

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ (GSH) ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ (GSSG)
ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ



Φιλιπώνη Μαρία

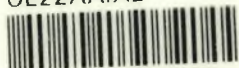
Λάρισα 2007



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

Αριθ. Εισ.: 6174/1
Ημερ. Εισ.: 05-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΦΙΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087188

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια αυτής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νικολαΐδη Μιχάλη για την αμέριστη συμπαράστασή του, καθώς και για τις πολύ χρήσιμες γνώσεις που μου μετέδωσε ώστε να μπορέσω να διεκπεραιώσω την διπλωματική μου εργασία με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κυππάρο Αντώνη και την Άννα για τις συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της ενασχόλησής μου στο εργαστήριο, όπως επίσης και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Οφείλω, επίσης, ένα ευχαριστώ στους πρώην συμφοιτητές μου Βεσκούκη Άρη και Σπανού Χρύσα για την άριστη συνεργασία μας και τη χρήσιμη εποπτεία τους όσον αφορά το πειραματικό στάδιο της εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ πολύ και τις συμφοιτήτριές μου Φίλιου Ελεάννα και Φλώρου Ζωή για την επικοινωνιακή συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΠΡΑΣΙΝΟ ΤΣΑΙ	7
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία-Εισαγωγή	7
1.2 Πολυφαινόλες	8
1.2.1 Φλαβονοειδή	10
1.2.2 Φαινολικά οξέα	15
1.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ	16
1.3.1 Καρκίνος	17
1.3.2 Γήρανση	17
1.3.3 Νευροεκφυλιστικές νόσοι	18
1.3.4 Καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες	18
1.3.5 Παχυσαρκία	18
1.3.6 Μικροβιακές μολύνσεις	19
1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	19
1.4.1 Ελεύθερες ρίζες	19
<i>Δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS)- Δραστικές ενώσεις αζώτου (RNS)</i>	20
1.4.2 Πηγές ελευθέρων ριζών	21
<i>Ενδογενείς πηγές</i>	21
<i>Εξωγενείς πηγές</i>	22
1.4.3 Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	22
<i>Θετικές επιδράσεις</i>	22
<i>Αρνητικές επιδράσεις</i>	22
1.4.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	23
1.4.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας	24
<i>Ρόλος των αντιοξειδωτικών</i>	24
<i>Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας</i>	26
<i>Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας</i>	29
1.4.6 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης του πράσινου τσαγιού	32
1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	34
1.5.1 Μηχανισμοί αύξησης του οξειδωτικού στρες λόγω της άσκησης	35
2. ΣΚΟΠΟΣ	38
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
3.1 Υλικά	39
3.2 Συμμετέχοντες	39
3.3 Αιμοληψία	39
3.4 Μέθοδοι ανάλυσης	39
3.5 Στατιστική ανάλυση	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
4.1 Ανηγγμένη Γλουταθειόνη (GSH)	42
4.2 Οξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)	42
4.3 Αναλογία GSH: GSSG	43
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βασικές κατηγορίες των φλαβονοειδών με τα κυριότερα συστατικά τους και τις διατροφικές πηγές τους.	12
Πίνακας 2: Κλινικές καταστάσεις οι οποίες είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες.	24
Πίνακας 3: Αποτελέσματα GSH στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.	42
Πίνακας 4: Αποτελέσματα GSH μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.	42
Πίνακας 5: Αποτελέσματα GSSG στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.	42
Πίνακας 6: Αποτελέσματα GSSG μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.	43
Πίνακας 7: Αποτελέσματα GSH:GSSG στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.	43
Πίνακας 8: Αποτελέσματα GSH:GSSG μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.	43

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διάγραμμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των πολυφαινολών.	12
Εικόνα 2: Κατηγοριοποίηση και δομή των πολυφαινολών.	10
Εικόνα 3: Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών. Α,Β είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώ C είναι ο ανθρακικός πυρακικός δακτύλιος.	10
Εικόνα 4: Βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών.	10
Εικόνα 5: Χημική δομή των κατεχινών του πράσινου τσαγιού (EC, ECG, EGC, EGCG) και του μαύρου τσαγιού (TF-1, TF-2a, TF-2b, TF-3).	13
Εικόνα 6: Βασικές χημικές δομές της οικογένειας των φλαβονοειδών.	14
Εικόνα 7: Βασική χημική δομή της ανθοκυανιδίνης και της γλυκοσυκιωμένης ανθοκυανίνης.	15
Εικόνα 8: Χημική δομή των δύο βασικών κατηγοριών των φαινολικών οξέων.	15
Εικόνα 9: Χημική δομή γαλλικού οξέος.	15
Εικόνα 10: Χημική δομή μιας υδρολυόμενης ταννίνης συνδεδεμένης με 5 μόρια γαλλικού οξέος.	16
Εικόνα 11: Η ελεύθερη ρίζα με το αζευγάρωτο ηλεκτρόνιό της, έχει ως στόχο το κύτταρο.	20
Εικόνα 12: Αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών.	21
Εικόνα 13: Οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών στους κινητήριους νευρώνες.	23
Εικόνα 14: Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών.	25
Εικόνα 15: Τρισδιάστατη δομή της Cu-Zn SOD.	26
Εικόνα 16: Αντίδραση καταλάσης.	27
Εικόνα 17: Τρισδιάστατη δομή της καταλάσης.	27
Εικόνα 18: Παραγωγή της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και μετατροπή της σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG).	28
Εικόνα 19: Τρισδιάστατη δομή της GSSGR.	29
Εικόνα 20: Χημική δομή της γλουταθειόνης.	30
Εικόνα 21: Κύκλοι αναγωγής και οξείδωσης της GSH.	30
Εικόνα 22: Μοριακή δομή της βιταμίνης C.	31
Εικόνα 23: Γενικό πλάνο της αντιοξειδωτικής δράσης της SOD, CAT και GPX.	32
Εικόνα 24: Λειτουργικές χημικές ομάδες των κατεχινών, χρήσιμες στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα.	33
Εικόνα 25: Το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης.	36
Εικόνα 26: Διαγραμματική απεικόνιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης.	37
Εικόνα 27: Αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.	40

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA - ασκορβικό οξύ
ADP – δυφωσφορική αδενοσίνη
AH – α-τοκοφερόλη
AMP – μονοφωσφορική αδενοσίνη
APP – πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
ATP – τριφωσφορική αδενοσίνη
CAT- καταλάση
COMT – κατεχολ- O –μεθυλοτρανσφεράση
CoQ10 – συνένζυμο Q10
CHS – συνθάση της χαλκόνης
DHA – δεϋδροασκορβικό οξύ
DPPH – 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl
FAD – φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο
GPX – υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSSGR – ρεδοκτάση της γλουταθειόνης
GSH – ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης
GSSG – οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης
Hsp72 – πρωτεΐνη θερμικού σοκ 72
L· – λιπιδιακή ρίζα
LOO· – λιπουπεροξειδική ρίζα
MDA – μαλονδυαλδεϋδη
MPTP – 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,4-τετραυδροπυριδίνη
NADPH- φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
8-oxodG – 8-οξο-δεοξυγουανοσίνη
6-OHDA – 6- υδροξυντοπαμίνη
PAL – αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης
PMN - πολυμορφοουδετερόφιλα
PUFAs – πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
Q - ουβικινόνη
QH· - ημικινόνη
QH₂ - ουβικινόλη
RNS – ενεργές ενώσεις αζώτου
ROO· – λιπουπεροξειδική ρίζα
ROOH- λιπουπεροξειδίο
ROS – ενεργές ενώσεις οξυγόνου
SOD – δισμουτάση του υπεροξειδίου
SULT - σουλφοτρασφεράση
TBARS – ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ
UDP - γλυκουρονυλτρασφεράσες
uPA - ουροκινάση
XO – οξειδάση ξανθίνης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη επιλεγμένων δεικτών οξειδωτικού στρες σε άτομα που υποβλήθηκαν σε αερόβια άσκηση και που είχαν καταναλώσει πράσινο τσάι. Απώτερος στόχος της διπλωματικής ήταν να προσδιοριστεί η επίδραση του πράσινου τσαγιού και της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και η αναλογία GSH/GSSG στο αιμόλυμα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι μόνο η άσκηση επέφερε αλλαγές στα επίπεδα των δεικτών. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση και τα επίπεδα της GSSG αυξήθηκαν μετά την άσκηση. Τέλος η αναλογία GSH/GSSG μειώθηκε, αποδεικνύοντας τη στατιστικά σημαντική επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Αντίθετα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πράσινο τσάι δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στους δείκτες οξειδωτικού στρες. Τα επίπεδα των δεικτών παρέμειναν αναλλοίωτα και στην ηρεμία αλλά και μετά την άσκηση. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι το πράσινο τσάι δεν έχει καμία επίδραση στο οξειδωτικό στρες, ενώ η άσκηση, έχει σημαντική επίδραση σε αυτό.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΡΑΣΙΝΟ ΤΣΑΙ

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία- Εισαγωγή

Το πράσινο τσάι είναι ένα φυτό (*Camelia Sinensis*), που προέρχεται από χώρες της Ανατολής, όπως η Κίνα, η γενέτειρα του τσαγιού, και η Ιαπωνία. Η παρασκευή του πράσινου τσαγιού ξεκινά από τα φύλλα του, τα οποία πλένονται, κόβονται και ξηραίνονται, ώστε να απενεργοποιηθούν οι πολυφαινολικές οξειδάσες, διατηρώντας τη μονομερή μορφή των πολυφαινολών που περιέχει (*Suchitra et al., 2007*). Στη συνέχεια, εκχυλίζονται στους 60-100 (°C) για 10 λεπτά και ακολουθεί απόσταξη των αρωματικών του υλών. Οι τελευταίες εν συνεχεία συμπυκνώνονται, ψύχονται, διηθούνται, ενώ ακολουθεί απομάκρυνση του συμπλόκου ταννίνης-καφεΐνης. Το υποκείμενο στεγνώνεται και συσκευάζεται. Τα φύλλα του δεν περνούν καμία διαδικασία ζύμωσης, με αποτέλεσμα να διατηρεί το χρώμα του και να αποκτά μια απαλή και ντελικάτη γεύση. Σήμερα, το πράσινο τσάι έχει γίνει αντικείμενο πολλών μελετών και θεωρείται ότι έχει την «αξεπέραστη δύναμη να μακρύνει τη ζωή».

Επιστημονικές μελέτες έδειξαν, ότι το πράσινο τσάι εκτός από ένα αρωματικό και τονωτικό ρόφημα (χάρη στην ταννίνη και καφεΐνη που περιέχει), αποτελεί και προστατευτική ασπίδα για τον οργανισμό καθώς είναι πλούσιο σε φυσικά αντιοξειδωτικά συστατικά, που ονομάζονται πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στην «απενεργοποίηση» των ελεύθερων ριζών, πριν προλάβουν να βλάψουν υγιή κύτταρα. Οι ελεύθερες ρίζες, πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη ασθενειών όπως, ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αναφέρεται ότι τα αντιοξειδωτικά του πράσινου τσαγιού είναι τέσσερις φορές πιο δραστικά από την βιταμίνη C (αντιοξειδωτικό αναφοράς), και απορροφώνται εύκολα από το γαστρεντερικό σωλήνα.

Πρόσφατες έρευνες σε πειραματόζωα και ανθρώπους έδειξαν, ότι τα πολυμερή φλαβονοειδή, που αποτελούν τα κύρια αντιοξειδωτικά του πράσινου τσαγιού, βοηθούν στην αναχαίτηση των κυττάρων διαφόρων τύπων καρκίνου όπως του μαστού, του προστάτη, του δέρματος, του οισοφάγου, των πνευμόνων, του ήπατος και του παγκρέατος. Το κύριο πολυφαινολικό συστατικό που επιδρά στον καρκίνο είναι η *epigallocatechin gallate* (EGCG) και βρίσκεται κατ'εξοχήν στο πράσινο τσάι. Συγχρόνως, οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού προκαλούν το θάνατο στα καρκινικά κύτταρα χωρίς να καταστρέφουν τους υγιείς ιστούς, μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Παράλληλα, τα φλαβονοειδή προλαμβάνουν χρόνιες παθήσεις, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, με το να μειώνουν τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο αίμα και με το να προστατεύουν από την οξείδωση της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) χοληστερόλης.

Το πράσινο τσάι, ενδέχεται να προστατεύει από τη νόσο του Parkinson και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, διότι οι πολυφαινόλες του εμποδίζουν τον τραυματισμό των νευρικών κυττάρων από νευροτοξίνες και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, στις οποίες οφείλονται οι εν λόγω ασθένειες. Παράλληλα, μελέτες έχουν συνδέσει τα φλαβονοειδή του πράσινου τσαγιού με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης, επηρεάζοντας θετικά την οστική πυκνότητα. Άλλες μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν, ότι το πράσινο τσάι ενισχύει τη δράση της ινσουλίνης. Η αντιδιαβητική δράση του τσαγιού οφείλεται στο πολυφαινολικό συστατικό EGCG, το οποίο αυξάνει την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου α-αμυλάση. Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή συμμετέχουν στην πρόληψη του πολλαπλασιασμού των βακτηριδίων, που ευθύνονται για την τερηδόνα και επίσης, επηρεάζουν θετικά τη λειτουργία του ήπατος. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι το πράσινο τσάι βοηθά στην πρόληψη της παχυσαρκίας (*Lin & Shiau, 2006*).

Παρατηρείται, ότι παρόλες τις ευεργετικές συνέπειες των πολυφαινολών του, το πράσινο τσάι πρέπει να καταναλώνεται με μέτρο διότι τα φλαβονοειδή παρεμποδίζουν εν μέρει την

απορρόφηση του σιδήρου από τις φυτικές τροφές (φρούτα και λαχανικά). Μία διατροφή, όμως, πλούσια σε βιταμίνη C μπορεί να αναστείλλει αυτή τη δράση. Παράλληλα, οι πολυφαινόλες φαίνεται, ότι προκαλούν βλάβη στο ήπαρ και τους νεφρούς όταν λαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες. Έχει αποδειχθεί, ότι και η υπερβολική πρόσληψη καφεΐνης προκαλεί νευρικότητα, αϋπνία και καρδιακές αρρυθμίες σε έγκυες γυναίκες, καθώς και σε ασθενείς με καρδιακά προβλήματα. Έχει βρεθεί ότι η κατανάλωση έως και 10 φλιτζανιών πράσινου τσαγιού την ημέρα έχει ευεργετικά αποτελέσματα, χωρίς να δημιουργεί προβλήματα. (Kinjo *et al.*, 1998).

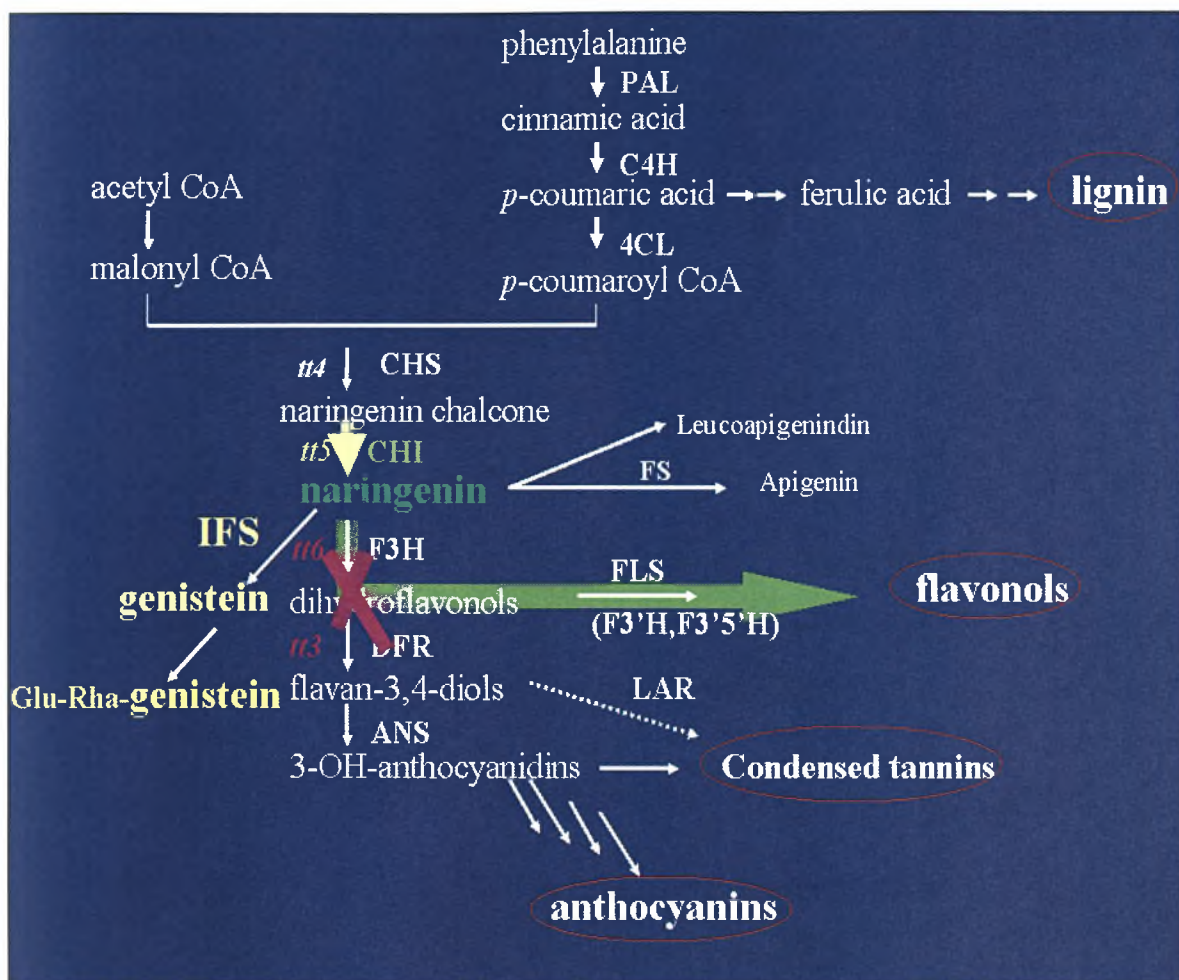
Στη συγκεκριμένη εργασία, θα μελετηθεί η επίδραση του πράσινου τσαγιού και των αντιοξειδωτικών του στο οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλείται, από την υπέρμετρη αύξηση των ελευθέρων ριζών.

1.2 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες είναι φυσικά συστατικά που βρίσκονται στα φυτά, τα φρούτα και τα λαχανικά, καθώς επίσης στο ελαιόλαδο, το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι. Η κύρια ιδιότητά τους είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα που προσφέρουν στο πράσινο τσάι. Επομένως, η κατανάλωση του πράσινου τσαγιού βοηθά στην αντιμετώπιση ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών που σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες (Higdon and Frei, 2003). Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα εκατοντάδες πολυφαινόλες σε πολλά ανώτερα φυτά. Έχουν χαρακτηριστική δομή, η οποία συνίσταται στην παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζοϊκού) δακτυλίου και μιας ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες δεσμευμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού και απαντώνται στη φύση κυρίως ως γλυκοζίτες παρά σε ελεύθερη μορφή. Παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τη διαλυτότητά τους, γιατί άλλες ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι αδιάλυτα ισομερή.

Στις πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές δράσεις. Έχουν ευεργετικές επιδράσεις απέναντι στις καρδιαγγειακές παθήσεις, και κυρίως τη στεφανιαία νόσο και την αρτηριοσκλήρυνση, μέσω αναστολής της οξείδωσης της LDL και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (Soleas *et al.*, 1997). Παράλληλα, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιική, αντιαλλεργική, αντικαρκινική και χημειοπροστατευτική δράση. Ωστόσο, ένα πλήθος πειραμάτων τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*, δείχνουν ότι παρόλες τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, ορισμένες έχουν και προ-οξειδωτική δράση, που σημαίνει ότι συμμετέχουν με διάφορους τρόπους στον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, προάγοντας την οξείδωση διαφόρων υποστρωμάτων.

Η βιοσύνθεση των πολυφαινολών (φλαβονοειδή και υδροξυκινναμωμικά οξέα), προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη, ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού. Ένα κύριο βήμα για τη σύνθεσή τους είναι η μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε κινναμωμικό οξύ με την αποβολή ενός μορίου αμμωνίας. Η αντίδραση καταλύεται από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL). Το κινναμωμικό οξύ μετατρέπεται σε π-κουμαρικό οξύ μέσω της cinnamate-4 υδροξυλάσης (C4H), και αυτό δέχεται μια μεθυλική ομάδα και μετατρέπεται σε φερουλικό οξύ μέσω μιας ο-μεθυλοτρανσφεράσης. Το φερουλικό οξύ υδροξυλιώνεται και μέσω μίας πολύπλοκης διαδρομής μετατρέπεται σε λιγνίνη. Το ένζυμο 4-κουμαράση:CoA-λιγάση (4CL) καταλύει τον σχηματισμό του π-κουμαρόλο-CoA, το οποίο αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με την συμπύκνωση του π-κουμαρόλο-CoA με 3 μόρια μαλόνυλ-CoA, η οποία καταλύεται από την συνθάση της χαλκόνης (CHS). Στην συνέχεια, η χαλκόνη μετατρέπεται σε διάφορα φλαβονοειδή όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες και ταννίνες. Στην εικ.1 φαίνεται αναλυτικά η βιοσύνθεση των πολυφαινολών.



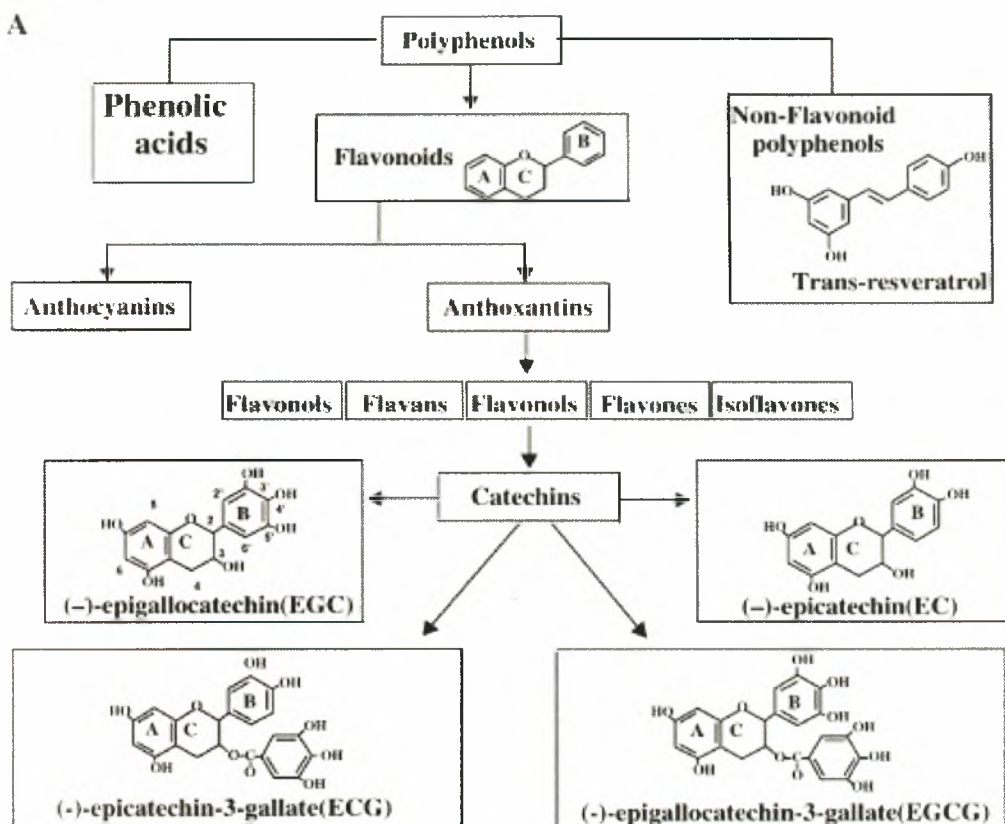
Εικ.1 Διάγραμμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των πολυφαινολών.

CHI: ισομεράση της χαλκόνης, F3H: υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης, IFS: συνθάση της ισοφλαβόνης, FS: συνθάση της φλαβόνης, FLS: συνθάση της φλαβονόλης, DHFR: ρεδοκτάση της διυδροφλαβονόλης, ANS: συνθάση της ανθοκυανίνης.

Οι βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών εξαρτώνται από την βιοδιαθεσιμότητά τους μέσα στον οργανισμό. Μπορεί μία πολυφαινόλη να βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, όμως η δράση της μέσα στον οργανισμό να είναι μικρή λόγω της μειωμένης απορρόφησής της από το έντερο ή λόγω της απομάκρυνσής της από τους νεφρούς (Manach et al., 2004). Συνήθως, οι πολυφαινόλες δεν μπορούν να απορροφηθούν από τον οργανισμό όταν είναι γλυκοσυλιωμένες ή με την μορφή πολυμερών. Οι ενώσεις αυτές θα πρέπει να υδρολυθούν για να μπορέσουν να απορροφηθούν. Κατά την πορεία της απορρόφησης, οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται από τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών στο λεπτό έντερο και στο ήπαρ. Τα ένζυμα αυτά είναι κυρίως οι κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες (COMT), γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες (UDP) και σουλφοτρανσφεράσες (SULT), οι οποίες προσθέτουν μεθυλικές, γλυκουρονικές καιθειϊκές ομάδες αντίστοιχα (Manach et al., 2004). Οι πολυφαινόλες απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω των ούρων και της χολής. Όταν απομακρύνονται μέσω της χολικής οδού απελευθερώνονται πίσω στο έντερο όπου μεταβολίζονται ξανά και μπορεί να απορροφηθούν εκ νέου.

Οι πολυφαινόλες απαρτίζονται από τρεις μεγάλες ομάδες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα μη-φλαβονοειδή (εικ.2). Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία των πολυφαινολών και περισσότερα από 2000 είναι σήμερα γνωστά. Μπορούν να διαχωριστούν

σε διάφορες κατηγορίες με βάση τη μοριακή τους δομή, όπως οι ανθοκυανίνες και οι ανθοξανθίνες. Οι ανθοξανθίνες χωρίζονται στις φλαβονόλες, φλαβάνες, φλαβόνες και ισοφλαβόνες. Οι κατεχίνες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών και είναι περισσότερο διαδεδομένες και καλά χαρακτηρισμένες.



Εικ.2. Κατηγοριοποίηση και δομή των πολυφαινολών (Ramassamy 2006, J. of Pharmacology)

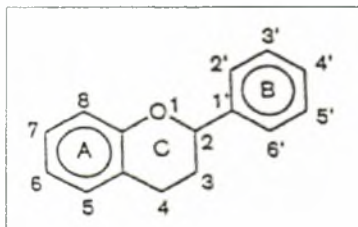
1.2.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολικών συστατικών και βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα φυτά, δρώντας ως συστατικά πολλών φαρμάκων φυτικής προέλευσης. Παραλαμβάνονται από τα φυτά με εκχύλιση, χρησιμοποιώντας ψυχρούς ή θερμούς διαλύτες. Στη συνέχεια ακολουθεί διαχωρισμός τους με μεθόδους χρωματογραφίας όπως: PC, TLC, CC, DCCC, HPLC.

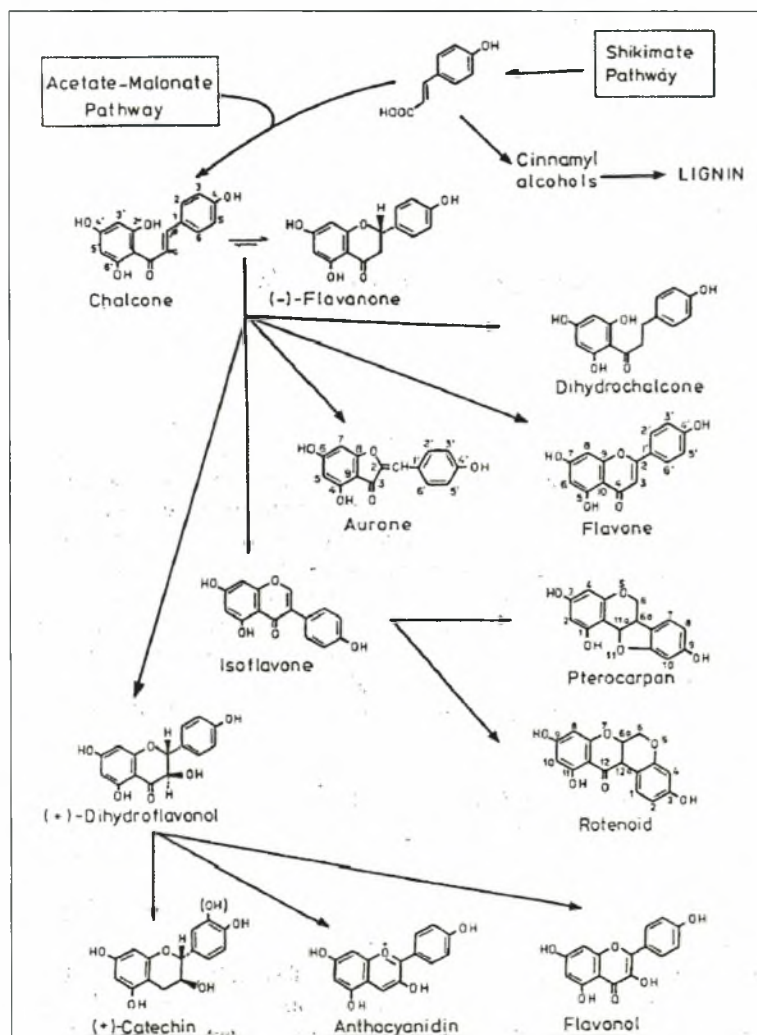
Παρουσιάζουν πλήθος φαρμακολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένης της αντικαρκινικής, αντι-ηπατοτοξικής, αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιβακτηριακής, αντιαλλεργικής και αντι-ϊικής. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στις άφθονες φαινολικές υδροξυλικές ομάδες, που βρίσκονται πάνω στους αρωματικούς δακτυλίους των φλαβονοειδών, και αποτελεί αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Τα φλαβονοειδή αποτελούν τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά συστατικά του πράσινου τσαγιού, κατατάσσοντας το στην κορυφή των αντιοξειδωτικών τροφών. Χρησιμοποιούνται επίσης, ως συστατικά τροφίμων και καλλυντικών.

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς περιέχει 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη C6-C3-C6 με δύο αρωματικούς δακτυλίους, που συνδέονται από μία γέφυρα με τρία

άτομα άνθρακα (ανθρακικός πυρανικός δακτύλιος),(εικ.3). Η γέφυρα και ο ένας αρωματικός δακτύλιος (δακτύλιος Β), βιοσυντίθενται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος, ενώ τα έξι άτομα άνθρακα του άλλου αρωματικού δακτυλίου (δακτύλιος Α), προέρχονται από τη συμπύκνωση των τριών μονάδων του οξικού οξέος διαμέσου της διαδρομής του μηλονικού οξέος. Το πρώτο φλαβονοειδές που προέκυψε από τη συνένωση των δύο μονοπατιών είναι η χαλκόνη και από αυτή με την επίδραση διαφόρων ενζυμικών συστημάτων προέκυψαν οι άλλοι τύποι των φλαβονοειδών (εικ.4). Στα ανώτερα φυτά, απαντώνται υπό μορφή γεννινών ή γλυκοσιδών. Οι γλυκοσίδες είναι Ο-γλυκοσίδες και μικρός αριθμός είναι C-γλυκοσίδες.



Εικ.3: Βασική χημική δομή των φλαβονοειδών. Α, Β είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώ C είναι ο ανθρακικός πυρανικός δακτύλιος. (Van de Wiel et al. 2001)



Εικ. 4.Βιοσυνθετικά μονοπάτια φλαβονοειδών.(Manach et al. 2004)

Τα φλαβονοειδή διαιρούνται σε κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης της γέφυρας με τα τρία άτομα άνθρακα:

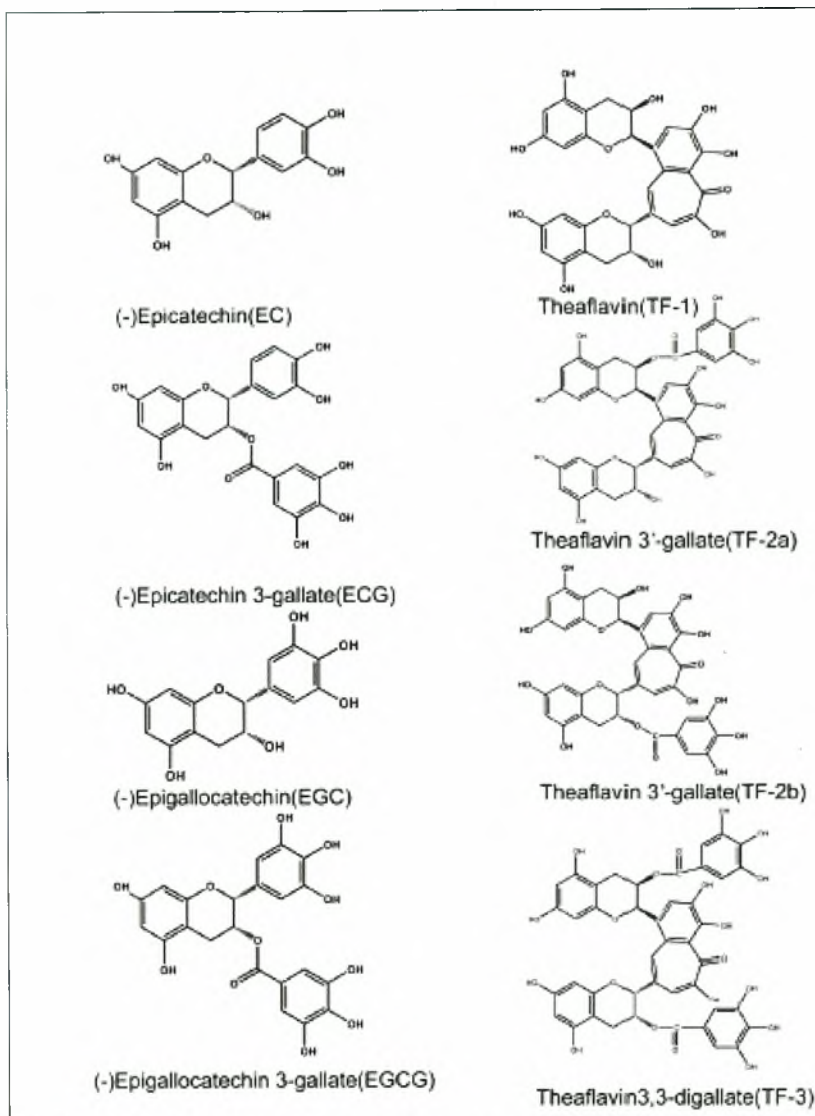
1. Παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου: ανθοκυανίνες.
2. Παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμόνης: φλαβόνες, φλαβονόλες, και τα διμερή τους, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, ισοφλαβανόλες, ξανθόνες.
3. Παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμανόνης: Φλαβάνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβαν-3,4-διόλες, χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, κατεχίνες.
4. Παράγωγα της βενζυλιδενεκουμαρόνης: αυρόνες.

Ομάδα Φλαβονοειδών	Χαρακτηριστικές πολυφαινόλες	Κύριες διατροφικές πηγές
Φλαβονόλες	Κερκετίνη, Ρουτίνη, Μυρικετίνη	κρεμμύδια, σταφύλια, πράσινο τσάι, μαρούλι, κεράσια, βατόμουρα, μπρόκολα, μήλα, ντομάτες
Φλαβόνες	Λουτεΐνη, Απιγενίνη	κίτρα
Ισοφλαβόνες	Γενιστεΐνη	όσπρια, σόγια
Φλαβανόνες	Ναριγκίνη, Ταξιφολίνη	ντομάτες, μέντα, κίτρα, πορτοκάλια
Φλαβανόλες	Κατεχίνη, Επικατεχίνη, κερκετίνη, καιμπερόλη	σταφύλια, πράσινο τσάι, σοκολάτα
Ανθοκυανίνες	Κυανιδίνη, Μαλβιδίνη	σταφύλια, κεράσια, βατόμουρα, πράσινο τσάι, φράουλες

Πίνακας 1. Βασικές κατηγορίες των φλαβονοειδών με τα κυριότερα συστατικά τους και τις διατροφικές πηγές τους. (*Int J Oncol*, 1996;8:221-38).

Οι φλαβονόλες είναι από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή, που βρίσκονται στο πράσινο τσάι και στα τρόφιμα. Η σημαντικότερη κατηγορία των φλαβονολών είναι οι κατεχίνες, οι οποίες βρίσκονται σε μονομερή μορφή και διακρίνονται στις επικατεχίνες (EC), στις epigallocatechin (EGC), στις epicatechine-3 gallate (ECG) και στις epigallocatechin-3 gallate (EGCG) (Εικ. 5). Η EGCG είναι η πιο άφθονη κατεχίνη του πράσινου τσαγιού με ποικίλες αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές δράσεις. Οι κατεχίνες, μετατρέπονται σε theaflavines (TF-1) και thearubigins, έπειτα από ζύμωση των φύλλων του πράσινου τσαγιού, δημιουργώντας το λεγόμενο μαύρο τσάι. Οι theaflavines αποτελούνται από τις theaflavin-3-gallate (TF-2a), theaflavin-3-gallate (TF-2b), theaflavin-3,3'-digallate (TF-3) (Εικ.5).

Οι προανθοκυανιδίνες αποτελούν την πολυμερή μορφή των φλαβονολών και ονομάζονται αλλιώς συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι ταννίνες, βρίσκονται σε πολλά φυτικά είδη, με κύριο είδος το πράσινο τσάι, και προστατεύουν τα φυτά από θανατογόνους μικροοργανισμούς. Είναι υπεύθυνες για το χρώμα και τη γεύση του πράσινου τσαγιού. Στο πράσινο τσάι, περιέχονται επίσης, σε μικρές ποσότητες και άλλες φλαβονόλες, όπως η καιμπερόλη, η κερκετίνη και η μυρικετίνη, με τη μορφή γλυκοσιδών, προσδίδοντάς του τη χαρακτηριστική στυφή γεύση (*Frei and Higdon*, 2003). Αυτές οι φλαβονόλες έχουν έντονη αντιφλεγμονώδη δράση, μειώνοντας τη διαπερατότητα και ευθραυστότητα των αιμοφόρων αγγείων και αναστέλλοντας αποκλειστικά την ισταμίνη που ελευθερώνεται από τα ανθρώπινα βασεόφιλα κύτταρα.



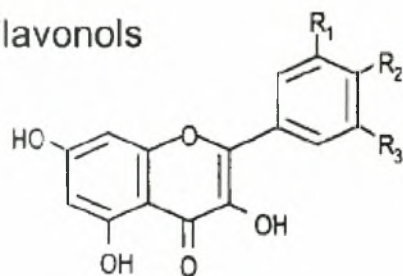
Εικ.5 Χημική δομή των κατεχινών του πράσινου τσαγιού (EC, ECG, EGC, EGCG) και του μαύρου τσαγιού (TF-1, TF-2a, TF-2b, TF-3). (Lin and Shiau, 2006)

Οι φλαβόνες, είναι λιγότερο κοινές στα φρούτα και στα λαχανικά. Είναι συνήθως ολιγοϋδροξυλιωμένα παράγωγα και ο βαθμός υδροξυλίωσής τους κυμαίνεται από 0-7. Ο τελευταίος μπορεί να έχει βιογενετική σημασία γιατί σε χαμηλό βαθμό υδροξυλίωσης επικρατούν οι φλαβόνες (3 θέση ελεύθερη), ενώ οι πολυϋδροξυλιωμένες συνήθως είναι φλαβονόλες (με OH στη θέση C3). Οι πιο σημαντικές φλαβόνες είναι η απιγενίνη, λουτεολίνη και διοσμίνη. (Ramassamy, 2006). (Εικ.6)

Οι ανθοκυανίνες, είναι η πιο διαδεδομένη ομάδα των φλαβονοειδών χρωστικών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα διάφορα χρώματα που παρατηρούνται στα φρούτα και τα λαχανικά. Είναι γλυκοζιτες, που έχουν σάκχαρα στη θέση του άνθρακα 3 και μερικές φορές σε κάποιες άλλες θέσεις. Δίχως τα σάκχαρα τους, οι ανθοκυανίνες είναι γνωστές ως ανθοκυανιδίνες, με πιο κοινές την πελαργονιδίνη, κυανιδίνη και δελφινιδίνη, (Εικ.7) (Τσέκος, 2004). Γενικά η συγκέντρωσή τους στο πράσινο τσάι είναι χαμηλή.

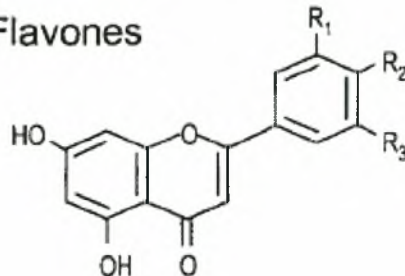
Οι ισοφλαβόνες διαφέρουν από τις άλλες τάξεις των φλαβονοειδών στο ότι είναι 3-φαινολοχρωμόνες Π.χ. η daidzein. Είναι γνωστές περίπου 600 ενώσεις με σκελετό ισοφλαβόνης. Μπορούν να διαιρεθούν σε 12 τάξεις σύμφωνα με τα επίπεδα οξείδωσης και το είδος του δακτυλίου, που μπορεί να είναι ενωμένος στο βασικό σκελετό της ισοφλαβόνης.

Flavonols



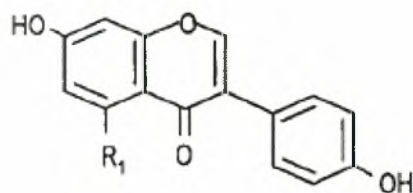
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$: Kaempferol
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Quercetin
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Myricetin

Flavones



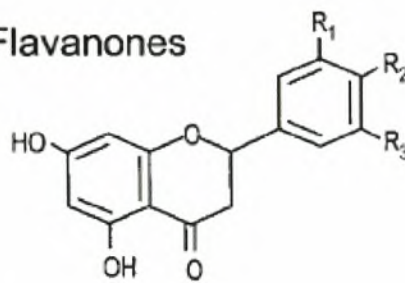
$R_1 = H; R_2 = OH$: Apigenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Luteolin

Isoflavones



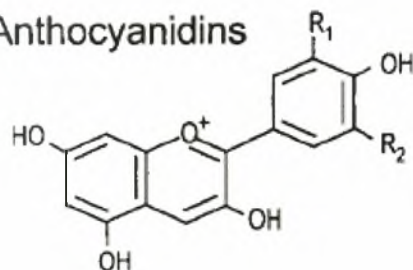
$R_1 = H$: Daidzein
 $R_1 = OH$: Genistein

Flavanones



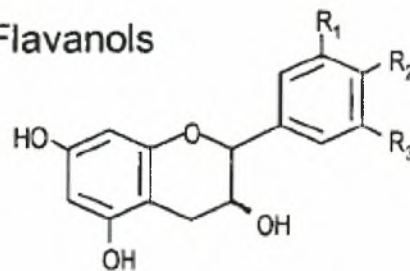
$R_1 = H; R_2 = OH$: Naringenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Eriodictyol
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Hesperetin

Anthocyanidins



$R_1 = R_2 = H$: Pelargonidin
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Cyanidin
 $R_1 = R_2 = OH$: Delphinidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidin
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Malvidin

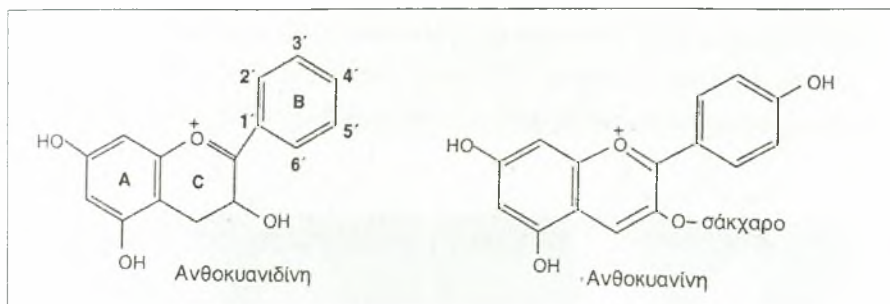
Flavanols



$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Catechins
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallocatechin

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

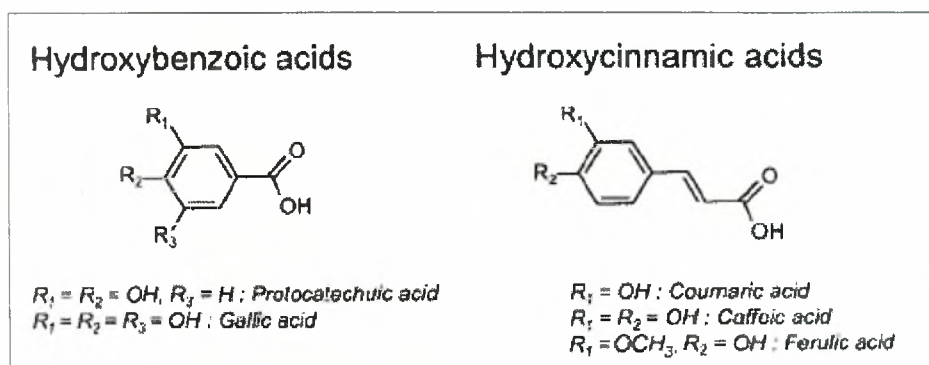
Αυτές οι ενώσεις έχουν έντονη αντι-μικροβιακή και εντομοκτόνο δράση. Βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πράσινο τσάι και του προσδίδουν οξεία προστατευτική δράση έναντι νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer (Mandel and Youdim, 2004).



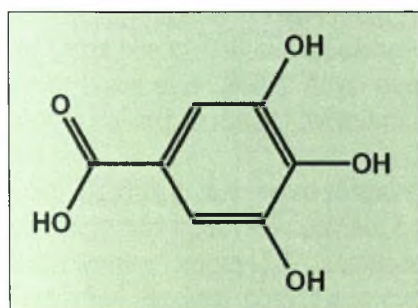
Εικ.7 Βασική χημική δομή της ανθοκυανιδίνης και της γλυκοσυλιωμένης ανθοκυανίνης. (Καράταγλης 1994).

1.2.2. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι απλούστερα στην δομή από τα φλαβονοειδή και αποτελούνται από έναν αρωματικό, βενζοϊκό δακτύλιο. Διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6-C1) και στα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέως αντίστοιχα (Εικ.8). Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα ανήκει το γαλλικό οξύ, το ελλαγικό οξύ και το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, ενώ στα υδροξυκινναμικά οξέα ανήκει το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το κουμαρικό και το φερουλικό οξύ. Από τους πιο χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους των υδροξυβενζοϊκών οξέων που βρίσκονται στο πράσινο τσάι είναι το γαλλικό οξύ (Εικ. 9).



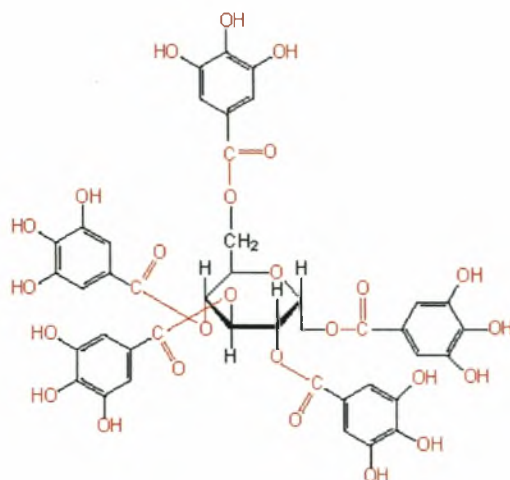
Εικ.8 Χημική δομή των δύο βασικών κατηγοριών των φαινολικών οξέων (Manach et al, 2004).



Εικ.9 Χημική δομή γαλλικού οξέος.

Το γαλλικό οξύ, βρίσκεται στα τρόφιμα αποτελώντας τμήματα μιας άλλης κατηγορίας ταννινών, τις υδρολυόμενες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι και αυτές μία ετερογενής ομάδα πολυμερών ενώσεων, που περιέχουν ένα σάκχαρο και άφθονα μόρια γαλλικού οξέος.

Τα μόρια του γαλλικού οξέος στο μόριο της υδρολυόμενης ταννίνης συνδέονται με ποικίλους τρόπους. (Εικ.10). Έχει βρεθεί ότι το γαλλικό οξύ έχει αντιμυκητιακές και αντι-ϊικές ιδιότητες. Παράλληλα, δρα ως αντιοξειδωτικό και βοηθά στην προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Πειράματα αποδεικνύουν επίσης, ότι παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα ενάντια στα καρκινικά κύτταρα χωρίς να προκαλεί βλάβη στα υγιή κύτταρα (Τσέκος, 2004). Έχει αντιδιαβητική δράση και χρησιμοποιείται ως στυπτικό σε περιπτώσεις εσωτερικής αιμορραγίας. Τέλος, χρησιμοποιείται για την παραγωγή χρωστικών ουσιών και μελανιών.



Εικ.10. Χημική δομή μιας υδρολυόμενης ταννίνης συνδεδεμένης με 5 μόρια γαλλικού οξέος.

1.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει, ότι το πράσινο τσάι παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του καρκίνου, των καρδιαγγειακών και νευρολογικών διαταραχών. Τα οφέλη του πράσινου τσαγιού, έχουν επιβεβαιωθεί επίσης από διάφορες ζωικές μελέτες και σχετίζονται με τη χημειοπροστασία, την υπερχοληστερολαιμία, την αθηροσκλήρωση, τις νόσους του Parkinson και του Alzheimer, καθώς και άλλες σχετιζόμενες με την ηλικία ασθένειες (Mandel and Youdim, 2004). Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων, έχει αποδείξει επίσης, τις προστατευτικές δράσεις του πράσινου τσαγιού, έναντι της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας, η οποία προκαλεί δερματική καρκινογένεση (Morley et al, 2005, Yusuf et al, 2007). Λόγω αυτών των σημαντικών επιδράσεων του πράσινου τσαγιού, ολόένα και περισσότεροι άνθρωποι, είτε υγιείς είτε ασθενείς, έχουν αυξήσει την κατανάλωση του.

Στη θεραπεία των περισσότερων προαναφερθέντων ασθενειών, βοηθά η αντιοξειδωτική ικανότητα του πράσινου τσαγιού, διότι αυτές είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες και της επακόλουθης παραγωγής ελεύθερων ριζών (Polidori 2003 and Junqueira et al., 2004). Παρακάτω, θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στο οξειδωτικό στρες και στους μηχανισμούς που το καταταπολεμούν.

Τα ευεργετικά αποτελέσματα του πράσινου τσαγιού, αποδίδονται στις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχει, ιδιαίτερα στις κατεχίνες, οι οποίες αποτελούν το 30% του ξηρού βάρους των φύλλων του (Graham, 1992). Οι κατεχίνες είναι ιδιαίτερα γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, αδρανοποιώντας τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και του αζώτου, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες, καθώς επίσης και από

ασθένειες σχετιζόμενες με αυτό. Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι έχουν αντι-αγγειογενετικές (προστασία από τον καρκίνο των αιμοφόρων αγγείων) και αντι-μεταλλαξογόνες ιδιότητες (Wang et al, 1989 and Han, 1997). Οι σημαντικότερες κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, όπως έχουν προαναφερθεί, είναι οι epigallocatechin (EGC), οι epicatechine-3 gallate (ECG) και οι epigallocatechin-3 gallate (EGCG).

1.3.1 Καρκίνος

Μελέτες in vitro έχουν δείξει, ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού, αναστέλλουν την καρκινογενετική διαδικασία σε όλα τα στάδιά της, τα οποία είναι το αρχικό στάδιο (initiation), το στάδιο της προαγωγής (promotion) και το στάδιο προόδου (progression) της καρκινογένεσης (Chung et al., 2003). Η δράση αυτή των πολυφαινολών, έχει αποδοθεί στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να επάγουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) και να αναστέλλουν την αγγειογένεση (Hibasami et al., 1998).

Η πιο σημαντική αντικαρκινική δράση του πράσινου τσαγιού έγκειται, στην αναστολή της ουροκινάσης (uPA), του πιο καλά χαρακτηρισμένου ενζύμου στον ανθρώπινο καρκίνο (Jankun et al., 1997). Οι ανθρώπινοι όγκοι χρειάζονται πρωτεολυτικά ένζυμα για να εισβάλλουν στα κύτταρα και να προκαλέσουν μετάσταση. Ένα από αυτά τα ένζυμα είναι η uPA. Αναστολή της uPA, προκαλεί μείωση του μεγέθους του όγκου ή πλήρη υποχώρησή του. Το σημαντικότερο πολυφαινολικό συστατικό που προκαλεί αυτή την αναστολή, είναι η EGCG, από την ομάδα των κατεχινών.

Γενικότερα, έχει αποδειχθεί, ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού μπορούν να εμποδίσουν τον καρκίνο με τους ακόλουθους τρόπους:

- Βοηθούν στην εξουδετέρωση των διαιτητικών καρκινογόνων ουσιών, όπως η νιτροζαμίνη και η αφλατοξίνη.
- Παρεμποδίζουν τη σύνδεση των καρκινογόνων παραγόντων στο κυτταροπλασματικό DNA, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από τις μεταλλάξεις, που μπορούν τελικά να προκαλέσουν καρκίνο (Fujiki, 2004).
- Προστατεύουν από την επίδραση των ελευθέρων ριζών, οι οποίες προκαλούν διάφορα είδη καρκίνου (Yang et al., 1999).
- Εμποδίζουν τις προκαλούμενες από βακτήρια μεταλλάξεις του DNA, που μπορούν να οδηγήσουν στην πρόκληση καρκίνου.
- Λειτουργούν με αντιοξειδωτικά ένζυμα στο έντερο, στο ήπαρ και στους πνεύμονες για να αποτρέψουν την ενεργοποίηση ορισμένων καρκινογόνων ουσιών, προτού βλάψουν το DNA.
- Προστατεύουν από την ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία (Morley et al., 2005).

1.3.2 Γήρανση

Η αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες, αποτελούν τη βάση για τις φαινοτυπικές αλλαγές, οι οποίες οδηγούν στη γήρανση και στην πρόκληση των νευρογενετικών διαταραχών. Πειράματα που έγιναν σε πρότυπα μοντέλα ποντικών μεγάλης ηλικίας, κατέδειξαν, ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού είχαν μια προστατευτική επίδραση στη γνωστική δυσλειτουργία και κατέστειλαν την εγκεφαλική ατροφία σε αυτά τα ζώα (Uhno et al., 2004). Επιπλέον, το πράσινο τσάι μείωσε τα επίπεδα της 8-οξο-δεοξυγουανωσίνης (8-oxodG), έναν δείκτη της οξειδωτικής βλάβης του DNA στο νεφρό, στο ήπαρ και στον εγκέφαλο, καταδεικνύοντας, ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού μπορούν να έχουν μια ευεργετική επίδραση στη βλάβη που προκαλεί η διαδικασία της γήρανσης.

1.3.3 Νευροεκφυλιστικές νόσοι

Το οξειδωτικό στρες, είναι ο κύριος παράγοντας που προκαλεί την παθογένεση της νόσου του Parkinson, θανατώνοντας τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (*Olanow and Tatton, 1999*). Πρόσφατα, βρέθηκε σε 5 γονίδια (*a-synuclein, parkin, ubiquitin C-terminal hydrolase, dj-1* και *Tau*), γενετική ποικιλομορφία που προκαλεί κληρονομικό Parkinson. Η πρωτεΐνη *a-synuclein* εμλέκεται στη ρύθμιση της ελεύθερης κυτοσολικής ντοπαμίνης, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξική για το κύτταρο. Σε καθιερωμένα ζωικά μοντέλα με νόσο Parkinson, βρέθηκε, ότι οι νευροτοξίνες 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,4-τετραυδροπυριδίνη (MPTP) και 6-υδροξυντοπαμίνη (6-OHDA), προκαλούν τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων, μέσω διαφόρων μηχανισμών που εμπλέκουν και το οξειδωτικό στρες (*Ramassamy, 2006*). Πολλές μελέτες έδειξαν, ότι το πράσινο τσάι και ιδιαίτερα η EGCG προλαμβάνουν τον εκφυλισμό, εμποδίζοντας τη συσσώρευση του σιδήρου και της *a-synuclein* σε ποντίκια, που τους έχει χορηγηθεί MPTP (*Mandel et al., 2004*). Αυτές οι επιδράσεις, έχουν αποδωθεί κατά κύριο λόγο στην αντιοξειδωτική ικανότητα της EGCG.

Παρόλο που δεν υπάρχουν επιστημονικά στοιχεία από ανθρώπινες μελέτες σχετικά με την επίδραση του πράσινου τσαγιού στη νόσο του Alzheimer, πλήθος μελετών σε ζώα αποδεικνύουν, ότι η EGCG του πράσινου τσαγιού, επιδρά σε σημαντικούς στόχους που σχετίζονται με τη νόσο. Προστατεύει τους νευρώνες του ιπποκάμπου από τη νευροτοξικότητα που προκαλεί η πρωτεΐνη β-αμυλοειδή, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της μέσω της αναστολής της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) (*Levites et al., 2003*). Παράλληλα, το πράσινο τσάι και οι κατεχίνες του αναστέλλουν το ένζυμο β-σεκρετάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της APP σε β-αμυλοειδές (*Jeon et al., 2003*). Όλες αυτές οι δράσεις του πράσινου τσαγιού στηρίζονται στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κατεχινών του.

1.3.4 Καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες

Η προστατευτική δράση του πράσινου τσαγιού στις καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες, φαίνεται να πηγάζει από την αντιοξειδωτική του ικανότητα (*Higdon and Frei, 2003*). Πειράματα σε ανθρώπους εθελοντές, οι οποίοι κατανάλωσαν πράσινο τσάι, έδειξαν, ότι το τελευταίο αυξάνει την ανθεκτικότητα της πλασματικής LDL στην οξείδωση, μια επίδραση που μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο της αθηρογένεσης. Επίσης, μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης-E, απέδειξαν ότι το πράσινο τσάι, και ιδιαίτερα η EGCG, εμποδίζει τη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης, χωρίς να επηρεάζει τα λιπίδια του πλάσματος ή τα επίπεδα της χοληστερόλης (*Miura et al., 2000*).

1.3.5 Παχυσαρκία

Αρκετές μελέτες δείχνουν, ότι η κατανάλωση του πράσινου τσαγιού προστατεύει από την παχυσαρκία και κατά συνέπεια από όλες τις διαταραχές που σχετίζονται με αυτή. Πειράματα σε αρουραίους, απέδειξαν, ότι η EGCG, μειώνει ή εμποδίζει την αύξηση βάρους τους, και αποτελεί μια αναστρέψιμη επίδραση που σχετίζεται με τη μείωση της λαμβανόμενης τροφής (*Kao et al., 2000*). Τέλος, μελέτες *in vivo* προτείνουν, ότι η EGCG, εμποδίζει την λιπιδική υπεροξειδωση και ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα (*Tsuneki et al., 2004*). Αυτές οι χρήσιμες επιδράσεις του πράσινου τσαγιού στην παχυσαρκία, όμως, μένει να διερευνηθούν διεξοδικότερα.

1.3.6 Μικροβιακές μολύνσεις

Πρόσφατα αποδείχθηκε, ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, αναστέλλουν τον ιό HIV καθώς και τις μολύνσεις από το ανθεκτικό, στα αντιβιοτικά, μικρόβιο *Staphylococcus aureus* (Stapleton et al., 2004). Η EGCG, εμποδίζει την αντιγραφή του HIV-1, αναστέλλοντας την HIV αντίστροφη μεταγραφάση. Παράλληλα, η EGCG, εμποδίζει την πρόσδεση της πρωτεΐνης gp120 στα CD4 T-βοηθητικά κύτταρα, αναστέλλοντας το αρχικό βήμα της μόλυνσης από τον ιό HIV (Kawai et al., 2003).

1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

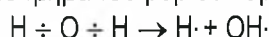
Οι περισσότερες ευεργετικές επιδράσεις του πράσινου τσαγιού, όπως η αντιφλεγμονώδης, η αντιαλλεργική, η καρδιοπροστατευτική, έχουν αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και στην ικανότητα των πολυφαινόλων του να απομακρύνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου (Yang, 1999).

1.4.1 Ελεύθερες ρίζες

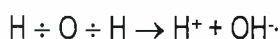
Το οξυγόνο είναι μόριο διατομικό και εμφανίζει παραμαγνητισμό, ο οποίος οφείλεται στην ύπαρξη δύο μονήρων ηλεκτρονίων σε αντιδεσμικά τροχιακά. Έχει την ιδιότητα να «κλέβει» ένα ηλεκτρόνιο, για να ολοκληρώσει το χημικό του τύπο, με αποτέλεσμα να αφήνει τις χημικές ενώσεις αποδυναμωμένες. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια σειρά από χημικές ενώσεις, γνωστές ως «ελεύθερες ρίζες», που τους λείπει ένα μοναδικό ηλεκτρόνιο και το αναζητούν όπου μπορούν προκαλώντας σοβαρές βλάβες. Επομένως, η **ρίζα (ή ελεύθερη ρίζα)**, ορίζεται ως ένα άτομο ή συγκρότημα ατόμων που φέρουν περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους και ως εκ τούτου διαθέτουν ένα ή περισσότερα μονήρη (ασύζευκτα) ηλεκτρόνια σε κάποιο τροχιακό τους. Εξαιτίας της μεγάλης τους αστάθειας, αντιδρούν με γειτονικά μόρια και τα τροποποιούν, καθώς τα ηλεκτρόνια μεταπηδούν από ένα μόριο στόχο στο επόμενο (Finaud et al., 2006). Είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν εύκολα να οξειδώσουν και να βλάψουν ζωτικά βιολογικά μόρια, όπως λίπη, πρωτεΐνες και DNA.

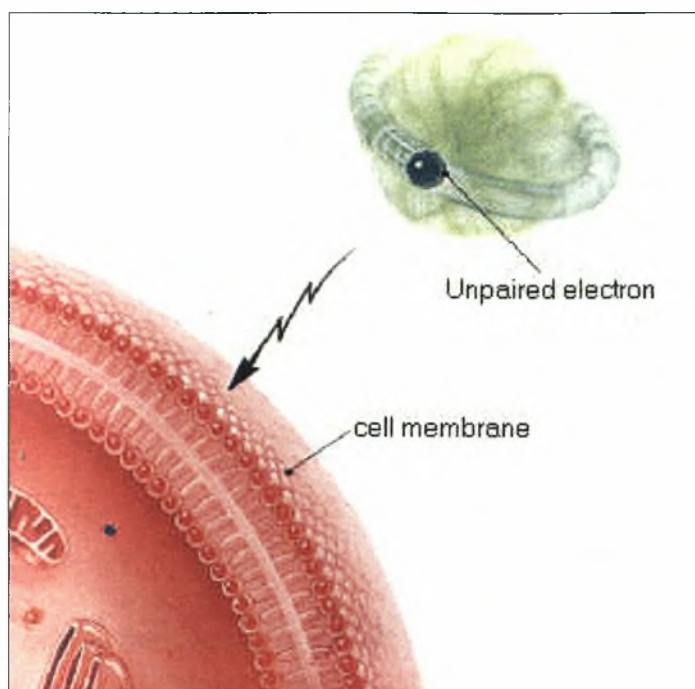
Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν μέσω:

- της ομολυτικής διάσπασης, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται συμμετρικά, ώστε κάθε τμήμα του μορίου λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο:



- της ετερολυτικής διάσπασης, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται μη συμμετρικά, ώστε και τα δύο ηλεκτρόνια παραμένουν στο ίδιο τμήμα, αφήνοντας το άλλο με ένα κενό τροχιακό:





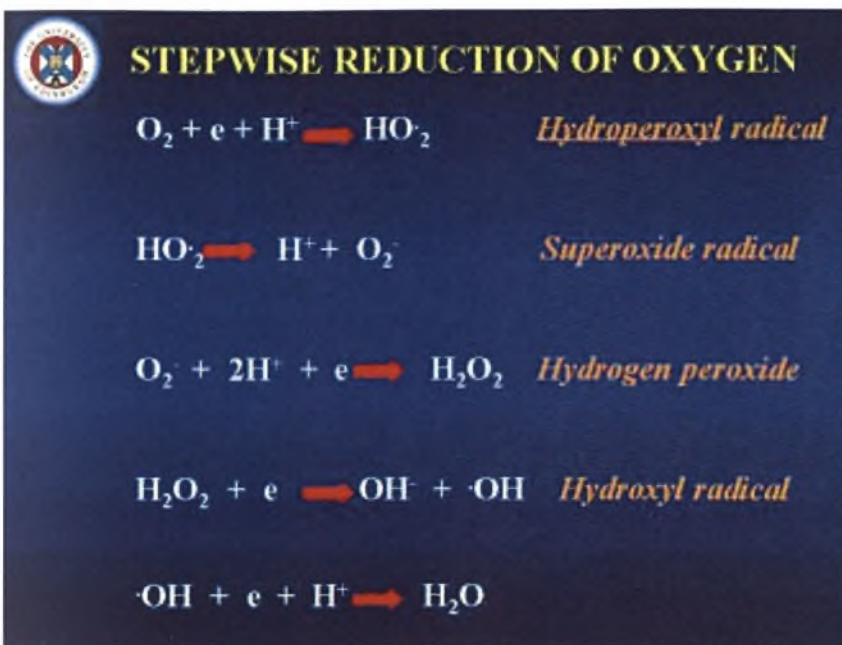
Εικ. 11 Η ελεύθερη ρίζα με το αζευγάρωτο ηλεκτρόνιό της, έχει ως στόχο το κύτταρο.

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}) και οι θειούχες ρίζες (RS^{\cdot}). Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιολογικά μόρια, παράγονται νέες ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσουν με άλλα μόρια, και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά καταλήγωντας σε καταστροφικές συνέπειες για τον οργανισμό.

Δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS)- Δραστικές ενώσεις Αζώτου (RNS)

Ο όρος δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου δίνει μία μεγάλη ποικιλία ROS τα οποία είναι ιδιαίτερα δραστικά. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$), ελεύθερες ρίζες όπως το ιόν υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το οποίο προκύπτει όταν το οξυγόνο (O_2) αποκτά ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο με αποτέλεσμα το μόριο να έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (Vollaard *et al.*, 2005).

Ο όρος δραστικές ενώσεις αζώτου, περιλαμβάνει τις ρίζες αζώτου όπως το νιτρικό οξύ (NO^{\cdot}) και τις μη ρίζες αζώτου όπως η ρίζα του περοξυνιτρίτη ($ONOO^{\cdot}$). Τα δραστικά αυτά στοιχεία μπορούν να οξειδώσουν διάφορα βιομόρια λόγω της έντονης χημικής δραστικότητάς τους (Kohen & Nyska, 2002).



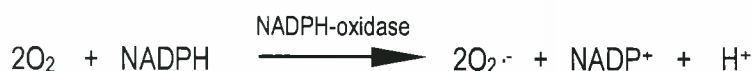
Εικ. 12 Αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.4.2 Πηγές ελευθέρων ριζών

Η δυσμενής παραγωγή των ελευθέρων ριζών προέρχεται από πολλές πηγές οι οποίες μπορεί να είναι είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς.

Ενδογενείς πηγές

1. Οξειδωτική φωσφορυλίωση: κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, κάποια από αυτά διαφεύγουν με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.
2. Σύστημα κυτοχρώματος P450: κατά την αντίδραση οξείδωσης ενός υποστρώματος (π.χ. φάρμακο), ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το NADPH και ταυτόχρονα παράγονται δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) ως παραπροϊόντα.
3. Φλεγμονώδεις αντιδράσεις: μία ποικιλία από φαγοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα διαθέτουν μια μεμβρανική NADPH οξειδάση, που καταλύει την παρακάτω αντίδραση με ταυτόχρονη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανιόντος του σουπεροξειδίου.



4. Υπεροξειδισώματα: μεμβρανικά κυστίδια με εξειδικευμένα ένζυμα για αντιδράσεις οξείδωσης μέσω των οποίων παράγονται ελεύθερες ρίζες.
5. Αυτοοξείδωση βιομορίων: οι φλαβίνες, οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες, οι αιμοσφαιρίνες και οι μυοσφαιρίνες με αυτοοξείδωση απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες.

Εξωγενείς πηγές

1. Κατανάλωση αλκοόλ
2. Κάπνισμα
3. Άσκηση (αερόβια ή αναερόβια)
4. ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία
5. ρύπανση του περιβάλλοντος
6. συντηρητικά τροφών
7. φυτοφάρμακα-εντομοκτόνα
8. άγχος

1.4.3 Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

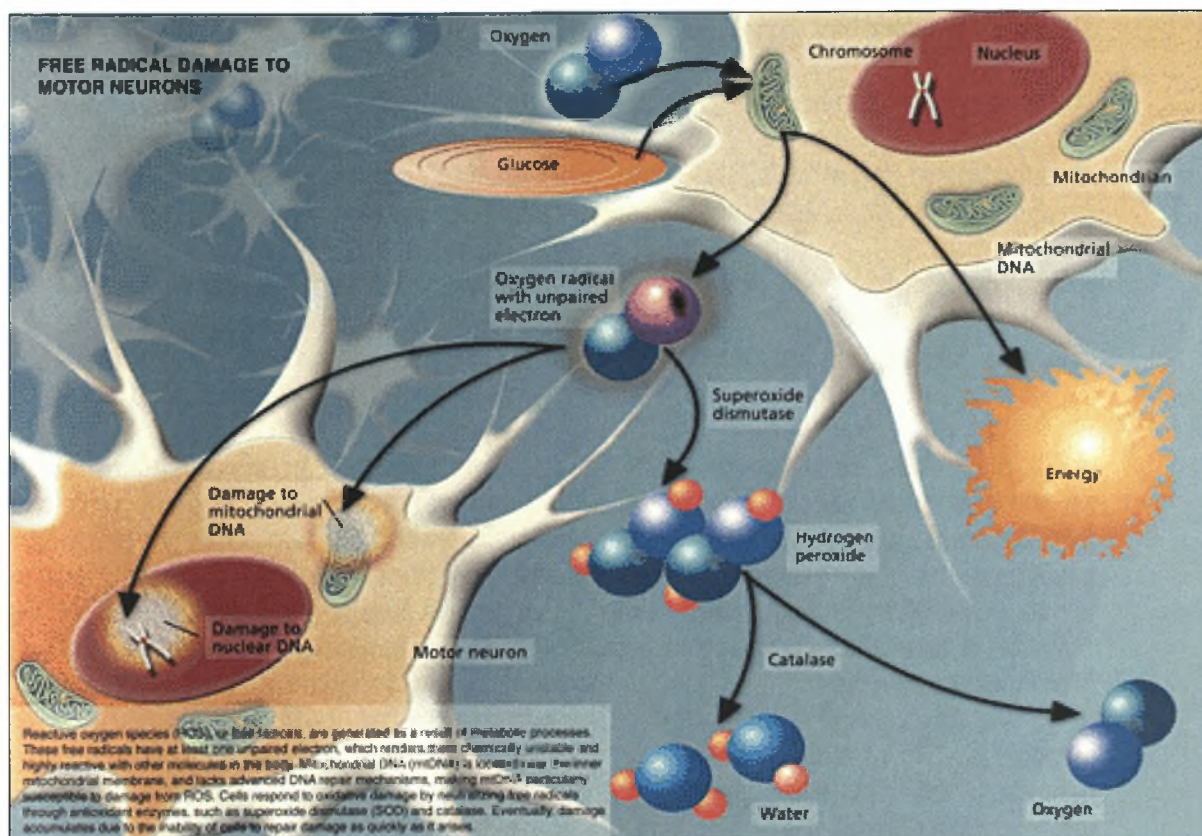
Θετικές επιδράσεις

Θεωρείται περισσότερο δεδομένο, ότι οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν δυσάρεστες καταστάσεις, ωστόσο όμως είναι αρκετές και οι θετικές επιδράσεις τους. Διαδραματίζουν βασικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπου δρουν ενάντια στα αντιγόνα που παράγονται από τα φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια φλεγμονής. Συμμετέχουν και ενεργοποιούν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι των MAPK για τη ρύθμιση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών. Το H₂O₂ χρησιμοποιείται σαν διακυτταρικό σηματοδοτικό μόριο και βοηθά στην παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών, όπως επίσης και το NO, το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική αναπνοή και την πίεση του αίματος. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες σε μικρές ποσότητες, επάγουν τη συστολή των μυικών ινών (*Finaud et al., 2006*).

Αρνητικές επιδράσεις

Σε αυτές περιλαμβάνονται η οξειδωση δομικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών του αίματος. Συγχρόνως, η έκθεση στις ελεύθερες ρίζες προκαλεί μεταλλάξεις και καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων. Η επίθεση των ROS προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών και την καταστροφή των πρωτεϊνών, που είναι συνδεδεμένες στην μεμβράνη. Παράλληλα, αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών είναι η γήρανση, που συμβαίνει μέσω της καταστροφής του μιτοχονδριακού DNA. Επομένως, τα μιτοχόνδρια καθίστανται δυσλειτουργικά και αδυνατούν να υποστηρίξουν τη σύνθεση του ATP (*Finaud et al., 2006*).

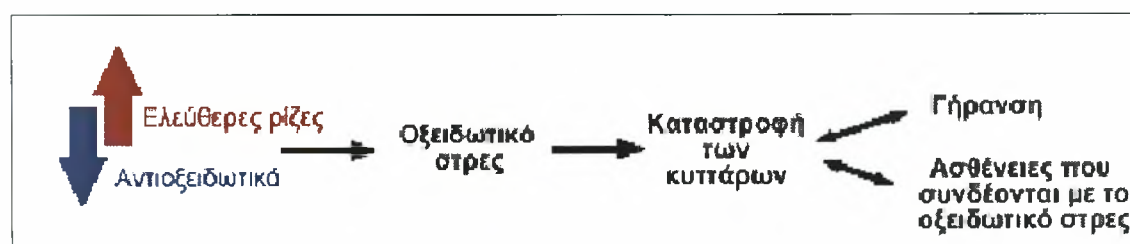
Τέλος, μια πληθώρα ασθενειών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, το αιμορραγικό σοκ, το Alzheimer, το AIDS και η κυστική ίνωση προκαλούνται από την μακροπρόθεσμη έκθεση του οργανισμού στα ROS.



Εικ.13 Οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών στους κινητήριους νευρώνες.

1.4.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από την ανισορροπία ανάμεσα στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (δραστικών ενώσεων οξυγόνου και δραστικών ενώσεων αζώτου) και στην υπάρχουσα αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.



Είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη υγεία και στην ασθένεια. Συσσωρευτικές αποδείξεις προτείνουν, ότι μια σωστή ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της υγείας, της ευεξίας και της μακροζωίας. Μια μεταβολή, όμως, μπορεί να καταλήξει σε διαταραχή και σε ασθένειες, όπως: φλεγμονές, νευροεκφυλιστικές παθήσεις, καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις, γήρανση (Πίνακας 2) (Halliwell & Whitman, 2004).

Επομένως, το οξειδωτικό στρες είναι ένα ζωτικό σήμα κινδύνου και η παρακολούθησή του είναι θεμελιώδης σημασίας για την προληπτική ιατρική και τη διατήρηση της υγείας, καθώς επίσης και για τον έλεγχο σχετικών θεραπειών, σε ένα μεγάλο φάσμα εφαρμογών.

Το οξειδωτικό στρες προέρχεται από διάφορες πηγές, οι κυριότερες των οποίων είναι οι εξής (Halliwell, 2001):

- Ενδογενείς παράγοντες όπως φλεγμονή, καρκίνος, ισχαιμία, ψυχολογικό στρες, κυτταρικός θάνατος, καθιστική ζωή, φυσική άσκηση.
- Εξωγενείς παράγοντες όπως η διατροφή (λίπη, αλάτι, αλκοόλ, καφεΐνη), το κάπνισμα, οι ρύποι (SO₂, NO₂, O₃, υδρογονάνθρακες), η ακτινοβολία (ιονίζουσα, υπεριώδης), τα φάρμακα (αντικαρκινικά), παθογενή βακτήρια, ιοί.
- Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που προέρχεται από αύξηση της ενεργοποίησης των φυσικών συστημάτων παραγωγής ROS/RNS.
- Μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών προερχόμενη από διατροφικές ελλείψεις, μεταλλάξεις ή διάφορους τοξικούς παράγοντες.

Έχει αποδειχθεί, ότι το οξειδωτικό στρες επιδρά και καταστρέφει τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) προκαλώντας τον τραυματισμό των ιστών. Παράλληλα, ενεργοποιεί την διαδικασία της οξείδωσης, μία από τις κυριότερες αιτίες της γήρανσης, προκαλώντας βλάβες στον οργανισμό. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων είναι η μαλονδυαλδεΐδη, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και τα λιπιδικά υπεροξειδία (Mylonas & Kouretas, 1999), ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών και του DNA χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) (Vincent & Taylor, 2006).

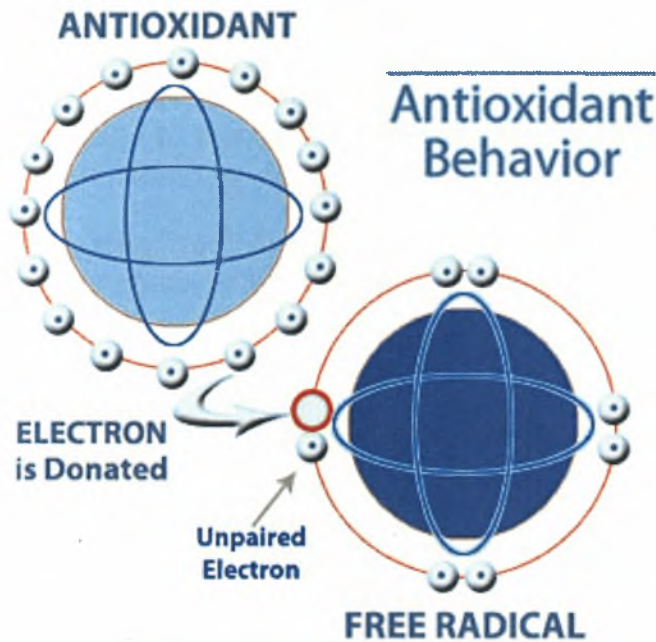
Στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιηθούν σε άτομα που έχουν καταναλώσει πράσινο τσάι και έχουν υποβληθεί σε αερόβια άσκηση, οι δείκτες ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη, ώστε να μελετηθεί κατά πόσο το πράσινο τσάι και η άσκηση επιδρούν στο οξειδωτικό στρες..

Παχυσαρκία	Ρευματοπάθειες
Αρτηριοσκλήρυνση	Αυτοάνοσα νοσήματα
Χρόνια πολυαρθρίτιδα	Τοξικώσεις από μέταλλα
Ελκώδης κολίτιδα	Πρόωρη γήρανση
Φλεγμονές	Νόσος Parkinson
Δερματικές παθήσεις	Νόσος Alzheimer
Ισχαιμία	Σκλήρυνση κατά πλάκας
Καταρράκτης	Παγκρεατίτιδα
Καρκίνος	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Κλινικές καταστάσεις οι οποίες είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες.

1.4.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

Εξαιτίας της ευπάθειας των ζωντανών οργανισμών στις ελεύθερες ρίζες τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ανέπτυξαν ειδικά ενζυμικά και μη ενζυμικά συστήματα για την προστασία τους από τις βλαβερές συνέπειες των ελευθέρων ριζών. Αυτά τα συστήματα, ονομάζονται αντιοξειδωτικά και σκοπός τους είναι να προσφέρουν τα ηλεκτρόνια τους στις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα οι τελευταίες να μετατρέπονται σε μη τοξικές άρα και ακίνδυνες για τον ανθρώπινο οργανισμό (Εικ.14).



Εικ. 14 Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών.

Συγκεκριμένα, ο όρος «αντιοξειδωτικό», αναφέρεται σε κάθε ουσία που βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλλει την οξείδωση κάποιου υποστρώματος. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και η παραγωγή των ελευθέρων ριζών βρίσκονται σε μία ισορροπία. Όταν αυτή η ισορροπία διαταραχθεί τότε ο οργανισμός αντιμετωπίζει το οξειδωτικό στρες (Halliwell, 2001).

Ρόλος των αντιοξειδωτικών

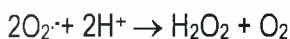
Τα αντιοξειδωτικά έχουν πολλούς ρόλους που δεν περιορίζονται μόνο στην προστασία του οργανισμού από τις ελεύθερες ρίζες.

- Έχουν αντικαρκινική δράση
- Δρουν καρδιοπροστατευτικά
- Προστατεύουν τους νευροδιαβιβαστές από την οξείδωση, βελτιώνοντας την εγκεφαλική μικροκυκλοφορία
- Προφυλάσσουν τον οργανισμό από την πρόωρη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου
- Έχουν αντιαλλεργική δράση
- Ενισχύουν την όραση, βελτιώνοντας τη λειτουργική κατάσταση του αμφιβληστροειδούς χιτώνα
- Προστατεύουν από οιδήματα, φλεγμονές και εκφυλιστικές αλλοιώσεις

Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

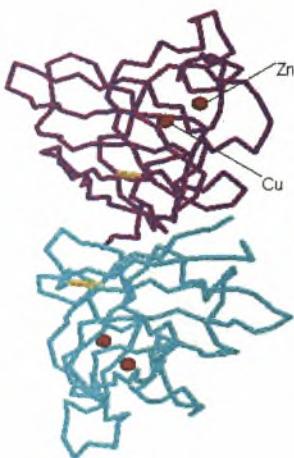
Στους ενζυμικούς μηχανισμούς συμμετέχουν διάφορα ένζυμα, τα οποία ή δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνουν την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPX), η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

1. Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) : Η SOD αποτελεί το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού και καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



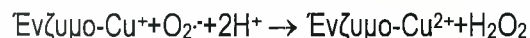
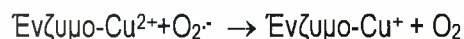
Η SOD διακρίνεται σε κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD, μιτοχονδριακή Mn-SOD και εξωκυτταρική SOD.

⇒ **Cu-Zn SOD:** αποτελείται από δύο υπομονάδες, από τις οποίες η μία φέρει ένα άτομο Zn και η άλλη ένα άτομο Cu. Είναι πολύ σταθερό ένζυμο με αποτέλεσμα να είναι εύκολη η απομόνωσή του.



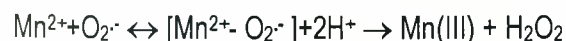
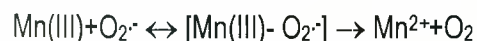
Εικ. 15 Τρισδιάστατη δομή της Cu-Zn SOD.

Απαντάται σε ευκαρυωτικά κύτταρα όπως ζυμομύκητες, φυτά και ζώα. Το ιόν του χαλκού συμμετέχει στην αντίδραση της δισμουτάσης και υφίσταται διαδοχικά οξείδωση και αναγωγή, δηλαδή:



Το ιόν Zn^{2+} δεν συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο, αλλά συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου.

⇒ **Mn-SOD:** εντοπίζεται σε βακτήρια, φυτά και ζώα, σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής:

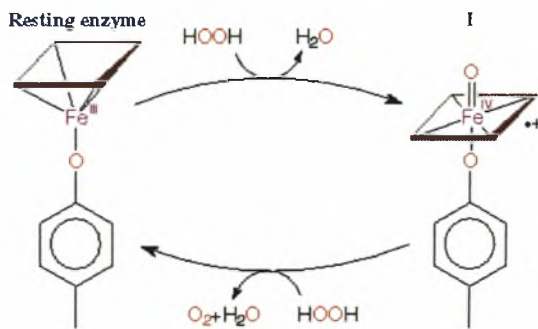
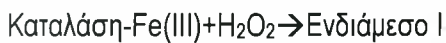


Το ιόν μαγγανίου είναι απαραίτητο για τη δραστικότητα του ενζύμου, καθώς η απομάκρυνσή του έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της δραστικότητας της Mn-SOD.

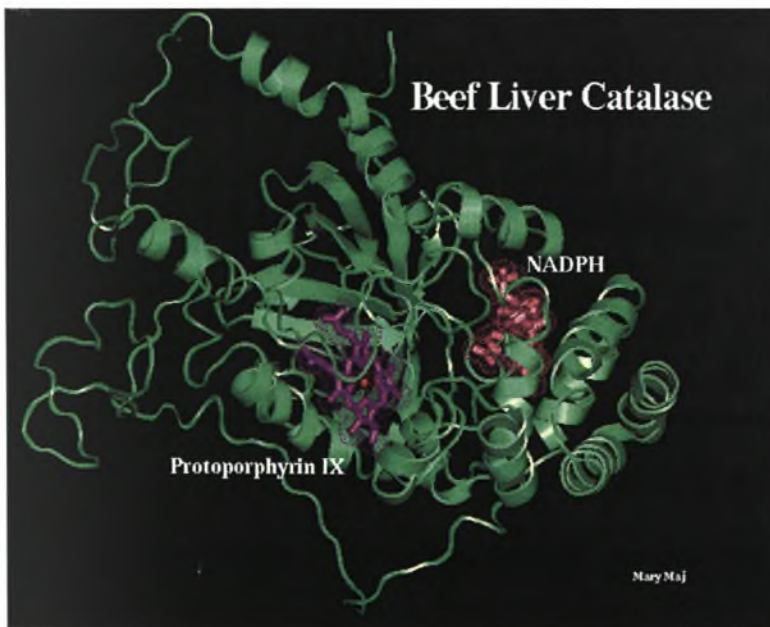
⇒ **Εξωκυτταρική SOD**: Υπάρχουν αρκετές μορφές εξωκυτταρικής SOD (A, B και C). Είναι τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη με ένα άτομο χαλκού και ένα άτομο ψευδαργύρου σε κάθε υπομονάδα της. Το μεγαλύτερο μέρος της βρίσκεται προσδεμένο στην επιφάνεια του κυττάρου μαζί με υδρογονάνθρακες, ιδιαίτερα στους πνεύμονες και στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων.

2. Καταλάση (CAT): Η καταλάση είναι ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδισώματα. Στα ζώα βρίσκεται σε όλα τα κύρια όργανα και ιδιαίτερα στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες φέρει μια ομάδα αίμης στο ενεργό της κέντρο.

Η δράση της καταλάσης έγκειται στη μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1989):



Εικ. 16 Αντίδραση καταλάσης.

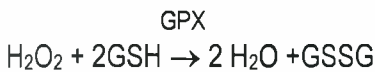


Εικ. 17 Τρισδιάστατη δομή της καταλάσης

Εκτός από την παραπάνω αντίδραση η καταλάση καταλύει: α) την μετατροπή της μεθανόλης και αιθανόλης στις αντίστοιχες αλδεύδες, β) την οξείδωση του φορμικού οξέος σε διοξείδιο του άνθρακα, γ) την οξείδωση του υδραργύρου, που απορροφάται από το ανθρώπινο σώμα, σε Hg²⁺.

Η δραστηριότητα της καταλάσης εμφανίζεται σε σημαντικό ποσοστό σε άτομα που ασχολούνται με αερόβια άσκηση.

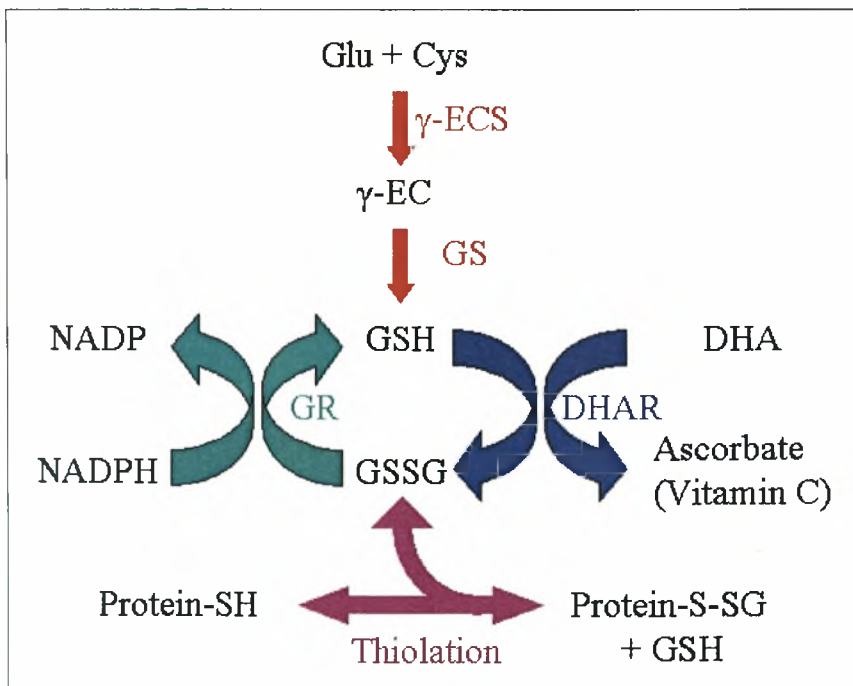
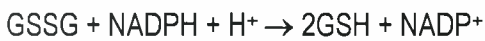
3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX): Το ένζυμο GPX ανακαλύφθηκε σε ζωικούς ιστούς το 1957, από τον G.C. Mills στις Η.Π.Α. Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) σε GSSG.



Η GPX αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες καθεμία από τις οποίες έχει ένα άτομο σεληνίου στο ενεργό της κέντρο. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ισομορφές GPX στα θηλαστικά: α) το κλασσικό κυτταρικό ένζυμο, β) η ισομορφή που μεταβολίζει τα λιπιδιακά υπεροξειδία γ) αυτή που εντοπίζεται στην γαστρεντερική οδό και δ) στο πλάσμα. Η ισομορφή που μεταβολίζει τα λιπιδιακά υπεροξειδία δρα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

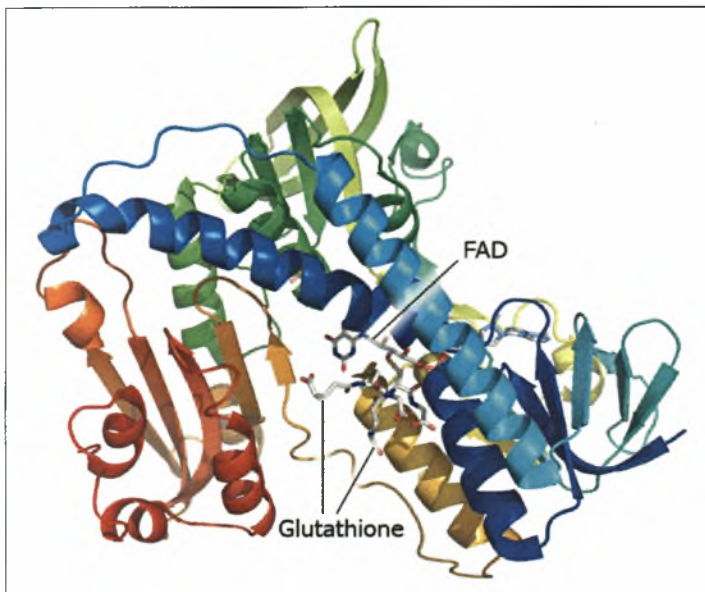


4. Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GSSGR): Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου με αναγωγή της GSSG σε GSH σύμφωνα με την αντίδραση:



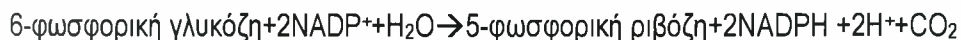
Εικ. 18 Παραγωγή της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και μετατροπή της σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG).

Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης αποτελείται από δύο υπομονάδες με ένα μόριο FAD σε κάθε ενεργό κέντρο (Εικ. 19). Το NADPH που προέρχεται από τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες οι οποίες αντιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε δύο μόρια GSH.



Εικ. 19 Τρισδιάστατη δομή της GSSGR.

5. Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD): Η πορεία των φωσφορικών πεντοζών (Pentose Phosphate Pathway-PPP) ξεκινάει με την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει την οξείδωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 5-φωσφορική ριβόζη με ταυτόχρονη παραγωγή NADPH. Συνολικά η αντίδραση είναι:

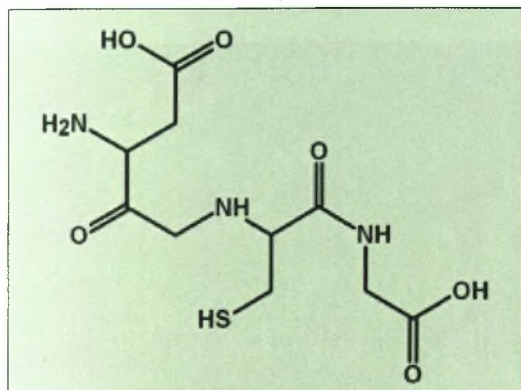


Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH για τα ερυθροκύτταρα, καθώς αυτά στερούνται μιτοχονδρίων. Συνεπώς, η παραγωγή NADPH από το μονοπάτι PPP παίζει σημαντικότατο ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από το οξειδωτικό στρες και τη διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και των ανηγμένων σουλφυδρυλομάδων (Jamourtas et al, 2005).

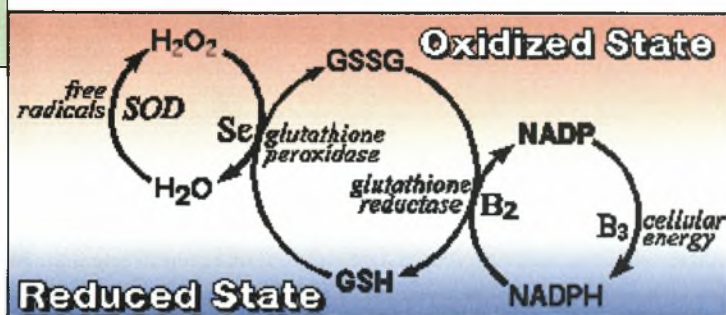
Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

Σ'αυτή την κατηγορία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπάγονται ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, τα στοιχεία μετάπτωσης, η μελατονίνη, το συνένζυμο Q10 καθώς επίσης και ενώσεις που προμηθεύεται ο οργανισμός από τη διατροφή όπως το ασκορβικό οξύ, η βιταμίνη E, A, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, το σελήνιο, ο φευδάργυρος και οι φυτικές φαινόλες.

1. Γλουταθειόνη (GSH): Ανήκει στην κατηγορία των θειολών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία στο ενεργό τους κέντρο σουλφυδρυλικών καταλοίπων (Εικ.20). Δρα ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στην αναστολή των ROS, μέσω της συνεχούς μετατροπής της από μία ανηγμένη μορφή (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίθετο (Εικ. 21) ,(Erden-Inal et al., 2002).



Εικ. 20 Χημική δομή της γλουταθειόνης.



Εικ. 21 Κύκλοι αναγωγής και οξειδωσης της GSH.

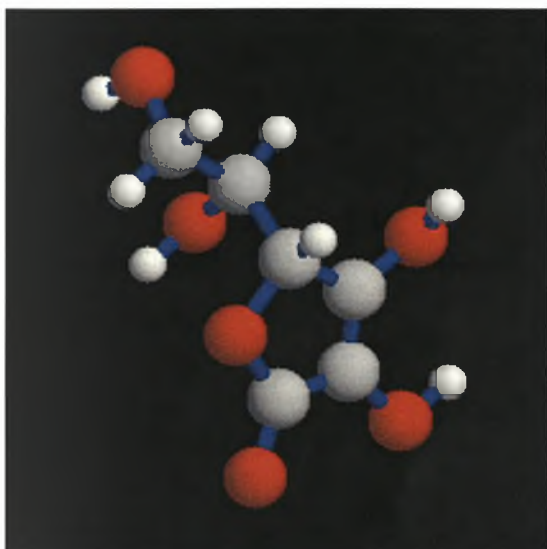
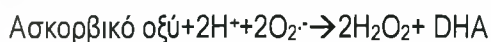
2. Βιταμίνη Ε (α-Τοκοφερόλη ή AH): Ανήκει στην οικογένεια των τοκοφερολών. Αποτελείται από πολικούς υδροξυλιωμένους αρωματικούς δακτυλίους και μη πολικές ισοπρενοειδείς πλευρικές αλυσίδες. Είναι το κύριο λιπόφιλο αντιοξειδωτικό των κυτταρικών μεμβρανών. Η αντιοξειδωτική δράση της ενεργοποιείται σε συνδυασμό με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το συνένζυμο Q10. Προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση δρώντας άμεσα με μια ποικιλία ελευθέρων ριζών, όπως τη ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), δημιουργώντας μία σχετικά αδρανή ρίζα τοκοφερόλης. (Thompson et al., 2000).



3. Βιταμίνη Α (ρετινόλη)- β-καροτένιο): Η βιταμίνη Α είναι λιποδιαλυτή πρωτεΐνη και εντοπίζεται σε πολλές λιπαρές ουσίες. Το β-καροτένιο βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη Α σε καταστάσεις ανάγκης για τον οργανισμό. Έχει προταθεί ότι απενεργοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλει την υπεξειδωση των λιπιδίων.

4. Ουρικό οξύ: Αποτελεί παραπροϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, με αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας τις ρίζες RO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} , το όζον, και το υποχλωριώδες οξύ. Κατά την εξουδετέρωση αυτών των ριζών παράγονται και άλλες ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να μην είναι αξιόπιστη η χρησιμοποίηση του ουρικού οξέος ως αντιοξειδωτικού (Halliwell and Gutteridge, 1989).

5. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ): Είναι μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε πολλά φυτά και ζώα. Ο άνθρωπος όμως την προμηθεύεται από τη διατροφή του. Αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό και αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες παράγοντας το μεταβολίτη δευδροασκορβικό οξύ (DHA) (Thompson et al., 2000).



Εικ. 22 Μοριακή δομή της βιταμίνης C.

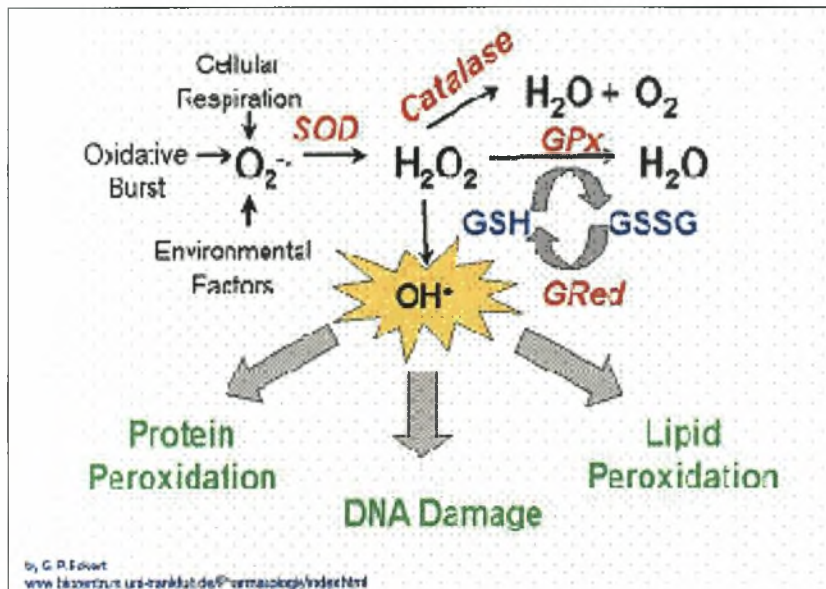
6. Συνένζυμο Q10 (ουβικινόλη): Διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Παράλληλα αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό προστατεύοντας τα λίπη από υπεροξειδωση και αναγεννώντας ένα άλλο ισχυρό αντιοξειδωτικό, την βιταμίνη E.

7. Στοιχεία μετάπτωσης: Ορισμένα μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός προσδένονται σε πρωτεΐνες όπως η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η φερριτίνη και σχηματίζουν αντιοξειδωτικά σύμπλοκα για την άμυνα του οργανισμού. Ο σίδηρος έχει αντιοξειδωτική δράση ως συμπαραγοντας της καταλάσης. Ωστόσο υπερβολικές ποσότητες μπορούν να μειώσουν την αντιοξειδωτική άμυνα. Η φερριτίνη διατηρεί τα επίπεδα του σιδήρου στο αίμα ή στα κύτταρα, με αποτελεσματική μείωση του σχηματισμού των ελευθέρων ριζών. Τα επίπεδα της φερριτίνης αυξάνονται σε καταστάσεις που καταλήγουν σε οξειδωτικό στρες όπως φλεγμονή, έντονη άσκηση και βλάβη των κυττάρων.

8. Μελατονίνη: Είναι ορμόνη η οποία δρα ως αντιοξειδωτικό ενεργοποιώντας πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα μεταξύ των οποίων τη SOD, τη GPX και την καταλάση. Παράλληλα έχει βρεθεί ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών.

9. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP): Αποτελούν μία ποικιλία πρωτεϊνών που παράγονται με ουβικιτινίωση ενός πολύ συντηρημένου γονιδίου. Επάγονται κατά τη διάρκεια έντονης φυσικής άσκησης, φλεγμονής, οξειδωτικού στρες και δρουν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες (Halliwell and Gutteridge, 1989).

10. Φλαβονοειδή: Αποτελούν τη βασικότερη κατηγορία των πολυφαινολών, οι οποίες είναι ουσίες εξαιρετικά αντιοξειδωτικές και βρίσκονται κατ'εξοχήν στο πράσινο τσάι, όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Στη συνέχεια της εργασίας θα αναλυθούν οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης του πράσινου τσαγιού, που βασίζονται στη δράση των φλαβονοειδών.



Εικ. 23 Γενικό πλάνο της αντιοξειδωτικής δράσης της SOD, CAT και GPX.

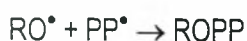
1.4.6 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης του πράσινου τσαγιού

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού μπορούν να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών τους υδρογόνων. Δρουν ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες και οδηγούν στην δημιουργία φαινολικών ριζών. Έτσι αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, εμποδίζοντας τις να οξειδώσουν είτε τα λιπίδια είτε άλλα μόρια και να δημιουργήσουν προβλήματα στα κύτταρα.

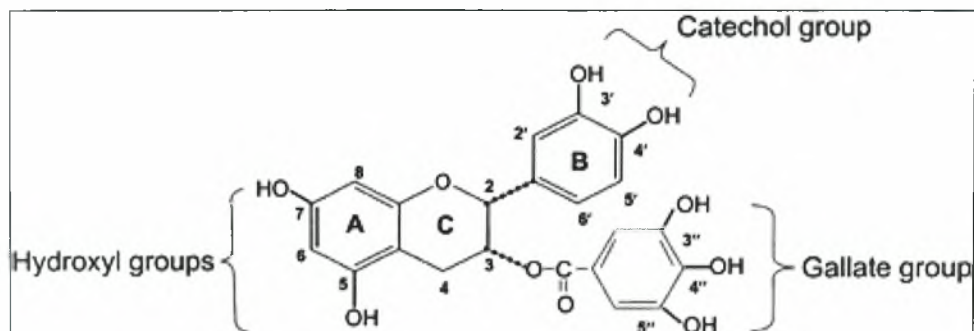


Όπου : RO^{\cdot} : η ελεύθερη ρίζα
 PPH : η πολυφαινόλη
 PP^{\cdot} : η φαινολική ρίζα

Η φαινολική ρίζα που παράγεται, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, διότι οι περισσότερες φαινολικές ρίζες είναι σταθερές και έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό και να οδηγήσει σε μία νέα σειρά αντιδράσεων. Η ρίζα αυτή μπορεί ακόμη να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα, η οποία οδήγησε στην παραγωγή της. Έτσι, δημιουργείται ένα μη δραστικό μόριο (Ferguson et al., 2001).

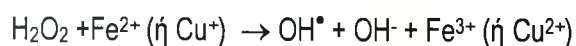


Από τη μεγάλη ομάδα των πολυφαινολών, οι φλαβόνες και οι κατεχίνες θεωρούνται από τα πιο δραστικά μόρια που προστατεύουν τον οργανισμό από την καταστροφική επίδραση των ελευθέρων ριζών. Η ικανότητά τους αυτή, οφείλεται στη χαρακτηριστική χημική δομή τους, δηλαδή στην παρουσία φαινολικών υδροξυλικών ομάδων στο Β δακτύλιο των κατεχινών EC και EGC, καθώς και στην παρουσία των Β- και Γ- δακτυλίων των γαλλοκατεχινών ECG και EGCG. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη μιας ορθο-3'4'-διυδροξυλικής (κατεχολο) ομάδας ή μιας 3'4'5'-τριυδροξυλικής (gallate) ομάδας στο Β δακτύλιο, η ύπαρξη μιας gallate ομάδας εστεροποιημένη στην 3 θέση του δακτυλίου Γ και η παρουσία υδροξυλικών ομάδων στις 5 και 7 θέσεις του δακτυλίου Α (Εικ. 24), (Frei and Higdon, 2003). Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται από την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη μετὰ-θέση του βενζοϊκού δακτυλίου. Το ίδιο συμβαίνει και στα υδροξυκινναμικά οξέα, στα οποία όσο μεγαλώνει ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων τόσο αυξάνει η ικανότητά τους να δεσμεύσουν ελεύθερες ρίζες. Τα υδροξυκινναμικά οξέα, είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά, διότι η ομάδα $-CH=CH-COOH$ που είναι συνδεδεμένη με τον αρωματικό δακτύλιο, συμβάλλει στην καλύτερη σταθεροποίηση της φαινολικής ρίζας που παράγεται μετά την δέσμευση μιας ελεύθερης ρίζας. Αντίθετα στα υδροξυβενζοϊκά οξέα, η καρβοξυλική ομάδα που βρίσκεται στον αρωματικό δακτύλιο, εμποδίζει την ικανότητα των υδροξυλίων που βρίσκονται στον βενζοϊκό δακτύλιο, να δώσουν το υδρογόνο τους, προκειμένου να αδρανοποιήσουν κάποια ρίζα (Εικ.8), (Rice-Evans et al., 1999).



Εικ. 24 Λειτουργικές χημικές ομάδες των κατεχινών, χρήσιμες στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Frei and Higdon, 2003).

Οι πολυφαινόλες είναι, επίσης, ικανές να δεσμεύουν χημικά μέταλλα, όπως σίδηρο και χαλκό, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική τους λειτουργία, με το να εμποδίζουν τη δημιουργία των ελευθέρων ριζών μέσω της αντίδρασης Fenton (Frei and Higdon, 2003).



Παράλληλα οι πολυφαινόλες, προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες, επάγοντας ορισμένα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), βοηθώντας έτσι στην απέκκριση διάφορων οξειδωμένων μορίων, ή επάγοντας ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως μεταλλοθειονίνες οι οποίες μπορούν με την σειρά τους να δεσμεύουν μέταλλα όπως χαλκός και σίδηρος, αναστέλλοντας την παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Ferguson 2001). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν ένζυμα, όπως η κυκλοοξυγενάση και η λιπooξυγενάση που έχουν οξειδωτικές δράσεις (Ferguson 2001, Rice-Evans et al. 1996).

Εκτός από τις μεταλλοθειονίνες, οι πολυφαινόλες επιδρούν και μεταβάλλουν τα επίπεδα και άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Μελέτες σε ποντίκια, που ήρθαν σε επαφή με UV-B ακτινοβολία, απέδειξαν ότι η κατανάλωση του πράσινου τσαγιού, μειώνει τα επίπεδα της

καταλάσης και της ρεδοουκτάσης της γλουταθειόνης. Παράλληλα σε ποντίκια, που είχαν προσβληθεί από τον ιό *M.tuberculosis*, η δραστηριότητα της SOD στα ερυθροκύτταρα μειώθηκε, ενώ της SOD στον ορό αυξήθηκε σε ποντίκια που είχαν εκτεθεί στο καρκινογόνο 3-methylcolanthrene. Μελέτη σε ποντίκια που είχαν υποστεί οξειδωτική βλάβη στους μυς τους, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPX (Frei and Higdon, 2003). Τέλος, αποδείχθηκε ότι μετά από ένα μήνα χορήγησης ενός αντιοξειδωτικού παρασκευάσματος πλούσιο σε κατεχίνες, αυξήθηκαν τα επίπεδα της SOD στο μιτοχονδριακό κλάσμα του εγκεφάλου των ποντικών, ενώ μειώθηκαν τα επίπεδα των TBARS στο φλοιό και την παρεγκεφαλίδα (Rice-Evans).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, θα μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του πράσινου τσαγιού σε ανθρώπινο ορό, μελετώντας τους δείκτες GSH και GSSG.

1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Πολλοί επιστήμονες και διάφοροι ερευνητικοί οργανισμοί επισημαίνουν, πως η άσκηση βελτιώνει την ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Η άσκηση μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της «καλής» χοληστερόλης, να μειώσει τα επίπεδα άγχους, να αυξήσει την ανθεκτικότητα των οστών, να οδηγήσει σε απώλεια βάρους με το συνδυασμό μίας σωστής διατροφής και να ενδυναμώσει τον τρόπο λειτουργίας της καρδιάς. Βάσει μιας μελέτης με Φινλανδούς αθλητές παγκοσμίου κλάσεως, φάνηκε ότι η τακτική φυσική δραστηριότητα, μπορεί να συμβάλλει ουσιαστικά στην επέκταση της πιθανής διάρκειας ζωής με το να προλαμβάνει πρόωρους θανάτους από καρδιαγγειακές αιτίες (Huonker et al.).

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει, ότι η άσκηση προάγει το οξειδωτικό στρες. Διαφορετικές μορφές άσκησης (αυξημένης έντασης, παρατεταμένης χρονικής διάρκειας, οξεία προπόνηση, έκκεντρη άσκηση), μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Παρατηρείται επομένως, η διπλή λειτουργία της άσκησης, δηλαδή η θετική επίδρασή της στον οργανισμό με τις ποικίλες ευργετικές συνέπειες, κατά τη φάση της ανάκαμψης, αλλά και η αρνητική επίδρασή της με την αύξηση του οξειδωτικού μεταβολισμού τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή που γίνεται.

Η άσκηση διακρίνεται, με βάση την ανεπάρκεια ή μη του οξυγόνου, σε αερόβια και αναερόβια. Η αερόβια άσκηση, οδηγεί σε χαμηλότερη καρδιακή συχνότητα, πνευμονικό αερισμό και συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, όταν η επιβάρυνση είναι η ίδια τόσο πριν όσο και μετά την εφαρμογή της. Η ενέργεια για την αερόβια άσκηση εξασφαλίζεται από το γλυκογόνο σε χρονική διάρκεια 5-30 λεπτών, ενώ στην περίπτωση άνω των 30 λεπτών, από το γλυκογόνο και τα λιπαρά οξέα, η συμμετοχή των οποίων εξαρτάται και από την ένταση της προσπάθειας. Συγχρόνως, η αερόβια υψηλής έντασης άσκηση ενεργοποιεί το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης, που αποτελεί μία από τις κυριότερες πηγές των ελευθέρων ριζών (Heunks et al., 1999). Στην αναερόβια άσκηση, προκαλείται συσσώρευση γαλακτικού οξέος που οδηγεί σε πτώση του pH. Αυτή η πτώση προκαλεί την απελευθέρωση του οξυγόνου από την αιμογλοβίνη αυξάνοντας τη μερική πίεση του οξυγόνου στους ιστούς και μειώνοντάς τη στις αρτηρίες. Έχει αποδειχθεί ότι η έκκεντρη άσκηση μπορεί να προκαλέσει μυϊκή καταστροφή, που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών, αύξηση της οξειδωσης των λιπιδίων και ενδεχομένως να προκαλέσει καταστροφή του DNA (Theodorou et al., 2007). Τέλος, η μικρής διάρκειας και μέτριας έντασης άσκηση, επάγει την υπεροξειδωση των λιπιδίων σε αρκετά είδη οργανισμών (Marlin et al, 2002).

Η τακτική άσκηση υιοθετεί στον οργανισμό μία προσαρμοστική συμπεριφορά ενεργοποιώντας ορισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η SOD, η GPX, η καταλάση (CAT) καθώς επίσης και αυξάνοντας τα επίπεδα διαφόρων δεικτών οξειδωτικού στρες όπως TBARS,

με σκοπό την εξάλειψη των ελευθέρων ριζών. Οι ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης οξειδωτικού στρες, όπου μετράται η συγκέντρωση ενός κυρίως προϊόντος λιπιδικής υπεροξειδωσης, της μαλονδυαλδεϋδης (MDA). Αρκετές μελέτες, σε ανθρώπους και ζώα, κατέδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ενζυμική δραστηριότητα των SOD και GPX, στο αίμα και στους ιστούς, αυξάνονταν μετά από αερόβια άσκηση. Αυτή η προσαρμοστική συμπεριφορά, επέρχεται αμέσως μετά την παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Finaud *et al.*, 2006). Παράλληλα, η αερόβια άσκηση προκαλεί αλλαγές και στα επίπεδα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, επιφέρει μείωση στα επίπεδα της GSH και μετατροπή της σε GSSG, μέσω του ενζύμου GPX, μειώνοντας τη δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών. Η GSSG αυξάνεται και ο λόγος GSH/GSSG μειώνεται (Heunks *et al.*, 1999). Κατά τη διάρκεια παρατεταμένης άσκησης, το ήπαρ αυξάνει τη σύνθεση της GSH, εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της γλυκόζης του πλάσματος και της βασσοπρεσίνης. Στο πλάσμα και στους μύς, η GSH μειώνεται. Ομοίως και στους σκελετικούς μύς, αφού η καρδιά χρησιμοποιεί την GSH για να αντισταθεί στις ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, η βιταμίνη C και το ουρικό οξύ αυξάνονται για να διατηρήσουν χαμηλά τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (Finaud *et al.*, 2006). Σχετικά με τη δραστηριότητα της CAT, υπάρχουν λίγες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν αύξησή της στους σκελετικούς μύς μετά την άσκηση (Ji, 1999).

Είναι σήμερα παραδεκτό, ότι η άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο όμως, αυτό δεν είναι απόλυτο, αφού αρκετοί είναι οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη, όπως η ηλικία των ασκούμενων, η διατροφή τους, το είδος της προπόνησης και η γενετική προδιάθεση, οι οποίοι επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της άσκησης. Έχει αποδειχθεί ότι άτομα με έλλειψη G6PD, μπορούν να συμμετέχουν σε προγράμματα αερόβιας άσκησης μέτριας έντασης και διάρκειας, χωρίς να κινδυνεύουν από τις βλαβερές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες (Jamourtas *et al.*, 2005).

Παρακάτω, αναλύονται οι μηχανισμοί, οι οποίοι οδηγούν στην αύξηση του οξειδωτικού στρες υπό την επίδραση της άσκησης.

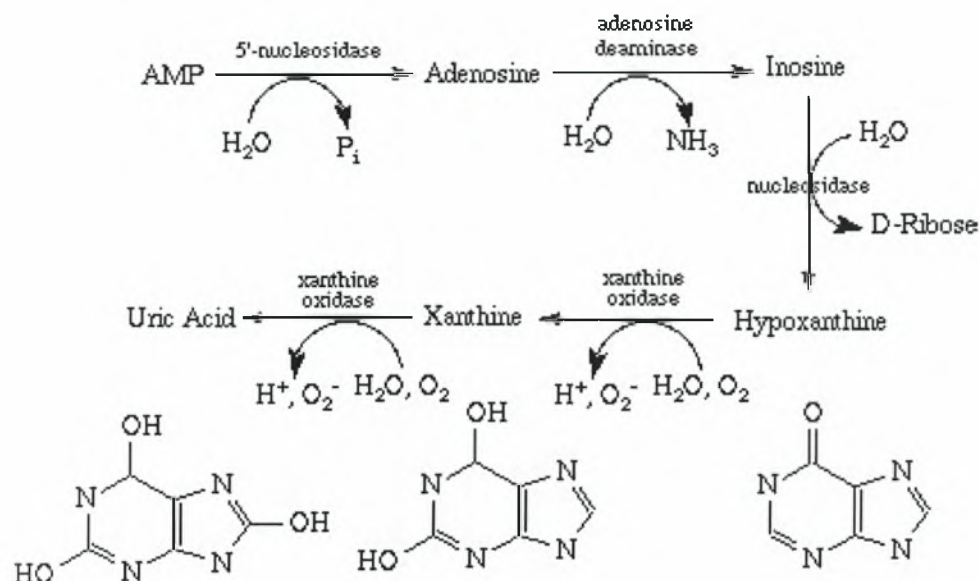
1.5.1 Μηχανισμοί αύξησης του οξειδωτικού στρες λόγω της άσκησης

Η άσκηση αυξάνει τα επίπεδα των ROS με συγκεκριμένο τρόπο, ο οποίος εξαρτάται και από τον τύπο της άσκησης. Οι σημαντικότερες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι οι ακόλουθες.

1. Η αερόβια αναπνοή. Κατά την αερόβια άσκηση αυξάνεται ο ρυθμός της αναπνοής και κατά συνέπεια η κατανάλωση του οξυγόνου. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και περιλαμβάνει μια ροή ηλεκτρονίων από τους μεταβολίτες του κύκλου του Krebs στο μοριακό οξυγόνο (Ji, 1999). Είναι δυνατό να υπάρξει διαρροή $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα «Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών». Προτάθηκε πως το σημείο διαρροής ήταν η ουβικινόνη (Leeuwenburgh *et al.*, 2001), της οποίας η αναγωγή προάγει το σχηματισμό της ενδιάμεσης ένωσης ουβισεμικινόνης, η οποία με τη σειρά της προσφέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο παράγοντας $O_2^{\bullet-}$.

2. Η ισχαιμία-επαναιμάτωση και το μονοπάτι της XO. Κατά τη διάρκεια υψηλής έντασης αναερόβιας άσκησης δημιουργούνται ισχαιμικά επεισόδια, που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της οξειδάσης της ξανθίνης (Møller *et al.*, 1996). Κατά την αναερόβια άσκηση η πρόσληψη του οξυγόνου είναι ανεπαρκής με αποτέλεσμα την διάσπαση του AMP σε ένα μόριο υποξανθίνης, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε ξανθίνη και ουρικό οξύ. (Το AMP έχει προέλθει από τη διάσπαση του ATP σε

ADP κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας). Την αντίδραση αυτή καταλύει το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, XO, και συνοδεύεται από την παραγωγή $O_2^{\bullet-}$, (Εικ. 25). Η υψηλής έντασης άσκηση οδηγεί σε συσσώρευση υποξανθίνης και ουρικού οξέος τόσο στους μυϊκούς ιστούς όσο και στο πλάσμα, αποδεικνύοντας ότι το μονοπάτι της XO (μια από τις κυριότερες πηγές ελευθέρων ριζών), ενεργοποιείται (Heunks et al., 1999).



Εικ. 25 Το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης (Crossnan and Moldave, *Methods in enzymology*, Vol XII, 1967).

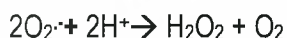
Το μονοπάτι της XO ενεργοποιείται μόνο κατά την αναερόβια άσκηση διότι κάτω από αερόβιες συνθήκες συμμετέχει η οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω της οποίας αναπληρώνεται το ATP και η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και ουρικό οξύ από τη δευδρογενάση της ξανθίνης. Μέσω αυτής της κατάλυσης δε γίνεται παραγωγή ελευθέρων ριζών (Vollaard et al., 2005).

3. Η φλεγμονώδης αντίδραση. Η φλεγμονώδης λευκοκυτταρική αντίδραση και η είσοδος των φαγοκυττάρων στο σκελετικό μυ προκαλούν αύξηση των δραστικών στοιχείων αμέσως μετά αλλά και ώρες μετά τη μυϊκή καταστροφή που προκλήθηκε από την άσκηση. Η έκκεντρη άσκηση μπορεί να προκαλέσει λευκοκυτταρική διήθηση και κατ'επέκταση σημαντική οξειδωτική καταστροφή. Τα ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται προκαλούν την παραγωγή αρκετών οξειδωτικών μέσων όπως $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 και HOCl με σκοπό να απομακρύνουν τον κατεστραμμένο μυϊκό ιστό και να γίνει η επιδιόρθωση στην κατεστραμμένη περιοχή του μυός. Τα δραστικά στοιχεία αν δράσουν ανεξέλεγκτα μπορούν να καταστρέψουν και υγιή μυϊκό ιστό. Η παραγωγή τους, που συνδέεται με την αντιμετώπιση της φλεγμονής φαίνεται να διαρκεί για 3 μέρες μετά από έκκεντρη άσκηση (Close et al., 2005).

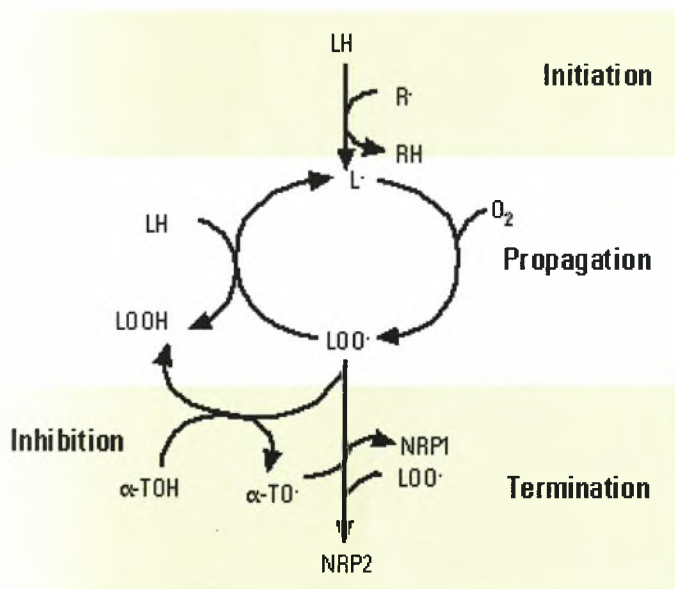
4. Οι κατεχολαμίνες. Όταν η άσκηση είναι παρατεταμένη εκκρίνονται από το μυελό των επινεφριδίων δύο ορμόνες η επινεφρίνη και η νορεπινεφρίνη. Αυτές οι ορμόνες αυξάνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων μέσω ενεργοποίησης των α-αδρενεργικών υποδοχέων τους.

Παράλληλα, η αυτοοξειδωση της επινεφρίνης σε αδενοχρώμιο οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\bullet-}$. Δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες όσον αφορά την επίδραση των κατεχολαμινών και τη συσχέτισή τους με την άσκηση (Ji, 1999).

5. Η μυοσφαιρίνη και η αιμοσφαιρίνη. Κατά τη διάρκεια έντονης αναερόβιας άσκησης προκαλείται συσσώρευση του γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα την τοπική πτώση του pH στους μυικούς ιστούς. Το γεγονός αυτό προάγει την απελευθέρωση του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη, αυξάνοντας τη μερική πίεσή του στους ιστούς και μειώνοντάς τη στις αρτηρίες, (Ji, 1999, Banerjee et al., 2003). Παράλληλα προάγεται η απελευθέρωση του σιδήρου από τη μυοσφαιρίνη και αιμοσφαιρίνη. Οι αντιδράσεις μέσω των οποίων αυτές οι δύο πρωτεΐνες επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι (Cooper et al., 2002):



6. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων. Κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενης ισομετρικής άσκησης προκαλείται αύξηση της συγκέντρωσης των υπεροξειδωμένων λιπιδίων (Urso et al., 2003). Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία υφίστανται οξείδωση, παράγοντας μία λιπιδική ρίζα (L^{\bullet}), η οποία αντιδρά με οξυγόνο και σχηματίζει μία λιπιδική περοξειδική ρίζα (LOO^{\bullet}), (Mylonas and Kouretas, 1999). Τα μόρια αυτά είναι οι μεταφορείς μιας αλυσίδας αντιδράσεων που οξειδώνουν παραπέρα και άλλα PUFAs, παράγοντας και άλλα είδη ριζών. Η σειρά των αντιδράσεων φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικ. 26 Διαγραμματική απεικόνιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Από την βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται ότι δεν υπάρχει καμία σχετική έρευνα που να έχει μελετήσει την επίδραση του πράσινου τσαγιού στο οξειδωτικό στρες, σε ανθρώπους που έχουν υποβληθεί σε αερόβια άσκηση. Σκοπός, λοιπόν, της διπλωματικής εργασίας είναι να καταλήξει σε επιφανή συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση του πράσινου τσαγιού αλλά και της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Στη μελέτη αυτή, συμμετείχαν άτομα τα οποία υποβλήθηκαν σε αερόβια άσκηση και μετρήθηκαν τα επίπεδα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών GSH, GSSG καθώς επίσης και ο λόγος GSH/GSSG, τόσο πριν όσο και μετά από αυτή. Παράλληλα, στα ίδια άτομα χορηγήθηκε πράσινο τσάι και μετρήθηκαν οι ίδιοι δείκτες, τόσο πριν όσο και μετά την κατανάλωσή του.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, έγιναν σε φωτόμετρο Hitachi U-1500. Τα υλικά TBA, DTNB, DPPH, NADPH, ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης και οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης προμηθεύτηκαν από την εταιρεία SIGMA. Από την εταιρεία MERCK προμηθεύτηκαν τα NaH_2PO_4 , NaHPO_4 και Tris (hydroxymethyl) aminomethane. Τέλος, τα TCA και Na_2SO_4 αγοράστηκαν από τις εταιρείες Pancreas και Fluca αντίστοιχα.

3.2. Συμμετέχοντες

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 18 άνδρες που χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες (placebo και πράσινο τσάι) ηλικίας 20-35 ετών. Τα άτομα της ομάδας «πράσινο τσάι» λάμβαναν καθημερινά 300 mg εκχύλισμα πράσινου τσαγιού για 3 μήνες.

3.3 Αιμοληψία

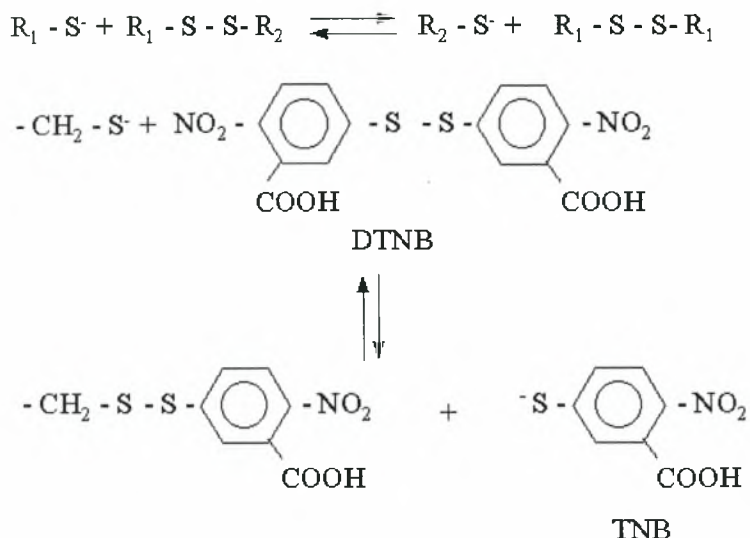
Η δοκιμασία περιελάμβανε τρέξιμο στο δαπεδοεργόμετρο στο 75 % της VO_2max για 45 λεπτά και ικατόπιν στο 90% μέχρι εξάντλησης.

3.4 Μέθοδοι ανάλυσης

Ανηγμένη Γλουταθειόνη(GSH)

Αρχή της μεθόδου: Σε 20 μL από το υπερκείμενο που προέκυψε κατόπιν φυγοκέντρησης του αιμολύματος προστέθηκαν 660 μL 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου και καλίου, pH 7,95 και 330 μL διαλύματος DTNB (39,6 mg DTNB σε 100ml 1% κιτρικού νατρίου). Κατόπιν ανάδευσης τα διαλύματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός για 45 min. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 412 nm. Στο τυφλό προστέθηκαν 20 μL dH_2O αντί για υπερκείμενο. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε εις τριπλούν για κάθε δείγμα.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων βασίζεται στο άρθρο των *Khyrian et al.* (2003) σύμφωνα με το οποίο η αντίδραση GSH – DTNB δίνει έγχρωμο προϊόν με συντελεστή απορρόφησης $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (στοιχειομετρική αντίδραση).



Εικ. 27: Αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.

Υπολογισμοί:

$$\Rightarrow \text{Ποσότητα GSH} = (Ab_{S_{\text{sample}}} - \Delta A_{\text{blank}} / 13.6) \times 131.3 \text{ mmoles/ml}$$

*όπου 131.3 είναι ο παράγοντας διαλυτότητας (DF).

Οξειδωμένη Γλουταθειόνη(GSSG)

Αρχή της μεθόδου: Σε 260 μL υπερκείμενου από αιμόλυμα κατόπιν φυγοκέντρησης προστέθηκαν 20–30 μL 1M NaOH μέχρι το pH να φτάσει στο 7,0–7,5. Έπειτα σε κάθε erpendorf προστέθηκαν 4 μL 2-νυπιλριγιδίνη μονομερ και έγινε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Με αυτό τον τρόπο η GSH δεσμεύτηκε από το 2-νυπιλριγιδίνη, με αποτέλεσμα στο τέλος να γίνει ο προσδιορισμός μόνο της GSSG. Στη συνέχεια, σε 5 μL δείγματος προστέθηκαν 3 mM NADPH (100 μL), 10 mM DTNB (100 μL), stock buffer (143 mM Na -P, 6,3 mM Na₂-EDTA) pH=7, 5 (600 μL), H₂O (194 μL). Έπειτα ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10. Τέλος, μετρήθηκε φωτομετρικά στα 412nm η συγκέντρωση της GSSG, με ταυτόχρονη προσθήκη 1 μL ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης.

Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν για το κάθε δείγμα. Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *Tietze et al. (2004)* και βασίζεται στην μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GSSGR), η οποία χρησιμοποιεί το NADPH σαν αναγωγική δύναμη. Η ανηγμένη γλουταθειόνη που παράγεται αντιδρά στη συνέχεια με το DTNB και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του έγχρωμου προϊόντος (κίτρινο) της αντίδρασης με φωτομέτρηση.

Υπολογισμοί:

$$\Rightarrow \text{Ποσότητα GSSG} = [(Ab_{S_{\text{sample}}} - \Delta A_{\text{blank}}) \times 0,75] / [\Delta A_{\text{standatd}} - \Delta A_{\text{blank}}] \times 520$$

mmoles/ml

*όπου 520 είναι ο παράγοντας διαλυτότητας (DF).

	Τυφλό	Πρότυπο (0.75 nmol/mL)	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα*	600 μ L	600 μ L	600 μ L
NADPH	100 μ L	100 μ L	100 μ L
DTNB	100 μ L	100 μ L	100 μ L
dH ₂ O	199 μ L	124 μ L	194 μ L
GSSG	—	75 μ L	—
Αιμόλυμα	—	—	5 μ L

*Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της GSSG προκύπτει με τον εξής τρόπο: αρχικά παρασκευάστηκε ένα πυκνό διάλυμα GSSG (0,0061 gr GSSG/10 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na₂EDTA, pH 7,5), το οποίο στη συνέχεια αραιώθηκε 1:100 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na₂EDTA, pH 7,5) ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 10 nmoles/ml.

3.5 Στατιστική ανάλυση

Για την εκτίμηση των διαφορών στους δύο δείκτες οξειδωτικού στρες μεταξύ των μετρήσεων πριν και μετά την άσκηση, καθώς επίσης, πριν και μετά τη λήψη πράσινου τσαγιού, χρησιμοποιήθηκε το τεστ paired Student's *t* test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε στο 0.05.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 Αποτελέσματα GSH στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.

Placebo	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	0.53 ± 0.12
Αμέσως μετά την άσκηση	0.49 ± 0.18
Ηρεμία	0.49 ± 0.14
Αμέσως μετά την άσκηση	0.40 ± 0.16

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 Αποτελέσματα GSH μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.

Green Tea	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	0.40 ± 0.18
Αμέσως μετά την άσκηση	0.32 ± 0.21
Ηρεμία	0.55 ± 0.27
Αμέσως μετά την άσκηση	0.44 ± 0.17

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η άσκηση έχει σημαντική επίδραση στη GSH και συγκεκριμένα τη μειώνει. Αυτό σημαίνει ότι παρουσιάστηκε οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση, που οδήγησε σε μείωση της GSH, ώστε να εξαλειφθούν οι ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα το πράσινο τσάι δεν παρουσίασε καμία επίδραση στη GSH, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το πράσινο τσάι δεν επηρεάζει το οξειδωτικό στρες.

4.2 Οξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 Αποτελέσματα GSSG στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.

Placebo	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	0.037 ± 0.014
Αμέσως μετά την άσκηση	0.049 ± 0.019
Ηρεμία	0.040 ± 0.022
Αμέσως μετά την άσκηση	0.059 ± 0.032

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 Αποτελέσματα GSSG μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.

Green Tea	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	0.035 ± 0.013
Αμέσως μετά την άσκηση	0.043 ± 0.015
Ηρεμία	0.043 ± 0.021
Αμέσως μετά την άσκηση	0.045 ± 0.014

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, η διαφορά είναι περισσότερο στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τη GSH. Παρατηρείται, επίδραση της άσκησης στη GSSG και συγκεκριμένα αυξησή της. Αντίθετα, η επίδραση του πράσινου τσαγιού και με αυτή τη μέθοδο ήταν μηδαμινή.

4.3 Αναλογία GSH:GSSG

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 Αποτελέσματα GSH:GSSG στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.

Placebo	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	17,6 ± 9,9
Αμέσως μετά την άσκηση	11,4 ± 6,2
Ηρεμία	16,3 ± 10,2
Αμέσως μετά την άσκηση	9,0 ± 7,5

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 Αποτελέσματα GSH:GSSG μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού στην ηρεμία και αμέσως μετά την άσκηση.

Green Tea	
Δείγμα	M.O ± SD
Ηρεμία	13,5 ± 8,4
Αμέσως μετά την άσκηση	8,2 ± 6,4
Ηρεμία	15,8 ± 9,5
Αμέσως μετά την άσκηση	10,7 ± 5,3

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα υπάρχει σημαντική μείωση της αναλογίας GSH:GSSG μετά την άσκηση. Αντίθετα, τόσο στα άτομα της ομάδας placebo όσο και στα άτομα της ομάδας που κατανάλωσαν πράσινο τσάι δεν εμφανίστηκαν διαφορές ούτε στη ηρεμία ούτε μετά την άσκηση.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που μελετά ταυτόχρονα την επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό στρες και την επίδραση του πράσινου τσαγιού σ' αυτό. Έγινε μια προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού των αντιοξειδωτικών του πράσινου τσαγιού και κατά πόσο αυτά επηρεάζουν το οξειδωτικό στρες. Η μελέτη έγινε σε ανθρώπινο ορό. Η βιβλιογραφία αναφέρει πειράματα που έγιναν μόνο 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 στρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πολλές είναι οι μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπινο ορό και αποδεικνύουν ότι η άσκηση επιφέρει σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών που χρησιμοποιούνται.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες GSH, GSSG καθώς επίσης και ο λόγος GSH / GSSG. Έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες, οι οποίες αποδεικνύουν τη μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα του συστήματος της γλουταθειόνης. Η GSH, είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο απαντάται σε πολλούς ανώτερους οργανισμούς. Εμπλέκεται σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών μηχανισμών, όπως είναι η διατήρηση των σουλφυδρικών ομάδων (-SH) της πρωτεΐνης θειόλης στην ανηγμένη τους μορφή, η απομάκρυνση του H₂O₂ καθώς και η αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών ουσιών. Η GSH μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG), μέσω του ενζύμου GPX, και η GSSG στη συνέχεια ανάγεται πάλι σε GSH, με τη βοήθεια του ενζύμου GSSGR, μετατρέποντας το NADPH σε NADP⁺. Αυτά τα δύο εξαρτώμενα από τη γλουταθειόνη ένζυμα διατηρούν την αναλογία GSH / GSSG μέσα στο κύτταρο. Αν αυτή η αναλογία διαταραχθεί δημιουργείται οξειδωτικό στρες (Erden- Inal et al., 2000).

Το οξειδωτικό στρες, έχει γίνει αντικείμενο πολλών μελετών, διότι οι περισσότερες ασθένειες που πλήττουν τον ανθρώπινο οργανισμό σήμερα, είναι αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες. Μια εξισορρόπηση μεταξύ των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και των ελευθέρων ριζών μπορεί να προστατεύσει από τη δυσμενή επίδραση του οξειδωτικού στρες.

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 των δεικτών GSH, GSSG καθώς και στο λόγο GSH / GSSG. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, που να αποδεικνύουν ότι το πράσινο τσάι είχε κάποια επίδραση.

Αρκετές μελέτες σε ζωικά μοντέλα, αποδεικνύουν τις ευεργετικές επιδράσεις του πράσινου τσαγιού σε πολλές νόσους που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως, το Parkinson, το Alzheimer, η γήρανση και οι καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες. Ο κύριος ρόλος των πολυφαινολών είναι να προστατεύουν τα κύτταρα μέσω της ρύθμισης διαφόρων μονοπατιών όπως σηματοδοτικά μονοπάτια και αντι-αποπτωτικές διαδικασίες. Το πράσινο τσάι και οι περιεχόμενες κατεχίνες, έχουν αντιαλλεργική, αντιμεταλλαξογόνο, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση. Έχει αποδειχθεί ότι η EGCG, το κύριο πολυφαινολικό συστατικό του πράσινου τσαγιού, είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες από τις παραπάνω λειτουργίες. Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, καταδεικνύουν ότι οι κατεχίνες, είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά που αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και του αζώτου. 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. 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.

Μελέτες που έγιναν σε ποντικούς, χρησιμοποιώντας για την πειραματική ανάλυση τους δείκτες GSH και SOD, έδειξαν ότι το πράσινο τσάι μειώνει τα επίπεδα της GSH στις περισσότερες από αυτές και αυξάνει τα επίπεδα της SOD (Frei and Higdon, 2003). Αποδεικνύεται με αυτό τον τρόπο η αντιοξειδωτική ικανότητα του πράσινου τσαγιού και η επίδρασή του στο οξειδωτικό στρες. Σκοπός της μελέτης μας ήταν να αποδείξουμε τις επιδράσεις του πράσινου τσαγιού και στον ανθρώπινο ορό, κάτι που όμως δε συνέβη, διότι τα επίπεδα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήσαμε, παρέμειναν αναλλοίωτα.

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

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν, κατά τη διάρκεια έντονης αερόβιας άσκησης. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος ήταν να αυξηθούν τα επίπεδα της GSSG, όπως φάνηκε από τη στατιστική ανάλυση. Παράλληλα, μειώθηκε ο λόγος GSH / GSSG. Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν, ότι λειτούργησε το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταθειόνης, με σκοπό να αντιμετωπίσει ο οργανισμός το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα και με άλλες μελέτες, η έντονη αερόβια άσκηση οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες, ενώ ταυτόχρονα οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί επιδρούν 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. Οι Davis *et.al* έδειξαν ότι η άσκηση μέχρι εξάντλησης προκαλεί δύο-τρεις φορές αύξηση στη συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών στους μύες και το ήπαρ που συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των TBARS. Επιπλέον, οι Marzatico *et.al* βρήκαν αύξηση των επιπέδων TBARS του πλάσματος σε δρομείς και μαραθωνοδρόμους μετά από έντονη άσκηση και έδειξαν ότι όσο πιο έντονη είναι η άσκηση τόσο πιο μεγάλη είναι η αύξηση της προκαλούμενης από την άσκηση υπεροξειδωση των λιπιδίων. Ομοίως, οι Bloomer *et.al.* έδειξαν ότι τόσο η αναερόβια όσο και η αερόβια άσκηση προκάλεσαν αύξηση των επιπέδων της MDA, του κύριου ενδιάμεσου προϊόντος της αντίδρασης με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Παράλληλα, άλλες μελέτες απέδειξαν μείωση στα επίπεδα GSH και αύξηση των επιπέδων GSSG, σε άτομα που είχαν υποβληθεί σε έντομη αερόβια άσκηση (Ji 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. 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.*, 2003).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται φανερό ότι η άσκηση οδηγεί στην παραγωγή του οξειδωτικού στρες, τη στιγμή που εκτελείται. Αμέσως μετά την παραγωγή των ελευθέρων ριζών η άσκηση προάγει την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα να εξαλείφεται και η παραμικρή πιθανότητα βλάβης του οργανισμού από αυτές. Η διαδικασία αυτή γίνεται στη λεγόμενη φάση της ανάκαμψης, που αρχίζει λίγα λεπτά μετά το τέλος της άσκησης. Έτσι λοιπόν, όσον αφορά την άσκηση τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τις άλλες μελέτες. Αντίθετα όσον αφορά το πράσινο τσάι, δεν μπορεί να γίνει σύγκριση διότι δεν υπάρχουν άλλες έρευνες που να μελετούν την επίδραση του πράσινου τσαγιού στο οξειδωτικό στρες, αναλύοντας ανθρώπινο ορό, μέχρι σήμερα.

Τα συμπεράσματά μας για το πράσινο τσάι, μπορούν να διεξαχθούν από τη βιβλιογραφία, διότι δεν καταργείται το γεγονός ότι το πράσινο τσάι έχει πολλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, επειδή η μελέτη μας δεν κατέληξε σε επιφανή αποτελέσματα ως προς την επίδρασή του στο οξειδωτικό στρες. Το κυριότερο είναι ότι το πράσινο τσάι περιέχει ουσίες οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών, και συνίσταται ανεπιφύλακτα η κατανάλωσή του από όλους.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Brown M.D. (1999). Green tea (*Camellia Sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer, 4:360-370.
- Chung F.L., Schwartz J., Herzog C.R., Yang Y.M. (2003). Tea and cancer prevention: Studies in animals and humans, 133:3268-3274.
- Clarkson P. M. and Thompson S. (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health ? 72:637-643.
- Cooper C.E., Vollaard N.B.J., Choueiri T., Wilson M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Society Transactions*, 30:280-285.
- Davies K.J., Quintanilha A.T., Brooks G.A., Packer L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107:1198-205.
- Erden-Inal M., Sunal E., Kanbak G. (2002). Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell biochem Funct.*, 20:61-66.
- Ferguson Lynnette R., (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111.
- Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006) Oxidative stress: relationship with exercise and training. 36:327-358.
- Frei B. and Higdon J. V. (2003) Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from animal studies, 133:3275-3284.
- Fujiki H. (2005). Green tea: health benefits as cancer preventive for humans, 5:119-132.
- Graham H.N. (1992). Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry, *Preventive medicine* 21:334-350.
- Halliwell B. and Gutteridge J. M.C. (1998). Free radicals in biology and chemistry, Oxford Science Publications.
- Halliwell B. (2001). Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science* Van de Wiel A., van Golde P.H.M., Hart H.Ch. (2001), Blessings of the grape, *European Journal of Internal Medicine*, 12:484-48.
- Heunks L.M.A., Vina J., Van Herwaarden C., Folgering H., Gimeno A., Dekhuizen R. (1999). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease, 363:1697-1703.
- Han C. (1997). Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols, *Cancer letters* 114:153-158.
- Θεοδώρου Α., Σακελλαρίου Γ., Νικολαΐδης Μ., Πασχάλης Β., Φατούρος Α., Τζιαμούρτας Ζ.. (2007). Η επίδραση της ασκησιογενούς μυϊκής καταστροφής σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα και στο μυ, 5:294-301.
- Jeon S.Y., Bae K., Seong Y.H., Song K.S. (2003). Green tea catechins as a BACE 1 (beta-Secretase) inhibitor, 13:3905-3908.
- Ji Li Li (1999) Antioxidants and oxidative stress in exercise. *P.S.E.B.M.*, 222:283-292.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004). Polyphenol: Food Sources and bioavailability, 79:727-47.
- Johnson P. (2002). Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension, 133:493-505.
- Jung D., Ellis L. (2001). Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, 82:309-316.
- Junqueira V.B., Barros S.B., Chan S.S., Rodrigues L., Giavarotti L., Abud R.L., Deucher G.P. (2004). Aging and oxidative stress, 25:5-16.
- Καρατάγλης Σ., Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text 1994.
- Kao Y.H., Hiipakka R.A., Liao S. (2000). Modulation of obesity by a green tea catechin, *American Journal of clinical Nutrition* 72:1232-1234.

- Katiyar S., Elmets C., Katiyar S.K. (2006). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair, 18:287-296.
- Kawai K., Tsuno N.H., Kitayama J., Okaji Y., Yazawa K., Asakage M., Hori N., Watanabe T., Takahashi K., Nagawa H. (2003). Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112:951-957.
- Lambert J.D and Yang C.S. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents, *Journal of Nutrition* 133:3262-3267.
- Leewenburgh C., Heinecke J.W.(2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medical chemistry*, 8:829-838.
- Levites Y., Amit T., Mandel S., Youdim M.B. (2003). Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)- epigallocatechin- 3- gallate, 17:952-954.
- Lin J., Shiau S. (2006). Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols, 50:211-217.
- Mandel S. and Youdim B.H (2004). Catechin polyphenols:Neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases, 37:304-317.
- Miura Y., Chiba T., Miura S., Tomita I.I., Umegaki K., Ikeda M., Tomita T. (2000). Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification og low density lipoproteins: an ex vivo study in humans, 11:216-222.
- Morley N., Clifford., Salter L., Campbell S., Gould D., Curnow A. (2005). The green tea polyphenol (-)- epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage, 21:15-22.
- Møller Peter, Wallin Hakan, Knudsen Lisbeth. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*, 102:17-36.
- Murase T., Haramizu S., Shimotoyodome A., Nagasawa A., Tokimitsu I. (2004). Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice, 288:708-715.
- Mylonas C. and Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo*, 13:295-310.
- Olanow C.W., Tatton W.G. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease, 22:123-144.
- Palazzetti S., Richard M.J., Favier A., Margaritis I. (2003). Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can. J. Appl. Physiol.*, 28(4):588-604.
- Pan T., Jankovic J., Le W. (2003). Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease, 20:711-721.
- Polidori M.C. (2003). Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases, *Journal of Pstgraduate Medicine* 49:229-235.
- Ramassamy C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of Neurodegenerative diseases, 545:51-64.
- Rice- Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant- derived polyphenolic flavonoids, 22:375-383.
- Rise-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 933-956.
- Soieas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M. (1997), *Journal of Clinical Laboratory Analysis*,11:287-313.

- Stapleton P.D., Shah S., Anderson J.C., Hara Y., Hamilton- Miller J.M., Taylor P.W. (2004). Modulation of beta- lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates, 23:462-467.
- Tietze F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analyt. Biochem.*, 27:502-522.
- Tsuneki H., Ishizuka M., Terasawa M., Wu J.B., Sasaoka T., Kimura I. (2004). Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic mice and on glucose metabolism in healthy humans, *BMC pharmacology*, 4:1-18.
- Τσέκος Ι.Β., Φυσιολογία φυτών (2004), Εκδόσεις Κυριακίδη.
- Unno K., Takabayashi F., Kishido T., oku N. (2004). Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence, *Experimental Gerontology* 39:1027-1034.
- Urso M.L., Clarkson P.M. (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189:41-54.
- Vollaard N., Shearman J., Cooper C. (2005). Exercise-Induced Oxidative Stress: myths, Realities and Physiological Relevance, 35:1045-1062.
- Wang Z.Y., Cheng S.J., Zhou Z.C., Athar M., Khan W.A., Bickers D.R., Mukhtar H. (1989). Antimutagenic activity of green tea polyphenols, *Mutation Research*, 223:273-285.
- Yang F., de Villiers W., McClain C., Varilek G.W. (1998). Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model, 128:2334-2340.
- Yusuf N., Irby C., Katiyar S., Elmets C. (2007). Photoprotective effects of green tea polyphenols, 23:48-56.
- Yang C.S. (1999). Tea and health, *Nutrition* 15:946-949.
- Zaveri N.T. (2005). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications, 78:2073-2080.

