

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



Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ**

**Φίλιου Ελένη-Άννα**

**Λάρισα 2007**



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

Αριθ. Εισ.: 6175/1  
Ημερ. Εισ.: 17-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΦΙΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087345

Αφιερωμένη στον πατέρα μου που έφυγε νωρίς...  
(4-11-2004)

"Το τραίνο εκτροχιάζεται,

Το πλοίο ναυαγεί,

τ' αεροπλάνο συντρίβεται.

Ένα μονάχα επισκεπτήριο στον πάγο χαραγμένο.

Αν είχα δικαίωμα εκλογής

Να ξαναρχίσω ή όχι τούτο το ταξίδι,

Θα το ξανάρχιζα."

(Ναζίμ Χικμέτ)



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, την πολύτιμη βοήθεια του και την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νικολαΐδη Μιχάλη για την υπομονή του, τις γνώσεις που μου προσέφερε, τις συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθεια του τόσο κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κύπαρο Αντώνη για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος και την ευχάριστη συνεργασία.

Ευχαριστώ τις κ. Σπανού Χρυσούλα και Καραγιάννη Άννα για την ευχάριστη συνεργασία και βοήθεια κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού πειράματος καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες μου Φιλιπώνη Μαρία και Φλώρου Ζωή για την ευχάριστη συνεργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
1.0	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Ελεύθερες ρίζες	3
1.1.1	Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες?	3
1.1.2	Δραστικές οξειδωτικές οξυγονούχες ενώσεις (REACTIVE OXYGEN SPECIES – ROS)	9
1.1.3	Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογία της κυτταρικής λειτουργίας, στο μεταβολισμό και στη μεταγωγή σημάτων για ενδοκυτταρική επικοινωνία	15
1.2	Αντιοξειδωτική Άμυνα	21
1.2.1	Αντιοξειδωτικές Πρωτεΐνες	23
1.2.2	Αντιοξειδωτικά μικρού μοριακού βάρους των οποίων η βιοσύνθεση γίνεται <i>in vivo</i>	29
1.2.3	Αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται με την διατροφή	43
1.2.4	Οξειδωτικό stress	71
1.2.5	Πράσινο τσάι	75
1.2.1	Αντιοξειδωτικές Πρωτεΐνες	23
1.2.1	Αντιοξειδωτικές Πρωτεΐνες	23
2.0	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	80
3.0	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	81
3.1	Συμμετέχοντες	81
3.2	Αιμοληψία	81
3.3	Ορός αίματος και αιμόλυμα	81
3.4	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (Total Antioxidant Capacity)	82
3.5	Καταλάση	83
4.0	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ	84
4.1	Καταλάση	84
4.2	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (TAC)	85
5.0	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
5.1	Γενικά	86
5.1.1	Σύγκριση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής εργασίας με τα αποτελέσματα άλλων μελετών για το πράσινο τσάι	87
5.1.3	Σύγκριση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής εργασίας με τα αποτελέσματα άλλων μελετών για την άσκηση	88
5.2	Συμπεράσματα	90
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91

## EΙΚΟΝΕΣ

1.1	Δομή ατόμου και μορίου οξυγόνου	1
1.2	Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	3
1.3	Μονοπάτια αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Ο σχηματισμός του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου	9
1.4	Η οικογένεια των ROS περιλαμβάνει μόρια που είναι ρίζες και άλλα που δεν είναι, αλλά παρουσιάζουν μεγάλη δραστικότητα	13
1.5	Τα ROS (κίτρινο πλαίσιο) σχηματίζονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε ως παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, είτε ως σηματοδοτικά μόρια (μπλε πλαίσιο). Οι επιπτώσεις των ROS στον οργανισμό διαχωρίζονται σε θετικές και αρνητικές (πράσινο πλαίσιο). Ωστόσο, υπάρχει πάντα μία λεπτή ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της δράσης των αντιοξειδωτικών μορίων (κόκκινο πλαίσιο). (από: Gabi Nindl, Cellscience Reviews, Vol 1, No 2, 2004)	15
1.6	Ρόλος των ROS στην αντιμετώπιση των μολύνσεων (από: Peter H., Free Radicals and Human Disease)	18
1.7	Τρισδιάστατη δομή της Cu-Zn SOD (από : <a href="http://www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/MSI/MSIenzymes/enzymesmsi.html">www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/MSI/MSIenzymes/enzymesmsi.html</a> )	24
1.8	Τρισδιάστατη δομή καταλάσης (από: Brannon Carter & Robin L. Carter, Catalase: An Enzyme at Work)	25
1.9	Αντίδραση καταλάσης (από: <a href="http://metallo.scripps.edu/Promise">http://metallo.scripps.edu/Promise</a> )	26
1.10	Τρισδιάστατη δομή GSH-Px	26
1.11	Σύνθεση GSH, ανακύκλωση GSH-GSSG & συμμετοχή GSH στην αναγωγή της βιταμίνης C	31
1.12	Το τριπεπτίδιο & η οξειδωμένη μορφή της GSH (από : Lubert Stryer: Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1997, 2 <sup>η</sup> έκδοση)	31
1.13	Η δομή της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης. Στην εικόνα απεικονίζεται ενωμένη με ένα μόριο FAD (από: PAI X-RAY CRYSTALLOGRAPHY LAB)	33
1.14	Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης ( από: James A. Thomas BB 404 Supplement/1999)	34
1.15	Η ουβικινόνη (Q) ανάγεται προς ουβικινόλη (QH <sub>2</sub> ) μέσω μίας ενδιάμεσης ημικινόνης (QH) (από: Stryer L., 1997)	34
1.16	Δομή ουρικού οξέος	40
1.17	Δομή ασκορβικού οξέος (από: <a href="http://www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/MSI/MSIenzymes/enzymesmsi.html">www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/MSI/MSIenzymes/enzymesmsi.html</a> )	45
1.18	Βιταμίνη E	48
1.19	Η βιταμίνη E ενσωματώνεται με την λιπόφιλη ουρά της στη λιπιδική διπλοστοιβάδα και την προστατεύει από οξειδωτική βλάβη. (από: Garrett D. Guy, JAAPA Archive, 1997)	52

1.20	α-καροτένιο	55
1.21	Διαφορετικές διατροφικές πηγές πολυφαινόλων	57
1.22	Κόκκινα σταφύλια, σημαντική πηγή κατεχινών	58
1.23	Η δομή της απιγενίνης	59
1.24	Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων.	72
1.25	Πράσινο τσάι	75
1.26	Οι κύριες πολυφαινόλες στο πράσινο τσάι (από: <i>Michael D. Brown. Green Tea (Camellia Sinensis) Extract and Its Possible Role in the Prevention of Cancer. Alt Med Rev 1999, 4(5):360-370</i> )	76

## ΠΙΝΑΚΕΣ

1.1	Η ονομασία, καθώς και η χημική δομή των διαφόρων δραστικών ειδών του οξυγόνου (ROS)	14
-----	---	----

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ADP** – διφωσφορική αδενοσίνη  
**AMP** – μονοφωσφορική αδενοσίνη  
**ATP** – τριφωσφορική αδενοσίνη  
**CAT**- καταλάση  
**Q10** – ουβικινόνη 10  
**DPPH** – 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl  
  
**DTNB** – 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)  
**EC** – επικατεχίνη  
**EGC** - επιγαλλοκατεχίνη  
**GPX** – υπεροξειδάση της γλουταθειόνης  
**GSH** – ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης  
**GSSG** – οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης  
**L<sup>•</sup>** – λιπιδιακή ρίζα  
**LOO<sup>•</sup>** – λιπούπεροξειδική ρίζα  
**LA** – α-λιποϊκό οξύ  
**MDA** – μαλονδυαλδεύδη  
**NADPH**- φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοσίδιο  
**Q** - ουβικινόνη  
**QH<sup>•</sup>** - ημικινόνη  
**QH<sub>2</sub>** - ουβικινόλη  
**ROO<sup>•</sup>** – λιπούπεροξειδική ρίζα  
**ROOH**- λιπούπεροξείδιο  
**ROS** – δραστικά είδη οξυγόνου  
**SOD** – δισμουτάση του υπεροξειδίου  
**TAC** – ολική αντιοξειδωτική ικανότητα  
**TBARS** – ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ  
**TCA** – τριγλωροξικό οξύ  
**XO** – οξειδάση ξανθίνης



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

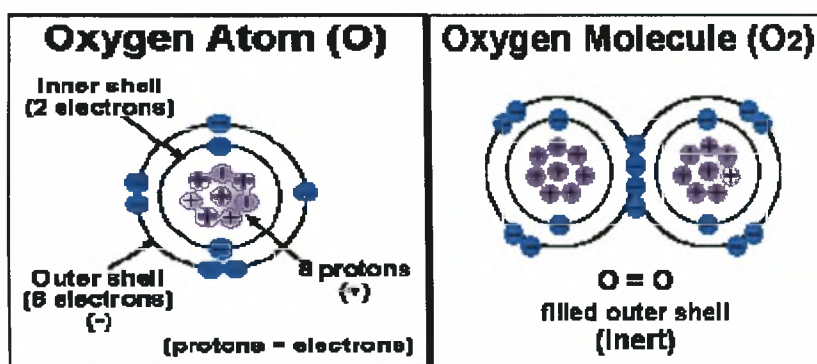
Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα έρευνες είναι γνωστό πως η φυσική άσκηση αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατ' επέκταση, η άσκηση αποτελεί σημαντική πηγή οξειδωτικού stress. Σκοπός λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδωτικού stress σε άτομα που δεν ασχολούνται επαγγελματικά με τον αθλητισμό, λαμβάνοντας παράλληλα πράσινο τσάι, με στόχο τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του στο επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό stress. Για το λόγο αυτό μετρήθηκαν πριν και μετά την άσκηση, καθώς και πριν και μετά τη λήψη πράσινου τσαγιού, η δραστικότητα της καταλάσης και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (TAC Total Antioxidant Capacity), τα οποία αποτελούν δείκτες υπεροξείδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνικής βλάβης, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι μετρήσεις μας έδειξαν μεν στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σχετικά με την αντίδραση του οργανισμού στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό stress, αλλά στατιστικά αδιάφορη μεταβολή όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση του πράσινου τσαγιού, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην χορηγούμενη δόση του πράσινου τσαγιού

Ταυτόχρονα, υπήρξε συνεργασία με άλλες δύο διπλωματικές εργασίες που προσδιόρισαν τα επίπεδα της μαλοναλδεϋδης (MDA) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, της ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης καθώς και του λόγου αυτών (GSH/GSSG) για να επιτευχθεί μία ολοκληρωμένη εικόνα γύρω από το πώς αντιδρά ο οργανισμός στο οξειδωτικό stress με την ταυτόχρονη λήψη αντιοξειδωτικών. Και στις δύο αυτές εργασίες, επίσης, παρατηρήθηκαν παρόμοιες στατιστικά μεταβολές των εν λόγω δεικτών. Τα αποτελέσματα των τριών εργασιών συγκλίνουν στο γεγονός ότι η άσκηση αυξάνει σημαντικά το οξειδωτικό stress, αλλά το πράσινο τσάι έχει μεν θετική δράση χωρίς όμως να παρέχει τη δυνατότητα αποτελεσματικής αντιμετώπισης των αρνητικών επιδράσεων που προκαλεί το οξειδωτικό stress .

## 21.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

«Ουδέν καλόν αμιγές κακού»: Το στοιχείο οξυγόνο (O) βρίσκεται στον αέρα που αναπνέουμε με τη μορφή διατομικού μορίου ( $O_2$ ) και αποτελεί το 21% του ατμοσφαιρικού αέρα. Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί (ζώα, φυτά, βακτηρίδια) χρειάζονται το οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας. Ενώ, όμως, το οξυγόνο είναι απαραίτητο στοιχείο για τη ζωή, κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να γίνει πολύ τοξικό. Η τοξικότητά του σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 21% είναι γνωστή από πολύ παλαιά (κατάδυση, υποβρύχια κολύμβηση κ.λ.π.). Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις, ακόμη και σε συγκεντρώσεις 21%, μπορεί να έχει τοξική επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς. Η επίδραση αυτή ποικίλλει ανάλογα με τον οργανισμό, την ηλικία, τη φυσιολογική κατάσταση, αλλά και τη διατροφή (Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999). Η R. Gershman και ο D. Gilbert το 1954, για να εξηγήσουν την τοξικότητα του οξυγόνου πρότειναν τη θεωρία των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η θεωρία αυτή ενοχοποιεί για την τοξικότητα του οξυγόνου τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που παράγονται κατά τον μεταβολισμό του και όχι το ίδιο το οξυγόνο. Η θεωρία αυτή στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και αναπτύχθηκε από τους J. McCord και I. Fridovich το 1969, με την ανακάλυψη της ρίζας του υπεροξειδίου.



Εικόνα 1.1 – Δομή ατόμου και μορίου οξυγόνου

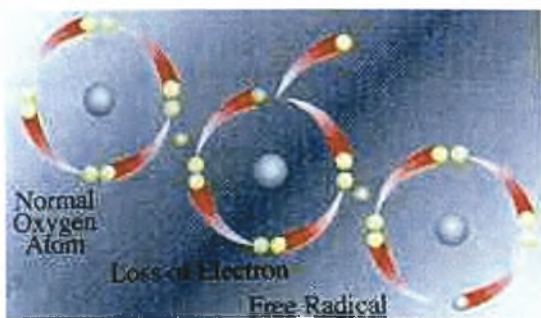
Με την αύξηση της συγκέντρωσης του  $O_2$  στην ατμόσφαιρα (το άζωτο είναι αδρανές αέριο και το μίγμα είναι ιδανικό για τους ζωντανούς οργανισμούς) και το διαλυμένο μέρος του στα νερά, οι οργανισμοί άρχισαν να προσαρμόζονται στη

χρήση του για μεταβολικούς μηχανισμούς και ενέργεια, αλλά συγχρόνως προώθησαν τη δημιουργία ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών για την προστασία τους από την τοξικότητά του. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν αερόβιοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν το οξυγόνο, αλλά και προστατεύονται σε σημαντικό βαθμό από τις τοξικές δράσεις. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «παράδοξο του Οξυγόνου» (*Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock gr, 1980*). Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών δράσεων και μεταβολισμού του O<sub>2</sub> με χαμηλή τοξικότητα πρέπει να συνέβαλε σε σημαντικό βαθμό στη μακροβιότητα του ανθρώπου και άλλων ζώων (*Streyer L, 1989*). Παρόλα αυτά η δράση των ελευθέρων ριζών, το οξειδωτικό stress και η φθορά των αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκαλεί προοδευτικά βλάβες στα βιομόρια και γήρανση των βιολογικών οργανισμών. Σήμερα, η θεωρία των «ελευθέρων ριζών» για τη γήρανση των βιολογικών οργανισμών συμφωνεί σε σημαντικό βαθμό με τα πολυάριθμα επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα [(*Cutler RG, 1984*), (*Harman D, 1956*)].

## 1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

### 1.1.1 Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες?

Σε έναν κανονικό ομοιοπολικό δεσμό, τα δύο ηλεκτρόνια που συμμετέχουν σε ένα μοριακό τροχιακό είναι *συζευγμένα* (paired) και έχουν αντιπαράλληλο σπιν.



Εικόνα 1.2 – Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.

Αντίθετα, στις *ρίζες* (radicals), που ονομάζονται και *ελεύθερες ρίζες* (free radicals, FRs), ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια σε ένα ή περισσότερα ατομικά ή μοριακά τροχιακά είναι *ασύζευκτο* ή *ασύζευκτα* (unpaired) και έχουν παράλληλο σπιν. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που περιέχουν ένα ή

περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell B, Gutteridge JMC, 1990). Ο ευρύς αυτός ορισμός συμπεριλαμβάνει το άτομο του υδρογόνου (H) που έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, το μόριο του οξυγόνου (O<sub>2</sub>) που έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, το οξειδίο του αζώτου (NO) που έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, καθώς και τα περισσότερα μεταβατικά μέταλλα, όπως ο Fe<sup>2+</sup> και ο Fe<sup>3+</sup>, που έχουν αντίστοιχα 4 και 5 ασύζευκτα ηλεκτρόνια, καθώς και ο Cu<sup>2+</sup> που έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (τα περισσότερα στοιχεία μετάπτωσης παρουσιάζουν παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω μονήρους ασύζευκτου ηλεκτρονίου σε εξωτερική στιβάδα σθένους). Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να υπάρχουν δύο ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια, αλλά να απέχουν σημαντικά μεταξύ τους ώστε να μην υπάρχει σύζευξη. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς – δραστικές ενώσεις και τείνουν να αποσπών ένα άτομο με ηλεκτρόνιο για τη δημιουργία ζεύγους. Μία τυπική αντίδραση δύο ριζών υδρογόνου:



Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με χημικά μόρια αποσπώντας ένα τμήμα τους, κυρίως άτομα υδρογόνου, ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει η απόσπαση αυτή από οργανικές ενώσεις (RH):



Οι αντιδράσεις αυτές συνήθως δημιουργούν αλυσιδωτή αντίδραση που μπορεί σε βιολογικά συστήματα να προκαλέσουν τοξικές βλάβες ή θραύσεις σε βιομόρια (π.χ. υπεροξειδωση λιπιδίων μεμβρανών κυττάρων ή θραύσεις κλώνων σε DNA). (Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999)

Το είδος των οξυγονούχων ελευθέρων ριζών που απαντούν σε κυτταρικές διεργασίες φέρει το μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο, αλλά υπάρχουν και ρίζες με το μονήρες ηλεκτρόνιο σε άτομο άνθρακα, αζώτου ή θείου. Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες είναι (Pryor WA, 1986):

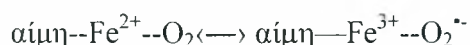
- Ρίζα υδροξυλίου (hydroxyl radical, HO<sup>•</sup>)
- Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος (superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)
- Ρίζα υδροϋπεροξυλίου (hydroperoxyl radical, HOO<sup>•</sup>)
- Ρίζα αλκοξυλίου (alkoxyl radical, RO<sup>•</sup>)
- Ρίζα υπεροξυλίου (peroxyl radical, ROO<sup>•</sup>)
- Ρίζα ακυλοξυλίου (acyl radical, RC=OO<sup>•</sup>)
- Ρίζα ακυλοϋπεροξυλίου (acylperoxyl radical, RC=OOO<sup>•</sup>)
- Ρίζα αρυλοξυλίου (aryloxyl radical, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sup>•</sup>, ArO<sup>•</sup>)
- Ρίζα αρυλοϋπεροξυλίου (arylperoxyl radical, ArOO<sup>•</sup>)
- Ρίζα βενζο-ημικινόνης (semiquinone radical, HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O<sup>•</sup>)
- Ρίζα θειύλο- (thiyl radical, RS<sup>•</sup>)
- Ρίζα μεθυλίου (methyl radical, <sup>•</sup>CH<sub>3</sub>)
- Ρίζα τριτοταγούς αλκυλο- ομάδας [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C<sup>•</sup>]
- Ρίζα φαινοξυλίου (phenoxy radical, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-O<sup>•</sup>)
- Ρίζα διαλκυλοαμινυλο- ομάδας (dialkylaminyl radical, R<sub>2</sub>N<sup>•</sup>).

Άλλες ελεύθερες ρίζες με μονήρες ηλεκτρόνιο είναι τα οξειδία του αζώτου (NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στους βιολογικούς οργανισμούς. Τέλος, οι οξυγονούχες δραστικές ενώσεις (reactive oxygen species- ROS) δεν είναι ελεύθερες ρίζες, αλλά πολύ εύκολα παράγουν (με επίδραση μετάλλων) ελεύθερες ρίζες. Πολλές από αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο σε οξειδωτικές διεργασίες στα βιολογικά συστήματα: όζον (O<sub>3</sub>), υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), νιτρώδες οξύ

(HNO<sub>2</sub>), υποχλωριώδες οξύ (HOCl), υπεροξυνιτρώδες ανιόν (peroxy-nitrite, ONOO<sup>-</sup>), υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONNOH), νιτροζυλο-κατιόν (nitrosyl cation, NO<sup>+</sup>) (Βαλαβανίδης Α, 2004).

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κατά τις κυτταρικές διεργασίες από ενδογενείς φυσιολογικούς μηχανισμούς ή κάτω από την επίδραση εξωτερικών επιδράσεων. Το υπεροξειδικό ανιόν (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) είναι λιγότερο δραστικό από τη ρίζα υδροξυλίου, ιδιαίτερα σε υδατικά διαλύματα με ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες. Στο εργαστήριο μπορεί να παραχθεί ηλεκτροχημικά, από διάφορα υπεροξειδικά άλατα μετάλλων, με ραδιολυτική ακτινοβολία, από ένζυμα και με φωτοχημικές αντιδράσεις. Μίγματα ξανθίνης και οξειδάσης της ξανθίνης χρησιμοποιούνται σε βιολογικά εργαστήρια για την παραγωγή του O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (Sawyer DT, Valentine JS, 1981) Το υπεροξειδικό ανιόν παράγεται ενδογενώς *in vivo* σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς από ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα και από αρκετά ένζυμα με την αναγωγή του O<sub>2</sub> κατά την αντίδραση με ηλεκτρόνια [O<sub>2</sub> → e<sup>-</sup> → O<sub>2</sub><sup>-</sup>]. Υπάρχει μεγάλος αριθμός ενζύμων, όπως οι υπεροξειδάσες (φυτά, βακτήρια), η οξειδάση της ξανθίνης (έντερα, ισχαιμικοί ιστοί), η 2,3-διοξειδάση της ινδολεαμίνης (διάφοροι ιστοί ζώων), η δυοξυγενάση της τρυπτοφάνης (ήπαρ), η αλδεϋδική οξειδάση (ήπαρ), η οξειδάση της γαλακτόζης (μύκητες) κλπ. που παράγουν το υπεροξειδικό ανιόν (De Groot H, Litauer A, 1989). Αρκετά σημαντικά βιομόρια οξειδώνουν το O<sub>2</sub> σε υπεροξειδικό ανιόν, όπως η γλυκεραλδεϋδη, οι ορμόνες αδρεναλίνη, η L-DOPA (δυδροξυφαινυλαανίνη), τετραϋδρο-πτερίνες κ.ά., η κυστεΐνη, οι ανηγμένες δομές του μονονουκλεοτιδίου της φλαβίνης και το νουκλεοτίδιο της φλαβινοαδενίνης. Οι αντιδράσεις αυτές αυτο-οξειδωσης, επειδή το O<sub>2</sub> είναι ελάχιστα δραστικό, ξεκινούν και επιταχύνονται με την παρουσία μεταλλικών ιόντων (σίδηρος, χαλκός). (Fridovitch I, 1983)

Υπεροξειδικό ανιόν παράγεται επίσης κατά τη διεργασία δέσμωσης του O<sub>2</sub> από την αίμη στην αιμοσφαιρίνη. Στη διαδικασία αυτή:



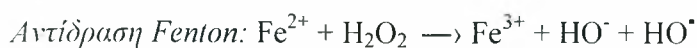
γίνεται απεντόπιση ηλεκτρονίων και πολύ συχνά ένα μόριο οξυαιμοσφαιρίνης διασπάται με απελευθέρωση O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (Brandley RE, 1993) Ωστόσο, η πιο σημαντική πηγή O<sub>2</sub><sup>-</sup> *in vivo* στα αερόβια κύτταρα είναι οι βιοχημικές αλυσίδες μεταφοράς

ηλεκτρονίων. Οι αλυσίδες αυτές λειτουργούν σε πολλές βακτηριακές μεμβράνες και μέσα στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, υπολογίζεται ότι το 1-3% του  $O_2$  που ανάγεται στα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε  $O_2^{\cdot-}$ . (Turrens JF, 1997) Επίσης, βλάβες στα μιτοχόνδρια ευνοούν τη διαρροή ηλεκτρονίων και την αυξημένη παραγωγή  $O_2^{\cdot-}$ . Η παραγωγή οξυγονούχων ελευθέρων ριζών από την αναπνοή μιτοχονδρίων έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούνται βλάβες σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA, με σημαντική αύξηση κατά την γήρανση [(Hayakawa M, Hattari K, Sugiyama S, Ozawa T, 1992), (Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN, 1994)]. Οι μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακό DNA έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σε μεγάλο αριθμό ασθενειών (Wallace DC, 1997). Υπεροξειδικό ανιόν και υπεροξειδίο του υδρογόνου έχουν βρεθεί ότι παράγονται και σε υποκυτταρικά κλάσματα που περιέχουν ενδοπλασματικό δίκτυο από διάφορους ιστούς με την παρουσία NADPH, ενώ η παραγωγή αυξάνεται παρουσία  $O_2$ . Η διεργασία επιτυγχάνεται μέσω αναγωγής ενός ηλεκτρονίου καταλυόμενη από το σύμπλοκο σύστημα της οξειδάσης NADPH:



Το σχηματιζόμενο  $O_2^{\cdot-}$  μετατρέπεται εύκολα σε άλλες οξυγονούχες ρίζες και δραστικές οξυγονούχες ενώσεις ( $HO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$ ) (Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H, 2001).

Η ρίζα υδροξυλίου ( $HO^{\cdot}$ ) είναι η πλέον σημαντική ελεύθερη ρίζα για βλάβες σε βιολογικά συστήματα. Μπορεί να παραχθεί σε βιολογικά υγρά με διάφορες αντιδράσεις, όπως η αντίδραση Fenton, η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από υπεριώδη ακτινοβολία, από το υποχλωριώδες οξύ με το υπεροξειδικό ανιόν, από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας στο νερό ή από την επίδραση υπερήχων σε υδατικά διαλύματα, καθώς και από όζον σε υδατικά διαλύματα κλπ. [(Liochev SI, Fridovitch I, 1994), (Sutton HC, Winterbourn CC, 1989)]



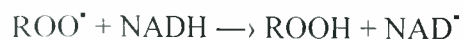
(η αντίδραση αυτή καταλύεται και από άλλα στοιχεία – μέταλλα μετάπτωσης)

Η ρίζα υδροξυλίου είναι πολύ δραστική και ο χρόνος ημιζωής της είναι  $10^{-9}$  sec (37 °C). Οι αντιδράσεις της με οργανικές ενώσεις είναι τριών ειδών: απόσπαση υδρογόνου, προσθήκη και μεταφορά ηλεκτρονίου και αντιπροσωπεύουν τις κλασικές ριζικές αντιδράσεις που παρατηρούνται στην οργανική χημεία. Η ρίζα υδροξυλίου εξηγεί σε σημαντικό βαθμό την καρκινογόνο δράση ορισμένων ξеноβιοτικών ρύπων και συγκεκριμένα κακοήθη νεοπλάσματα (καπνός του τσιγάρου – καρκίνος του πνεύμονα, ίνες αμιάντου – καρκίνος του πνεύμονα). (Valavanidis A, Balomenou H, Macropoulou I, Zarodimos I, 1996) Αντίθετα, η εκκαθάριση ριζών υδροξυλίου από αντιοξειδωτικές ουσίες (μαννιτόλη, βιταμίνες κλπ.) ή παρεμπόδιση της δράσης τους και μείωση των βλαβών σε βιομόρια με διάφορες ουσίες ερμηνεύει την αντικαρκινογόνο δράση ουσιών και φαρμάκων. (Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB, 1987)

Άλλες ελεύθερες ρίζες που μπορούν να δημιουργηθούν σε βιολογικά συστήματα είναι οι αλκοξυλο- ρίζες ( $RO^{\bullet}$ ) και οι υπεροξυλο- ρίζες ( $ROO^{\bullet}$ ). Οι ρίζες αυτές υπόκεινται σε ταχύτατη μοριακή μετάθεση προς άλλες οργανικές ρίζες (Paya M, Halliwell B, Hoult JR, 1992). Οι ελεύθερες αυτές ρίζες έχουν την ικανότητα απόσπασης  $H^{\bullet}$  από μόρια λιπιδίων που οδηγούν στη λιπιδική υπεροξειδωση. Η έναρξη γίνεται συνήθως με την απόσπαση ενός πρωτονίου (H) από μεθυλενική ομάδα ( $-CH_2-$ ) από αλυσίδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Halliwell B, Gutteridge JMC, 1984).



Οι ρίζες αυτές μπορούν, επίσης, να αντιδράσουν με το ασκορβικό ανιόν (οξειδωση) και το NADH, αντίδραση που οδηγεί στο σχηματισμό  $O_2^{\bullet-}$  παρουσία οξυγόνου:

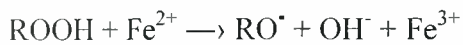
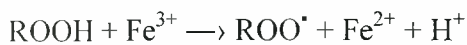




Οι αλκοξυλο- και υπεροξυλο- ρίζες δημιουργούνται από την προσβολή οργανικών ουσιών με ρίζα υδροξυλίου, λόγω σχηματισμού ριζών με το μονήρες ηλεκτρόνιο σε άνθρακα και αυτές οι ρίζες σε αερόβιες συνθήκες αντιδρούν με οξυγόνο:



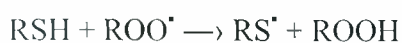
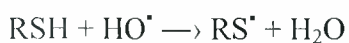
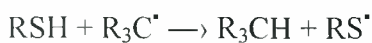
Τα περισσότερα οργανικά υπεροξειδία είναι σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου αλλά διασπώνται με τη θέρμανση, με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία ή με την προσθήκη μετάλλων, όπως του σιδήρου:



Αυτές οι αντιδράσεις αποτελούν τον κύριο κορμό των αντιδράσεων ελευθέρων ριζών που λαμβάνουν χώρα κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση με την παρουσία στοιχείων μετάπτωσης σε βιολογικά συστήματα.

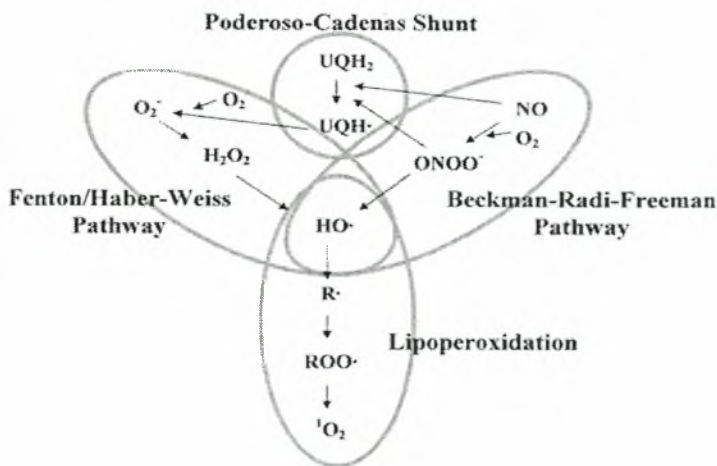
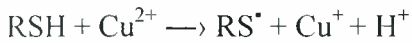
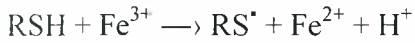
Οι θειύλο- ρίζες με το μονήρες ηλεκτρόνιο στο θείο είναι επίσης μεγάλης βιολογικής σημασίας ( $-S^{\bullet}$ ). Σε βιολογικούς οργανισμούς, οι θειόλες (ειδικά η ανηγμένη γλουταθειόνη) θεωρούνται αντιοξειδωτικοί παράγοντες λόγω της προστασίας της ομάδας  $-SH$  των πρωτεϊνών από την οξειδωση και μπορούν να εξουδετερώσουν οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες, ROS, υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH) (*Wardman P, von Sonntag P, 1995*).

Οι θειύλο- ρίζες σχηματίζονται από θειόλες που αντιδρούν με ανθρακο- ρίζες (μονήρες ηλεκτρόνιο στον άνθρακα) και με οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες:



Οι θειύλο- ρίζες συμμετέχουν στις βλαβερές δράσεις διαφόρων τοξινών (γλιοτοξίνης, διφαινυλοδισουλφιδίου κλπ.) σε ζώα. Οι θειύλο- ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν από θειόλες κατά την οξειδωσή τους από υπεροξειδάσες και

πρωτεΐνες της αίμης, καθώς και με την επίδραση μετάλλων μετάπτωσης ή από την ομολυτική διάσπαση δισουλφιδίων (δισουλφιδικές γέφυρες σε πρωτεΐνες):

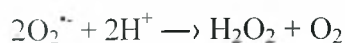


Εικόνα 1.3 – Μονοπάτια αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Ο σχηματισμός του υπεροξειδίου (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) και του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου

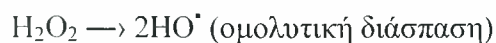
### 1.1.2 Δραστικές οξειδωτικές οξυγονούχες ενώσεις (REACTIVE OXYGEN SPECIES – ROS)

Οι ενώσεις αυτές δεν είναι ελεύθερες ρίζες, αλλά κάτω από ορισμένες συνθήκες συμμετέχουν σε μηχανισμούς ελευθέρων ριζών και παράγουν οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες. Οι ενώσεις αυτές είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το όζον και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (peroxynitrite, O=N-O-O<sup>-</sup>).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα με σημαντικό φυσιολογικό ρόλο, αλλά είναι και τοξικό στα περισσότερα κύτταρα σε συγκεντρώσεις 10-100 $\mu$ M. το η διαλύεται εύκολα στο νερό και παράγεται *in vivo* από διάφορα ένζυμα όπως η ξανθίνη, η οξειδάση του ουρικού ανιόντος κλπ. Επιπλέον, σε οποιοδήποτε βιολογικό σύστημα παράγεται υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^{\bullet-}$ ) θα δημιουργηθεί και  $H_2O_2$  με τη συνένωση δύο μορίων (παρουσία κατιόντων υδρογόνου):



Το  $H_2O_2$  ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ελαφρά οξειδωτική ένωση και έχει μικρή δραστηριότητα. Αυτός είναι και ο λόγος που δεν παρατηρούνται οξειδώσεις σε DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (mM). Ορισμένα ένζυμα απενεργοποιούνται με την επίδραση εξωγενούς  $H_2O_2$ , λόγω οξειδωσης των θειολικών ομάδων (-SH) [(*Brodie AE, Reed DJ, 1987*), (*Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, 1986*)]. Το  $H_2O_2$  μπορεί να οξειδώσει ορισμένα κετονοξέα (όπως το πυρουβικό,  $CH_3COCOOH$ ). Παρά τη χαμηλή δραστηριότητα του, το  $H_2O_2$  μπορεί να καταστεί κυτταροτοξικό σε υψηλές συγκεντρώσεις και ιδιαίτερα σε βακτήρια και ορισμένες κυτταρικές καλλιέργειες (χρήση ως αντισηπτικό) [(*Ohno Y, Gallin JI, 1985*), (*Burdon RH, 1995*)]. Το  $H_2O_2$  μπορεί να διαχυθεί ταχύτατα μέσω κυτταρικών μεμβρανών και σε αντίδραση με ίχνη σιδήρου (και χαλκού) παράγει τη ρίζα υδροξυλίου ( $HO^{\bullet}$ ). Αυτός είναι και ο βασικός λόγος για την οξειδωτική δράση του  $H_2O_2$  στο DNA των κυττάρων (*Wiseman H, Halliwell B, 1996*). Επίσης, μπορεί να διασπάσει ορισμένες πρωτεΐνες της αίμης (μυοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη, κυτόχρωμα c), ενώ διασπάται εύκολα με το υπεριώδες φως προς τις δραστικές ρίζες υδροξυλίου (*Gutteridge JMC, 1986*):



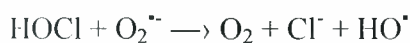
Το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) είναι ασθενές οξύ (pKa 7,5) και ιονίζεται κατά 50% σε pKa 7,4. Το υποχλωριώδες οξύ παράγεται από το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (myeloperoxidase - MPO) σε ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα από  $H_2O_2$  (*Folkes LK, Candeias LP, Wardman P, 1995*):



Αν και το HOCl δεν είναι πολύ σημαντικό στην εξόντωση βακτηρίων από φαγοκύτταρα, έχει συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της υψηλής δραστικότητας και των βλαβών που μπορεί να προκαλέσει σε βιομόρια είτε άμεσα είτε μετά από διάσπαση σε χλώριο (*Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH et al, 1990*):



Σε βιολογικούς οργανισμούς το HOCl προσβάλλει μεγάλο αριθμό μορίων-στόχων. Μπορεί να απενεργοποιήσει την α1-αντιπρωτεάση (ένα σημαντικό παρεμποδιστή των πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η ελαστάση), καθώς και τη θρομβομονδουλίνη (thrombomodulin), μία γλυκοπρωτεΐνη στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων που ρυθμίζει την πήξη του αίματος (*Glaser CB, Morser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K et al, 1992*). Το HOCl οξειδώνει τις θειόλες, το ασκορβικό ανιόν, το NAD(P)H, χλωριώνει τις βάσεις του DNA (ειδικά την πυριμιδίνη) και τις ομάδες τυροσίνης στις πρωτεΐνες. Επίσης, με την οξειδωτική του δράση απελευθερώνει μέταλλα από πρωτεΐνες, όπως ο ψευδάργυρος ( $\text{Zn}^{2+}$ ) από τη μεταλλοθειονεΐνη (*Fliss H, Menard M, 1991*). Τέλος, η αντίδρασή του με το υπεροξειδικό ανιόν σχηματίζει ρίζα υδροξυλίου, καθώς και με τον δισθενή σίδηρο (αντίδραση Fenton):



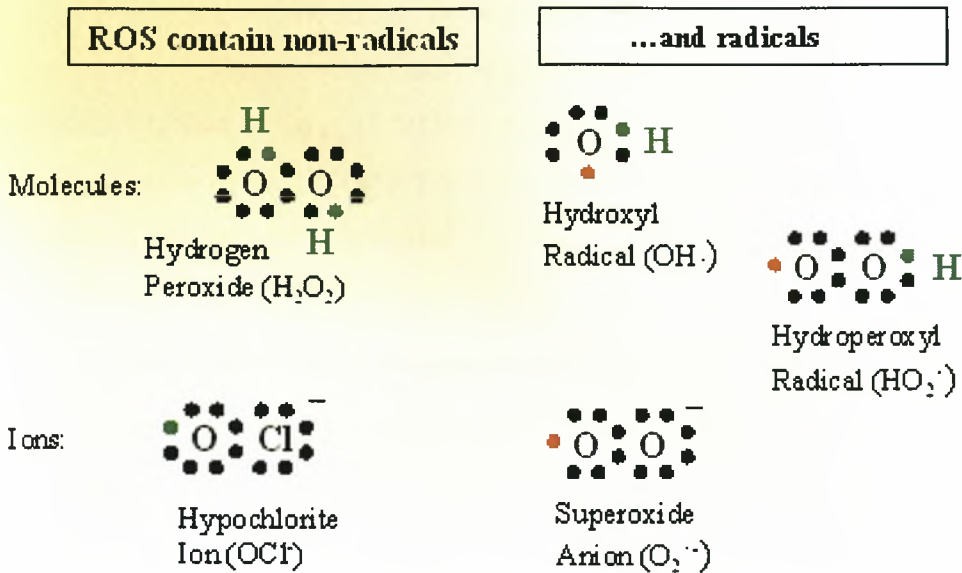
Το υποχλωριώδες οξύ σχηματίζει εύκολα χλωραμίνες ( $\text{RNHCl}$ ), που έχουν παρατηρηθεί ως μακράς διάρκειας οξειδωμένες ουσίες σε διάφορα βιολογικά υγρά και οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν επιδιορθωτικές διεργασίες του DNA στα κύτταρα. (*Pero RW, Sheng Y, Olsson A, Brynggelsson C, Lund-Pero M et al, 1996*)

Το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (peroxynitrite,  $\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$ ) είναι αποτέλεσμα της παρακάτω αντίδρασης, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερη βιολογική σημασία [(*Pryor WA, Squadrito GL, 1995*), (*Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS, 1992*)]:

$\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{ONOO}^-$   $k=7 \cdot 10^9 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  [το επίσημο όνομα της ένωσης είναι oxoperoxonitrate (-1)]

Η πρωτονιομένη μορφή του  $\text{ONOOH}$  είναι ισχυρό οξειδωτικό οξύ με κυτταροτοξικές ιδιότητες. Η παραγωγή του υπεροξυνιτρώδους σε βιολογικά κύτταρα, ιστούς και σωματικά υγρά οδηγεί στην εξουδετέρωση αντιοξειδωτικών, στην οξείδωση ομάδων  $-\text{SH}$ , στην οξείδωση λιπιδίων, σε θραύσεις σε κλώνους του DNA, σε νίτρωση και απαμίνωση των βάσεων του DNA (ειδικά τη γουανίνη) και νίτρωση αρωματικών αμινοξέων σε πρωτεΐνες [(*Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J et al.* 1992), (*Spencer JPE, Wong J, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Halliwell B,* 1995)]. Η πιο σημαντική επίδραση του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος σε πρωτεΐνες είναι η νίτρωση της τυροσίνης σε 3-νιτροτυροσίνη, που οδηγεί σε απενεργοποίηση ενζύμων και στην παρεμβολή της μεταβίβασης σημάτων (νίτρωση της τυροσίνης παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση των κινασών της τυροσίνης) (*Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H,* 1996). Η βιολογική σημασία του  $\text{ONOO}^-$  στον άνθρωπο φαίνεται από τον ρόλο του σε διάφορες ασθένειες φθοράς, καθώς και σε ποικίλες νευρολογικές αλλοιώσεις. [(*Smith MA, Richey HPL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G,* 1997), (*Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS,* 1995)]

## Reactive Oxygen Species (ROS)



Εικόνα 1.4 – Η οικογένεια των ROS περιλαμβάνει μόρια που είναι ρίζες και άλλα που δεν είναι, αλλά παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα

Το οξυγόνο είναι διατομικό μόριο το οποίο θα μπορούσε να καταταχθεί στην κατηγορία των ελευθέρων ριζών γιατί έχει δύο ασύζευκτα (unpaired) ηλεκτρόνια σε δύο διαφορετικά αντιδεσμικά  $\pi$  τροχιακά. Τα δύο αυτά ηλεκτρόνια έχουν τον ίδιο κβαντικό αριθμό του spin (παράλληλα spin). Αυτή είναι η πιο σταθερή κατάσταση του οξυγόνου (ground state). Υπάρχουν όμως και δύο δραστικότερες μορφές οξυγόνου που είναι γνωστές ως μονήρη οξυγόνα (singlet oxygens) και παράγονται με την εισαγωγή ενέργειας, η  $^1\Delta_g O_2$  (με ενέργεια πάνω από τη σταθερή κατάσταση κατά 93,6 kJ) και η  $^1\Sigma_g O_2$  (+157 kJ). Η  $^1\Delta_g O_2$  δεν είναι ελεύθερη ρίζα γιατί δεν υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια και η  $^1\Sigma_g O_2$  αποσυντίθεται γρήγορα στην πρώτη. Το μονήρες οξυγόνο συνήθως παράγεται στο εργαστήριο με φωτοευαίσθητες αντιδράσεις, ενώ διάφορες βιολογικές ενώσεις μπορούν να δημιουργήσουν το μονήρες οξυγόνο, όπως η ριβοφλαβίνη και παράγωγά της. (Foote CS, 1995) Αντιδράσεις φωτοευαισθησίας συνήθως περιλαμβάνουν μονήρες οξυγόνο και είναι σημαντικές σε πολλές βιολογικές καταστάσεις. Ορισμένες

ασθένειες μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό μονήρους οξυγόνου, όπως οι διάφορες πορφυρίες.

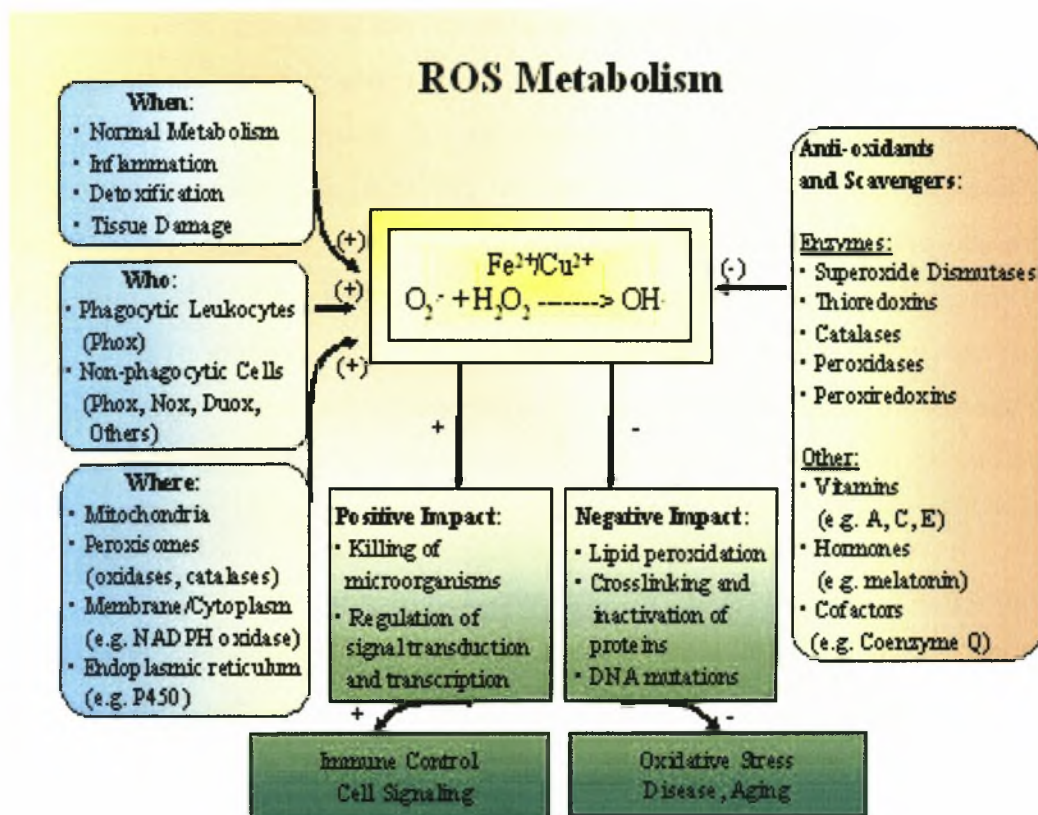
Το όζον ( $O_3$ ) είναι αέριος ρύπος στην ατμόσφαιρα. Είναι ισχυρά οξειδωτικό αέριο που παράγεται δευτερογενώς από τη φωτοχημική ρύπανση. Σχηματίζει μία προστατευτική στιβάδα σε ύψος 15-50 km (στρατόσφαιρα) και προστατεύει τη ζωή του πλανήτη μας με την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-B), που είναι εξαιρετικά βλαβερή στα βιολογικά συστήματα και στους ιστούς. [(Lipmann M, 1991), (Menzel DB, 1984)]

Το  $O_3$  σε υδατικά διαλύματα διασπάται σε ρίζες υδροξυλίου (αν και είναι αργή διεργασία σε φυσιολογικό pH). Το όζον έχει αποδειχθεί από πολυάριθμες έρευνες ότι έχει εξαιρετική οξειδωτική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων και αποτελεί σημαντικό παράγοντα καρκινογένεσης στον άνθρωπο. [(Βαλαβανίδης Α, 1994), (Borek C, Ong A, Cleaver JA, 1998), (Maugh TH, 1982)]

Πίνακας 1.1 – Η ονομασία καθώς και η χημική δομή των διαφόρων δραστικών ειδών του οξυγόνου (ROS).

Δραστικό είδος οξυγόνου (ROS)	Χημική δομή
Triplet oxygen	$\cdot O-O\cdot$
Ατομικό οξυγόνο	$O-O:$
Υπεροξείδιο	$\cdot O-O:$
Ρίζα perhydroxyl	$\cdot O-O:H$
Υπεροξείδιο υδρογόνου	$H:O-O:H$
Ρίζα υδροξυλίου	$H:O\cdot$
Ιόν υδροξυλίου	$H:O:$
Νερό	$H:O:H$

### 1.1.3 Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογία της κυτταρικής λειτουργίας, στο μεταβολισμό και στη μεταγωγή σημάτων για ενδοκυτταρική επικοινωνία



Εικόνα 1.5 – Τα ROS (κίτρινο πλαίσιο) σχηματίζονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε ως παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, είτε ως σηματοδοτικά μόρια (μπλε πλαίσιο). Οι επιπτώσεις των ROS στον οργανισμό διαχωρίζονται σε θετικές και αρνητικές (πράσινο πλαίσιο). Ωστόσο πάντα υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της δράσης των αντιοξειδωτικών μορίων (κόκκινο πλαίσιο).

Η μεγάλη σημασία των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογική λειτουργία των βιολογικών συστημάτων προτάθηκε πριν από 50 χρόνια με την υπόθεση που ανέπτυξε ο D. Harman για το ρόλο των ριζών στη γήρανση των έμβιων όντων. Η υπόθεση αυτή όμως πήρε μία νέα διάσταση με την ανακάλυψη το 1969 του ενζυμικού ρόλου της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase- SOD) στους βιολογικούς οργανισμούς και του υπεροξειδικού ανιόντος ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Από την εποχή εκείνη υπήρξε μία σειρά ανακαλύψεων για το σπουδαίο ρόλο των ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών οξυγονούχων ενώσεων στη φυσιολογική λειτουργία και στις μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου. Ιδιαίτερο ρόλο παίζει η



ρίζα υπεροξειδικό ανιόν, που παράγεται σε σημαντικές ποσότητες στα μιτοχόνδρια και ένα τμήμα της διαρρέει στο κυτταρικό περιβάλλον.

Οι βιολογικοί οργανισμοί από τη μία μεριά χρειάζονται τις ελεύθερες ρίζες και τις ROS γενικά για φυσιολογικές λειτουργίες, αλλά και τους αντιοξειδωτικούς προστατευτικούς μηχανισμούς για την εξισορρόπηση της κατάστασης. Κατά την πορεία της φυλογενετικής εξέλιξης, οι οργανισμοί διάλεξαν βιομόρια που να αντέχουν στις οξειδώσεις και έτσι υπάρχουν δομές πρωτεϊνών που αντέχουν στην οξειδωτική πρωτεόλυση και το πετυχαίνουν με την κατάλληλη αναδίπλωση της δομής τους. Τα κύτταρα και οι ιστοί προσπαθούν να βρίσκονται τον περισσότερο χρόνο σε οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και αυτό επιτυγχάνεται με προσωρινή μετατόπιση ή αύξηση της ενδοκυτταρικής κατάστασης με θειολο-/δισουλφιδο ενώσεις. (*Slund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G, 1999*)

Η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση επιτυγχάνεται όταν οι ROS ενεργοποιούν καταρράκτη «ευαίσθητων» μηνυμάτων, το οποίο μέσω της γονιδιακής έκφρασης αυξάνουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μεταφορά του αμινοξέος της κυστεΐνης, πράγμα που διευκολύνει ορισμένους τύπους κυττάρων να αυξήσουν ενδοκυτταρικά τη γλουταθειόνη στα μακροφάγα και στα λεμφοκύτταρα. (*Ishi T, Itoh K, Sato H, Bannai S, 1999*)

Σε διάφορους οργανισμούς η πρωτεΐνη οξειδοαναγωγάση Trx (oxidoreductase Trx) ενεργοποιείται και εκφράζεται στα λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλες συνθήκες οξειδωτικού stress. Μαζί με το σύστημα της γλουταθειόνης, η πρωτεΐνη αυτή παίζει ουσιαστικό ρόλο στην εξισορρόπηση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης. (*Sachi Y, Hirota K, Masutani H, Toda K, Okamoto T et al., 1995*)

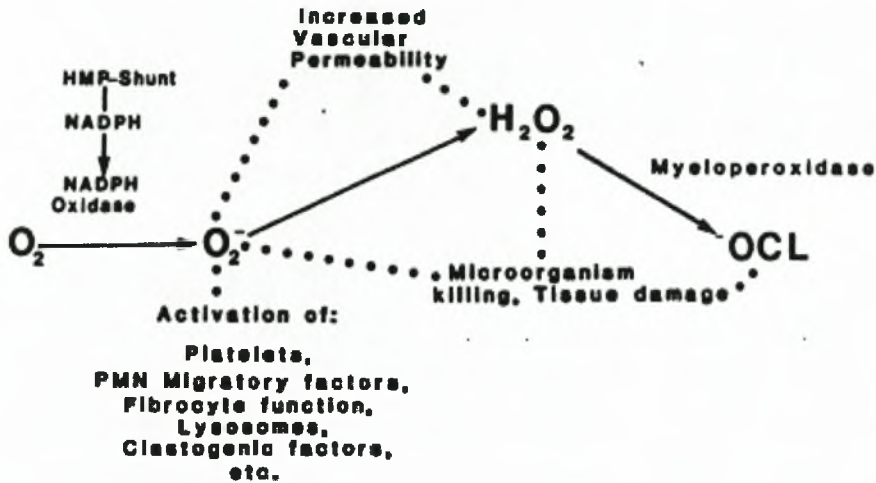
Ο οξειδοαναγωγικός έλεγχος του γονιδίου της οξυγενάσης-1 της αίμης (HO-1) είναι ένα από τα πρότυπα που έχει μελετηθεί καλύτερα για την οξειδοαναγωγική ρύθμιση των κυττάρων των θηλαστικών. Η ενεργοποίηση της HO-1 στους ινοβλάστες του δέρματος μπορεί να χρησιμεύσει για την προστασία και την απομάκρυνση της αίμης που απελευθερώνεται από οξειδωτικές ενώσεις. Η HO-1 και το mRNA ενεργοποιούνται σε μεγάλο βαθμό από ROS, υπεριώδη ακτινοβολία-

A (UV-A) και διάφορους παράγοντες οξειδωτικού stress, συμπεριλαμβανομένου και του NO. (Tyrrell R, 1999)

Η ομοίωση του οξυγόνου είναι επίσης μία άλλη διεργασία που ρυθμίζεται συστηματικά στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στον αναπνευστικό αερισμό. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι αλλαγές στη συγκέντρωση του οξυγόνου ανιχνεύονται ανεξάρτητα με διάφορες πρωτεΐνες που παράγονται μέσω των ROS, συμπεριλαμβανομένου και του κυτοχρώματος b-τύπου. (Acker H, 1994)

Σε πολλές βιολογικές διεργασίες η ισορροπία μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών ενζύμων προφυλάσσει από κυτταρικές βλάβες. Για παράδειγμα, οι συγκολλητικές ικανότητες των κυττάρων και των ιστών βρίσκονται υπό συνεχή έλεγχο. Η συγκόλληση λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων σε μετατριχοειδή φλεβίδια είναι το πρώτο στάδιο της χρόνιας φλεγμονής και εξαρτάται από την έκφραση των υποδοχέων στις επιφάνειες των κυττάρων. Η συγκόλληση αυτή προκαλείται και από ROS, αλλά η κατάσταση αυτή μπορεί να προληφθεί με το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση (όχι όμως από την SOD), πράγμα που σημαίνει ότι το  $H_2O_2$  παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάσταση αυτή. (Roy S, Sen CK, Packer L, 1999)

Επίσης, το ανοσιακό σύστημα στους βιολογικούς οργανισμούς ρυθμίζεται από οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Τα λεμφοκύτταρα είναι οι μεταφορείς της ανοσιακής δράσης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα απέναντι σε παθογόνα μικρόβια. Ο συνδυασμός εξαιρετικά ευαίσθητων μηχανισμών επιτρέπει την ταχύτατη και επιθετική αντιμετώπιση των παθογόνων, χωρίς να προκαλεί βλάβες στον βιολογικό ιστό. Η ανταπόκριση, που είναι αρκετά περίπλοκη, ρυθμίζεται και από οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Η ενεργοποίηση, για παράδειγμα, των T-λεμφοκυττάρων αυξάνεται με την παρέμβαση των ROS και/ή με τη μετατόπιση στην ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση της γλουταθειόνης. Επίσης, το  $O_2^{\cdot-}$  και το  $H_2O_2$  σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την παραγωγή 2 κυτταροκινών (στις οποίες υπάγονται οι ιντερλευκίνες και οι ιντερφερόνες, παράγονται από T-κύτταρα μετά από επαφή με αντιγόνο, είναι φυσικοί φονείς των B-κυττάρων και χρησιμοποιούνται για θεραπεία όγκων). (Los M, Droge W, Stricker K, Baeurle PA, Schulze-Osthoff K, 1995)



Εικόνα 1.6 – Ρόλος των ROS στην αντιμετώπιση μολύνσεων

Οι οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), που ρυθμίζει την ανάπτυξη και την ομοιοστάση των πολυκύτταρων οργανισμών. Έχει παρατηρηθεί πειραματικά ότι οι ROS αυξάνονται κατά την κυτταρική απόπτωση που προκαλείται από διάφορες αιτίες. Αν και δεν είναι απαραίτητες οι προ-οξειδωτικές καταστάσεις για την απόπτωση ορισμένων τύπων κυττάρων, η υψηλή συγκέντρωση ROS, όπως το  $H_2O_2$ , και οι συνθήκες οξειδωτικού stress είναι γενικά οι αιτίες που ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς. (Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML, 1999) Επίσης, έχει βρεθεί ότι το NO συνδέεται με ορισμένες μορφές απόπτωσης, αλλά και ο TNF- $\alpha$  (παράγοντας νέκρωσης όγκων, Tumor Necrosis Factor), οδηγώντας στον θάνατο κακοήθων κυττάρων μέσω ενδογενούς παραγωγής ROS, οι οποίες εν συνεχεία ενεργοποιούν διάφορους μηχανισμούς. (Albina JE, Reichner JS, 1998)

Ένας άλλος τομέας στον οποίο οι ROS παίζουν πρωτεύοντα ρόλο είναι οι ενδοκυτταρικές μεταγωγές σημάτων για διάφορους υποδοχείς, παράγοντες ανάπτυξης, κυτταροκίνες (cytokines) κλπ. Αν και οι λεπτομέρειες των μοριακών αντιδράσεων δεν είναι γνωστές, οι έρευνες με υποδοχείς και διόδους μεταγωγής σημάτων αποκαλύπτουν συστηματικές καταστάσεις με σημαντικές φυσιολογικές επιπτώσεις στα βιολογικά συστήματα. Για παράδειγμα, ο ρόλος των ROS έχει αποδειχθεί για τον παράγοντα ανάπτυξης νεύρων (nerve growth factor- NGF) στα

νευρωνικά κύτταρα, για τον επιδερμικό παράγοντα ανάπτυξης (epidermal growth factor- EGF) με μεταγωγή στα ανθρώπινα επιδερμοειδή κακοήθη κύτταρα (human epidermoid carcinoma cells) και για τον παράγοντα ανάπτυξης αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor- PDGF). [(Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K et al., 2000), (Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG, 2000)]

Μία άλλη πλευρά του φυσιολογικού ρόλου των ROS που έχει μελετηθεί αφορά την ενεργοποίηση των υποδοχέων της ινσουλίνης. Οι πιο σημαντικοί ιστοί που ανταποκρίνονται στην ινσουλίνη είναι οι λιπώδεις ιστοί του ήπατος και των σκελετικών μυών. Στους ιστούς αυτούς η ινσουλίνη ρυθμίζει αρκετές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβάνοντας την παραλαβή γλυκόζης, τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό της γλυκόζης και τη σύνθεση πρωτεϊνών στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης. Η μεταγωγή σημάτων από την ινσουλίνη απαιτεί την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα κινάσης της ινσουλίνης στα αμινοξέα Tyr-1158, Tyr-1162 και Tyr-1163. Πειράματα έδειξαν ότι το  $H_2O_2$  σε υψηλές συγκεντρώσεις παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης, αλλά λόγω του ότι η παραγωγή του  $H_2O_2$  προκαλείται από την ινσουλίνη, η οξειδοαναγωγική αυτή διεργασία φαίνεται να αποτελεί μέρος μίας αναδραστικής ρυθμιστικής πορείας. (Krieger-Brauer H, Medda PK, Kather H, 1997)

Η οξειδωτική ενεργοποίηση των ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C μέσω του  $H_2O_2$  έχει επίσης μελετηθεί πρόσφατα. Η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης C (PKC)-α συμμετέχει σε μεταγωγή σημάτων για ποικίλες διεργασίες που ελέγχουν τη μεταγραφή αλλά και τον κυτταρικό κύκλο. Οι έρευνες έδειξαν ότι η PKC-α και μερικές άλλες ισομορφές μπορούν να ενεργοποιηθούν από το  $H_2O_2$  σε διεργασία που εξαρτάται από φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα από τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης. (Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matzuraki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y, 1997)

Οι μεταβολές της συγκέντρωσης του ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) στο διαλυτό κυτταρόπλασμα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση αρκετών ενδοκυτταρικών μηχανισμών διάδοσης μηνυμάτων, εκ των οποίων ορισμένοι ενεργοποιούνται στον τομέα της απόπτωσης. Η συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  στο

κυττοσόλιο μπορεί να αυξηθεί από τη μεταφορά αποθηκευμένου ενδοκυτταρικού ασβεστίου ή/και μέσω εισροής εξωκυτταρικού ασβεστίου. Αυτή η αύξηση του ασβεστίου από τις ROS μπορεί και να συμβάλλει στην ενεργοποίηση της PKC-α λόγω οξειδωτικού stress. (*Kumasaka S, Shoji H. Okabe E, 1999*)

Τέλος, αρκετές έρευνες δείχνουν επίσης ότι ο ρόλος των ROS στα αγγεία είναι πιο σύνθετος από τις αρχικές ενδείξεις, δηλαδή δεν είναι μόνο η υπεροξείδωση LDL και το οξειδωτικό stress, αλλά συνεισφέρουν ακόμα και στη μεταγωγή σημάτων στα αγγεία και στη διαφοροποίηση των κυτταρικών διεργασιών. [(*Chen K, Thomas SR, Keaney JF, 2003*), (*Djordjevic VB, 2004*), (*Brookes PS, 2005*)]

## 1.2 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ

Στους αερόβιους οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) είναι μία κανονική διεργασία. Οι αερόβιοι όμως οργανισμοί κατορθώνουν και επιβιώνουν με την παρουσία των ROS, επειδή έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτική άμυνα. Η αντιοξειδωτική άμυνα διαφέρει από ιστό σε ιστό και από κύτταρο σε κύτταρο. Επίσης, τα υγρά έξω από τα κύτταρα έχουν διαφορετική αντιοξειδωτική άμυνα από αυτή που περιέχει το ενδοκυτταρικό περιβάλλον και οι κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι, όταν σχηματίζονται ROS *in vivo* λαμβάνουν μέρος πολλοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Η σχετική σπουδαιότητα αυτών των μηχανισμών εξαρτάται τόσο από το είδος των ROS, όσο και από το πώς και πού παράγονται οι ROS. Δεν υπάρχει, δηλαδή, ένα γενικό αντιοξειδωτικό που να προστατεύει τον οργανισμό μας από όλες τις ROS, αλλά πολλά αντιοξειδωτικά που καθένα από δρα κατά περίπτωση. Έτσι, για παράδειγμα, το ασκορβικό προστατεύει τα λιπίδια από οξειδωτική καταστροφή, όχι όμως και τις πρωτεΐνες. Τα αντιοξειδωτικά δηλαδή δεν δρουν όλα με τον ίδιο τρόπο στα διαφορετικά στάδια της οξείδωσης. (Gutteridge JMC, 1995)

Έτσι, τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τη δράση τους μπορούν να ταξινομηθούν:

- *Προληπτικά αντιοξειδωτικά* (preventive antioxidants), που βρίσκονται στην «*πρώτη γραμμή προστασίας*». Τα αντιοξειδωτικά αυτά καταστέλλουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών ή *εξουδετερώνουν* (quenching) καταλυτικά τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Τα αντιοξειδωτικά στην περίπτωση αυτή είναι κυρίως ένζυμα, όπως οι καταλάσες, οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου. Όλα αυτά τα αντιοξειδωτικά ένζυμα απομακρύνουν τις ROS χωρίς να καταναλώνονται στην αντίδραση. Στα αντιοξειδωτικά «*πρώτης γραμμής προστασίας*» συγκαταλέγονται και ορισμένες πρωτεΐνες (π.χ. τρανσφερρίνη, απτοσφαιρίνες, σερουλοπλασμίνη, αλβουμίνη κλπ.), που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με μεταβατικά ιόντα (π.χ. σιδήρου και χαλκού) και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, που προάγεται με τα ιόντα αυτά.
- *Αντιοξειδωτικά που εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες* (free radical scavengers) ή *σταματούν στην αρχή την αλληλουχία μίας αλυσιδωτής αντίδρασης* (chain breaking antioxidants) ελευθέρων ριζών. Τα

αντιοξειδωτικά αυτά βρίσκονται στη «*δεύτερη γραμμή προστασίας*», καταναλώνονται προοδευτικά και έτσι η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι μικρού μοριακού βάρους και ο άνθρωπος έχει την ικανότητα να βιοσυνθέτει ορισμένα από αυτά, όπως είναι η ουβικινόλη, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη κλπ., ενώ τα περισσότερα, όπως είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή κλπ., τα προσλαμβάνει με τη διατροφή του.

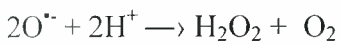
- Στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς μπορούμε να συμπεριλάβουμε και τα ενζυμικά συστήματα που επισκευάζουν το DNA μετά από προσβολή από τις ελεύθερες ρίζες, τα ένζυμα αποικοδόμησης των πρωτεϊνών που έπαθαν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων. Όλα τα παραπάνω ένζυμα βρίσκονται στην «*τρίτη γραμμή προστασίας*».
- Στο ολοκληρωμένο αυτό σύστημα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μπορούμε να συμπεριλάβουμε και τους μηχανισμούς προσαρμογής, που είναι επίσης σημαντικοί. Με αυτούς τους μηχανισμούς, όταν συμβαίνει οξειδωτικό stress, παράγεται το κατάλληλο αντιοξειδωτικό ένζυμο και μεταφέρεται στην κατάλληλη θέση, την κατάλληλη στιγμή και στην κατάλληλη συγκέντρωση.

### 1.2.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

### 1.2.1.1 Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου

Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν από τους McCord και Fridovich το 1969, όταν απομόνωσαν από τα ερυθροκύτταρα μία πρωτεΐνη (erythrocyprein), που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ένζυμο αυτό αργότερα μετονομάστηκε σε δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD).

Όλες οι γνωστές δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs) καταλύουν την ίδια αντίδραση και δείχνουν ειδικότητα μόνο για το υπόστρωμα  $O_2^{\cdot-}$ :

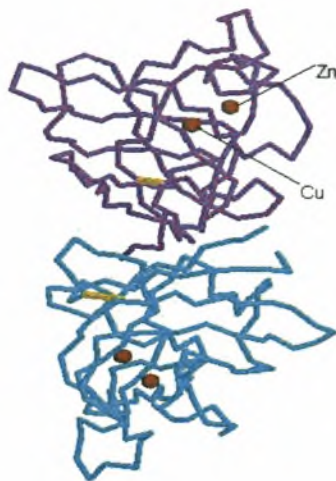


Οι SODs δρουν ως αντιοξειδωτικά ένζυμα και μάλιστα απαραίτητα για την ανάπτυξη των αερόβιων οργανισμών, επειδή με τη δράση τους εξουδετερώνουν το  $O_2^{\cdot-}$  και έτσι δεν προκαλούνται εκτεταμένες βλάβες στα βιομόρια και κυρίως στο DNA.

Οι SODs, ανάλογα με το μέταλλο που απαιτούν για να εκδηλωθεί η ενζυμική τους δράση, ταξινομούνται σε τρεις τάξεις [(*Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G, 1987*), (*Hassan HM, 1988*)]:

- I. SODs του χαλκού – ψευδαργύρου (Cu, Zn-SOD), που βρίσκονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα.
- II. SODs του μαγγανίου (Mn-SOD), που βρίσκονται στα προκαρυωτικά κύτταρα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων.
- III. SODs του σιδήρου (Fe-SOD), που βρίσκονται μόνο στα προκαρυωτικά κύτταρα.





Εικόνα 1.7 – Τρισδιάστατη δομή Cu-Zn SOD

Έτσι, μέσα στα κύτταρα των θηλαστικών βρίσκονται δύο διαφορετικές μορφές SODs, η μία μορφή περιέχει Cu και Zn και βρίσκεται στο κυτοδιάλυμα των περισσότερων κυττάρων, ενώ η άλλη περιέχει Mn και βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Η βιοσύνθεση της Cu, Zn-SOD και Fe-SOD είναι συνεχής, ενώ της Mn-SOD είναι επαγόμενη. Η επαγωγή της Mn-SOD φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των μιτοχονδρίων από το οξειδωτικό stress.

Όλες οι ενδοκυττάρειες Cu, Zn-SODs έχουν μοριακό βάρος γύρω στα 32 kDa και έχουν δύο υπομονάδες, που η κάθε μία περιέχει ένα άτομο Cu και ένα άτομο Zn. Ο Zn δεν παίρνει μέρος στην καταλυτική διαδικασία της αντίδρασης, αλλά μόνο στη σταθεροποίηση του ενζύμου. (Fridovich I, 1995)

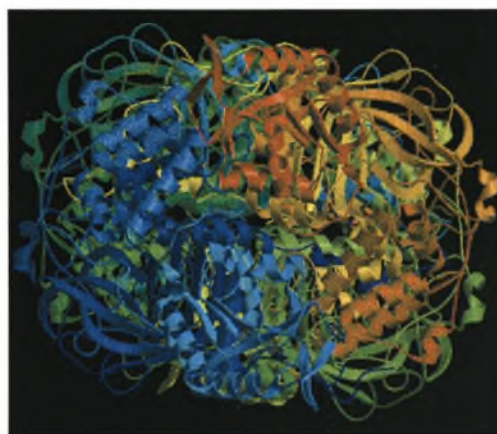
Η Cu, Zn-SOD έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πειράματα *in vitro*. (Emerit I, Packer L, Auclair C, 1990) Όμως, πειράματα *in vivo* με έκχυση SOD δεν είχαν επιτυχία, επειδή η SOD έχει ημιπερίοδο ζωής στο πλάσμα του αίματος 4-5 min. Ο μικρός αυτός χρόνος ζωής οφείλεται στην πολύ γρήγορη απέκκριση της SOD από τους νεφρούς. Έτσι η SOD είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί *in vivo* ως θεραπευτικό αντιδραστήριο.

Στην οικογένεια των SODs τα τελευταία χρόνια προστέθηκε και η εξωκυττάρια Cu, Zn-SOD, η οποία αναφέρεται και ως EC-SOD. Το ένζυμο αυτό στον άνθρωπο είναι μία ομοτετραμερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 135 kDa. Η EC-SOD ελαττώνοντας τη συγκέντρωση του  $O^{\cdot -}$  στο πλάσμα του αίματος ελαττώνει

και την ταχύτητα σχηματισμού του  $\text{ONOO}^-$ , που σχηματίζεται από το  $\text{NO}^\bullet$  και  $\text{O}^\bullet$ , και έτσι αυξάνεται η ημιπερίοδος ζωής του  $\text{NO}^\bullet$ . (Fridovich I, 1997)

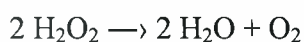
### 1.2.1.2 Καταλάσες

Οι καταλάσες και υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι τα κυρίαρχα ένζυμα στη ρύθμιση των επιπέδων του  $\text{H}_2\text{O}_2$  μέσα στα κύτταρα. Η καταλάση στους ιστούς του ανθρώπου βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα και σχετικά σε πολύ μικρότερες στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στο μυϊκό ιστό. Μέσα στα κύτταρα εντοπίζεται στα υπεροξυσωμάτια, με



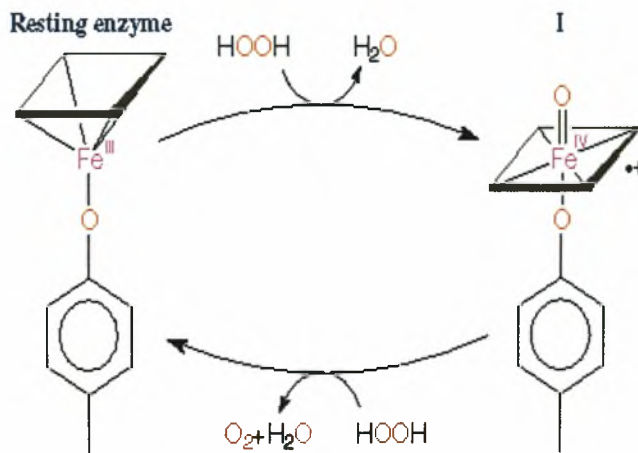
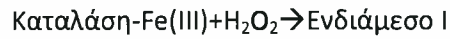
Εικόνα 1.8 – Τρισδιάστατη δομή καταλάσης

εξαιρεση τα ερυθροκύτταρα στα οποία εντοπίζεται στο κυτοδιάλυμα. Οι καταλάσες στα ζώα έχουν τέσσερεις υπομονάδες. Η ενεργή περιοχή κάθε υπομονάδας περιέχει ένα μόριο  $\text{NADPH}$ , που σταθεροποιεί τη διαμόρφωση του ενζύμου, καθώς και ένα μόριο αίμης. Η αντίδραση που καταλύουν τα ένζυμα αυτά είναι η αναγωγή ενός μορίου  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε  $\text{H}_2\text{O}$  με ταυτόχρονη οξείδωση ενός άλλου μορίου  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε  $\text{O}_2$ :



Στα υπεροξυσωμάτια εδρεύουν πολλά ένζυμα που παράγουν  $\text{H}_2\text{O}_2$ , οι καταλάσες όμως εξουδετερώνουν το  $\text{H}_2\text{O}_2$  πριν αυτό διαχυθεί σε άλλα μέρη του κυττάρου. Επειδή το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα υπεροξυσωμάτια, είναι δύσκολο να πει κανείς πολλά για τον προστατευτικό ρόλο αυτού του ενζύμου στο κυτοδιάλυμα. Αν όμως λάβουμε υπόψη μας ότι το  $\text{H}_2\text{O}_2$  μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και ότι οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν τη μετατροπή του  $\text{H}_2\text{O}_2$ , όταν αυτό βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, τότε φαίνεται ο ρόλος της καταλάσης να είναι πολύ σημαντικός. [(Marklund SL,

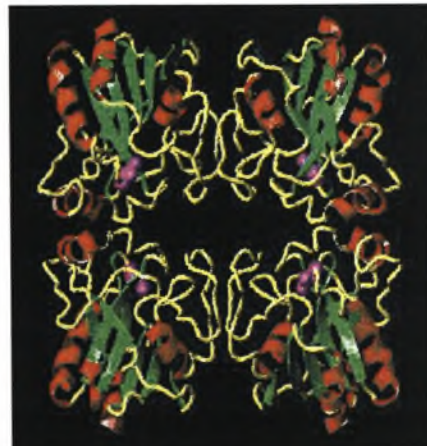
Westman NG, Landgren E, Roos G, 1982), (Chance B, Klotman PE, Boveris A, 1979)]



Εικόνα 1.9 – Αντίδραση καταλάσης

### 1.2.1.3 Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης που περιέχουν σελήνιο

Οι *υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης* (glutathione peroxidases, GPxs) ανακαλύφθηκαν από τον Mills. Ο Mills περιέγραψε αρχικά τη δράση μιας GPx το 1957 και υπέθεσε ότι το ένζυμο αυτό προστατεύει τα ερυθροκύτταρα του αίματος από την αιμόλυση που προκαλείται από οξείδωση. Το ένζυμο αυτό ονομάστηκε κλασική GPx και τώρα ονομάζεται GPx-1. Σε



Εικόνα 1.10 – Τρισδιάστατη δομή GSH-Px

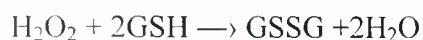
ορισμένες δημοσιεύσεις το ένζυμο αυτό ονομάζεται επίσης κυτοδιαλυτή ή κυτταρική GPx (cGPx).

Οι *υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης* (GPxs) που περιέχουν σελήνιο (Se) αποτελούν μία οικογένεια ενζύμων που έχουν την ικανότητα να ανάγουν αρκετά οργανικά και ανόργανα υπεροξέα στις αντίστοιχες αλκοόλες. Για την αναγωγή χρησιμοποιούν ως αναγωγικό αντιδραστήριο κυρίως τη γλουταθειόνη, αλλά και άλλες αναγωγικές ενώσεις. Το γεγονός ότι καταλύουν και την αντίδραση αναγωγής του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, τα κάνει να διαφέρουν από τα άλλα παρόμοια ως προς την καταλυτική δράση ένζυμα, όπως είναι η μη εξαρτώμενη από σελήνιο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που ονομάζεται και *τρανσφεράση της γλουταθειόνης Β*.

Όλες οι γνωστές GPxs περιέχουν στη ενεργή περιοχή μία σελινοκυστεΐνη, δηλαδή μία κυστεΐνη στην οποία έχει αντικατασταθεί το θείο της σουλφυδρυλικής της ομάδας (-SH) από Se. Εκτός από τη σελινοκυστεΐνη, έχουν και δύο υπολείμματα αμινοξέων, ένα της τρυπτοφάνης και ένα της γλουταμίνης, που διατηρούνται σε όλες τις GPxs.

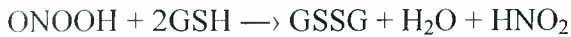
Τα ένζυμα αυτά ανήκουν σε μία οικογένεια ενζύμων με παρόμοια καταλυτική δράση. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί πέντε μέλη της οικογένειας GPx: α) η *υπεροξειδάση του κυτοδιαλύματος* (cytosolic GPx ή cGPx ή GPx-1), β) η *γαστροεντερική υπεροξειδάση* (gastrointestinal GPx ή giGPx ή GPx-2), γ) η *υπεροξειδάση του πλάσματος* (plasma GPx ή pGPx ή GPx-3), δ) η *υπεροξειδάση της γλουταθειόνης των φωσφολιπιδικών υδροϋπεροξειδίων* (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPx ή pHGPx ή GPx-4) και ε) η *υπεροξειδάση της γλουταθειόνης του πυρήνα του σπέρματος* (sperm nucleus glutathione peroxidase, snGPx).

Όλες οι γνωστές σελινοϋπεροξειδάσες καταλύουν την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας τη GSH ως υπόστρωμα:



Εκτός από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορούν να ανάγουν και άλλα υπεροξείδια, όπως τα ROOH σε ROH και το υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH) σε νιτρώδες οξύ:





Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου το σελήνιο οξειδώνεται από τα υπεροξειδία σε παράγωγο του σεληνικού οξέος (SeOH) και στη συνέχεια από ένα δότη ηλεκτρονίων. Όταν η γλουταθειόνη δρα ως αναγωγικό ισοδύναμο, σχηματίζεται δισουλφίδιο του σεληνίου (R-Se-SG). Ο δεσμός του σεληνοδισουλφιδίου στη συνέχεια διασπάται με ένα επιπλέον μόριο GSH και παράγει την GPx στην αναγωγική μορφή. Έτσι, στην αντίδραση αυτή, δύο μόρια GSH οξειδώνονται σε GSSG, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί με την αναγωγή της γλουταθειόνης, που είναι το κύριο ένζυμο στα θηλαστικά που ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). (*Kühn H, Borchert A, 2002*)

Τα μέλη της οικογένειας αυτής των ενζύμων τα οποία σχετίζονται περισσότερο με την έρευνα που διεξήγαμε είναι τα παρακάτω:

**cGPx (GPx-1):** Η cGPx κατανέμεται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών και κωδικοποιείται στον άνθρωπο από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3. Το μόριο της cGPx αποτελείται από τέσσερις όμοιες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα έχει ένα μόριο σεληνίου (Se) συνδεδεμένο με ένα υπόλειμμα κυστεΐνης που βρίσκεται στη ενεργή περιοχή. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση αναγωγής του  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε  $\text{H}_2\text{O}$  με τη συμμετοχή της GSH, καθώς και την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων (ROOH) σε αλκοόλες (ROH), αφού όμως πρώτα διασπαστούν αυτά υδρολυτικά από τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών με τη φωσφολιπάση  $\text{A}_2$ . Η cGPx δείχνει μεγάλη ειδικότητα για τη γλουταθειόνη. Γενικά, η δράση αυτού του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στο κυτοδιάλυμα και είναι ένας κύκλος στον οποίο συμμετέχει η GSH, η αναγωγή της γλουταθειόνης και το NADPH που προέρχεται από το μεταβολικό δρόμο των φωσφορικών πεντοζών. (*Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K, 1997*)

**giGPx (GPx-2):** Είναι μία δεύτερη ισομορφή της GPx που εμφανίζεται στο κυτοδιάλυμα ορισμένων κυττάρων. Η giGPx είναι μία ομοτετραμερής πρωτεΐνη και το γονίδιο της στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14. Η giGPx έχει παρόμοια ειδικότητα με τη cGPx για το υπόστρωμα, ανάγει δηλαδή το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), τα ελεύθερα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων (ROOH), αλλά δεν ανάγει τα υδροϋπεροξειδία που είναι συνδεδεμένα στα φωσφολιπίδια.

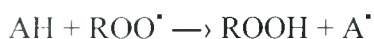
Στον άνθρωπο, το mRNA της *giGPx* βρίσκεται στο ήπαρ και στο έντερο. (*Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS, 1993*)

***pGPx (GPx-3)***: Είναι η τρίτη ισομορφή της GPx και εμφανίζεται στο πλάσμα του αίματος. Είναι και αυτή ομοτετραμερής και ονομάστηκε GPx του πλάσματος (*pGPx*) ή εξωκυτταρική GPx (*eGPx*). (Αυτή η πρωτεΐνη ονομάζεται πλέον *GPx-3*). Σε αντίθεση με τις άλλες υπεροξειδάσες, η *pGPx* είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακά βάρη υπομονάδων περίπου 23-25 kDa. Η υδατανθρακική αλυσίδα πιθανόν να είναι απαραίτητη για την έξοδό της από τα κύτταρα μετά τη βιοσύνθεσή της. Το γονίδιο της *pGPx* εντοπίζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 5. Η βιολογική σημασία της *pGPx* δεν είναι ακόμα ξεκαθαρισμένη, δεδομένου ότι για να δράσει απαιτεί mM συγκεντρώσεις γλουταθειόνης και έτσι υπάρχουν ορισμένες αμφιβολίες εάν μπορεί να λειτουργήσει ως υπεροξειδάση στο πλάσμα του αίματος, επειδή η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι μικρότερη από 0,5 μM. Όμως, εκτός από τη γλουταθειόνη και άλλες αναγωγικές ουσίες, όπως είναι η θειορεδοξίνη και η αναγωγάση της θειορεδοξίνης, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δότες ηλεκτρονίων από την *pGPx* του ανθρώπου. Έτσι αυξάνεται η πιθανότητα το ένζυμο αυτό να λειτουργεί ως εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό χρησιμοποιώντας πχ. τη θειορεδοξίνη και όχι τη γλουταθειόνη, και το γεγονός αυτό έρχεται σε συμβιβασμό με τη χαμηλή συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο πλάσμα του αίματος. (*Bjornsted M, Xue JY, Haung WH, Akesson B, Holmgren A, 1994*)

### 1.2.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ

#### ΓΙΝΕΤΑΙ *in vivo*

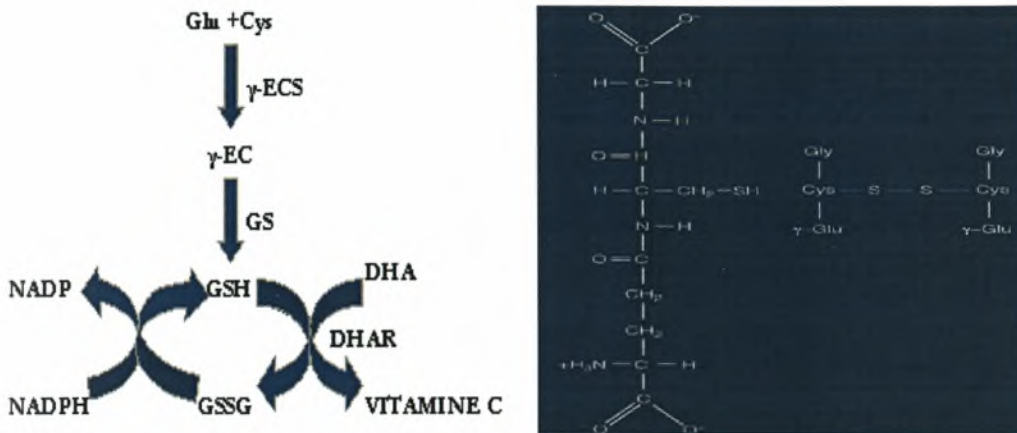
Τα κύτταρα για να αποφύγουν τις βλαπτικές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών χρησιμοποιούν μία σειρά ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, δηλαδή να τις ανάγουν σε λιγότερο δραστικές μορφές. Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η εξουδετέρωση είναι η απόδοση σ' αυτές ενός ατόμου υδρογόνου. Επομένως, ενώσεις που μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά μόρια είναι αυτές που αποδίδουν εύκολα υδρογόνο (AH):



Τέτοια γνωστά αντιοξειδωτικά είναι η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες A και E, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το β-καροτένιο κλπ. και πιθανόν και άλλες ενώσεις, όπως το ουρικό οξύ και η χολερυθρίνη. Άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι αυτά που περιέχονται στα τρόφιμα, όπως στο παρθένο ελαιόλαδο, στο κόκκινο κρασί, στο τσάι (βασικός λόγος για τον οποίο μελετούμε ιδιαίτερος το κινέζικο πράσινο τσάι), σε αρωματικά φυτά κλπ. για τα οποία γνωρίζουμε πολύ λίγα για την απορρόφηση, τη βιοδιαθεσιμότητα και την αντιοξειδωτική τους δράση. Εκτός από τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχουμε και συνθετικά αντιοξειδωτικά που δρουν με τον παραπάνω τρόπο, όπως είναι το *tert*-βουτυλο-υδροξυτολουόλιο (BHT) που χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό στα τρόφιμα.

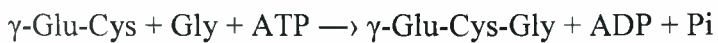
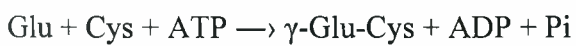
Η αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλών διαφορετικών αντιοξειδωτικών. Η συνεργιστική δράση των διαφορετικών ουσιών προστατεύει τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες σε μεγαλύτερο βαθμό από κάθε ουσία μόνη της. Ένα τυπικό παράδειγμα συνέργειας μεταξύ των αντιοξειδωτικών είναι η γλουταθειόνη, που ανάγει το δεϋδροασκορβικό οξύ σε ασκορβικό οξύ και το ασκορβικό οξύ, που με τη σειρά του ανάγει την α-τοκοφερόλη.

## 1.2.2.1 Γλουταθειόνη



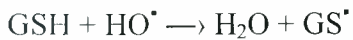
Εικόνες 1.11&1.12 – Το τριπεπτίδιο & η οξειδωμένη μορφή  
Σύνθεση GSH, ανακύκλωση GSH –GSSG & συμμετοχή της γλουταθειόνης  
GSH στην αναγωγή της βιταμίνης C

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο, που αποτελείται από γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη (γ-Glu-Cys-Gly). (Sies H, 1999) Δραστική ομάδα είναι η σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) της κυστεΐνης. Η GSH βρίσκεται σε όλα τα ζωικά κύτταρα και είναι η κυριότερη μικρού μοριακού βάρους σουλφυδρυλική ένωση. Η βιοσύνθεσή της γίνεται με δύο αντιδράσεις που καταλύονται η πρώτη από τη συνθετάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης και η δεύτερη από τη συνθετάση της γλουταθειόνης:

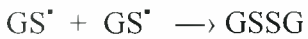


Η γλουταθειόνη είναι μία από τις κυριότερες αντιοξειδωτικές ουσίες των ζωικών κυττάρων. Μπορεί να αντιδράσει με ελεύθερες ρίζες, όπως με HO<sup>•</sup> και να παραχθεί η θειλική ρίζα (thiyl radical, GS<sup>•</sup>):

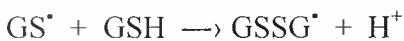




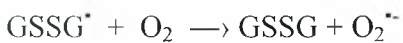
Οι θειλικές ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους και να δώσουν το *δισουλφίδιο της γλουταθειόνης* (GSSG) που αποτελείται από δύο μόρια GSH συνδεδεμένα με τις -SH ομάδες με δισουλφιδικό δεσμό:



Μία άλλη αντίδραση που μπορεί να γίνει, είναι να αντιδράσει η θειλική ρίζα (GS<sup>•</sup>) με άλλο μόριο GSH και να σχηματίσει τη ρίζα του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSSG<sup>•</sup>):

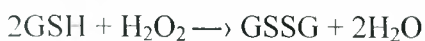


η οποία μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο και να παράγει τη ρίζα του σουπεροξειδίου:

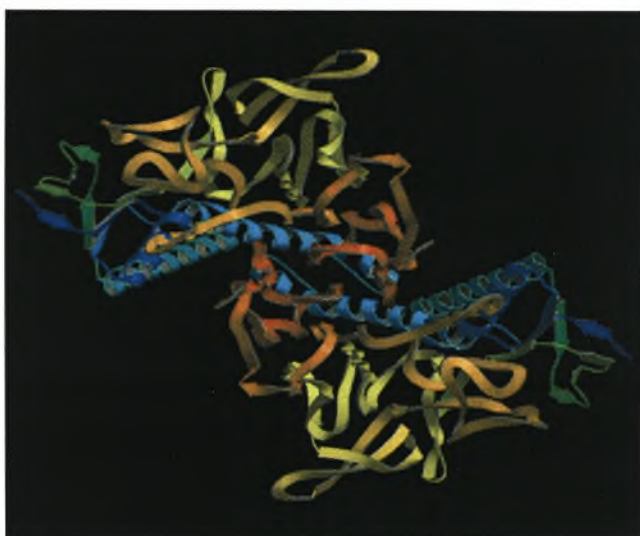
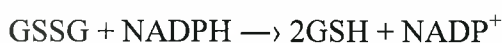


Οι ρίζες του σουπεροξειδίου μπορούν να εξουδετερωθούν από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου και έτσι το καθαρό αποτέλεσμα όλων των παρακάτω αντιδράσεων είναι η αναγωγή των ελευθέρων ριζών σε προϊόντα που μεταβολίζονται εύκολα.

Η προστασία της GSH έναντι του οξειδωτικού stress δεν περιορίζεται μόνο στις παραπάνω αντιδράσεις. Η GSH αποτοξινώνει τα κύτταρα από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το ROOH, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις που καταλύονται από τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης που περιέχουν σελήνιο.



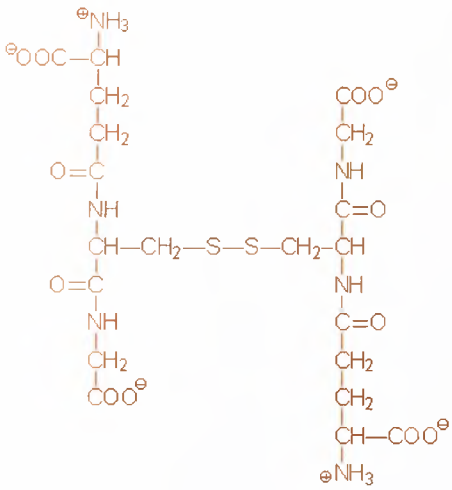
Επίσης, η GSH ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο συζεύγνυται με ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια και αποτοξινώνει τα κύτταρα από εξωγενώς χορηγούμενες ηλεκτρονιόφιλες ουσίες, όπως είναι οι κινόνες, ή από τοξικά μεταβολικά προϊόντα. Οι αντιδράσεις σύζευξης καταλύονται από τις *τρανσφεράσες-S της γλουταθειόνης*. Ο σχηματισμός των συζευγμένων προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της γλουταθειόνης, γι' αυτό ο προσδιορισμός της GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής προστασίας. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) που σχηματίζεται, ανάγεται με NADPH σε GSH:



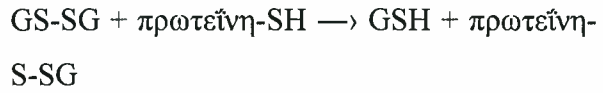
Εικόνα 1.13 – Η δομή της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης. Στην εικόνα αποικνίζεται ενωμένη με ένα μόριο FAD.

Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη φλαβοπρωτεΐνη αναγωγάση της γλουταθειόνης και το NADPH, που προέρχεται κυρίως από τον δρόμο των φωσφορικών πεντοζών.

Στα περισσότερα κύτταρα η GSSG αντιπροσωπεύει ένα ποσοστό μικρότερο από 1% της ολικής γλουταθειόνης. Η αύξηση της GSSG στο οξειδωτικό stress είναι παροδική, επειδή ανάγεται πολύ γρήγορα από την *αναγωγάση της γλουταθειόνης*. Επίσης, η GS-SG μπορεί να ανταλλάξει την ομάδα -SG με το υδρογόνο της σουλφυδρυλικής ομάδας μίας πρωτεΐνης και να σχηματίσει ένα μικτό δισουλφίδιο:



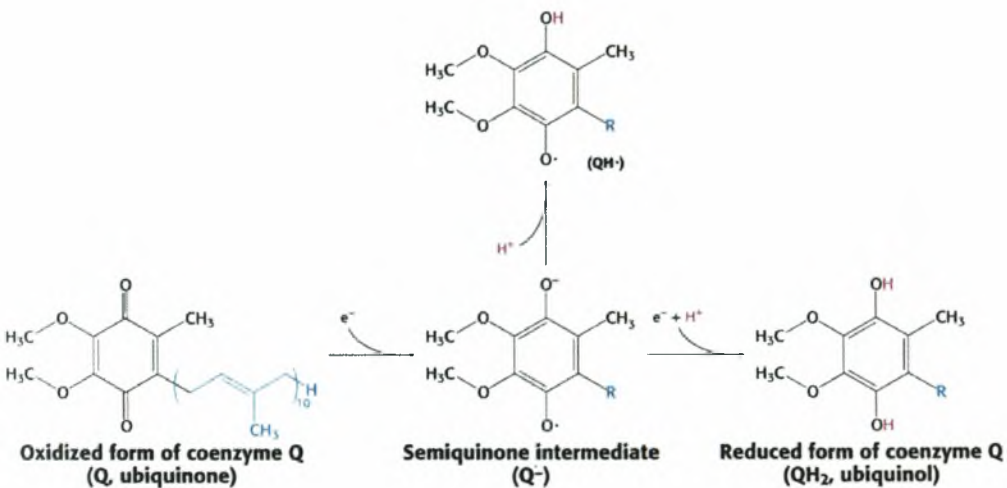
Glutathione disulfide (GSSG)



Τα μικτά δισουλφίδια έχουν μεγαλύτερη ημιπερίοδο ζωής από την GSSG. (Arteel GE, Sies H, 2001)

Εικόνα 1.14 – Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης

1.2.2.2 Ουβικινόνη



Εικόνα 1.15 – Η ουβικινόνη (Q) ανάγεται προς ουβικινόλη (QH<sub>2</sub>) μέσω μιας ενδιάμεσης ημικινόνης (QH<sup>•-</sup>)

**Χημική δομή:** Η ουβικινόνη (ubiquinone) ή συνένζυμο Q (coenzyme Q) είναι λιποδιαλυτό παράγωγο της κινόνης. Αποτελείται από έναν οξειδοαναγωγικό

πυρήνα και μία υδρόφοβη πλάγια αλυσίδα, που περιέχει έναν αριθμό από μονοακόρεστες *trans*-ισοπρενοειδείς μονάδες. Η ονομασία της προέρχεται από το ubiquitous που σημαίνει πανταχού παρούσα. Η μορφή που κυριαρχεί στα ζώα και στον άνθρωπο είναι η ουβικινόνη-10 (Q10) που περιέχει 10 ισοπρενοειδείς μονάδες στην πλάγια αλυσίδα (επίσης ονομάζεται και ουβικινόνη 50 από τον ολικό αριθμό των ατόμων του άνθρακα που περιέχει στην πλάγια αλυσίδα). Η ουβικινόνη στα βιολογικά συστήματα δρα κυρίως ως οξειδοαναγωγικό συστατικό, στα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών, όπως στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. (Ernster L, 1984)

**Βιοσύνθεση και κατανομή:** Η ουβικινόνη είναι το μόνο γνωστό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που μπορούν να βιοσυνθέσουν *de novo* τα κύτταρα των ζώων. Στα κύτταρα των θηλαστικών για τη βιοσύνθεση της ουβικινόνης αλληλεπιδρούν δύο μεταβολικοί δρόμοι. Ο κινουοειδής δακτύλιος παράγεται από την τυροσίνη, η οποία με έναν αριθμό βημάτων μετατρέπεται σε 4-υδροξυβενζοϊκό. Ενώ η σύνθεση της πολυπρενυλικής πλάγιας αλυσίδας αρχίζει από το ακετύλο-CoA, το οποίο με μία αλληλουχία αντιδράσεων, που συνήθως ονομάζεται δρόμος του μεβαλονικού οξέος, οδηγεί στο σχηματισμό του *φαρνεσύλο-πυροφωσφορικού* (φαρνεσύλο-PP). Το τελευταίο μετά από μετασχηματισμό σε *δεκαπρενύλο-πυροφωσφορικό* (δεκαπρενύλο-PP) συμπυκνώνεται με το 4-υδροξυβενζοϊκό σε δεκαπρενύλο-4-υδροξυβενζοϊκό και στη συνέχεια με έναν αριθμό βημάτων μετατρέπεται σε ουβικινόνη. Το φαρνεσύλο-PP είναι πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση επίσης της χοληστερόλης και της δολιχόλης. (Dallner G, Sindelar P.J, 2000)

Η βιοσύνθεση της ουβικινόνης φαίνεται να αρχίζει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και να συμπληρώνεται στο σύστημα Golgi από όπου η ουβικινόνη μεταφέρεται στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου και στο πλάσμα του αίματος, όπου συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες. Σε αντίθεση με την χοληστερόλη, η ουβικινόνη δεν φαίνεται να κατανέμεται στους διάφορους ιστούς με την κυκλοφορία του αίματος. Στους ιστούς ένα μέρος της ουβικινόνης βρίσκεται με την αναγωγική της μορφή (ουβικινόλη). Η έκταση της αναγωγής της ουβικινόνης ποικίλλει από ιστό σε ιστό. Επίσης, στο αίμα φαίνεται ένα μέρος της ουβικινόνης να υπάρχει με την αναγωγική μορφή, γεγονός που συμφωνεί με την αντιοξειδωτική

της δράση. Ο μηχανισμός με τον οποίο ανάγεται η ουβικινόνη δεν είναι ξεκαθαρισμένος. Μία πιθανή εκδοχή είναι να γίνεται η αναγωγή της ουβικινόνης από τις αναγωγάσες των κινουιδών, όπως είναι η NADH-κυτόχρωμα-β5 αναγωγάση, η NADPH-κυτόχρωμα P-450 αναγωγάση και η DT-διαφοράση.

**Αντιοξειδωτική δράση:** Η ουβικινόνη, εκτός από τη μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων στα μιτοχόνδρια, που συνδέεται με τη βιοσύνθεση του ATP, δρα με την αναγωγική της μορφή (ουβικινόλη) και ως αντιοξειδωτική ένωση. Η ουβικινόλη μπορεί να αναστείλει την έναρξη αλλά και την πρόοδο της λιπιδικής υπεροξειδωσης τόσο στις κυτταρικές μεμβράνες όσο και στις LDL, ενώ η βιταμίνη E αναστέλλει μόνο την πρόοδο της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Πρόσφατα, ο Y. Yamamoto και ο S. Yamashita υποστήριζαν ότι η σχέση της ουβικινόλης προς ουβικινόνη στο πλάσμα του αίματος είναι μία ένδειξη του οξειδωτικού stress.

Σύμφωνα με τελευταίες μαρτυρίες, η ουβικινόνη προστατεύει και τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, καθώς και το DNA από οξειδωτικές βλάβες. Η ουβικινόλη μπορεί να αναγεννήσει τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη της μορφή, μία διεργασία που γίνεται κυρίως από υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C. Η ουβικινόνη δρα ανεξάρτητα από τη βιταμίνη E και για να εκδηλώσει την αντιοξειδωτική της δράση δεν απαιτείται η παρουσία της βιταμίνης E.

**Επίδραση εξωγενούς ουβικινόνης:** Η χορήγηση ουβικινόνης στον άνθρωπο αυξάνει τα επίπεδα της ουβικινόλης στο αίμα, με αποτέλεσμα να αυξάνει τόσο η προστασία των LDL από την οξείδωση όσο και η προστασία των ενδοθηλιακών κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες σε καταστάσεις ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. (Yamamoto Y, Yamashita S, 2002)

### 1.2.2.3 Λιποϊκό οξύ

Το *α-λιποϊκό οξύ* (*α-lipoic acid, LA*) είναι παράγωγο του οκτανοϊκού οξέος και έχει δύο σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH). Στην οξειδωμένη μορφή οι δύο αυτές ομάδες σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό (-S-S-). (*Reed LJ, 1996*)

Το ελεύθερο LA στην αναγωγική του μορφή ονομάζεται *διυδρολιποϊκό οξύ* (DHLA) και έχει μεγάλη αναγωγική χωρητικότητα.

Το LA είναι απαραίτητη προσθετική ομάδα στο ένζυμο διυδρολιποϋλο-τρανσακετυλάση του πολυενζυμικού συμπλέγματος που καταλύει την αποκαρβοξυλίωση των *α-κετοξέων*, όπως του πυρουβικού σε ακέτυλο-CoA και του *α-κετογλουταρικού* σε σουκινύλο-CoA. Το LA είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με αμιδικό δεσμό στο ένζυμο διυδρολιποϋλο-τρανσακετυλάση με την αμινομάδα μίας συγκεκριμένης λυσίνης και σχηματίζει το λιποαμίδιο. Η αναγέννηση του λιποαμιδίου στα μιτοχόνδρια από το διυδρολιποαμίδιο γίνεται με τη *διυδρολιποϋλο-δεϋδρογονάση ή δεϋδρογονάση του λιποαμιδίου* (LipDH) δια μέσου του NAD<sup>+</sup> και FAD. Κατά συνέπεια, η *in vivo* λειτουργία της LipDH στα μιτοχόνδρια είναι η κατάλυση της οξείδωσης του διυδρολιποαμιδίου. (*Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH, 1998*)

Το ελεύθερο LA βρίσκεται στο αίμα σε μικρομοριακές ποσότητες με τη DHLA μορφή. Όταν το LA λαμβάνεται από το στόμα κατανέμεται σε διάφορα όργανα και μέσα στα κύτταρα ανάγεται σε μεγάλο βαθμό σε DHLA. Η προσθήκη LA σε καλλιέργειες κυττάρων έδειξε ότι αυτό ανάγεται μέσα στα κύτταρα σε DHLA και στη συνέχεια το αναχθέν μόριο ελευθερώνεται. Κατά συνέπεια, το LA και ιδιαίτερα η αναγωγική του μορφή, έχει ιδιότητες που του δίνουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό φάρμακο.

Η θεραπευτική χρήση του ελεύθερου LA (ή συνήθως του DHLA) έχει ερευνηθεί τα τελευταία χρόνια. Από τις ερευνητικές αυτές εργασίες είναι σαφές ότι το LA/DHLA, όταν δίνεται ως φάρμακο, έχει πολλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων με μεταβατικά μέταλλα που καταλύουν την

παραγωγή ελευθέρων ριζών ή με την εξουδετέρωση απευθείας των ελευθέρων ριζών. Επίσης, το DHLA μπορεί να αναγεννήσει άλλα αντιοξειδωτικά που οξειδώθηκαν, όπως είναι η GSH, το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη Ε.

Κλινικές δοκιμές σε αρκετές διαφορετικές νόσους, όπου χρησιμοποιήθηκε το LA, έδειξαν ότι το LA θα μπορούσε να έχει θεραπευτική χρήση στο σακχαρώδη διαβήτη (επειδή παρεμποδίζει την καταστροφή των β-κυττάρων), στην αθηροσκλήρωση, στον καταρράκτη αλλά και στη μείωση των συμπτωμάτων από διαβητική νευροπάθεια. Στην ισχαιμία/επαναιμάτωση έχειδειχθεί ότι το LA αποτρέπει ή μειώνει τις βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται, όταν ο ισχαιμικός ιστός επανοξυγονώνεται. Το LA επίσης εμφανίζεται να έχει κάποια επίδραση στη δηλητηρίαση από μανιτάρια, σε νόσο του ήπατος, σε HIV-μόλυνση, σε δηλητηριάσεις από βαρέα μέταλλα κλπ. Η ενζυμική αναγωγή του λιποϊκού οξέος, όταν χορηγείται εξωγενώς, έχει αποδοθεί στην LipDH και στην αναγωγή της γλουταθειόνης. Η LipDH είναι μιτοχονδριακό ένζυμο και δεν βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα. Επομένως, η αναγωγή του LA στα ερυθροκύτταρα θα πρέπει να γίνεται με την αναγωγή της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι η αναγωγή διαπιστώθηκε πειραματικά ότι εξαρτάται από το NADPH και παρεμποδίζεται από τη mitomycin C, που είναι αναστολέας των αναγωγασών που περιέχουν FAD. Για την αναγωγή του LA στο ήπαρ, προτάθηκαν και η δεϋδρογονάση του λιποαμιδίου και η αναγωγή της γλουταθειόνης. Το LA ανάγεται επίσης αποτελεσματικά *in vitro* από την TrxR-1 που προέρχεται από θύμο αδένος, ήπαρ μόσχων, ανθρώπινο πλακούντα και από ήπαρ αρουραίων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η TrxR μπορεί να συμμετέχει σημαντικά στην αναγωγή του LA στο κυτταροδιάλυμα. (Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B, 1994)

#### 1.2.2.4 Μελατονίνη

Η μελατονίνη (N-ακετυλο-5-μεθόξυτρυπταμίνη) είναι μία ορμόνη που παράγεται στα κύτταρα της επίφυσης ή κωναριοκύτταρα και εκκρίνεται στη συστηματική κυκλοφορία. (Arendt J, 1988) Η βιοσύνθεσή της γίνεται από τη

σεροτονίνη. Η μελατονίνη έχει πολλαπλές δράσεις, οι περισσότερες από τις οποίες μόνο πρόσφατα άρχισαν να γίνονται αντιληπτές. Η μελατονίνη δρα ως γενικό αντιοξειδωτικό. Η αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης έχει αποδειχθεί σε ομογενοποιημένους ιστούς, καθώς και σε ζωντανούς οργανισμούς. [(Reiter R.J, Tan DX, Acuma-Castroviejo D, Burkhardt S, Karbownik M, 2000), (Reiter R.J, Tan DX, 2003)]

#### 1.2.2.5 Οιστρογόνα

Οι ορμόνες οιστραδιόλη, οιστρόνη και οιστριόλη μπορούν, σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις, να αναστείλουν *in vitro* τη λιπιδική υπεροξειδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Η αναστολή αυτή οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση του φαινολικού υδροξυλίου που περιέχουν. Έτσι, μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά και να σταματήσουν τη λιπιδική υπεροξειδωση με τρόπο παρόμοιο με την τοκοφερόλη. Όμως, γενικά οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι πολύ μεγαλύτερες από τα φυσιολογικά επίπεδα αυτών των ορμονών, που κυμαίνονται σε pmol.

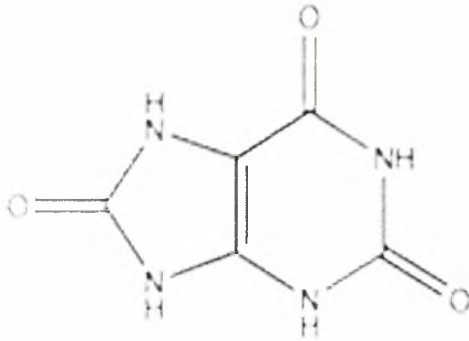
Οι φαινοξυλικές ρίζες των οιστρογόνων που παράγονται όταν τα οιστρογόνα αντιδρούν με  $ROO^{\bullet}$ , είναι ικανές να αντιδράσουν με πρωτεΐνες και με DNA και να προκαλέσουν βλάβες στα βιομόρια αυτά. Έτσι, οι ορμόνες αυτές παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση.

Το συνθετικό οιστρογόνο διαιθυλο-στιλβοιστρόλη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όμως είναι καρκινογόνος ουσία για τα ζώα και τον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν σχεδιάζονται συνθετικά αντιοξειδωτικά για θεραπευτικούς σκοπούς. (Liehr JG. 1996)



## 1.2.2.6 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ παράγεται με οξείδωση της ξανθίνης και της υποξανθίνης από την οξειδάση και την δεϋδρογονάση της ξανθίνης. Τα



Εικόνα 1.16 – Δομή ουρικού οξέος (uric acid)

περισσότερα είδη ζώων περιέχουν στα υπεροξυσωμάτια το ένζυμο οξειδάση του ουρικού, που μετατρέπει το ουρικό σε αλλαντοΐνη, η οποία στη συνέχεια μεταβολίζεται σε άλλα προϊόντα που είναι περισσότερο διαλυτά στο νερό από το

ουρικό. Όμως στον άνθρωπο και σε άλλα ανώτερα ζώα λείπει το ένζυμο αυτό και

έτσι το ουρικό, πριν αποβληθεί στα ούρα,

αθροίζεται στο πλάσμα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,2-0,4 mM . Επίσης, το ουρικό βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και σε όλα τα υγρά του σώματος, συνήθως όμως σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Σε φυσιολογικό pH, η ενολική μορφή όλου του ουρικού οξέος ιονίζεται σε ουρικό ( $pK=5,4$ ).

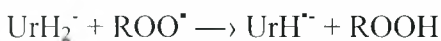
Το ουρικό είναι δυσδιάλυτο στο νερό, έτσι όταν παράγεται σε περίσσεια, αποβάλλεται από τα υγρά του σώματος και σχηματίζει κρυστάλλους που εναποτίθενται σε διάφορα σημεία και κυρίως στις αρθρώσεις (ουρική αρθρίτιδα, gout), αλλά και σε διάφορα όργανα, όπως στους νεφρούς προκαλώντας νεφρικές βλάβες. Η ουρική αρθρίτιδα αντιμετωπίζεται συχνά με αλλοπουρινόλη που έχει δομή ανάλογη με την υποξανθίνη, μόνο που οι θέσεις των ατόμων N και C στις θέσεις 7 και 8 έχουν υποστεί αμοιβαία μετάθεση.

Η αλλοπουρινόλη είναι αναστολέας της δεϋδρογονάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης. Ο μηχανισμός δράσης της αλλοπουρινόλης παρουσιάζει ενδιαφέρον. Αρχικά δρα ως υπόστρωμα και στη συνέχεια το προϊόν που παράγεται, η αλλοξανθίνη, δρα ως αναστολέας (υπόστρωμα αυτοκτονίας).

Ισχυρά οξειδωτικά, όπως  $\text{OH}^\bullet$ , οξειδώνουν το ουρικό σε ελεύθερη ρίζα με αρνητικό φορτίο ( $\text{UrH}^{\bullet-}$ ). Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μετατοπίζεται πάνω στο δακτύλιο του ουρικού δίνοντας με συντονισμό σταθερότερη ρίζα, η οποία δεν αντιδρά με  $\text{O}_2$ , για να σχηματίσει την υπεροξειδική ρίζα του ουρικού. Η ρίζα  $\text{UrH}^{\bullet-}$  μπορεί να αναχθεί από το ασκορβικό οξύ (AH):



Το ουρικό επίσης αντιδρά με υπεροξειδικές ρίζες ( $\text{ROO}^\bullet$ ) και τις εξουδετερώνει:



Το 1981 ο Ames και συν. σημείωσαν το γεγονός ότι το ουρικό, *in vitro*, είναι ένας ισχυρός εκκαθαριστής των  $\text{ROO}^\bullet$  και  $\text{OH}^\bullet$  καθώς και του μονήρους οξυγόνου ( $^1\text{O}_2$ ), υποθέτοντας ότι δρα και βιολογικά ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Επίσης, οι ερευνητές αυτοί υποστήριξαν ότι η μη έκφραση του γονιδίου της υπεροξειδάσης του ουρικού δίνει πλεονεκτήματα στα ανώτερα ζώα, επειδή επιτρέπει τη συσσώρευση αυτού του αντιοξειδωτικού. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι το ουρικό είναι ένας ισχυρός εκκαθαριστής του  $\text{O}_3$  και του  $\text{NO}_2$  που βρίσκονται στον μολυσμένο αέρα και ίσως το ουρικό να παρέχει κάποια προστασία και από αυτά τα οξειδωτικά. Το ουρικό επίσης προστατεύει τις πρωτεΐνες από τη νίτρωση που προκαλείται από το  $\text{ONOO}^-$ . Επίσης, το ουρικό σχηματίζει χηλικές ενώσεις με μεταλλικά ιόντα, όπως είναι του σιδήρου και του χαλκού, που καταλύουν αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Παρ' όλα αυτά η αντίδραση του ουρικού με  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$  και  $\text{ONOO}^-$  έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της ρίζας του ουρικού. Η ρίζα αυτή βιολογικά δεν πρέπει να είναι και τόσο αβλαβής, επειδή έχει δειχθεί *in vitro* ότι αντιδρά με την  $\alpha_1$ -αντιπρωτεΐνάση. Η ανενεργοποίηση, βέβαια, της  $\alpha_1$ -αντιπρωτεΐνάσης μπορεί να προληφθεί με την ταυτόχρονη παρουσία του ασκορβικού οξέος. [(Simic MG, Jovanovic SV, 1989), (Whiteman M, Halliwell B, 1996)]

### 1.2.2.7 Χολερυθρίνη

Η *χολερυθρίνη* (bilirubin) είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της αίμης στα θηλαστικά και προέρχεται από την πρόδρομη ένωση *χολοπρασίνη* (biliverdin) με τη δράση του ενζύμου *αναγωγή της χολοπρασίνης* (biliverdin reductase). Η χολοπρασίνη έχει γαλαζοπράσινο χρώμα, ενώ η χολερυθρίνη φωτεινό κόκκινο. Η *αναγωγή της χολοπρασίνης* απουσιάζει από τα πτηνά, τα ερπετά και τα αμφίβια και έτσι αυτά αποβάλλουν χολοπρασίνη και όχι χολερυθρίνη.

Στο σώμα του ανθρώπου παράγονται την ημέρα περίπου 275 mg χολερυθρίνης, που προέρχονται κατά 80% περίπου από τον καταβολισμό της αιμοσφαιρίνης και κατά 20% από άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη, όπως η μυοσφαιρίνη, η καταλάση, το κυτόχρωμα P450 και άλλα κυτοχρώματα. (Ryter SW, Tyrell RM, 2000) Η χολερυθρίνη είναι υδρόφοβη και σε φυσιολογικό pH είναι αδιάλυτη στο νερό. Έτσι, για να μπορέσει να μεταφερθεί στο ήπαρ συνδέεται στοιχειομετρικά 1:1 με την αλβουμίνη. Αυτή τη σύνδεση στην αλβουμίνη την συναγωνίζονται και άλλα μόρια, όπως είναι τα φάρμακα τα οποία αντικαθιστούν τη συνδεδεμένη χολερυθρίνη. Μέσα στα ηπατικά κύτταρα η υδρόφοβη χολερυθρίνη συνδέεται με πρωτεΐνες του κυτοδιαλύματος, κυρίως με την *τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης* και μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εκεί υφίσταται σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ και σχηματίζει μόνο- και διγλυκουρονίδια. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την *ουριδίνιο-διφωσφογλυκουρονύλο τρανσφεράση* (UDP glucuronyl transferase). Τα γλυκουρονίδια της χολερυθρίνης είναι διαλυτά στο νερό, μεταφέρονται στη χολή από όπου και αποβάλλονται.

Η σύνθεση της χολερυθρίνης προάγεται σε οξειδωτικό stress και έχει προταθεί ως φυσιολογικό αντιοξειδωτικό. Η χολερυθρίνη έχει δειχθεί *in vitro* ότι αναστέλλει την παραγωγή του σουπεροξειδίου ( $O^{\bullet-}$ ) από τα ουδετερόφιλα, εξουδετερώνει το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ) και είναι ισχυρός εκκαθαριστής της υπεροξειδικής ρίζας ( $ROO^{\bullet}$ ). Η συνδεδεμένη στην αλβουμίνη χολερυθρίνη προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες τόσο την αλβουμίνη όσο και τα λιπαρά οξέα

που μεταφέρονται από αυτή. Οι μαρτυρίες που συνηγορούν ότι η χολερυθρίνη είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό *in vivo* είναι πολύ λίγες. (Βέβαια, ας μην ξεχνάμε ότι αυτή μπορεί να ευαισθητοποιήσει με την παρουσία φωτός το οξυγόνο και να σχηματίσει το μονήρες οξυγόνο.) (Stocker R, Yamamoto Y, Mc Donagh AF, Glazer AN, Ames BN, 1987)

#### 1.2.2.8 α-Κετοξέα

Ορισμένα κετοξέα, όπως το πυρουβικό και το α-κετογλουταρικό, όταν προστίθενται σε καλλιέργειες κυττάρων, αντιδρούν μη ενζυμικά με το  $H_2O_2$  και δρουν ως εκκαθαριστές του.

Η αποκαρβοξυλίωση, μάλιστα, του α-κετογλουταρικού χρησιμοποιείται και για τη δοκιμασία του  $H_2O_2$ . Επίσης, τα οξέα αυτά ίσως να εκκαθαρίζουν και το HOCl και το ONOOH. Οι αντιδράσεις, όμως, αυτές δεν είναι βέβαιο ότι γίνονται φυσιολογικά στους ιστούς των ζώων. (Free Rad Res Commun, 1989)

#### 1.2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

*Αναγωγικό* (reductant) ή *αναγωγικό αντιδραστήριο* (reducing agent) είναι μία ουσία που δίνει ηλεκτρόνια σε ένα άλλο αντιδραστήριο, το οποίο με την πρόσληψη των ηλεκτρονίων ανάγεται. Αντίθετα, *οξειδωτικό* (oxidant) ή *οξειδωτικό αντιδραστήριο* (oxidizing agent) είναι μία ουσία η οποία δέχεται ηλεκτρόνια από ένα άλλο αντιδραστήριο, το οποίο με τη σειρά του οξειδώνεται. Οξείδωση, δηλαδή, είναι δυνατόν να συμβεί χωρίς αντίστοιχη αναγωγή σε οποιοδήποτε μέρος του συστήματος. Όταν μία αντίδραση χαρακτηρίζεται από οξείδωση και αναγωγή, ονομάζεται *οξειδοαναγωγική αντίδραση* (redox reaction). Τέτοιες αντιδράσεις γίνονται στα βιολογικά συστήματα με τη συμμετοχή του οξυγόνου που περιέχεται στον αέρα. Με τις αντιδράσεις αυτές οξειδώνονται οι

χημικές ουσίες που προέρχονται από τη διάσπαση των τροφών και οι οργανισμοί προμηθεύονται την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωσή τους.

Οι ονομασίες αναγωγικό ή αναγωγικό αντιδραστήριο και οξειδωτικό ή οξειδωτικό αντιδραστήριο είναι χημικοί ορισμοί. Συναφείς εκφράσεις στα βιολογικά συστήματα για το αναγωγικό και το οξειδωτικό είναι *αντιοξειδωτικό* (antioxidant) και *προ-οξειδωτικό* (pro-oxidant) αντίστοιχα. *Αντιοξειδωτική χαρακτηρίζεται κάθε ουσία η οποία, όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με ευοξειδωτες ουσίες του οργανισμού, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωσή τους από προ-οξειδωτικές ουσίες.* Μία προ-οξειδωτική ένωση είναι τοξική ουσία, επειδή μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια, πρωτεΐνες, σάκχαρα και νουκλεϊκά οξέα και στη συνέχεια να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις ή ακόμα και σε ασθένειες. Ο όρος «*προ-οξειδωτικό*» είναι συνώνυμος με τις *δραστικές μορφές* (reactive species). Έτσι, χημικά, ένα προ-οξειδωτικό είναι ένα οξειδωτικό που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να ανάγει ένα προ-οξειδωτικό και να σχηματίσει προϊόντα που να έχουν ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα. Ένα αντιοξειδωτικό είναι αναγωγικό, αλλά όλα τα αναγωγικά δεν είναι απαραίτητα και αντιοξειδωτικά. Έτσι, η ύπαρξη *in vivo* ποικίλων βλαβερών προ-οξειδωτικών, όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO^{\cdot}$  και  $OH^{\cdot}$ ), κάνει τα αντιοξειδωτικά απαραίτητα συστατικά του οργανισμού μας για μία υγιεινή ζωή.

Για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μία έντονη δραστηριοποίηση σχετικά με την ευεργετική επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου. Μάλιστα, η έρευνα επικεντρώνεται σε συστατικά, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτά. Η σύγχρονη βιομηχανία προσπαθεί να αναπτύξει νέες τεχνολογικές μεθόδους για τη βελτίωση του ρόλου των τροφίμων στην ανθρώπινη υγεία, ενώ παράλληλα γίνεται προσπάθεια για την προώθηση στην αγορά μίας νέας κατηγορίας τροφίμων. Αυτή περιλαμβάνει τρόφιμα φυσικής προέλευσης τα οποία, εκτός από την κάλυψη των βασικών διατροφικών αναγκών, θα παρέχουν κάποια πρόσθετα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία και θα την προστατεύουν από πιθανούς κινδύνους.

Πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής επιβραδύνουν ή παρεμποδίζουν την εμφάνιση ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η εγκεφαλική δυσλειτουργία, η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος κλπ. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να απενεργοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες σχετίζονται με τις παραπάνω ασθένειες.

Πολλές κατηγορίες ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση έχουν αναχνηθεί σε διάφορα φυτά. Αυτές οι ενώσεις είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), οι τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες, τα καροτενοειδή, οι αρωματικές αλκοόλες, τα υδροξυ-παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και άλλα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, η υδροξυτυροσόλη κλπ. Σημαντικές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, οι ελαιούχοι σπόροι, τα σιτηρά, τα δημητριακά, το τσάι, το κρασί, τα βότανα και τα καρυκείμενα. (Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999)

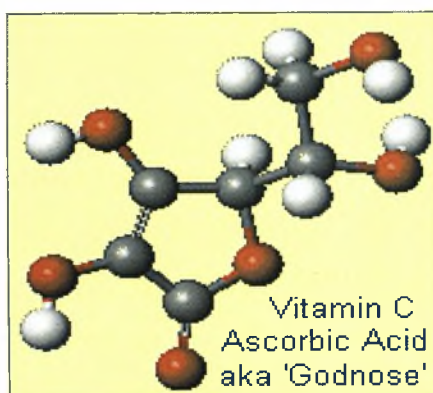
### 1.2.3.1 Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

**Χημική δομή:** Η χημική δομή του L-ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) έγινε γνωστή από τις εργασίες του Szent Georgi το 1928 και των King και Waugh το 1932.

Η αναγωγική μορφή της βιταμίνης C, δηλαδή το L-ασκορβικό οξύ, είναι ένα σακχαρικό οξύ και κατατάσσεται στα

μονοσάκχαρα. Πολλά ζώα έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέσουν τη βιταμίνη C,

όμως ο άνθρωπος, τα ινδικά χοιρίδια και ο πίθηκος δεν μπορούν να τη



Εικόνα 1.17 – Ασκορβικό οξύ

βιοσυνθέσουν, επειδή τους λείπει το ένζυμο *οξειδάση της γουλονολακτόνης* (gulonolactone oxidase), που καταλύει την τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να την προσλαμβάνουν με την τροφή τους. (Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Yagi K, 1995)

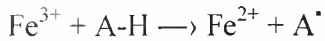
Πλήρης έλλειψη ή πολύ χαμηλά επίπεδα βιταμίνης C στην τροφή του ανθρώπου, δημιουργούν την πάθηση σκορβούτο. Οι συνηθισμένες απαιτήσεις πρόσληψης ασκορβικού οξέος που δίνονται από την *Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences* (1989) είναι 60 mg/ημέρα. Σε ειδικές όμως περιπτώσεις, τα επίπεδα αυτά είναι αυξημένα. Έτσι, στην εγκυμοσύνη των γυναικών είναι 70 mg/ημέρα, στη γαλουχία 95 mg/ημέρα και στους καπνιστές 100 mg/ημέρα.

**Αντιοξειδωτική δράση:** Το ασκορβικό οξύ είναι δότης ηλεκτρονίων (αναγωγικό αντιδραστήριο) και μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμα όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο ( $O^{\bullet -}$ ), τις υδροξυλικές ρίζες ( $OH^{\bullet}$ ), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου που βρίσκονται μέσα και έξω από το κύτταρο. [(May JM, 1999), (Frei B, Stocker R, England L, Ames BN, 1990)]

Στο κυτόπλασμα το ασκορβικό και η GSH παρουσιάζουν συνεργική δράση για να προστατεύσουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες. (Meister A, 1995) Έξω από τα κύτταρα το ασκορβικό οξύ (A-H) πιθανόν να δρα σε σύζευξη με τη λιποδιαλυτή βιταμίνη E (E-OH), η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες (σχημα). Ένα πιθανό πρόβλημα με το μοντέλο αυτό είναι ότι η λιποδιαλυτή βιταμίνη E και η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις. Έχει όμως δειχθεί ότι στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται ενδιάμεσα μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με τον ίδιο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από την λιπιδική υπεροξειδωση και

με τον τρόπο αυτό συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών. [(Mylonas C, Kouretas D, 1999), (Chopra M, Thurnham DI, 1999)]

**Προ-οξειδωτική δράση:** Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει το  $\text{Fe}^{3+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$  και στη συνέχεια ο  $\text{Fe}^{2+}$  με την αντίδραση Fenton μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών:



Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να δράσει και στο  $\text{Cu}^{2+}$ . Έτσι, μίγμα σιδήρου ή χαλκού με ασκορβικό οξύ προάγει *in vitro* την παραγωγή ελευθέρων ριζών και μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Αυτή η προ-οξειδωτική δράση, που εμφανίζει το ασκορβικό *in vitro*, θα είχε μεγαλύτερη φυσιολογική σημασία, επειδή σχετίζεται με την περιεκτικότητα του ασκορβικού στα τρόφιμα. Όμως δεν υπάρχουν μαρτυρίες για την τοξικότητα του ασκορβικού σε μεγάλες δόσεις στον άνθρωπο. Μία ποσότητα ασκορβικού 200 mg/ημέρα είναι ικανοποιητική για να κορεστούν τα κύτταρα και τα υγρά του σώματος με την βιταμίνη αυτή. Μεγαλύτερες ποσότητες αποβάλλονται στα ούρα. Όμως οι καπνιστές πιθανόν να χρειάζονται μεγαλύτερες ποσότητες από αυτή. Η προ-οξειδωτική δράση της βιταμίνης σχετίζεται με την βιοδιαθεσιμότητα των καταλυτικών μεταβατικών ιόντων. Όμως, *in vivo* ο σίδηρος και ο χαλκός δεσμεύονται από ορισμένες πρωτεΐνες και δεν μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. (Levine M *et al.*, 1996)



### 1.2.3.2 Βιταμίνη E



Εικόνα 1.18 – Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E ανακαλύφθηκε το 1922 από τους Evans και Bishop. Το όνομα τοκοφερόλη δόθηκε αργότερα, μετά από παρατήρηση ότι η έλλειψή της από τη διατροφή των επιμύων, δημιουργούσε τέτοιες συνθήκες, ώστε ο θηλυκός επίμυς που κυοφορούσε απορροφούσε τα έμβρυά του ως εσωτερική αποβολή. Έτσι, διαπιστώθηκε η σημαντικότητα της βιταμίνης στη διατήρηση της κυοφορίας. Η βιταμίνη E είναι απαραίτητο συστατικό της διατροφής όχι μόνο των ζώων αλλά και των ανθρώπων. Όμως, μέχρι σήμερα, δεν έχει αποδειχθεί αν και κατά πόσο επηρεάζει τη γονιμότητα στον άνθρωπο.

Η φυσική βιταμίνη E είναι μία ομάδα λιποδιαλυτών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση, που αποτελείται από τέσσερις τοκοφερόλες (α, β, γ, δ) και τέσσερις τοκοτριενόλες (α, β, γ, δ). Μία από τις ενώσεις αυτές, η α-τοκοφερόλη, είναι περισσότερο διαδεδομένη στη φύση και έχει τη μεγαλύτερη βιολογική και αντιοξειδωτική δράση. Η φυσιολογική σπουδαιότητά της ως αντιοξειδωτική ένωση αναγνωρίστηκε τα τελευταία 50 χρόνια. (*Burton GW, Traber MG, 1990*) Έτσι, σήμερα αναφέρεται περισσότερο ως αντιοξειδωτική ένωση παρά ως βιταμίνη. Και αυτό συμβαίνει επειδή οι περισσότερες βιταμίνες είναι συνένζυμα ενζυμικών αντιδράσεων, γεγονός που δεν ισχύει για τη βιταμίνη E και επιπλέον, η έλλειψη της βιταμίνης E στον άνθρωπο δεν εμφανίζει πολύ γρήγορα κάποια ασθένεια με εμφανή συμπτώματα, όπως συμβαίνει με τις άλλες βιταμίνες. Οι επιδράσεις από τη μη λήψη της κατάλληλης ποσότητας εμφανίζονται μετά από

μεγάλο χρονικό διάστημα, συνήθως δεκαετίες, και συνδέονται με εκφυλιστικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση κ.ά. Πολλά εργαστήρια ασχολούνται με την αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E και τον προστατευτικό της ρόλο στη λιπιδική υπεροξειδωση των ιστών και των λιποπρωτεϊνών. Από καιρό όμως έχει αναγνωριστεί ότι οι αντιοξειδωτικές δράσεις των διαφόρων μορφών βιταμίνης E δεν είναι σύμφωνες με τις βιολογικές της δράσεις. *In vitro*, π.χ. η RRR-γ-τοκοφερόλη παρουσιάζει το 50% της αντιοξειδωτικής δράσης της RRR-α-τοκοφερόλης, ενώ *in vivo* έχει μόνο το 10%. Από τις παρατηρήσεις αυτές έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι εκτός από την αντιοξειδωτική δράση οι διάφορες μορφές της βιταμίνης E μπορεί να έχουν μία πιο συγκεκριμένη φυσιολογική λειτουργία. Είναι γνωστό ότι η α-τοκοφερόλη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C και της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>, χωρίς όμως να είναι ακόμα σαφής η φυσιολογική σημασία αυτής της αναστολής. [(Giakoustidis D, Kontos N, Iliadis S, Papageorgiou G, Tsantilas D, Spyridis C, Papazoglou N, Botsoglou N, Dimitriadou A, Giakoustidis E, 2001), (Mukai K, 1993)]

Σύμφωνα με απόφαση της Διεθνούς Οργάνωσης Υγείας (World Health Organization) η αναφορά στη βιταμίνη E, όπως εξάλλου γίνεται και με άλλες βιταμίνες, θα πρέπει να συνοδεύεται και από τη χημική της δομή για να υπάρχει απόλυτη συμβατότητα στην ερμηνεία των οποιονδήποτε παρατηρήσεων σχετίζονται με αυτή.

Σήμερα στο εμπόριο κυκλοφορούν τόσο η φυσική όσο και η συνθετική μορφή της βιταμίνης E. Όμως η φυσική και η συνθετική μορφή δεν είναι ισοδύναμες, επειδή διαφέρουν στη σύσταση, στη δομή, στη βιοδιαθεσιμότητα και στη βιολογική δράση. Η συνθετική βιταμίνη E, που πωλείται ως συμπλήρωμα της φυσικής βιταμίνης E, παρασκευάζεται βιομηχανικά από την τριμεθυλοϋδροκινόνη και τη συνθετική ισοφυτόλη. Επειδή η συνθετική ισοφυτόλη αποτελείται από στερεοϊσομερείς μορφές, το τελικό προϊόν, που είναι η συνθετική βιταμίνη E, περιέχει όλες τις στερεοϊσομερείς μορφές της α-τοκοφερόλης. Η συνθετική βιταμίνη αναφέρεται ως *d,l*-α-τοκοφερόλη ή *all rac*-α-τοκοφερόλη και είναι ένα ρακεμικό μίγμα που αποτελείται από ίσες ποσότητες των οκτώ στερεοϊσομερών μορφών της α-τοκοφερόλης (*RRR*, *SRR*, *RRS*, *SRS*, *RSS*, *SSR*, *RSR* και *SSS*-α-

τοκοφερόλη). Εμπορικά χρησιμοποιούνται συνήθως οι εστέρες με οξικό και σουκινικό οξύ της φυσικής *RRR*-α-τοκοφερόλης, όσο και της συνθετικής *all rac*-α-τοκοφερόλης, επειδή οι μορφές αυτές είναι πιο σταθερές στην οξειδωση από το οξυγόνο που περιέχεται στον αέρα. (Vitamins and carotenoid abstracts, 1997)

Οι εστέρες με οξικό οξύ τόσο της φυσικής όσο και της συνθετικής α-τοκοφερόλης είναι σε ελαιώδη μορφή, ενώ με σουκινικό οξύ είναι σε στερεή μορφή. Οι εστέρες αυτοί πριν απορροφηθούν, υδρολύονται πολύ γρήγορα στο έντερο από την παγκρεατική εστεράση και απορροφώνται με την ελεύθερή τους μορφή. Η παγκρεατική εστεράση, σε αντίθεση με την παγκρεατική λιπάση, απαιτεί τα υποστρώματα να είναι σε διαλυτή μορφή. Έτσι τα χολικά οξέα και τα λιποδιαλυτά προϊόντα των τριακυλογλυκερολών είναι απαραίτητα για τη διαλυτοποίηση της οξικής τοκοφερόλης πριν αυτή απορροφηθεί. Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι τα χολικά οξέα είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες για την παγκρεατική εστεράση. (Muller D, Manning J, Mathias P, Harries J, 1976)

**Σημαντικότερες διατροφικές πηγές βιταμίνης E:** Η βιοσύνθεση της βιταμίνης E γίνεται μόνο στα φυτά, γι' αυτό τα ομόλογά της βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στα φυτικά προϊόντα και κυρίως στα φυτικά έλαια. Οι τοκοφερόλες βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στα φύτρα των δημητριακών καρπών και στα φυτικά έλαια, ενώ οι τοκοτριενόλες στην αλευρώδη και υποαλευρώδη στιβάδα των δημητριακών καρπών και στο *φοινικέλαιο* (palm oil). Επειδή στα φυτικά έλαια υπάρχει μία πολύ καλή θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των τοκοφερολών με την ποσότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, έχει υποστηριχθεί ότι η βιταμίνη E αντιπροσωπεύει την κυριότερη αντιοξειδωτική ουσία στους ιστούς των φυτών.

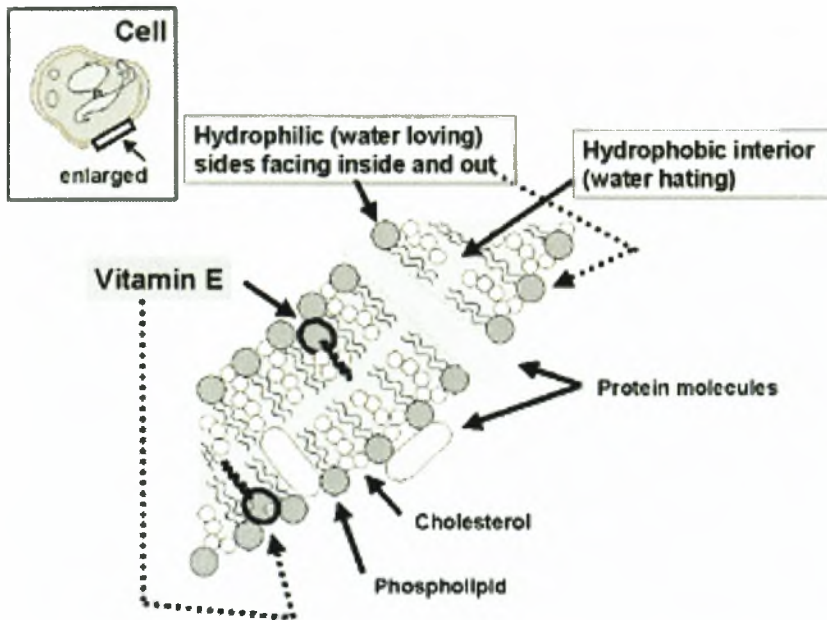
Σε αντίθεση με τα φυτά, οι ιστοί των ζώων περιέχουν μικρές, σχετικά, ποσότητες βιταμίνης E και μάλιστα σχεδόν αποκλειστικά την α-τοκοφερόλη. Τα υψηλότερα επίπεδα α-τοκοφερόλης βρέθηκαν στο λιπώδη ιστό (150 μg/g), ενώ τα ερυθροκύτταρα περιέχουν μικρές ποσότητες α-τοκοφερόλης (2 μg/g). (Sheppard A.J. Pennington JAT, Weihrauch JL, 1993)

**Βιοδιαθεσιμότητα και βιολογική δράση:** Ως βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability) ορίζεται ο βαθμός και η ταχύτητα απορρόφησης, της μη εστεροποιημένης τοκοφερόλης από το πεπτικό σύστημα και η μεταφορά της στο αίμα. Έρευνες για τη βιοδιαθεσιμότητα που έγιναν σε ανθρώπους με χορήγηση ισομοριακών ποσοτήτων ελεύθερης *RRR*-α-τοκοφερόλης και εστεροποιημένης τοκοφερόλης με οξικό οξύ, έδειξαν ότι και οι δύο μορφές απορροφώνται με την ίδια ταχύτητα και ότι η μέγιστη ποσότητα στο πλάσμα εμφανίζεται περίπου μετά από 12 h, ενώ στα ερυθροκύτταρα μετά από 24 h. Παρ' όλο που ο βαθμός απορρόφησης ήταν διαφορετικός για κάθε άτομο, η σχετική απορρόφηση ήταν ίδια και για τις δύο μορφές. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι ποσότητες των δύο μορφών της α-τοκοφερόλης ήταν ίσες τόσο στο πλάσμα όσο και στα ερυθροκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στον άνθρωπο η εστεροποιημένη και η ελεύθερη μορφή έχουν την ίδια βιοδιαθεσιμότητα. (*Cheeseman KH, Holley AE, Kelly FJ, Wasil M, Hughes L, Burton G, 1995*)

Ιδιαίτερες προσπάθειες έχουν καταβληθεί για να καθοριστεί η βιολογική δράση των διαφόρων μορφών της βιταμίνης E. Η βιολογική δράση της α-τοκοφερόλης και των αναλόγων της έχει καθοριστεί χρησιμοποιώντας διάφορες δοκιμασίες, τόσο χημικές όσο και βιολογικές. Μεταξύ αυτών, η βιολογική δοκιμασία απορρόφησης του εμβρύου-κύησης επιμύων έχει γίνει ευρέως αποδεκτή. Ως διεθνή μονάδα (IU) βιολογικής δράσης ορίστηκε το 1 mg του οξικού εστέρα της ρακεμικής συνθετικής α-τοκοφερόλης (*all-rac*-α-τοκοφερόλη οξική), που όταν χορηγείται από το στόμα (*per os*) σε επίμυς που στερούνται βιταμίνης E, τους προστατεύει από την απορρόφηση του εμβρύου-κύησης. Η βιολογική δράση για τα ανάλογα της βιταμίνης E, όπως ακριβώς βρέθηκε στους επίμυς με την παραπάνω δοκιμασία, έχει μεταφερθεί και στον άνθρωπο. (*Hume EM, 1941*)

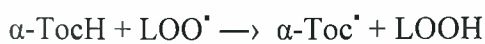
Η National Research Council (NRC) πρότεινε ότι, όταν η βιταμίνη E προορίζεται για διατροφή, η δράση της να εκφράζεται σε ισοδύναμα της *RRR*-α-τοκοφερόλης (α-TE) και όχι σε IU. Ως ένα α-οTE ορίζεται η δράση 1 mg *RRR*-α-τοκοφερόλης. Έτσι, η ολική δράση της βιταμίνης E σε ένα τρόφιμο υπολογίζεται από το άθροισμα των τιμών που λαμβάνονται πολλαπλασιάζοντας τα

μικρογραμμάρια (mg) των διαφόρων μορφών της βιταμίνης E με τον ανάλογο συντελεστή.



Εικόνα 1.19 – Η βιταμίνη E ενσωματώνεται με την λιπόφιλη ουρά της στη λιπιδική διπλοστοιβάδα και την προστατεύει από οξειδωτική βλάβη.

Η βιολογική δράση των διαφόρων μορφών της βιταμίνης E εξαρτάται από τη μεταφορά της στους ιστούς, όμως η πλέον διαδεδομένη και βιολογικά δραστική στα ζώα είναι η *RRR*- $\alpha$ -τοκοφερόλη. Αν και οι άλλες τοκοφερόλες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δεν διατηρούνται ικανοποιητικά στους ιστούς των ζώων. Η βασική αντιοξειδωτική δράση των τοκοφερολών, ιδιαίτερα η εκκαθάριση υπεροξυλοριζών των λιπιδίων ( $\text{LOO}^\bullet$ ) κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση, είναι αποτέλεσμα της ταχύτερης αντίδρασης με τις ρίζες αυτές σε σχέση με τις αντιδράσεις διπλανών λιπαρών οξέων ή πρωτεϊνών μεμβρανών.



(σχετική ταχύτητα  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )



Η σχετική ταχύτητα αντίδρασης της τοκοφερόλης είναι αρκετά υψηλή με το μονήρες οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$ ), το υπεροξειδικό ανιόν (πιθανόν υπό τη μορφή  $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) και με ρίζες υδροξυλίου ( $\text{HO}^{\bullet}$ ). Σχηματική παράσταση μηχανισμών οξειδωσης α-τοκοφερόλης δείχνει το βασικό προϊόν α-τοκοφερυλοκινόνη. [(Liebler DC, 1993), (Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, Comp P, Grammas P et al, 2004)]

Η τοκοφερόλη ως λιποδιαλυτή βιταμίνη είναι γνωστή για τη δράση της στη διάσπαση αλυσιδωτών λιπιδικών υπεροξειδώσεων και η ριζική της μορφή μπορεί να ανακυκλωθεί φυσιολογικά πίσω στην αρχική μορφή. Στην ανακύκλωση αυτή σημαντικό ρόλο παίζει το ασκορβικό οξύ. Μελέτες έδειξαν ότι το ασκορβικό ανιόν ανάγει την α-τοκοφερυλο-ρίζα στην α-τοκοφερόλη με σχετικά υψηλή ταχύτητα, σε απομονωμένες μεμβράνες, καλλιέργειες κυττάρων και λιποπρωτεΐνες. (Chow CK, 1991)

Η βιταμίνη E είναι απαραίτητο μικροδιατροφικό υλικό με υψηλή αναγωγική ικανότητα για τον ανθρώπινο οργανισμό, γι' αυτό και η έλλειψή της μπορεί να προκαλέσει λιπιδική υπεροξειδωση και οξειδωτικό stress σε διάφορα όργανα. Οι ιστοί της καρδιάς είναι πλούσιοι σε βιταμίνη E, σχεδόν σε συγκέντρωση παρόμοια με αυτή του ήπατος. Όλα τα μεμβρανικά καρδιομυοκύτταρα περιέχουν υψηλή συγκέντρωση βιταμίνης E, όπως και οι εσωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες. Η βιταμίνη E είναι σχεδόν η μόνη αντιοξειδωτική ουσία και αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, ενώ μειώνει το οξειδωτικό stress. Με τη γήρανση των οργανισμών παρουσιάζεται πτώση της συγκέντρωσης της βιταμίνης E στο μυοκάρδιο. Η βιταμίνη E μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά για τις βλάβες στο μυοκάρδιο και την ισχαιμική επαναϊμάτωση. [(Neuzil J, 2003), (Janero DR, 1991)]

Η βιταμίνη E, όπως και άλλες αντιοξειδωτικές βιταμίνες, προστατεύει το ανοσιακό σύστημα των βιολογικών οργανισμών. Αρκετά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η βιταμίνη E έχει θετικά αποτελέσματα στο ανοσιακό σύστημα του ανθρώπου, ιδιαίτερα με διατροφικά συμπληρώματα και με ιχνοστοιχεία σε υγιείς ηλικιωμένους. (Bendich A, 1996) Έκθεση σε μόλυβδο και άλλα τοξικά μέταλλα είναι γνωστό ότι υποβαθμίζει το ανοσιακό σύστημα στον άνθρωπο, όπως και άλλα συστήματα (ενδοκρινικό, νευρικό και αναπαραγωγικό), λόγω της αύξησης του

οξειδωτικού stress. Η λήψη βιταμίνης E και άλλων αντιοξειδωτικών προστατεύει το ανοσιακό σύστημα και προλαμβάνει την τοξική δράση του μολύβδου σε διάφορα όργανα.

Η βιταμίνη E έχει μελετηθεί και ως προς τον ρόλο της στην πρόληψη της νίτρωσης των πρωτεϊνών σε περιπτώσεις χρόνιων φλεγμονών σε πειραματόζωα. Πειράματα σε ποντίκια δείχνουν ότι η λήψη διατροφικών συμπληρωμάτων βιταμίνης E προλαμβάνουν τη νίτρωση πρωτεϊνών και παρεμποδίζουν την οξείδωση της βιταμίνης C. Επίσης, πειράματα για την αντινεοπλασματική δράση της βιταμίνης E και την προώθηση της απόπτωσης κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες, έχουν προσδιορίσει θετικά αποτελέσματα. (Zhang D, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamagushi R, Kasai H, 1997)

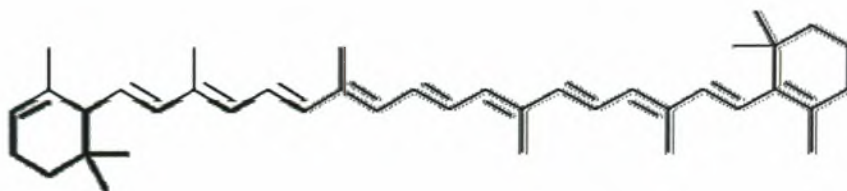
### 1.2.3.3 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μία ομάδα φυσικών χρωστικών που περιλαμβάνει περισσότερες από 600 ενώσεις. (Olson JA, Krinsky N, 1995) Οι ενώσεις αυτές προσδίδουν το κίτρινο, το πορτοκαλί και το κόκκινο χρώμα σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Πολλά καροτενοειδή είναι πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης A ή ρετινόλης. Πάνω από 50 καροτενοειδή μπορούν να δώσουν τη βιταμίνη A. Έτσι, αυτά είναι συχνά η κυριότερη διατροφική πηγή της βιταμίνης A στον άνθρωπο. Το πιο γνωστό και πιο σημαντικό καροτενοειδές για τον άνθρωπο είναι το β-καροτένιο, το οποίο μπορεί να μετατραπεί στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου με τη β-καροτενοειδή 15,15'-διοξυγονάση (β-carotenoid 15, 15'-dioxygenase) σε δύο όμοια μόρια βιταμίνης A. (Olson JA, 1989) Πολλά καροτενοειδή δεν μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη A και επομένως δεν έχουν τη δράση της βιταμίνης A. Ένα τέτοιο καροτενοειδές είναι το λυκοπένιο, που προσδίδει το κόκκινο χρώμα στη ντομάτα.

Ο παλαιότερος γνωστός αντιπρόσωπος των καροτενοειδών είναι το καροτένιο, στο οποίο οφείλουν και το όνομά τους όλες αυτές οι ενώσεις. Το καροτένιο αποτελεί τη χρωστική των καρότων και απομονώθηκε από αυτά το 1831 από τον Wackenroder. Η χρωστική αυτή δεν είναι μία ένωση, αλλά μίγμα

τριών ενώσεων που ονομάζονται α-, β- και γ- καροτένια με αντίστοιχη αναλογία 10:90:0,1.

Τα καροτενοειδή ανήκουν στα πολυένια (υδρογονάνθρακες με πολλούς διπλούς δεσμούς) και σχετίζονται τόσο με το ισοπρένιο όσο και με τις ιονόνες. Ο βασικός σκελετός των καροτενοειδών περιέχει 40 άτομα άνθρακα. Η ανθρακική αυτή αλυσίδα μπορεί να τροποποιηθεί με κυκλοποίηση από το ένα άκρο ή και από τα δύο άκρα, με αναγωγή των διπλών δεσμών και με εισαγωγή ομάδων που περιέχουν οξυγόνο. Τα καροτενοειδή που περιέχουν μία ή περισσότερες ομάδες οξυγόνου είναι γνωστά ως *ξανθοφύλλες*. Η κυριότερη ξανθοφύλλη που βρέθηκε στο πλάσμα είναι η λουτεΐνη, αλλά και η ζεαξανθίνη και η κρυπτοξανθίνη. Η β-κρυπτοξανθίνη είναι προ-βιταμίνη Α. Τα καροτενοειδή που δεν περιέχουν οξυγόνο είναι γνωστά ως *υδρογονοανθρακικά καροτενοειδή* ή *καροτένια*. (Britton G, 1995)



Εικόνα 1.20 –α-καροτένιο

**Διατροφικές πηγές καροτενοειδών:** Τα καροτενοειδή ο άνθρωπος τα προσλαμβάνει με τη διατροφή του κυρίως από τα φυτά, όπου εντοπίζονται κυρίως στις ρίζες, στα φύλλα, στο σπέρμα, στα βλαστάρια, στα φρούτα και στα άνθη. Περίπου 60 διαφορετικά καροτενοειδή έχουν αναγνωριστεί σε φρούτα και λαχανικά που καταναλώνονται από τους ανθρώπους.

**Αντιοξειδωτική δράση:** Τα καροτενοειδή είναι οι ισχυρότεροι βιολογικοί απενεργοποιητές του μονήρους οξυγόνου ( $^1 O_2$ ) (Di Mascio P, Kaiser S, Sies H, 1989). Μονήρες οξυγόνο παράγεται όταν η ενέργεια διεγερμένου φωτός από ένα



φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρεται στο μοριακό οξυγόνο. Η αντίδραση του β-καροτένιου με το  $^1\text{O}_2$  αποδείχθηκε πρώτη φορά το 1968 από τον Foote και συν. Η ικανότητα των καροτενοειδών να απενεργοποιούν το  $^1\text{O}_2$  συσχετίζεται με το μήκος της πολυενικής αλυσίδας. Έτσι, το λυκοπένιο (μεγάλη πολυενική αλυσίδα) εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη ικανότητα στην απενεργοποίηση του  $^1\text{O}_2$ . Τα καροτενοειδή αλληλεπιδρούν με το  $^1\text{O}_2$  με δύο τρόπους: α) δια μέσου ενός φυσικού μηχανισμού, με τον οποίο η διεγερμένη ενέργεια του  $^1\text{O}_2$  μεταφέρεται στο καροτενοειδές και στη συνέχεια διασκορπίζεται στο περιβάλλον με τη μορφή θερμότητας, β) με χημική εξουδετέρωση, με την οποία το καροτενοειδές καταστρέφεται με την εισαγωγή του  $^1\text{O}_2$  σε ένα διπλό δεσμό.

Εκτός από την απενεργοποίηση του μονήρους οξυγόνου, έχει μελετηθεί και η δράση των καροτενοειδών στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. (Burton GW, 1989) Το β-καροτένιο, όταν αντιδρά με τις λιπιδικές ρίζες ( $\text{LOO}^\bullet$ ) σχηματίζει μία ενδιάμεση ρίζα του καροτένιου που έχει δύο δυνατότητες: α) να αντιδράσει με μία άλλη λιπιδική ρίζα και να σχηματίσει ένα σταθερό παράγωγο, ή β) να αντιδράσει με οξυγόνο και να δώσει ένα παράγωγο που έχει προ-οξειδωτικές ιδιότητες. Σε περιβάλλον όπου η μερική πίεση του οξυγόνου είναι μεγάλη, όπως στους πνεύμονες, πιθανόν να αντιδρά με οξυγόνο και να δείχνει προ-οξειδωτική δράση. Αντιθέτως, σε άλλους ιστούς με χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, είναι περισσότερο πιθανόν να δρα ως αντιοξειδωτικό και να σταματά τη λιπιδική υπεροξείδωση.

#### 1.2.3.4 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά και είναι μία πολύ μεγάλη οικογένεια ενώσεων που περιλαμβάνει τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τις λιγνάνες.



Εικόνα 1.21 –Διαφορετικές διατροφικές πηγές πολυφαινολών

#### 1.2.3.5. Φαινολικά οξέα

Γενικά, τα φαινολικά οξέα απαντούν στα σιτηρά, στα όσπρια, στα φρούτα, στο κρασί, στο παρθένο ελαιόλαδο, σε βότανα και καρυκεύματα, στο λιναρόσπορο, σε εδώδιμα φύλλα και σε διάφορες άλλες πηγές. Στην τάξη αυτή ανήκουν τα υδροξυ-παραγωγα του βενζοϊκού οξέος, του φαινυλοξικού οξέος και του κινναμωμικού οξέος. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υδροξυ-παραγωγα του κινναμωμικού οξέος που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτά. Κυριότερος αντιπρόσωπος των παραγώγων αυτών είναι το καφεϊκό οξύ, που βρίσκεται στον καφέ εστεροποιημένο με τη 5-OH του κινικού οξέος (quinic acid) και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ. [(Clifford MN., 1999), (Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G., 1996)]

Η βιοσύνθεση των υδροξυ-παραγώγων του κινναμωμικού οξέος στα φυτά γίνεται δια μέσου της οδού του σικιμικού οξέος από τα αρωματικά αμινοξέα

φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. (*Castellucio C., Papanga G., Melikian N., Bolwell G., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C., 1995*)

### 1.2.3.6 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία πολύ μεγάλη τάξη ενώσεων και βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία σε όλα σχεδόν τα φυτικά τρόφιμα και σε αρκετά ποτά και ηδύποτα (τσάι, κρασί κλπ), κυρίως συζευγμένα με σάκχαρα με β-γλυκοσιδικό δεσμό. (*Scalbert A., Williamson G., 2000*) Τα τελευταία χρόνια μελετώνται πολύ εντατικά, επειδή θεωρούνται ότι προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση [(*Ness AR., Powles JW, 1997*), (*Criqui MH, Ringel BL, 1994*), (*Renaud S, De Lorgeril M, 1992*), (*Tijburg LBM, Mattem T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB, 1997*)] και ορισμένες μορφές καρκίνου [(*Yang CS, Wang ZY, 1993*), (*Steinmetz KA, Potter JD, 1996*), (*Adiercreutz H, Mazur W, 1997*)]. Οι ενώσεις αυτές περιέχουν φαινολικά υδροξύλια συνδεδεμένα στους δακτυλίους A, B και C. Η τάξη των φλαβονοειδών περικλείει αρκετές οικογένειες όπως φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες, που διαφέρουν κυρίως στον ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (*Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ, 2002*).

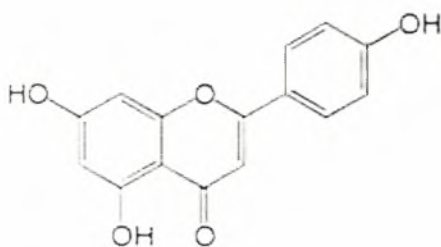
Όλες οι οικογένειες των φλαβονοειδών προέρχονται από ένα κοινό βιοσυνθετικό δρόμο (*Winkler-Shirley B, 2002*). Επιπλέον μετατροπές γίνονται σε διάφορα στάδια με αποτέλεσμα μεταβολές στην έκταση της υδροξυλίωσης, της μεθυλίωσης, στο διμερισμό και τη γλυκοσυλίωση.



Εικόνα 1.22 –Κόκκινα σταφύλια, σημαντική πηγή κατεχινών

**Φλαβανόλες:** Αντιπροσωπεύονται από τις κατεχίνες, που βρίσκονται σε αφθονία στο πράσινο τσάι (*camellia sinensis*), στο οποίο θα αναφερθούμε εκτενέστερα στην πορεία. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του πράσινου τσαγιού, με σκοπό τη μετατροπή του σε

μαύρο τσάι, οι φλαβονόλες που είναι σε μονομερή μορφή οξειδώνονται ενζυμικά σε περισσότερο σύνθετες πολυφαινόλες και σε ταννίνες (Ding Z, Kuhr S, Engelhardt UH, 1992). Έτσι, το μαύρο τσάι περιέχει περίπου τη μισή ποσότητα κατεχινών από το πράσινο τσάι. Άλλες πηγές κατεχινών είναι το κόκκινο κρασί (Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL, 1995) και η σοκολάτα (Arts C, Hollman PC, Kromhout D, 1999).



Εικόνα 1.23 –απιγενίνη

1992).

**Φλαβόνες:** Είναι λιγότερο διαδεδομένες στη φύση και αντιπροσωπεύονται κυρίως από τη λουτεολίνη και την απιγενίνη που βρέθηκαν στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (λουτεολίνη) και στο σέλινο (απιγενίνη) (Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, 1992).

**Φλαβονόλες:** Αντιπροσωπεύονται κυρίως από την καμφερόλη, την κερκετίνη, τη μυρικετίνη και τη φισετίνη. Η κερκετίνη είναι η κυριότερη φλαβονόλη στη διατροφή μας και βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαχανικά και ποτά και ιδιαίτερα στα κρεμμύδια (Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, 1992) και στον καφέ (Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B, 1993).

**Φλαβονόνες:** Αντιπροσωπεύονται κυρίως από τη ναρινγενίνη, την ταξιφολίνη και την εσπεριδίνη. Κυριότερη πηγή τους είναι τα εσπεριδοειδή. Αυτή που λαμβάνεται περισσότερο με τη διατροφή είναι η εσπεριδίνη, επειδή βρίσκεται στα πορτοκάλια που καταναλώνονται σε μεγαλύτερες ποσότητες (Rousseff RL, Martin SF, Youtsey CO, 1987).

**Ισοφλαβόνες:** Στις ενώσεις αυτές ο Β δακτύλιος εντοπίζεται στην θέση 3 του C δακτυλίου. Αντιπροσωπεύονται από την δαϊδζεΐνη και τη γενιστεΐνη. Η κυριότερη πηγή τους είναι η σόγια (Halliwell B, Gatteridge JMC, 1990). Για τις ενώσεις αυτές υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή έχουν ιδιότητες οιστρογόνων και επειδή έχει υποστηριχθεί ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού και στην οστεοπόρωση [(Adiercreutz H, Mazur W, 1997), (Tapiero H, Ba GN, Tew KD, 2002)].

**Ανθοκυανιδίνες:** Είναι οι κόκκινες χρωστικές των φρούτων. Οι προανθοκυανιδίνες αποτελούνται από μονομερή της φλαβονόλης και τα αντίστοιχα ολιγομερή.

Φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, φλαβόνες και ανθοκυανιδίνες είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα με *O*-γλυκοσιδικό δεσμό. Το συνδεδεμένο σάκχαρο συνήθως είναι γλυκόζη ή ραμνόζη, αλλά μπορεί επίσης να είναι αραβινόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικό οξύ ή και κάποιο άλλο σάκχαρο. Το συνδεδεμένο σάκχαρο συνήθως είναι ένα, αλλά μπορεί να είναι δύο ή και τρία και υπάρχουν αρκετές πιθανές θέσεις για να συνδεθούν αυτά στα φλαβονοειδή. Η γλυκοσυλίωση καθιστά τα φλαβονοειδή περισσότερο υδατοδιαλυτά, αλλά λιγότερο δραστικά στις ελεύθερες ρίζες.

Άλλα φλαβονοειδή, όπως τα στυλβένια, δεν είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτικά τρόφιμα. Παρ' όλα αυτά σε ένα από αυτά, τη ρεσβερατρόλη, που βρίσκεται στο κρασί, πρόσφατα έχει δοθεί μεγάλη προσοχή, επειδή παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες (*Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW et al., 1997*). Οι λιγνάνες αναγνωρίζονται ως φυτοοιστρογόνα, εξαιτίας της ιδιότητάς τους να ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα. Τα μόνα τρόφιμα που περιέχουν αξιόλογες ποσότητες από τις λιγνάνες είναι ο λιναρόσπορος και το λινέλαιο (*Axelsson M, Sjovalld J, Gustafsson BE, Setchell KDR, 1982*). Λιγνάνες με τη μορφή της εντεροδιόλης και εντερολακτόνης βρέθηκαν στο πλάσμα και στα ούρα του ανθρώπου (*Steinmetz KA, Potter JD, 1996*). Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι μονομερή, διμερή ή ολιγομερή. Οι πολυμερείς ενώσεις ονομάζονται ταννίνες και ανάλογα με τη δομή τους διαχωρίζονται σε συμπυκνωμένες και υδρολυόμενες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή των φλαβονοειδών, ενώ οι υδρολυόμενες περιέχουν συνήθως γαλλικό οξύ εστεροποιημένο με υδατάνθρακα.

**Απορρόφηση και μεταβολισμός:** Η χημική δομή των πολυφαινόλων προσδιορίζει την ταχύτητα και την έκταση της απορρόφησης στο έντερο, καθώς και τη φύση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο πλάσμα. Μαρτυρίες για την απορρόφηση τους μπορούν να ληφθούν με μέτρηση της αντιοξειδωτικής χωρητικότητας του πλάσματος, μετά από κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες ή με

μέτρηση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα και στα ούρα, μετά από χορήγηση καθαρών ενώσεων ή τροφίμων με γνωστό περιεχόμενο πολυφαινολών. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή που απορροφώνται στο λεπτό έντερο, η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα ελαττώνεται πολύ γρήγορα (ημιπερίοδος ζωής 1-2h). Ο χρόνος αυτός για την κερκετίνη είναι 24h και αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μεγάλη συγγένεια που δείχνει η ένωση αυτή στη σύνδεση με την αλβουμίνη του πλάσματος [(*Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C et al.*, 1995), (*Hollman PCH, Van Trijp JMP, Buysman MNCP, Van der Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, Katan MB*, 1997)].

Η γλυκοσυλίωση επιδρά στις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών, επειδή προσδίδει σε αυτές υδρόφιλες ιδιότητες. Η απομάκρυνση του σακχάρου γίνεται υδρολυτικά με τα ένζυμα γλυκοσιδάσες. Η υδρολυτική αυτή διάσπαση είναι συνήθως απαραίτητη για την παθητική διάχυση του άγλυκου συστατικού (φλαβονοειδές ελεύθερο σακχάρου) δια μέσου της ψηκτροειδούς παρυφής του εντέρου. Η δράση των γλυκοσιδασών εμφανίζεται στα κύτταρα του γαστρεντερικού βλεννογόνου. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να εκκριθούν και από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Οι πολυφαινόλες που είναι συνδεδεμένες με γλυκόζη, αραβινόζη ή ξυλόζη είναι ισχυρά υποστρώματα για τα ενδογενή ένζυμα του ανθρώπου. Η συνδεδεμένη ραμνόζη δεν είναι υπόστρωμα για τη β-γλυκοσιδάση του ανθρώπου και διασπάται μόνο από τις ραμνοσιδάσες του παχέος εντέρου. Η υδρολυτική διάσπαση των πολυφαινολών, όταν χορηγούνται σε μικρές δόσεις, γίνεται κυρίως στα βλεννογόνα κύτταρα του εντέρου και το ήπαρ παίζει ένα δευτερεύοντα ρόλο και λαμβάνει μέρος στην επιπλέον μετατροπή των πολυφαινολών. Αντίθετα, όταν χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις, ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται κυρίως στο ήπαρ (*Piskula MK, Terao J*, 1998). Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι το έντερο παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των πολυφαινολών που λαμβάνονται με τη διατροφή.

Μετά την υδρόλυση των πολυφαινολών στο άγλυκο μέρος, γίνεται σύζευξη ορισμένων υδροξυλομάδων με μεθυλομάδες, θεικές ομάδες και με γλυκουρονικό οξύ ή ακόμη και με συνδυασμό όλων αυτών. Η σύζευξη αυτή μεταβάλλει τις βιολογικές ιδιότητες στους μεταβολίτες των πολυφαινολών που κυκλοφορούν στο πλάσμα. Όταν οι πολυφαινόλες χορηγούνται σε μικρές δόσεις,

τότε σχεδόν όλοι οι μεταβολίτες που κυκλοφορούν στο πλάσμα είναι συζευγμένοι, ενώ όταν χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις, τότε μόνο ένα μέρος των μεταβολιτών είναι συζευγμένο και το υπόλοιπο ελεύθερο (*Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE, 2000*).

Φλαβανόλες, όπως η (—)-επικατεχίνη, είναι συνήθως ακυλωμένες με γαλλικό οξύ. Η γαλλούλο υποκατάσταση δεν επιδρά τόσο ισχυρά στη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών, όπως συμβαίνει με τη γλυκοσυλίωση. Οι φλαβανόλες εμφανίζονται να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να απορροφώνται χωρίς αποσύνδεση ή υδρόλυση [(*Yang CS, Lee MJ, Chen LS, 1999*), (*Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T, 1997*)].

Τα υδροξυ-παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ, είναι συχνά εστεροποιημένα με σάκχαρα, οργανικά οξέα και λιπίδια. Το χλωρογενικό οξύ είναι ο εστέρας του καφεϊκού οξέος με κινικό οξύ. Η ένωση αυτή βρέθηκε στον καφέ σε υψηλά επίπεδα, επειδή δεν υπάρχουν εστεράσες στους ιστούς του ανθρώπου για να το υδρολύσουν και να ελευθερώσουν το καφεϊκό οξύ. Έτσι, το μόνο σημαντικό σημείο που μεταβολίζεται το χλωρογενικό οξύ είναι η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (*Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Williamson G, 1996*).

**Ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των πολυφαινολών:** Οι κυτταροδιαλυτές β-γλυκοσιδάσες της λακτάσης βρίσκονται σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς, κυρίως όμως στο ήπαρ και καταλύουν μία μεγάλη ποικιλία από εξωγενή γλυκοσίδια [(*Lamarco KL, Glew RH, 1986*), (*Gopalan V, Pastuzyn A, Galey WR, Glew RH, 1992*)]. Η λακτάση φλοριζίνη υδρολάση (lactase phlorizin hydrolase) βρίσκεται μόνο στο λεπτό έντερο και πρόσφατα έχει υποστηριχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των γλυκοσυλιωμένων πολυφαινολών, επειδή καταλύει μία μεγάλη ποικιλία γλυκοσυλιωμένων πολυφαινολών, όπως και το 3-Ο-γλυκοσίδιο της κερκετίνης που δεν είναι υπόστρωμα για τις κυτοδιαλυτές β-γλυκοσιδάσες. Όμως, το 50% των Ευρωπαίων και το 90% των Αφρικανών και Ασιατών έχουν έλλειψη αυτού του ενζύμου στην εφηβεία.

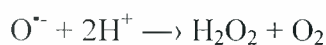
Η κατεχόλη-Ο-μεθυλοτρανσφεράση έχει ευρεία κατανομή στους ιστούς και μεθυλιώνει τις υδροξυλομάδες των πολυφαινόλων. Η ειδικότητα αυτού του ενζύμου εξαρτάται από τη θέση της υδροξυλομάδας στους δακτυλίους της πολυφαινόλης.

UDP-γλυκουρονοσύλο-τρανσφεράσες καταλύουν τη σύζευξη των πολυφαινόλων με γλυκουρονικό οξύ.

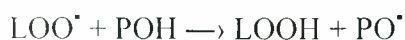
Οι σουλφοτρανσφεράσες των φαινόλων είναι κυτοδιαλυτά ένζυμα με ευρεία κατανομή. Ενδογενή υποστρώματα αυτών των ενζύμων είναι οι ιωδοθυρονίνες αλλά και άλλα υποστρώματα, όπως η 4-νιτροφαινόλη, οι φαινόλες και οι υδροξυαρυλαμίνες (*Coughtrie MH, Sharp S, Maxwell K, Innes NP, 1998*). Μερικές σουλφοτρανσφεράσες αναστέλλονται από τις πολυφαινόλες (*Walle T, Baton EA, Walle UK, 1995*).

**Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης:** Οι πολυφαινόλες *in vitro* δρουν αντιοξειδωτικά με τους παρακάτω τρόπους:

A) Εκκαθαρίζουν τις ρίζες του σουπεροξειδίου ( $O^{\cdot -}$ ) στο αρχικό στάδιο και το εμποδίζουν να οδηγηθεί στο σύστημα των αντιδράσεων Fenton, που είναι μία σημαντική πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου (*Παπαγεωργίου ΓΕ, 1999*):

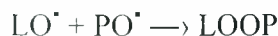


B) Εξουδετερώνουν τις λιπούπεροξειδικές ρίζες ( $LOO^{\cdot}$ ), που σχηματίζονται κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση. Η εξουδετέρωση των  $LOO^{\cdot}$  γίνεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου από μία υδροξυλομάδα της πολυφαινόλης (POH) (*Παπαγεωργίου ΓΕ, 1999*):



Η ρίζα των πολυφαινόλων ( $PO^{\cdot}$ ) που παράγεται από την παραπάνω αντίδραση είναι σχετικά πιο σταθερή και δεν αντιδρά εύκολα με λιπαρά οξέα, αλλά μόνο με ελεύθερες ρίζες:





Έτσι, σχηματίζεται ένα αδρανές προϊόν (LOOP) και τερματίζεται η διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Η ρίζα  $\text{PO}^{\bullet}$ , όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με ένα λιπαρό οξύ και να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες:



Στην περίπτωση αυτή, οι πολυφαινόλες δείχνουν προ-οξειδωτική δράση. Στις αντιοξειδωτικές ικανότητες των φλαβονοειδών μπορούμε να προσθέσουμε και την ικανότητα ορισμένων από αυτές να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με ιόντα μετάλλων, τα οποία προάγουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών με την αντίδραση Fenton.

**Σχέση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών οξέων:** Η δομή των φαινολικών οξέων επιδρά σημαντικά στην αναστολή της υπεροξειδωσης. Έτσι, η αντιοξειδωτική δράση τους *in vitro* εξαρτάται:

- *Από τις υδροξυλομάδες.* Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλομάδων του μορίου. Από έρευνες που έχουν γίνει, βρέθηκε ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από τις μονοφαινόλες και η εισαγωγή μίας δεύτερης υδροξυλομάδας σε ορθο- ή παρα- θέση αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση του φαινολικού οξέος. Έτσι, το πρωτοκατεχικό και το καφεϊκό οξύ (ο-φαινόλες) είναι αποτελεσματικότερα αντιοξειδωτικά σε σχέση με τις αντίστοιχες μονοφαινόλες, δηλαδή το π-υδροξυβενζοϊκό και το π-κουμαρικό οξύ. Το γαλλικό οξύ, με τρεις υδροξυλομάδες, είναι δραστικότερο από το πρωτοκατεχικό οξύ. Ωστόσο, η παρουσία περισσότερων των τριών υδροξυλομάδων σε έναν αρωματικό πυρήνα δεν βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα.
- *Από τις μεθόξυ ομάδες.* Η παρουσία ενός ή δύο μεθοξυ-ομάδων σε ορθο-θέση ως προς την υδροξυλομάδα, αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων. Έτσι, το σιναπικό οξύ εμφανίζεται δραστικότερο από το φερουλικό, το οποίο με τη σειρά του είναι πιο δραστικό από το π-κουμαρικό. Για τον ίδιο λόγο, το συρινγικό οξύ είναι αποτελεσματικότερο από το βανιλικό και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Είναι

γενικώς αποδεκτό ότι η ορθο- υποκατάσταση με αλκυλο- ή μεθοξυ- ομάδες, οι οποίες δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, σταθεροποιεί την αρυλοξυ- ρίζα και επομένως, αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση. Βέβαια, η μεθοξυ- υποκατάσταση δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να θεωρηθεί ισοδύναμη με την προσθήκη υδροξυλομάδας.

- *Από την παρουσία διπλού δεσμού.* Η παρουσία της ομάδας  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  στο κινναμωμικό οξύ εξασφαλίζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση στα υδροξυ-παράγωγά του σε σχέση με την ομάδα  $-\text{COOH}$  του βενζοϊκού οξέος. Πράγματι, τα οξέα καφεϊκό, π-κουμαρικό, φερουλικό και σιναπικό είναι δραστηκότερα από το π-υδροξυβενζοϊκό, πρωτοκατεχικό, βανιλλικό και συρινγικό οξύ. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο διπλό δεσμό  $\text{C}=\text{C}$ , ο οποίος σταθεροποιεί τη ρίζα εξαιτίας συντονισμού.

Η αλκυλο-εστεροποίηση δεν μεταβάλλει την αντιοξειδωτική δράση, δεδομένου ότι τόσο το γαλλικό όσο και ο προπυλεστέρας του εμφανίζουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα.

**Σχέση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών:** Η δομή των φλαβονοειδών επιδρά σημαντικά στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών και των μεταβολιτών τους *in vitro* εξαρτάται από τη διάταξη των λειτουργικών ομάδων στους δακτυλίους. Έτσι, η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται:

- ❖ *Από την παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 3 στο δακτύλιο C.* Το άγλυκο φλαβονοειδές που έχει την 3-OH, όπως η φισετίνη, η (+)-κατεχίνη, η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η μορίνη είναι ισχυροί αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης, συγκρινόμενα με εκείνα που στερούνται την 3-OH, όπως η απιγενίνη, η εσπεριδίνη και η ναριγενίνη.
- ❖ *Από την παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα C-2 και C-3 στο δακτύλιο C.* Υδρογόνωση αυτού του δεσμού ελαττώνει την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών.

- ❖ Από την καρβονυλική ομάδα στον άνθρακα C-4 του δακτυλίου C. Η ομάδα αυτή σε ορισμένες μελέτες βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε άλλες όχι. Έτσι, η κερκετίνη, που έχει καρβονυλική ομάδα στον C-4, έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τις κατεχίνες, που στερούνται καρβονυλικής ομάδας στον C-4.
- ❖ Από τον αριθμό των υδροξυλομάδων. Η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με τον αριθμό των υδροξυλομάδων που βρίσκονται στον δακτύλιο B και ειδικότερα στον C-3'. Έτσι, η μυρικετίνη, που έχει τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις C-3', C-4' και C-5' του δακτυλίου B, έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την καμφερόλη, που έχει μόνο μία υδροξυλομάδα στη θέση C-4' του δακτυλίου B.
- ❖ Από τη διευθέτηση των υδροξυλομάδων. Οι υδροξυλομάδες στις θέσεις C-5 και C-7 του δακτυλίου A, στις θέσεις C-3' και C-4' του δακτυλίου B και στην θέση C-3 του δακτυλίου C εμφανίζονται να συμβάλουν σημαντικά στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα φλαβονοειδή χρειάζονται μία υδροξυλομάδα στη θέση C-2' και την ομάδα της πυρογαλλόλης (υδροξυλομάδα στις θέσεις C-3', C-4', C-5') για αντιυπεροξειδική δράση.
- ❖ Από την παρουσία γλυκοσυλιωμένων σακχάρων. Η σύνδεση με σάκχαρα ελαττώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, επειδή στερεί την ικανότητά τους να δώσουν υδρογόνο. Έτσι, το άγλυκο μέρος των φλαβονοειδών της κερκετίνης, μυρικετίνης, απιγενίνης, ναριγενίνης, εσπεριδίνης είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην αναστολή παραγωγής μαλονικής διαλδεϋδης (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) από τα αντίστοιχα γλυκοσίδια τους.
- ❖ Από τις μεθόξυ ομάδες. Οι ομάδες αυτές ελαττώνουν επίσης την αντιοξειδωτική ικανότητα για τον ίδιο λόγο με την παραπάνω περίπτωση.
- ❖ Από την καρβονυλομάδα στη θέση C-5 και την υδροξυλομάδα στη θέση C-3 ή στη θέση C-4. Τα φλαβονοειδή αυτά, όπως η ρουτίνη και η κερκετίνη, μπορούν να σχηματίσουν χηλικές ενώσεις με ιόντα σιδήρου και να συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δράση, προστατεύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών με το σύστημα των αντιδράσεων Fenton.

Για να μπορεί να γίνει εφαρμογή αυτών των πληροφοριών στα φλαβονοειδή που καταναλώνουμε με τη διατροφή μας, χρειάζεται συστηματική ανάλυση των τροφίμων για την περιεκτικότητα και τη σύσταση σε φλαβονοειδή, καθώς και εκτεταμένη μελέτη για το μεταβολισμό τους.

**Αντιοξειδωτική δράση:** Οι πολυφαινόλες *in vitro*, είναι ή αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης ή εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών ή σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με ιόντα μετάλλων. Αρκετές φαινόλες των φυτών αναστέλλουν την οξειδωση των LDL *in vitro*, όπως το καφεϊκό οξύ και η υδροξυτυροσώλη που βρίσκεται στις ελιές και στο ελαιόλαδο [(Παπαγεωργίου Κ, Νούτσου Φ, Χατζηδιονυσίου Κ, Ηλιάδης Σ, Μακέδου Κ, Παπαγεωργίου Γ, 2002), (Φεσληκίδης Θ, Ηλιάδης Σ, Μακέδου Κ, Παπαγεωργίου Γ, 2003)]. Τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο κόκκινο κρασί βρέθηκε να αναστέλλουν την οξειδωση των LDL *in vitro*, οπότε υποστηρίχθηκε ότι αυτά θα μπορούσαν να ασκήσουν σημαντική καρδιοπροστατευτική επίδραση και *in vivo*, περιορίζοντας την οξειδωση των LDL. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επιπλέον με την εξήγηση του «Γαλλικού παραδόξου». Σε περιοχή της Γαλλίας, όπου παρ' όλο που επικρατούν παράγοντες που προάγουν τις καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως είναι το κάπνισμα και η διατροφή με λιπαρά, παρατηρείται χαμηλό ποσοστό καρδιακών προσβολών, επειδή καταναλώνουν κόκκινο κρασί που περιέχει πολλές πολυφαινόλες.

Το χλωρογενικό οξύ και το καφεϊκό οξύ είναι αντιοξειδωτικά *in vitro* (Kono Y, Shibata H, Kodama Y, Sawa Y, 1995). Επίσης, το χλωρογενικό οξύ αναστέλλει βλάβες του DNA [(Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H, 2000), (Shibata H, Sakamoto Y, Oka M, Kono Y, 1999)]. Έτσι, η αρνητική συσχέτιση του καρκίνου του παχέος εντέρου με την πρόσληψη καφέ σε ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες, πιθανόν εξηγείται μερικώς με την παρουσία του χλωρογενικού οξέος στον καφέ [(Favero A, Franceschi S, La Vecchia C, Negri E, Conti E, Montella M, 1998), (La Vecchia C, Ferraroni M, Negri E, D'Avanzo B, Decarii A, Levi F, Franceschi S, 1989)].

Γενικά όμως, για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών και την εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών *in vivo* δεν υπάρχουν ξεκάθαρες μαρτυρίες και

χρειάζονται περισσότερα ερευνητικά αποτελέσματα, για να εκτιμηθεί η φυσιολογική σημασία των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικών στο ανθρώπινο σώμα. γεγονός που αποτέλεσε εφαλτήριο για τη δική μας διερεύνηση.

**Προ-οξειδωτική δράση:** Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών υποστηρίζουν το θετικό ρόλο αυτών των ενώσεων στη διατροφή του ανθρώπου και στην προφύλαξη από ασθένειες. Ορισμένα, όμως, φλαβονοειδή παρουσιάζουν *in vitro* προ-οξειδωτική δράση, που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και περιπλέκει το θετικό ρόλο αυτών των ενώσεων.

Η προ-οξειδωτική δράση βρέθηκε να είναι ανάλογη προς το συνολικό αριθμό των -OH ομάδων (Cao G, Sofic E, Prior RL, 1997). Ο Hanasaki και συν. (Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S, 1994), σε μία σειρά από μονο- και δι-υδροξυφλαβονοειδή δεν κατέδειξαν καμία ανιχνεύσιμη προ-οξειδωτική δράση, ενώ αντιθέτως φλαβονοειδή με περισσότερες -OH ομάδες και ειδικά στο Β-δακτύλιο, αύξησαν σημαντικά την παραγωγή ριζών υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ) σε ένα σύστημα Fenton. Οι ενώσεις που έδειξαν προ-οξειδωτική δράση είχαν τη δομή της πυρογαλλόλης στον Α-δακτύλιο. Για την πυρογαλλόλη είχε επίσης αναφερθεί ότι προωθεί την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW, Pardini RS, 1986), από το οποίο με την αντίδραση Fenton μπορεί να παραχθεί η ιδιαίτερα αντιδραστική ρίζα του  $\cdot\text{OH}$  (Galey JB, 1997). Αυτή η προ-οξειδωτική δράση πιθανόν να ευθύνεται για τα κυτταροτοξικά και προ-αποπτωτικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών που απομονώνονται από διάφορα φαρμακευτικά βότανα [(Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J, 2002), (Ismail N, Alam M, 2001)]. Παρουσία δραστικών μορφών του αζώτου, φλαβονοειδή με τη διαμόρφωση της πυρογαλλόλης στον Α- ή Β- δακτύλιο προκαλούν τη μονόκλωνη θραύση του DNA (Ohshima, Auriol S, Gilibert I, 1998). Αν και η συμπεριφορά των φλαβονοειδών με πολλές υδροξυλικές ομάδες είναι να προωθούν την κυτταρική βλάβη από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, η χρήση της κερκετίνης και άλλων παρόμοιων πολυφαινολών, σε φαρμακολογικές δόσεις, δείχνουν αντίθετα αποτελέσματα *in vivo*.

Υπάρχουν επίσης εργασίες που δείχνουν ότι φλαβονοειδή που έχουν ακόρεστο δεσμό μεταξύ του άνθρακα 2 και 3 ή κετονική ομάδα στη θέση 4 προωθούν το σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου, που προκαλείται από το  $\text{Cu}^{2+}$  παρουσία οξυγόνου (Cao G, Sofic E, Prior RL, 1997).

Αποτελέσματα από πολλές εργασίες υποστηρίζουν ότι μερικές δομικές ιδιότητες που βελτιστοποιούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, μπορούν επίσης να βελτιστοποιήσουν και την προ-οξειδωτική τους δράση. Για να μπορέσουμε, λοιπόν, να οδηγηθούμε σε ορισμένα συμπεράσματα για την συμπεριφορά αυτών των ενώσεων *in vivo*, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας και τη σταθερότητα της ρίζας των φλαβονοειδών (Zhu BT, Ezell EL, JG. Liehr, 1994). Έτσι, δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που αυξάνουν τη σταθερότητα της ρίζας, αυξάνουν και την αντιοξειδωτική δράση.

Η μεθυλίωση και η γλυκοσυλίωση των OH ομάδων μειώνουν την προ-οξειδωτική συμπεριφορά των φλαβονοειδών (Cao G, Sofic E, Prior RL, 1997). Έτσι, τα δυσμενή προ-οξειδωτικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών μετριάζονται *in vivo* από τις ηπατικές μεθυλοτρανσφεράσες, που μεθυλιώνουν τα φλαβονοειδή.

Τα κατιόντα δισθενούς σιδήρου ή χαλκού, παρουσία φλαβονοειδών, αυξάνουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών *in vitro*. Η αύξηση αυτή έχει θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των παραπάνω κατιόντων [(Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K, 1999), (Sahu SC, Gray GC, 1997)]. Τα δεδομένα αυτά, όμως, είναι λιγότερο αντιπροσωπευτικά στο φυσιολογικό περιβάλλον του ανθρώπου, όπου ο χαλκός είναι σχετικά μη διαθέσιμος και η παρουσία του σιδήρου θα μπορούσε να επιταχύνει τα προ-οξειδωτικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών, σχηματίζοντας όμως χηλικές ενώσεις με ορισμένα φλαβονοειδή μπορεί θεωρητικά να τροποποιήσει τη διαδικασία αυτή.

Στη διαμόρφωση της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών φαίνεται να παίζει ρόλο και η βιταμίνη C. Υψηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης C μειώνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται από φλαβονοειδή *in vitro* (Bors W, Michel C, Schikora S, 1995). Έτσι, η βιταμίνη C θα μπορούσε πιθανόν *in vivo* να τροποποιήσει την προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών. Επειδή, λοιπόν, οι πολυφαινόλες εκτός από αντιοξειδωτική παρουσιάζουν και

προ-οξειδωτική δράση, χρειάζεται μεγάλη προσοχή στην κατανάλωση πολυφαινολών σε μεγάλες δόσεις.

Η γνώση που υπάρχει για την απορρόφηση και τον μεταβολισμό των πολυφαινολών περιορίζεται σε μία <επίλεκτη> ομάδα διαιτητικών φλαβονοειδών. Παρ' όλα αυτά, τα στοιχεία που έχουμε συλλέξει από την μέχρι τώρα μελέτη αυτών των φλαβονοειδών είναι επαρκή για να υποστηρίξουν ότι οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις απορροφώνται ικανοποιητικά. Ένας σημαντικός αριθμός από μελέτες μας προμηθεύει με πληροφορίες ότι μπορούν να δράσουν διττά: ως αντιοξειδωτικά, αλλά και ως προ-οξειδωτικά. Το πώς θα δράσουν *in vivo* εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ποσότητα που καταναλώνουμε, καθώς και από τη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων φλαβονοειδών θα μπορούσε δυνητικά να «υπερφορτώσει» το ανθρώπινο σώμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και αναπόφευκτες βλάβες στο DNA.

Πολλές εταιρίες σήμερα προωθούν σκευάσματα με μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινολών και προτείνουν απαιτούμενες δόσεις, οι οποίες απέχουν *παρασάγγας* από αυτές που λαμβάνουμε με τη διατροφή. Για το λόγο αυτό, πρέπει να εμπλουτίσουμε τις, μέχρι πρότινος περιορισμένες, γνώσεις μας για τον μεταβολισμό, τη βιοδιαθεσιμότητα και κυρίως την τοξικότητα αυτών των ενώσεων. Θα πρέπει λοιπόν να διατηρήσουμε μία επιφύλαξη και έναν, όχι απαραίτητα στείρο, σκεπτικισμό όσον αφορά την άκριτη κατανάλωση ανάλογων συμπυκνωμένων σκευασμάτων. Ας μην ξεχνάμε και τους προγόνους μας που έλεγαν «*παν μέτρον άριστον*», καθώς και «*ουκ εν τω πολλώ το ευ*», ειδικά σε μία εποχή που ο υπερκαταναλωτισμός τείνει να γίνει στάση ζωής.

### 1.2.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

Το οξειδωτικό stress μπορεί να καθοριστεί ως μία διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αναγωγικών μέσων που υπάρχουν σε έναν οργανισμό. Κάθε κύτταρο ενός οργανισμού εκτίθεται σε οξειδωτικά μέσα προερχόμενα από μία μεγάλη ποικιλία εξωγενών κι ενδογενών πηγών.

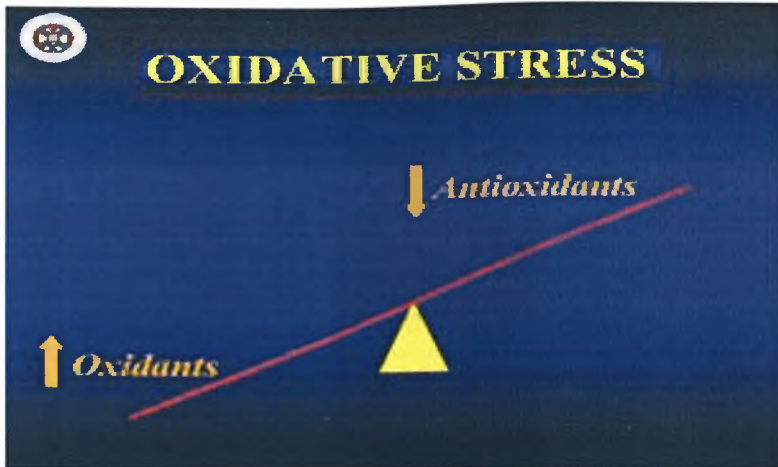
Οι εξωγενείς πηγές περιλαμβάνουν:

- ❖ χημικά και τοξίνες,
- ❖ παθογενή βακτήρια και ιούς,
- ❖ φυσικά δηλητηριώδη αέρια (π.χ. όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου)  
κι
- ❖ επιδράσεις της ιονίζουσας ή μη ιονίζουσας ακτινοβολίας.

Αντίθετα οι ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν:

- ❖ ένζυμα που μπορούν άμεσα να παράγουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης που μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ καθώς επίσης και το οξυγόνο σε υπεροξείδιο) και
- ❖ κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα που μετά την ενεργοποίησή τους παράγουν ελεύθερες ρίζες εκτός των υπολοίπων προϊόντων τους.





Εικόνα 1.24 – Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων.

Οξειδωτικό stress μπορεί να προκύψει λόγω:

1. Μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών που προκύπτουν από:

- i. μεταλλάξεις
- ii. τοξικούς παράγοντες
- iii. κακή διατροφή

2. Αυξημένης παραγωγής δραστικών ειδών

#### 1.2.4.1 Άσκηση και οξειδωτικό stress

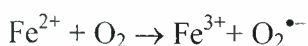
Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού stress έγινε το 1978 από τους Dillard et al.. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η άσκηση αυξάνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων στα κύτταρα. Έκτοτε μεγάλος αριθμός μελετών ασχολήθηκε με τη σύνδεση της άσκησης και του οξειδωτικού stress. Σήμερα γνωρίζουμε πως η φυσική άσκηση αποτελεί αμφιλεγόμενο θέμα.

Όσον αφορά τα οφέλη που προσφέρει η φυσική άσκηση συνοψίζονται στα εξής:

- ❖ συνίσταται ως μέτρο πρόληψης έναντι ορισμένων ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα κυρίως,
- ❖ αναζωογονεί το ανθρώπινο σώμα,
- ❖ συμβάλλει στη διατήρηση της μυϊκής μάζας και
- ❖ αυξάνει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Ωστόσο, από την άλλη πλευρά η φυσική άσκηση αυξάνει, όπως είναι αναμενόμενο, την κατανάλωση του οξυγόνου με αποτέλεσμα την επακόλουθη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου. Η παραγωγή των ROS οφείλεται κυρίως:

- ❖ στην αύξηση του ρυθμού αναπνοής και τη διαρροή ηλεκτρονίων από τα μιτοχόνδρια.
- ❖ στη μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης, η οποία καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα σε ισχαιμικές κυρίως καταστάσεις κι έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση  $O_2^{\bullet-}$ .
- ❖ στην επαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης λόγω καταστροφής των μυών κατά την άσκηση. Στη συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνουν μέρος τα ουδετερόφιλα, τα οποία έχουν και σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ιστών από ιούς και βακτήρια. Τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν λυσοζύμη (διάσπαση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων) και  $O_2^{\bullet-}$  (προλαμβάνει επέκταση βακτηριακής μόλυνσης).
- ❖ στη συσσώρευση γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά την άσκηση κι έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη. Επίσης, η πτώση του pH οδηγεί σε απελευθέρωση ιόντων σιδήρου από την αιμοσφαιρίνη και τη μυοσφαιρίνη και την επακόλουθη παραγωγή ROS σύμφωνα με τις αντιδράσεις:





- ❖ στην αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών κατά τη διάρκεια άσκησης. Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των μυών με επακόλουθη αύξηση της παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια.

Το παράδοξο λοιπόν είναι πως η άσκηση ενώ συντελεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια στην εμφάνιση οξειδωτικού stress, ταυτόχρονα προσφέρει προσαρμογές έναντι αυτού με αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. [(Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT, 2002), (Vollaard NBJ, Shearman JP, Cooper CE, 2005)]

### 1.2.5 ΠΡΑΣΙΝΟ ΤΣΑΙ

Αρχαιολογικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι άνθρωποι καταλάωναν φύλλα τσαγιού, σε βραστό νερό, 500.000 χρόνια πριν. Βοτανολογικά δεδομένα φανερώνουν ότι η Ινδία και η Κίνα ήταν από τις πρώτες χώρες στην καλλιέργεια τσαγιού. Στις μέρες μας, εκατομμύρια ανθρώπων ανά τον κόσμο πίνουν τσάι και διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι το τσάι –και ειδικότερα το πράσινο τσάι (*Camellia Sinensis*)- είναι πολύ ωφέλιμο στην υγεία του ανθρώπου, με διάφορους τρόπους.



Εικόνα 1.25 –Πράσινο τσάι

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες τσαγιού: το πράσινο, το μαύρο και η oolong. Η διαφορά ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες είναι η επεξεργασία τους. Το πράσινο τσάι παρασκευάζεται από φύλλα βιολογικής καλλιέργειας και θεωρείται ότι περιέχει την υψηλότερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών, συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες.

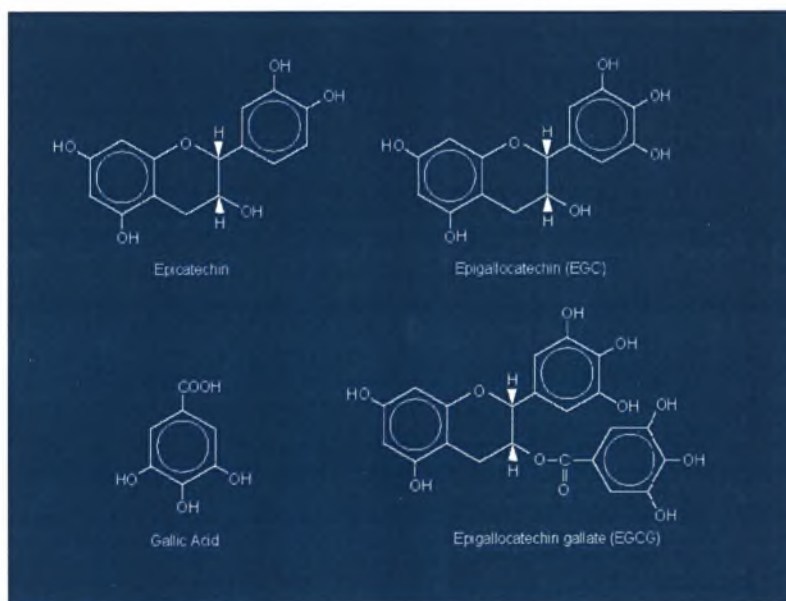
Η *Camellia Sinensis*, ένα μέλος της οικογένειας Theaceae, είναι ένας αειθαλής θάμνος (ή δενδρύλλιο), ο οποίος μπορεί να φθάσει μέχρι και 30 feet σε ύψος, αλλά συνήθως κατά την καλλιέργειά του διατηρείται σε ύψος 2-5 feet. Τα φύλλα του έχουν σκούρο πράσινο χρώμα, με σχήμα μακρόστενο ωοειδές και κατά προτίμηση συλλέγονται νωρίς, αρκετά πριν την ωρίμανση.

Γενικά, η επεξεργασία των διαφόρων τύπων τσαγιού ξεκινά μετά τη συλλογή των φύλλων τους, τα οποία αποξηραίνονται και έπειτα τυλίγονται σε ρολά. Στη συνέχεια, τα φύλλα αφήνονται να «ζυμωθούν», επιτρέποντας κατά αυτόν τον τρόπο τον μετασχηματισμό των πολυφαινολών και τη δημιουργία αρωματικών συμπλόκων. Η ζύμωση προκύπτει καθώς ένζυμα των φύλλων, τα οποία περιλαμβάνουν και οξειδάσες των πολυφαινολών, αλληλεπιδρούν με τις ταννίνες

και τις κατεχίνες. Κατά την παραγωγή του πράσινου τσαγιού, όμως, παρεμποδίζεται η οξείδωση των φύλλων. Αυτό επιτυγχάνεται με την έκθεση των φύλλων σε ατμό, διεργασία που απενεργοποιεί τα περιεχόμενα ένζυμα, προστατεύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις πολυφαινόλες.

### Χημική σύσταση του πράσινου τσαγιού

Η χημική σύσταση του πράσινου τσαγιού περιλαμβάνει πολλές πολυφαινολικές ενώσεις -οι οποίες αποτελούν το 30-40% των στέρεων εκχυλισμάτων από αποξηραμένα φύλλα τσαγιού- και το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτές αποτελούν οι φλαβανόλες, γνωστές και ως «κατεχίνες». Οι κύριες κατεχίνες του πράσινου τσαγιού είναι η επικατεχίνη (epicatechin-EC), η επικατεχίνη-3-γαλλικό οξύ (epicatechin-3-gallate-ECG), η επιγαλλοκατεχίνη (epigallocatechin-EGC) και η επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλικό οξύ (epigallocatechin-3-gallate-EGCG). Άλλες πολυφαινόλες περιλαμβάνουν φλαβανόλες με τα γλυκοσίδια και τα διπεπτίδια τους, όπως το χλωρογενικό οξύ, το κουμαροϋλκουνικό οξύ (coumaroylquinic acid), καθώς και μία που εντοπίζεται αποκλειστικά και μόνον στο τσάι, την τεογαλλίνη (theogallin- 3-galloylquinic acid). Επίσης, στα συστατικά του πράσινου τσαγιού συγκαταλέγεται και μία πληθώρα άλλων ουσιών, όπως διάφορες πρωτεΐνες, λιγνίνη, καροτενοειδή, χλωροφύλλη, διάφορα μεταλλικά στοιχεία, καφεΐνη κλπ.



Εικόνα 1.26 –Οι κύριες πολυφαινόλες στο πράσινο τσάι

Ανάλογα με τον βαθμό της οξειδωσης και της συμπύκνωσης των κατεχινών, το πράσινο τσάι μπορεί να περιέχει και ουσίες που εντοπίζονται κυρίως στο μαύρο τσάι, όπως η θεοφλαβίνη (theaflavin), διάφορες πτητικές ενώσεις κλπ. (Michael D. Brown, 1999)

### **Πιθανές επιδράσεις του πράσινου τσαγιού στην υγεία του ανθρώπου**

Θεωρίες για την ευεργετική δράση του πράσινου τσαγιού διατυπώνονται εδώ και 4700 χρόνια, ίσως και παραπάνω, αφού η ανακάλυψή του συνδέεται με τον θρυλικό αυτοκράτορα *Shennong*. Ο *Shen Nong Ben Cao* ισχυριζόταν ότι η γεύση του πράσινου τσαγιού και οι διεγερτικές του ιδιότητες ήταν χρήσιμες για την αντιμετώπιση όγκων, αποστημάτων, κυστικών ασθενειών, ακόμα και του λήθαργου μεταξύ άλλων (N. H. Woodward, 1980). Επίσης, ο Ζεν ιερέας *Eisai* το 1191, στο βιβλίο του *Kissa Yojoki (Book of Tea)*, περιγράφει το πώς πίνοντας πράσινο τσάι μπορεί κάποιος να έχει ευεργετικά οφέλη στα πέντε ζωτικά όργανα και ειδικότερα στην καρδιά. Στις μέρες μας, η «δυτική» επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί και αυτή με τη σειρά της στη διερεύνηση των πιθανών επιδράσεων του πράσινου τσαγιού στον ανθρώπινο οργανισμό. Κάποιες μελέτες παρουσιάζουν θετικά ευρήματα, ερχόμενες σε αντίθεση με άλλες που υποστηρίζουν ακριβώς το αντίθετο, ότι οι παρενέργειες είναι ποσοτικά και ποιοτικά πιο σημαντικές από τα οφέλη του πράσινου τσαγιού. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι το πράσινο τσάι αποτελεί ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα, που «ταλανίζει» την επιστημονική κοινότητα.

Τα πιθανολογούμενα, λοιπόν, οφέλη του πράσινου τσαγιού είναι τα παρακάτω (κάποια υποστηρίζονται ήδη από κλινικές μελέτες, ενώ άλλα βρίσκονται ακόμα υπό έρευνα):

- ❖ Αναστολή συγκεκριμένων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως οι ασθένειες Alzheimer και Parkinson.
- ❖ Η πρόληψη και η αντιμετώπιση κάποιων τύπων καρκίνου [(Tsubono F, Nishino Y, 2001),(Sartippour MR et al., 2006)].
- ❖ Αντιμετώπιση διαφόρων τύπων σκλήρωσης, όπως η αθηροσκλήρωση.

- ❖ Πρόληψη της αποδιάταξης των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω της εξουδετέρωσης της διασποράς των ελευθέρων ριζών κατά τη διεργασία της οξειδωσης.
- ❖ Περιορισμός των αρνητικών επιδράσεων της LDL χοληστερόλης (δηλαδή, της «κακής» χοληστερόλης), μέσω της μείωσης των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της αύξησης της παραγωγής της HDL χοληστερόλης (δηλαδή, της «καλής» χοληστερόλης).
- ❖ Αύξηση της οξειδωσης του λίπους (επιτρέποντας στο σώμα να χρησιμοποιήσει το λίπος ως πηγή ενέργειας) και του ρυθμού του μεταβολισμού.
- ❖ Η Joy Bauer, μία διατροφολόγος στη Νέα Υόρκη, υποστηρίζει ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού αυξάνουν τα επίπεδα του μεταβολισμού με το να προάγουν την έκκριση της νορεπινεφρίνης από τον εγκέφαλο.
- ❖ Ιάπωνες ερευνητές ισχυρίζονται ότι η κατανάλωση 5 φλιτζανιών πράσινου τσαγιού την ημέρα οδηγεί στην καύση 70 έως 80 επιπλέον θερμίδων. Ο Dr. Nicholas Perricone, ένας ειδικός σε θέματα αντιγήρανσης, υποστηρίζει ότι η κατανάλωση πράσινου τσαγιού για 6 συνεχείς εβδομάδες μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια 4,5kg!
- ❖ Η πρόληψη διαφόρων τύπων διαβήτη (η θεωρία αυτή βρίσκεται ακόμα υπό έρευνα και απαιτεί πολλά ακόμα κλινικά αποτελέσματα για να επιβεβαιωθεί πλήρως).
- ❖ Αύξηση της απόδοσης και αντοχής κατά την άσκηση.
- ❖ Ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος και της άμυνας του οργανισμού.
- ❖ Μείωση των επιπέδων των stress ορμονών.
- ❖ Περιορίζει την πιθανότητα μόλυνσης από τον ιό HIV.
- ❖ Αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού βακτηρίων στη στοματική κοιλότητα.
- ❖ Αντιμετώπιση διαταραχών προκαλούμενων από υπερ-σιδηραιμία.
- ❖ Αντιμετώπιση της ημικρανίας.
- ❖ Αντιμετώπιση συμπτωμάτων του άσθματος.
- ❖ Τέλος, ερευνάται ακόμα το ενδεχόμενο η κατανάλωση πράσινου τσαγιού να έχει ευεργετικές συνέπειες σε ανθρώπινες ασθένειες που

προκαλούνται από prions, όπως η νόσος Creutzfeldt-Jakob (*Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K, 2004*).



## 2.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι σχετικοί όροι οξειδωτικό stress, οξειδωτική βλάβη, ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά έχουν γίνει αναπόσπαστο κομμάτι του επιστημονικού λεξιλογίου και χρησιμοποιούνται συχνά σε επιστημονικές συζητήσεις. Η βιβλιογραφία είναι υπερπλήρης με άρθρα που αφορούν φαινόμενα οξειδωτικού stress τόσο σε σχέση με ασθένειες όσο και σε υγιή άτομα, αλλά και για ενήλικα άτομα που ασχολούνται με τον αθλητισμό. Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί μία στροφή της έρευνας στην διερεύνηση παραγόντων που θα μπορούσαν να αναστείλουν ή να περιορίσουν τις αρνητικές συνέπειες του οξειδωτικού stress στον ανθρώπινο οργανισμό και στη διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του. Η αναζήτηση αυτή επικεντρώνεται κυρίως σε φυσικά αντιοξειδωτικά, που μπορούμε να λαμβάνουμε συστηματικά μέσω μίας ισορροπημένης διατροφής, όπως οι πολυφαινόλες στο κόκκινο κρασί. Ανατρέχοντας στην κινεζική παράδοση, αλλά και στην επιστημονική βιβλιογραφία, διαπιστώνουμε πληθώρα αναφορών στις ευεργετικές συνέπειες του πράσινου τσαγιού στην υγεία και μακροζωία του ανθρώπου, χωρίς ωστόσο να έχει επιχειρηθεί συσχέτισή του με το οξειδωτικό stress. Συνεπώς, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδωτικού stress σε υγιή άτομα (18 άνδρες, ηλικίας 20-35 ετών) που δεν ασχολούνται επαγγελματικά με τον αθλητισμό, τα οποία εθελοντικά έλαβαν πράσινο τσάι σε συγκεκριμένη ποσότητα (300 mg/ημέρα εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού) και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (3 μήνες). Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η δραστηριότητα της καταλάσης, που σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αποτελούν δείκτες οξειδωτικού stress. Επίσης, υπήρξε συνεργασία με άλλες δύο διπλωματικές εργασίες, που ασχολήθηκαν με τη μελέτη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με μέτρηση της MDA, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, των επιπέδων της GSH και της GSSG καθώς και του λόγου τους GSH/GSSG, για τα ίδια άτομα, ούτως ώστε να δημιουργηθεί μία ολοκληρωμένη εικόνα για την αποτελεσματικότητα του πράσινου τσαγιού στο οξειδωτικό stress.

### 3.0 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο *Hitachi U-1500*. Τα υλικά TBA, DTNB, DPPH, NADPH, ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης προμηθεύτηκαν από την εταιρεία SIGMA. Από την εταιρεία MERCK προμηθεύτηκαν τα  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHPO}_4$  και Tris (hydroxymethyl) aminomethane. Τέλος, τα TCA και  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  αγοράστηκαν από τις εταιρείες Pancreac και Fluca αντίστοιχα.

#### 3.1 Συμμετέχοντες

Στη συγκεκριμένη άσκηση έλαβαν μέρος άτομα νεαρής ηλικίας (20-35 ετών), που δεν ασκούσαν συστηματικά. Συνολικά, έλαβαν μέρος 18 άνδρες που χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες (placebo και πράσινο τσάι). Τα άτομα της ομάδας «πράσινο τσάι» λάμβαναν καθημερινά 300 mg εκχύλισμα πράσινου τσαγιού για 3 μήνες. Οι συμμετέχοντες ήταν μη καπνιστές και δεν είχαν λάβει συμπληρώματα διατροφής ή αντιφλεγμονώδη το τελευταίο μήνα καθώς και κατά τη διάρκεια της μελέτης. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως placebo διάλυμα σακχάρων.

#### 3.2 Αιμοληψία

Η δοκιμασία περιελάμβανε τρέξιμο στο δαπεδοεργόμετρο στο 75 % της  $\text{VO}_2\text{max}$  για 45 λεπτά κα κατόπιν στο 90% μέχρι εξάντλησης.

#### 3.3 Ορός αίματος και αιμόλυμα

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και της καταλάσης γίνεται στον ορό του αίματος. Το αίμα τοποθετείται στον ειδικό σωλήνα με το τζελ (vacutainer tube) και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά μέχρι να πήξει. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 3500 rpm (1370 g) για 10 λεπτά και στους

5<sup>0</sup>C. Έπειτα συλλέγουμε το υπερκείμενο, το μοιράζουμε σε σωλήνες erpendorf (περίπου 100μl/σωλήνα, 2 σωλήνες) και τέλος το καταψύχουμε στους -20<sup>0</sup>C.

### 3.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (Total Antioxidant Capacity)

**Αρχή της μεθόδου:** Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός βασίζεται στην εξουδετέρωση του 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) από τα αντιοξειδωτικά του ορού και πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο των *A. Janaszewska & G. Bartosz (2002)*. Το DPPH είναι μια χρωμοφόρος ρίζα της οποίας το χρώμα μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης με τα αντιοξειδωτικά του ορού από ιώδες σε καφέ. Συνεπώς μετρώντας την απορρόφηση του ορού 30 λεπτά μετά την προσθήκη διαλύματος DPPH μπορούμε να προσδιορίσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού.

Ο ορός (20 μl) αναμειγνυόταν με 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (480 μl) και 0,1 mM DPPH (500 μl) και μετά από ανάδευση, ακολουθούσε 30 λεπτά επώαση (στο σκοτάδι). Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε φυγοκέντρηση στα 12000g, στους 25<sup>0</sup>C για 3 min και ολοκληρώσαμε τη διαδικασία με φωτομέτρηση στα 520nm. Η κυψελίδα του τυφλού (blank) περιείχε μόνο 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (500 μl) και 0,1 mM DPPH (500 μl). Σαν θετικό control χρησιμοποιούταν διάλυμα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH=7.4 (495 μl), 0,1 mM DPPH (500 μl) και 10 mM ασκορβικό οξύ (5 μl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν η εκατοστιαία μείωση της απορρόφησης του control:

$$\% \text{ μείωση} = [\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{δείγματος}} / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

κι όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

### 3.5 Καταλάση

**Αρχή της μεθόδου:** Ο προσδιορισμός αυτός βασίζεται στην απορρόφηση που δίνει το  $H_2O_2$  αμέσως μετά την προσθήκη του στον ορό και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *Aebi (1984)*. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη αρχίζει η αντίδραση που καταλύεται από την καταλάση με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  και συνεπώς της απορρόφησής του. Η φωτομέτρηση συνεχίζεται για 1 λεπτό μετά την προσθήκη του  $H_2O_2$  κι όσο μεγαλύτερη η μείωση της απορρόφησης, τόσο μεγαλύτερη η δραστικότητα της καταλάσης του ορού.

Ο ορός (20  $\mu$ l) αναμειγνυόταν με 67 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (2975  $\mu$ l) κι ακολουθούσε επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προτίθετο 8.82M [30%]  $H_2O_2$  (5  $\mu$ l), οπότε η αντίδραση παρακολουθείτο στα 240nm (UV) για 1 λεπτό. Τα αποτελέσματα συγκρίνονταν με αυτά του τυφλού (blank), που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ορού (2995  $\mu$ l). Η δραστικότητα της καταλάσης εκφραζόταν σε  $\mu$ mol/min/ml ορού και προσδιοριζόταν από τον τύπο:

**Δραστικότητα(U/ml= $\mu$ mol/min/ml ορού)**=[ $\Delta$ O.D./62,4] $\times$ [συνολικός όγκος στην κυψελίδα(ml)/1000 ml] $\times$ [1000 $\mu$ l/ορός στην κυψελίδα ( $\mu$ l)]

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

## 4.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

## 4.1 Καταλάση

Placebo	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	30,0 ± 13,0
Αμέσως μετά την άσκηση	44,3 ± 12,7
Ηρεμία	47,3 ± 12,8
Αμέσως μετά την άσκηση	55,5 ± 18,6

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται επίδραση της άσκησης στη δραστηριότητα της καταλάσης και συγκεκριμένα αύξησή της. Αντίθετα, η επίδραση του placebo με αυτή τη μέθοδο ήταν στατιστικά **μη σημαντική**.

Green Tea	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	28,1 ± 10,9
Αμέσως μετά την άσκηση	34,5 ± 11,9
Ηρεμία	36,6 ± 8,6
Αμέσως μετά την άσκηση	42,8 ± 11,9

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται, επίσης, επίδραση της άσκησης στη δραστηριότητα της καταλάσης και συγκεκριμένα αύξησή της. Αντίθετα, η επίδραση του πράσινου τσαγιού με αυτή τη μέθοδο ήταν **μη στατιστικά σημαντική**.

## 4.2 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (TAC)

<b>Placebo</b>	
<b>Δείγμα</b>	<b>M.O ± SD</b>
Ηρεμία	0,85 ± 0,36
Αμέσως μετά την άσκηση	1,05 ± 0,36
Ηρεμία	0,89 ± 0,36
Αμέσως μετά την άσκηση	1,03 ± 0,38

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται επίδραση της άσκησης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και συγκεκριμένα αύξησή της. Αντίθετα, η επίδραση του placebo και με αυτή τη μέθοδο ήταν **μη στατιστικά σημαντική**.

<b>Green Tea</b>	
<b>Δείγμα</b>	<b>M.O ± SD</b>
Ηρεμία	0,61 ± 0,28
Αμέσως μετά την άσκηση	0,75 ± 0,32
Ηρεμία	0,67 ± 0,32
Αμέσως μετά την άσκηση	0,83 ± 0,31

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται επίδραση της άσκησης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και συγκεκριμένα αύξησή της. Αντίθετα, η επίδραση του πράσινου τσαγιού και με αυτή τη μέθοδο ήταν **μη στατιστικά σημαντική**.

## 5.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη, μέχρι στιγμής, που μελετά την επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό stress και την επίδραση του πράσινου τσαγιού σ' αυτό, συγχρόνως. Επιχειρήσαμε, λοιπόν, να κατανοήσουμε το μηχανισμό δράσης των αντιοξειδωτικών του πράσινου τσαγιού και κατά πόσο αυτά επηρεάζουν το, επαγόμενο από την άσκηση, οξειδωτικό stress. Η μελέτη έγινε σε ανθρώπινο ορό. Η βιβλιογραφία αναφέρει τη διεξαγωγή προγενέστερων πειραμάτων, σε ζωικά μοντέλα, αποδεικνύοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών του πράσινου τσαγιού. Παράλληλα, μέσα από τη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε για ακόμη μία φορά η σημαντική επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό stress. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο αριθμός κλινικών μελετών σε ανθρώπινο ορό είναι μεγάλος και αποδεικνύει εμπράκτως ότι η άσκηση επιφέρει σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες οξειδωτικού stress η δραστικότητα της καταλάσης και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού. Η δραστικότητα της καταλάσης τείνει να είναι σχετικά αυξημένη σε άτομα που αθλούνται. Για παράδειγμα, στους ενήλικες αθλητές αντοχής, όπως είναι οι κολυμβητές, η άσκηση αυξάνει τη δραστικότητα της καταλάσης σημαντικά [(Alessio and Goldfarb, 1988), (Aguiló et al, 2005)]. Αν και σήμερα είναι πλέον τεκμηριωμένο πως η άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό stress, υπήρξαν πολλές φορές που τα αποτελέσματα ερευνών οδηγούσαν σε αμφιλεγόμενες απόψεις. Οι κύριοι λόγοι ήταν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων που επιλέγονταν προς μελέτη ως προς την ηλικία, τη φυσική κατάσταση, τη γενετική προδιάθεση, τις διατροφικές συνήθειες όπως επίσης και τα διαφορετικά πρωτόκολλα άσκησης. Αξίζει να σημειωθεί πως μόνο η έντονη άσκηση μακράς διάρκειας φαίνεται πως ξεπερνά την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και οδηγεί σε οξειδωτικές βλάβες (Palazzetti et al., 2003).

Ο προσδιορισμός της φυσικής κατάστασης της μελετούμενης ομάδας είναι μια βασική παράμετρος για την εξαγωγή ορθών αποτελεσμάτων. Η απόδοση του ατόμου κατά την άσκηση και η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου θεωρούνται πλέον ανεπαρκή κριτήρια για τον προσδιορισμό του επιπέδου προσαρμογής του οργανισμού στο οξειδωτικό stress. Αντιθέτως, οι βιοχημικές παράμετροι είναι πιο αντιπροσωπευτικές αν και έχει παρατηρηθεί πως πολλά προϊόντα οξειδωτικών αντιδράσεων δεν παράγονται αμέσως μετά την άσκηση, αλλά φθάνουν σε μέγιστα επίπεδα μετά από κάποιες ώρες ή ακόμα και μέρες μετά το τέλος της άσκησης. Για αυτό το λόγο, η απουσία δεικτών οξειδωτικού stress μετά την άσκηση δεν θεωρείται πλέον πως συνδέεται με τη μη έκθεση του οργανισμού σε ROS.

Το οξειδωτικό stress, έχει γίνει εδώ και χρόνια αντικείμενο πολλών μελετών, καθώς επιβεβαιώθηκε η υποψία ότι οι περισσότερες ασθένειες που πλήττουν τον ανθρώπινο οργανισμό σήμερα είναι αποτέλεσμα των διαταραχών που επιφέρει στην λειτουργία και στην ομοιόσταση του. Η επιστημονική κοινότητα αναζητά συνεχώς το πώς θα μπορούσε να οδηγηθεί πειραματικά σε μία εύπλαστη ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και των ελευθέρων ριζών, η οποία θα μπορούσε να παρέχει στον ανθρώπινο οργανισμό μία ασπίδα προστασίας από τη δυσμενή επίδραση του οξειδωτικού stress.

#### 5.1.1 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής εργασίας με τα αποτελέσματα άλλων μελετών για το πράσινο τσάι

Τα αποτελέσματα της παρούσης διπλωματικής εργασίας έδειξαν ότι το πράσινο τσάι δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα της καταλάσης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, που να υποδεικνύουν ότι το πράσινο τσάι είχε κάποια επίδραση στο επαγόμενο οξειδωτικό stress.

Αρκετές μελέτες σε ζωικά μοντέλα, αποδεικνύουν τις ευεργετικές επιδράσεις του πράσινου τσαγιού σε πολλές ασθένειες, όπως το Parkinson, το Alzheimer και διάφορες καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες. Ο κύριος ρόλος των πολυφαινόλων είναι να προστατεύουν τα κύτταρα μέσω της ρύθμισης διαφόρων μονοπατιών, όπως τα



σηματοδοτικά μονοπάτια και διάφορες αντι-αποπτωτικές διαδικασίες[(*Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS, 2005*), (*Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL et al, 1997*)] . Το πράσινο τσάι και οι περιεχόμενες σε αυτό κατεχίνες θεωρείται ότι έχουν αντιαλλεργική, αντιμεταλλαξιγόνο, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση και για το λόγο αυτό αποτελούν αντικείμενο μελέτης. Έχει αποδειχθεί σε ορισμένες μελέτες (όπου χρησιμοποιήθηκαν επίμυες, κόνικλοι και ποντίκια) ότι η EGCG, η κατεχίνη που εντοπίζεται αποκλειστικά μόνο στο πράσινο τσάι, μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματική στις προαναφερθείσες περιπτώσεις (*Mukhtar H, Ahmad N, 2000*). Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, καταδεικνύουν ότι οι κατεχίνες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (ειδικά οι ισομορφές του γαλλικού οξέος) που αδρανοποιούν σε μεγάλο ποσοστό τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και του αζώτου, με μόνο μειονέκτημα το μικρό χρόνο ημιζωής τους στο πλάσμα. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που τους έχουν αποδοθεί στηρίζονται στην ικανότητά τους να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και διαφόρων μετάλλων. Παράλληλα, αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, που προκαλείται από τη συσσώρευση του σιδήρου στις μιτοχονδριακές μεμβράνες του εγκεφάλου (*Murase et al, 2006*). Η χαρακτηριστική χημική δομή των πολυφαινολών είναι εκείνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική τους δράση. Στα φλαβονοειδή η θέση και ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων, η παρουσία διπλών δεσμών στον δακτύλιο C και οι υποκαταστάσεις των υδροξυλικών ομάδων με σάκχαρα, μεθυλομάδες ή άλλους υποκαταστάτες επηρεάζουν την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. (*Michael D. Brown, 1999*)

### 5.2.2 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής εργασίας με τα αποτελέσματα άλλων μελετών για την άσκηση

Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη σημαντικά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς και τα επίπεδα της καταλάσης, με σκοπό να αντιμετωπίσει ο οργανισμός το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό stress. Σύμφωνα και με άλλες μελέτες, η έντονη αερόβια άσκηση οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού stress, ενώ ταυτόχρονα οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται για να το καταπολεμήσουν.

Μια έρευνα των *Palazzetti et al.*, έδειξε σημαντική μείωση της TAC μετά την άσκηση αποδίδοντας αυτήν τη μείωση στην κατανάλωση των μη-ενζυμικών αντιοξειδωτικών κατά τη διάρκεια της άσκησης. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο προσδιορισμός της TAC παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως μικρή εξειδίκευση, τα οποία μπορεί να μειώνουν την ικανότητα προσδιορισμού μιας ακριβούς εικόνας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του σώματος. Τα επίπεδα της καταλάσης παρουσιάζουν διακυμάνσεις κυρίως μεταξύ των διαφορετικών οργάνων. Σύμφωνα με ένα άρθρο των *Boltzan et al.*, η δράση της καταλάσης παραμένει σταθερή ανεξαρτήτου ηλικίας στο συκώτι, ενώ μειώνεται με την πάροδο του χρόνου στο σπλήνα (*Boltzan et al.*, 1995). Αν και η καταλάση δεν ανήκει στην ομάδα ενζύμων των οποίων η δραστηριότητα τροποποιείται σημαντικά με την άσκηση, φαίνεται ότι αυξάνεται στους σκελετικούς μυς (*Ji*, 1999) και στον ορό κολυμβητών (*Mine et al.*, 2001). Ωστόσο έχουν διατυπωθεί και κάποιες άλλες απόψεις (*Powers et al.*, 1994), σύμφωνα με τις οποίες η άσκηση δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα της καταλάσης. Η συγκεκριμένη υπόθεση βασίζεται σε δύο αιτιολογίες. Πρώτον, η δραστηριότητα της καταλάσης ρυθμίζεται από διαφορετικά κυτταρικά σήματα σε σχέση με τα άλλα ενζυμικά συστήματα. Δεύτερον, μπορεί η καταλάση να μοιράζεται τα ίδια ερεθίσματα με τα άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, αλλά ενεργοποιείται από μεγαλύτερης έντασης ερέθισμα. Αν και δεν υπάρχουν αναφορές για τη δραστηριότητα της καταλάσης σε παιδιά, υποστηρίζεται πως μειώνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία και συμβάλει στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών σε προχωρημένες ηλικίες (*Ashok BT, Rashid A*, 1999).

Έχει τεκμηριωθεί πως η μέτριας έντασης άσκηση αυξάνει το μέσο όρο ζωής, προστατεύει τον οργανισμό από τις νευρομυϊκές και καρδιαγγειακές παθήσεις και σε βιοχημικό επίπεδο τροποποιεί την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών τα τελευταία είκοσι χρόνια, ο ρόλος της άσκησης έχει και προσαρμοστικό χαρακτήρα. Οι έντονες ανάγκες του οργανισμού για οξυγόνο δημιουργούν δραστικές ενώσεις οξυγόνου που αν δεν απομακρυνθούν επιφέρουν σημαντικές βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια. Η παρέμβαση της άσκησης έγκειται στην αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τη μείωση των δεικτών οξειδωτικού στρες και την αύξηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας (*Navarro et al.*, 2004).

## 5.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται φανερό ότι η άσκηση οδηγεί στην παραγωγή του οξειδωτικού stress, οι επιπτώσεις του οποίου εξαρτώνται από την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης. Αμέσως μετά την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, η άσκηση προάγει την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, ώστε δυνητικά να περιορίζονται οι πιθανότητες, επαγόμενης από αυτές, δυσλειτουργίας του οργανισμού. Η διαδικασία αυτή γίνεται στη λεγόμενη φάση της ανάκαμψης, που αρχίζει λίγα λεπτά μετά το τέλος της άσκησης.

Τα συμπεράσματά μας για το πράσινο τσάι μπορούν να διεξαχθούν από τη διεθνή βιβλιογραφία, διότι δεν μπορούμε έτσι απλά να αναιρέσουμε το γεγονός ότι το πράσινο τσάι προσφέρει ποικίλα οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, επειδή η μελέτη μας δεν κατέληξε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, που να καταδεικνύουν την επίδρασή του στο οξειδωτικό stress. Από την εργασία αυτή, την κινεζική παράδοση, προγενέστερες μελέτες και όσα άλλα συνάδουν ως προς την ευεργετική δράση του πράσινου τσαγιού πρέπει να κρατήσουμε την ουσία: το πράσινο τσάι περιέχει ένα σημαντικό αριθμό, διαφορετικών μεταξύ τους, ουσιών με ευνοϊκή δράση για τον οργανισμό μας, και έτσι αν το εντάξουμε ως μέρος μίας εν γένει ισορροπημένης και υγιεινής διατροφής, θα μπορούσαμε να δούμε σημαντική βελτίωση στην ποιότητα ζωής μας. Εν κατακλείδι, μία υγιεινή διατροφή θα πρέπει να αποτελεί στάση ζωής.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1980, 10:797-808.
2. Streyer L. Biochemistry. 3rd ed. WH Freeman, New York, 1989:420-424.
3. Mylonas C, Kouretas D. Lipid Peroxidation and Tissue Damage. In vivo. 1999, 13:295-310
4. Cutler RG. Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor WA (ed) *Free radicals in biology*. Vol 6. Academic Press, New York, 1984:371-428.
5. Harman D. Aging: a theory based on the free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 1956, 11:298-300.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Parker L, Glazer AN, eds. *Methods in Enzymology*, Vol 186:1-85, Academic Press 1990.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, 1999:27-34,67-70,
8. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol* 1986, 48:657-667.
9. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991, 91(Suppl 3C):14-22
10. De Groot H, Litauer A. Hypoxia, reactive O<sub>2</sub> and cell injury. *Free Radic Biol Med* 1989, 9:541-548
11. Sawyer DT, Valentine JS. How super is superoxide? *Acc Chem Res* 1981, 14:347-393
12. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983, 23:239-257
13. Brandley RE. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993, 268:6995-6999
14. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997, 17:3-9

15. Hayakawa M, Hattari K, Sugiyama S, Ozawa T. Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 189:979-985
16. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:10771-10776
17. Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am* 1997, 277:22-29
18. Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Report* 2001, 6:27-36
19. Liochev SI, Fridovich I. The role of  $O_2^{\cdot -}$  in the production of  $HO^{\cdot}$  *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 1994, 16:29-33
20. Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* 1989, 6:53-58
21. Valavanidis A, Balomenou H, Macropoulou I, Zarodimos I. A study of the synergistic interaction of asbestos fibers with cigarette tar extracts for the generation of hydroxyl radicals in aqueous buffer solution. *Free Radic Biol Med* 1996, 20:853-958
22. Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr* 1987, 45:1368-1377
23. Paya M, Halliwell B, Hoult JR. Peroxyl radical scavenging by a series of coumarins. *Free Rad Res Commun* 1992, 17:293-296
24. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984, i:1396-1398
25. Wardman P, von Sonntag P. Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. *Methods Enzymol* 1995, 251:31-39
26. Brodie AE, Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by  $H_2O_2$ . *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148:120-128
27. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL. Generation of hydrogen peroxide by incidental metal ion-catalyzed autoxidation of glutathione. *J Inorg Biochem* 1986, 27:191-203

28. Ohno Y, Gallin JI. Diffusion of extracellular hydrogen peroxide into intracellular compartments of human neutrophils. *J Biol Chem* 1985, 260:8438-8446
29. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995, 18:775-794
30. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996, 313:17-29
31. Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986, 201:291-298
32. Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of HOCl reactions. *Arch Biochem Biophys* 1995, 323:120-128
33. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH et al. Mechanisms of hypochlorite injury to target cells. *J Clin Invest* 1990, 85:554-559
34. Glaser CB, Morser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. *J Clin Invest* 1992, 90:2565-2569
35. Fliss H, Menard M. HOCl-induced mobilization of zinc from metalloproteins. *Arch Biochem Biophys* 1991, 287:175-178
36. Pero RW, Sheng Y, Olsson A, Brynggelsson C, Lund-Pero M et al. Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis* 1996, 17:13-19
37. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *J Am Physiol* 1995, 268:L699-L705
38. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992, 5:834-842
39. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992, 298:431-438

40. Spencer JPE, Wong J, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Halliwell B. Base modifications and strand breakage in isolated calf thymus DNA and DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholininosynonimine. *Chem Res Toxicol* 1995, 9:1152-1158
41. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effect of ONOO<sup>-</sup> induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996, 385:63-69
42. Smith MA, Richey HPL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1997, 17:2653-2659
43. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:1250-1258
44. Foote CS (ed) *Active oxygen chemistry*. Blackie, London, 1995
45. Lipmann M. Health effects of tropospheric ozone. *Environ Sci Technol* 1991, 25:1954-1962
46. Menzel DB. Ozone: an overview of its toxicity in man and in animals. *J Toxicol Environ Health* 1984, 13:36-53
47. Βαλαβανίδης Α. Τοξική και καρκινογόνος δράση του όζοντος της τροπόσφαιρας. Ρόλος των ελευθέρων ριζών και των ενδιάμεσων δραστικών μορίων. *Ιατρική* 1994, 65:463-471
48. Borek C, Ong A, Cleaver JA. DNA damage from ozone and radiation in human epithelial cells. *Toxicol Health* 1998, 4:547-553
49. Maugh TH. New link between ozone and cancer. *Science* 1982, 216:397
50. Slund F, Zheng M, Bechwith J, Storz G. Regulation of OxyR-transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:6161-6165
51. Ishi T, Itoh K, Sato H, Bannai S. Oxidative stress-inducible proteins in macrophages. *Free Radic Res* 1999, 31:351-355
52. Sachi Y, Hirota K, Masutani H, Toda K, Okamoto T et al. Induction of ADF/TRX by oxidative stress in keratinocytes and lymphoid cells. *Immunol Lett* 1995, 44:189-193

53. Tyrell R. Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1. *Free Radic Res* 1999, 31:335-340
54. Acker H. Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol* 1994, 95:1-10
55. Roy S, Sen CK, Packer L. Determination of cell-cell adhesion in response to oxidants and antioxidants. *Methods Enzymol (Oxidants and Antioxidants)* 1999, 75:395-401
56. Los M, Droge W, Stricker K, Baeurle PA, Schulze-Osthoff K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immun* 1995, 25:159-165
57. Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF- $\kappa$ B. *Oncogene* 1999, 18:747-757
58. Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 1998, 17:39-53
59. Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K et al. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2000, 275:13175-13178
60. Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG. Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2000, 275:10527-10531
61. Krieger-Brauer H, Medda PK, Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Ga<sub>12</sub>. *J Biol Chem* 1997, 272:10135-10143
62. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matzuraki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:11233-11237
63. Kumasaka S, Shoji H, Okabe E. Novel mechanisms involved in superoxide anion radical triggered Ca<sup>2+</sup> release from cardiac sarcoplasmic reticulum linked to cyclic ADP-ribose stimulation. *Antiox Redox Signal* 1999, 1:55-69
64. Chen K, Thomas SR, Keaney JF. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2003, 35:117-132



65. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. Review. *Int Rev Cytol* 2004, 237:57-58
66. Brookes PS. Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation. An odd couple. *Free Radic Biol Med* 2005, 38:12-23
67. Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1991, 11:215-232
68. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 1993, 23:147-169
69. Neuzil J. Vitamin E succinate and cancer treatment: a vitamin E prototype for selective antitumour activity. *Br J Cancer* 2003, 89:1822-1826
70. Janero DR. Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemic-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1991, 10:315-324
71. Bendich A. Antioxidant vitamins and human immune responses. *Vitam Hormones* 1996, 52:35-62
72. Zhang D, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamagushi R, Kasai H. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Res* 1997, 57:2410-2414
73. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995, 41/12:1819-1828
74. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyprein. *J Biol Chem* 1969, 244:6049-6055
75. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987, 22:111-180
76. Hassan HM. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* 1988, 5(5-6):377-385
77. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995, 64:97-112
78. Emerit I, Packer L, Auclair C. Antioxidants in therapy and preventive medicine. *Polonium, New York* 1990
79. Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sup>•-</sup>), superoxide dismutases and related matters. 1997, 272:18515-18517

80. Marklund SL, Westman NG, Landgren E, Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutases, manganese-containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982, 42:1955-61
81. Chance B, Klotman PE, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979, 59:527-605
82. Mills GC. Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957, 229:189-97
83. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(2):154-172
84. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidation. A new function for selenoprotein as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997, 272:27812-27
85. Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993, 268:2571-2576
86. Bjornsted M, Xue JY, Haung WH, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994, 269:29382-29384
87. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:916-
88. Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Env Toxicol and Pharmacol* 2001, 10:153-158
89. Ernster L. Ubiquinone: redox coenzyme, hydrogen carrier, antioxidant. *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q vol 4*, Elsevier, Amsterdam 1984 :3-13
90. Dallner G, Sindelar PJ. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Rad Biol Med* 2000, 29:285-294
91. Yamamoto Y, Yamashita S. Ubiquinol/ubiquinone ratio as marker of oxidative stress. *Methods Mol Biol* 2002, 186:241-246

92. *Reed LJ*. Chemistry and function of lipoic acid. *Comprehensive Biochemistry* Vol.14, Elsevier Science, New York (1996), pp.99-126
93. *Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihm BH*. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med* 1998, 24:1023-1039
94. *Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler HJ, Halliwell B*. Lipoic acid and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res* 1994, 20:119-133
95. *Arendt J*. Melatonin (review) *Clin Endocrinol* 1988, 29:205-229
96. *Reiter RJ, Tan D-X, Acuma –Castroviejo D, Burkhardt S, Karbownik M*. Melatonin: mechanisms and actions as antioxidant. *Curr Top Biophys* 2000, 24:171-183
97. *Reiter RJ, Tan D-X*. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003, 58:10-19
98. *Liehr JG*. Antioxidant and pro-oxidant properties of estrogens. *J Lab Clin Med* 1996, 128:344
99. *Ames BN et al*. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused ageing and cancer. A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:6858
100. *Simic MG, Jovanovic SV*. Antioxidation mechanisms of uric acid. *J Am Chem Sci* 1989, 111:5778
101. *Whiteman M, Halliwell B*. Protection against ONOO<sup>-</sup> dependent tyrosine nitration and a1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. *Free Rad Res* 1996, 25:275
102. *Ryter SW, Tyrrell RM*. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Rad Biol Med* 2000, 28:289-309
103. *Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN*. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987, 235:1043-1046
104. *Free Rad Res Commun*, 1989, 5:359

105. Παπαγεωργίου ΓΕ. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αντιοξειδωτική άμυνα στα βιολογικά συστήματα. Επιστημονική Επετηρίδα Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. 1999, 26(1):95-117
106. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in men. J Biol Chem 1995, 269:13685-13688
107. Food and Nutrition Board, Recommended Dietary Allowances, National Academy Press, Washington, DC, 1989
108. May JM. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? FASEB J. 1999, 9:995-1006
109. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. Adv Exp Med Biol 1990, 264:155-163
110. Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. Biochim Biophys Acta 1995, 1271:35-42
111. Chopra M, Thurnham DI. Antioxidants and lipoprotein metabolism. Proc Nutr Soc, 1999, 58:663-671
112. Levine M et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93:3704
113. Evans HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. Science 1922, 56:650-651
114. Evans HM, Emerson OH, Emerson GA. The isolation from wheat germ oil of an alcohol, alpha-tocopherol, having the properties of vitamin E. J Biol Chem 1936, 113:319-32
115. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. Annu Rev Nutr 1990, 10:375-382
116. Giakoustidis D, Kontos N, Iliadis S, Papageorgiou G, Tsantilas D, Spyridis C, Papazoglou N, Botsoglou N, Dimitriadou A, Giakoustidis E. Severe total ischemia and reperfusion: relationship between very high  $\alpha$ -tocopherol uptake and lipid peroxidation. Free Rad Res 2001, 35:103-109
117. Mukai K. Vitamin E in health and disease. pp. 97-119, Marcel Dekker, New York, 1993

118. Sheppard AJ, Pennington JAT, Weihrauch JL. Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. *Vitamin E in health and disease*. pp. 97-119, Marcel Dekker, New York, 1993
119. Vitamins and carotenoid abstracts, 1997, VERIS
120. Muller D, Manning J, Mathias P, Harries J. Studies on the hydrolysis of tocopheryl esters. *Int J Vitam Nutr Res* 1976, 46:207-210
121. Cheeseman KH, Holley AE, Kelly FJ, Wasil M, Hughes L, Burton G. Biokinetics in humans of RRR- $\alpha$ -tocopherol: the free phenol, acetate ester and succinate ester forms of vitamin E. *Free Radic Biol Med* 1995, 19:591-598
122. Hume EM. Standardization of vitamin E. *Nature* 1941, 148:472-473
123. Olson JA, Krinsky N. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiological modulators. *FASEB J* 1995, 9:1547-1550
124. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 1995, 9:1551-1558
125. Olson JA. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *Journal of Nutrition* 1989, 19:105-108
126. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arc Biochem Biophys* 1989, 274:532-538
127. Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 1994, 66:1003-1010
128. Burton GW. Antioxidant actions of carotenoids. *Journal of Nutrition* 1989, 119:109-111
129. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999, 79:362-72
130. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996, 20:933-956
131. Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell G, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans CA. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS letters* 1995, 368:182-192

132. *Scalbert A, Williamson G.* Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000, 13:2073-2085
133. *Ness AR, Powles JW.* Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol* 1997, 6:1-13
134. *Criqui MH, Ringel BL.* Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet* 1994, 344:1719-1723
135. *Renaud S, De Longe M.* Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary disease. *Lancet* 1992, 339:1523-1526
136. *Tijburg LBM, Mattem T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB.* Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997, 37:771-85
137. *Yang CS, Wang ZY.* Tea and cancer. *J Nat Cancer Inst* 1993, 85:1038-49
138. *Steinmetz KA, Potter JD.* Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996, 96:1027-39
139. *Adiercreutz H, Mazur W.* Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 1997, 29:95-120
140. *Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.* Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nut Biochem* 2002, 13:572-584
141. *Winkler-Shirley B.* Biosynthesis of flavonoids. *Current Opinion in plant biology* 2002, 5:218 -223
142. *Ding Z, Kuhr S, Engelhardt UH.* Influence of catechins and the aflavins on the astringent taste of black tea brews. *Z.Lebensm.Unters Forsch* 1992, 195:108-11
143. *Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL.* Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 1995, 43:890-4
144. *Arts C, Hollman PC, Kromhout D.* Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 1999, 354:488
145. *Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB.* Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992, 40:2379-83

146. *Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B.* Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1993, 41:1242-6
147. *Rousseff RL, Martin SF, Youtsey CO.* Quantitative survey of naringin, naringin, heperidin and neohesperidin in citrus. *J Agric Food Chem* 1987, 35:1027-30
148. *Tapiero H, Ba GN, Tew KD.* Estrogens and environmental estrogens. *Bionied Pharmacother* 2002, 56:1-9
149. *Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997, 275:218-20
150. *Axelsson M, Sjovalld J, Gustafsson BE, Setchell KDR.* Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature* 1982, 298:659-660
151. *Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C et al.* Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995, 12:1911-22
152. *Hollman PCH, Van Trijp JMP, Buysman MNCP, Van der Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, Katan MB.* Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 1997, 418:152-156
153. *Piskula MK, Terao J.* Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998, 128:1172-1178
154. *Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE.* (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr* 2000, 71:103-108
155. *Yang CS, Lee MJ, Chen LS.* Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999, 8:83-89
156. *Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T.* Dose-dependent incorporation of tea catechins (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997, 61:1981-1985

157. Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Williamson G. Solubilisation of ferulic acid from plant cell wall materials in a model human gut system. *Biochem Soc Trans* 1996, 24:384-394
158. Lamarco KL, Glew RH. Hydrolysis of a naturally occurring B-glucoside by a broad specificity  $\beta$ -glucosidase from liver. *J Biochem* 1986, 237:469-476
159. Gopalan V, Pastuzyn A, Galey WR, Glew RH. Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic B-glucosidase. *J Biol Chem* 1992, 267:14027-14032
160. Coughtrie MH, Sharp S, Maxwell K, Innes NP. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact.* 1998, 109:3-27
161. Walle T, Baton EA, Walle UK. Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenolsulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 1995, 50:731-734
162. Παπαγεωργίου Κ, Νούτσου Φ, Χατζηδιονυσίου Κ, Ηλιάδης Σ, Μακέδου Κ, Παπαγεωργίου Γ. Επίδραση φυσικών αντιοξειδωτικών παραγώγων του κινναμωμικού οξέος στην οξείδωση των LDL. *Επιστημονική Επετηρίδα του Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ.* 2002, 29(1):23-28
163. Φεσληκίδης Θ, Ηλιάδης Σ, Μακέδου Κ, Παπαγεωργίου Γ. Αντιοξειδωτική δράση του ριγανελαίου στις λιποπρωτεΐνες του ορού του αίματος. *Επιστημονική Επετηρίδα του Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ.* 2003, 30(1):37-41
164. Kono Y, Shibata H, Kodama Y, Sawa Y. The suppression of the N-nitrosating reaction by Chlorogenic acid. *J Biochem* 1995, 312:947-953
165. Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. Action of Chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol.* 2000, 38:467-471
166. Shibata H, Sakamoto Y, Oka M, Kono Y. Natural antioxidant, Chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloroamine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999, 63:1295-1297
167. Favero A, Franceschi S, La Vecchia C, Negri E, Conti E, Montella M. Meal frequency and coffee intake in colon cancer. *Nutr Cancer* 1998, 30:182-185



168. *La Vecchia C, Ferraroni M, Negri E, D'Avanzo B, Decarii A, Levi F, Franceschi S.* Coffee consumption and digestive tract cancers. *Cancer Res.* 1989, 49:1049-1051
169. *Cao G, Sofic E, Prior RL.* Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997, 22:749-760
170. *Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S.* The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1994, 16:845-850
171. *Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW, Pardini RS.* Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: structure-activity study. *Biochem Pharmacol.* 1986, 35:2345-2357
172. *Galey JB.* Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv. Pharmacol.* 1997, 38:167-203
173. *Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J.* Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as pro-oxidant. *Mol. Immunol.* 2002, 38:781-791
174. *Ismail N, Alam M.* A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* 2001, 72:676-679
175. *Ohshima, Auriol S, Gilibert I.* Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitrosyl anion. *Free Radic Biol Med* 1998, 25:1057-1065
176. *Zhu BT, Ezell EL, JG. Liehr.* Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids: metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. *J Biol Chem.* 199, 269:292-299
177. *Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K.* Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med.* 1999, 27:1313-1323
178. *Sahu SC, Gray GC.* Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol.* 1997, 35:443-447

179. *Bors W, Michel C, Schikora S.* Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse-radiolysis study. *Free Radic Biol Med.* 1995, 19:45-52
180. *Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT.* Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2002,30:280-284
181. *Vollaard NBJ, Shearman JP, Cooper CE.* Exercise-Induced Oxidative Stress: Myths, Realities and Physiological Relevance. A review. *Sports Med* 2005, 35(12):1045-1062
182. *Michael D. Brown.* Green Tea (*Camellia Sinensis*) Extract and Its Possible Role in the Prevention of Cancer. *Alt Med Rev* 1999, 4(5):360-370
183. *N. H. Woodward.* Teas of the world. Ed G Spiller (1998)
184. *Tsubono F, Nishino Y et al.* Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med* 2001, 344(9):632-636
185. *Sartippour MR et al.* The combination of green tea and tamoxifen is effective against breast cancer. *Carcinogenesis* 2006, 27(12):2424-2433
186. *Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K.* A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2004
187. *Alessio HM, Goldfarb AH.* Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 1988, 64(4):1333-1336
188. *Aguiló et al.* Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*, 2005, 85:1-7
189. *Palazzetti et al.* Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*, 2003, 28(4):588-604
190. *Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS.* Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 2005, 81:284S-291S
191. *Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL et al.* Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1881-1886
192. *Mukhtar H, Ahmad N.* Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 2000, 71:1698S-1702S

193. *Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A et al.* Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 2006, 290:R1550-R1556
194. *Boltzan et al.* Hormonal modulation of antioxidant enzyme activities in young and old rats. *Exp Gerontol*, 1995, 30(2):169-175
195. *Ji Li Li.* Antioxidants and oxidative stress in exercise. *P.S.E.B.M.* 1999, 222:283-292
196. *Mine et al.* Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci in sport and exercise.* 2001, 33(4):564-567
197. *Powers et al.* Influence of exercise and fiber type antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American journal of regulatory, integrative and comparative physiology.* 1994, 35:375-380
198. *Ashok BT, Rashid A.* The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol.* 1999, 34:293-303
199. *Navarro et al.* Beneficial effects of moderate exercise on mice ageing: survival, behavior, oxidative stress and mitochondrial electron transfer. *Am J Reg Interg Comp Physiol*, 2004, 13:505-511
200. *Aebi et al.* Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984, 105:121-126

