

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

Κερασιώτη Ευθαλία

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ
ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ**



Λάρισα 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8122/1

Ημερ. Εισ.: 13-04-2010

Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: Δ

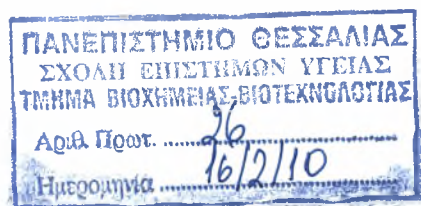
547.6

ΚΕΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087112



**Επίδραση πολυφαινολικών ενώσεων στη δραστηριότητα της οξειδάσης της
ξανθίνης**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κουρέτας Δημήτρης, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας-
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτρη (Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κοντού Μαρία (Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους υποψήφιους διδάκτορες Χρύσα Σπανού και Βεσκούκη Άρη βοήθειά τους τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | σελ. |
|--|------|
| Περίληψη | 9 |
| Abstract | 10 |
| | |
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 11 |
| 1.1.Πολυφαινόλες..... | 11 |
| 1.2.Τύποι και κατανομή πολυφαινολών στα τρόφιμα..... | 11 |
| 1.2.1.Φαινολικά οξέα..... | 12 |
| 1.2.2.Φλαβονοειδή..... | 13 |
| 1.2.3.Λιγνάνια..... | 15 |
| 1.2.4.Στιλβένια..... | 16 |
| 1.3.Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα τρόφιμα..... | 16 |
| 1.4.Ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών..... | 17 |
| 1.5.Ελεύθερες ρίζες..... | 18 |
| 1.6.Πηγές παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου..... | 19 |
| 1.6.1.Ενδογενείς πηγές..... | 19 |
| 1.6.1.α.Οξειδωτική φωσφορυλίωση..... | 19 |
| 1.6.1.β.Ουδετερόφιλα και αναπνευστική <<έκρηξη>>..... | 20 |
| 1.6.1.γ.Οξειδάση της ξανθίνης..... | 21 |
| 1.6.1.δ.Κυτόχρωμα P ₄₅₀ | 21 |
| 1.6.1.ε.Αυτοοξείδωση μορίων..... | 22 |
| 1.6.2.Εξωγενείς πηγές..... | 22 |
| 1.7.Βιολογικές επιδράσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου..... | 22 |
| 1.7.1.Θετικές επιδράσεις..... | 22 |
| 1.7.2.Αρνητικές επιδράσεις..... | 23 |
| 1.8.Οξειδωτικό στρες..... | 24 |
| 1.9.Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί..... | 25 |
| 1.9.1.Ενζυμικοί μηχανισμοί..... | 25 |
| 1.9.1.α.Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)..... | 25 |
| 1.9.1.β.Καταλάση (CAT)..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 1.9.1.γ.Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης..... | 26 |
| 1.9.1.δ.Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)..... | 26 |
| 1.9.2.Μη ενζυμικοί μηχανισμοί..... | 27 |
| 1.9.2.α.Πολυφαινόλες..... | 27 |
| 1.9.2.β.Βιταμίνη Ε..... | 27 |
| 1.9.2.γ.Βιταμίνη C..... | 27 |
| 1.9.2.δ.Β-καροτένιο..... | 28 |
| 1.9.2.ε.Γλουταθειόνη..... | 28 |
| 1.9.2.στ.Συνένζυμο Q-10..... | 28 |
| 1.9.2.θ.Σελήνιο..... | 28 |
| 1.10.Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών..... | 29 |
| 1.10.1.Πρόληψη ασθενειών..... | 29 |
| 1.11.Οξειδάση της ξανθίνης..... | 30 |
| 1.11.1.Πρωτεϊνική δομή..... | 30 |
| 1.11.2.Καταλυτική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης..... | 31 |
| 1.11.3.Ουρικό οξύ..... | 31 |
| 1.11.4.Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες..... | 32 |
| 1.11.5.Μέθοδοι προσδιορισμού της οξειδάσης της ξανθίνης..... | 33 |
| 1.12.Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης..... | 34 |
| 1.12.1.Αλλοπουρινόλη..... | 36 |
| 1.12.2.Πολυφαινόλες ως αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης..... | 37 |
| 1.13.Βασικές αρχές ενζυμικής κινητικής..... | 38 |
| 1.13.1.Ενζυμικοί αναστολείς..... | 39 |
| 1.13.1.α.Συναγωνιστική αναστολή..... | 40 |
| 1.13.1.β.Μη-συναγωνιστική αναστολή..... | 40 |
| 1.13.1.γ.Μικτή αναστολή..... | 40 |
| 1.13.1.δ.Ανταγωνιστική αναστολή..... | 41 |
| 1.13.2.Γραφική αναπαράσταση του είδους της αναστολής..... | 41 |
| 2.ΣΚΟΠΟΣ..... | 43 |
| 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 44 |
| 3.1.Υλικά..... | 44 |
| 3.1.1.Χημικά αντιδραστήρια..... | 44 |
| 3.1.2.Καθαρές πολυφαινόλες και κλάσματα που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού <i>Vicia faba</i> | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.Μέθοδοι..... | 45 |
| 3.2.1.Αρχή της μεθόδου..... | 45 |
| 3.2.1.α.Κινητική μελέτη στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης με την ξανθίνη ως υπόστρωμα..... | 46 |
| 3.2.2.Επίδραση καθαρών πολυφαινολών και καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από ψυχανθή στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης..... | 49 |
| 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 51 |
| 4.1.Ανασταλτική δράση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται σε διάφορα τρόφιμα..... | 51 |
| 4.2.Ανασταλτική δράση καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από ψυχανθή..... | 54 |
| 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 57 |
| 6.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 60 |
| 7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 63 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1:** Χημικές δομές πολυφαινολών
- Εικόνα 2:** Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων
- Εικόνα 3:** Χημική δομή φλαβονοειδών
- Εικόνα 4:** Χημική δομή λιγνανίων
- Εικόνα 5:** Χημική δομή της ρεσβερατρόλης
- Εικόνα 6:** Ελεύθερη ρίζα
- Εικόνα 7:** Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών
- Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες
- Εικόνα 9:** Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικό
- Εικόνα 10:** Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης
- Εικόνα 11:** Δομή οξειδάσης της ξανθίνης
- Εικόνα 12:** Μία από τις δύο υπομονάδες της οξειδάσης της ξανθίνης
- Εικόνα 13:** Αντιδράσεις που καταλύει η οξειδάση της ξανθίνης
- Εικόνα 14:** Μονοπάτι σχηματισμού ουρικού οξέος
- Εικόνα 15:** Μονοπάτι δράσης της αλλοπουρινόλης
- Εικόνα 16:** Συναγωνιστικός αναστολέας

Εικόνα 17: Μη συναγωνιστικός αναστολέας

Εικόνα 18: Ανταγωνιστικός αναστολέας

Εικόνα 19: Επίδραση των τεσσάρων ειδών αναστολέων σε τρεις μορφές γραφικής παράστασης των επιπτώσεων της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. K_m και V_{max} είναι οι τιμές των σταθερών Michaelis και της μέγιστης ταχύτητας αντίστοιχα και K_p και V_p οι ίδιες σταθερές παρουσία του αναστολέα. Slope= κλίση. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση μετακίνησης της καμπύλης παρουσία του αναστολέα. Από πάνω προς τα κάτω. Πρώτη σειρά- Γραφική αναπαράσταση της κλασικής εξίσωσης Michaelis-Menten. Δεύτερη σειρά- Γραφική αναπαράσταση κατά Lineweaver-Burk. Τρίτη σειρά- Γραφική αναπαράσταση κατά Woolf-Augustinson-Hofstee.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών

Πίνακας 2: Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

Πίνακας 3: Τρόπος μεταβολής της K_M και V_{max} ανάλογα με το είδος της αναστολής

Πίνακας 4: Δομές καθαρών πολυφαινολών

Πίνακας 5: Δομές πολυφαινολικών ενώσεων που απομονώθηκαν από ψυχανθή

Πίνακας 6: Ποσότητες που προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης

Πίνακας 7: Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Πίνακας 8: Ποσότητες που προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης

Πίνακας 9: Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

Πίνακας 10: Εκχυλίσματα ψυχανθών

Πίνακας 11: Δομές κερκετίνης και καιμφερόλης

Πίνακας 12: Ονοματολογία καθαρών ενώσεων που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Γραφική αναπαράσταση της ταχύτητας V μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$.

Γράφημα 2: Γραφική αναπαράσταση της εξίσωσης του διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk)

Γράφημα 3: Πρώτο γράφημα - Γραφική αναπαράσταση της κλασικής εξίσωσης Michaelis-Menten. Δεύτερο γράφημα - Γραφική αναπαράσταση κατά Lineweaver-Burk.

Γράφημα 4: Σύγκριση της ισχύος της ανασταλτικής δράσης των καθαρών πολυφαινολών σε σχέση με το IC_{50}

Γράφημα 5: Καφεϊκό οξύ

Γράφημα 6: Γαλλικό οξύ

Γράφημα 7: Ελλαγικό οξύ

Γράφημα 8: Φερουλικό οξύ

Γράφημα 9: Κουμαρικό οξύ

Γράφημα 10: Σύγκριση της ισχύος της ανασταλτικής δράσης των καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από ψυχανθή σε σχέση με την τιμή IC_{50}

Γράφημα 11: Ένωση 2

Γράφημα 12: Ένωση 4

Γράφημα 13: Ένωση 5

Γράφημα 14: Ένωση 9

Γράφημα 15: Ένωση 10

Γράφημα 16: Ένωση 3

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από ένα μεγάλο αριθμό ερευνών έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις, ως βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων, παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, χημειοπροστατευτικές αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν επίδραση στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Η δραστικότητα του ενζύμου είναι πολύ υψηλή κατά την άσκηση ενώ η αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεσή του στα οστά οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ουρική αρθρίτιδα. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια αναζήτησης φυσικών αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης. Μελετήθηκαν 5 καθαρές πολυφαινόλες (καφεϊκό, ελλαγικό, φερουλικό, κουμαρικό και γαλλικό οξύ) που εντοπίζονται σε διάφορα τρόφιμα και 6 καθαρά πολυφαινολικά μόρια που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα μόρια είχαν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το καφεϊκό, το ελλαγικό, το φερουλικό και το κουμαρικό οξύ είναι μη συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου ενώ το γαλλικό οξύ είναι συναγωνιστικός αναστολέας. Ακόμη, βρέθηκε ότι όλα τα καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών είναι μη συναγωνιστικοί αναστολείς. Ωστόσο, τα μόρια παρουσιάζουν ανασταλτική δράση σε συγκεντρώσεις της τάξης μM ενώ θα έπρεπε να είναι της τάξης nM ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν φαρμακευτικά στοιχεία όπως συμβαίνει με την αλλοπουρινόλη, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας. Λαμβάνοντας υπόψη το διπλό ρόλο του ενζύμου (αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος), η χορήγηση των μορίων που μελετήθηκαν τόσο ως διατροφικών παραγόντων όσο και ως αντιοξειδωτικών πριν την άσκηση χρήζει περαιτέρω μελέτης.

ABSTRACT

It has been previously observed that polyphenols are bioactive components of foods and possess antioxidant, chemopreventive, antiviral, antiallergic and anti-inflammatory properties. Furthermore, it has been suggested that polyphenols affect xanthine oxidase (XO) activity. XO catalyses the oxidation of hypoxanthine to xanthine to uric acid leading to reactive oxygen species production. XO activity is excessively high during exercise whereas uric acid deposition in joints may cause gout. The scope of this study was to identify natural XO inhibitors, which could be possibly used in gout treatment. Thus, 5 dietary polyphenols (cafeic, ellagic, ferulic, cumaric and gallic acid) and 6 polyphenolic compounds isolated from legume extracts were studied. From the results obtained, all tested molecules inhibited XO activity. More specifically, it was found that cafeic, ellagic, ferulic and cumaric acid are non-competitive inhibitors of the enzyme while gallic acid is a competitive inhibitor. Furthermore, the polyphenolic compounds isolated from legume extracts are non-competitive inhibitors. It is noteworthy that the compounds tested cannot be used as drugs for gout treatment as they do not inhibit XO activity in such low concentrations as is the case with allopurinol, a potent uric acid inhibitor. Taking into account the dual role of XO (inhibition of free radical and uric acid generation), the administration of the tested molecules as dietary components and antioxidants before exercise needs further research.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυφαινόλες

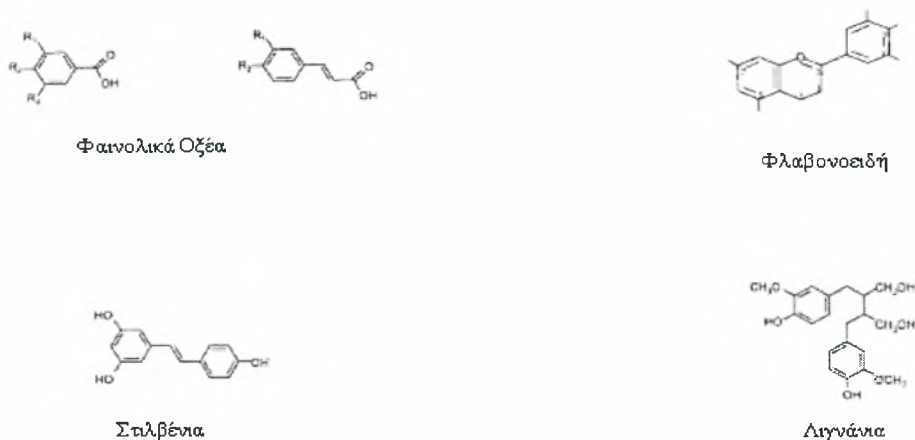
Οι πολυφαινόλες είναι άφθονα μικροσυστατικά της διατροφής. Οι επιδράσεις στην υγεία εξαρτώνται από την ποσότητα που καταναλώνεται και από την βιοδιαθεσιμότητά τους. Τα τελευταία 10 χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών όσον αφορά τις πολυφαινόλες έχει αυξηθεί. Ο κύριος λόγος γι' αυτό το ενδιαφέρον είναι η αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, η μεγάλη τους αφθονία σε διατροφικά στοιχεία και ο πιθανός ρόλος στην παρεμπόδιση ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος και καρδιαγγειακές και νευρολογικές ασθένειες (Scarlet a, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L, in press). Επιπλέον, οι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε πολλά φαρμακευτικά φυτά, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα ενζύμων και τη λειτουργία κυτταρικών υποδοχέων (Middleton E. et al., 2000).

Βέβαια δεν απορροφούνται όλες οι πολυφαινόλες με την ίδια αποτελεσματικότητα. Μεταβολίζονται εκτενώς από ηπατικά και εντερικά ένζυμα και από την εντερική μικροχλωρίδα. Η γνώση της βιοδιαθεσιμότητας και του μεταβολισμού των ποικίλων πολυφαινολών είναι απαραίτητη για την εκτίμηση των βιολογικών ιδιοτήτων τους στους ιστούς.

1.2 Τύποι και κατανομή πολυφαινολών στα τρόφιμα

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και γενικά εμπλέκονται στην άμυνα ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία και την προσβολή από παθογόνα. Αυτές οι χημικές ενώσεις ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και των δομικών στοιχείων που ενώνουν τους δακτυλίους μεταξύ τους (Manach C. et al., 2004).

Διαχωρισμοί γίνονται μεταξύ των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών, των στιλβενίων και των λιγνανίων.



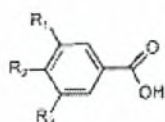
Εικόνα 1: Χημικές δομές πολυφαινολών (Manach C. et al. 2004).

1.2.1 Φαινολικά Οξέα

Υπάρχουν δύο τάξεις φαινολικών οξέων, τα **υδροξυβενζοϊκά** και τα **υδροξυκινναμικά οξέα**. Το περιεχόμενο των βρώσιμων φυτών σε υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι γενικά χαμηλό με εξαίρεση συγκεκριμένα κόκκινα φρούτα, ραπανάκια και κρεμμύδια που μπορούν να έχουν συγκεντρώσεις δεκάδων mg/kg καθαρού βάρους. Το τσάι είναι μια σημαντική πηγή γαλλικού οξέος καθώς τα φύλλα του περιέχουν έως 4.5g γαλλικού οξέος/kg καθαρού βάρους (Manach C. et al., 2004). Επιπλέον, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι συστατικά πολύπλοκων δομών όπως υδρολυόμενων ταννινών. Επειδή τόσο τα ελεύθερα όσο και τα εστεροποιημένα υδροξυβενζοϊκά οξέα, βρίσκονται μόνο σε λίγα βρώσιμα φυτά δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και δεν θεωρούνται μεγάλου θρεπτικού ενδιαφέροντος (Manach C. et al., 2004).

Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι πιο κοινά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και αποτελούνται κυρίως από το κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ. Αυτά τα οξέα σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή. Τα είδη των φρούτων που έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση (μήλα, κεράσια, ακτινίδια, δαμάσκηνα) περιέχουν 0.5-2g/kg καθαρού βάρους (Manach C. et al., 2004).

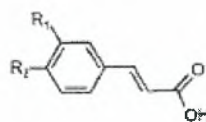
Υδροξυβενζοϊκά Οξέα



$R_1=R_2=OH, R_3=H$: Προτοκατεχικό οξύ

$R_1=R_2=OH$: Γαλλικό οξύ

Υδροξυκινναμικά Οξέα



$R_1=OH$: Κουμαρικό οξύ

$R_1=R_2=OH$: Καφεϊκό οξύ

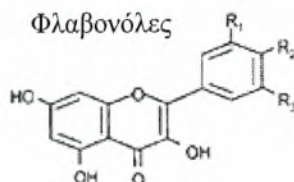
$R_1=OCH_3, R_2=OH$: Φερουλικό οξύ

Εικόνα 2: Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων (Manach C. et al. 2004).

1.2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με άτομα άνθρακα τα οποία σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο και χωρίζονται σε έξι υποομάδες: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες και τις ανθοκυανιδίνες (Manach C. et al., 2004).

Φλαβονόλες

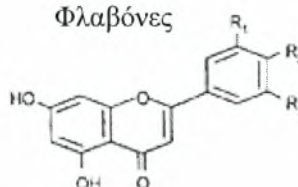


$R_2=OH, R_1=R_3=H$: Καιμφορόλη

$R_1=R_2=OH, R_3=H$: Κερκετίνη

$R_1=R_2=R_3=OH$: Μυρκετίνη

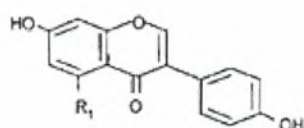
Φλαβόνες



$R_1=H, R_2=OH$: Απιγενίνη

$R_1=R_2=OH$: Λουτεολίνη

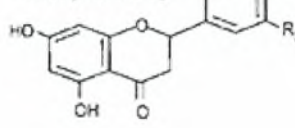
Ισοφλαβόνες



$R_1=H$: Δαιδζεϊνη

$R_1=OH$: Γενιστεϊνη

Φλαβανόνες

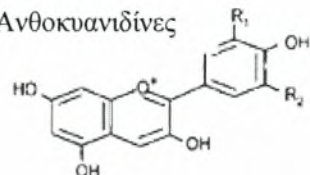


$R_1=H, R_2=OH$: Ναριγενίνη

$R_1=R_2=OH$: Εριοδικτυόλη

$R_1=OH, R_2=OCH_3$: Εσπερετίνη

Ανθοκυανιδίνες



$R_1=R_2=R_3=H$: Πελαργονιδίνη

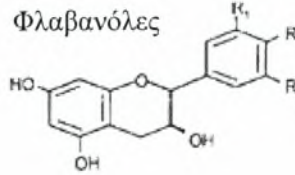
$R_1=OH, R_2=H$: Κυανιδίνη

$R_1=R_2=OH$: Δελφινιδίνη

$R_1=OCH_3, R_2=OH$: Πετουνιδίνη

$R_1=R_2=OCH_3$: Μαλβιδίνη

Φλαβανόλες



$R_1=R_2=OH, R_3=H$: Κατεχίνες

$R_1=R_2=R_3=OH$: Γαλλοκατεχίνη

Εικόνα 3: Χημική δομή φλαβονοειδών (Manach C. et al., 2004).

Φλαβονόλες: Είναι τα πιο άφθονα φλαβονοειδή στα τρόφιμα και οι κύριοι αντιπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη και η καιμπφερόλη. Γενικά βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι πλουσιότερες πηγές είναι τα κρεμμύδια, το μπρόκολο, τα πράσα. Το κόκκινο κρασί και το τσάι περιέχουν μέχρι και 45mg φλαβονολών/L. Αυτές οι ενώσεις είναι κυρίως παρούσες σε γλυκοσιλιωμένες μορφές στα τρόφιμα. Το μόριο σακχάρου είναι συχνά η γλυκόζη και η ραμνόζη αλλά εμπλέκονται κι άλλα σάκχαρα όπως γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη και γλυκουρονικό οξύ. Τα φρούτα συχνά περιέχουν μεταξύ 5 και 10 διαφορετικών γλυκοσιδίων φλαβονολών. Αυτές οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στους εξωτερικούς και εναέριους ιστούς επειδή η βιοσύνθεσή τους διεγείρεται από το φως (Manach C. et al., 2004).

Φλαβόνες: Είναι λιγότερο κοινές από ότι οι φλαβονόλες στα φρούτα και τα λαχανικά. Αποτελούνται κυρίως από γλυκοσίδια λουτεολίνης και απιγενίνης. Οι μόνες σημαντικές βρώσιμες πηγές που ανιχνεύθηκαν είναι ο μαϊντανός και το σέλινο. Σιτηρά όπως το κεχρί και το σιτάρι περιέχουν C-γλυκοσίδια φλαβονών. Το περίβλημα εσπεριδοειδών φρούτων περιέχει μεγάλες ποσότητες μεθοξυλιωμένων φλαβονών όπως τανγερετίνη, νοβιλετίνη και σινενσετίνη. Ανήκουν στα πιο υδροφοβικά φλαβονοειδή (Manach C. et al., 2004).

Φλαβανόνες: Βρίσκονται σε ντομάτες και αρωματικά φυτά όπως η μέντα αλλά είναι παρούσες σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή. Τα κύρια αγλυκόνια είναι η ναρινγενίνη στα γκρεϊπφρουτ, η εσπερετίνη στα πορτοκάλια και η εριοδουκτιόλη στα λεμόνια (Manach C. et al., 2004).

Ισοφλαβόνες: Είναι φλαβονοειδή που έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Αν και δεν είναι στεροειδή έχουν υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις 7 και 4' σε μια διαμόρφωση ανάλογη με αυτή των υδροξυλιών στο μόριο της οιστραδιόλης. Αυτό τους προσφέρει ψευδοορμονικές ιδιότητες, όπως να συνδέονται σε υποδοχείς οιστρογόνων και συνεπώς κατηγοριοποιούνται σαν ψευδοοιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται αποκλειστικά σε όσπρια. Η σόγια και τα επεξεργασμένα προϊόντα της είναι οι κύριες πηγές ισοφλαβονών (Manach C. et al., 2004).

Φλαβανόλες: Υπάρχουν τόσο με την μονομερή τους μορφή (κατεχίνη) όσο και με την πολυμερισμένη τους (προανθοκυανιδίνες). Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλούς τύπους φρούτων καθώς και στο κόκκινο κρασί, αλλά το πράσινο τσάι και η σοκολάτα είναι μακράν οι πλουσιότερες πηγές. Το μαύρο τσάι περιέχει λιγότερες μονομερείς φλαβανόλες οι οποίες οξειδώνονται κατά τη θέρμανση των φύλλων του σε θεαβλαβίνες (διμερή) και θεαρουβιγίνες (πολυμερή). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη

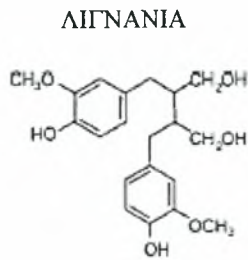
είναι οι κύριες φλαβανόλες στα φρούτα ενώ η γαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη βρίσκονται στα σταφύλια και κυρίως στο τσάι. Σε αντίθεση με τις άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δεν γλυκοσυλιώνονται στα τρόφιμα (Manach C. et al., 2004).

Οι προανθοκυανιδίνες, που είναι επίσης γνωστές και σαν συμπυκνωμένες ταννίνες, είναι διμερή, ολιγομερή και πολυμερή κατεχινών που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς ανάμεσα στον C4 και C8 (ή C6). Είναι υπεύθυνες για τον στυπτικό χαρακτήρα των φρούτων (μήλα, αχλάδια, σταφύλια, ροδάκινα κ.α) και των ποτών (κρασί, τσάι, μπίρα κ.α) και για την πικρή γεύση της σοκολάτας (Manach C. et al., 2004).

Ανθοκυανίνες: Είναι χρωστικές ουσίες των φυτών και εντοπίζονται τόσο στον επιδερμικό ιστό όσο και στην σάρκα των καρπών προσδίδοντάς τους ροζ, κόκκινο, μπλε ή μωβ χρώμα. Υπάρχουν σε διάφορες χημικές δομές ανάλογα με το pH. Αν και είναι ασταθείς στην μη γλυκοσυλιωμένη μορφή, είναι ανθεκτικές στο φως, στο pH, και σε συνθήκες οξείδωσης. Η αποικοδόμηση τους αποτρέπεται με γλυκοσυλίωση (μια γλυκόζη στη θέση 3') και εστεροποίηση με ποικίλα οργανικά και φαινολικά οξέα. Επιπλέον, σταθεροποιούνται με σχηματισμό συμπλεγμάτων με άλλα φλαβονοειδή. Στην ανθρώπινη διατροφή, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στο κόκκινο κρασί, σε ποικιλίες δημητριακών και σε λαχανικά (μελιτζάνες, λάχανα, φασόλια, κρεμμύδια, ραπανάκια) αλλά είναι πιο άφθονες στα φρούτα. Η κυανιδίνη είναι η πιο άφθονη ανθοκυανιδίνη στα τρόφιμα (Manach C. et al., 2004).

1.2.3 Λιγνάκια

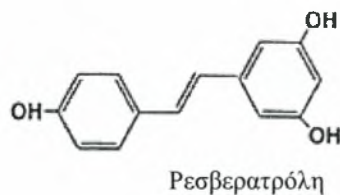
Σχηματίζονται από δύο μονάδες φαινυλοπροπανίου. Η πλουσιότερη διατροφική πηγή είναι ο λιναρόσπορος. Τα δημητριακά, τα σταφύλια, τα φρούτα και κάποια λαχανικά επίσης περιέχουν ίχνη λιγνανών, αλλά οι συγκεντρώσεις στον λιναρόσπορο είναι χίλιες φορές υψηλότερες. Τα λιγνάκια μεταβολίζονται σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη από την εντερική μικροχλωρίδα (Manach C. et al., 2004). Οι Thompson et al χρησιμοποίησαν μια *in vitro* τεχνική που περιελάμβανε ζύμωση των τροφίμων από ανθρώπινη μικροχλωρίδα και ποσοτικοποίηση των προδρόμων της εντεροδιόλης και της εντερολακτόνης, επιβεβαιώνοντας ότι ο λιναρόσπορος είναι η πλουσιότερη πηγή.



Εικόνα 4: Χημική δομή λιγνάνιων (Manach C. et al., 2004).

1.2.4 Στιλβένια

Τα στιλβένια βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στην ανθρώπινη διατροφή. Ένα από αυτά, η ρεσβερατρόλη, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς και τις έχουν αποδοθεί αντικαρκινικές ιδιότητες. Βρίσκεται σε υψηλές ποσότητες στο κόκκινο κρασί και τα σταφύλια (Manach C. et al., 2004).



Εικόνα 5: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης (Manach C. et al., 2004).

1.3 Βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα τρόφιμα

Τα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι και το κόκκινο κρασί αποτελούν τις κύριες πηγές των πολυφαινολικών ενώσεων στη διατροφή. Πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, χυμοί, τσάι, κρασί κ.α) ενώ άλλες βρίσκονται σε συγκεκριμένα τρόφιμα όπως φλαβανόνες στα εσπεριδοειδή και ισοφλαβόνες στη σόγια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα τρόφιμα περιέχουν πολύπλοκα μίγματα πολυφαινολών. Για πολλά φυτικά προϊόντα, η πολυφαινολική σύσταση είναι λιγότερο γνωστή. Η γνώση περιορίζεται σε 1 ή 2 ποικιλίες και τα δεδομένα μερικές φορές δεν αφορούν βρώσιμα φυτά. Ακόμη, πολυάριθμοι παράγοντες όπως είναι η ωρίμανση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η επεξεργασία και η αποθήκευση επηρεάζουν το πολυφαινολικό περιεχόμενο των φυτών. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά την πολυφαινολική σύσταση. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να είναι ο τύπος εδάφους, η

ηλιακή έκθεση, η βροχόπτωση και ο τύπος της καλλιέργειας (βιολογική ή υδροπονική καλλιέργεια). Ο βαθμός ωρίμανσης επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των διάφορων πολυφαινολών (Shahidi F. and Naczki M., 1995). Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων μειώνονται κατά την ωρίμανση ενώ των ανθοκυανινών αυξάνονται.

1.4 Ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών

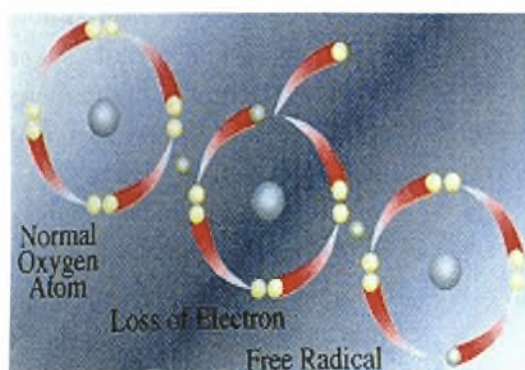
Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες όσον αφορά τις ποσότητες των πολυφαινολών που καταναλώνονται ημερησίως σε όλο τον κόσμο. Αυτά τα δεδομένα προέρχονται μέσα από ανάλυση των κύριων αγλυκονίων (μετά από υδρόλυση των γλυκοσιδίων και εστέρων) σε τρόφιμα που καταναλώνονται ευρέως.

Πίνακας 1: Ημερήσια πρόσληψη πολυφαινολών

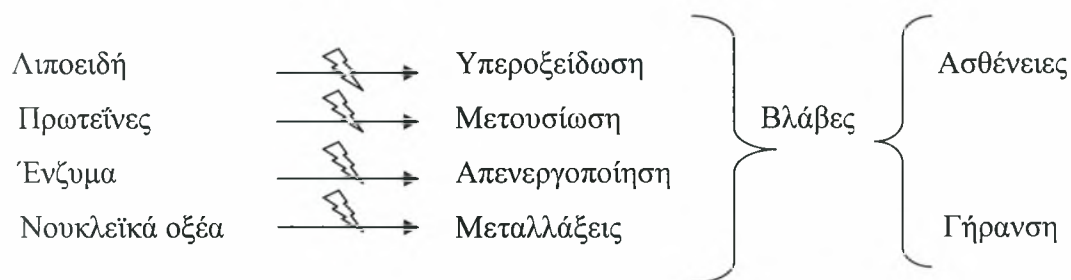
| | |
|-----------|---|
| ΗΠΑ | Φλαβονόλες \approx 20-25mg/d |
| Δανία | Φλαβονόλες \approx 20-25mg/d |
| Ολλανδία | Φλαβονόλες \approx 20-25mg/d |
| Ιταλία | Φλαβονόλες 35mg/d |
| Φινλανδία | Εσπερετίνη 28,3mg/d Ανθοκυανίνες(μούρα) 82mg/d |
| Ασία | Ισοφλαβόνες (σόγια) 25-40mg/d |
| Ισπανία | Κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες (μήλα, αχλάδια, σταφύλια, κόκκινο κρασί) 18-31mg/d |

1.5 Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα (Free Radical) είναι ένα χημικό μόριο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους. Προκύπτει από την προσθήκη ή την απώλεια ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στοιβάδα (Mylonas and Kouretas, 1999). Εξαιτίας αυτών των ελεύθερων ηλεκτρονίων προκαλούν βλάβες στο DNA, στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και στις πρωτεΐνες.



Εικόνα 6: Ελεύθερη ρίζα



Αρκετές ελεύθερες ρίζες είναι ή προέρχονται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και από τις δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS).

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Radicals

Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)

Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})

Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})

Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})

Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})

Non-radicals

Υπεροξειδιο Υδρογόνου (H_2O_2)

Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)

Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)

Όζον (O_3)

Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Radicals

Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO^{\cdot})

Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO_2^{\cdot})

Non-radicals

Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)

Κατιόν Νιτροσουλίου (NO^+)

Ανιόν Νιτροσουλίου (NO^-)

1.6 Πηγές παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου

Υπάρχουν ενδογενείς και άλλες εξωγενείς πηγές παραγωγής ROS.

1.6.1 Ενδογενείς πηγές

1.6.1.a. Οξειδωτική φωσφορλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού 90% της κατανάλωσης οξυγόνου από τον οργανισμό ανάγεται σε νερό. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη.

Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξειδίο του αζώτου (NO) από την ενζυμική δράση της συνθάσης του NO. Το μονοξειδίο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} . Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Boveris and Cadenas, 1997).

1.6.1.β. Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του αίματος που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani and Evans, 1979).

Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα και το $O_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από τη μυελοπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petroni et al., 1992). Η κυτταροπλασματική υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH^{\cdot} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$.

μυελοπεροξειδάση



Αν και αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης, ROS και άλλα οξειδωτικά που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξειδωση των λιπιδίων (Meydani and Evans, 1979; Meydani et al., 1992).

1.6.1.γ. Οξειδάση της ξανθίνης

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuprasamy and Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP απαμινώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του $\text{O}_2^{\cdot-}$. Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

1.6.1.δ. Κυτόχρωμα P₄₅₀

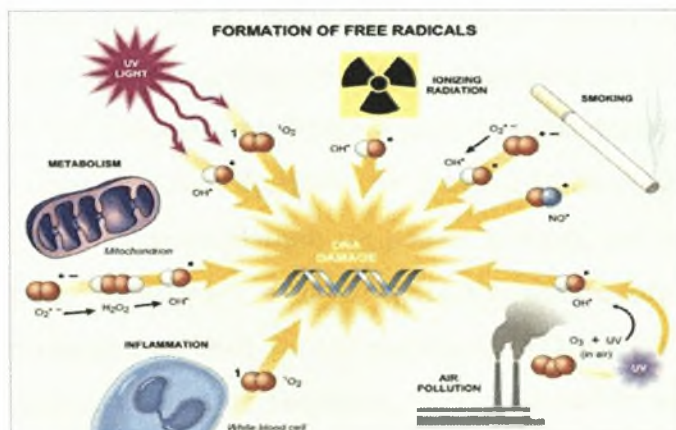
Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα του ήπατος παράγουν ελεύθερες μορφές οξυγόνου μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Yu, 1994). Το NADPH οξειδώνεται παράγοντας στο $\text{O}_2^{\cdot-}$ το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell and Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $\text{O}_2^{\cdot-}$. Η NADPH οξειδάση βρίσκεται, εκτός από την μεμβράνη του πλάσματος και σε άλλα κυτταρικά συστατικά όπως τα μιτοχόνδρια.

1.6.1.ε. Αυτοοξειδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

1.6.2 Εξωγενείς πηγές

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες (Koren, 1995; Victoria, 1994). Επίσης, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000). Σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι επίσης στοιχεία της διατροφής (Ames, 1986; Kanner and Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).



Εικόνα 7: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.7 Βιολογικές επιδράσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου

1.7.1 Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι, έχουν δηλαδή την ικανότητα να μεταφέρουν σήματα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των κυττάρων (Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002). Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα

αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finaud et al., 2006). Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Reid, 2001; Linnane et al., 2002). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

1.7.2 Αρνητικές επιδράσεις

Προκαλούν οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και καταστροφή του DNA. Επίσης, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους καθώς και με τη γήρανση. Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA).

Λιπίδια: Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την απόσπαση ατόμων υδρογόνου ή ηλεκτρονίων από τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO[·] κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου ή ηλεκτρόνιο από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες (Halliwell and Gutteridge, 1999).

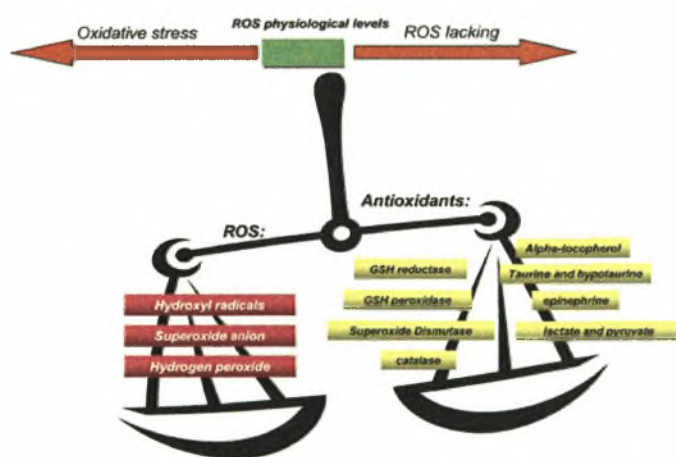
Πρωτεΐνες: Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH[·], το RO[·] και οι δραστικές μορφές αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι είτε η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας είτε η

τροποποίηση των ιδιοτήτων της πρωτεΐνης (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).

DNA: Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυδιογουανοσίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων τέτοιων προϊόντων (Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002q Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).

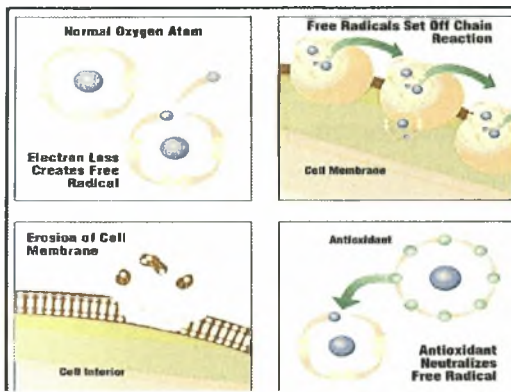
1.8 Οξειδωτικό στρες

Είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας των ιστών σε βάρος του δεύτερου σκέλους της ισορροπίας αυτής.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες.

1.9 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί



Εικόνα 9: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικό.

Είναι ενζυμικοί και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό το κατορθώνουν με τρεις τρόπους.

- ❖ Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- ❖ Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια
- ❖ Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

1.9.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί

Περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

1.9.1.α. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

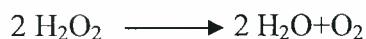
Είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 :



Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu-SOD στο κυτταρόπλασμα, η Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

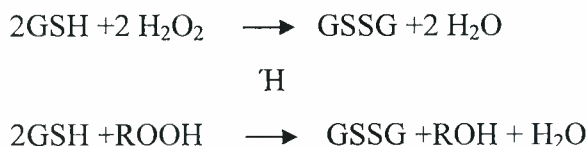
1.9.1.β. Καταλάση (CAT)

Εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στο ενεργό της κέντρο. Κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



1.9.1.γ. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου και είναι άφθονη στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και επίσης ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό ενώ προκαλεί την οξειδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



1.9.1.δ. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της GSSG σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στο ενεργό της κέντρο ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη

δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.

1.9.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τις πολυφαινόλες, τη βιταμίνη E, τη βιταμίνη C, το β-καροτένιο, τη γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

1.9.2.α. Πολυφαινόλες

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση καθώς λειτουργούν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες λειτουργούν τόσο ως δέκτες ηλεκτρονίων όσο και ως δότες ατόμου H στις ελεύθερες ρίζες ($RO^{\bullet} + PPH \rightarrow ROH + PP^{\bullet}$). Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται σταθερές φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες σταματούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al., 2005). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Fe^{+2} και Cu^{+}) παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της ρίζας OH^{\bullet} που παράγεται από την αντίδραση Fenton. Τέλος, ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά ενισχύοντας την δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ferguson P.L., 2001).

1.9.2.β. Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη και υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση και αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



1.9.2.γ. Βιταμίνη C

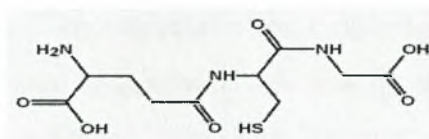
Η βιταμίνη C παίρνει μέρος στην απομάκρυνση της αμμωνίας και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

1.9.2.δ. Β-καροτένιο

Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη Α όταν απαιτείται από τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E και το σελήνιο. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης.

1.9.2.ε. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπίδιο (γ-Glu-Cys-Gly) και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Αποτελεί σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης της από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίθετο.



Εικόνα 10: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης.

1.9.2.στ. Συνένζυμο Q 10

Το συνένζυμο Q 10 (ουβικινόνη) παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Ακόμη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης.

1.9.2.θ. Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που συμμετέχει στη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο. Ως συμπάρογοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

1.10 Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών

Οι βιολογικές ιδιότητες γλυκοσυλιωμένων και μη πολυφαινολών έχουν μελετηθεί σε ένζυμα καλλιέργειες κυττάρων, απομονωμένους ιστούς και με διάφορες άλλες *in vitro* δοκιμές (Manach C. et al., 2004).

1.10.1 Πρόληψη ασθενειών

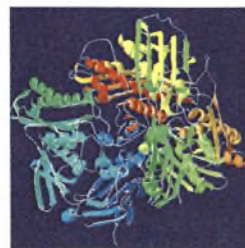
Η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένου των πνευμόνων, του στήθους και του προστάτη (Manach C. et al., 2004). Οι πολυφαινόλες έχει αποδειχθεί ότι έχουν ποικίλες αντικαρκινικές και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Jang et al., 1997). Αναστέλλουν την κυκλοοξυγενάση (COX), ένα ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό προφλεγμονοδών συστατικών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των όγκων και την καταστολή της δράσης του ανοσοποιητικού. Προσφέρουν επίσης προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η στεφανιαία νόσος μέσω αναστολής της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και της σύνθεσης των εικοσανοειδών (Pace-Asciak et al., 1995; Goldberg et al., 1995).

Έχει βρεθεί ότι η κατανάλωση τσαγιού προσφέρει προστασία ενάντια στον καρκίνο του δέρματος που προκαλείται είτε από χημικά καρκινογόνα είτε από υπεριώδη ακτινοβολία στα ποντίκια (Mukhtar and Ahmad, 2000). Ακόμη, κάποιες πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, είναι αναστολείς των σουλφοτρανσφερασών και μπορεί να έχουν επίδραση στη λειτουργία των θυρεοειδών ορμονών, των στεροειδών και των κατεχολαμινών (Coughtrie et al., 1998). Τέλος, κάποια φλαβονοειδή μπορούν να δρουν σαν αναστολείς του κυτοχρώματος P450 αυξάνοντας την βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων.

Τα φυτικά φαινολικά συστατικά έχει προταθεί ότι παρέχουν ένα μέσο για την πρόληψη των ανεπιθύμητων επιδράσεων των μυκοτοξινών στην ανθρώπινη υγεία (Beekrum et al., 2003).

1.11 Οξειδάση της ξανθίνης

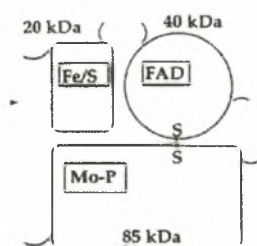
Είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωτική υδροξυλίωση υποστρωμάτων πουρινών στο κέντρο μολυβδαινίου και οδηγεί σε μείωση του O_2 στο κέντρο της φλαβίνης με επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), είτε ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Borges F. et al., 2002).



Εικόνα 11: Δομή οξειδάσης της ξανθίνης.

1.11.1. Πρωτεϊνική Δομή

Η οξειδάση της ξανθίνης ανήκει στην κατηγορία των φλαβοπρωτεϊνών και είναι άφθονη ανάμεσα στα είδη και ανάμεσα στα διάφορα είδη ιστών των θηλαστικών (ήπαρ, καρδιά, εγκέφαλο, μύες, πάγκρεας, έντερο) (Borges F. et al., 2002). Αποτελείται από δύο υπομονάδες 145kDa. Κάθε υπομονάδα περιέχει μια μολυβοπτερίνη (85kDa), μια επικράτεια (20kDa) που περιέχει δύο μη πανομοιότυπα κέντρα σιδήρου-θείου (Fe_2S_2) και ένα δινουκλεοτίδιο φλαβινοαδενίνης (FAD) (40kDa) (Avis P.G. et al., 1956; Massey V. et al., 1969; Palmer G. et al., 1969; Kramer S.P. et al., 1987). Η αμινοξική αλληλουχία είναι υψηλά ομόλογη ανάμεσα στα ένζυμα των ποντικών, των αρουραίων και των ανθρώπων με 90% ομοιότητα (Nishino T. 1994).



Εικόνα 12: Μία από τις δύο υπομονάδες της οξειδάσης της ξανθίνης

1.11.2 Καταλυτική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα υποξανθίνη και ξανθίνη τις οποίες οξειδώνει προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος, αντίστοιχα.

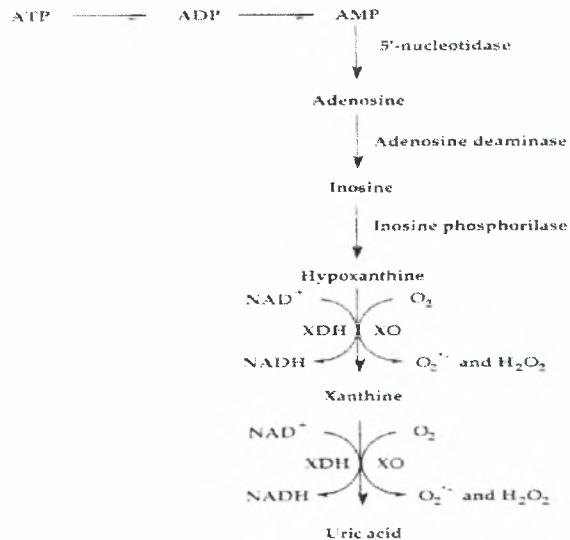


Εικόνα 13: Αντιδράσεις που καταλύει η οξειδάση της ξανθίνης.

Η παραπάνω αντίδραση επιτελείται με την βοήθεια μολυβδαινίου (Mo) που περιέχει η οξειδάση της ξανθίνης στο ενεργό της κέντρο. Και στις δύο αντιδράσεις που καταλύει, ένα άτομο οξυγόνου από το μόριο του H_2O συνδέεται με το Mo και στη συνέχεια μεταφέρεται στην υποξανθίνη και την ξανθίνη προς σχηματισμό ξανθίνης και ουρικού οξέος, αντίστοιχα (Hille R., 2006).

1.11.3 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν οξειδωσης των πουρινών. Πρόκειται για χημικές ενώσεις όπως η αδενίνη και η γουανίνη, που υπάρχουν στο DNA, στο RNA και στο ATP. Παράγεται από την ξανθίνη και την υποξανθίνη με την δράση του ενζύμου της οξειδάσης της ξανθίνης.



Εικόνα 14: Μονοπάτι σχηματισμού ουρικού οξέος

Παράγεται κατά το μεγαλύτερο μέρος στο ήπαρ και στη συνέχεια απεκκρίνεται από τους νεφρούς. Υψηλές συγκεντρώσεις του ανιχνεύονται στα ούρα.

Το ουρικό οξύ αποτελεί ένα άφθονο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος (Maxwell, Jakeman, Thomason, Leguen, & Thorpeet, 1993).

Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ουρικού οξέος είναι οι ακόλουθοι: 1) Αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες, τις εξουδετερώνει και οξειδώνεται σε αλλαντοΐνη, οξονικό οξύ και παραβανικό οξύ.

2) Σχηματίζει σύμπλοκο με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}), δεσμεύοντάς τον και αναστέλλοντας την οξείδωση του ασκορβικού οξέος από αυτόν (Mikami, Yoshino & Ito, 2000).

Το ουρικό οξύ ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση τόσο σε κυτταρικό επίπεδο (κυτταρικές μεμβράνες), όσο και σε γενετικό (DNA) (Hellsten, Sjödin, Richter, & Bangsbo, 1998). Επιπλέον κάποιοι ερευνητές θεωρούν ότι προστατεύει από οξείδωση και τα λιπίδια του πλάσματος (Yanai & Morimoto, 2004). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το ουρικό οξύ αποτελεί ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά του αίματος. Ωστόσο υψηλές συγκεντρώσεις του συνδέονται με την ουρική αρθρίτιδα, μια μεταβολική πάθηση που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση ουρικού οξέος στις αρθρώσεις. Οι δυο αυτές αντίθετες, ως προς την επίδραση στην υγεία, πλευρές του προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

1.11.4 Οξειδάση της ξανθίνης και οξειδωτικό στρες

Έχει παρατηρηθεί ότι σε καταστάσεις που οδηγούν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (άσκηση), εντείνεται η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η αυξημένη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης σχετίζεται με ασθένειες όπως η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η υπερχολήστερολαιμία, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση και ο διαβήτης.

Σε *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε ότι η εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα οξειδάσης της ξανθίνης του μυοκαρδίου, τα οποία συνεισφέρουν στην αύξηση του οξειδωτικού στρες στην καρδιά (Ferdinandy et al., 1999, 2000). Σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος καθώς και αύξηση στην δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο μυοκάρδιο (Leyva et al., 1998; Cappola et al., 2001). Στον διαβήτη

τύπου 1 υπάρχει αύξηση στα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης στο πλάσμα και το ήπαρ (Desco et al., 2002).

Επίσης, στην καρδιά υπερτασικών ποντικών, οι Janssen et al. (1993) ανέφεραν αύξηση στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Έχει επίσης μελετηθεί η παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου από την οξειδάση της ξανθίνης κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση.

Υπάρχουν 5 διαφορετικοί μηχανισμοί παραγωγής ανιόντος σουπεροξειδίου:

- Η παραγωγή σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνεται λόγω μετατροπής της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης (Rasmussen et al., 2000; Saksela et al., 1999).
- Η αυξημένη έκφραση του mRNA της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και της οξειδάσης της ξανθίνης (Saksela et al., 1998).
- Όταν το ήπαρ γίνεται ισχαιμικό απελευθερώνει οξειδάση της ξανθίνης στην κυκλοφορία του αίματος (Sanhueza et al., 1992).
- Η οξειδάση της ξανθίνης προσδένεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και παράγει ελεύθερες ρίζες.
- Το ATP διασπάται σε ξανθίνη και υποξανθίνη, επομένως αυξάνει τα επίπεδα των υποστρωμάτων της οξειδάσης της ξανθίνης.

Τέλος έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της εξαντλητικής άσκησης παρατηρείται παραγωγή ROS. Ένας από τους λόγους είναι και η μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης.

1.11.5 Μέθοδοι προσδιορισμού της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης συνήθως μετράει τα προϊόντα μεταβολισμού της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ καθώς και την παραγωγή ριζών σουπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου ή NADPH.

1) Φωτομετρική μέτρηση του ουρικού οξέος.

Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά, μετρώντας την παραγωγή του ουρικού οξέος στα 295 nm, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ξανθίνη ή υποξανθίνη (Della Corte E. and Stirpe F., 1972; Batella M.G. et al., 1973).

2) Φθορομετρική μέτρηση της παραγόμενης ισοξανθοπτερίνης.

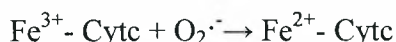
Η οξειδάση της ξανθίνης μπορεί να προσδιοριστεί με φθορομετρία, χρησιμοποιώντας την οξειδωση της πτερίνης σε ισοξανθοπτερίνη σαν μέτρο της δραστικότητας του ενζύμου (Margolin Y. et al., 1992; Beckman J.S. et al., 1989).

3) Μέτρηση του παραγόμενου $O_2^{\cdot-}$ από την οξειδάση της ξανθίνης με χημειοφωταύγεια.

Η χημειοφωταύγεια της λουμινόλης και ειδικά η χημειοφωταύγεια της λουσιγενίνης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του παραγόμενου $O_2^{\cdot-}$ είτε σε *in vitro* ενζυμικά συστήματα είτε σε κύτταρα (Hodgson E.K. and Fridovich J.L., 1973; Merenyi G. et al., 1985).

4) Μέτρηση του παραγόμενου $O_2^{\cdot-}$ από την οξειδάση της ξανθίνης με το κυτόχρωμα c.

Η παραγωγή του $O_2^{\cdot-}$ μπορεί να ανιχνευθεί σε κύτταρα χρησιμοποιώντας την σιδηρούχο μορφή του κυτοχρώματος c:



Τα κύτταρα επωάζονται με $Fe^{3+} - Cyt\ c$ και η απορρόφηση μετριέται στα 550nm (Mayo L. and Curnutte J.T., 1990; Atlante A. et al., 1997).

5) Μέτρηση του παραγόμενου H_2O_2 από την οξειδάση της ξανθίνης.

Κατά την υδροξυλίωση της ξανθίνης από την οξειδάση της ξανθίνης η ανηγμένη φλαβίνη αντιδρά με οξυγόνο και σχηματίζει είτε H_2O_2 είτε $O_2^{\cdot-}$ (Kim J.H. et al., 1996; Hodgson K. and Fridovich I., 1976; Lacy F. et al., 1998).

6) Μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου.

Μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου με χρήση ενός εκλεκτικού ηλεκτροδίου (Darmon N. et al., 1992).

1.12 Αναστολείς της Οξειδάσης Της Ξανθίνης

Ο πιο γνωστός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης είναι η αλλοπουρινόλη της οποίας η χρόνια χορήγηση για την αναστολή της XO είναι κλινικά αποτελεσματική ενάντια στην υπερουριχαιμία. Βέβαια, γίνονται έρευνες για την ανακάλυψη νέων αναστολέων της XO που μπορεί να έχουν δομές σχετιζόμενες με τις πουρίνες ή διαφορετικού τύπου. Τα περισσότερα από αυτά τα συστατικά, είτε προέρχονται από σύνθεση είτε από απομονώνονται από φυσικές πηγές, σαν αναστολείς της XO είναι ετεροκυκλικές ενώσεις οξυγόνου και αζώτου (οι δομές τους παρατίθενται στο παράρτημα-πίνακας 9).

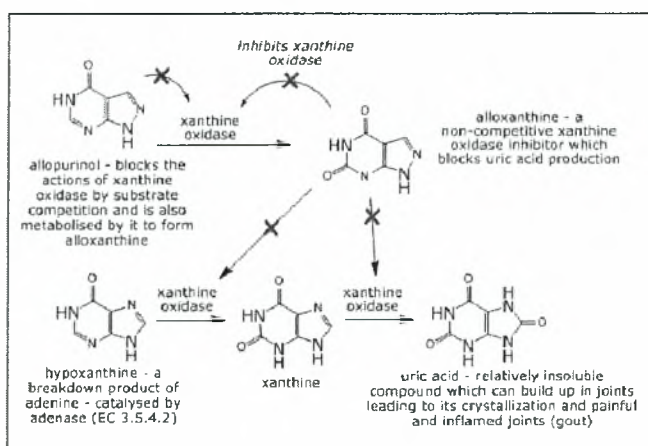
Πίνακας 2: Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

| | | IC ₅₀ (μΜ) | ΤΥΠΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ |
|---|--|--------------------------|--------------------|
| ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΖΩΤΟΥ | | | |
| Α. Παράγωγα Πουρινών | | | |
| -Ανάλογα Αδερίνης | 8 azaadenine | 0,54 | Μικτή |
| -Ανάλογα Γουανίνης | 9-phenylguanine | 0,41 | - |
| | 9-(p chlorophenyl)guanine | 1,8 | - |
| | 9-phenyl-6-guanine | 1,1 | - |
| | 8-azaguanine | 42,10 | Συναγωνιστική |
| -Ανάλογα Πτεριδόνης | | | |
| - Ανάλογα Υποξανθίνης και Ξανθίνης | | | |
| Β. Παράγωγα Πυριμιδίνης | 4amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine | 5,91 | Συναγωνιστική |
| | 4amino-6-mercaptopyrazolo[3,4-d]pyrimidine | 8,17 | - |
| | 4aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidine | 25,46 | Μικτή |
| Γ. Ανάλογα Βενζοθιαζινών | 2-amino-4H-1,3-benzothiazin-4-one | 5,54 | Μη Συναγωνιστική |
| | 2-guanidino-4H-1,3-benzothiazin-4-one | 5,60 | Μικτή |
| Δ. Ανάλογα Ιμιδαζόλης και Τριαζόλης | | | |
| ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ | | | |
| Α. Φλαβονοειδή και ανάλογα | Apigenin | 0,70±0,23 | Μικτή |
| | Baicalein | 2,79±0,01 | Ανταγωνιστική |
| | Quercetin | 2,62±0,13 | Συναγωνιστική |
| Β. Ανθοκυανιδίνες, ανθοκυανίνες και ανάλογα | delphinidin | 0,07 | - |
| Γ. Κουμαρίνες | 7-hydrocumarin | 43,65±0,55 | Ανταγωνιστική |

| | | | |
|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Δ. Ξανθόνες | norathyriol | 0,92 | Ανταγωνιστική |
| E. Αουρόνες | sulfuretin | 6.2 | Δεν έχει βρεθεί |
| ΣΤ. Ελλαγικό Οξύ | | Δεν έχει βρεθεί | Δεν έχει βρεθεί |

1.12.1 Αλλοπουρινόλη

Η αλλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ισομερές της υποξανθίνης και ο πιο γνωστός και καλύτερα μελετημένος αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης. Αρχικά συντέθηκε από τη Falco στα μέσα της δεκαετίας του '50, σε μια προσπάθεια παραγωγής νέων αντινεοπλασματικών παραγόντων, αλλά βρέθηκε ότι έχει ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης (Elion G.B., 1993). Είναι συναγωνιστικός αναστολέας, η αναστολή είναι χρονο-εξαρτώμενη και επίσης πρέπει να διατηρείται μια αποτελεσματική συγκέντρωση του αναστολέα γιατί αποστασιοποιείται από το ένζυμο με αυτόματη οξείδωση του Mo^{IV} σε Mo^{VI} επαναφέροντας την ενζυμική δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Okamoto K. And Nishino T., 1995). Η αλλοπουρινόλη είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της χρόνιας ουρικής αρθρίτιδας, ασθένειας προκαλούμενης από την υπερβολική συσσώρευση ουρικού οξέος στους ιστούς.



Εικόνα 15: Μονοπάτι δράσης της αλλοπουρινόλης

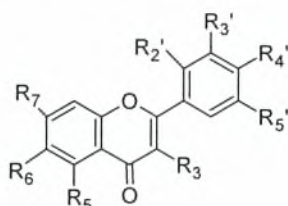
1.12.2 Πολυφαινόλες ως αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

Κάποια φλαβονοειδή είναι πολύ γνωστό ότι δρουν *in vitro* ως ισχυρά αντιοξειδωτικά με το να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και χηλικά μεταλλικά ιόντα (Cotelle N. et al., 1992; Terao J. et al., 1994). Πολλά από αυτά έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν και ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης (XO).

Η μελέτη της σχέσης δομής-δράσης των φλαβονοειδών ως αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

- Οι υδροξυλικές ομάδες στον C-5 και C-7 και ο διπλός δεσμός ανάμεσα στον C-2 και C-3 είναι απαραίτητα για μια υψηλή ανασταλτική δράση.
- Η παρουσία μιας υδροξυλικής ομάδας στον C-3 μειώνει ελαφρώς την ανασταλτική δράση.
- Οι φλαβόνες εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερη ανασταλτική δράση από τις φλαβονόλες.
- Οι φυτικές φλαβόνες και φλαβονόλες είναι πιο ανασταλτικές από τα μη φυτικά φλαβονοειδή (ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες) (Cos P. et al., 1997) .

Ένα παράδειγμα παρατίθεται παρακάτω:



| Ένωση | R ₃ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | R ₂ ' | R ₃ ' | R ₄ ' | R ₅ ' | IC ₅₀ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Κερκετίνη | OH | OH | H | OH | H | OH | OH | H | 2.62±0.13 |
| Φισετίνη | OH | H | H | OH | H | OH | OH | H | 4.33±0.19 |

Η κερκετίνη έχει υψηλότερη ανασταλτική δράση από την φισετίνη λόγω παρουσίας υδροξυλικών ομάδων και στον C-5 και στον C-7 ενώ η φισετίνη φέρει υδροξυλική ομάδα μόνο στον C-7.

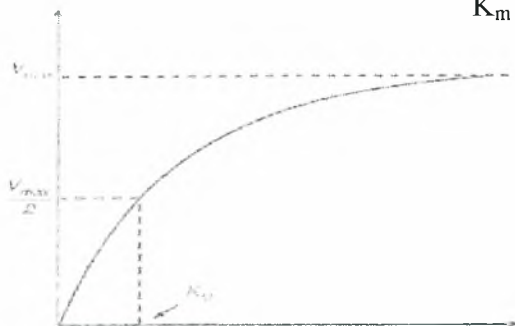
1.13 Βασικές αρχές ενζυμικής κινητικής

Για να δράσει ένα ένζυμο, E, πρέπει να δημιουργήσει με το υπόστρωμα, S, ένα σύμπλοκο, ES, που είτε μπορεί να διασπαστεί πάλι σε E και S είτε μπορεί να δώσει το προϊόν, P, της αντίδρασης και να απελευθερώσει το ένζυμο, E. Οι k_1 , k_2 και k_3 είναι οι σταθερές της ταχύτητας των αντιδράσεων.



Η δημιουργία του συμπλόκου ένζυμο-υπόστρωμα οφείλεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην αντίδραση 1 φαίνεται ότι το ένζυμο, E, βρίσκεται σε δύο μορφές, μία ελεύθερη, E, και μία με το υπόστρωμα, ES. Το άθροισμα των δύο αυτών μορφών δίνει το σύνολο του ενζύμου, Et.

Οι Michaelis-Menten κατέληξαν στην εξίσωση:
$$V = V_{\max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

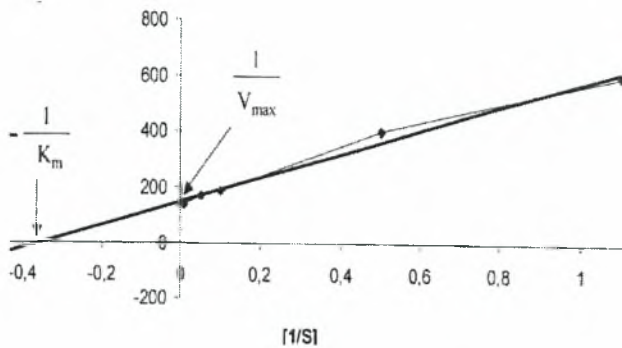


Γράφημα 1: Γραφική αναπαράσταση της ταχύτητας V μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S].

Σε σταθερή συγκέντρωση ενζύμου και σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα V είναι σχεδόν ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S]. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος [S], η ταχύτητα είναι περίπου ανεξάρτητη από το [S].

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών V_{\max} και K_m χρησιμοποιείται η αντιστρεπτή μορφή της εξίσωσης Michaelis-Menten που προτάθηκε από τους Lineweaver-Burk (εξίσωση του διπλού αντιστρόφου).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{Εξίσωση Lineweaver-Burk}$$



Γράφημα 2: Γραφική αναπαράσταση της εξίσωσης του διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk).

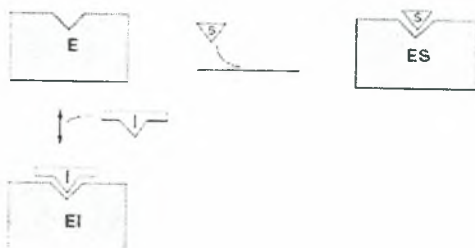
1.13.1 Ενζυμικοί αναστολείς

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι **αντιστρεπτός** ή **μη αντιστρεπτός**. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί σχετικά εύκολα από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος και όταν αφαιρεθεί το ένζυμο επανακτά τη δραστηρότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία.

Διακρίνουμε 4 κύριους τύπους ενζυμικής αναστολής: τη συναγωνιστική, τη μη συναγωνιστική, την αναταγωνιστική και τη μικτή.

1.13.1.α Συναγωνιστική Αναστολή

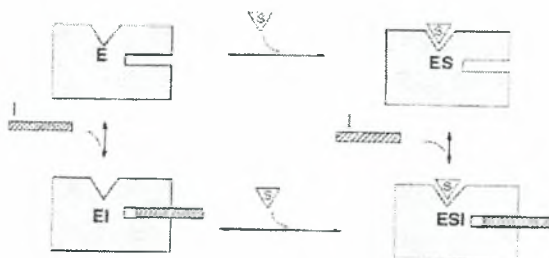
Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται **συναγωνιστικός** αναστολέας.



Εικόνα 16: Συναγωνιστικός αναστολέας

1.13.1.β. Μη Συναγωνιστική Αναστολή

Αν αντί ο αναστολέας I να ανταγωνίζεται με το υπόστρωμα S για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε αναφερόμαστε σε **μη συναγωνιστική** αναστολή.



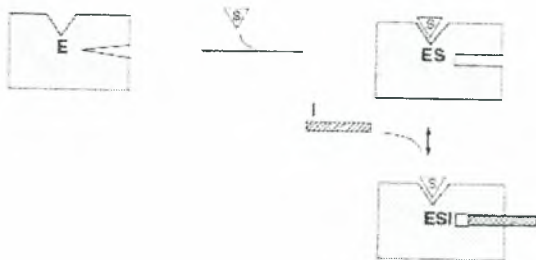
Εικόνα 17: Μη συναγωνιστικός αναστολέας

1.13.1.γ. Μικτή Αναστολή

Στην **μικτή** αναστολή μεταβάλλονται τόσο η K_m όσο και η V_{max} . Η K_m μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί από τον αναστολέα, ενώ η V_{max} πάντα θα ελαττώνεται.

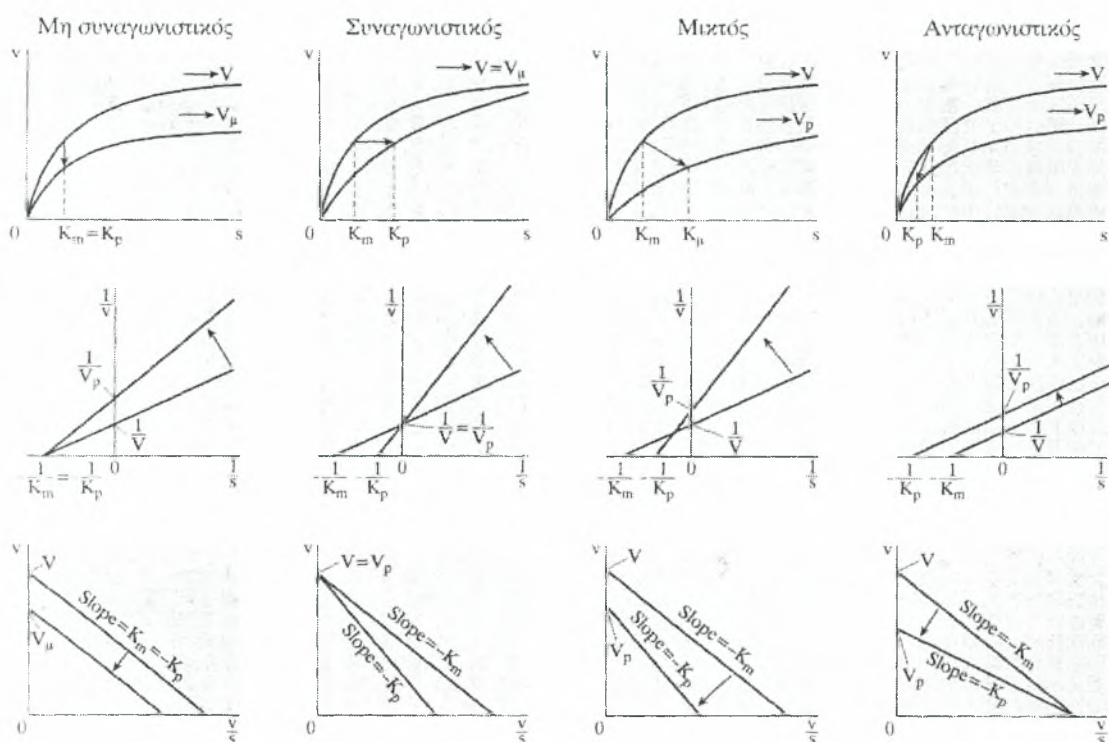
1.13.1.δ Ανταγωνιστική αναστολή

Στην περίπτωση της **ανταγωνιστικής** αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου- υποστρώματος.



Εικόνα 18: Ανταγωνιστικός αναστολέας

1.13.2 Γραφική Αναπαράσταση του είδους της Αναστολής



Εικόνα 19: Επίδραση των τεσσάρων ειδών αναστολέων σε τρεις μορφές γραφικής παράστασης των επιπτώσεων της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. K_m και V_{max} είναι οι τιμές των σταθερών Michaelis και της μέγιστης ταχύτητας αντίστοιχα και K_p και V_p οι ίδιες σταθερές παρουσία του αναστολέα. Slope= κλίση. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση μετακίνησης της

καμπύλης παρουσία του αναστολέα. Από πάνω προς τα κάτω. Πρώτη σειρά- Γραφική αναπαράσταση της κλασικής εξίσωσης Michaelis-Menten. Δεύτερη σειρά- Γραφική αναπαράσταση κατά Lineweaver-Burk. Τρίτη σειρά- Γραφική αναπαράσταση κατά Woolf-Augustinson-Hofstee.

Πίνακας 3: Τρόπος μεταβολής της K_M και της V_{max} ανάλογα με το είδος της αναστολής.

| Αναστολή | K_M | V_{max} |
|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| Συναγωνιστική | Αυξάνεται | Δε μεταβάλλεται |
| Μη συναγωνιστική | Δε μεταβάλλεται | Ελαττώνεται |
| Μικτή | Αυξάνεται ή ελαττώνεται | Ελάττώνται |
| Ανταγωνιστική | Ελαττώνεται | Ελαττώνεται |

2. ΣΚΟΠΟΣ

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων έχουν επίδραση στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Η δραστικότητα του ενζύμου είναι πολύ υψηλή κατά την άσκηση ενώ η αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεσή του στα οστά οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ουρική αρθρίτιδα. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια αναζήτησης φυσικών αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης. Μελετήθηκαν 5 καθαρές πολυφαινόλες (καφεϊκό, ελλαγικό, φερουλικό, κουμαρικό και γαλλικό οξύ) που εντοπίζονται σε διάφορα τρόφιμα και 6 καθαρά πολυφαινολικά μόρια που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

KH_2PO_4 (SIGMA, USA)

Na_2HPO_4 (Panreac, Spain)

EDTA (Panreac, Spain)

Ξανθίνη (SIGMA, USA)

Οξειδάση της ξανθίνης (bovine milk) (SIGMA, USA)

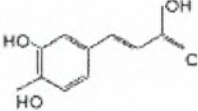
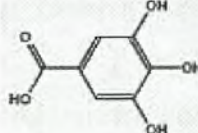
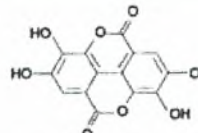
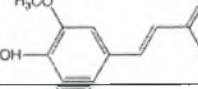

Αλλοπουρινόλη (SIGMA, USA)

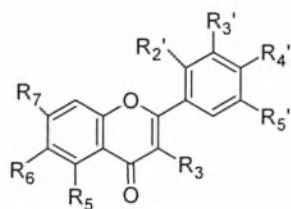
Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο HITACHI U-1500.

3.1.2. Καθαρές πολυφαινόλες και κλάσματα που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πλάσ του φυτού *Vicia faba*.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 5 καθαρές πολυφαινόλες και 6 κλάσματα, που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πλάσ του φυτού *Vicia faba*.

Πίνακας 4: Δομές καθαρών πολυφαινολών

| | |
|----------------------|---|
| Καφεϊκό οξύ |  |
| Γαλλικό οξύ |  |
| Ελλαγικό οξύ |  |
| Φερουλικό οξύ |  |
| Κουμαρικό οξύ |  |



Πίνακας 5: Δομές πολυφαινόλικών ενώσεων που απομονώθηκαν από ψυχανθή

| ενώσεις | R ₃ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | R _{2'} | R _{3'} | R _{4'} | R _{5'} |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2 | | OH | H | | H | OH | OH | H |
| 4 | | OH | H | | H | H | OH | H |
| 5 | | OH | H | | H | H | OH | H |
| 9 | | OH | H | | H | H | OH | H |
| 10 | | OH | H | | H | H | OH | H |
| 3 | | - | - | - | - | - | - | - |

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε με βάση την παραγωγή του ουρικού οξέος μέσω της οξείδωσης της ξανθίνης. Η εκτίμηση της ανασταλτικής ή επαγωγικής δράσης ενός εκχυλίσματος βασίστηκε στη μεταβολή του ρυθμού παραγωγής του ουρικού οξέος.

3.2.1.a. Κινητική μελέτη στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης με την ξανθίνη ως υπόστρωμα

Για την κινητική μελέτη της ανασταλτικής δράσης ενός φυτικού εκχυλίσματος απαιτείται η κατασκευή καμπύλης ταχύτητας V αντίδρασης του ενζύμου-συγκέντρωσης υποστρώματος $[S]$.

Πίνακας 6: Ποσότητες που προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης.

| | C₁ (0.64 μM) | C₂ (0.96 μM) | C₃ (1.92 μM) | C₄ (4.8 μM) | C₅ (9.6 μM) | C₆ (19.2 μM) |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Ρυθμιστικό | 403μl | 403μl | 403μl | 403μl | 403μl | 403μl |
| Ξανθίνη | 80μl | 80μl | 80μl | 80μl | 80μl | 80μl |
| XO | 17μl | 17μl | 17μl | 17μl | 17μl | 17μl |
| Τελ. όγκος | 500μl | 500μl | 500μl | 500μl | 500μl | 500μl |

Αρχικά προστίθενται τα διαλύματα μέχρι και την ξανθίνη και ακολουθεί ανάδευση. Σε κάθε δείγμα ξεχωριστά προστίθεται το ένζυμο, αναδεύεται άμεσα και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 295nm για 4 min. Για την κινητική μελέτη ακολουθεί και υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης /λεπτό ($\Delta_{\text{ABS}}/\text{min}$). Ο υπολογισμός της μεταβολής της απορρόφησης/λεπτό υπολογίστηκε στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης (πίνακας 7). Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

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

$$V = \frac{\text{Ρυθμός αλλαγής της} \\ \text{Όγκος κυψελίδας (0.5ml)} \times \text{απορρόφησης / λεπτό}}{\text{Μοριακή απορροφητικότητα προϊόντος}} \times 1000$$

Όγκος κυψελίδας: 0.5ml

Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης/λεπτό: $\Delta_{\text{abs}}/\text{min}$.

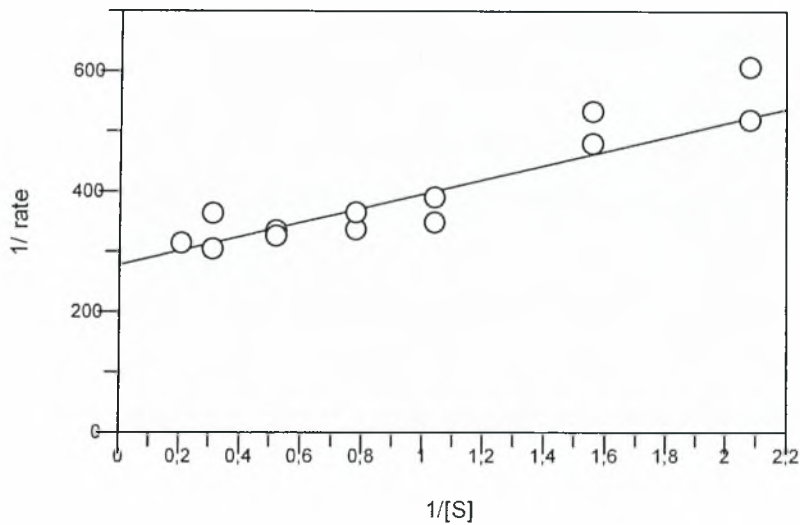
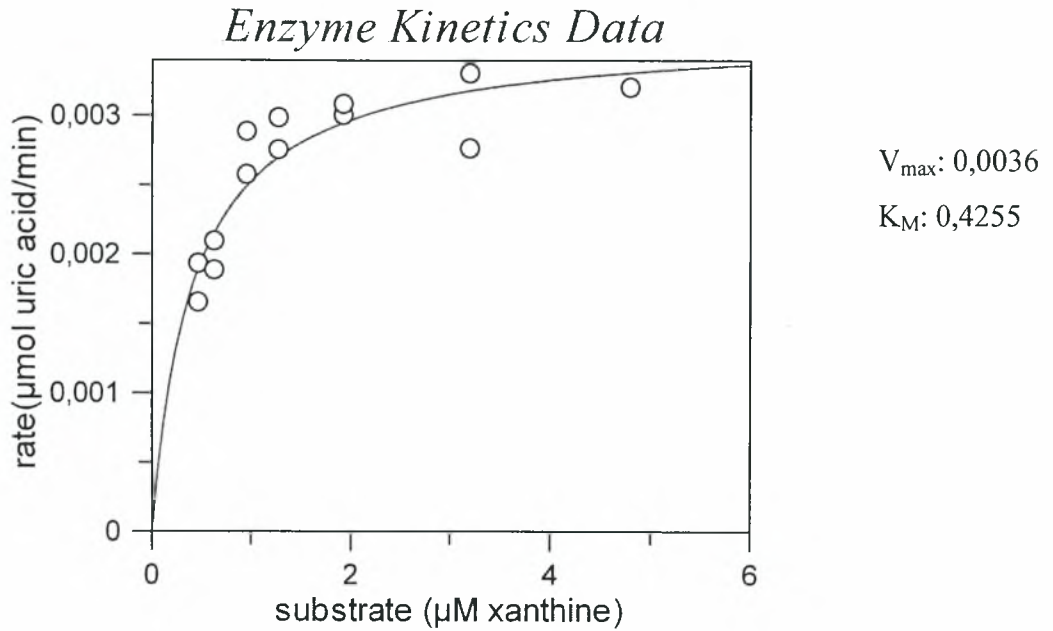
Μοριακή απορροφητικότητα του προϊόντος (ουρικού οξέος): 9600L/mol cm.

Η ταχύτητα εκφράζεται σε $\mu\text{mol ουρικού οξέος}/\text{min}$

Πίνακας 7: Τιμές της ταχύτητας της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

| Συγκέντρωση υποστρώματος (μmol ξανθίνης) | Ταχύτητα ενζύμου (nmol ουρικού οξέος/ min) | $\Delta\text{abs}/\text{min}$ |
|---|---|-------------------------------|
| 0,48 | 1,9 | 0,0365 |
| 0,48 | 1,7 | 0,0326 |
| 0,64 | 2,1 | 0,0403 |
| 0,64 | 1,9 | 0,0365 |
| 0,96 | 2,6 | 0,0499 |
| 0,96 | 2,9 | 0,0557 |
| 1,28 | 3,0 | 0,0576 |
| 1,28 | 2,7 | 0,0518 |
| 1,92 | 3,0 | 0,0576 |
| 1,92 | 3,1 | 0,0595 |
| 3,2 | 3,3 | 0,0634 |
| 3,2 | 2,8 | 0,0538 |
| 4,8 | 3,2 | 0,0614 |

Με τα παραπάνω στοιχεία έγινε η καμπύλη ταχύτητας / συγκέντρωσης υποστρώματος $V/[S]$.



Γράφημα 3: Πρώτο γράφημα - Γραφική αναπαράσταση της κλασικής εξίσωσης Michaelis-Menten. Δεύτερο γράφημα - Γραφική αναπαράσταση κατά Lineweaver-Burk.

Η συγκέντρωση του υποστρώματος $4,8 \mu\text{M}$ είναι η συγκέντρωση, στην οποία το ένζυμο είναι σε κορεσμό και δρα στη μέγιστη ταχύτητα. Η κινητική μελέτη πρέπει να γίνει σε αυτή τη συγκέντρωση του υποστρώματος καθώς το ένζυμο είναι κορεσμένο και έτσι η δράση του είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

3.2.2. Επίδραση καθαρών πολυφαινολών και καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από ψυχανθή στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

Για την κινητική μελέτη των μορίων που εξετάστηκαν, αρχικά προσδιορίστηκε η τιμή IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των μορίων που προκαλεί αναστολή της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης κατά 50%. Η τιμή IC_{50} είναι ένα μέτρο της ισχύος ενός αναστολέα. Ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} έγινε σε συγκέντρωση υποστρώματος 4,8 μ M όπου το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό. Στη συνέχεια, για το χαρακτηρισμό του τύπου της αναστολής (K_m , V_{max} , K_i) πραγματοποιήθηκε η αντίδραση με 3 ή 4 διαφορετικές ισχυρές συγκεντρώσεις αναστολέα (οι τιμές των συγκεντρώσεων ήταν κοντά στην τιμή IC_{50}) σε 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Τα δεδομένα (συγκέντρωση υποστρώματος-ταχύτητα ενζύμου) αναλύθηκαν με πρόγραμμα το ενζυμικής κινητικής Grafit 4.

Όπου V_{max} = η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης

K_m = η συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία ο ρυθμός της αντίδρασης έχει φτάσει στο μισό της V_{max}

K_i = η συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία ο ρυθμός της αντίδρασης έχει φτάσει στο μισό της V_{max}

Το μείγμα της αντίδρασης (500 μ L) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 33 mM pH 7.5 με EDTA 0.1 mM, ξανθίνη (4.8 μ M) και εκχύλισμα ή κλάσμα καθαρών μορίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινούσε αμέσως μετά την προσθήκη 17 μ L οξειδάσης της ξανθίνης (2.55 u/mL αραιωμένο σε H_2O) (Πίνακας 10). Ο ρυθμός παραγωγής του ουρικού οξέος προσδιοριζόταν σε θερμοκρασία δωματίου στα 295 nm για 4 min. Κάθε δείγμα δοκιμαζόταν εις τριπλούν.

Πίνακας 8: Ποσότητες που προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης

| | Control | C₁ | C₂ | C₃ | C₄ | C₅ |
|------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Εκχύλισμα | - | 80μl (6) | 80μl (5) | 80μl (4) | 80μl (3) | 80μl (2) |
| Ρυθμιστικό | 403μl | 323μl | 323μl | 323μl | 323μl | 323μl |
| Ξανθίνη | 80μl | 80μl | 80μl | 80μl | 80μl | 80μl |
| XO | 17μl | 17μl | 17μl | 17μl | 17μl | 17μl |
| Τελ. όγκος | 500μl | 500μl | 500μl | 500μl | 500μl | 500μl |

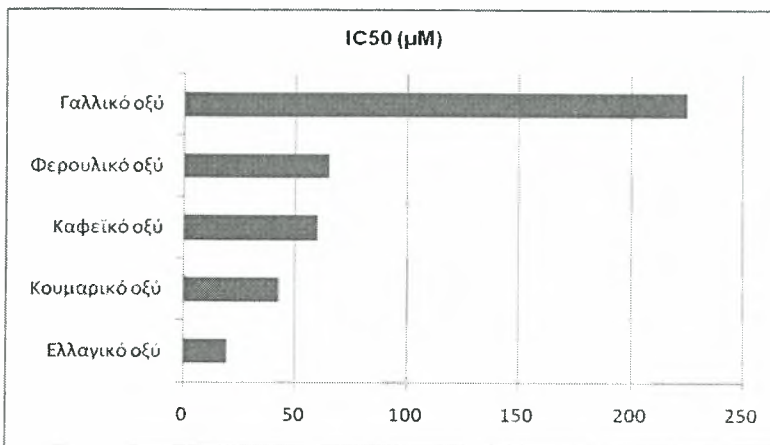
Επίσης, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του ενζύμου με την αλλοπουρινόλη ως μάρτυρα ανασταλτικής δράσης. Η αλλοπουρινόλη είναι εξειδικευμένος και ισχυρός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης με IC₅₀ 2,1μM.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανασταλτική δράση καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται σε διάφορα τρόφιμα

Όλες οι πολυφαινολικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν παρουσίασαν ανασταλτική δράση στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Με βάση τις τιμές IC_{50} η σειρά δραστηριότητας είναι:

ελλαγικό οξύ > κουμαρικό οξύ > καφεϊκό οξύ > φερουλικό οξύ > γαλλικό οξύ



Γράφημα 4: Σύγκριση της ισχύος της ανασταλτικής δράσης των καθαρών πολυφαινολών σε σχέση με την τιμή IC_{50} .

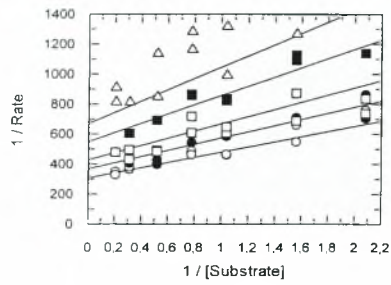
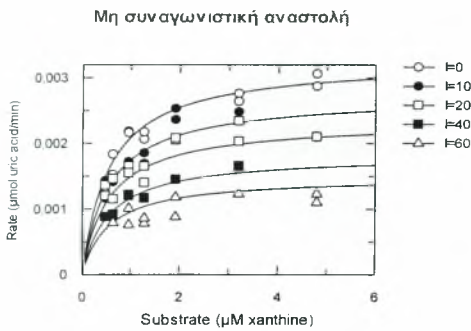
-Τύπος αναστολής

Από τις πέντε πολυφαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν το καφεϊκό, το ελλαγικό, το φερουλικό και το κουμαρικό οξύ εμφάνισαν μη συναγωνιστική αναστολή ενώ το γαλλικό εμφάνισε συναγωνιστική αναστολή.

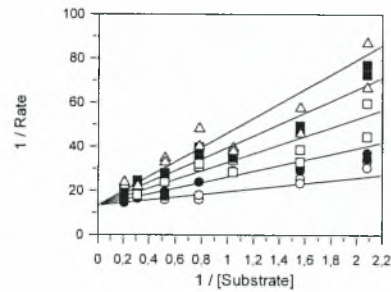
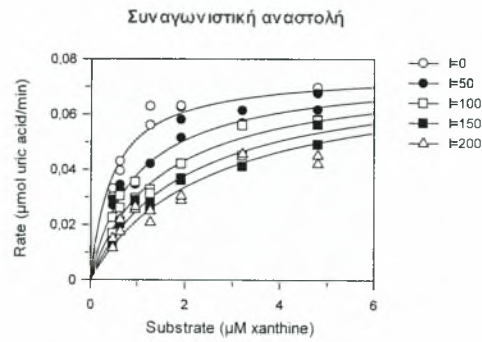
| | K_m (μ M) | V_{max} (μ mol ουρικού οξέος/min) | K_i (μ M) | Τύπος αναστολής |
|---------------|------------------|--|------------------|------------------|
| Καφεϊκό οξύ | 0,5621 | 0,0033 | 50,73 | Μη συναγωνιστική |
| Γαλλικό οξύ | 0,4742 | 0,0753 | 47,14 | Συναγωνιστική |
| Ελλαγικό οξύ | 0,2487 | 0,0015 | 10,76 | Μη συναγωνιστική |
| Φερουλικό οξύ | 0,4920 | 0,0026 | 52,70 | Μη συναγωνιστική |
| Κουμαρικό οξύ | 0,2227 | 0,0033 | 43,59 | Μη συναγωνιστική |

-Γραφήματα

Γράφημα 5: Καφεϊκό οξύ

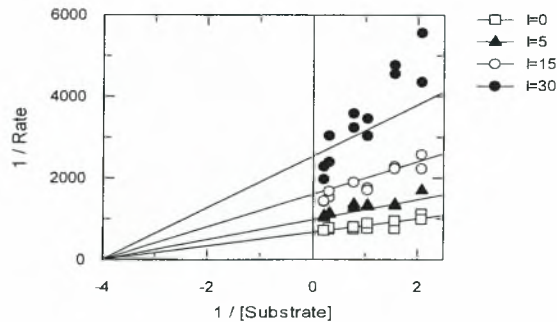
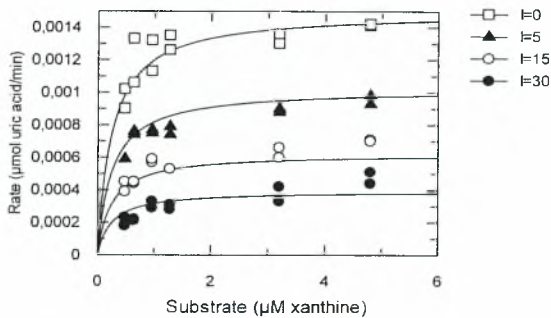


Γράφημα 6: Γαλλικό οξύ



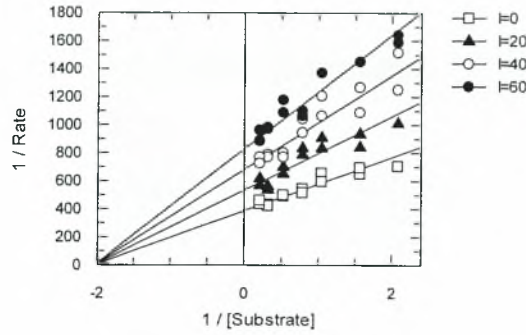
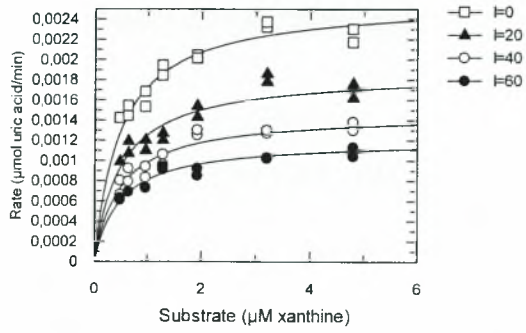
Γράφημα 7: Ελλαγικό οξύ

Μη συναγωνιστική αναστολή



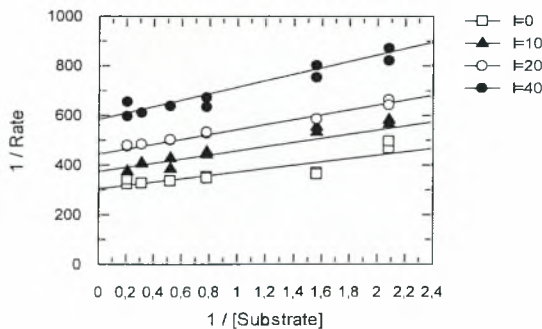
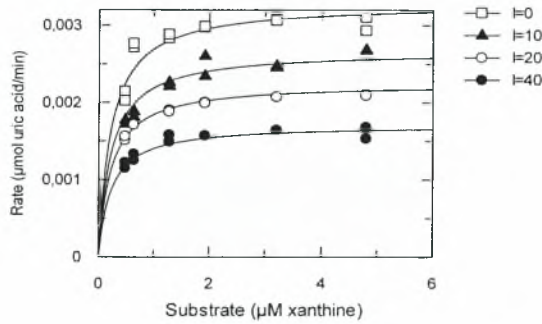
Γράφημα 8: Φερουλικό οξύ

Μη συναγωνιστική αναστολή



Γράφημα 9: Κουμαρικό οξύ

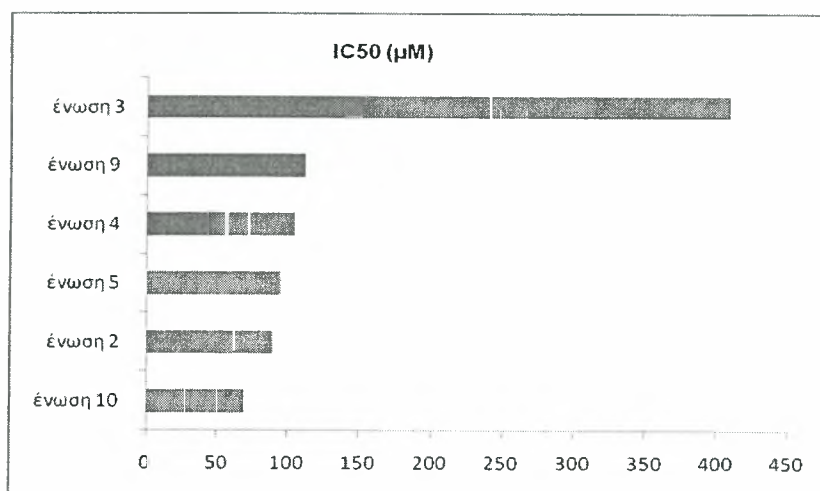
Μη συναγωνιστική αναστολή



4.2 Ανασταλτική δράση καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από ψυχανθή

Όλα τα καθαρά μόρια που δοκιμάστηκαν εμφάνισαν ανασταλτική δράση στη δραστηριότητα της οξειδάση της ξανθίνης. Με βάση τις τιμές IC_{50} η σειρά δραστηριότητας είναι:

ένωση 10 > ένωση 2 > ένωση 5 > ένωση 4 > ένωση 9 > ένωση 3



Γράφημα 10: Σύγκριση της ισχύος της ανασταλτικής δράσης των καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από ψυχανθή σε σχέση με την τιμή IC_{50} .

- Τύπος αναστολής

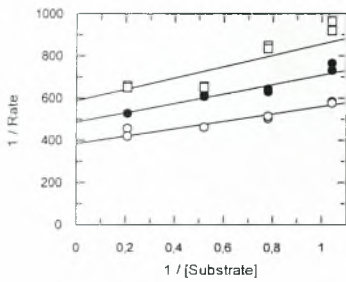
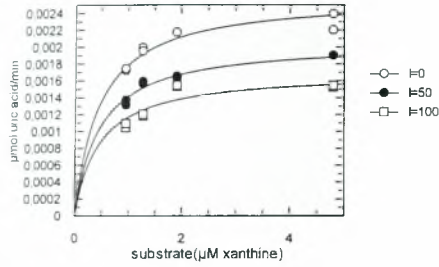
Από τα έξι μόρια που μελετήθηκαν όλα εμφάνισαν μη συναγωνιστική αναστολή.

| Ενώσεις | K_m (μ M) | V_{max} (μ mol ουρικού οξέος/min) | K_i (μ M) | Τύπος αναστολής |
|---------|------------------|--|------------------|------------------|
| 2 | 0,4583 | 0,0026 | 188,79 | Μη συναγωνιστική |
| 4 | 0,2801 | 0,0027 | 700,36 | Μη συναγωνιστική |
| 5 | 0,4539 | 0,0017 | 344,90 | Μη συναγωνιστική |
| 9 | 0,4124 | 0,0031 | 209,07 | Μη συναγωνιστική |
| 10 | 0,2198 | 0,0017 | 178,70 | Μη συναγωνιστική |
| 3 | 0,5062 | 0,0017 | 768,29 | Μη συναγωνιστική |

-Γραφήματα

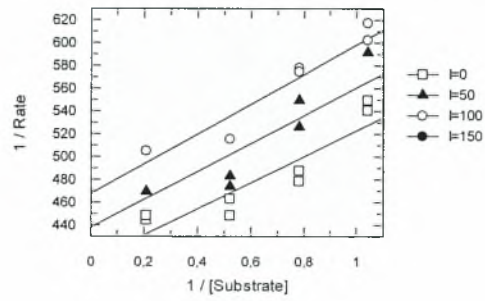
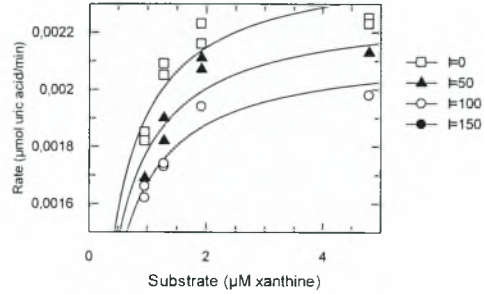
Γράφημα 11: Ένωση 2

Μη συναγωνιστική αναστολή



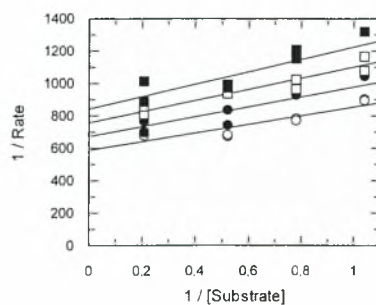
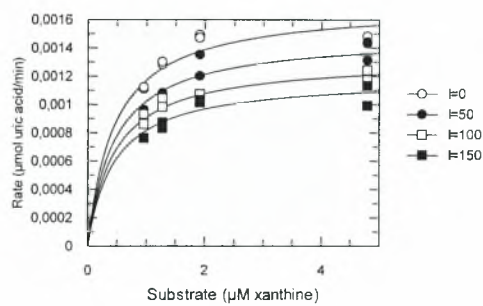
Γράφημα 12: Ένωση 4

Μη συναγωνιστική αναστολή



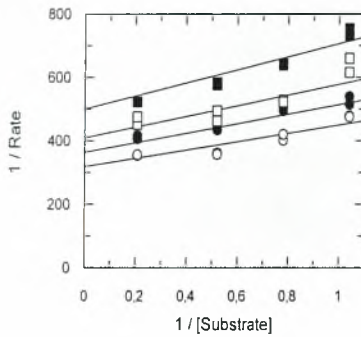
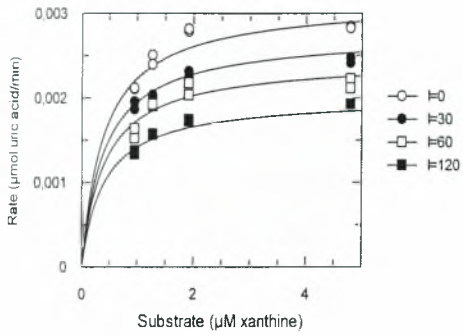
Γράφημα 13: Ένωση 5

Μη συναγωνιστική αναστολή



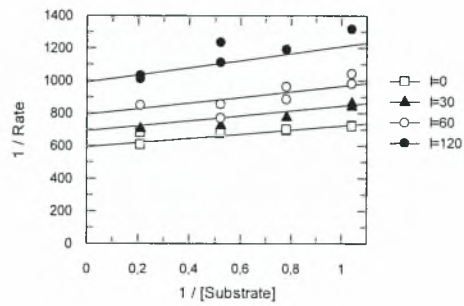
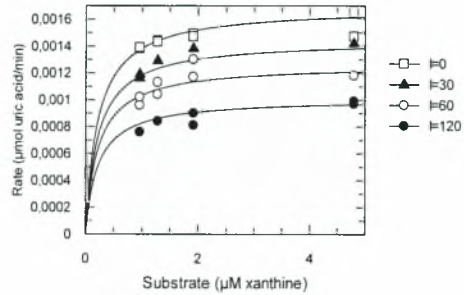
Γράφημα 14: Ένωση 9

Μη συναγωνιστική αναστολή



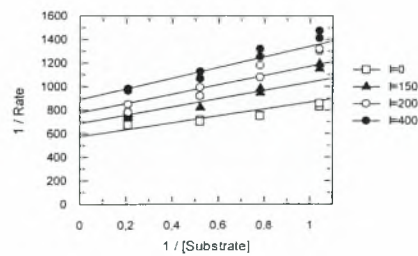
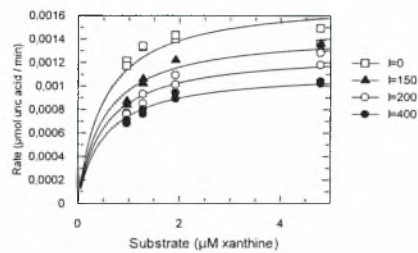
Γράφημα 15: Ένωση 10

Μη συναγωνιστική αναστολή



Γράφημα 16: Ένωση 3

Μη συναγωνιστική αναστολή



5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολυφαινόλες είναι άφθονα μικροσυστατικά της διατροφής. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και εμπλέκονται στην άμυνα ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία και την προσβολή από παθογόνα (Manach C. et al., 2004). Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, λιγνάνια, στυλβένια) ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και των δομικών στοιχείων που ενώνουν τους δακτυλίους μεταξύ τους (Manach C. et al., 2004). Από ένα μεγάλο αριθμό ερευνών έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις, ως βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων, παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, χημειοπροστατευτικές αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Manach C. et al., 2004). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν επίδραση στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Cotelle N. 2001).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν καθαρές πολυφαινόλες, που εντοπίζονται σε τρόφιμα και καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών. Σκοπός της εργασίας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης αυτών των ενώσεων στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στα πλαίσια αναζήτησης φυσικών αναστολέων του ενζύμου. Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πουρινών (Harrison R., 2002, Hille R., 2006) και κατά την διάρκεια της άσκησης καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με παράλληλη παραγωγή ελευθέρων ριζών (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$) (McCord and Fridovich, 1968). Έχει, επίσης, βρεθεί ότι πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν αναστολή στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (Cotelle N. 2001, Lin JK et al., 2000, Nagao A. et al., 1999).

Συνολικά μελετήθηκαν 5 καθαρές πολυφαινόλες που εντοπίζονται σε τρόφιμα και 6 καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από ψυχανθή. Όλες οι πολυφαινόλες εμφάνισαν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης με πιο δραστικό το ελλαγικό οξύ και λιγότερο δραστικό το γαλλικό οξύ. Με βάση τις τιμές IC_{50} η σειρά δραστηριότητας είναι:

ελλαγικό οξύ (IC_{50} 20 μ M) > κουμαρικό οξύ (IC_{50} 43 μ M) > καφεϊκό οξύ (60 IC_{50} μ M)
> φερουλικό οξύ (IC_{50} 65 μ M) > γαλλικό οξύ (IC_{50} 225 μ M).

Το γαλλικό οξύ βρέθηκε ότι είναι συναγωνιστικός αναστολέας ενώ το ελλαγιικό, το κουμαρικό, το φερούλικό και το καφεϊκό οξύ είναι μη συναγωνιστικοί αναστολείς. Παρατηρήθηκε ότι το καφεϊκό και το φερούλικό οξύ, τα οποία έχουν παρόμοια χημική δομή, έχουν και παραπλήσιες τιμές IC_{50} (60 μ M και 65 μ M αντίστοιχα). Το ελλαγιικό οξύ, που είναι και το πιο δραστικό έχει πολύ διαφορετική δομή από τις υπόλοιπες 4 πολυφαινόλες (όπως φαίνεται και στον πίνακα 4), των οποίων η δομή είναι παραπλήσια. Το γαλλικό οξύ, που έχει τη μικρότερη δραστικότητα με τιμή IC_{50} =225 μ M, στον εξαμελή δακτύλιο φέρει τρεις -OH ενώ οι υπόλοιπες πολυφαινόλες φέρουν το πολύ δύο. Πιθανώς, η παρουσία μίας επιπλέον -OH να μειώνει τη δραστικότητα.

Από τα καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από ψυχανθή το πιο δραστικό είναι η ένωση 10 και το λιγότερο δραστικό η ένωση 3. Με βάση τις τιμές IC_{50} η σειρά δραστικότητας είναι:

ένωση 10 (IC_{50} 70 μ M) > ένωση 2 (IC_{50} 90 μ M) > ένωση 5 (IC_{50} 95 μ M) > ένωση 4 (IC_{50} 105 μ M) > ένωση 9 (IC_{50} 112 μ M) > ένωση 3 (IC_{50} 410 μ M).

Όλα τα παραπάνω μόρια είναι μη συναγωνιστικοί αναστολείς προσδένονται, δηλαδή, στο ένζυμο σε σημείο διαφορετικό από το ενεργό του κέντρο. Τα μόρια προέρχονται από μίγματα πολυφαινολικών ενώσεων, που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών. Από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου παρατηρήθηκε ότι τα μίγματα αυτά παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης (πίνακας 10- παράρτημα). Έτσι, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η ανασταλτική δράση των μειγμάτων αποδίδεται στα επιμέρους συστατικά τους.

Τα μόρια αυτά είναι γλυκοσίδια κερκετίνης και καιμπερόλης (πίνακας 11- παράρτημα). Η κερκετίνη και η καιμπερόλη είναι φλαβονοειδή, τα οποία είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης με τιμές IC_{50} 2,62 μ M και 1,06 μ M, αντίστοιχα (Cotelle N. 2001). Η μελέτη της σχέσης δομής-δράσης των φλαβονοειδών ως αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις C-5 και C-7 και ο διπλός δεσμός ανάμεσα στον C-2 και C-3 ευνοούν την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών. Ωστόσο, η παρουσία μιας υδροξυλικής ομάδας στον C-3 και η γλυκοσυλίωση των υδροξυλομάδων μειώνει ελαφρώς την ανασταλτική τους δράση (Cotelle N. 2001, Nagao A. et al., 1999). Τα γλυκοσίδια κερκετίνης και καιμπερόλης που

μελετήθηκαν έχουν τον διπλό δεσμό στις θέσεις C-2 και C-3. Ωστόσο, η θέση C-7 είναι γλυκοσυλιωμένη. Η παρουσία του σακχάρου ίσως είναι υπεύθυνη για την μικρότερη δράση των μορίων στην οξειδάση της ξανθίνης.

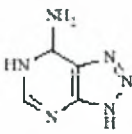
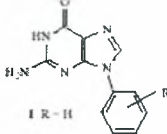
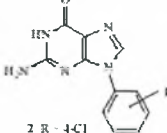
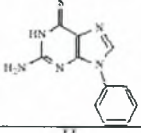
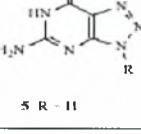
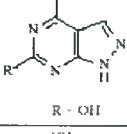
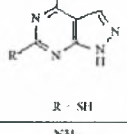
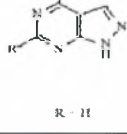
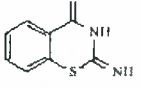
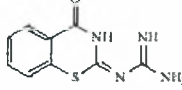
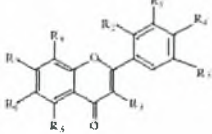
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι ενώσεις που μελετήθηκαν εμφάνισαν συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή στην οξειδάση της ξανθίνης. Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για τη σύνδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας προσδένεται σε κάποιο άλλο σημείο του ενζύμου και όχι στο ενεργό του κέντρο. Για τον ακριβή μηχανισμό της μη συναγωνιστικής αναστολής και γενικότερα για τον τρόπο πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο πρέπει να γίνει κρυστάλλωση τόσο του ενζύμου όσο και των μορίων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν βρέθηκε ότι όλα τα καθαρά μόρια που δοκιμάστηκαν είναι φυσικοί αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης. Ωστόσο, η ανασταλτική τους δράση παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις της τάξης μM ενώ θα έπρεπε να είναι της τάξης nM ώστε να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικά στοιχεία όπως συμβαίνει με την αλλοπουρινόλη, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας. Επίσης, η δράση τους απέναντι στην οξειδάση της ξανθίνης δεν είναι εξειδικευμένη αλλά πλειοτροπική (Cotelle N. 2001). Η αλλοπουρινόλη, αντίθετα, έχει IC_{50} $2,1\mu\text{M}$ και είναι δομικό ισομερές της υποξανθίνης κι έτσι παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια με την οξειδάση της ξανθίνης.

Συμπερασματικά, τόσο οι καθαρές πολυφαινόλες που εντοπίζονται σε τρόφιμα όσο και τα καθαρά μόρια που απομονώθηκαν από ψυχανθή παρουσίασαν ανασταλτική δράση στην οξειδάση της ξανθίνης. Οι παραπάνω ουσίες πέραν του ότι μειώνουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών προκαλούν και μείωση του παραγόμενου ουρικού οξέος, που είναι ένα απ' τα σημαντικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού. Λαμβάνοντας υπόψη το διπλό ρόλο του ενζύμου (αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος), η χορήγηση των μορίων που μελετήθηκαν τόσο ως διατροφικών παραγόντων όσο και ως αντιοξειδωτικών πριν την άσκηση χρήζει περαιτέρω μελέτης.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

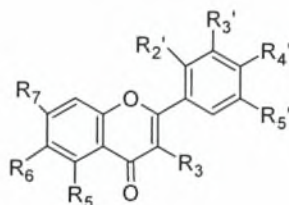
Πίνακας 9: Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

| | |
|--|--|
| 8 azaadenine |  |
| 9-phenylguanine |  |
| 9-(p chlorophenyl)guanine |  |
| 9-phenyl-6-thioguanine |  |
| 8-azaguanine |  |
| 4-amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine |  |
| 4-amino-6-mercaptopyrazolo[3,4-d]pyrimidine |  |
| 4aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidine |  |
| 2-amino-4H-1,3-benzothiazin-4-one |  |
| 2-guanidino-4H-1,3-benzothiazin-4-one |  |
| Apigenin |  |

Πίνακας 10: Εκχυλίσματα ψυχανθών

| Κλάσματα από εκχύλισμα <i>Vicia faba</i> | IC ₅₀ (μg/mL) | r | Ενώσεις | Αναλογία ενώσεων |
|---|-----------------------------|-------|--------------------------|---------------------|
| VfN | 40 | 0.981 | 7:8 | 2:1 |
| VfP | 55 | 0.966 | 9:10 | 1:1 |
| VfE | 66 | 0.972 | 3:4 | 3:1 |
| VfI | 72 | 0.981 | 5:6 | 1:4 |
| VfK | 72 | 0.926 | 5:10:6 | 4:1:2 |
| VfC | 85 | 0.913 | 1:2 | 2:1 |
| VfL | 94 | 0.983 | Μίγμα μη πολικών ενώσεων | |
| VfQ | 95 | 0.960 | 5:10 | 2:3 |
| VfF | 115 | 0.950 | 3:4 | 2:1 |
| VfB | 135 | 0.900 | 1:2:3 | 3:1:3 |
| Μεθ. εκχύλισμα <i>V. faba</i> | 540 | 0.983 | | |
| Κλάσματα από εκχύλισμα <i>Lotus edulis</i> | IC ₅₀ (μg/mL) | r | Ενώσεις | Αναλογία ενώσεων |
| Le E | 55 | 0.982 | 11 a,b(ισομερή) | 1:1 |
| Le O | 90 | 0.963 | 12 | 1 |
| Le B | 97 | 0.933 | 13 | 1 |
| Le N | 260 | 0.983 | 7 | 1 |
| | | 0.982 | | |
| Μεθ. εκχύλισμα <i>L.edulis</i> | 410 | | | |

Πίνακας 11: Δομές κερκετίνης και καιμπερόλης



| ενώσεις | R ₃ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | R ₂ ' | R ₃ ' | R ₄ ' | R ₅ ' |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Κερκετίνη | OH | OH | H | OH | H | OH | OH | H |
| Καιμπερόλη | OH | OH | H | OH | H | H | OH | H |

Πίνακας 12: Ονοματολογία καθαρών ενώσεων που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα ψυχανθών

| Καθαρή ένωση | Όνομα | MB |
|--------------|--|--------|
| 2 | 3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλο)-γλυκοπυρανοσυλο-7- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη | 756,66 |
| 3 | ιονόνη | 386 |
| 4a, 4b | 3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη | 740,66 |
| 5 | 3- <i>O</i> -γαλακτοπυρανοσυλο-7- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη | 594,52 |
| 9 | 3- <i>O</i> -αραβινοπυρανοσυλο-7- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη | 564,49 |
| 10 | 3- <i>O</i> -γλυκοπυρανοσυλο-7- <i>O</i> -ραμνοπυρανοσυλοκαιμπερόλη | 594,52 |

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
2. Atlante A, Gagliardi S, Minervini GM, Ciotti MT, Marra E, Calissano P (1997). Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation. *J. Neurochem.*, 68,2038.
3. Atlante A, Passarella S (1999). Detection of reactive oxygen species in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res. Prot.*, 4,266.
4. Avis PG, Bergel F, Bray RC (1956). *J. Biol. Chem.*;253,1219.
5. Baker BR, Hendrickson JL (1967). *J. Pharm. Sci.*, 8,955.
6. Battelli MG, Lorenzoni E, Stirpe F (1973). *Biochem. J.*, 131,191.
7. Beckman JS, Parks DA, Pearson JD, Marshall PA, Freeman BA (1989). A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radical Biol. Med.*, 6-607.
8. Beekrum S, Govinden R, Padayachee T, Odhav B (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B-1. *Food Add. Contam.*20:490-493.
9. Burda S, Oleszek W, Lee CY (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J Agric Food Chem*;38:945-8.
10. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger Rd, Rosas GO, Kobeis ZA, Marban E, hare JM (2001).Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*; 104: 2407-2411.
11. Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
12. Chang W, Chang Y, Lu F, Chiang H (1994). Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, 14,501.
13. Cotelle N, Bernier JL, Henichart JP, Catteau JP, Gaydou E, Wallet JC (1992). Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free radic. Biol. Med.*;13:211-219.
14. Darmon N, Fernandez Y, Periquet A, Mitjavila S (1992). Superoxide anion scavenging capacity measured by a polarographic method. Comparison with a colorimetric method. *Free Radical Res. Commun.*, 17,97.

15. Davis KJ (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262:9895-9901.
16. Della Corte E, Stirpe F (1972). *Biochem. J.*, 126,739.
17. Desco MC, Asensi M, Marquez-Valls J, Vento MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type I diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*; 51: 1118-1124.
18. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115.
19. Downey JM (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52: 487-504.
20. Elion GB (1993). The quest for a cure. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33,1.
21. Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology* 72:153-165.
22. Ferdinandy P, Danial H, ambrus I, Rothery RA, Schulz R (2000). Peroxynitrite is amajor contributor to cytokine- induced myocardial contractile failure. *Circ Res*; 87:241-247.
23. Ferdinandy P, Panas D, Schulz R (1999). Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardia efficiency in isolated working rat hearts. *Am J Physiol*; 276: H1861-H1867.
24. Fridovich I (1970). Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*;245:4053-4057.
25. Goldberg DM, Hahn SE, Parkes JG (1995). Beyond alcohol:beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta*;237:155.
26. Grune T, Reinheckei T, Davies KJA (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEBJ* 11:526-534.
27. Halliwell B (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?*Am J Clin Nutr* 72:1082-1087.
28. Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford Univesrity Press, Midsomer Norton, Avon, England.

29. Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). Free radicals in biology and medicine (2nd ed.) Oxford: *Clarendon Press*, pp 136-158.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE (1992). *J. Lab. Clin. Med.*;119:598-620.
31. Harris CM, Massey V (1997). The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J. Biol. Chem.*, 272,8370.
32. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300:156-166.
33. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, Bangsbo J (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *American Journal of Physiology*;274:E600-E606.
34. Hille R. (2006). Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase. *European Journal of Inorganic Chemistry* ; (10): 1905–2095.
35. Hodgson EK, Fridovich I (1973). The role of O₂⁻ in the chemiluminescence of luminal. *Photobiol.*, 18,451.
36. Hodgson EK, Fridovich I (1976). The accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase. A requiem for H₂O₄. *Biochim Biophys. Acta*, 430,182.
37. Ichimori K, Fukahori M, Nakazawa H, Okamoto K, Nishino T (1999). Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. *J. Biol. Chem.*, 274,7763.
38. Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J (1995). Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglycosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*;1234:99-104.
39. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*;275:218-220.
40. Janssen M, de Jong JW, Pasini E, Ferrari R (1993). Myocardial xanthine oxidoreductase activity in hypertensive and hypercholesterolemic rats. *Cardio-science*; 4: 25-29.

41. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635.
42. Kanner J and Lapidot T (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31: 1388-1395.
43. Kaviarasan S, Vijayalakshmi K, Anuradha CV (2004). Polyphenol-rich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage. *Plant foods Hum. Nutrition*;59:143-147.
44. Kim JH, Ryan MG, Knaut H, Hille R (1996). The reductive half-reaction of xanthine oxidase. The involvement of prototropic equilibria in the course of the catalytic sequence. *J. Biol. Chem.*, 271,6771.
45. Koren HS (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect* 103: 235-242.
46. Kramer SP, Johnson JL, Ribeiro AA, Millington DS, Rajagopalan KV (1987). The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di-(carboxamidomethyl) molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem*;262,16357.
47. Kuppusamy P and Zweier JL (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264: 9880-9884.
48. Lacy F, Gough DA, Schmid-Schonbein GW (1998). Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radical Biol. Med.*, 25,720.
49. Leyva F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ (1998). Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur heart J*;19: 1814-1822.
50. Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA (1998). Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J. Biol. Chem.*, 272,2015.
51. Lijinsky W (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 443: 129-138.
52. Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J (1990). *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL: CRC Press.
53. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*; 79:727-47.

54. Margolin Y, Berhman HR (1992). Xanthine oxidase and dehydrogenase activities in rat ovarian tissues. *Am. J. Physiol.*, 262,E173.
55. Massey V, Brumby PE, Komai H, Palmer G (1969). *J. Biol. Chem.*;244,1682.
56. Maxwell SR, Jakeman P, Thomason H, Leguen C, Thorpe GH (1993). Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Radical Research Communications*;19:191-202.
57. Mayo L, Curnutte JT (1990). Kinetic microplate assay for superoxide production b neutrophils and other phacytic cells. *Methods Enzymol.*, 186,567.
58. Merenyi G, Lind J, Eriksen TE (1985). *Photochem. Photobiol.*, 11,203.
59. Meydani M and Evans WJ (1993). Free radicals, exercise and aging. In: Yu BP, Ed *Free Radicals in Aging* Boca raton, FL: CRC Press, pp 183-204.
60. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*;52:673-751.
61. Mikami T, yoshino Y, Ito A (2000). Does a relationship exist between the urate pool in the body and lipid peroxidation during exercise? *Free Radical Research*;32:31-39.
62. Mukhtar H, Ahmad (2000). Tea polyphenols:prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutrition*;71:1698S-1702S.
63. Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295-309.
64. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 43:30S-34S.
65. Nishino T (1994). *J. Biochem*;116,1.
66. Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelan L (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res* 906:170-175.
67. Okamoto K, Nishino T (1995). Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with anew tight binding inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 270,7816.

68. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta*;237:207-219.
69. Palmer G, Massey V (1969). Electron paramagnetic resonance and circular dichroism studies on milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*;244,2614.
70. Palmerini CA, Carlini E, Saccardi C, Servili M, Montedoro G, Arienti G (2005). Activity of olive oil phenols on lymphomonocyte cytosolic calcium. *J. Nutr. Biochem*;16:109-113.
71. Price KR, Bacon JR, Rhodes MJC (1997). Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion. *J Agric Fod Chem*;45:1523-40.
72. Pyne DB (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med* 17: 245-258.
73. Radi R, Rubbo H, Thomson L, Prodavon E (1990). Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates. *Free Radical Biol. Med.*, 8,121.
74. Rasmussen JT, Rasmussen MS, Petersen Te (2000). Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase. *J. Dairy Sci.* 83,499.
75. Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 24: 191-200.
76. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Boil. Med.*;20:933-956.
77. Saksela M, Lapatto R, Rainio KO (1998). Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biol. Neonate* 74, 274.
78. Saksela M, Lapatto R, Rainio KO (1999). Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS Lett.*443,117.
79. Sanhueza J, valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A (1992). Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected

- to ischemiareperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res. Commun. Chem. Pthol. Pharmacol.* 78, 211.
80. Shahidi F, Naczki M (1995). *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications.* Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc.
 81. Spanos GA, Wrolstad RE (1992). Phenolics of apple, pear and white grape juice and their changes with processing and storage. *J Agric Food Chem*;40:1478-87.
 82. Stadtman ER (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci* 11: 11-12.
 83. Terao J, Piskula M, Yao Q (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*;308:278-284.
 84. Tsutomu H, Taeko Y, Rieko Y, Yukihiro I, Muneto M, Kazufumi Y, Isao A, Sansei N, Tadataka N, Masa Y, Takuo O (1991). *Planta Med*;57:83-84.
 85. Van Acker SABE, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*;20:331-342.
 86. Van der Sluis AA, Decker M, de Jager A, Jongen WM (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J Agric Food Chem*;49:3606-13.
 87. Victoria K (1994). Review on the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res* 317 : 43-55.
 88. Wormser U, Sintov A, Brodsky B, Nyska A (2000). Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol* 169: 33-39.
 89. Yanai H, Morimoto M (2004). Effect of ascorbate on serum lipids and urate metabolism during exhaustive training. *Clinical Science*;106:107-109.
 90. Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.