

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίδραση εκγυλισμάτων από σταφύλια στην ενζυμική δραστηριότητα
της υπεροξειδικής δισμουτάσης**



ΠΑΛΑΙΟΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8180/1
Ημερ. Εισ.: 27-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΠΑΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087089

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίδραση εκχυλισμάτων από σταφύλια στην ενζυμική δραστικότητα
της υπεροξειδικής δισμουτάσης**

Παλαιογιάννης Δημήτριος

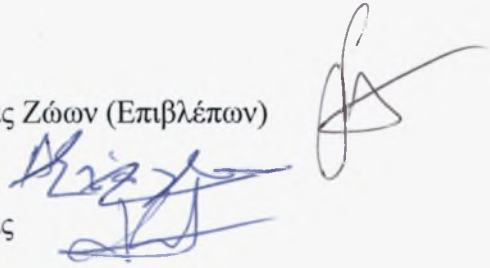
ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων (Επιβλέπων)

Στάγκος Δημήτριος, Διδάσκων ΠΔ 407/80

Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορας Φαρμακολογίας



Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψηφίους διδάκτορες Αριστεΐδη Βεσκούκη και Χρύσα Σπανού για την αμέριστη βοήθειά τους και καθοδήγηση που μου προσέφεραν, τόσο στην διεκπεραίωση των πειραμάτων, όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής εργασίας καθώς και για την υπομονή τους και την προθυμία τους να απαντήσουν όλες τις απορίες μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου, για την πολύ καλή συνεργασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1.1. Ποικιλίες αμπέλου και τμήματα του σταφυλιού	9
1.1.2. Ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού και των σταφυλιών στην υγεία	10
1.2.1. Κατηγορίες πολυφαινολών	12
1.2.2. Φαινολικά οξέα	13
1.2.3. Φλαβονοειδή	14
1.2.4. Λιγνάνια	16
1.2.5. Σπλβένια	17
1.2.6. Αντιοξειδωτική και προοξειδωτική των πολυφαινολικών ενώσεων	18
1.3.1. Ελεύθερες ρίζες	18
1.3.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	19
1.4. Αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	22
1.5. Οξειδωτικό στρες – συσχετισμός των ελευθέρων ριζών με ασθένειες και άσκηση	25
1.6.1. Υπεροξειδική δισμουτάση	27
1.6.2. Ισομορφές και πρωτεϊνική δομή τους	28
1.6.3. Προσδιορισμός δραστηριότητας της SOD μέσω της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης	29
1.6.4. Αναστολείς της SOD	31
1.7. Σκοπός	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1. Υλικά	33
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	33
2.1.2. Προετοιμασία αιμολύματος	33
2.1.3. Εκχυλίσματα	33
2.2.1. Αρχή της μεθόδου	35
2.2.2. Συστατικά της αντίδρασης	35
2.3. Πειραματική διαδικασία	36
2.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πυρογαλλόλης για την οποία το ένζυμο της SOD βρίσκεται σε κορεσμό	36
2.3.2. Επίδραση εκχυλισμάτων στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης παρουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης	37
2.3.3. Επίδραση εκχυλισμάτων στην αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης απουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης	38
2.4. Υπολογισμός επαγωγής της υπεροξειδικής δισμουτάσης (PC ₅₀)	38
2.5. Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
3.1. Αποτελέσματα από τη μέτρηση της απορρόφησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης	40

3.2. Επίδραση εκχυλισμάτων από σταφύλια στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης	41
3.3. Επίδραση εκχυλισμάτων από στέμφυλα στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης	42
3.4. Επίδραση εκχυλισμάτων από βόστρυχους στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης	43
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ποικιλίες σταφυλιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα

Πίνακας 2: Τα εκχυλίσματα από βόστρυχους που μελετήθηκαν

Πίνακας 3: Τα εκχυλίσματα από στέμφυλα που μελετήθηκαν

Πίνακας 4: Τα εκχυλίσματα από σταφύλια που μελετήθηκαν

Πίνακας 5: Οι προστιθέμενοι όγκοι στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα από τη μέτρηση της απορρόφησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης.

Πίνακας 7: Οι προστιθέμενοι όγκοι στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες για τον έλεγχο επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης παρουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Πίνακας 8: Οι προστιθέμενοι όγκοι στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες για τον έλεγχο επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία της SOD.

Πίνακας 9: Επίδραση εκχυλισμάτων από σταφύλια στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Πίνακας 10: Επίδραση εκχυλισμάτων από στέμφυλα στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Πίνακας 11: Επίδραση εκχυλισμάτων από βόστρυχους στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Πίνακας 12: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών)

Πίνακας 13: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων στέμφυλων

Πίνακας 14: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων βοστρύχων

ΠΕΡΙΟΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ταχύτητας της αντίδρασης-Συγκέντρωσης της πυρογαλλόλης

Διάγραμμα 2: Διάγραμμα σύγκρισης PC₅₀ μεταξύ των σταφυλιών

Διάγραμμα 3: Διάγραμμα σύγκρισης PC₅₀ μεταξύ των βόστρυχων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: *Vitis vinifera*

Εικόνα 2: Χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών οξέων και υδροξυκιναμικών οξέων

Εικόνα 3: Χημική δομή φλαβονοειδών

Εικόνα 4: Χημική δομή της σεκοΐσολαρισερινόλης και της ματαιρεσινόλης και των παραγώγων τους εντεροδιόλη και εντερολακτόνη

Εικόνα 5: Χημική δομή ρεσβερατρόλης

Εικόνα 6: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου

Εικόνα 7: Παραγωγή ελεύθερων ριζών στην αναπνευστική αλυσίδα

Εικόνα 8: Παράγοντες που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών

Εικόνα 9: Χημική δομή γλουταθειόνης

Εικόνα 10: Μονοπάτι των αντιοξειδωτικών ενζύμων

Εικόνα 11: Διαταραχή ισορροπίας (οξειδωτικό στρες)

Εικόνα 12: Cu/Zn SOD

Εικόνα 13: Mn SOD

Εικόνα 14: Εξωκυττάρια SOD

Εικόνα 15: Δομή της πυρογαλλόλης

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

$O_2^{\bullet -}$: ανιόν του σουπεροξειδίου

OH^{\bullet} : ρίζα του υδροξυλίου

RO^{\bullet} : ρίζα του αλκοξυλίου

ROS: Reactive oxygen species (Δραστικές μορφές οξυγόνου)

SOD: superoxide dismutase (Υπεροξειδική δισμουτάση)

CAT: καταλάση

SOD: υπεροξειδική δισμουτάση

GPX: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GR: αναγωγή της γλουταθειόνης

GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG: γλουταθειόνη οξειδωμένη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα σταφύλια και το κρασί έχουν κερδίσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς έχουν ευεργετικές βιολογικές δράσεις που οφείλονται κυρίως στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Από τις σημαντικότερες βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι οι αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιών στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Η SOD είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει την οξείδωση του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\bullet-}$) σχηματίζοντας H_2O_2 και O_2 . Για την επίτευξη του στόχου μελετήθηκαν δέκα εκχυλίσματα σταφυλιών, πέντε εκχυλίσματα στέμφυλων και δώδεκα εκχυλίσματα βοστρύχων ελληνικών ποικιλιών στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης μέσω αναστολής της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης. Για να αποσαφηνιστεί αν αυτή η αναστολή της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης, όσα εκχυλίσματα παρουσίασαν δράση παρουσία του ενζύμου της SOD, επανεξετάστηκαν απουσία της SOD. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν σημαντικές ενδείξεις για την επαγωγική δράση των εκχυλισμάτων στέμφυλων και βοστρύχων Σαντορίνης. Από τα εκχυλίσματα που επανεξετάστηκαν ορισμένα εμφάνισαν δράση απουσία της SOD, γεγονός που σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα δεν επάγουν μόνο τη SOD, αλλά έχουν και αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση που παρουσίασαν τα εκχυλίσματα αυτά οφείλεται στις πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχουν.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. Ποικιλίες αμπέλου και τμήματα του σταφυλιού

Το *V. Vinifera* (Εικόνα 1.12) είναι αγγειόσπερμο φυτό, ανήκει δε στην τάξη των Ραμνωδών και στην οικογένεια των Αμπελοειδών. Πιθανότατα προέρχεται από τα όρη του Καυκάσου, είναι το κυριότερο οινοπαραγωγικό φυτό. Η υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη των περισσότερων ποικιλιών του *V. vinifera* όταν φτάσουν στην ωρίμανση είναι ο κυριότερος παράγοντας για την επιλογή αυτών των ποικιλιών στην παραγωγή κρασιών σε όλο τον κόσμο. Το υψηλό περιεχόμενο σε ζάχαρη, το οποίο παρέχει το απαραίτητο υπόστρωμα για τη ζύμωση, είναι αρκετό ώστε να παράγει κρασί με 10% η και περισσότερο σε αλκοόλ. Κρασιά που περιέχουν λιγότερο αλκοόλ είναι ιδιαίτερα ασταθή λόγω της ευαισθησίας σε φθορά από βακτηρίδια. Η μέση οξύτητα των ωρίμων σταφυλιών ποικιλιών του είδους *V. vinifera* είναι επίσης κατάλληλη για την παραγωγή κρασιών. Ο καρπός έχει οξύτητα μικρότερη από 1 τοις εκατό (υπολογισμένο ως τρυγικό οξύ, το κύριο οξύ των σταφυλιών) και pH από 3.1 ως 3.7 (ελαφρώς όξινα). Το μηλικό οξύ είναι επίσης σημαντικό οξύ. Το κιτρικό οξύ βρίσκεται μόνο σε μικρή ποσότητα. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται αρκετές ποικιλίες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ποικιλίες σταφυλιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα

Ποικιλίες σταφυλιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα	
Από κόκκινα σταφύλια	Από λευκά σταφύλια
Αγιωργίτικο	Αθήρι
Βερτζαμί	Αηδάνι
Κοτσιφάλι	Ασύρτικο
Κρασάτο	Βηλάνα
Λιάτικο	Δαφνί
Λημνιό	Μονεμβασιά
Μαντηλαριά	Μοσχάτο Λευκό
Μαυροδάφνη	Μοσχάτο Αλεξανδρείας
Μαύρο Μεσενικόλα	Μπατίκι
Μοσχάτο Αμβούργου	Ντεμπίνα
Μοσχοφίλερο	Πλυτό
Νεγκόσκα	Ροδίτης

Ξινόμαυρο

Ρομπόλα

Σαββατιανό

Μαλαγουζιά

Το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα ο βότρυς του σταφυλιού απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας ή τσαμπί και τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού. Τα στέμφυλα είναι το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους (κοτσάνια), τα γίγαρτα (κουκούτσια) και τους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό γλεύκους (αζύμωτου ή εν ζυμώσει) ή κρασιού ανάλογα με το βαθμό έκθλιψης / πίεσης τούτων (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: *Vitis vinifera*

1.1.2. Ενεργητικές ιδιότητες του κρασιού και των σταφυλιών στην υγεία

Το κρασί αποτελεί κομμάτι του ανθρώπινου πολιτισμού για 6000 χρόνια, προσφέροντας διατροφικές ιδιότητες και κοινωνικο-πολιτισμικές ιδιαιτερότητες. Παράγεται σε όλες τις ηπείρους και η χημική του σύσταση εξαρτάται από τις οινολογικές τεχνικές, την ποικιλία αμπέλου που χρησιμοποιήθηκε για να παραχθεί το κρασί και τους κλιματικούς παράγοντες της κάθε περιοχής. Το σταφύλι είναι πλούσιο σε βιταμίνη Α, βιταμίνη C, καθώς και σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β, ενώ από μεταλλικά στοιχεία περιέχει ασβέστιο (Ca), φώσφορο (P), κάλιο (K) και σίδηρο (Fe)

(Olga Juhasz et al., 1987). Είναι καλή πηγή υδατανθράκων λόγω των σταφυλοσακχάρων που περιέχει κι έτσι αποτελεί καλή πηγή ενέργειας για τον οργανισμό. Η βιταμίνη Α βοηθά στην καλή όραση, ενώ οι ανθοκυανίνες (χρωστικές που βρίσκονται κυρίως στα κόκκινα σταφύλια) δυναμώνουν τα αγγεία των ματιών κι επιβραδύνουν τη γήρανση της όρασης και την ανάπτυξη παθήσεων του αμφιβληστροειδούς. (G.Soleas et al. 1997). Οι πολυφαινόλες βρίσκονται μέσα στη φλούδα και στα κουκούτσια των σταφυλιών. Όταν κατασκευάζεται κρασί από τα σταφύλια, η αλκοόλη που δημιουργείται από τη ζύμωση, διαλύει τις πολυφαινόλες που περιέχονται μέσα στη φλούδα και στα κουκούτσια των σταφυλιών, καθώς οι πολυφαινόλες έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στην αιθανόλη. Το κόκκινο κρασί περιέχει περισσότερες πολυφαινόλες παρά το άσπρο κρασί, διότι η κατασκευή άσπρου κρασιού επιβάλλει την αφαίρεση της φλούδας των σταφυλιών μετά το λιώσιμο. Οι φαινόλες στο κόκκινο κρασί περιλαμβάνουν τα στιλβένια, τις κατεχίνες, τις επικατεχίνες και το γαλλικό οξύ.

Εκτός από την προστατευτική τους δράση για την όραση, οι ανθοκυανίνες μαζί με τις πολυφαινόλες, λόγω των εξαιρετικά αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, εμποδίζουν τη δημιουργία και τη δράση των ελευθέρων ριζών, ενισχύουν τα τοιχώματα των αγγείων και μειώνουν τις φλεγμονές, ασκώντας τόσο αντιγηραντική όσο και καρδιοπροστατευτική δράση. Τα φλαβονοειδή, που αφθονούν κι αυτά στο κόκκινο σταφύλι, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, προστατεύουν την καρδιά, τα αγγεία και τους πνεύμονες και τονώνουν το δέρμα. Το κρασί και ιδιαίτερα το κόκκινο κρασί περιέχει μια ποικιλία πολυφαινολών, οι οποίες έχουν ευεργετικές ιδιότητες. Οι πολυφαινόλες του κρασιού απαρτίζονται από τα φαινολικά οξέα (p-κουμαρικό, φερουλικό, σιναμικό, καφεϊκό, γεντιστικό και βανιλικό οξύ), τα τριυδροξυ-στιλβένια (ρεσβερατρόλη και πολυδατίνη) και τα φλαβονοειδή (κατεχίνη, επικατεχίνη και κερσετίνη). (G.Soleas et al. 1997). Μάλιστα έχει βρεθεί ότι τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο κουκούτσι του σταφυλιού, μειώνουν τη χοληστερίνη και βοηθούν στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Σε μέτρια κατανάλωση μπορεί να μειώσει τη θνησιμότητα από την στεφανιαία νόσου αυξάνοντας τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Έχει βρεθεί ότι η κερκετίνη και το ταννικό οξύ έχουν τη δυνατότητα να αποτρέψουν τη στένωση αρτηριών σε ποντικούς. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα τους να ρυθμίζουν την παραγωγή NO στο αγγειακό ενδοθήλιο. Το NO, παράγεται από την αργινίνη μέσω ενός ενζυμικού συμπλόκου. Θεωρείται πως είναι κύριος ρυθμιστής της αγγειακής

χαλάρωσης και επίσης αναστέλλει την προσκόλληση αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο (Keaney JF et al. 1995, Fitzpatrick DF et al. 1993). Επίσης, τα φλαβονοειδή είναι ισχυροί αναστολείς της cAMP φωσφοδιεστεράσης και cGMP φωσφοδιεστεράσης, γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της κυκλοοξυγενάσης και συνεπώς της παραγωγής thromboxane A₂. Η thromboxane A₂ παίζει σημαντικό ρόλο στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η κερκετίνη προκαλεί αναστολή της προστακυκλίνης στην ADP-εξαρτώμενη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων (Ferrell JE. 1979, Ruckstuhl M et al. 1979, Beretz A et al. 1981). Τέλος, μερικά φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, η ρουτίνη και η μορίνη μπλοκάρουν το μονοπάτι της 5-λιποοξυγενάσης των ανθρώπινων ουδετερόφιλων (Corvazier E et al. 1985). Η 5-λιποοξυγενάση συμμετέχει στη σύνθεση των λευκοτριενίων, τα οποία είναι μεσολαβητές σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρυνση (Parsatharathy S et al. 1989, Ross R et al. 1993).

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο που συνεισφέρει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Το ένζυμο αυτό συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών καταλύοντας την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη, καθώς και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων μοριακό οξυγόνο κατά τη διαδικασία της διάσπασης των πουρινών με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και ανιόντος σουπεροξειδίου (O₂⁻) (McCord and Fridovich, 1968). Έχει βρεθεί ότι φλαβονοειδή που περιέχονται στο κρασί αναστέλλουν τη δράση της. Συγκεκριμένα η κερκετίνη σε χαμηλή συγκέντρωση ξεπερνά την αναστολή που μπορεί να επιφέρει η αλλοπουρινόλη, η οποία είναι ένας ισχυρός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (Chang W-S et al, 1993).

1.2.1. Κατηγορίες πολυφαινόλων

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής ομάδα χημικών ενώσεων με χαρακτηριστική δομή η οποία αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Οι ενώσεις αυτές είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών με κοινή πρόδρομη ένωση την φαινυλαλανίνη, η οποία προκύπτει από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού απέναντι στην υπερϊώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα, ενώ είναι

υπεύθυνα επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al. 2004).

Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων σε πολλά ανώτερα φυτά, ενώ εκατοντάδες από αυτές έχουν αναγνωριστεί στα εδώδιμα φυτά, που αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, στα φρούτα, στα λαχανικά, στα σταφύλια, στο κρασί, στα δημητριακά στον καφέ και στο τσάι. Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής παρουσιάζουν αντιϊκές, αντιαλλεργικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επίσης εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης 1994).

Διακρίνονται σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που φέρουν καθώς και τις δομικές ομάδες που συνδέονται στους δακτυλίους. Οι βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα σπιλβένια και τα λιγνάνια (Manach C. et al. 2004).

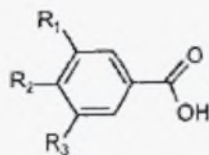
1.2.2. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροξυβενζοϊκά οξέα που είναι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και στα υδροξυκινναμικά οξέα που είναι παράγωγα του κινναμικού οξέος (Εικόνα 2).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι συστατικά υδρολυόμενων ταννινών και περιλαμβάνουν το γαλλικό, το συριγγικό και το βανιλικό οξύ. Συναντώνται κυρίως στα κόκκινα φρούτα, στα σκουρόχρωμα ραπανάκια και στο τσάι (Manach C. et al. 2004).

Τα υδροξυκινναμικά οξέα συναντώνται ως γλυκοσυλιωμένα παράγωγα ή εστέρες του κινικού, του σικιμικού και του ταρταρικού οξέος. Περιλαμβάνουν το ρκουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το συναπικό οξύ. Βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εξωτερικά μέρη ώριμων φρούτων. Το φερουλικό και το καφεϊκό οξύ απαντώνται κυρίως στα δημητριακά (Manach C. et al. 2004)

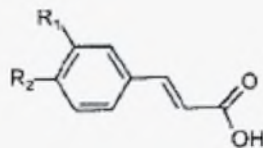
Υδροξυβενζοϊκά οξέα



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

$R_1 = R_2 = R_3 = OH$: 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 οξέων και υδροξυκινναμικών οξέων (Manach C. et al. 2004)

1.2.3. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία πολυφαινόλων. Η βασική δομή είναι αυτή του φαινυλβενζοπυρενίου ($C_6-C_3-C_6$), δηλαδή αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους με τρία άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροδακτύλιο. Συνήθως απαντώνται ως γλυκοσίδια και εντοπίζονται κυρίως σε αγγειώδη φυτά. Ανάλογα με τις δομικές ομάδες που περιέχουν οι δακτύλιοι και το βαθμό κορεσμού του βενζο-γ-πυρενικού δακτυλίου διακρίνονται στις φλαβονόλες, στις φλαβόνες, στις ισοφλαβόνες, στις φλαβονόνες, στις ανθοκυανιδίνες και στις φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) (Εικόνα 3) (Manach C. et al. 2004, Carlo G.D. et al. 1999).

Οι φλαβονόλες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των φλαβονοειδών και οι κυριότεροι αντιπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη και η καιμπερόλη. Βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή και συσσωρεύονται στα εξωτερικά μέρη του φυτού (επιδερμίδα και φύλλα), γιατί η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach C. et al. 2004). Οι φλαβόνες απαντώνται σε μικρότερο βαθμό από τις φλαβονόλες και οι κυριότεροι αντιπρόσωποί τους είναι τα γλυκοσίδια λουτεολίνης και απιγενίνης. Πηγές φλαβονών αποτελεί ο μαϊντανός και το σέλινο, καθώς και η επιδερμίδα των εσπεριδοειδών (Manach C. et al. 2004).

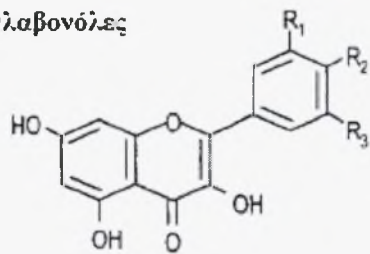
Οι φλαβονόνες είναι γλυκοσυλιωμένες με ένα δισακχαρίδιο στη θέση C7 και οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η εσπερετίνη και η ναριγενίνη. Βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Manach C. et al. 2004).

Οι ισοφλαβόνες διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις C7 και C4 σε ανάλογη διαμόρφωση με αυτές που έχει η οιστραδιόλη. Λόγω αυτής της δομικής ομοιότητάς τους με τα οιστρογόνα λειτουργούν ως ψευδορμόνες και έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων. Βρίσκονται στα ψυχανθή και κυρίως στη σόγια με κυριότερες ισοφλαβόνες τη ντενζεΐνη και τη γενιστεΐνη (Manach C. et al. 2004).

Οι φλαβανόλες παρουσιάζονται σε μονομερή μορφή (κατεχίνες) και σε πολυμερή μορφή (προανθοκυανιδίνες), ενώ δεν εμφανίζονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή. Η γαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη απαντώνται στο τσάι, στα ψυχανθή και στα σταφύλια. Οι προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους, γνωστές και ως συμπυκνωμένες ταννίνες. Αποτελούνται από μονομερή φλαβαν-3-όλης και δίνουν μια χαρακτηριστική στυφή γεύση στα φρούτα που βρίσκονται (Manach C. et al. 2004).

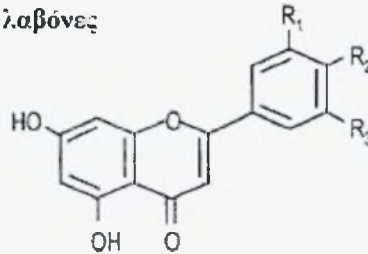
Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες που βρίσκονται συνήθως στην επιδερμίδα των άνθων και των φρούτων. Εντοπίζονται σε ποικίλες χημικές μορφές ανάλογα με το pH, παρουσιάζοντας διάφορα χρώματα. Εξαιτίας της γλυκοσυλίωσης και της εστεροποίησης με διάφορα οργανικά και φαινολικά οξέα αποκτούν ανθεκτικότητα στην οξείδωση, στο φως και στο pH. Πηγές ανθοκυανινών αποτελούν το κόκκινο κρασί, τα λαχανικά και ορισμένα φρούτα, όπως τα κεράσια και οι φράουλες (Manach C. et al. 2004).

Φλαβονόλες



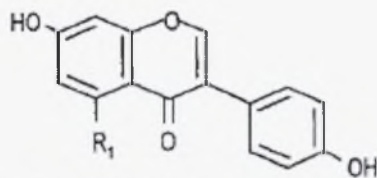
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$: Καμπεφερόλη
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Κερκετίνη
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Μυρισετίνη

Φλαβόνες



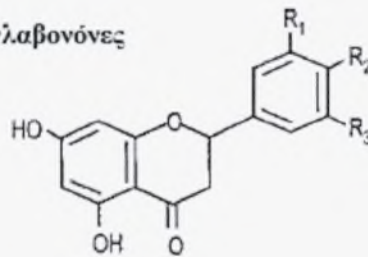
$R_1 = H; R_2 = OH$: Απιγερίνη
 $R_1 = R_2 = OH$: Λουτεολίνη

Ισοφλαβόνες



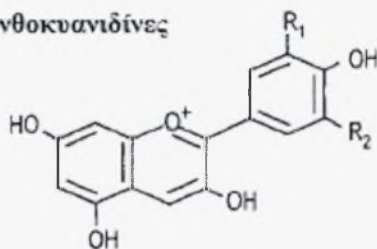
$R_1 = H$: Ντενζεΐνη
 $R_1 = OH$: Γενισαΐνη

Φλαβονόνες



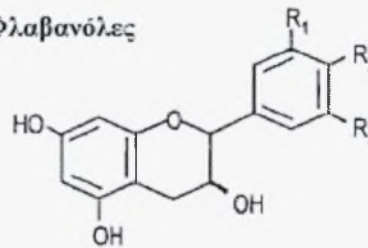
$R_1 = H; R_2 = OH$: Ναριγενίνη
 $R_1 = R_2 = OH$: Εριοντικόλη
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Εσπερετίνη

Ανθοκυανιδίνες



$R_1 = R_2 = H$: Πελαργονιδίνη
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Κυανιδίνη
 $R_1 = R_2 = OH$: Δελφινιδίνη
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Πετονιδίνη
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Μαλβινιδίνη

Φλαβανόλες

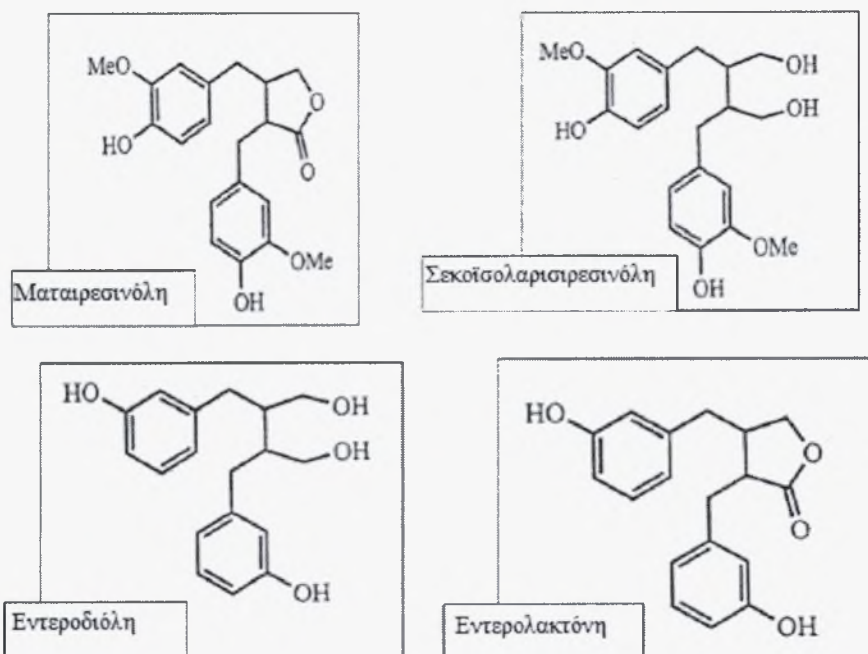


$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Κατεχίνες
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Γαλλοκατεχίνη

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

1.2.4. Λιγνάνια

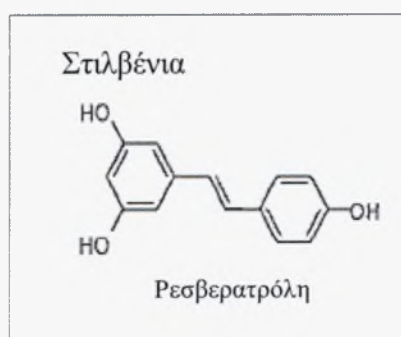
Τα λιγνάνια αποτελούνται από δύο μόρια φαιυλοπροπανίου. Κύρια πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ σε μικρότερες ποσότητες εντοπίζονται στα ψυχανθή, στα φύκη, στα δημητριακά, στα φρούτα και στα λαχανικά. Τα φυτικά λιγνάνια σεκοΐσολαρισερινόλη και ματαιρεσινόλη μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα στα λιγνάνια εντεροδιόλη και εντερολακτόνη (Manach C. et al. 2004) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Χημική δομή της σκεοΐσολαρισρεσινόλης και της ματαιρεσινόλης και των παραγώγων τους εντεροδιόλη και εντερολακτόνη

1.2.5. Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα αιθενίου. Η ρεσβερατρόλη που αποτελεί το σημαντικότερο στιλβένιο απαντάται κυρίως στο κρασί και στα σταφύλια και έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες (Εικόνα 5) (Manach C. et al. 2004).



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

1.2.6. Αντιοξειδωτική και προ-οξειδωτική των πολυφαινολικών ενώσεων

Η βασική ιδιότητα των πολυφαινολών είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Μία φαινοξυλική ρίζα σαν μόριο είναι πολύ μεγαλύτερο από μία ελεύθερη ρίζα (π.χ. $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}), έτσι αν και προκύπτει πάλι ρίζα δεν έχει την ικανότητα της ελεύθερης μετακίνησης μέσα από κυτταρικούς φραγμούς (π.χ. πυρηνική μεμβράνη) και συνεπώς τη δυνατότητα οξείδωσης άλλων βιολογικών μορίων (Scalbert et al, 2005). Τέλος, κάποιες πολυφαινόλες παρουσιάζουν προ-οξειδωτική δράση. Στην περίπτωση αυτή συμμετέχουν με διάφορους μηχανισμούς στο σχηματισμό ασταθών φαινοξυλικών ριζών που οδηγούν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης διάφορων κυτταρικών δομών, οδηγώντας πολλές φορές το κύτταρο ακόμα και στην απόπτωση, αποτρέποντας την μετατροπή του σε καρκινικό κύτταρο. Η αντιοξειδωτική και η προ-οξειδωτική δράση βρίσκονται σε μία ισορροπία, η οποία οφείλεται στην ικανότητα τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και να αντιδρούν χημικά με μέταλλα (Cotelle, 2001), (Y.Sakihama et al, 2002).

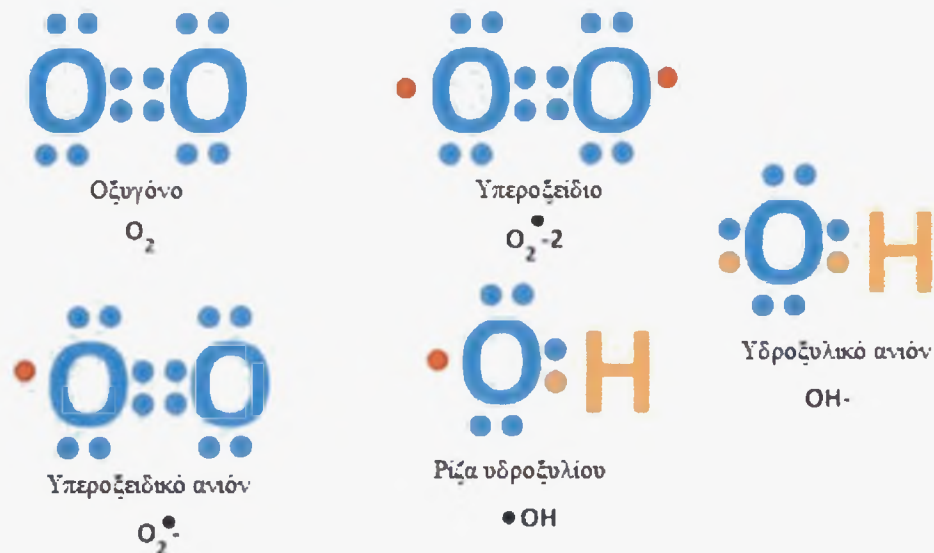
1.3.1. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα και προκύπτουν είτε από την απώλεια είτε από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα σθένους. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται και από φυσιολογικές διεργασίες στον οργανισμό, όπως για παράδειγμα αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια. Για να αποκτήσουν σταθερή δομή αποσπών ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ξεκινά μια αλυσίδα και να προκαλούνται έτσι βλάβες σε κυτταρικές δομές όπως πρωτεΐνες, κυτταρικές μεμβράνες και DNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\bullet}), του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\bullet}), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}), του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\bullet}), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\bullet}) και οι θειούχες ρίζες (RS^{\bullet}) (Εικόνα 6). Στις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το $O_2^{\bullet-}$, και το OH^{\bullet} χρησιμοποιείται ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), (Εικόνα 1.1). Στις ROS

επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) (Halliwell 2001).

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

● = Μονήρη ηλεκτρόνια



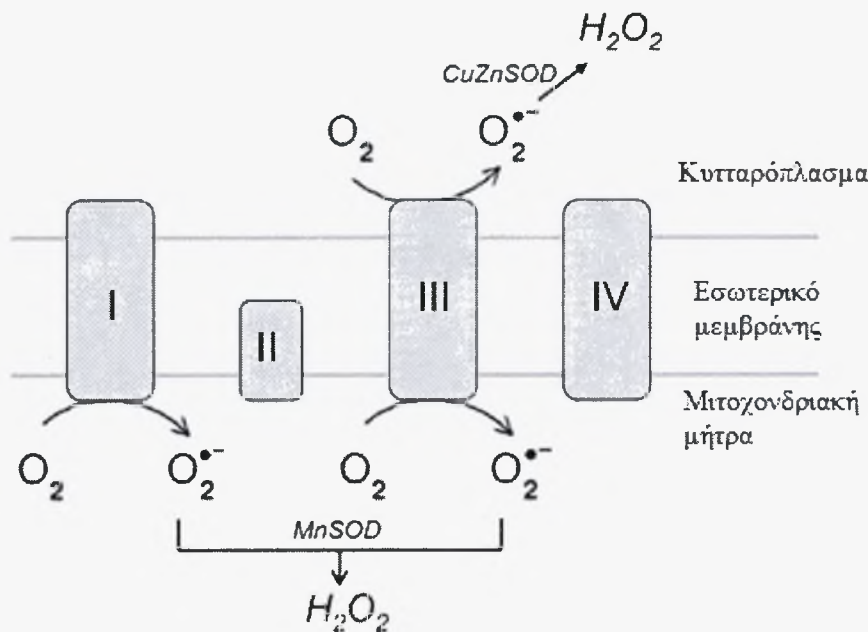
Εικόνα 6: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου

1.3.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι πηγές των ελευθέρων ριζών διακρίνονται στις ενδογενείς και στις εξωγενείς.

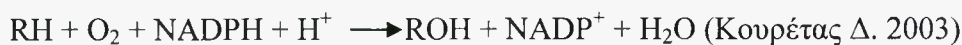
Ενδογενείς πηγές

Στο κυτταρόπλασμα του μιτοχονδρίου, η παραγωγή του ATP, επιτυγχάνεται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στην αναπνευστική αλυσίδα, όπου το οξυγόνο ανάγεται σε νερό, μερικά ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα σύμπλοκα I και III και αντιδρούν με το O_2 παράγοντας ROS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet}) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Παραγωγή ελεύθερων ριζών στην αναπνευστική αλυσίδα

Μία ακόμη ενδογενής πηγή ελεύθερων ριζών είναι στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα του κυτοχρώματος P-450, που συμβάλλει στην απομάκρυνση ξενοβιοτικών ουσιών. Μέσω των μονοοξυγενασών η ξενοβιοτική ουσία οξειδώνεται με μία αντίδραση μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADPH ή NADH στο μοριακό οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



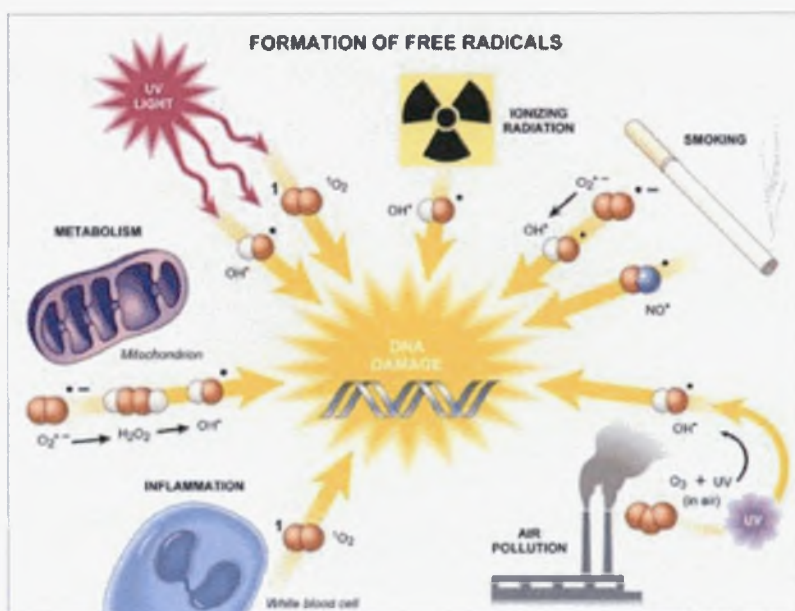
Στο εσωτερικό των υπεροξειδισωμάτων παράγονται ελεύθερες ρίζες εξαιτίας μιας ειδικής οξειδωτικής διαδικασίας που υφίστανται τα λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα, μια φλαβοπρωτεΐνη αφαιρεί ένα ζευγάρι ατόμων υδρογόνου από ένα ενεργοποιημένο μόριο λιπαρού οξέος και στη συνέχεια τα δύο άτομα υδρογόνου μεταφέρονται απευθείας στο μοριακό οξυγόνο παράγοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (Alberts B. et al., 2000).

Ακόμη, σε μια φλεγμονώδη αντίδραση σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες από λευκοκύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονή όπως ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφυλλα. Τέλος, στις ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών συμπεριλαμβάνονται και διάφορα μόρια που μπορούν να αυτοοξειδωθούν και να σχηματίσουν ανιόν υπεροξειδίου (O₂^{•-}) (Sebaldt R.J. et al., 1992).

Εξωγενείς πηγές

Οι εξωγενείς πηγές διακρίνονται σε τρεις ομάδες, τις χημικές, τις φυσικές και τις βιολογικές. Στις χημικές πηγές ανήκουν οι περιβαλλοντικοί ρύποι, το κάπνισμα, το αλκοόλ, τα συντηρητικά τροφίμων και τα γεωργικά φάρμακα (ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα). Στις φυσικές πηγές περιλαμβάνεται η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία. Στην ίδια κατηγορία πηγών συμπεριλαμβάνεται και η άσκηση για την οποία έχει βρεθεί ότι προκαλεί οξειδωτικό στρες (Michailidis et al, 2007, Nikolaidis et al, 2006). Στις βιολογικές πηγές περιλαμβάνονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Οι ελεύθερες ρίζες σε αυτή την περίπτωση παράγονται από την ενεργοποίηση των μακροφάγων για την ανοσολογική απόκριση στους παθογόνους μικροοργανισμούς.

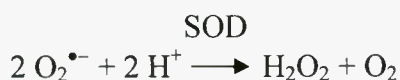
Η παραγωγή ελευθέρων ριζών αυξάνεται όταν υπάρχει αυξημένη παραγωγή ενέργειας, όπως υπερβολική κατανάλωση θερμίδων και ιδιαίτερα λίπους, ανοσολογική απόκριση και αυξημένη παραγωγή στεροειδών (π.χ. σε καταστάσεις στρες, όπως η έντονη φυσική δραστηριότητα, εφηβεία, διαταραχές εμμήνου ρύσεως κ.ά.). Ακόμη, ελεύθερες ρίζες παράγονται μετά από έκθεση σε μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. καπνός τσιγάρου, ρύποι που μολύνουν την ατμόσφαιρα) και σε ακτινοβολία (π.χ. υπεριώδη ακτινοβολία UV) (Εικόνα 8). (Halliwell B, 2001)



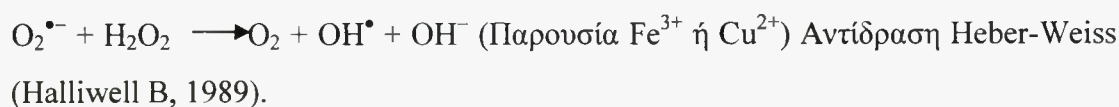
Εικόνα 8: Παράγοντες που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τις ενδογενείς και τις εξωγενείς πηγές εκτός από το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$), είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

και η ρίζα υδροξειλίου (OH^\bullet). Συγκεκριμένα, το $\text{O}_2^{\bullet-}$ μπορεί να παράγει τις παραπάνω ρίζες. Το H_2O_2 παράγεται από το $\text{O}_2^{\bullet-}$ με μία αντίδραση που καταλύει η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).



Το H_2O_2 που παράγεται δεν είναι πολύ δραστικό, αλλά μπορεί να παράγει OH^\bullet μέσω της αντίδρασης Fenton ή της αντίδρασης Heber-Weiss. Το OH^\bullet είναι πολύ δραστική και επιβλαβής ρίζα. Στην αντίδραση Fenton το H_2O_2 αντιδρά με Fe^{2+} ή Cu^+ και στην αντίδραση Heber-Weiss το H_2O_2 αντιδρά με το $\text{O}_2^{\bullet-}$:



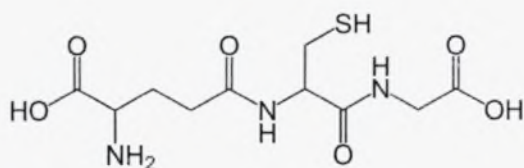
1.4. Αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να θεωρηθεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με εκείνη του προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει την οξείδωση των βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες ή εμποδίζει το σχηματισμό τους. Υπάρχουν δύο κατηγορίες αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών, οι μη ενζυμικοί και οι ενζυμικοί.

Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C και E, οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q_{10} .

- Η γλουταθειόνη (Εικόνα 9) είναι ένα τριπεπτίδιο ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) και η αντιοξειδωτική της δράση επιτυγχάνεται με την κυκλική μετάπτωσή της από μια ανηγμένη (GSH) σε μια οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίστροφο (Kouretas D. and Mylonas C. 1999).

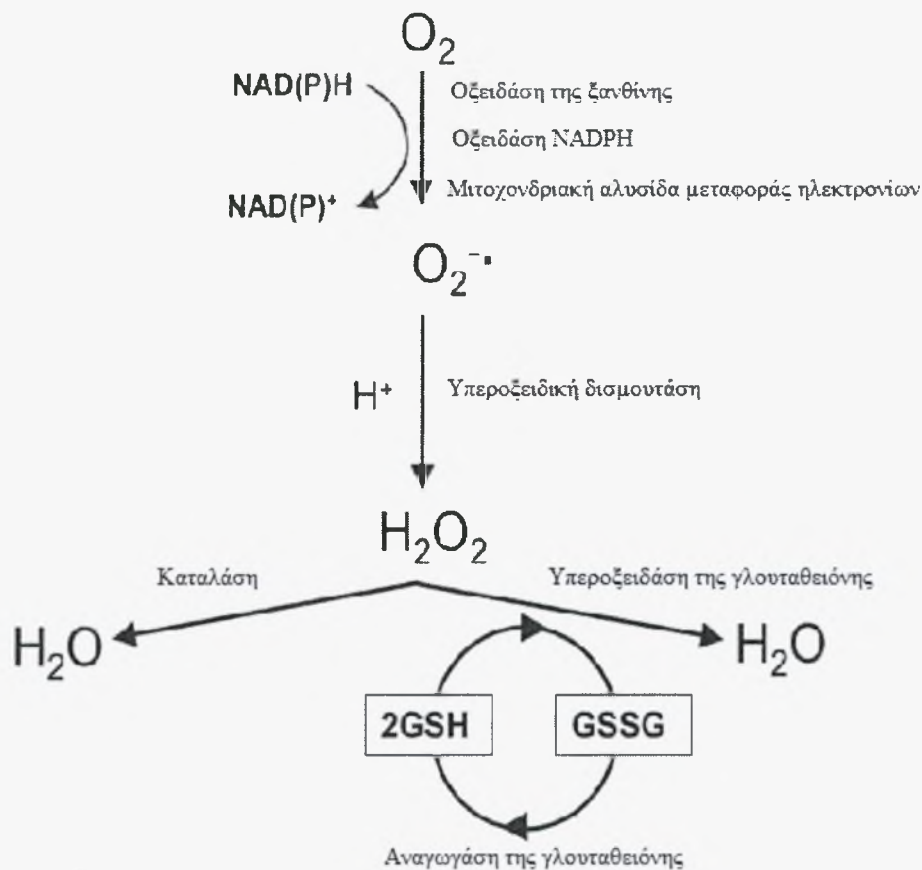


Εικόνα 9: Χημική δομή γλουταθειόνης

- Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι μια ισχυρή αντιοξειδωτική πρωτεΐνη, η οποία αντιδρά με πολλές ελεύθερες ρίζες παράγοντας δευδροασκορβικό οξύ (DHA). Είναι αρκετά υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη και ο άνθρωπος την προσλαμβάνει αποκλειστικά από την τροφή, καθώς δεν έχει τη δυνατότητα σύνθεσής της (Pietri S., 1994).
- Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) έχει την ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας την λιπιδική υπεροξειδωση (Gutteridge J.M., 1995).
- Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας του φαινολικών τους ομάδων που μπορούν να δεχθούν ηλεκτρόνια από τις ελεύθερες ρίζες ανταλλάσσοντας τα με πρωτόνια (H^+). (Halliwell 2001, Scalbert A. Et al. 2005)
- Η κατηγορία των χηλικών δεσμευτών μεταβατικών μετάλλων απαρτίζεται από ενζυμικές και μη ενζυμικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, όπως η SOD(Cu/Fe), κυτοχρωμική οξειδάση (Cu), κυτοχρώματα (Se), φερριτίνη (Fe) και λακτοφερριτίνη (Fe) (Mylonas C. and Kouretas D., 1999).
- Το ουρικό οξύ είναι ένα από τα προϊόντα του μεταβολισμού των πουρινών. Αντιδρά με ελεύθερες ρίζες προκαλώντας την εξουδετέρωσή τους. Παρ' όλα αυτά όμως με τις αντιδράσεις αυτές παράγονται ως παραπροϊόντα ελεύθερες ρίζες, έτσι το ουρικό οξύ δε θεωρείται από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά (Wayner D.D. et al., 1987).
- Το συνένζυμο Q_{10} (ουβικινόνη) είναι σημαντικό συστατικό της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας όπου εκτός από μεταφορέας ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα αποτελεί ένα σημαντικό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό (Mylonas C. and Kouretas D. 1999)..

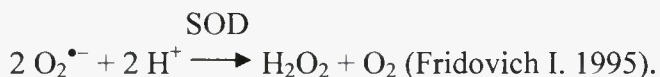
Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Μονοπάτι των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

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

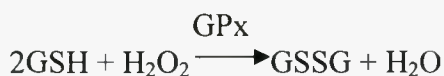


- Η καταλάση (CAT) είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο εξουδετερώνει το H_2O_2 μετατρέποντάς το σε H_2O :



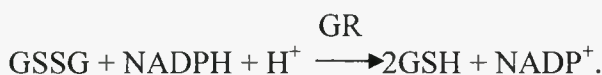
Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες 500 περίπου αμινοξέων και η κάθε μία από αυτές περιέχει μία αίμη. Στα κύτταρα των θηλαστικών η καταλάση σε μεγάλο βαθμό βρίσκεται στα υπεροξυσωμάτια, είναι άφθονη στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα (Halliwell and Gutteridge, 1998).

- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) παίζει το ρόλο της καταλάσης στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Πρόκειται για ένζυμο εξαρτώμενο από το σελήνιο και έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη:



Βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσωμάτια και έχουν ανακαλυφθεί 5 ισομορφές της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα θηλαστικά, μερικές εκ των οποίων εντοπίζονται στα ώριμα απορροφητικά επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Λειτουργικά, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για το H_2O_2 από την καταλάση, ενώ αντιδρά αποτελεσματικά με τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων και με το υπεροξυνιτρικό, παρέχοντας αντιοξειδωτική προστασία. Όσον αφορά την παρουσία τους σε κύτταρα που εμπλέκονται στην φλεγμονή, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και το η γλουταθειόνη βρίσκονται κυρίως στα μονοκύτταρα, ενώ η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα ουδετερόφιλα. Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν στο ότι η γλουταθειόνη και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης δρουν ως πρωτογενής άμυνα έναντι μιας χαμηλού βαθμού αλλά συνεχούς έκθεσης στο H_2O_2 , ενώ η καταλάση διαδραματίζει πιο σημαντικό ρόλο σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες (Kouretas D. and Mylonas C. 1999).

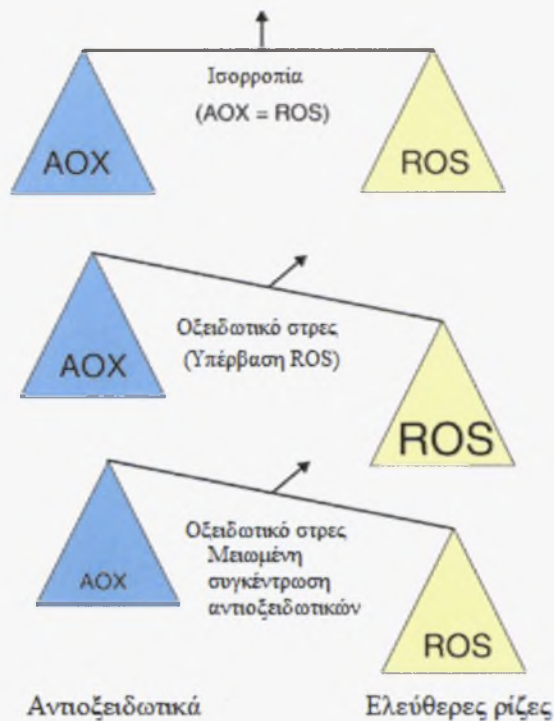
- Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) αποτελείται από δύο υπομονάδες, οι οποίες στο ενεργό τους κέντρο ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD) και καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH:



Συμβάλει στη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του ήπατος (Halliwell B, 1989).

1.5. Οξειδωτικό στρες – συσχετισμός των ελευθέρων ριζών με ασθένειες

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών στον οργανισμό κατά την οποία υπερισχύουν οι πρώτες ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (Εικόνα 11). Το οξειδωτικό στρες προκαλείται είτε από μείωση της λειτουργικότητας των αντιοξειδωτικών, είτε από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η υψηλή δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών σε μακρομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA.



Εικόνα 11: Διαταραχή ισορροπίας (οξειδωτικό στρες)

Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με πολλά βιομόρια του κυττάρου. Συγκεκριμένα, προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων, οξείδωση των πρωτεϊνών και του DNA. Εξαιτίας αυτών των αλληλεπιδράσεων με τα βιομόρια θεωρούνται υπεύθυνες για πολλές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η γήρανση, ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος, ο διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση και διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson και του Alzheimer (Halliwell B, 2001).

Ιδιαίτερη δραστηριότητα εναντίον των μεμβρανικών λιπιδίων εμφανίζει η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet), ξεκινώντας τη διεργασία της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, η οποία καταλήγει μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων στην παραγωγή υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων και των αλδευδών. Η διεργασία της υπεροξείδωσης των λιπιδίων επιταχύνεται μόνο όταν τα ενδογενή συστήματα άμυνας κατά των ελευθέρων ριζών δεν είναι ικανά να εξουδετερώσουν τις παραγόμενες ποσότητες OH^\bullet και H_2O_2 που θεωρούνται πρόδρομες ουσίες της διεργασίας αυτής. Οι λιποδιαλυτές αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η βιταμίνη E, καθώς και η ενδογενής γλουταθειόνη παρέχουν αποτελεσματική προστασία κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Kouretas D. and Mylonas C. 1999).

Οι πρωτεΐνες επίσης μπορεί να αποτελέσουν στόχους των ελευθέρων ριζών. Η οξείδωση των πρωτεϊνών οδηγεί σε συγκεκριμένες τροποποιήσεις αμινοξέων και στη

διάσπαση των πεπτιδικών αλυσίδων. Το κάθε αμινοξύ έχει διαφορετική ευαισθησία στην αλληλεπίδρασή του με τις ελεύθερες ρίζες και οι διάφορες ROS έχουν διαφορετική ικανότητα να αντιδράσουν με τα αμινοξέα αυτά (Gardner PR. Et al. 1991).

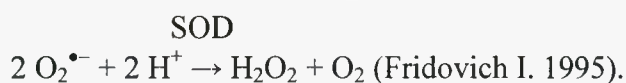
Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να βλάψουν ακόμη και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου αποτελεί πρωτεϊνικό στόχο για προσθήκη νιτρικής ομάδος μιας μορφής ελεύθερης ρίζας. Όταν η αντίδραση αυτή συμβαίνει στο κυτταροπλασματικό Cu/Zn-SOD, δεν παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, ενώ αντιθέτως όταν συμβαίνει στο μιτοχονδριακό Mn-SOD συνοδεύεται με απώλεια λειτουργικότητας του ενζύμου (Stadtman ER. Et al. 1997) (MacMillan-Crow LA. et al. 1996).

Τόσο η ρίζα του οξυγόνου όσο και άλλοι παράγοντες που προάγουν την δημιουργία ROS, όπως πχ. η ιονίζουσα ακτινοβολία, μπορούν να στοχεύσουν στο DNA προκαλώντας μεταλλάξεις γονιδίων και δυσλειτουργίες στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA, οδηγώντας σε καρκινογένεση (Imlay JA. Et al. 1986).

Η άσκηση συσχετίζεται με πολλά οφέλη όσον αφορά την υγεία, ωστόσο έχει βρεθεί από μελέτες ότι προκαλεί αυξημένη παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα κατά την άσκηση αυξάνεται η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ελεύθερων ριζών που οδηγούν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Μια από τις πιο σημαντικές πηγές ελεύθερων ριζών κατά την άσκηση είναι η παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Chance B et al., 1979). Ο οργανισμός για να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες υφίσταται προσαρμογή. Έχει βρεθεί ότι η χρόνια άσκηση διεγείρει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, κυρίως της Mn-SOD και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Ji, 1993).

1.6.1. Υπεροξειδική δισμουτάση

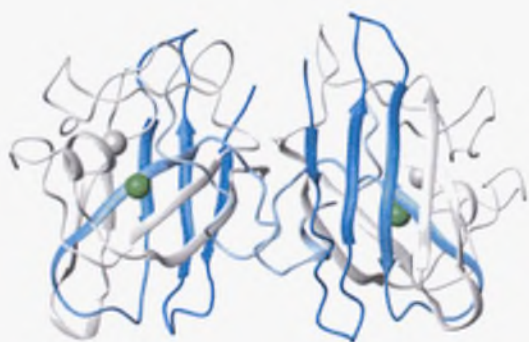
Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένας από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Η SOD καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



1.6.2. Ισομορφές και πρωτεϊνική δομή τους

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου (Fridovich I. 1995).

Η πρώτη είναι η Cu/Zn-SOD (Εικόνα 12), που είναι ένα ομοδιμερές 32 kDa και αποτελεί περίπου το 70% των δισμουτασών του υπεροξειδίου. Υπάρχει σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων στα περισσότερα όργανα και εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια (Crapo JD. 1992). Εκτός της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ και το H_2O_2 μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα του ενζύμου αντιδρώντας με την ανηγμένη μορφή του χαλκού (Cu^+). Επίσης, το ένζυμο μπορεί να έχει ως υπόστρωμα το υπεροξυνιτρικό οδηγώντας σε σχηματισμό νιτρικών ομάδων που ακολούθως μεταφέρονται σε τυροσίνες διαφόρων πρωτεϊνών (Ischiropoulos H. 1992).



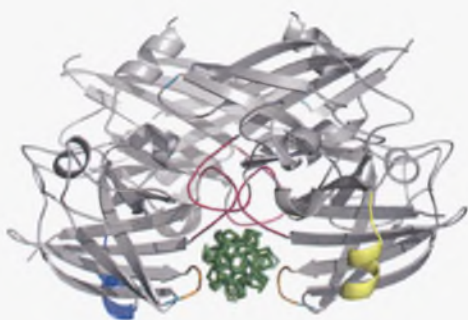
Εικόνα 12: Cu/Zn SOD

Η δεύτερη ισομορφή της SOD είναι η Mn-SOD (Εικόνα 13), ένα ομοτετραμερές 96 kDa που περιέχει ένα άτομο μαγγανίου ανά υπομονάδα και απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Το συγκεκριμένο ένζυμο διαδραματίζει καίριο ρόλο στην εξουδετέρωση της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ που παράγεται στα μιτοχόνδρια και η έλλειψή του προκαλεί το θάνατο σε πειραματόζωα λίγες μέρες μετά τη γέννησή τους (Li Y., et al, 1995).



Εικόνα 13: Mn SOD

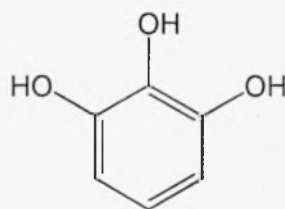
Η τρίτη ισομορφή είναι η εξωκυττάρια-SOD (Εικόνα 14) που περιγράφηκε προσφάτως και αποτελεί την κύρια ισομορφή στο πλάσμα και στο διάμεσο ιστό και είναι το μόνο ένζυμο που εξουδετερώνει τις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Αυτή η μορφή αποτελεί το 15% περίπου των SOD και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Πρόκειται για μια τετραμερή γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 135 kDa, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο. Ο ρόλος του ενζύμου είναι πολύ σημαντικός λόγω της εξωκυττάριας κατανομής του στους ιστούς, όπου παρέχει αποτελεσματική προστασία από το οξειδωτικό στρες στο συνδετικό ιστό και στις ίνες κολλαγόνου, ενώ αποτελεί ρυθμιστή του αγγειακού τόνου μέσω πρόληψης της μετατροπής του μονοξειδίου του αζώτου σε υπεροξυνιτρικά στα μιτοχόνδρια επιθηλιακών κυττάρων και φαγοκυττάρων (Whittaker JW. 2000), (Oury TD,et al,1994), (Oury TD,et al,1995), (Oury TD,et al,1996).



Εικόνα 14: Εξωκυττάρια SOD

1.6.3. Προσδιορισμός δραστηριότητας της SOD μέσω της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης

Η πυρογαλλόλη, $C_6H_3(OH)_3$, είναι μια τριυδροξυφαινόλη (Εικόνα 15) που παράγεται από το γαλλικό οξύ όταν επιδρά σε αυτό θερμότητα. Όταν έρχεται σε επαφή με το O_2 της ατμόσφαιρας αυτοοξειδώνεται παρουσία ριζών $O_2^{\bullet-}$. Παρουσία της SOD αναστέλλεται η αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης λόγω μετατροπής των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 και το ποσοστό επί τοις εκατό της αναστολής αυτής καταδεικνύει τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης.



Εικόνα 15. Χημική Δομή της πυρογαλλόλης

Ο ρυθμός της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης καταλύεται επίσης από μερικά ιόντα μετάλλων, όπως Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} . Με την παρουσία του EDTA, ο ρυθμός είναι ανεξάρτητος από την συγκέντρωση των χηλικών και μεταλλικών ιόντων και δεν επηρεάζει σημαντικά την αυτοοξειδωση (Ruomei Gao et al., 1998).

Το ποσοστό επί τοις εκατό της αναστολής εξαρτάται από την ποσότητα της SOD, το pH του συστήματος και από τη συγκέντρωση της πυρογαλλόλης. Η αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης έχει ερευνηθεί σε pH από 7.9- 10.6. Έχει βρεθεί ότι σε pH 7,87 με την παρουσία EDTA, η αντίδραση αναστέλεται περίπου 99% από την SOD, γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή του υπεροξειδικού ανιόντος στην αντίδραση. Σε υψηλό pH κυριαρχούν ανεξάρτητοι από το υπεροξειδικό ανιόν μηχανισμοί, καθώς η SOD σε τέτοιες τιμές pH μετουσιώνεται (Stefan Marklund & Gudrun Marklund, 1974), (Ruomei Gao et al., 1998).

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

Ένας παράγοντας (εκχύλισμα) που αναστέλλει την δράση της SOD αυξάνει την αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης ενώ ένας παράγοντας που αυξάνει την δράση της SOD μειώνει την αυτοοξειδωσή της. Όσα εκχυλίσματα παρουσιάζουν αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης παρουσία του ενζύμου της SOD, πρέπει να επανεξεταστούν απουσία της SOD για να διευκρινιστεί αν αυτή η αναστολή οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Η δραστηκότητα της SOD μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με μία μέθοδο παρόμοια με την προηγούμενη και συγκεκριμένα με μέτρηση της αναστολής της αυτοοξειδωσης της αιματοξυλίνης από το $O_2^{\bullet-}$ (Martin J.P.Jr et al., 1987) (Flobe L. & Otting F., 1984).

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

Τέλος, για να μετρηθεί μόνο η ισομορφή Mn-SOD χρησιμοποιείται κυανίδιο που είναι αναστολέας της SOD που έχει στο ενεργό της κέντρο Cu/Zn, οπότε δρα μόνο η Mn-SOD ισομορφή καθώς οι δύο άλλες ισομορφές είναι Cu/Zn SOD (Maurizio P. et al., 1988).

1.6.4. Επίδραση στην δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Η δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης, όπως και άλλων ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας (καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), είναι πιο έντονη κατά την άσκηση. Αυτό συμβαίνει γιατί η άσκηση προκαλεί υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου συμβάλλοντας στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Nikolaidis et al., 2006, Veskoukis et al., 2008).

Από μελέτες που έγιναν σε επίμυες έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης ποικίλει ανάλογα με την ηλικία του ατόμου, τον ιστό και το είδος της άσκησης. Η SOD εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητα στο ήπαρ και ακολούθως στα επινεφρίδια, τους νεφρούς και την καρδιά, ενώ μικρότερη δραστηριότητα παρουσιάζεται στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας. Επίσης, βρέθηκε ότι όσο αυξάνεται η ηλικία αυξάνεται η δραστηριότητα της SOD στο ήπαρ και τους νεφρούς, ενώ ελαττώνεται στα ερυθροκύτταρα (Anuradha Nandi & Chatterjee I. B., 1988).

Έχει βρεθεί ότι κάποια μόρια μπορούν να αναστείλουν τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Το NBT (Nitro Blue Tetrazolium) εμφανίζει ανασταλτική δράση κάτω από αερόβιες συνθήκες (Fridovich I., 1991). Επίσης, το DETC (diethyl dithio carbamate) προκαλεί αναστολή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Lijnen P. et al., 2008). Τέλος, το κυανίδιο είναι αναστολέας της SOD που έχει στο ενεργό της κέντρο Cu/Zn, οπότε δεν επηρεάζει την Mn-SOD ισομορφή και αναστέλλει τις δύο άλλες ισομορφές που είναι Cu/Zn SOD (Maurizio P. et al., 1988).

1.8. Σκοπός

Έχει βρεθεί σε μελέτες ότι οι πολυφαινόλες που περιέχουν τα σταφύλια, τους προσδίδουν υψηλή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό να μελετηθεί η επίδραση εκχυλισμάτων σταφυλιών, στέμφυλων και βοστρύχων στην δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης μέσω αναστολής της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι κομμάτι μιας γενικότερης μελέτης επίδρασης εκχυλισμάτων από τμήματα σταφυλιού διαφορετικών ποικιλιών στη δραστικότητα των βασικών ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών για τις δραστικές μορφές οξυγόνου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι παρακάτω:

Πυρογαλλόλη (Sigma-Aldrich, Γερμανία)

Tris (Merck, Γερμανία)

HCl (37% Riedel, Γερμανία)

DTPA (Sigma-Aldrich, Γερμανία)

2.1.2. Προετοιμασία αιμολύματος

Ως πηγή SOD χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Αρχικά, το ολικό αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (EDTA) και φυγοκεντρήθηκε στα 1370 g, για 10 min, στους 4°C. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο (πλάσμα) και έμειναν τα ερυθροκύτταρα ως ίζημα. Στη συνέχεια, προστέθηκε απιονισμένο νερό (1:1 v/v), το σωληνάριο ανακινήθηκε βίαια και φυγοκεντρήθηκε στα 4020 g, για 15 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αντιπροσώπευε το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων έμειναν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μl). Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αιμόλυμα αραιωμένο κατά 10 φορές.

2.1.3. Εκχυλίσματα

Μελετήθηκαν δώδεκα εκχυλίσματα βόστρυχων (Πίνακας 2), πέντε εκχυλίσματα στέμφυλων (Πίνακας 3) και δέκα εκχυλίσματα σταφυλιών (Πίνακας 4), και από ελληνικές ποικιλίες.

Πίνακας 2: Τα εκχυλίσματα από βόστρυχους που μελετήθηκαν

Εκχυλίσματα από βόστρυχους

Αθήρι Σαντορίνη (2003)

Λιαστά Μανδηλαριά Σατορίνη (2004)

Βοηδόματο Σαντορίνη (2003)

Αθήρι Σαντορίνη (2004)

Ασύρτικο Σαντορίνη (2004) (1)

Μαυροτράγανο Σαντορίνη (2004) (1)

Ασύρτικο Σαντορίνη (2003)

Μαυροτράγανο Σαντορίνη (2004) (2)

Ασύρτικο Σαντορίνη (2004) (2)
Βηλάνα Σητεία (2003)
Μανδηλαριά Σαντορίνη (2003)

Πίνακας 3: Τα εκχυλίσματα από στέμφυλα που μελετήθηκαν

Εκχυλίσματα από στέμφυλα

Ασύρτικο Ρόδος (2003)
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη (2004)
Ασύρτικο Σαντορίνη (2003) (2)
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη (2003) (2)
Υδρολυμένο κλάσμα Λιαστά Μανδηλαριά

Πίνακας 4: Τα εκχυλίσματα από σταφύλια που μελετήθηκαν

Εκχυλίσματα από σταφύλια

Ασύρτικο Σαντορίνης
Μανδηλαριά Ηράκλειο (2004) ώριμο
Μανδηλαριά Ρόδος (2003)
Αγιωργίτικο Νεμέα
Εκχύλισμα Οίνου Κοτσιφάλι Ηράκλειο XAD4
Υδατικό Μανδηλαριάς
Μεθανολικό Μανδηλαριάς
Υδατικό Ασύρτικο
Μεθανολικό Ασύρτικο
Υδατικό Τυρνάβου

2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένας από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$. Ως πηγή της SOD χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Η SOD καταλύει τη μετατροπή του $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η πυρογαλλόλη, $C_6H_3(OH)_3$, όταν έρχεται σε επαφή με το O_2 της ατμόσφαιρας αυτοοξειδώνεται παρουσία ριζών $O_2^{\bullet-}$. Παρουσία της SOD αναστέλλεται η αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης λόγω μετατροπής των ριζών $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 .

Ένας παράγοντας (εκχύλισμα) που αναστέλλει την δραστηριότητα της SOD αυξάνει την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης ενώ ένας παράγοντας που επάγει την δραστηριότητα της SOD μειώνει την αυτοοξείδωσή της. Η μεταβολή που έχει το control σε 3 min αντικατοπτρίζει την αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης.

Όσα εκχυλίσματα παρουσίασαν αναστολή της αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης παρουσία του ενζύμου της SOD, επανεξετάστηκαν απουσία της SOD για να διευκρινιστεί αν αυτή η αναστολή οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης.

2.2.2. Συστατικά της αντίδρασης

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

Tris-HCl DTPA buffer (pH 8.2)

MB Tris: 121.14

MB DTPA: 393.35

Για την παρασκευή 500 mL του buffer Tris-HCl 0.05 mM που περιέχει 1 mM DTPA ζυγίζονται 3.03 g Tris και 196.6 mg DTPA και τα διαλύονται σε 400 mL H_2O . Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 mL και το pH ρυθμίζεται σε 8.2 με την προσθήκη HCl 1 N.

Διάλυμα πυρογαλλόλης (8 mM)

MB pyrogallol: 126.11

Για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση πυρογαλλόλης στην αντίδραση (κυβελίδα 1000 μ L) 0.8 mM πρέπει να φτιαχτεί ένα διάλυμα 8 mM. Για την παρασκευή 20 mL

διαλύματος πυρογαλλόλης 8 mM ζυγίζονται 20.18 mg πυρογαλλόλης και διαλύονται σε 20 mL H₂O. Το διάλυμα αυτό πρέπει να ετοιμάζεται κάθε φορά, την ημέρα του πειράματος, λίγο πριν την προσθήκη του στην αντίδραση και να καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

Αραίωση αιμολύματος

Στην αντίδραση χρησιμοποιείται αιμόλυμα αραιωμένο κατά 10 φορές. Για 1000μl αραιωμένου αιμολύματος προσθέτουμε 100 μl αιμολύματος σε 900μl H₂O. Η ποσότητα SOD που προστίθεται στα 30μl ερυθροκυτταρικού αιμολύματος είναι η εξής: Το 1 unit ενζύμου SOD αντιστοιχεί σε 36 μl αιμολύματος. Στα 30 μl αιμολύματος που μπαίνουν στην αντίδραση αντιστοιχούν σε 0.83 units. Το MB της συνολικής SOD είναι 32500. Τα 0.83 units αντιστοιχούν σε 0.027 mg SOD.

2.3. Πειραματική διαδικασία

2.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πυρογαλλόλης για την οποία το ένζυμο της SOD βρίσκεται σε κορεσμό

Για την μελέτη της δράσης ενός εκχυλίσματος, αρχικά προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πυρογαλλόλης στην οποία το ένζυμο βρίσκεται σε κορεσμό, δηλαδή δρα με την μέγιστη ταχύτητα. Πραγματοποιήθηκε η κατασκευή καμπύλης ταχύτητας [V] αντίδρασης του ενζύμου-συγκέντρωσης [S] υποστρώματος. Υπόστρωμα της SOD είναι οι ρίζες O₂^{•-}. Η πυρογαλλόλη είναι το μέσο για να γίνει αντιληπτή η δράση της SOD στο υπόστρωμα.

Προστέθηκαν οι παρακάτω όγκοι με την ακόλουθη σειρά σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 5: Οι προστιθέμενοι όγκοι στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης

Συγκέντρωση πυρογαλλόλης	0.2mM	0.4mM	0.6mM	0.8mM	1mM	1.2mM
Buffer pH 8.2	870 μl	870 μl	870 μl	870 μl	870 μl	870 μl
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl
Πυρογαλλόλη	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Τελικός όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Αρχικά στα δείγματα προστίθεται το buffer και στη συνέχεια σε κάθε τριάδα δειγμάτων προστίθεται το αιμόλυμα, αναδεύεται στο vortex και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 min.

Ακολούθως προστίθεται η πυρογαλλόλη στο erpendorf και μεταφέρεται το περιεχόμενό του στην κυψελίδα. Ανακινείται τρεις φορές χρησιμοποιώντας parafilm στην κορυφή της κυψελίδας και μετράμε την απορρόφηση στα 420 nm για 190 sec.

2.3.2. Επίδραση εκχυλισμάτων στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης παρουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Προστίθενται οι παρακάτω όγκοι με την ακόλουθη σειρά σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 7: Οι προστιθέμενοι όγκοι στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες για τον έλεγχο επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης παρουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

	control	C ₁ (100μg/ml)	C ₂ (200μg/ml)	C ₃ (300μg/ml)	C ₄ (400μg/ml)	C ₅ (500μg/ml)	C ₆ (600μg/ml)
Buffer pH 8.2	870μl	770μl	770μl	770μl	770μl	770μl	770μl
Εκχύλισμα	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Αιμόλυμα 1/10	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl
Πυρογαλλόλη	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Τελικός όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Αρχικά στα δείγματα προστίθεται το buffer και στην συνέχεια το εκχύλισμα και αναδεύονται στο vortex. Σε κάθε τριάδα δειγμάτων προστίθεται το αιμόλυμα, αναδεύεται και τα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 min.

Ακολούθως προστίθεται η πυρογαλλόλη στο erpendorf και μεταφέρεται το περιεχόμενό του στην κυψελίδα. Τέλος ανακινείται τρεις φορές χρησιμοποιώντας parafilm στην κορυφή της και πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm για 190 sec. Η μεταβολή που έχει το control σε 3 min αντικατοπτρίζει την αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης.

2.3.3. Επίδραση εκχυλισμάτων στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Προστίθενται οι παρακάτω όγκοι με την ακόλουθη σειρά σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

Πίνακας 8: Οι προστιθέμενοι όγκοι στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες για τον έλεγχο επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία της SOD.

	control	C ₁ (100μg/ml)	C ₂ (200μg/ml)	C ₃ (300μg/ml)	C ₄ (400μg/ml)	C ₅ (500μg/ml)	C ₆ (600μg/ml)
Buffer pH 8.2	900μl	800μl	800μl	800μl	800μl	800μl	800μl
Εκχύλισμα	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Πυρογαλλόλη	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Τελικός όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

2. 4. Υπολογισμός επαγωγής της υπεροξειδικής δισμουτάσης (PC₅₀)

Η επαγωγή της υπεροξειδικής δισμουτάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ επαγωγή της υπεροξειδικής δισμουτάσης} = \frac{\text{M.O. } \Delta_{\text{ABS control}} - \text{M.O. } \Delta_{\text{ABS C}_x}}{\text{M.O. } \Delta_{\text{ABS control}}} \times 100$$

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

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

Για κάθε εκχύλισμα προσδιορίστηκε η τιμή PC₅₀, η οποία είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εκφράζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί κατά 50% επαγωγή του ενζύμου. Η τιμή του PC₅₀ υπολογίζεται από την καμπύλη του ποσοστού επαγωγής που προέκυψε από το κάθε εκχύλισμα σε συνάρτηση με τη συγκέντρωσή του.

2.5. Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το test του Dunnett. Ακόμη, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής που

προκαλούσαν τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν και της συγκέντρωσης τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα από τη μέτρηση της απορρόφησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης

Τα αποτελέσματα για την κατασκευή της καμπύλης ταχύτητας [V] αντίδρασης του ενζύμου-συγκέντρωσης πυρογαλλόλης [S] φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Αποτελέσματα από τη μέτρηση της απορρόφησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυρογαλλόλης

Συγκέντρωση πυρογαλλόλης (mM)	ΔABS/min	Ταχύτητα [V] μmol/min/mg ενζύμου
0.2	0	0
0.4	0.011	240
0.6	0.021	465
0.8	0.022	477
1	0.024	547
1.2	0.022	502

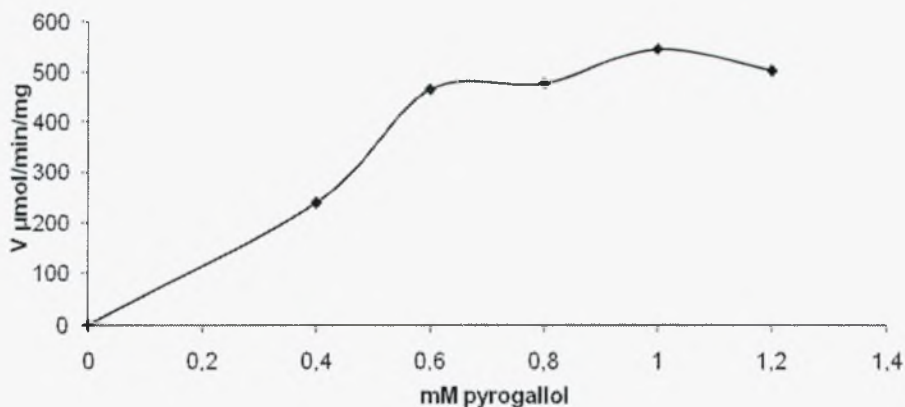
Ο υπολογισμός της ταχύτητας του ενζύμου γίνεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

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

Ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης/λεπτό: Δabs/min.

Μοριακή απορροφητικότητα της πυρογαλλόλης : 2.47 mmol/L.

Η ποσότητα του ενζύμου στην κυψελίδα είναι 0.027 mg.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ταχύτητας της αντίδρασης-Συγκέντρωσης της πυρογαλλόλης

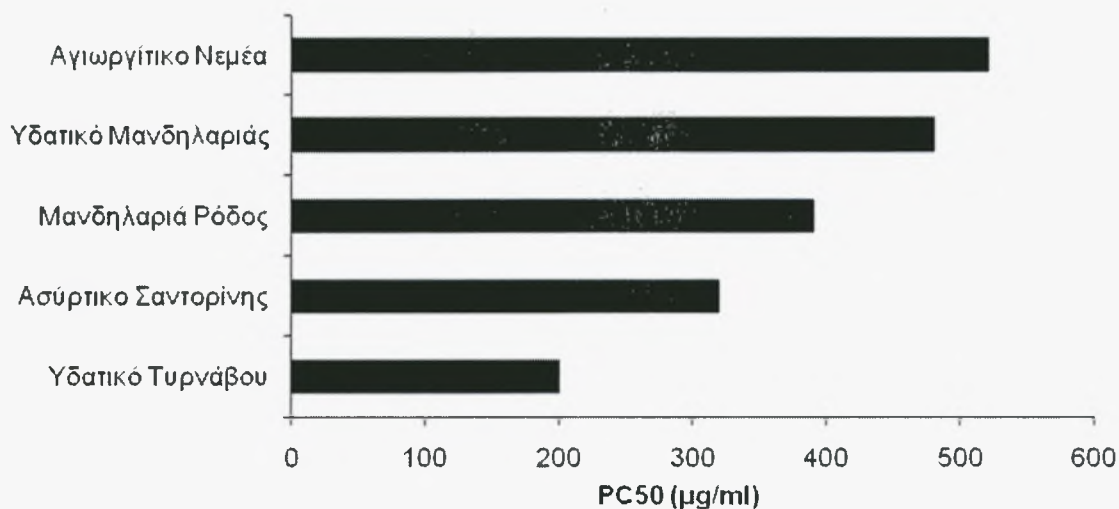
Από την καμπύλη ταχύτητας συγκέντρωσης υποστρώματος $V/[S]$, συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση της πυρογαλλόλης $0.8 \mu\text{M}$ είναι εκείνη στην οποία το ένζυμο είναι σε κορεσμό και άρα δρα στην μέγιστη ταχύτητα. Σε αυτή τη συγκέντρωση υποστρώματος εξετάστηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων (σε αυτή τη συγκέντρωση η δράση του ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος).

3.2. Επίδραση εκχυλισμάτων από σταφύλια στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Από τα 10 εκχυλίσματα σταφυλιών που μελετήθηκαν, αναστολή στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης εμφάνισαν τα 5 και τα υπόλοιπα δεν παρουσίασαν καμία δράση (Πίνακας 9). Το εύρος των τιμών του PC_{50} κυμάνθηκε από 200 $\mu\text{g/ml}$ έως 520 $\mu\text{g/ml}$ (Διάγραμμα 2). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν το υδατικό εκχύλισμα σταφυλιού Τυρνάβου και το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από σταφύλια ποικιλίας Αγιωργίτικο Νεμέας με τιμές 200 $\mu\text{g/ml}$ και 520 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Τα 5 εκχυλίσματα σταφυλιών που εμφάνισαν επαγωγή της SOD, ξαναμελετήθηκαν απουσία αιμολύματος για να διαπιστωθεί αν αυτή η αναστολή οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης. Από αυτά τα 5 εκχυλίσματα σταφυλιών μόνο το εκχύλισμα από σταφύλια Ασύρτικο Σαντορίνης παρουσίασε μία μικρή επίδραση στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία του ενζύμου της SOD.

Πίνακας 9: Επίδραση εκχυλισμάτων από σταφύλια στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Εκχύλίσματα από σταφύλια	PC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	% Αναστολής αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης απουσία SOD
Ασύρτικο Σαντορίνης	320	48
Μανδηλαριά Ηράκλειο (2004) ώριμο	καμία δράση	-
Μανδηλαριά Ρόδος (2003)	390	-
Σταφύλια Αγιωργίτικο Νεμέα	520	-
Υδατικό Μανδηλαριάς	480	-
Μεθανολικό Μανδηλαριάς	καμία δράση	-
Υδατικό Ασύρτικο	καμία δράση	-
Μεθανολικό Ασύρτικο	καμία δράση	-
Υδατικό Τυρνάβου	200	-
Εκχύλισμα Οίνου Κοτσιφάλι Ηράκλειο XAD4	καμία δράση	-



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα σύγκρισης PC₅₀ μεταξύ των σταφυλιών

3.3. Επίδραση εκχυλισμάτων από στέμφυλα στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Από τα 5 εκχυλίσματα από στέμφυλα που μελετήθηκαν, αναστολή στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης εμφάνισαν τα 3 και τα υπόλοιπα δεν παρουσίασαν καμία δράση (Πίνακας 10). Η τιμή PC₅₀ δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί σε 1 από τα 3 εκχυλίσματα. Υψηλότερη δράση παρουσίασε το εκχύλισμα που προέκυψε από στέμφυλα της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης με τιμή 600μg/ml και χαμηλότερη δράση εμφάνισε το εκχύλισμα από υδρολυμένο κλάσμα στέμφυλων της ποικιλίας Λιαστά Μανδηλαριά, το οποίο στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1mg/ml), έφτασε σε ποσοστά αναστολής 37%. Τα 3 εκχυλίσματα στέμφυλων που εμφάνισαν επαγωγή της SOD, ξαναμελετήθηκαν απουσία αιμολύματος για να διαπιστωθεί αν αυτή η αναστολή οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης. Από αυτά τα 3 εκχυλίσματα στέμφυλων τα 2 από στέμφυλα Ασύρτικο Ρόδου και υδρολυμένο κλάσμα λιαστών Μανδηλαριά παρουσίασαν μία μικρή επίδραση στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία του ενζύμου της SOD.

Πίνακας 10: Επίδραση εκχυλισμάτων από στέμφυλα στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης

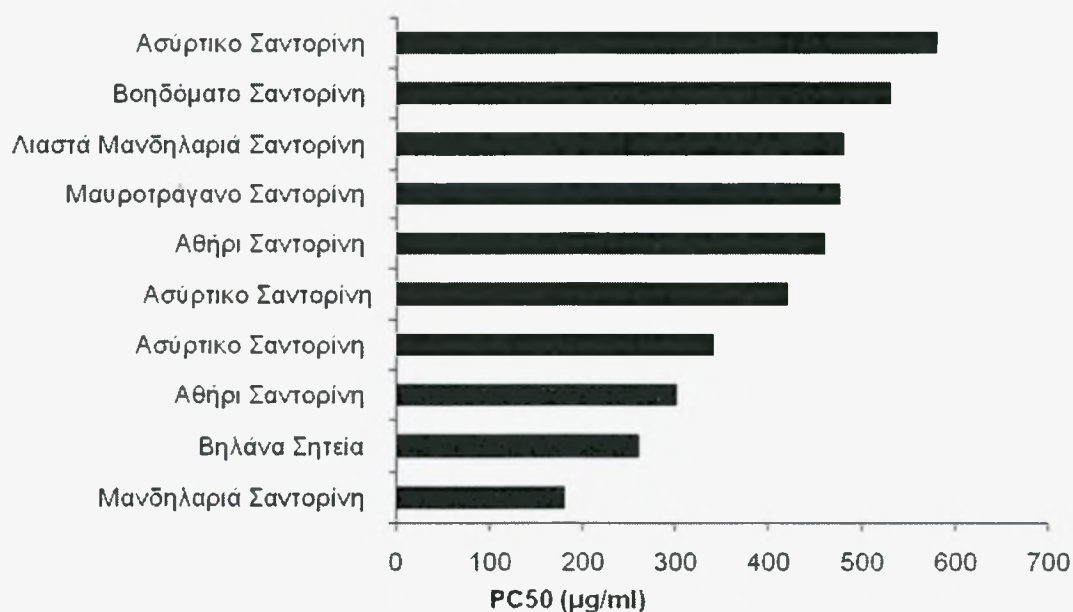
Εκχυλίσματα από στέμφυλα	PC₅₀ (μg/ml)	% Αναστολής αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης απουσία SOD
Ασύρτικο Ρόδος (2003)	650	13
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη (2004)	καμία δράση	-
Ασύρτικο Σαντορίνη (2003) (2)	600	-
Λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνη (2003) (2)	καμία δράση	-
Υδρολυμένο κλάσμα Λιαστά Μανδηλαριά	37% στα 1mg/ml	-

3.4. Επίδραση εκχυλισμάτων από βόστρυχους στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Από τα 12 εκχυλίσματα από βόστρυχους που μελετήθηκαν, αναστολή στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης εμφάνισαν τα 10 και τα υπόλοιπα δεν παρουσίασαν καμία δράση (Πίνακας 11). Το εύρος των τιμών του PC₅₀ κυμάνθηκε από 180μg/ml έως 580μg/ml (Διάγραμμα 3). Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε ήταν το υδατικό από βόστρυχους ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης και το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από βόστρυχους ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης με τιμές 180μg/ml και 580μg/ml αντίστοιχα. Τα 10 εκχυλίσματα από βόστρυχους που εμφάνισαν επαγωγή της SOD, ξαναμελετήθηκαν απουσία αιμολύματος για να διαπιστωθεί αν αυτή η αναστολή οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης. Από αυτά τα 10 εκχυλίσματα τα 5 (βόστρυχοι Βοηδόματο Σαντορίνης, Αθήρι Σαντορίνης, Μαυροτράγανο Σαντορίνης, Ασύρτικο Σαντορίνης, Μανδηλαριά Σαντορίνης) παρουσίασαν μία μικρή επίδραση στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία του ενζύμου της SOD.

Πίνακας 11: Επίδραση εκχυλισμάτων από βόστρυχους στη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης

Εκχυλίσματα από βόστρυχους	PC ₅₀ (μg/ml)	% Αναστολής αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης απουσία SOD
Αθήρι Σαντορίνη (2003)	460	-
Λιαστά Μανδηλαριά Σατορίνη (2004)	480	-
Βοηδόματο Σαντορίνη (2003)	530	19
Αθήρι Σαντορίνη (2004)	300	-
Ασύρτικο Σαντορίνη (2004) (1)	420	-
Βόστρυχοι Μαυροτράγανο Σαντορίνη (2004) (1)	475	15
Ασύρτικο Σαντορίνη (2003)	καμία δράση	-
Μαυροτράγανο Σαντορίνη (2004) (2)	καμία δράση	-
Ασύρτικο Σαντορίνη (2004) (2)	580	18
Βηλάνα Σητεία (2003)	260	-
Μανδηλαριά Σαντορίνη (2003)	180	-
Ασύρτικο Σαντορίνη (2003) (1)	340	-



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα σύγκρισης PC₅₀ μεταξύ των βόστρυχων

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σταφύλι και το κρασί παράγονται και καταναλώνονται σχεδόν παγκοσμίως. Τα τελευταία χρόνια, έχει βρεθεί από μελέτες ότι έχουν αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση και αυτό αποδίδεται στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Οι πολυφαινόλες με την αντιοξειδωτική τους δράση συμβάλλουν στην πρόληψη διάφορων ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες (Manach et al., 2005).

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν εκχυλίσματα από τμήματα σταφυλιών ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επίδραση των εκχυλισμάτων αυτών στην ενζυμική δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης μέσω αναστολής της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης. Η SOD είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει την οξείδωση του υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\bullet-}$) σχηματίζοντας H_2O_2 και O_2 , αποτελώντας έναν σημαντικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Παρόλα αυτά δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη η πιθανή επίδραση των πολυφαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της SOD.

Συνολικά μελετήθηκαν 27 εκχυλίσματα, από τα οποία τα 10 ήταν από σταφύλια, τα 5 από στέμφυλα και τα 12 από βόστρυχους. Όσα εκχυλίσματα παρουσίασαν αναστολή της αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης παρουσία του ενζύμου της SOD, επανεξετάστηκαν απουσία της SOD για να διευκρινιστεί αν αυτή η αναστολή οφείλεται στο εκχύλισμα ή στο συνδυασμό εκχυλίσματος-υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Από τα 10 εκχυλίσματα σταφυλιών δράση εμφάνισαν τα 5. Το εύρος των τιμών του PC_{50} κυμάνθηκε από 200 μ g/ml έως 520 μ g/ml. Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν το υδατικό εκχύλισμα σταφυλιού Τυρνάβου και το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό που προέκυψε από σταφύλια ποικιλίας Αγιωργίτικο Νεμέας με τιμές 200 μ g/ml και 520 μ g/ml αντίστοιχα. Από αυτά τα 5 εκχυλίσματα σταφυλιών μόνο το εκχύλισμα από σταφύλια Ασύρτικο Σαντορίνης παρουσίασε μία μικρή επίδραση στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία του ενζύμου της SOD.

Από τα 5 εκχυλίσματα από στέμφυλα παρουσίασαν δράση τα 3. Η τιμή PC_{50} δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί σε 1 από τα 3 εκχυλίσματα και υψηλότερη δράση παρουσίασε το εκχύλισμα από στέμφυλα της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης με τιμή 600 μ g/ml, ενώ χαμηλότερη δράση εμφάνισε το εκχύλισμα από υδρολυμένο κλάσμα στέμφυλων της ποικιλίας Λιαστά Μανδηλαριά, το οποίο στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1mg/ml), έφτασε σε ποσοστά επαγωγής 37%, στη

μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (1mg/ml). Από τα 3 εκχυλίσματα στέμφυλων τα 2 από στέμφυλα Ασύρτικο Ρόδου και υδρολυμένο κλάσμα λιαστών Μανδηλαριά παρουσίασαν μία μικρή επίδραση στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία του ενζύμου της SOD.

Από τα 12 εκχυλίσματα από βόστρυχους που μελετήθηκαν, τα 10 εμφάνισαν δράση. Το εύρος των τιμών του PC₅₀ κυμάνθηκε από 180μg/ml έως 580μg/ml. Το πιο δραστικό ήταν το υδατικό εκχύλισμα από βόστρυχους ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης και το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν από βόστρυχους Ασύρτικο Σαντορίνης με τιμές 180μg/ml και 580μg/ml αντίστοιχα. Από τα 10 εκχυλίσματα τα 5 (βόστρυχοι Βοηδόματο Σαντορίνης, Αθήρι Σαντορίνης, Μαυροτράγανο Σαντορίνης, Ασύρτικο Σαντορίνης, Μανδηλαριά Σαντορίνης) παρουσίασαν μία μικρή επίδραση στην αυτοοξειδωση της πυρογαλλόλης απουσία του ενζύμου της SOD.

Όσα εκχυλίσματα εμφάνισαν δράση μόνο με την παρουσία του ενζύμου της SOD, προκαλούν επαγωγή της δράσης του ενζύμου. Τα εκχυλίσματα όμως που παρουσίασαν δράση απουσία της SOD έχουν διπλή δράση. Συγκεκριμένα, εκτός από επαγωγή της SOD, εμφανίζουν και αντιοξειδωτική δράση απέναντι στο υπεροξειδικό ανιόν.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η διαφορά στη δραστικότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων οφείλεται στη διαφορετική χημική σύστασή τους, αφού αυτά προέρχονται τόσο από διαφορετικές ποικιλίες, όσο και από διαφορετικά τμήματα του φυτού (στέμφυλα, βόστρυχοι, σταφύλι). Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα διαφορετικά μέρη του φυτού που μελετήθηκαν προκύπτει ότι τα πιο δραστικά είναι τα εκχυλίσματα βοστρύχων. Η χημική ανάλυση ίδιων ποικιλιών σταφυλιών, βοστρύχων και στέμφυλων, μεταγενέστερων όμως ετών, με τη μέθοδο HPLC (Πίνακας 12, 13, 14) έδειξε ότι υπάρχουν αρκετές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στις περιεχόμενες πολυφαινόλες (παράρτημα). Όσον αφορά τη σύστασή τους, τα εκχυλίσματα περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία από πολυφαινόλες, οι οποίες ανήκουν στις ομάδες των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και των στιλβενίων. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες trans-ρεσβερατρόλη, ε-βινιφερίνη, αQ3-O-γαλακτοσίδη και trans-καφταρικό οξύ εντοπίστηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους βόστρυχους, των οποίων τα εκχυλίσματα είναι πιο δραστικά σε σχέση με τα εκχυλίσματα που προήρθαν από τα υπόλοιπα τμήματα των σταφυλιών, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα. Έχει βρεθεί από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε

ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, ότι η ρεσβερατρόλη αυξάνει την έκφραση και τη δραστικότητα της μιτοχονδριακής MnSOD (Robb EL., 2008).

Η επαγωγική, όσο και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων οδηγεί στην μείωση του υπεροξειδικού ανιόντος. Αυτό θα μπορούσε να έχει θετικές επιδράσεις σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την υψηλή συσσώρευσή του.

Επίσης, τα εκχυλίσματα θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην μείωση της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Μέχρι στιγμής έχει βρεθεί ότι ο οργανισμός προσαρμόζει τη δραστικότητα της SOD, αυξάνοντάς τη, με την χρόνια άσκηση. Παρόλα αυτά, αν και τα εκχυλίσματα συμβάλλουν στην επαγωγή της SOD, καθώς και αντιοξειδωτικά ενάντια στην ελεύθερη ρίζα του $O_2^{\bullet-}$, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από την SOD. Να σημειωθεί ότι το H_2O_2 ανήκει στις ROS και είναι αρκετά τοξικό. Σε αντίθεση με το υπεροξειδικό ανιόν, το H_2O_2 μπορεί να διαχέεται διαμέσου των μεμβρανών. Έτσι, θα πρέπει να μελετηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων και σε άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η καταλάση, η οποία μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα στέμφυλων και βόστρυχων, που αποτελούν τμήματα της αμπέλου μη εκμεταλλεύσιμα για καταναλωτικούς σκοπούς, παρουσίασαν επαγωγική δράση στην υπεροξειδική δισμουτάση. Είναι γνωστό ότι οι βόστρυχοι και τα στέμφυλα των σταφυλιών είναι παραπροϊόντα της οινοποίησης. Περίπου το 80% της ποσότητας των σταφυλιών χρησιμοποιείται στην οινοποίηση, οπότε το ποσοστό των παραπροϊόντων είναι αρκετά σημαντικό. Ορισμένα από αυτά τα παραπροϊόντα όπως οι βόστρυχοι και τα στέμφυλα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή βιοδραστικών συστατικών με φαρμακευτική και εμπορική αξία.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 12: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σταφυλιών (καρπών)

Συστατικά	Εκχυλίσματα Σταφυλιών (καρποί)		
	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασσύρτικο
Γαλλικό οξύ	1.98	2.24	1.03
(+)-Κατεχίνη	102.20	95.92	151.67
(-)-Επικατεχίνη	55.14	40.49	31.35
Προανθοκυανιδίνη Β3	21.01	20.35	24.51
Προανθοκυανιδίνη Β2	16.14	17.40	10.63
Επιγαλλοκατεχίνη	60.57	30.57	30.39
<i>trans</i> -Καφταρικό οξύ	0.25	1.05	4.31
<i>trans</i> -Ρεσβατραρόλη	0.007	0	0
ε-Βινιφερίνη	0.33	0.57	0.17
aQ 3-O-γαλακτοσίδη	3.32	2.73	3.49
aQ 3-O-γλυκοσίδη	1.74	1.08	1.12
aQ 3-O-ραμνοσίδη	0.92	0	4.73
Κερκετίνη	0	0	0
Κεμπφερόλη	0	0	0
Καφεϊκό οξύ	0	0	0
Συριγγικό οξύ	0	0	0
p-Κουμαρικό οξύ	0	0	0
Φερουλικό οξύ	0	0	0
TPC*	472.4	467.4	492.7

Πίνακας 13: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων στέμφυλων

Συστατικά	Εκχυλίσματα Στέμφυλων			
	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασύρτ. Σαντορίνη	Ασσύρτικο
Γαλλικό οξύ	20.44	13.64	22.21	10.78
(+)-Κατεχίνη	10.96	9.32	47.4	105.57
(-)-Επικατεχίνη	15.04	8.72	12.5	37.39
Προανθοκυανιδίνη Β3	4.12	3.61	5.22	9.96
Προανθοκυανιδίνη Β2	7.83	3.22	21.32	24.01
Επιγαλλοκατεχίνη	1.47	0.53	12.21	2.93
<i>trans</i> -Καφταρικό οξύ	0.12	6.40	0.44	0
<i>trans</i> -Ρεσβατραρόλη	0.24	2.00	0.29	0.33
ε-Βινιφερίνη	2.00	7.55	1.41	0.83
aQ 3-O-γαλακτοσίδη	3.96	4.63	4.25	1.56
aQ 3-O-γλυκοσίδη	2.68	2.62	4.63	7.29
aQ 3-O-ραμνοσίδη	0.87	1.78	1.9	3.34
Κερκετίνη	3.83	3.26	3.52	4.75
Κεμπφερόλη	1.53	0.06	0.54	0.54
Καφεϊκό οξύ	0	0.36	0.23	0.05
Συριγγικό οξύ	0.95	4.16	0.25	0.17
p-Κουμαρικό οξύ	0	0.47	0.26	0.25
Φερουλικό οξύ	0	0.06	0.09	0
TPC*	376.71	207.79	167	465.3

Πίνακας 14: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων βοστρύχων

Συστατικά	Εκχυλίσματα Βοστρύχων						
	Βοηδόματο	Μανδηλαριά	Ασσύρτικο	Λιαστα Μανδηλαριά	Μαυροτράγανο	Αθήρι Σαντορίνη 2003	Αθήρι Σαντορίνη 2004
Γαλλικό οξύ	11.49	12.84	41.44	12.84	8.33	8.9	7.25
(+)-Κατεχίνη	46.74	85.81	95.39	85.81	66.28	36.49	51.05
(-)-Επικατεχίνη	11.14	0.43	4.34	0.43	5.21	2.69	4.02
Προανθοκυανιδίνη Β3	20.54	31.55	26.01	31.55	21.04	20.01	14.9
Προανθοκυανιδίνη Β2	0	0	5.15	0	3.36	2.55	2.49
Επιγαλλοκατεχίνη	5.61	7.78	3.14	7.78	2.68	4.02	2.37
<i>trans</i> -Καφταρικό οξύ	16.11	1.62	4.87	1.62	2.33	0.4	9.39
<i>trans</i> -Ρεσβατρατόλη	5.47	17.56	12.62	17.56	4.85	3.86	8.59
ε-Βινιφερίνη	12.79	31.42	20.15	31.42	15.82	8.73	12.07
αQ 3-O-γαλακτοσίδη	12.06	6.63	8.20	6.63	11.04	4.55	13.63
αQ 3-O-γλυκοσίδη	3.86	4.61	2.06	4.61	5.84	3.01	4.95
αQ 3-O-ραμνοσίδη	0.90	0.46	0.34	0.46	0.63	0.9	1.34
Κερκετίνη	0.80	0.60	3.40	0.6	0.96	0.49	0.5
Κεμπφερόλη	0	0.20	0.32	0.2	0.17	0.03	0.07
Καφεϊκό οξύ	0.51	0	0.34	0	0.05	0.07	0.01
Συριγγικό οξύ	0.14	0.07	0.46	0.07	0.01	0.18	0
p-Κουμαρικό οξύ	0.12	0.08	0.04	0.08	0.07	0.04	0.01
Φερουλικό οξύ	0	0.03	0.04	0.03	0	0.06	0
TPC*	494.2	536.8	484.3	537	584	559	464

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καράταγλης 1994
- Κουρέτας Δημήτριος Βιοχημική Τοξικολογία (2003).
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, (2000).
- Anuradha Nandi & Chatterjee I. B. Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues, *J. Biosci.*, 1988, 13:305-315.
- Aruoma OI. Free radicals: dietary advantages and disadvantages. In: Scandalios JG, (ed). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997, 841-860.
- Beauchamp Charles & Fridovich Irwin, Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry* 1971, 44: 276-287.
- Beretz A, Stierle A, Anton R, Cazenave JP., Role of cAMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin. *Biochem Pharmacol* 1981, 31:3597–3600.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs., *Physiol Rev*, 1979, 59:527-605.
- Chang W-S, Lee Y, Lu F, Chiang H. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*, 1993, 13:2165–2170.
- Chen JJ, Bertrand H, Yu BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products., *Free Rad Biol Med*, 1995, 19: 583-590.
- Corvazier E, Maclouf J: Interference of some flavonoids and non-steroidal drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 835:315–321.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily α cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:10405-10409.
- Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *I General aspects. J Biol Chem*, 1987, 262:9895-9901.
- Deng DX, Cal I, Chakrabarti S, et al. Increased radiation- induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein. *Toxicology*, 1999, 134:39-49.
- Fang Y-Z. et al. 2002
- Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Microbiol Rev*, 1991, 55:561-85.
- Ferrell JE, Peter DG, Sing C, et al. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of cAMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices. *Mol Pharmacol*, 1979, 16:556–568.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG: Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*, 1993, 265:H774–H778.

- Flobe L. & Otting F. Superoxide Dismutase Assays, *Methods in enzymology*, 1984, 105:93-104.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*, 1995, 64:97-112.
- Gardner PR, Fridovich I. Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem*, 1991, 266:1478-1483.
- Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 1995, 41/12,1819-1828.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd edn. Oxford, Clarendon Press, 1989.
- Halliwell B. Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*, 2001.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr*, 1996, 16:33-50.
- Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res*, 1999, 443:37-52.
- Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 1986, 240:1302-1309.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 298:431-437.
- Jayatilke A, Shaw S. Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol*, 1998, 16:119-123.
- Ji, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci. Sports Exer*, 1993, 25:225-231.
- Jour'dHeuil D, Vaananen P, Meddings JB. Lipid peroxidation of the brushborder membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am J Physiol*, 1993, 264:G1009-1015.
- Juhasz Olga, Erno Dworschak & Pal Kozma. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1987, 37:275-281.
- Keaney JF, Jr: Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Progr Cardivasc Dis*, 1995, 38:129-154.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 1995, 11:376-381.
- Lijnen P, Petrov V, van Pelt J, Fagard R. Inhibition of superoxide dismutase induces collagen production in cardiac fibroblasts. *Am J Hypertens.*, 2008, 10:1129-1136.

- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, et al. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:11853-11858.
- Manach C. et al. 2004
- Martin J.P.Jr, Dailey M & Sugarman E. Negative and Positive Assays of Superoxide Dismutase Based on Hematoxylin Autooxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 255, 329-336.
- Maurizio Paci, Alessandro Desideri, and Giuseppe Rotilio, ‘‘ Cyanide Binding to Cu,Zn Superoxide Dismutase’’ *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1988, 263, 162-166.
- McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243:5753-5760.
- McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O., Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant Physiol.*, 1996, 111(4):1177-1181.
- Mylonas C., Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage, *In Vivo*, 1999, 13:295-310
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:3030-3034.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med. Sci. Sports Exerc*, 2006, 38:1443-1450.
- Oleinick NL, Chiu S, Ramakrishnan N, Xue L. The formation, identification and significance of DNA protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer*, 1986, 55:135-140.
- Oury TD, Chang LY, Day BJ, et al. Compartmentalization of radical reactions. In: Davies KJA, Ursini FS, (eds). *The Oxygen Paradox*. Padova, *CLEUP University Press*, 1995, 195-207.
- Oury TD, Chang L-Y, Marklund SL, et al. Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest*, 1994, 70:889-898.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*, 1996, 75:617-636.
- Parsatharathy S, Wieland E, Steinberg D: A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989, 86:1046–1050.
- Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio KO, et al. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am J Physiol*, 2000, 278:C118-125.
- Pietri S. Seguin JR. Darbigny P. et al. Ascorbyl freeradical—a noninvasive marker of oxidative stress in human open heart surgery. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16:523-8

- Robb EL., Page MM., Wiens BE., Stuart JA., Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(2):406-412
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362:801–809.
- Ruckstuhl M, Beretz A, Anton R, Landry Y: Flavonoids are selective cGMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 1979, 28:535–538.
- Sebaldt R. J., Adams D. O. and Uhing R. J., Quantification of contributions of phospholipid precursors to diradylglycerols in stimulated mononuclear phagocytes. *Biochem J*. 1992, 284(Pt 2): 367–375.
- Sies H, Sharov VS, Klotz L-O, et al. Glutathione peroxi-dase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem*, 1997, 272:27812-27817.
- Singh AK, Dhaunsi GS, Gupta MP, et al. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315:331-338.
- Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1997, 11:287-313.
- Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, 1997, 10:485-494.
- Tham DM, Whitin JC, Kim KK, et al. Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol*, 1998, 275:G1463-1471.
- Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 2008, 33:1140-1154.
- Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem Biophys Acta*. 1987, 924(3):408-19.
- Whittaker JW. Manganese superoxide dismutase. *Metal Ions Biol Syst*, 2000, 37:587-611.

