδάση αραιωμένη 1προς20

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

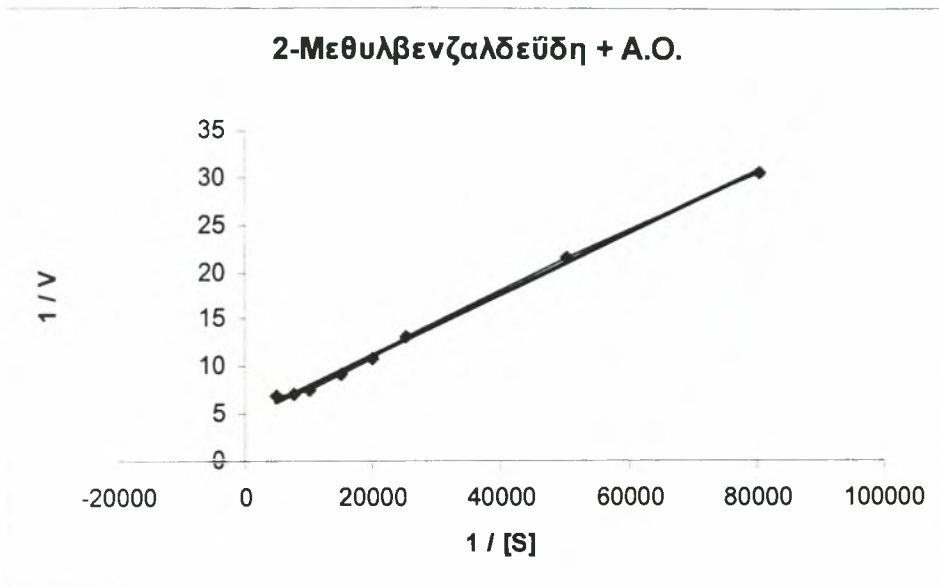
3.1. Προσδιορισμός ποσότητας ενζύμου (Αλδεϋδική Οξειδάση)

Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης Bradford βρέθηκε η ποσότητα της αλδεϋδικής οξειδάσης. Το επιπλέον δείγμα, που χρησιμοποιήθηκε όταν εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Bradford έδειξε απορρόφηση 0,638. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην ύπαρξη 3,1mg ενζύμου/ml. Η εικόνα 12 δείχνει τη συγκεκριμένη μέτρηση.

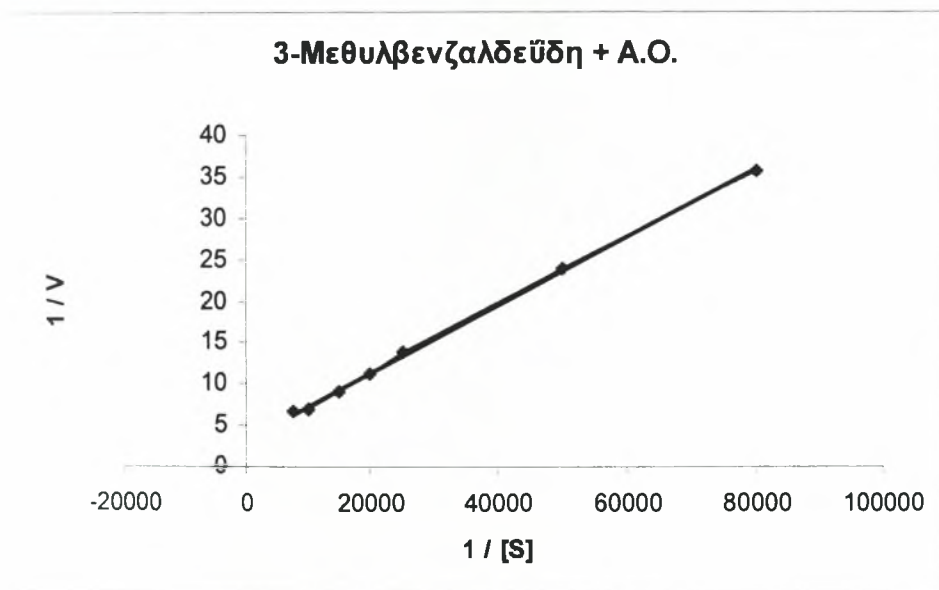


Εικόνα 14. Πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας του ενζύμου (Αλδεϋδική Οξειδάση). (n=2)

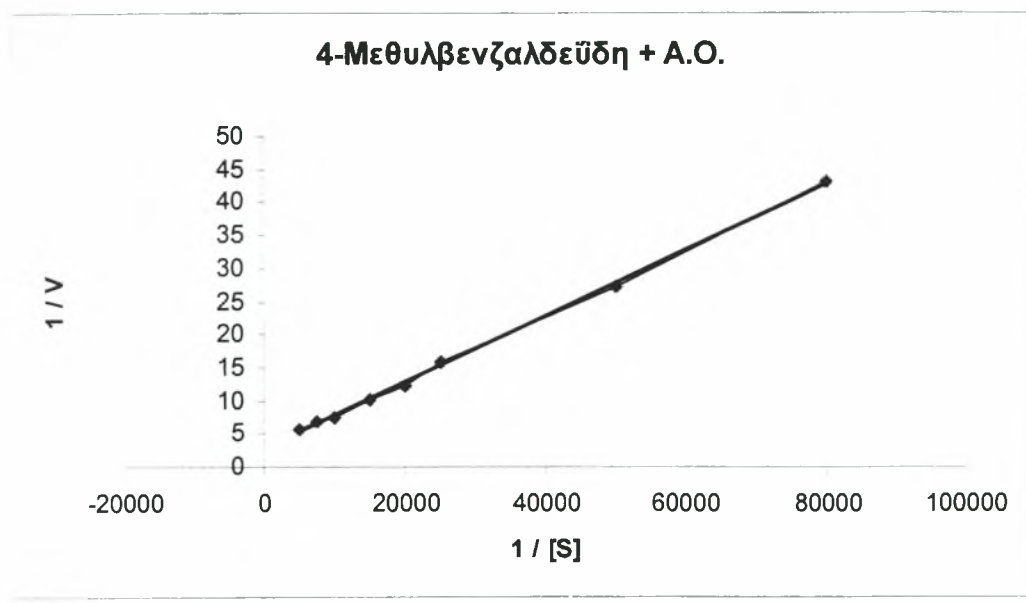
3.2. Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m , V_{max} και K_s των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών με τη χρήση της καμπύλης Lineweaver – Burk.



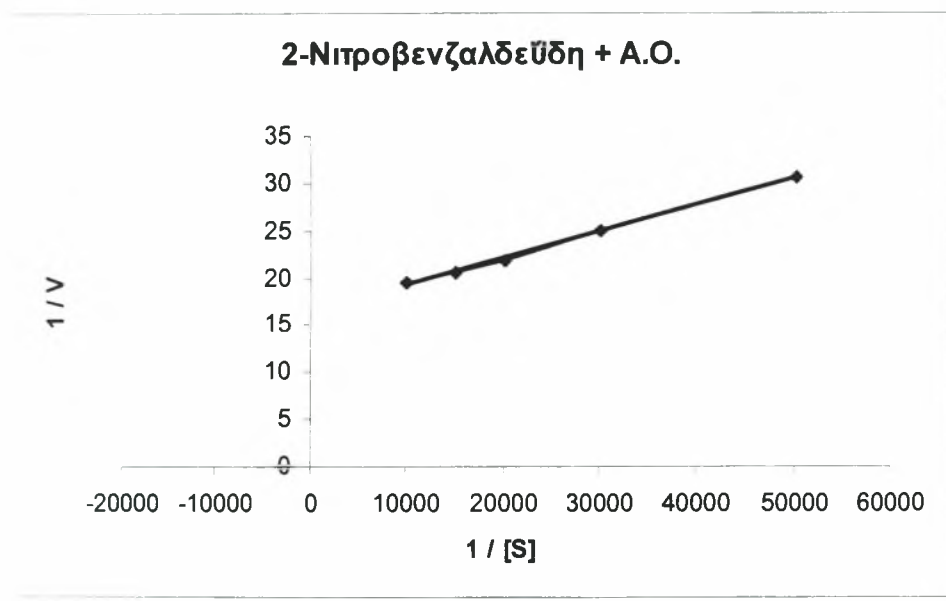
Εικόνα 15. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 2-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (Α.Ο.). (n=2)



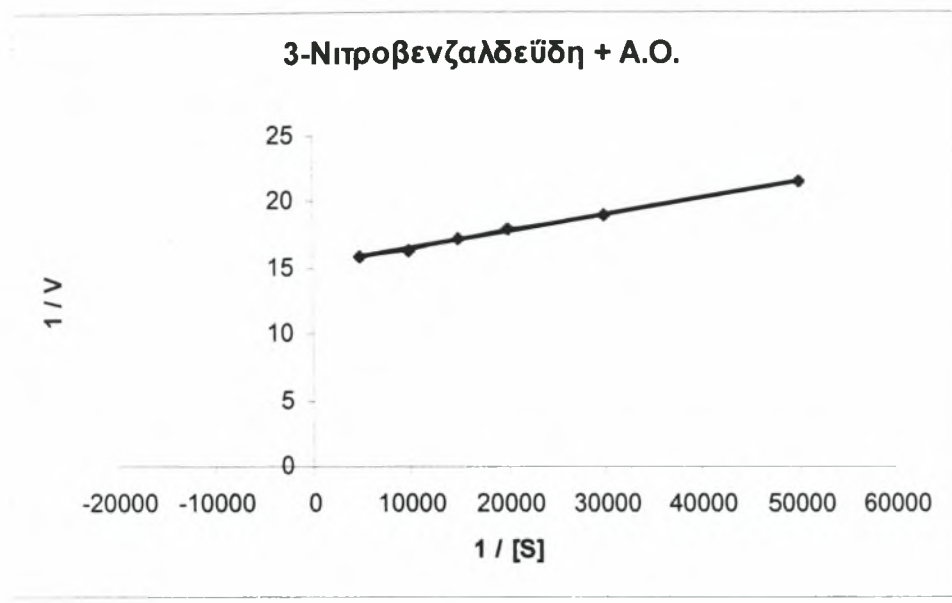
Εικόνα 16. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της 3-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (Α.Ο.). (n=2)



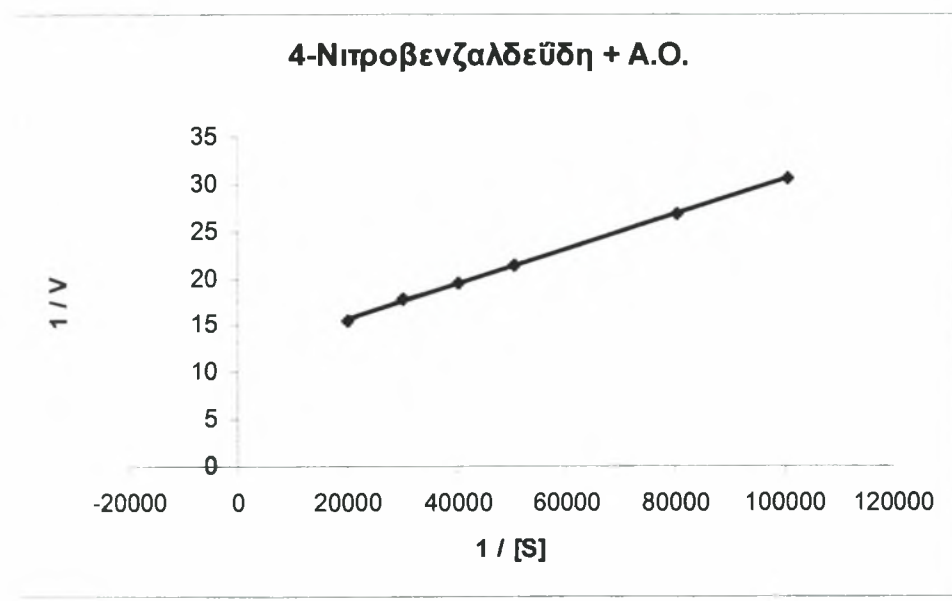
Εικόνα 17. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 4-Μεθυλβενζαλδεΐδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (Α.Ο.). (n=2)



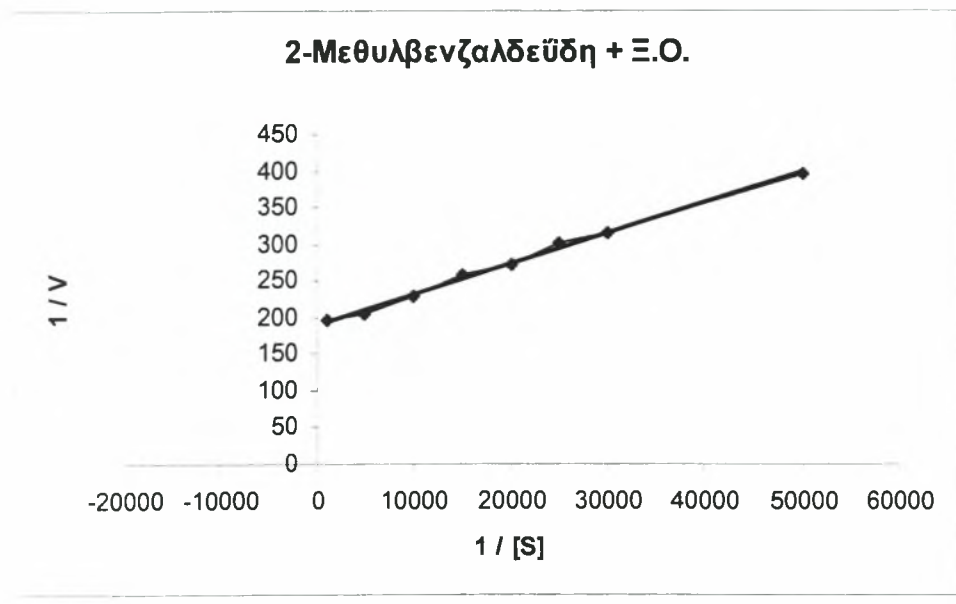
Εικόνα 18. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 2-Νιτροβενζαλδεΐδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (Α.Ο.). (n=2)



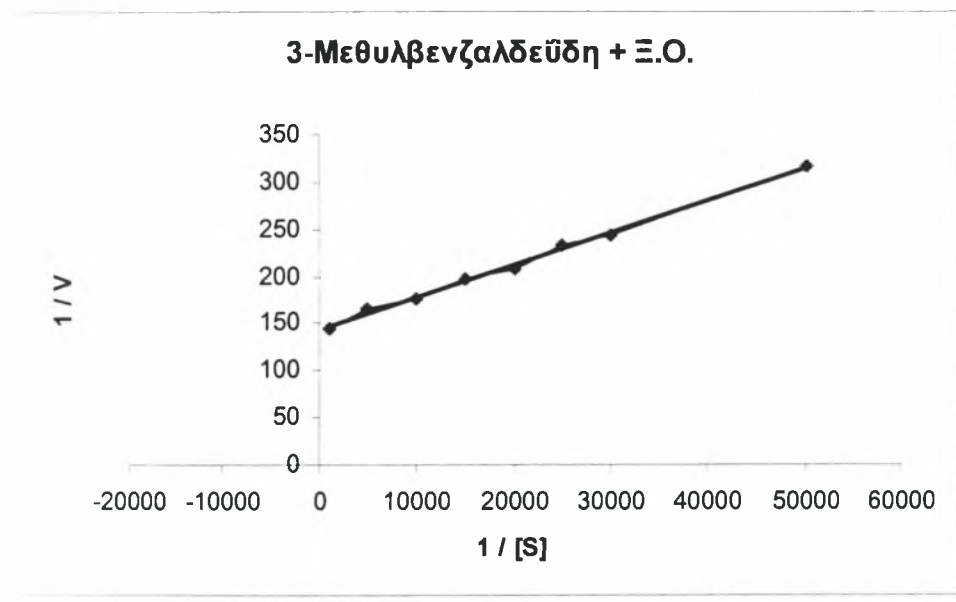
Εικόνα 19. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 3-Νιτροβενζαλδεΐδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (Α.Ο.). (n=2)



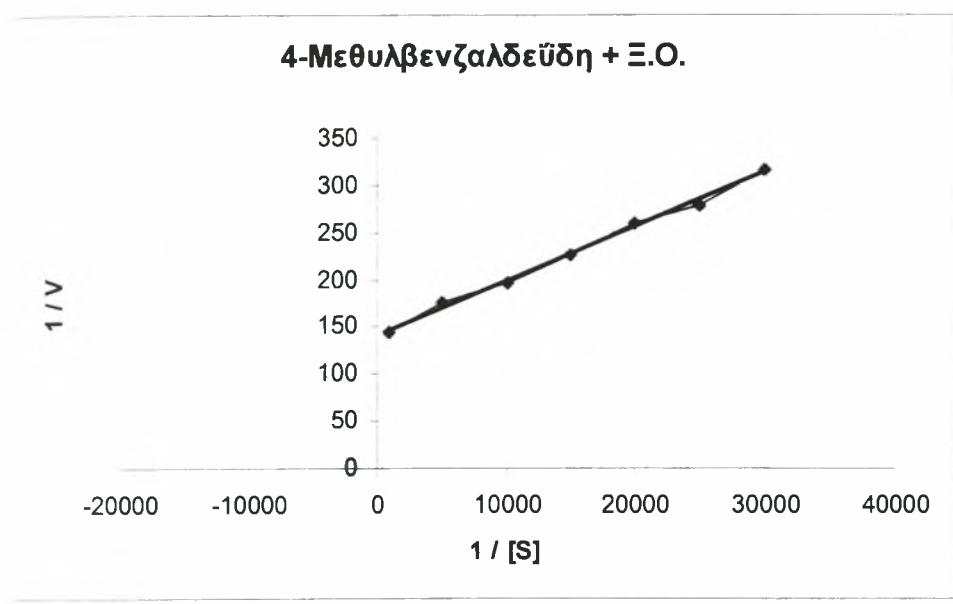
Εικόνα 20. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 4-Νιτροβενζαλδεΐδης παρουσία Αλδεϋδικής Οξειδάσης (Α.Ο.). (n=2)



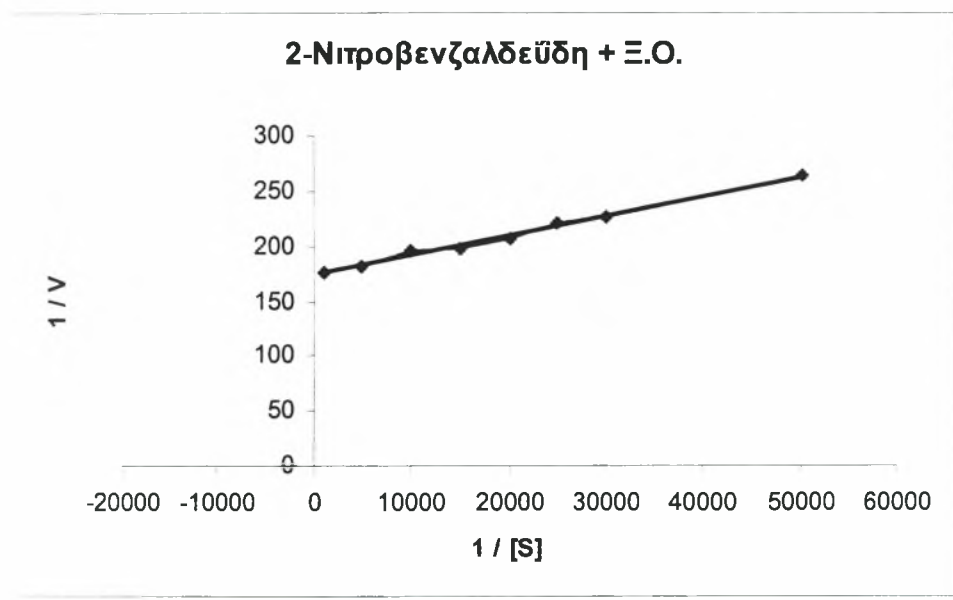
Εικόνα 21. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 2-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)



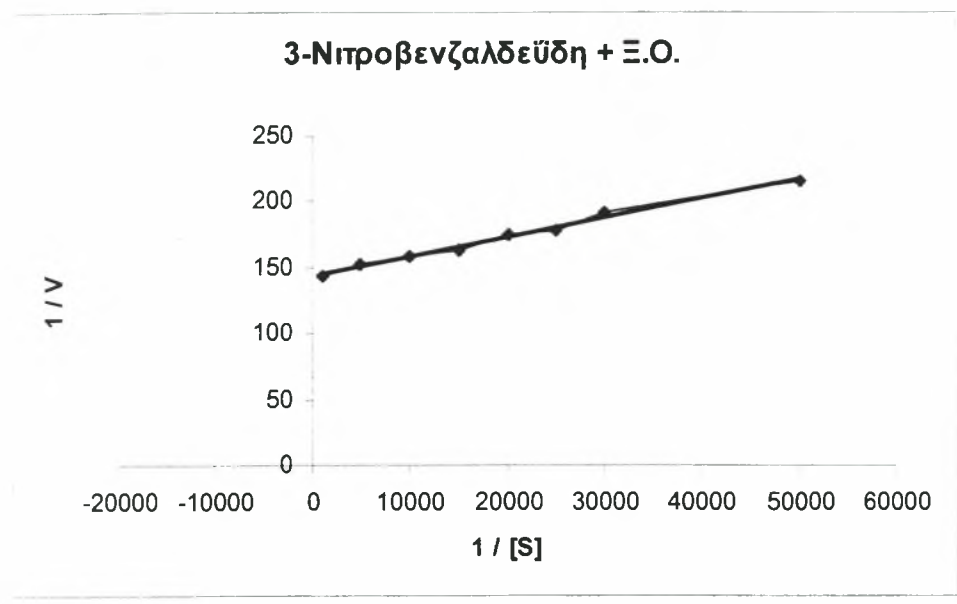
Εικόνα 22. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 3-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)



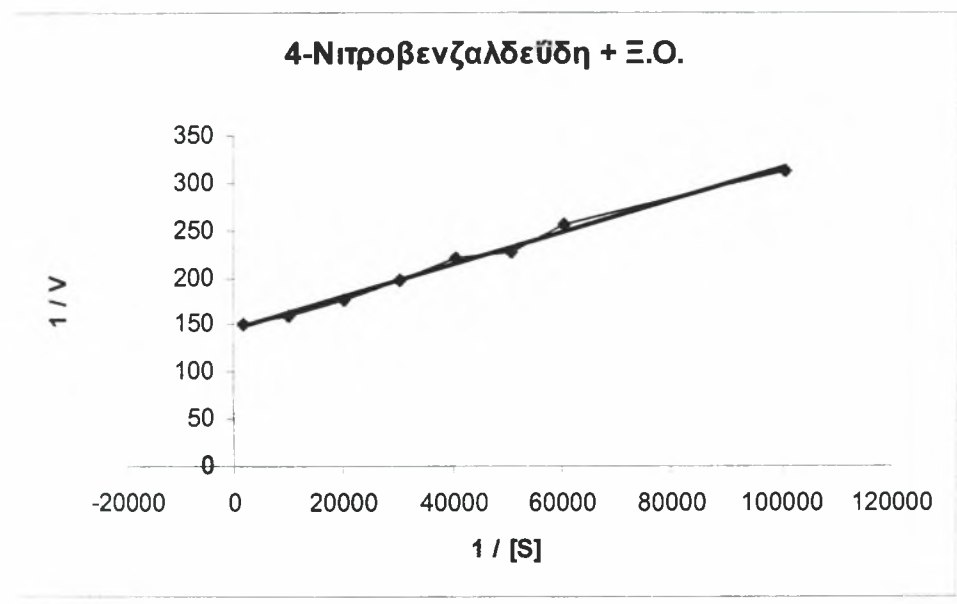
Εικόνα 23. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 4-Μεθυλβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)



Εικόνα 24. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 2-Νιτροβενζαλδεϋδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)



Εικόνα 25. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 3-Νιτροβενζαλδεΐδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)



Εικόνα 26. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_i για την οξείδωση της 4-Νιτροβενζαλδεΐδης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης (Ξ.Ο.). (n=2)

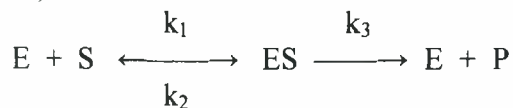
Υποστρώματα	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_s = V_{max}/K_m$ (ml/min/mg)
2-Μεθυλβενζαλδεϋδη	0,018	0,2	11,1
3-Μεθυλβενζαλδεϋδη	0,011	0,36	32,7
4-Μεθυλβενζαλδεϋδη	0,18	0,33	1,8
2-Νιτροβενζαλδεϋδη	0,017	0,06	3,5
3-Νιτροβενζαλδεϋδη	0,008	0,065	7,8
4-Νιτροβενζαλδεϋδη	0,015	0,08	5,3

Πίνακας 4. Οι κινητικές σταθερές των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών κατά την οξείδωσή τους με Αλδεϋδική Οξειδάση. (n=2)

Υποστρώματα	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_s = V_{max}/K_m$ (ml/min/mg)
2-Μεθυλβενζαλδεϋδη	0,003	0,005	1,8
3-Μεθυλβενζαλδεϋδη	0,024	0,007	0,29
4-Μεθυλβενζαλδεϋδη	0,04	0,007	0,18
2-Νιτροβενζαλδεϋδη	0,01	0,006	0,6
3-Νιτροβενζαλδεϋδη	0,001	0,007	7
4-Νιτροβενζαλδεϋδη	0,011	0,0067	0,61

Πίνακας 5. Οι κινητικές σταθερές των υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών κατά την οξείδωσή τους με Ξανθική Οξειδάση. (n=2)

Η παρακάτω αντίδραση δείχνει τη δημιουργία συμπλόκου ένζυμο (E)-υπόστρωμα (S). Ακολουθεί η διάσπαση του συγκεκριμένου συμπλόκου σε ένζυμο και προϊόν (P).



Η k_3 είναι η σταθερά που ρυθμίζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης καθώς η δημιουργία του συμπλόκου ένζυμο-υπόστρωμα είναι ταχύτερη ενώ η εμφάνιση των προϊόντων προχωρεί αργά.

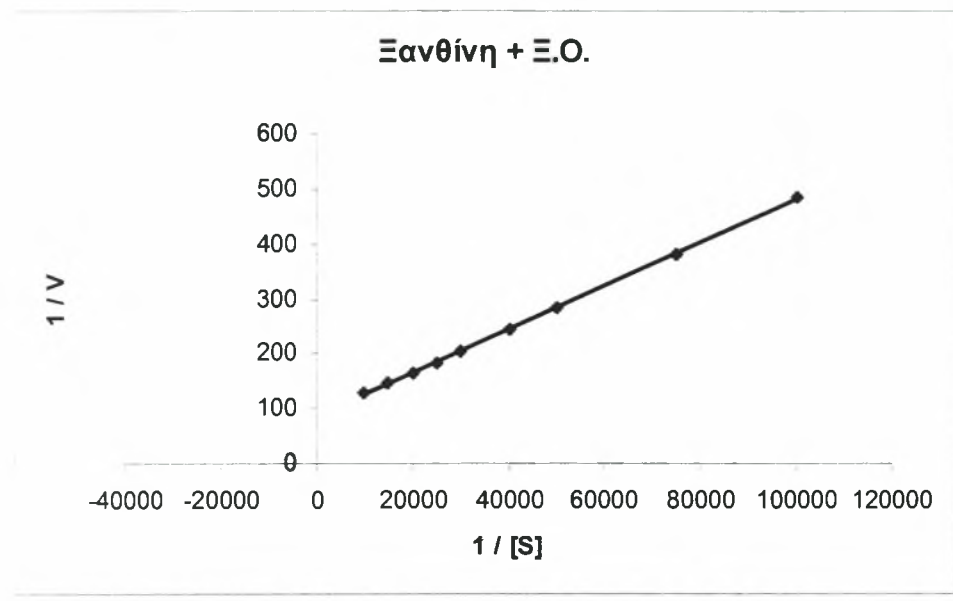
Οι δύο σταθερές που χαρακτηρίζουν ένα ένζυμο είναι η K_m (σταθερά Michaelis-Menten) και η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} . Η V_{max} εκφράζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις του υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις του είναι ανεξάρτητη. Αυτό συμβαίνει διότι παρατηρείται το φαινόμενο του κορεσμού του ενζύμου με αποτέλεσμα να μην μπορεί να δράσει περαιτέρω με την ίδια δυναμική που ενεργεί όταν το υπόστρωμα βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση. Η K_m αποτελεί τη σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ένζυμο-υπόστρωμα και ισούται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι η μισή της μέγιστης. Έχει μεγάλη φυσική σημασία καθώς είναι το μέτρο συγγένειας ή αγκιστείας του ενζύμου με το υπόστρωμα. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της, τόσο πιο μεγάλη είναι η συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα ή αλλιώς τόσο μικρότερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για τον κορεσμό του ενζύμου. Δηλαδή, μια ένωση χαρακτηρίζεται τόσο καλύτερο υπόστρωμα για ένα ένζυμο όσο μικρότερη είναι η τιμή της σταθεράς K_m . Το πηλίκιο V_{max} / K_m είναι η σταθερά K_s , ένα μέτρο της δραστηριότητας του ενζύμου.

Ο πίνακας 4 απεικονίζει τις κινητικές σταθερές (V_{max} , K_m και K_s) κατά την οξειδωση των έξι υποκατεστημένων βενζαλδευδών με αλδεϋδική οξειδάση από το ήπαρ ινδικού χοιριδίου. Κατά την παρατήρηση των τιμών της K_m στις τρεις πρώτες βενζαλδεύδες, τη 2-, 3- και 4-μεθυλβενζαλδεύδη, φαίνεται ότι η χαμηλότερη τιμή εμφανίζεται στη meta-υποκατεστημένη βενζαλδεύδη (3-μεθυλβενζαλδεύδη) και η μεγαλύτερη στην para-υποκατεστημένη (4-μεθυλβενζαλδεύδη). Αυτό σημαίνει ότι η πρώτη είναι ένα καλό υπόστρωμα του ενζύμου, καλύτερο και σε σχέση με τις δύο άλλες μεθυλβενζαλδεύδες. Σχετικά με τις τιμές της K_m για τις τρεις νιτροβενζαλδεύδες, παρατηρείται ότι καλύτερο υπόστρωμα με χαμηλότερη τιμή της σταθεράς K_m είναι πάλι η βενζαλδεύδη, που είναι υποκατεστημένη στη θέση meta-γεγονός που φανερώνει την ικανότητα της αλδεϋδικής οξειδάσης να οξειδώνει υποστρώματα με αυτού του είδους τη δομή σε μεγαλύτερο και ικανοποιητικότερο βαθμό σε σχέση με τις δύο άλλες δομές που μελετήθηκαν, την ortho- και την para-. Οι τιμές της σταθεράς στις άλλες δύο βενζαλδεύδες είναι αντεστραμμένες σε σχέση με τις μεθυλβενζαλδεύδες και μάλιστα στις νιτρο-υποκατεστημένες η υψηλότερη τιμή της μετρήθηκε στην ortho-νιτροβενζαλδεύδη. Μία σύγκριση όλων, και των έξι υποστρωμάτων, δείχνει ότι η χαμηλότερη τιμή της K_m ανήκει στη meta-υποκατεστημένη νιτροβενζαλδεύδη και ακολουθεί η ortho-υποκατεστημένη μεθυλβενζαλδεύδη. Αντίθετα, η υψηλότερη τιμή της παρατηρείται στην 3- και 4-μεθυλβενζαλδεύδη. Σχετικά μικρές τιμές της V_{max} παρατηρήθηκαν στις τρεις νιτροβενζαλδεύδες ενώ στις τρεις μεθυλ-βενζαλδεύδες οι τιμές είναι μεγαλύτερες.

Στον πίνακα 5 απεικονίζονται οι τιμές των αντίστοιχων κινητικών σταθερών κατά την οξειδωση των έξι υποκατεστημένων βενζαλδευδών από ξανθική οξειδάση προερχόμενη από γάλα βοδιού. Όσον αφορά τις τρεις μεθυλβενζαλδεύδες, εκείνη με τη μικρότερη τιμή της K_m και άρα εκείνη που είναι καλύτερο υπόστρωμα για την ξανθική οξειδάση είναι η ortho-υποκατεστημένη (2-μεθυλβενζαλδεύδη). Η para-υποκατεστημένη (4-μεθυλβενζαλδεύδη) είναι αυτή με τη μεγαλύτερη τιμή στην K_m και άρα το ασθενέστερο υπόστρωμα σε σχέση με τις άλλες δύο (ortho- και meta-). Η para-υποκατεστημένη νιτροβενζαλδεύδη (4-νιτροβενζαλδεύδη) εμφανίζει κι αυτή τη μεγαλύτερη τιμή στην K_m γεγονός που δείχνει ότι η ξανθική οξειδάση οξειδώνει καλύτερα υποστρώματα που δεν είναι υποκατεστημένα στη θέση para-. Αντίθετα, όμως με τις μεθυλβενζαλδεύδες, καλύτερο υπόστρωμα για την ξανθική οξειδάση είναι η meta- υποκατεστημένη νιτροβενζαλδεύδη (3-νιτροβενζαλδεύδη), η οποία έχει τη μικρότερη τιμή της σταθεράς. Συνολικά, καλύτερα υποστρώματα της ξανθικής

οξειδάσης είναι η 3-νιτροβενζαλδεΰδη και η 2-μεθυλβενζαλδεΰδη ενώ σε μικρότερο βαθμό οξειδώνονται η 2-νιτροβενζαλδεΰδη και η 4-μεθυλβενζαλδεΰδη. Σχετικά με τις τιμές της V_{max} αυτές είναι αρκετά μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές στην οξείδωση με την αλδεϋδική οξειδάση.

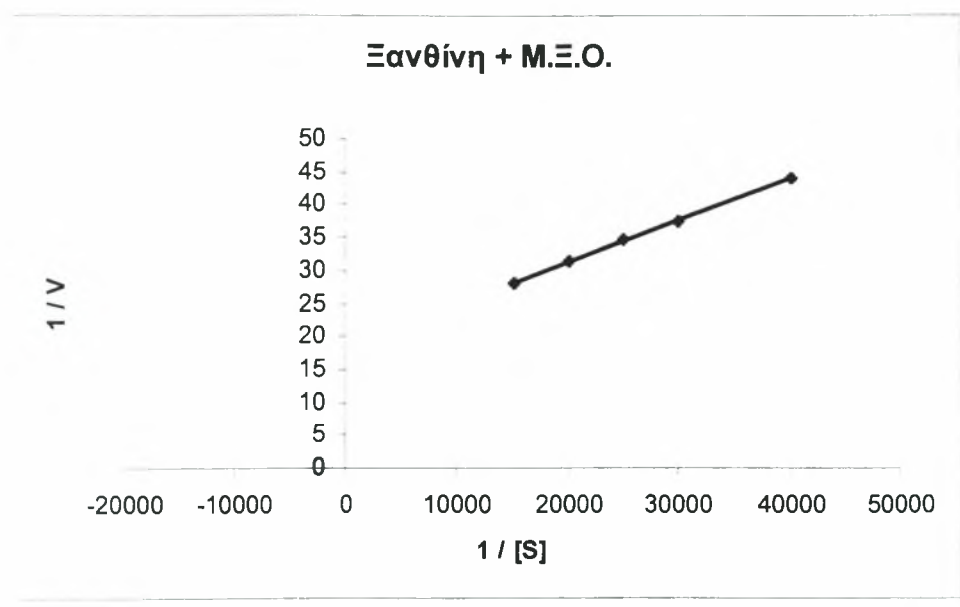
3.3. Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m , V_{max} και K_s της ξανθίνης με ξανθική οξειδάση με τη χρήση της καμπύλης Lineweaver – Burk.



Εικόνα 27. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της ξανθίνης παρουσία Ξανθικής Οξειδάσης από γάλα βοδιού (Ξ.Ο.). (n=2)

Υπόστρωμα	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_s = V_{max}/K_m$ (ml/min/mg)
Ξανθίνη	$4,3 \times 10^{-4}$	0,001	232,5

Πίνακας 6. Οι κινητικές σταθερές της ξανθίνης κατά την οξείδωσή της με Ξανθική Οξειδάση προεργόμενη από γάλα βοδιού. (n=2)



Εικόνα 28. Η καμπύλη Lineweaver – Burk για τον προσδιορισμό των K_m , V_{max} και K_s για την οξείδωση της ξανθίνης παρουσία Μικροβιακής Ξανθικής Οξειδάσης (Μ.Ξ.Ο.). (n=2)

Υπόστρωμα	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_s = V_{max}/K_m$ (ml/min/mg)
Ξανθίνη	3×10^{-5}	0,05	1666,7

Πίνακας 7. Οι κινητικές σταθερές της ξανθίνης κατά την οξείδωσή της με Μικροβιακή Ξανθική Οξειδάση. (n=2)

3.4. Υπολογισμός της αναστολής, που προκλήθηκε από τις πολυφαινόλες στη δράση της ξανθικής οξειδάσης με υπόστρωμα την ξανθίνη.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα ξανθίνης συγκέντρωσης 6×10^{-4} M με τελική συγκέντρωση στην κυβέττα 1×10^{-4} M και μετά από προσθήκη 100μl ξανθικής οξειδάσης αραιωμένης 1/20 φωτομετρήθηκε για 5 λεπτά. Οι τιμές παίρνονταν κάθε 15 δευτερόλεπτα. Ανάλογα με την τιμή μετά από το πέρας των 5 λεπτών υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής, που προκάλεσε κάθε μία συγκέντρωση των πολυφαινολών. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον πίνακα 5.

Αναστολέας (Πολυφαινόλη)	Συγκέντρωση Αναστολέα (mM)	Αναστολή της οξείδωσης της ξανθίνης (%)
Γαλλικό Οξύ	1	84
	0,1	8
Φερουλικό Οξύ	1	100
	0,1	100
	0,01	0
Καφεϊκό Οξύ	1	100
	0,1	58
	0,01	31
	0,001	32
Πρωτοκαχεϊκό Οξύ	1	100
	0,1	13
	0,01	16
Κατεκίνη	1	55
	0,1	36
	0,01	38
	0,001	35
Επικατεκίνη	1	26
	0,1	25
	0,01	19
Ρουτίνη	1	100
	0,1	100
	0,01	15

Πίνακας 8. Αναστολή της οξείδωσης της ξανθίνης συγκέντρωσης 1×10^{-4} M στην κυβέττα από πολυφαινόλες με ξανθική οξειδάση από γάλα βοδιού στα 295nm. (n=2)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αλδεύδες είναι οργανικά μόρια, τα οποία συναντώνται σε μεγάλη ποικιλία στη φύση. Συγκεκριμένα, οι αρωματικές αλδεύδες είναι συστατικά των τροφών και πολλές φορές χρησιμοποιούνται ως παράγοντες για τη γεύση (1,2) αλλά και τη διατήρηση των τροφικών παρασκευασμάτων, παίζοντας το ρόλο συντηρητικών. Οι αλδεύδες αποτελούν το επόμενο βήμα στο μεταβολισμό των φαρμάκων και κυρίως εκείνων που έχουν στο μόριό τους αμινομάδες. Ακολουθώντας, αυτές μπορούν να μεταβολιστούν είτε μετατρεπόμενες στο αντίστοιχο οξύ τους με τη δράση οξειδωτικών ενζύμων είτε με την αναγωγή τους σε αλκοόλες μέσω της αλδευδικής ρεδοукτάσης ή δεϋδρογονάσης.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η οξείδωση 6 υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών, των 2-, 3- και 4-Νιτροβενζαλδεϋδών και 2-, 3- και 4-Μεθυλβενζαλδεϋδών από δύο ένζυμα, την αλδευδική οξειδάση και την ξανθική οξειδάση. Η αλδευδική οξειδάση απομονώθηκε από το ήπαρ ινδικού χοιριδίου διότι παρουσιάζει παρόμοια δράση σε σχέση με τα υποστρώματα με εκείνη του ανθρώπινου ήπατος (104,55). Η ξανθική οξειδάση προερχόταν από το γάλα του βοδιού και χρησιμοποιήθηκε συσκευασμένη από το εμπόριο.

Τα δύο αυτά ένζυμα ανήκουν στις υδροξυλάσες μολυβδαινίου (39) και αποτελούνται από δύο υπομονάδες, που η καθεμία έχει μία περιοχή με το άτομο μολυβδαινίου, μία περιοχή με το σύμπλεγμα Fe_2S_2 , και μία με ένα μόριο FAD (40). Χαρακτηριστικό τους είναι ότι καταλύουν μια ευρεία κλίμακα υποστρωμάτων, όπως πουρίνες, πυριμιδίνες, πτεριδίνες, άλλες ετεροκυκλικές ενώσεις με άζωτο και αλδεύδες. Συγκεκριμένα, είναι γνωστές για το μεταβολισμό ετεροκυκλικών με άζωτο ενώσεων κυρίως παρά για την οξείδωση αλδεϋδών (55,58). Ωστόσο, η ξανθική αποτελεί πολύ καλό υπόστρωμα για την ξανθική οξειδάση και το ίδιο συμβαίνει με τις αρωματικές αλδεύδες για την αλδευδική οξειδάση. Σε ό,τι αφορά τις υποκατεστημένες βενζαλδεύδες, η οξείδωσή τους εμποδίζεται σε ένα βαθμό από την παρουσία υποκαταστατών στη θέση ortho (65) και μάλιστα η αντίδραση γίνεται σε όλο και μικρότερο με τον ολοένα αυξανόμενο όγκο του υποκαταστάτη. Γι' αυτό το λόγο η δραστηριότητα κυρίως της ξανθικής οξειδάσης είναι μειωμένη στις ortho-υποκατεστημένες αλδεύδες σε σχέση με τις meta- ή τις para-. Έχει βρεθεί επίσης ότι τόσο η αλδευδική όσο και η ξανθική οξειδάση είναι πιο ενεργές για αλδεύδες με 3-6 άτομα άνθρακα (67).

Υπολογισμός των κινητικών σταθερών των υποκατεστημένων βενζαλδευδών.

Ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών (V_{max} , K_m και K_s) έγινε με τη χρήση σιδηροκυανιούχου καλίου ως δέκτη ηλεκτρονίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις αφαιρέθηκαν οι τιμές των μεγάλων συγκεντρώσεων του υποστρώματος από τις γραφικές παραστάσεις. Ο κορεσμός του ενζύμου και η αναστολή στη δράση του (105) που προκαλούν αυτές δε δίνουν ικανοποιητικά και συγκρίσιμα αποτελέσματα. Έχει παρατηρηθεί αναστολή κατά την οξειδωση της 2-υδροξυβενζαλδεύδης από αλδευδική οξειδάση προερχόμενο από το ήπαρ κουνελιού (105) αλλά και κατά την οξειδωση της 4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζαλδεύδης συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 5mM με αλδευδική οξειδάση από τον *Streptomyces viridosporus* T7A (106). Το φαινόμενο αυτό δε συναντάται μόνο στις αλδεύδες αλλά και σε άλλα υποστρώματα όπως η φθαλαζίνη (54) και η κινολόνη, οι οποίες προκαλούν αξιοσημείωτη αναστολή (105). Η μεγάλη συγκέντρωση του υποστρώματος μπορεί να προκαλέσει υπερβολική αναγωγή του μολυβδαινίου (Mo^{+3}) με αποτέλεσμα την αργή μετατροπή σε Mo^{+4} (82).

Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών υποκατεστημένων βενζαλδευδών κατά την οξειδωσή τους με αλδευδική οξειδάση από ινδικό χοιρίδιο. Πιο συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί μεθοξυ- και υδροξυ-βενζαλδεύδες, οι οποίες ωστόσο αν και διαφορετικές από αυτές της παρούσας μελέτης μπορούν να δώσουν συγκρίσιμα αποτελέσματα κυρίως λόγω των ανάλογων δομών των μορίων. Ένα πολύ σημαντικό κοινό στοιχείο έγκειται στο γεγονός ότι όλες, τόσο οι μεθοξυ- και υδροξυβενζαλδεύδες όσο και οι νιτρο- και μεθυλβενζαλδεύδες είναι από πολύ καλά έως εξαιρετικά υποστρώματα για την αλδευδική οξειδάση.

Ειδικότερα, παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα στην τιμή της K_m ανάμεσα στη 2-υδροξυβενζαλδεύδη, που είναι της τάξης του 0,02 (55) και στις 2-μεθυλ- και 2-νιτροβενζαλδεύδη, που είναι της τάξης του 0,018 και 0,017 αντίστοιχα. Αυτό δείχνει την ικανότητα του συγκεκριμένου ενζύμου να οξειδώνει τις ορθο-υποκατεστημένες βενζαλδεύδες με παρόμοιο ρυθμό. Οι ομοιότητες των meta- και para-υδροξυ βενζαλδευδών είναι μικρότερες με τις αντίστοιχες των νιτρο- και μεθυλβενζαλδευδών.

Σημαντική ομοιότητα παρατηρείται στην τιμή της K_m στην 4-μεθοξυβενζαλδεύδη, που ισούται με 0,013 (59) και τις 2-νιτρο- και 4-νιτροβενζαλδεύδη που είναι 0,017 και 0,018 αντίστοιχα. Είναι φανερό ότι η μορφή του μορίου και ο τρόπος με τον οποίο είναι αυτό υποκατεστημένο αποτελεί έναν καλό γνώμονα για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών βενζαλδευδών και την έκβαση βάσιμων συμπερασμάτων. Ανάλογες ομοιότητες μπορούν να βρεθούν και στις τιμές των V_{max} καθώς η τιμή της στην 3-μεθοξυβενζαλδεύδη βρέθηκε ίση 0,38 ενώ της 3-νιτροβενζαλδεύδης υπολογίστηκε 0,36 αλλά και της 4-μεθοξυβενζαλδεύδης, που είναι ίση με 0,38 και της 4-νιτροβενζαλδεύδης, που είναι της τάξης του 0,33.

Ανάλογη σύγκριση μπορεί να γίνει και με τις κινητικές σταθερές που προέκυψαν από την οξειδωση των βενζαλδευδών από την ξανθική οξειδάση. Σχετικά με την ξανθική οξειδάση, η οποία είναι ένα ένζυμο που μπορεί να οξειδώσει μία πολύ ευρεία κλίμακα υποστρωμάτων, εξετάστηκε (67) το πόσο σημαντικό ρόλο παίζει στην οξειδωση των υποκατεστημένων βενζαλδευδών. Βρέθηκε ότι αλδεύδες υποκατεστημένες με άτομο αλογόνου μεγαλύτερου μεγέθους, όπως οι ιωδοβενζαλδεύδες, είναι καλύτερα υποστρώματα σε σχέση με τις φθοριοβενζαλδεύδες και μάλιστα η αύξηση στο ρυθμό της οξειδωσης ξεπερνάει τις δύο τάξεις μεγέθους. Επιπλέον, οι 3-, και 4-νιτροβενζαλδεύδες, οι αλδεύδες δηλαδή

που είναι υποκατεστημένες στις θέσεις meta- και para-, οξειδώνονται από την ξανθική οξειδάση περίπου στον ίδιο βαθμό, ενώ ο ρυθμός της οξειδωσης της 2-νιτροβενζαλδεΐδης, της υποκατεστημένης στη θέση ortho-, είναι τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερος.

Αυτό που παρατηρείται είναι ότι τόσο οι τρεις μεθυλβενζαλδεΐδες όσο και οι τρεις νιτροβενζαλδεΐδες είναι καλύτερα υποστρώματα από τις υδροξυ- και μεθοξυβενζαλδεΐδες. Οι χαμηλότερες τιμές της K_m το μαρτυρούν. Είναι μικρότερες τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους ενώ σε κάποιες, όπως στη 2-μεθυλβενζαλδεΐδη και την 3-νιτροβενζαλδεΐδη είναι κατά δύο τάξεις μεγέθους μικρότερες από τις αντιστοίχως υποκατεστημένες υδροξυ- και μεθοξυβενζαλδεΐδες (55). Τέτοιου μεγέθους διαφορές παρατηρούνται και στις τιμές της V_{max} .

Υπολογισμός των κινητικών σταθερών της ξανθίνης κατά την οξειδάσή της από ξανθική οξειδάση προερχόμενη από γάλα βοδιού και μικροβιακή ξανθική οξειδάση.

Κατά την οξειδάση της ξανθίνης και τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών αποδείχτηκε ότι είναι ένα άριστο υπόστρωμα για την ξανθική οξειδάση, είτε αυτή προέρχεται από το γάλα βοδιού είτε από μικροοργανισμούς. Οι τιμές της K_m βρίσκονται πολύ χαμηλότερα από εκείνες άλλων αρκετά καλών υποστρωμάτων του ενζύμου, όπως είναι οι ortho-, meta- και para- υποκατεστημένες υδροξυ- και μεθοξυ-βενζαλδεΐδες. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ξανθίνη οι τιμές της σταθεράς ισούνται με $4,3 \times 10^{-4}$ και 3×10^{-5} αντίστοιχα. Φυσικά, δεν υπάρχει δομική ομοιότητα ανάμεσα στην ξανθίνη και τα μόρια αυτά αλλά οι τιμές είναι ενδεικτικές ενός πολύ καλού υποστρώματος. Σχετικά με τα δύο ένζυμα, η μικροβιακή ξανθική οξειδάση έδωσε χαμηλότερη τιμή της σταθεράς K_m και υψηλότερη της K_s γεγονός που φανερώνει ότι έχει ελαφρώς μεγαλύτερη αγχιστεία με την ξανθίνη, απ' ότι έχει το ένζυμο από το γάλα του βοδιού. Έχουν βρεθεί στη βιβλιογραφία τιμές της K_m για την οξειδάση της ξανθίνης από ξανθική οξειδάση προερχόμενη από γάλα βοδιού που κυμαίνονται μία με δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερα, δηλαδή περίπου $4-8 \times 10^{-6}$ (53). Η συγκεκριμένη απόκλιση μπορεί να οφείλεται σε ενδεχόμενα σφάλματα ή σε διαφορετικές συνθήκες του πειράματος, όπως είναι η χρησιμοποίηση διαφορετικού δέκτη ηλεκτρονίων, πχ οξυγόνου. Ωστόσο, φαίνεται ότι η ξανθίνη είναι ένα άριστο υπόστρωμα για την ξανθική οξειδάση.

Αναστολή της δράσης της ξανθικής οξειδάσης από πολυφαινόλες.

Μελετήθηκε επίσης η αναστολή της δράσης της ξανθικής οξειδάσης από διάφορες πολυφαινόλες. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ξανθίνη. Οι πολυφαινόλες, που είναι μόρια με περισσότερους του ενός φαινολικούς δακτυλίους, βρίσκονται σε μεγάλη κλίμακα στο φυτικό βασίλειο αλλά δεν παίζουν ρόλο στη θρέψη. Είναι αξιοσημείωτες όμως ιδιότητες τους σχετιζόμενες με αντιμεταλλαξιγόνο, αντικαρκινογόνο, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Ωστόσο, είναι σαφές ότι σε ορισμένες συγκεντρώσεις μπόρουν να έχουν διαφορετικά αποτελέσματα για τον οργανισμό. Να παίζουν δηλαδή το ρόλο οξειδωτικών για λιπίδια και πρωτεΐνες (93).

Συγκεκριμένα, εμποδίζουν την παραγωγή αζωτούχων ενώσεων με καρκινογόνο δράση (88) ενώ προστατεύουν τις LDL από οξείδωση αλλά και το DNA δίνοντας στον οργανισμό ένα πλεονέκτημα για την αποφυγή της ανάπτυξης κακοήθων όγκων. Επιπλέον, ευνοούν το μεταβολισμό βλαβερών μορίων και επάγουν τη μετατροπή ελεύθερων ριζών σε αδρανή και ακίνδυνα μόρια. Αυτό το επιτυγχάνουν δίνοντας στις ελεύθερες ρίζες ένα άτομο υδρογόνου με αποτέλεσμα να τις μετατρέπουν σε σταθερά μόρια. Στα πλαίσια αυτά, έχουν επίδραση πάνω σε ένζυμα με οξειδωτική δράση, όπως είναι το κυτόχρωμα P450, η κυκλοξυγενάση και η λιποξυγενάση. Η επίδραση των πολυφαινόλων πάνω σε ένζυμα, τα οποία κατά τη δράση τους προκαλούν την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και θέτουν τον οργανισμό υπό τον κίνδυνο οξειδωτικού στρες, είναι επίσης σημαντική. Τέτοια ένζυμα είναι η πρωτεϊνική κινάση c και κυρίως η ξανθική οξειδάση. Η δράση τους αναστέλλεται, ανάλογα βέβαια και με τη συγκέντρωση της πολυφαινόλης σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 7 πολυφαινόλες και μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση που είχαν στην οξείδωση της ξανθίνης από την ξανθική οξειδάση. Οι πολυφαινόλες αυτές είναι το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το πρωτοκαχεϊκό οξύ, η κατεκίνη, η επικατεκίνη και η ρουτίνη. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η ρουτίνη και το φερουλικό οξύ είναι οι μόνες πολυφαινόλες, που προκάλεσαν 100% αναστολή στη δράση της ξανθικής οξειδάσης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις τους. Δηλαδή, τόσο στην αρχική συγκέντρωση του 1mM στην κυβέττα όσο και στην 0,1 mM, που αντιστοιχεί σε μια αραιώση 1/10 της αρχικής, εμπόδισαν πλήρως την οξείδωση της ξανθίνης. Είναι, λοιπόν, οι πιο δραστικές πολυφαινόλες στον τομέα αυτό.

Στην αρχική συγκέντρωση του 1mM πλήρης αναστολή (100%) επετεύχθη από δύο ακόμη πολυφαινόλες, το καφεϊκό οξύ και το πρωτοκαχεϊκό οξύ. Το γαλλικό οξύ ξεκίνησε στην αρχική συγκέντρωση με μια αναστολή της τάξης του 84%, η κατεκίνη με 55% και η επικατεκίνη με 26%. Στη δεύτερη συγκέντρωση, στην 0,1 mM, το γαλλικό οξύ προκαλεί ελάχιστη αναστολή, που κυμαίνεται στο 8%, παρατηρείται δηλαδή μια απότομη πτώση. Ανάλογη πτώση υπάρχει και στην τρίτη συγκέντρωση της ρουτίνης, της 0,01mM, αφού από το 100% πέφτει στο 15%. Χαρακτηριστική είναι η πτώση της ανασταλτικής δράσης και του φερουλικού οξέος. Ενώ στις δύο πρώτες συγκεντρώσεις του προκαλεί 100% αναστολή της δράσης της ξανθικής οξειδάσης, στην τρίτη συγκέντρωση (0,01mM) δεν προκαλεί καμία αναστολή αφήνοντας το ένζυμο να δράσει με τον ίδιο ρυθμό που θα δρούσε απουσία του.

Σχετικά με το πρωτοκαχεϊκό οξύ, στις δύο επόμενες συγκεντρώσεις του, την 0,1 mM και την 0,01 mM, παρατηρείται αξιοσημείωτη πτώση τη αναστολής της οξείδωσης της ξανθίνης στα επίπεδα του 13% και του 16% αντίστοιχα. Εκτός όμως από τη σημαντική αυτή πτώση πρέπει να δοθεί έμφαση και στη σταθερή και σχεδόν όμοια αναστολή των δύο αυτών συγκεντρώσεων αν και διαφέρουν κατά μία τάξη μεγέθους. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο καθώς δείχνει την απουσία κλιμάκωσης στη δράση του πρωτοκαχεϊκού οξέος. Μια ανάλογη κλιμάκωση παρατηρήθηκε και στη δράση της ρουτίνης όπως και του γαλλικού οξέος.

Η κατεκίνη προκάλεσε στην αρχική συγκέντρωση του 1 mM αναστολή κατά 55%, μείωση δηλαδή στη δράση της ξανθικής οξειδάσης κατά το ήμισυ περίπου. Στις τρεις επόμενες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, 0,1 mM, 0,01 mM και 0,001 mM, η αναστολή κυμάνθηκε στα επίπεδα του 36%, του 38% και του 35% αντίστοιχα. Εμφανίζεται δηλαδή μια σταθερή αναστολή χωρίς πολύ μεγάλη διαφορά από την αρχική. Η διαφορά, βέβαια, είναι στατιστικά εξαιρετικά σημαντική αλλά δεν είναι τόσο απότομη όσο παρατηρήθηκε με άλλες πολυφαινόλες (ρουτίνη, γαλλικό οξύ, πρωτοκαχεϊκό οξύ). Σε αντίθεση, δηλαδή, με αυτές τις πολυφαινόλες η κατεκίνη

εμφανίζει σημαντική αναστολή ακόμα κι όταν η συγκέντρωσή της ελαττώνεται κατά δύο και τρεις τάξεις μεγέθους. Ανάλογη δράση με την κατεκίνη εμφανίζει και η επικατεκίνη. Στις τρεις συγκεντρώσεις της που μελετήθηκαν, 1 mM, 0,1 mM και 0,01 mM, προκαλεί αναστολή 26%, 25% και 19% αντίστοιχα. Εδώ, η αναστολή όταν βρίσκεται στην αρχική και μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι στο 1/4 περίπου της δράση της ξανθικής οξειδάσης απουσία της, όπως συμβαίνει και με τη δεύτερη συγκέντρωσή της. Στην τρίτη συγκέντρωσή της, η διαφορά στην αναστολή δεν είναι πολύ μεγάλη σε σχέση με τις δύο πρώτες συγκεντρώσεις (5-6%), όπως συνέβαινε με την κατεκίνη και είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτή της κατεκίνης (19% σε σχέση με 35% της κατεκίνης). Επιπλέον, το καφεϊκό οξύ εμφανίζει 100% αναστολή στην πρώτη συγκέντρωση. Στη δεύτερη συγκέντρωση η αναστολή πέφτει στο 58% ενώ στις δύο επόμενες συγκεντρώσεις (0,01 mM και 0,001 mM) η αναστολή κυμαίνεται στα επίπεδα του 31% και 32% αντίστοιχα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Lindahl, R** Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev Biochem. Mol. Biol.* 27, 283-335 (1992)
2. **Feron V. J., Til, H. P., de Vrijer, F., Woutersen, R. A., Cassee, F. R., & van Bladeren, P.J.** Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res.* 259, 363-385 (1991)
3. **Flath, R. A, Black, D. R., Guadagni, G. D., McFadden, W. H. & Schultz, M. T.,** *J Agric Food Chem.,* 15, 29 (1967)
4. **Moshonas, M. G.,** *J Agric Food Chem.,* 19, 769 (1971)
5. **Pyne, A. W. & Wick, E. L.,** *J. Food Sci.,* 30, 192 (1965)
6. **Whitfield, F. B. & Shipton, J.,** *J. Food Sci.,* 31, 328 (1966)
7. **Goretti, G., Sanchez, J. L., & Liberti, A.,** Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Off. Aromi Saponi Cosmet, *Aerosol,* 49, 145 (1967)
8. **Mehlinetz, A., & Minas, T.,** *Riechst Aromen Korpepflegem,* 15, 365 (1965)
9. Volatile Compounds in Food: Qualitative & Quantitative Data, Vols I, II & III, TNO CIVO Food Analysis Institute, Zeist
10. **Kuroda, Y & Inouye, T.,** Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria, *Mutat. Res.* 202, 387-391 (1988)
11. **Cerutti, P., Alzamora, S. M., Vidales, S. L.,** Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry puree, *J. Food Sci.* 62, 608-610 (1997)
12. **Bond, P. A.,** Metabolism of propranolol ('Inderal'), a potent, specific beta-adrenergic receptor blocking agent, *Nature (London),* 713, 721 (1967)
13. **Lamensdorf, I., Eisenhofer, G., Harvey-White, J., Nechustan, A., Kirk, K., Kopin, I. J.,** 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde potentiates the toxic effects of metabolic stress in PC12 cells, *Brain Res.* 868, 191-201 (2000)
14. **Henry, D. P., Russell, W. L., Clemens, J. A., & Plebus, L. A.,** Phenylethylamine and p-tyramine in the extracellular space of the rat brain: quantification using a new radioenzymatic assay and in situ microdialysis, *Trace Amines, Comparative and clinical Neurobiology (Boulton A. A. Jurio A. V. & Downer RGH, eds).* Humana Press, Clifton, NJ 239-250 (1988)
15. **Paterson I, A., Jurio A. V., & Boulton A. A.,** 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system, *J. Neurochem.* 55, 1827-1837 (1990)
16. **Dyck, L. A., Yang, C. R., & Boulton A. A.,** The biosynthesis of p-tyramine and β -Phenylethylamine by rat striatal slices, *J. Neurochem.* 10, 211-220 (1983)
17. **Barroso, N., & Rodriguez, M.,** Action β -Phenylethylamine and related amines on nigrostriatal dopamine neurotransmission, *Eur. J. Pharmacol.* 297, 195-203 (1983)
18. **Berry, M. D., Scarr, E., Zhu, M-Y, Paterson, I. A., & Jurio A. V.,** The effects of administration of monoamine oxidase-B inhibitors on rat striatal neuron responses to dopamine, *Br J. Pharmacol* 113, 1156-1166 (1994)
19. **Salach, J. I.,** Monoamine oxidase from beef liver mitochondria: simplified isolation procedure, properties and determination of its cysteinyl flavin content, *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 128-137 (1979)
20. **Wouters, J.,** Structural aspects of monoamine oxidase and its reversible inhibition, *Curr. Med. Chem.* 5, 137-162 (1998)
21. **Panoutsopoulos, G. I., Kouretas, Gounaris, E. G., D, Beedham, C.,** Metabolism of 2-Phenylethylamine and phenylacetaldehyde by precision-cut

- guinea pig fresh liver slices, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 29, 111-118 (2004)
22. **Martin, V. T., & Behbehani, M. M.**, Headache: Toward a rational understanding of migraine trigger factors, *Med. Clin. N. Am.* 85, 1-20 (2001)
 23. **Millichap, J. G., & Yee M. M.**, The diet factor in pediatric and adolescent migraine, *Pediatr. Neurol.* 28, 9-15 (2003)
 24. **Sandler, M., Youdim, M. B., & Hanington, E.**, A Phenylethylamine oxidizing defect in migraine, *Nature* 250, 335-337 (1974)
 25. **Quian, M., & Reineccius, G.**, Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry, *J. Dairy Sci.* 85, 1362-1369 (2002)
 26. **Hyotylainen, T., Savola, N., Lehtonen, P., & Riekkola, M. N.**, Determination of biogenic amines in wine by multidimensional liquid chromatography with online derivatisation, *Analyst* 126, 2124-2127 (2001)
 27. **Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J., & Ferreira, V.**, Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition: Partial least squares regression models, *J. Agric. Food Chem.* 51, 2700-2707 (2003)
 28. **Kerns, W. D., Pavkov, K. L., Donofrio, D. J., Gralla, E. J. & Swenberg, J. A.**, Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure, *Cancer Res.*, 43, 4382-4392 (1983)
 29. **Tobe, M., Naito, K., & Kurokaway, Y.**, Chronic toxicity study on formaldehyde administered orally to rats, *Toxicology*, 56, 79-86 (1989)
 30. **Woutersen, R. A., Van Garderen-Hoetmer, A., Bruyntjes, J. P., Zwart, A., & Feron, V. J.**, Nasal tumours in rats after severe injury to the nasal mucus and prolonged exposed to 10 ppm formaldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 9, 39-46 (1989)
 31. **Feron, V. J., Krysse, A., & Woutersen, R. A.**, Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapor alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18, 13-31 (1982)
 32. **Chung, F. L., Young, R., & Hecht, S. S.**, Formation of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde, *Cancer Res.* 44, 990-995 (1984)
 33. **Feron, V. J., & Krysse, A.**, Effects of exposure to furfural vapor in hamsters simultaneously treated with benzo(alpha)pyrene or diethylnitrosamine, *Toxicology*, 11, 127-144 (1978)
 34. **Durant, S., & Karran, P.** Vanillins – a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 31, 5501-2212 (2003)
 35. **Akagi, K., Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Ito, N., & Shrai, T.**, Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in rat medium term multi-organ carcinogenesis model, *Cancer Lett.* 94, 113-121 (1995)
 36. **Tsuda, H., Uehara, N., Iwahori, Y., Asamoto, M., Liogo, M., Nagao, M., Matsumoto, K., Ito, M., & Hirono, J.**, Chemoprotective effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat, *Jpn J. Cancer Res.* 85, 1214-1219 (1994)
 37. **Wang, Y., Hasuma, T., Yano, Y., Morishima, Y., Matsui-Yuasa, I., & Otani, S.** Induction of apoptosis in CTLL-2 cells by protocatechualdehyde. *Anticancer Res.* 21,1095-1101 (2001)
 38. **Wang, Y., Zhu, Z., Hasuma, T., Morishima, Y., Matsui-Yuasa, I., & Otani, S.** Modulation of ornithine decarboxylase activity and mitogen-

- activated protein kinases in protocatechualdehyde-induced apoptosis of CTLL-2 cells. *Anticancer Res.* 22, 3389-3394 (2002)
39. **Bray, R. C.**, Molybdenum iron/sulphur flavin hydroxylases and related enzymes. In the *Enzymes*, ed. Boyer, P. D., *Vol. 12 part B, 3rd edition*, Academic Press, London, p.300 (1975)
 40. **Felsted, R. L., Chu, A.E.-Y., & Chaykin, S.** Purification and properties of the aldehyde oxidase from hog and rabbit livers. *J. Biol. Chem.*, 248, 2580-2587 (1973)
 41. **Beedham, C., S. E. Bruce & D. J. Rance:** Tissue distribution of the molybdenum hydroxylases, aldehyde oxidase and xanthine oxidase, in male and female guinea pigs. *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet.* 12 303-306 1987
 42. **Bruce, S. E.**, "In species Variation and Tissue Distribution of Molybdenum Hydroxylase Activity", *Mphil Thesis, Bradford* (1988)
 43. **Sasaki, K., Hosoya, R., Wang, Y.-M., & Raulston, G. L.**, Formation and disposition of 7-hydroxymethotrexate in rabbits. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 503 (1983)
 44. **Badway, J.A., Robinson, J. M., Karnovsky, M.J., & Karnovsky, M. L.**, Superoxide production by an unusual aldehyde oxidase in guinea pig granulocytes. *J. Biol. Chem.* 256, 3479-3486 (1981)
 45. **Al-Khalidi, U.A.S., & Chaglassian, T. M.**, The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 97, 318-320 (1965)
 46. **Betz, A.L.**, Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J. Neurochem.*, 44, 574-579 (1985)
 47. **Tubaro, E., Lotti, B., Santiangeli, C., & Cavallo, G.**, Xanthine oxidase: an enzyme playing a role in killing mechanism of polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 3018-320 (1980)
 48. **Tubaro, E., Lotti, B., Santiangeli, C., & Cavallo, G.**, Xanthine oxidase increase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1945-1948 (1980)
 49. **Bruder, G., Jarash, E.-D., & Heid, H. W.**, High concentrations of antibodies to xanthine oxidase and animal sera (Molecular characterization). *J. Clin. Invest.*, 74, 783-794 (1984)
 50. **Critchley, D.J.P.**, In "Diazanaphthalenes as Probes of Molybdenum Hydroxylase Activity" *PhD Thesis, Bradford* (1989)
 51. **Woolfolk, C.A. & Downard, J.S.**, Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteria. *J. Bacteriol.*, 130, 1175 (1977)
 52. **Krenitsky, T.A., Tuttle, J.V., Cattau, E.L. & Wang, P.**, A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 49B, 687-703 (1974)
 53. **Krenitsky, T.A., Spector, T., & Hall, W.W.**, Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 108-119 (1986)
 54. **Beedham, C., Critchley, D.J.P.**, Substrate specificity of human liver aldehyde oxidase toward substituted quinazolines and phthalazines: a comparison with hepatic enzyme from guinea pig, rabbit and baboon, *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 481-490 (1995)
 55. **Panoutsopoulos, G. I., Beedham, C.**, Kinetics and specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase towards substituted benzaldehydes. *Acta Biochim Polon.* 51, 649-663 (2004)

56. **Klyosov, A. A.**, Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic and fused polycyclic aldehydes, *Biochemistry* 35, 4457-4467 (1996)
57. **Petterson, H., & Tottmar, O.**, Inhibition of aldehyde dehydrogenases in rat and liver by disulfiram and coprine, *J. Neurochem.* 39, 628-634 (1982)
58. **Panoutsopoulos, G. I., Kouretas, D, Beedham, C.**, Contribution of aldehyde oxidase, xanthine oxidase and aldehyde dehydrogenase on the oxidation of aromatic aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1368-1376 (2004)
59. **Panoutsopoulos, G. I., Beedham, C.**, Kinetics and specificity of guinea pig liver aldehyde oxidase and bovine milk xanthine oxidase toward substituted benzaldehydes, *Acta Biochimica Polonica* 51, (2004)
60. **Panoutsopoulos, G. I.**, Metabolism of 2-phenylethylamine to phenylacetic acid, via the intermediate phenylacetaldehyde, by freshly prepared and cryopreserved guinea pig liver slices, *In Vivo* 18, (2005)
61. **Panoutsopoulos, G. I., Beedham, C.**, Enzymatic oxidation of vanillin, isoanillin and protocatechuic aldehyde with freshly prepared guinea pig liver slices, *Cellular Physiology and Biochemistry* 15, (2005)
62. **Johns, D.G.**, Human liver aldehyde oxidase: Differential inhibition of oxidation of charged and uncharged substrates. *J. Clin. Invest.*, 46, 1492-1505 (1967)
63. **Morpeth, F.F.**, Studies on the specificity toward aldehyde substrate and steady-state kinetics of xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 744, 328-333 (1983)
64. **Booth, V.H.**, The specificity of xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 32, 494-502 (1938)
65. **Pelsy, G., & Klibanov, A.M.**, Remarkable positional (regio)specificity of xanthine oxidase and some dehydrogenases in the reactions with substituted benzaldehydes. *Biochim. Biophys. Acta*, 742, 352-357 (1983)
66. **Feldman, R.J., & Weiner, H.**, Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 247, 260-266 (1972)
67. **Palmer, G.**, The purification and properties of aldehyde oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 444-459 (1962)
68. **Hijikata, M.**, *Nichidai Igaku Zasshi*, 18, 1105 (1959)
69. **Felsted, R.L., & Chaykin, S.**, N1-methylnicotinamide oxidation in a number of mammals, *J. Biol. Chem.*, 242, 1274-1279 (1967)
70. **Johnson, J.L., Jones, H.P., & Rajagopalan, K.V.**, In vitro reconstitution of demolybdo sulphite oxidase by a molybdenum cofactor from rat liver and other sources. *J. Biol. Chem.*, 252, 4994-5003 (1980)
71. **Rajagopalan, K.V.**, Molybdopterins: problems and perspectives. *BioFactors*, 1, 273-278 (1988)
72. **Olson, J. S., Ballou, D. P., Palmer, G., & Massey, V.**, The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen. *J. Biol. Chem.*, 249, 4350 (1974)
73. **Branzoli, U., & Massey, V.**, Preparation of aldehyde oxidase in its native and dehalo forms (comparison of spectroscopic and catalytic properties). *J. Biol. Chem.*, 249, 4339 (1974)
74. **Olson, J. S., Ballou, D. P., Palmer, G., & Massey, V.**, The mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 249, 4363 (1974)
75. **Coughlan, M.P. & Ni Fhaolain, I.**, On the sites of interaction of oxidizing substrates with molybdenum iron/sulphur flavin hydroxylases. *Proc. R. Ir Acad.*, 79B, 169-175 (1979)

76. **Spence, J. T., Barber, M. G., & Siegel, L. M.**, Determination of the stoichiometry of electron uptake and the midpoint reduction potentials of milk xanthine oxidase at 25 degrees (by microcoulometry), *Biochemistry*, *21*, 1656-1661 (1982)
77. **Fridovich, I., & Handler, P.**, Differential inhibition of the reduction of various electron acceptors. *J. Biol. Chem.*, *237*, 916 (1962)
78. **Coughlan, M. P., Rajagopalan, K. V., & Handler, P.**, The role of molybdenum in xanthine oxidase and related enzymes (Reactivity with cyanide, arsenite and methanol). *J. Biol. Chem.*, *244*, 2658 (1969)
79. **Pick, F. M., McGartoll, M. A., & Bray, R. C.**, Reaction of formaldehyde and of methanol with xanthine oxidase. *Eur. J. Biochem.*, *18*, 65 (1971)
80. **Kim, S. H.**, Effect of biogenic amines on the hepatic aldehyde oxidase activity in rabbit. *Korean J. Food Nutrition*, *12*, 57-61 (1983)
81. **Johnson, C., Stuble-Beedham, C., & Stell, J. G. P.**, Elevation of molybdenum hydroxylase levels in rabbit liver after ingestion of phthalazine or its hydroxylated metabolite. *Biochem. Pharmacol.*, *33*, 3699-3705 (1984)
82. **Coughlan, M. P.**, In "Molybdenum and Molybdenum Containing Enzymes:", ed. Coughlan, M. P., *Pergamon Press Ltd.* (1980)
83. **Rajagopalan, K. V., Fridovich, I., & Handler, P.**, Hepatic aldehyde oxidase: Purification and properties *J. Biol. Chem.*, *237*, 922-928 (1962) (A)
84. **Bravo, L.**, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* *56*, 317-333 (1998)
85. **Harborne, J.B.**, *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman and Hall, London, 1993
86. **Singleton, V.L.**, Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods, *Adv. Food Res.* *27*, 149-242 (1981)
87. **Lijinsky, W.**, N-Nitroso compounds in the diet, *Mutat. Res.* *443*, 129-138 (1999)
88. **Pignatelli, B., Friesen, M., Walker, E.A.**, The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation, in: E.A.Walker, I.Griciute, M. Castegnaro, M. Borzsonyi (Eds.), *N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence*, *IARC Scientific Publications*, Vol. 31, Lyon, 1980, pp. 95-110. *Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 2690-2694 (1993)
89. **Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D.**, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderley study, *Lancet* *342*, 1007-1011 (1993)
90. **Hertog, M.G.L., Sweetnam, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C., Kromhout, D.**, Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study, *Am. J. Clin. Nutr.* *65* (1997) 1489-1494. in *Escherichia coli B*, *Mutat. Res.* *243*, 273-280 (1990)
91. **Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, C., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S.**, Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, *Arch. Int. Med.* *155*, 381-386 (1995)
92. **Hertog, M.G., Bueno-de-Mesquita, H.B., Fehily, A.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C., Kromhout, D.**, Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study, *Cancer Epidemiology, Biomark. Prev.* *5*, 673-677 (1996)
93. **Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y.**, Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants, *Annals of the N.Y. Academy of Sciences* *854*, 425-434 (1998)

94. **Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilibert, I.,** Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion, *Free Rad. Biol. Med.* 25, 1057–1065. 5398–5404 (1998)
95. **Sahu, S.C., Gray, G.C.,** Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei, *Food Chem. Toxicol.* 35, 443–447 (1997)
96. **Middleton Jr, E., Kandaswami, C.,** Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions, *Biochem. Pharmacol.* 43, 1167–1179 (1992)
97. **Ferguson, L.R., Whiteside, G., Holdaway, K.M., Baguley, B.C.,** Application of fluorescence in situ hybridisation to studying the relationship between cytotoxicity, chromosomal aberrations and changes in chromosome number after treatment with the topoisomerase II inhibitor, amsacrine, *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 255–262 (1996)
98. **Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K.,** Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells, *Eur. J. Cancer* 35, 1517–1525 (1999)
99. **Cambie, R.C., Brewis, A.A.,** Antifertility plants of the Pacific, CSIRO, Australia, 181 pp. 1997
100. **Adlercreutz, C.H., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Hockerstedt, K.A., Watanabe, S., Hamalainen, E.K., Markkanen, M.H., Makela, T.H., Wahala, K.T., Adlercreutz, T.,** Soybean phytoestrogen intake and cancer risk, *J. Nutr.* 125 (3Suppl.), 757S–770S (1995)
101. **Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, J.L.,** Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14138–14143 (1997)
102. **Lerner, L.J., Jordan, V.C.,** Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Bruce Cain memorial award lecture, *Cancer Res.* 50, 4177–4189 (1990)
103. **Beedham, C, Bruce, SE, Critchley DJ, Rance DJ.,** 1-Substituted pthalazines as probes of the substrate-binding site of mammalian molybdenum hydroxylases. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1213-1221 (1990)
104. **Beedham, C, Bruce, SE, Critchley DJ, Al-Tayib Y, Rance DJ.,** Species variation in hepatic aldehyde oxidase activity. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 12, 307-310 (1987)
105. **Rajagopalan, KV, Handler, P.,** Hepatic aldehyde oxidase: The substrate-binding site, *J Biol Chem* 239, 2027-35 (1964)
106. **Wilkof, C. A., Korus, R. A., Crawford, D. L., Pometto, III A. L.,** Enzymatic oxidation of aromatic aldehydes, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 14, 419-423