

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ



ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

<<Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης χρωμενοπυριδινών >>

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ:

ΓΩΓΟΥΛΟΥ ΠΕΤΡΟΥΛΑ-ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΚΟΝΤΟΓΙΩΡΓΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 από την Γώγουλου Πετρούλα-Ευαγγελία, φοιτήτρια του Τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας του ΑΤΕΙΘ, με θέμα:

«Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης χρωμενοπυριδινών»

Αισθάνομαι την ανάγκη να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε μία σειρά ανθρώπων, χωρίς τη βοήθεια των οποίων θα ήταν ανέφικτη η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Παπαδόπουλο επίκουρο καθηγητή στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης για την ανάθεση της πτυχιακής αυτής μελέτης.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Κοντογιώργη επιστημονικό συνεργάτη στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμβολή του στη διεκπεραίωσή της και για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις του κατά την ανάλυση και συγγραφή του θεωρητικού μέρους.

Γώγουλου Πετρούλα-Ευαγγελία,
Τελειόφοιτος Τμήματος Διαιτολογίας - Διατροφής

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	3
Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:ΧΡΩΜΟΝΕΣ.....	5
Α.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
Α.1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΧΡΩΜΟΝΕΣ.....	5
Α.1.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΡΩΜΟΝΩΝ.....	6
Α.1.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΡΩΜΟΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ.....	7
Α.1.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΧΡΩΜΟΝΩΝ.....	7
Α.1.5.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ 3-ΦΟΡΜΥΛΟΧΡΩΜΟΝΩΝ.....	7
Α.1.5.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ 3-ΚΥΑΝΟΧΡΩΜΟΝΩΝ.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	9
Α.2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	9
Α.2.2 ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	9
Α.2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	10
Α.2.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	11
Α.2.5 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	11
Α.2.6 ΧΗΜΕΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	11
Α.2.7 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	12
Α.2.8 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ:ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	13
Α.2.9 ΒΛΑΒΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	14
Α.2.10 ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	15
Α.3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	17
Α.3.2 ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ.....	18
Α.3.3 ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	19
Α.3.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	19
Α.3.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	20
Α.3.6 ΧΗΜΕΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	21
ΣΚΟΠΟΣ.....	23
Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
Β.1.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1- ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH) ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ	
Β.1.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	
Β.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ (LOX) ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ	
Β.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2- ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH)	

B.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΪΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΑΛΑΣ ΤΟΥ 2,2'- ΔΙΑΖΩ-2-ΑΜΙΔΙΝΟΠΡΟΠΑΝΙΟΥ (ΑΑΡΗ)

B.5 Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να ανταγωνίζονται το DMSO στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών $\cdot\text{OH}$

ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

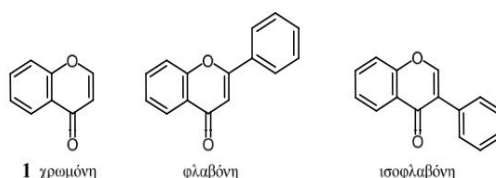
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο :ΧΡΩΜΟΝΕΣ

A.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι **χρωμενοπυριδίνες** είναι, **οργανικές ετεροτρικυκλικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα δακτύλιο πυριδίνης συγχωνευμένο με ένα χρωμένιο**. Ανήκουν σε μια ευρύτερη ομάδα χημικών ενώσεων τις **χρωμόνες**. Οι **χρωμόνες** ή 1,4-βενζοπυρόνες αποτελούν βασική δομική μονάδα ενός μεγάλου αριθμού φυσικών προϊόντων. Αποτελούν επίσης το βασικό πυρήνα μιας ολόκληρης τάξης φυσικών προϊόντων, των **φλαβονών** (οι οποίες αποτελούν κατηγορία των φλαβονοειδών, φυσικών χρωστικών) (1) και αποτελούν επίσης το κύριο φαρμακοφόρο τμήμα πολλών μορίων με σημαντική βιολογική και φαρμακευτική δράση, είτε αυτά συντίθενται από τη φύση είτε σε εργαστήρια. Ορισμένες από τις ιδιότητες που εμφανίζουν διάφορα παράγωγά τους φαίνεται να είναι αντιφλεγμονώδεις, αντιασθματικές, αντικαρκινικές και κατά της αλλεργικής ρινίτιδας και του άσθματος. Ακόμη φαίνεται να αποτελούν αναστολείς της συνθετάσης της τυροσίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C και εμφανίζονται ως αντι-ιικοί, αντιφυματικοί και αντι-υπερτασικοί παράγοντες. Οι ενώσεις αυτές πλεονεκτούν έναντι πολλών άλλων λόγω της μικρής τοξικότητας που εμφανίζουν στα θηλαστικά. Επίσης, βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο διαιτολόγιο του ανθρώπου εξαιτίας της ύπαρξής τους σε πολλά φυτά.

A.1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΧΡΩΜΟΝΕΣ

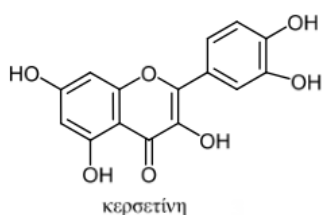
Η χρωμόνη ή 1,4-βενζοπυρόνη αποτελεί βασική δομική μονάδα ενός μεγάλου αριθμού φυσικών προϊόντων, όπως στα φλαβονοειδή ή ισοφλαβονοειδή που συναντώνται κυρίως στα φυτά.



Η χρωμόνη αποτελεί το κύριο φαρμακοφόρο πολλών μορίων με σημαντική βιολογική και φαρμακευτική δράση, που είτε συντίθενται από τη φύση, είτε σε εργαστήρια.(2) Μεταξύ αυτών είναι α)η κερσετίνη, η οποία βρίσκεται στο κρεμμύδι με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, β)το χρωμογλυκικό οξύ,

κατά της αλλεργικής ρινίτιδας και του άσθματος το οποίο βρίσκεται σε φάρμακα, όπως πχ. Allergitin και τέλος, γ) η γενιστεΐνη η οποία είναι η ισοφλαβόνη της σόγιας, με αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες.

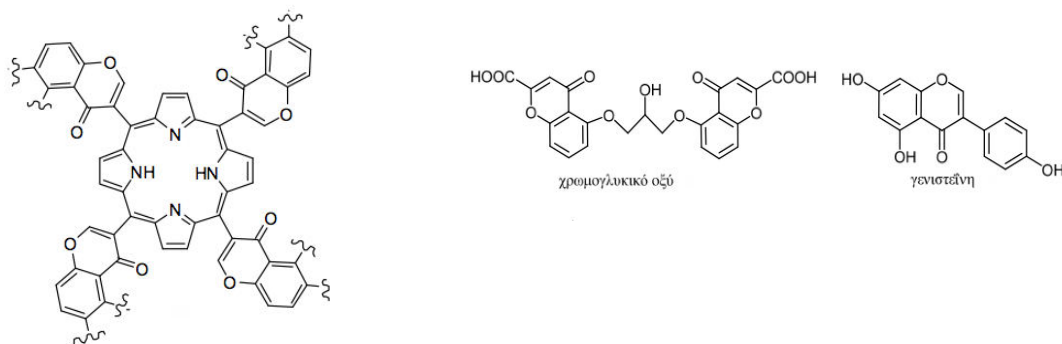
Κάποια χρωμονικά παράγωγα, φαίνεται να αποτελούν αναστολείς της τυροσίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης C και αυτά εμφανίζονται ως αντι-πικροί, αντιφυματικοί και αντι-υπερτασικοί παράγοντες(3,4) επιπλέον είναι, αντικαρκινικοί παράγοντες με σημαντικές αντιμεταστατικές ιδιότητες. Υπάρχουν επίσης και χρωμόνες οι οποίες δρουν στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης.(5)



Επιπροσθέτως, τα πορφυρινικά παράγωγα που περιέχουν στο μοριό τους χρωμόνη, θεωρούνται σημαντικής βιολογικής δραστηριότητας (6). Ο πορφυρινικός δακτύλιος είναι, ένας από τους πιο γνωστούς στη φύση τόσο, στο φυτικό βασίλειο, κυρίως ως **χλωροφύλλη**, όσο και στο ζωικό, συγκεκριμένα στο δακτύλιο της αίμης, στο κυτόχρωμα P450 αλλά και σε άλλα ενεργά συστήματα του κυττάρου με τεράστια βιολογική σημασία. (7)

A.1.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΡΩΜΟΝΩΝ

Οι χρωμόνες συντίθενται είτε σε βασικές είτε σε όξινες συνθήκες. Τα



περισσότερα χρωμονικά παράγωγα, για να συντεθούν απαιτούν ισχυρά όξινες συνθήκες στο τελικό στάδιο της σύνθεσης.(8) Το σύστημα πιπεριδίνης – ζέουσας πυριδίνης εξασφαλίζει τις βασικές συνθήκες, για τη σύνθεση των χρωμονών σε βασικό περιβάλλον, αν και είναι μια μέθοδος

πολύ περιορισμένη στη χρήση της. Έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, και η θέρμανση με μικροκύματα για την κυκλοποίηση.(9) Υπάρχει ακόμη πλήθος άλλων μεθόδων, για τη συνδυαστική σύνθεση χρωμονών και φλαβονών.(10)

Μια πολύ σημαντική πρόδρομη ένωση - μόριο για την παρασκευή πιο σύνθετων χρωμονικών παραγώγων αποτελεί η **3-κυανοχρωμόνη**. Με την εισαγωγή μιας ισχυρά ηλεκτραρνητικής ομάδας, όπως είναι η κυανομάδα, στην 3-θέση του χρωμονικού δακτυλίου, μεταβάλλεται ουσιαστικά η δραστηριότητα του πυρονικού δακτυλίου, έχοντας σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πλήθους ενώσεων, ανάλογα, με το στόχο της εκάστοτε μελέτης. (11,12)

A.1.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΡΩΜΟΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

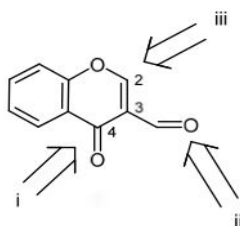
Για πολλές ερευνητικές ομάδες τα χρωμονικά παράγωγα εξαιτίας, των σημαντικών ιδιοτήτων τους, αποτέλεσαν και αποτελούν, συνθετικούς στόχους.(13)

A.1.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΧΡΩΜΟΝΩΝ

A.1.5.1

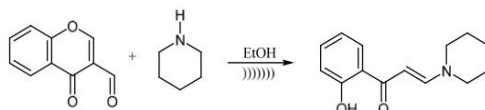
- Αντιδράσεις 3-φορμυλοχρωμονών,

Η 3-φορμυλοχρωμόνη αποτελεί ένα πολύ ενεργό σύστημα σε πυρηνόφιλες προσβολές εξαιτίας της α,β -ακόρεστης κετο-ομάδας (i), της φορμυλο-ομάδας ως υπο- καταστάτη στην 3-θέση (ii) και λόγω του πολύ ενεργού ηλεκτρονιόφιλου άνθρακα στη 2-θέση (iii)



Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αντιδράσεις 3-φορμυλοχρωμονών, με θέση προσβολής τον C-2 χρωμονικό άνθρακα, από πυρηνόφιλα αντιδραστήρια. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν σε διάνοιξη του χρωμονικού δακτυλίου και σχηματισμό προϊόντων που είναι συνήθως νέες ετεροκυκλικές ενώσεις.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντίδραση της 3-φορμυλοχρωμόνης με την πιπεριδίνη, που επιτυγχάνεται σε αιθανολικό διάλυμα με επίδραση μικροκυμματικής ακτινοβολίας. Για τον σχηματισμό του τελικού προϊόντος παρατηρείται αποφορμυλίωση. (14)



A.1.5.2

Αντιδράσεις 3-κυανοχρωμονών

Στις αντιδράσεις 3-κυανοχρωμονών, οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι πολύ περιορισμένες σε σχέση με τις αντιδράσεις των 3-φορμυλοχρωμονών. Η κυανο-ομάδα, λόγω της εύκολης υδρόλυσής της, παρουσία βάσης, συμμετέχει στις περισσότερες αντιδράσεις, σχηματίζοντας την 2-αμινο-3-φορμυλοχρωμόνη (εικόνα). Το γεγονός αυτό, κάποιες συνθετικές πορείες το εκμεταλλεύονται, για να επιτύχουν τον σχηματισμό νέων προϊόντων. (15)

Η αντίδραση 3-κυανοχρωμόνης, αρχικά από τον C-2 χρωμονικό άνθρακα με μεθυλοκετόνη και παρουσία βάσης DBU, αποτελεί μια πολύ πρόσφατη αναφορά. Χρησιμοποιείται διαλύτης αιθανόλης, σε θερμοκρασία βρασμού και το τελικό προϊόν που απομονώνεται είναι η **χρωμενοπυριδίνη**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο :ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

A.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ως αντιοξειδωτική μπορεί να οριστεί οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση του ενός υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. (16).

Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών ως απενεργοποιητές ελευθέρων ριζών και των υδροξυλιωμένων ελευθέρων ριζών, είναι να εμποδίσει στα συστατικά του κυττάρου την καταστροφή που προκύπτει ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες. Πρόσφατα, σημαντικός αριθμός στοιχείων έχει δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες έχουν κεντρικό ρόλο ως συντελεστές στο γήρας και σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η φθορά του ανοσοποιητικού συστήματος και οι εγκεφαλικές δυσλειτουργίες. (17,18).

Ευτυχώς, η δημιουργία ελευθέρων ριζών ελέγχεται φυσικά από πολλές ευεργετικές ενώσεις, τα αντιοξειδωτικά. Όταν η διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών είναι μειωμένη, αυτή η καταστροφή μπορεί να συσσωρευτεί και να επιφέρει αποτελέσματα οξειδωτικού stress. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να σταθεροποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές επιτεθούν σε κύτταρα και βιολογικούς στόχους. Έτσι είναι κρίσιμα για την διατήρηση της ιδανικής υγείας του κυττάρου και του οργανισμού (19).

A.2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Η χημική έννοια του όρου "αντιοξειδωτικό" αναφέρεται στην τάση ενός μορίου για απόδοση ενός ηλεκτρονίου (e-) προς έναν οξειδωτικό παράγοντα – συνήθως ελεύθερη ρίζα – με αποτέλεσμα την προφύλαξη άλλων μορίων, τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα (20).

Προκειμένου μια ένωση π.χ. φαινόλη να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό, πρέπει να έχει δύο ιδιότητες:

α) όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξειδωση

υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοοξείδωση ή την προκληθείσα από ελεύθερες ρίζες οξείδωση και

β) η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται μετά τη δράση της πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακού υδρογονικού δεσμού) σε περαιτέρω οξείδωση. (21)

Ακόμη, ένα αντιοξειδωτικό πρέπει:

1. να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με το υπόστρωμα για την ενεργή διάμεση ουσία,
2. να επαναγεννάται γρήγορα από το βιολογικό σύστημα
3. να έχει πρόσβαση στην ενεργή διάμεση ουσία στο μικροπεριβάλλον
4. Το αντιοξειδωτικό πρέπει να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα. (22)

Τα βιολογικά αντιοξειδωτικά έχουν τις εξής ιδιότητες:

α) η ανασταλτική δράση τους εστιάζεται κυρίως στον ενδοκυττάριο χώρο. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να διαπερνούν με κάποιον τρόπο τις κυτταρικές μεμβράνες και να βρίσκονται την κατάλληλη στιγμή στο κατάλληλο σημείο και στην κατάλληλη συγκέντρωση.

β) μπορούν να βοηθούν τους αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου συντελώντας, για παράδειγμα, στη διατήρηση της στάθμης της γλουταθειόνης και κατ' επέκταση βοηθώντας στην απομάκρυνση του H₂O₂.

γ) μπορούν να δράσουν ως χηλικοί παράγοντες δεσμεύοντας οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα μετάλλων και άρα αναστέλλοντας τη συμμετοχή τους σε αντιδράσεις παραγωγής κυτταροτοξικών προϊόντων.

δ) σε ορισμένες περιπτώσεις προάγουν τη βιοσύνθεση νέων πρωτεϊνών, οι οποίες ενέχονται είτε στην άμυνα ή σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων.

ε) προστατεύουν τα κύτταρα αναστέλλοντας τις διαδικασίες μεταγωγής του σήματος, τις οποίες προκαλεί ο συγκεκριμένος οξειδωτικός παράγοντας. (20)

A.2.3 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Τα τελευταία 5 χρόνια έχουν γίνει πολλές έρευνες παγκοσμίως που αφορούν τις θετικές επιδράσεις της τροφής στην υγεία. Ολοένα αυξανόμενη έμφαση έχει δοθεί στις διεργασίες που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο (23). Ενδιαφέρον επίσης έχει αναπτυχθεί για το ρόλο της οξειδωτικής / αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στη διαδικασία της γήρανσης και των εκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης. Τα εν δυνάμει ενεργά συστατικά φρούτων, λαχανικών, βοτάνων, ριζών και φύλλων έχουν μελετηθεί

εκτεταμένα. Προσοχή έχει δοθεί στα μη διατροφικά συστατικά φυτικής προελεύσεως όπως τσάι, καρυκεύματα και βότανα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες και ειδικά τα φλαβονοειδή έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δύναμη που προστατεύει τα κύτταρα από την βλαπτική επίδραση των ελεύθερων ριζών (24).

A.2.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

A.2.5 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: (i) ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), (ii) ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως (HClO), (iii) συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και (iv) μόρια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). (25) Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, κλέβοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. (26)

A.2.6 ΧΗΜΕΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες που εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την επιβλαβή δράση των τελευταίων (27).

Σύμφωνα με την υπόθεση των ελευθέρων ριζών, οι σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της αδυναμίας του οργανισμού να ανταπεξέλθει στο οξειδωτικό στρες που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της ζωής. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών σε βάρος των δεύτερων.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούνται οξειδωτικές βλάβες σε μόρια όπως το DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες. Επίσης, επί μακράν προσβολή ενός οργάνου από ελεύθερες ρίζες, το οποίο είναι ήδη ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες, παρατηρούνται οργανικές δυσλειτουργίες.

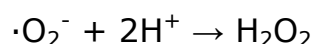
Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να αυξηθούν από εξωμεταβολικές (π.χ. μόλυνση, ακτινοβολία, τοξίνες κ.τ.λ.) ή ενδομεταβολικές πηγές. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι αυτές που οδηγούν στη δημιουργία (\square_2O) από μεταφορά ηλεκτρονίων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Για τη μετατροπή του οξυγόνου σε νερό αποκτείνεται μεταφορά ηλεκτρονίων. Κατά τις αντιδράσεις αυτές παράγονται (HO_2) (υδροπεροξυλική ρίζα), (H_2O_2) (υπεροξειδίο του υδρογόνου) και ($OH\cdot$) (ρίζα υδροξυλίου) που είναι το πιο δραστικό προ-οξειδωτικό. Άλλες κυτταρικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι το ηπατικό μικρόσωμα και οι πυρηνικές μεμβράνες οι οποίες περιέχουν συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων που μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες (28)

A.2.7 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ

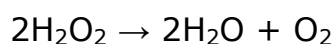
Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η παραγωγή οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και τελικά συμμετέχει στο σχηματισμό μορίων νερού. Επιπρόσθετα, οι αντιδράσεις της ουβικινόνης της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν και αυτές μια τάση να προκαλούν διαρροή ηλεκτρονίων. Συνολικά, μέχρι και 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα σουπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$). Υποστηρίζεται ότι στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβινοπρωτεΐνες επίσης παράγεται ένα ποσοστό των συνολικών ROS. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450.

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

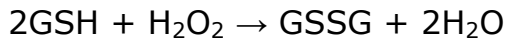
Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), που καταλύει την αντίδραση:



Η καταλάση, που καταλύει την αντίδραση:



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την αντίδραση:



Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδεϋδών. Ως περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες A, D και E, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβινοειδή είναι εν δυνάμει περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.

A.2.8 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ:ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Ο όρος ελεύθερη ρίζα αντιπροσωπεύει ένα άτομο ή ένα μόριο το οποίο έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τα οποία βρίσκονται μόνα τους στο εξωτερικό τροχιακό. Η ανισορροπία των ηλεκτρονίων στα τροχιακά έχει ως αποτέλεσμα, στις περισσότερες περιπτώσεις, την υψηλή δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών. (29)

Μία ποικιλία ελευθέρων ριζών σχηματίζεται καθημερινά στον ανθρώπινο οργανισμό, από αιτίες όπως υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, έκθεση σε ουσίες όπως το όζον, η αιθαλομίχλη, χημικά και φάρμακα, καθώς και κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών. Τέτοιες ρίζες είναι:

A) Η ρίζα του υπερυπεροξειδίου (O-O•)

Αυτές έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο, πράγμα που σημαίνει ότι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο βρίσκεται στο οξυγόνο. Σχηματίζονται όταν τα μόρια οξυγόνου αντιδράσουν μη-αντιστρεπτά με ένα ηλεκτρόνιο και το οξυγόνο ανάγεται κατά ένα ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό μιας ρίζας υπερυπεροξειδίου. Η ρίζα αυτή χρησιμεύει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως μεταφορά ηλεκτρονίων, υδροξυλίωση και στην ανοσολογική απόκριση.

B) Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H-O-O-H)

Το υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν είναι ρίζα, αλλά θεωρείται ενεργή μορφή οξυγόνου. Παράγεται από την αντίδραση δύο υπερυπεροξειδίων με ένα μόριο υδρογόνου, παρουσία ενζύμου.

Γ) Ρίζα υδροξυλίου (O•-H)

Η ρίζα υδροξυλίου έχει ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο. Μπορεί να παραχθεί από έκθεση σε ακτίνες γ, καθώς και από αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με άλλα μόρια, όπως το υπερυπεροξειδίου και ο σίδηρος.

Δ) Υδρο-υπεροξειδικές ρίζες (H-O-O•)

Ε) Λιποειδικές ρίζες με κεντρικό άτομο τον άνθρακα (L•)

Σχηματίζονται από την αντίδραση μιας ρίζας υδροξυλίου με ένα πολυακόρεστο λιπαρόοξύ (LH).

ΣΤ) Υπεροξειδικές λιποειδικές ρίζες (LOO•)

Ζ) Υπεροξειδία των λιπιδίων (LOOH)

Γνωστά επίσης και ως λιπο-υπεροξειδία και υπεροξειδωμένα λιπαρά οξέα.

Η) Αλκοξειδία των λιποειδών (LO•)

Θ) Μονήρες μοριακό οξυγόνο (O₂) (30)

A.2.9 ΒΛΑΒΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Η αυτοξειδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση με το οξυγόνο, η οποία προχωρά με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Έχει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό, που περιγράφονται από τις παρακάτω αντιδράσεις:

Έναρξη → R• (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση → R• + O₂ → ROO• (ρίζα υπεροξειδίου)

ROO• + RH → R• + ROOH

Τερματισμός → R• + R• → R-R

ROO• + R• → ROOR

ROO• + ROO• → ROOR + O₂

(αδρανή προϊόντα που δεν προκαλούν έναρξη ή διάδοση της αντίδρασης)
(28)

Οι ελεύθερες ρίζες, και οι ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου αντιδρούν με μόρια DNA, πρωτεΐνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ερυθρά αιμοσφαίρια, αποσπώντας ηλεκτρόνια, αλλοιώνοντας τις δομές των μορίων αυτών. Έτσι, οι ελεύθερες ρίζες ενοχοποιούνται για δεκάδες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρυνση, πρόωρη αποικοδόμηση πρωτεϊνών, αιμόλυση και καρκίνο. (30)

Η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών στο σώμα προκαλεί σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες, που παράγονται κατά τις αντιδράσεις οξειδωσης καταστρέφουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) την μεμβρανών και βλάπτουν το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Έτσι, τα προϊόντα της οξειδωσης είναι υπεύθυνα για αρκετές ασθένειες, όπως καρκίνος, καρδιοπάθειες, καταρράκτης, νευροπάθειες και ενζυμικές ασθένειες. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να διευκολύνουν τη διαδικασία της γήρανσης (30). Επομένως, η αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες απαιτεί την υψηλή πρόσληψη διαιτητικών αντιοξειδωτικών (31,32).

A.2.10 ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Μια κατηγορία ενώσεων με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικά συστατικά των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι εμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπών, δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και το ενεργό οξυγόνο, δεσμεύουν ιόντα σιδήρου και απενεργοποιούν την λιποξυγενάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Η ομάδα των φλαβονοειδών αποτελείται από περισσότερες από 3.000 ενώσεις, πιο σημαντικές από τις οποίες είναι οι φαινόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβονόλες η κερκετίνη, οι κατεχίνες, οι τανίνες, τα φαινολικά οξέα και οι ανθοκυανίνες.

Η κυριότερη αιτία που καθιστά τα φλαβονοειδή ευεργετικά για την υγεία είναι οι αντιοξειδωτικές, οι αντιθρομβωτικές και οι αντικαρκινικές τους ιδιότητες.

Η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα σε διάφορες παθήσεις. Το φαινόμενο αυτό γίνεται ορατό μετά από συμπτώματα όπως το αιμορραγικό σύνδρομο, η υπέρταση και τα οιδήματα και σε παθήσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, το σκορβούτο (έλλειψη βιταμίνης C), οι αιμορροΐδες και τα διάφορα έλκη. Πρόσφατες μελέτες με φυτικά εκχυλίσματα φλαβονοειδών απέδειξαν ότι μειώνουν τη διαπερατότητα και την ευθραυστότητα των τοιχωμάτων των τριχοειδών. Η δράση αυτή πιθανόν να οφείλεται στο δεσμό που αναπτύσσεται μεταξύ αυτών και του κολλαγόνου των τοιχωμάτων των τριχοειδών.

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι έχουν προστατευτική δράση στην αρτηριοσκλήρωση και αντιοξειδωτική δράση που εμποδίζει την οξείδωση της LDL. Τέτοια δράση παρουσιάζουν οι ανθοκυανίνες, γλυκοσίδες που βρίσκονται κυρίως στο κόκκινο κρασί. Ο χυμός λεμονιού μειώνει την χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια ενώ του πορτοκαλιού αυξάνει την HDL. Αντιθρομβωτική δράση έχουν οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες . Ελαττώνουν την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και έτσι μειώνουν την πιθανότητα δημιουργίας θρόμβων. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν χαμηλό ποσοστό στεφανιαίας νόσου σε γαλλικές πόλεις όπου καταναλώνεται το κόκκινο κρασί.

Διάφορες εργαστηριακές αναλύσεις και μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δώσει ενδείξεις για μια σειρά θετικών επιδράσεων των φλαβονοειδών στην υγεία, όπως η καταπολέμηση φλεγμονών και η αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Η τανγκερετίνη, για παράδειγμα, που περιέχεται στη φλούδα των κίτρων, έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ ερευνητές του υπουργείου Υγείας των ΗΠΑ σε δημοσίευσή τους τονίζουν ότι τα φλαβονοειδή του πορτοκαλιού εμποδίζουν τη δράση ενζύμων που μετατρέπουν κάποια συστατικά του καπνού του τσιγάρου σε καρκινογενείς ουσίες.

Επίσης οι φλαβόνες (από το λατινικό flavus, που σημαίνει κίτρινο) έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, πιθανόν λόγω της αναστολής μερικών ενζυμικών συστημάτων που εμπλέκονται στο σχηματισμό και την εξέλιξη της φλεγμονής.

Μία ακόμα ευεργετική ιδιότητα των ουσιών αυτών είναι το γεγονός ότι αποτρέπουν το σχηματισμό ελκών, μετριάζουν των πόνο και σταματούν την αιμορραγία. Πρόσφατες μελέτες in vivo σε ποντίκια έδειξαν ότι η μυρικετίνη και ο γναφαλοσίδης ήταν οι πιο αποτελεσματικές ουσίες, ενώ στα κουνέλια ιδιαίτερη δράση είχαν οι κατεχίνες.

Γενικά, φλαβονοειδή θα βρούμε στο κρεμμύδι, στα μούρα, στα μύρτιλλα, στο μπρόκολο, στα μήλα, στις φράουλες, στα δημητριακά, στο κόκκινο κρασί, στο πράσινο και μαύρο τσάι, στα κόκκινα σταφύλια, στη σόγια, στα χόρτα, στο λάχανο, στο κουνουπίδι, στο πορτοκάλι, στο λεμόνι και στη σοκολάτα.

Συμπερασματικά, μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές έρευνες που αφορούν τις παροχές των φλαβονοειδών στην υγεία μας και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ουσίες αυτές είναι ικανές να μας προστατέψουν από καρδιαγγειακά επεισόδια, από καρκινικούς όγκους και από τις βλαβερές ελεύθερες ρίζες. Όμως, οι επιδημιολογικές μελέτες δεν έχουν δώσει σαφή συμπεράσματα. Έρευνα Φινλανδών επιστημόνων, που δημοσιεύθηκε στο British Medical Journal το Φεβρουάριο του 1996, έδειξε ότι οι μειωμένες πιθανότητες θανάτου από καρδιακό επεισόδιο σχετίζονται με την κατανάλωση μήλων και κρεμμυδιών, δύο από τις κυριότερες διατροφικές πηγές φλαβονοειδών, ενώ οι ίδιοι ερευνητές επισήμαναν πιθανή προστασία και από τον καρκίνο του πνεύμονα. Αντίθετα, έρευνα επιστημόνων του Χάρβαρντ κατέδειξε ότι τα φλαβονοειδή παρέχουν στατιστικά ασήμαντη προστασία για τη στεφανιαία νόσο. Το σίγουρο είναι ότι τα φλαβονοειδή δεν είναι σε καμία περίπτωση βλαβερά για την υγεία μας, οπότε μόνο να κερδίσουμε μπορούμε από την ένταξή τους στο καθημερινό μας διαιτολόγιο. Άλλωστε, τα φρούτα και τα λαχανικά στα οποία περιέχονται είναι από μόνα τους η βάση μιας υγιεινής διατροφής και ένας ακόμη τρόπος να κερδίσουμε συμμάχους για την αμυντική λειτουργία του οργανισμού μας, που είναι τα φλαβονοειδή.

A.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν την πιο κοινή και ευρέως διαδεδομένη ομάδα φαιολικών παραγώγων των φυτών. Η κοινή τους δομή είναι αυτή των διφαινυλοπροπανίων (C6-C3-C6) που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μέσω τριών ανθράκων που συνήθως σχηματίζουν ένα -Ο-ετεροκύκλικό.

Βιογενετικά, ο δακτύλιος A συνήθως προέρχεται από ένα μόριο ρεσορκινόλης ή φλωρογλυκινόλης που συντέθηκε από την οξική οδό, ενώ ο δακτύλιος B προέρχεται από τη σικιμική οδό. (33) Τα φλαβονοειδή μερικές φορές απαντώνται στα φυτά ως αγλυκόνες, αν και ανευρίσκονται συνήθως ως γλυκοζιτικά παράγωγα (34).

Οι κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών περιλαμβάνουν φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες (κατεχίνες) και χαλκόνες. Οι διαφορές μεταξύ

των επιμέρους τάξεων συνίστανται σε διαφορές στο δακτύλιο Γ (απουσία ή παρουσία διπλού δεσμού, παρουσία 3-υδροξυ ή και 2-οξυ ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτυλίους Α και Β (Vinson, 1998). Μεταξύ των φλαβονοειδών, οι φλαβόνες (π.χ. λουτεολίνη, απιγενίνη, διοσμετίνη), οι φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, καιμπφερόλη, μυρισετίνη) και οι γλυκοζίτες τους είναι οι πιο κοινές ενώσεις, ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, με εξαίρεση τα φύκια και τα μανιτάρια. Οι φλαβονόλες απαντώνται ως Ο- γλυκοζίτες. Επίσης, οι Ο- και C- γλυκοζίτες της φλαβόνης είναι πολύ κοινοί, με τους τελευταίους να χαρακτηρίζονται από ένα δεσμό C-C ανάμεσα στον ανωμερή C ενός μορίου σακχάρου και τον C-6 ή C-8 του πυρήνα της φλαβόνης. Σε αντίθεση με τους Ο- γλυκοζίτες, τα σάκχαρα στους C- γλυκοζίτες δε διασπώνται με όξινη υδρόλυση. Οι φλαβανόνες (π.χ. ναρινγκενίνη, εσπεριδίνη) απαντώνται ως Ο- και C- γλυκοζίτες και είναι άφθονες, ιδιαίτερα σε δαμάσκηνα και εσπεριδοειδή. Οι ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη, δαϊδζεΐνη), με τον δακτύλιο Β του μορίου της φλαβόνης προσκολλημένο στον άνθρακα 3 του ετεροκυκλικού, απαντώνται ιδιαίτερα σε όσπρια. (35)

Οι ανθοκυανίνες – γλυκοζίτες ανθοκυανιδινών π.χ. κυανιδίνης - είναι οι πιο σημαντικές υδατοδιαλυτές φυτικές χρωστικές, που ευθύνονται για το χρώμα των λουλουδιών και των καρπών των ανώτερων φυτών. Εκτός από τη γλυκοσυλίωση, μπορεί να δημιουργηθούν δεσμοί με αρωματικά και αλειφατικά οξέα, καθώς και με παράγωγα μεθυλεστέρα. Οι ανθοκυανίνες και οι πολυμερείς χρωστικές που προκύπτουν από αυτές με συμπύκνωση με άλλα φλαβονοειδή, είναι υπεύθυνες για το χρώμα του κόκκινου κρασιού. (35)

Οι απλές φαινόλες και τα φλαβονοειδή αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων των φυτών. Έχουν σχετικά μικρά ΜΒ και είναι διαλυτές ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική δομή τους (βαθμός υδροξυλίωσης, γλυκοσυλίωσης κ.λπ.). Κάποιες απ' αυτές τις ενώσεις μπορούν να συνδέονται και με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, όπως πολυσακχαρίτες, λιγνίνη (35).

A.3.2 ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το μέρος από τη συνολική προσληφθείσα ποσότητα ενός θρεπτικού συστατικού που χρησιμοποιείται για τις φυσιολογικές σωματικές λειτουργίες (36).

Η ολική πρόσληψη πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών μπορεί και να φτάσει 1g/ημέρα. Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα σπάνια υπερβαίνει το 1μΜ μετά από κατανάλωση 10- 100mg μιας μόνο φαινολικής ένωσης. Πάντως, η συνολική συγκέντρωση των πολυφαινολών στο αίμα είναι μάλλον υψηλότερη λόγω της παρουσίας μεταβολιτών, οι οποίοι σχηματίζονται είτε στους ιστούς του σώματος ή από τη μικροχλωρίδα του

παχέος εντέρου (37). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι μόνο το 2% της συνολικής κυκλοφορούσας ποσότητας των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα είναι ενεργά, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό τους έχει τροποποιηθεί με μεθυλίωση ή γλυκουρονίωση στο ήπαρ (38).

A.3.3 ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Ο ορισμός της του Μεσογειακού τύπου διατροφής ποικίλει ανάλογα με της συγκεκριμένη περιοχή της Μεσογείου που εξετάζεται. Για παράδειγμα, στην ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής διατροφής κυριαρχεί η κατανάλωση ελαιολάδου και η υψηλή κατανάλωση λαχανικών και φρούτων. Επειδή τα αντιοξειδωτικά είναι κοινά σε αυτά τα τρόφιμα, η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να παρέχει μια εύσχημη εξήγηση για τα προφανή οφέλη αυτής της διατροφής. Σύμφωνα με μια άλλη εκδοχή, όμως, η Μεσογειακή διατροφή είναι μια όχι αυστηρή φυτοφαγική διατροφή πλούσια σε ελαιικό οξύ, ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες, βιταμίνες του συμπλέγματος Β και διάφορα αντιοξειδωτικά, αλλά χαμηλή σε κορεσμένα και πολυακόρεστα λιπίδια. Με αυτόν τον ευρύτερο ορισμό, τα αναμενόμενα οφέλη για την πρόληψη της στεφανιαίας καρδιακής νόσου επεκτείνονται πολύ μακρύτερα από το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα και συμπεριλαμβάνουν την επίδραση στη μείωση των λιπιδίων και της αρτηριακής πίεσης, αντιφλεγμονώδη δράση, την πρόληψη της ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας και της θρόμβωσης όπως επίσης και την προστασία έναντι της κακοήθους κοιλιακής αρρυθμίας και της καρδιακής ανεπάρκειας. (39,40)

A.3.4 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η Μεσογειακή διατροφή εξασφαλίζει μια υψηλή πρόσληψη πολυφαινολικών

αντιοξειδωτικών δίνοντας έμφαση στην κατανάλωση φρούτων και λαχανικών (5-9 μικρομερίδες ημερησίως), οσπρίων και παρθένου ελαιολάδου, το οποίο αποτελεί την κύρια πηγή λίπους (40,41,42).

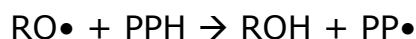
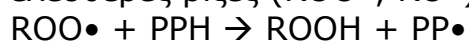
Η Μεσογειακή Διατροφή είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, τα οποία προέρχονται από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, ελαιολάδου, κόκκινου κρασιού. Συγκρίνοντας τη σχετική αντιοξειδωτική δραστηριότητα κρασιών, χυμών φρούτων και τσαγιών για παράδειγμα, προκύπτει ότι τα συστατικά φλαβονοειδή και φαινυλο-προπανοειδή συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική δραστηριότητά τους. Όσον αφορά στα φρούτα, η σειρά της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητάς τους, έχει ως εξής: φραγκοστάφυλο > πορτοκάλι > χυμός μήλου. Πάντως, τα τσάγια, τα οποία είναι πλούσια σε

φλαβονόλες (γαλλικούς εστέρες κατεχίνης), έχουν πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Τα κόκκινα κρασιά, τα οποία περιέχουν έναν συνδυασμό ακυλιωμένων ανθοκυανινών (πρωτίστως γλυκοζιτών μαλβιδίνης) με παράγωγα απλούστερων φαινολικών ενώσεων, όπως καφεϊκού και γαλλικού οξέος, ήταν τα πιο αποτελεσματικά από τα ροφήματα που μελετήθηκαν. Το λευκό κρασί, από το οποίο «απουσιάζουν» ανθοκυανίνες, φλαβονόλες και άλλα συστατικά του φλοιού του μαύρου σταφυλιού, εμφανίστηκε να έχει μια χαμηλότερη αντιοξειδωτική ισχύ συγκριτικά με την αντίστοιχη του χυμού πορτοκαλιού (43).

Οι φακές και γενικά τα όσπρια, κατέχουν σημαντική θέση στη Μεσογειακή διατροφή. Οι φακές περιέχουν μερικούς μη-διατροφικούς παράγοντες, όπως αναστολείς τρυψίνης και χυμοτρυψίνης, φυτικό οξύ, συμπυκνωμένες ταννίνες, σαπωνίνες. Μάλιστα, στο τρόφιμο αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα φαινολικών ενώσεων χαμηλού MB (βενζοϊκά οξέα και αλδεΐδες, υδροξυκιναμικά οξέα και παράγωγα, φλαβαν-3-όλες και προκυανιδίνες). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες, πολυμερή φλαβαν-3-ολών, δεσμεύονται σε πρωτεΐνες του τροφίμου, αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων πέψης. Οι ταννίνες επίσης, μπορούν να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των ενώσεων που περιέχουν σίδηρο, στις φακές (44).

A.3.5 ANTIΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Τα φαινολικά οξέα λειτουργούν ως ουσίες που τερματίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και σαν χηλικοποιητές μεταλλικών ιόντων είναι ικανά να καταλύουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (PPH) εμπλέκονται στην οξειδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων με το να δίνουν ταχύτητα ένα άτομο υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες (ROO•, RO•) όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Επιπλέον, τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας είναι σχετικά σταθερά και συνεπώς δεν μπορεί εύκολα να ξεκινήσει μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας δρουν επίσης ως οι ουσίες που τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες:



Ωστόσο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (υψηλή συγκέντρωση φαινολικών αντιοξειδωτικών, υψηλό pH, παρουσία σιδήρου) τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να εκκινήσουν μια πορεία αυτοοξειδωσης και να συμπεριφερθούν ως προοξειδωτικά. (45)

Η ικανότητα των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικές ενώσεις εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους δομή. Η φαινόλη η ίδια είναι ανενεργή σαν αντιοξειδωτικό, αλλά τα ορθο- και παρα- διφαινολικά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία αυξάνει με την αντικατάσταση ατόμων με αιθυλ- ή η-βουτυλ- ομάδες. (45) Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ

των πιο ισχυρών φυτικών αντιοξειδωτικών επειδή έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική δράση.

1. Μία ο-δифαινολική ομάδα στο δακτύλιο Β, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό των ηλεκτρονίων
2. Έναν 2-3 διπλό δεσμό σε συζυγία με την 4-οξο δράση στον C δακτύλιο, υπεύθυνο για τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων από τον Β δακτύλιο και
3. Υδροξυλάσες στις θέσεις 3 και 5 μαζί με την 4-οξο δράση στους Α και C δακτυλίους για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών. (46)

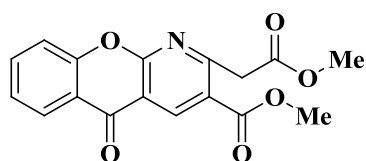
Τα φλαβονοειδή είναι πολύ ικανά μόρια δέκτες υδροξυλ- και υπεροξυλ- ριζών, παρ' όλο που η ικανότητά τους ως δέκτες του ανιόντος του υπεροξειδίου δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη (47). Επιπλέον, τα φλαβονοειδή διατηρούν την ικανότητα του δέκτη ελευθέρων ριζών μετά το σχηματισμό συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα (48)

Παρ' όλο που η οξειδωτική τους δράση παραδοσιακά έχει αποδοθεί μόνο σε διαλυτά φαινολικά συστατικά (εκχυλιζόμενες πολυφαινόλες), μια πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι οι μη εκχυλιζόμενες πολυφαινόλες (πολυμερείς προανθοκυανιδίνες και υψηλού μοριακού βάρους υδρολυόμενες ταννίνες) είναι 15 με 30 φορές πιο ισχυρές στο να αποσβένουν υπεροξυλ- ρίζες από ότι είναι οι απλές φαινόλες. Επειδή τα συστατικά αυτά δεν απορροφούνται, θα μπορούσαν να εκφράσουν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσα στο γαστρεντερικό σωλήνα και να προστατεύσουν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες από την οξειδωτική βλάβη κατά την πέψη, και να εξοικονομήσουν διαλυτά αντιοξειδωτικά. (49).

ΣΚΟΠΟΣ

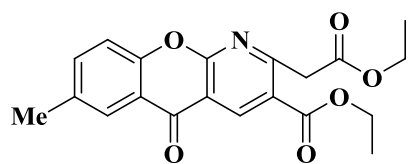
Το ενδιαφέρον για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ενώσεων στην υγεία του ανθρώπου έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και η κατανάλωσή τους, κυρίως ως συμπληρώματα διατροφής, έχει παρουσιάσει σημαντική αύξηση. Πολλά από αυτά τα αντιοξειδωτικά είναι προϊόντα φυσικής προέλευσης που εμπεριέχονται στην παραδοσιακή Μεσογειακή διαίτα, η οποία συμβάλλει στην προστασία του ανθρώπινου οργανισμού έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου. Ανάμεσα στα βιολογικά αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες συγκεντρώνουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον και παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, τόσο για τη συντήρηση του τροφίμου όσο και για την προστασία της LDL-χοληστερόλης, αλλά και την παρεμπόδιση άλλων μηχανισμών ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι δυνατό να προκαλέσουν παθολογικές καταστάσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν, διατέθηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας Α.Π.Θ.

E54



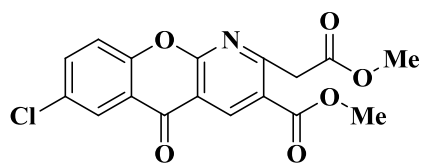
methyl 2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylate

E66



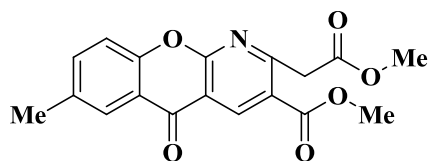
ethyl 2-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-7-methyl-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylate

E60



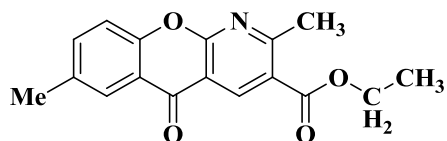
methyl 7-chloro-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylate

E55



methyl 2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-7-methyl-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylate

E71



ethyl 2,7-dimethyl-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylate

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Β.1.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH) ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Με το πείραμα αυτό μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ελεγχόμενων δειγμάτων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου DPPH.

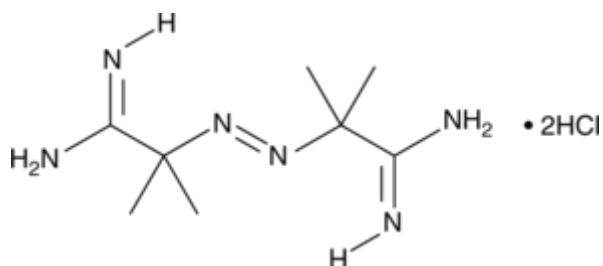
Σε 20 μL διαλυμάτων των δειγμάτων του μαράθου, προστέθηκαν 980 μL καθαρής αιθανόλης και 1000 μL διαλύματος DPPH. Τα διαλύματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 και 60 λεπτά και μετρήθηκε η απορρόφηση UV στα 517nm.

Για το δείγμα αναφοράς προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 20 μL DMSO ή 20 μL H_2O (για τα τρία δείγματα νερού), 980 μL καθαρής αιθανόλης και 1000 μL DPPH.

Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 20 μL ουσίας με 1.980 μL καθαρής αιθανόλης.

Β.1.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η ικανότητα των ενώσεων του μαράθου να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος. Σε κυψελίδα χαλάζια, προστέθηκαν 10 μL DMSO, 10 μL LLA (λινελαϊκό οξύ), 930 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών οξέων (pH= 7,4) και 50 μL διαλύματος AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride) (Πρότυπο διάλυμα – Standard) σε θερμοκρασία 37°C, παρουσία αέρα και καταγράφηκε η μεταβολή της τιμής απορρόφησης στα 234nm (μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε 13-υπεροξυ-λινελαϊκό οξύ).



Σχήμα 15: Χημική δομή AAPH

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ποσοστά εφαρμόζοντας τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{(STANDARD - BLANK) - (A - B)}{STANDARD - BLANK} * 100$$

Όπου:

- Standard: ο μέσος όρος της απορρόφησης του πρότυπου διαλύματος
- Blank: ο μέσος όρος της απορρόφησης του τυφλού διαλύματος
- A: ο μέσος όρος της απορρόφησης των δειγμάτων με προσθήκη AAPH
- B: ο μέσος όρος της απορρόφησης των δειγμάτων χωρίς προσθήκη AAPH

Μελέτη της ικανότητας των εξεταζομένων ενώσεων να ανταγωνίζονται το DMSO στη δέσμευση ριζών υδροξυλίου (HO[•])
Kontogiorgis and Hadjipavlou 2003]

Στο πείραμα αυτό γίνεται μια προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα των ενώσεων να παγιδεύουν τις ρίζες υδροξυλίου και αυτό εξετάζεται με βάση την ικανότητα των ενώσεων να ανταγωνίζονται το διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO) για τις πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (HO[•]).

Η ικανότητα των εξεταζομένων ενώσεων να δεσμεύουν ρίζες HO[•] εκτιμάται από τη δυνατότητα των ενώσεων να ανταγωνίζονται το DMSO για τις ρίζες αυτές. Το μίγμα της επώασης αποτελείται από την εξεταζόμενη ουσία, 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50 mM, pH 7,4) το οποίο περιέχει και 0,1 mM EDTA, 200μl διαλύματος DMSO (33 mM), και 200 μl διαλύματος FeCl₃ σε ρυθμιστικό διάλυμα (167 μM σε μίγμα με EDTA 1:2).

Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη 150 μM διαλύματος ασκορβικού οξέος (10 mM). Το μίγμα επωάζεται στους 37⁰C για 30 λεπτά.

Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 250μl υδατικού διαλύματος τριχλωροξικού οξέος (17,5% w/v) και η σχηματιζόμενη φορμαλδεύδη προσδιορίζεται φωτομετρικά με την προσθήκη 1 ml αντιδραστήριου Nash, στους 60⁰ C για 10 λεπτά και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 412 nm [Kato et al. 1988].

Το αντιδραστήριο Nash αποτελείται από 45g CH₃COONH₄, 0,9 ml CH₃COOH και 0,6 ml ακετυλακετόνης (CH₃COCH₂COCH₃) σε 100 ml απιονισμένου νερού.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ (LOX) ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ

Σκοπός της διαδικασίας ήταν να προσδιοριστεί η αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης στο μεταβολισμό του λινελαϊκού οξέος με την παρουσία των διαλυμάτων του μαράθου.

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας, το οποίο αρχικά μηδενίστηκε με διάλυμα νερού. Οι μετρήσεις έγιναν σε μήκος κύματος 234 nm.

Σε κυψελίδα περιεκτικότητας 1 ml προστέθηκαν 10 μ L DMSO, 200 μ L διαλύματος LOX και 790 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris (Πρότυπο διάλυμα-standard) σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης (μετατροπή του λινελαϊκού σε 13-υπεροξυλινελαϊκό οξύ) στα 234 nm.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία αντικαθιστώντας τα 10 μ L DMSO με 10 μ L του εκάστοτε δείγματος μαράθου.

Για το τυφλό δείγμα (sample) προστέθηκαν 10 μ L DMSO, 200 μ L διαλύματος LOX, 100 μ L LLA και 690 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris και μετρήθηκε η απορρόφηση για 30".

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία αντικαθιστώντας τα 10 μ L DMSO με 10 μ L του εκάστοτε δείγματος μαράθου.

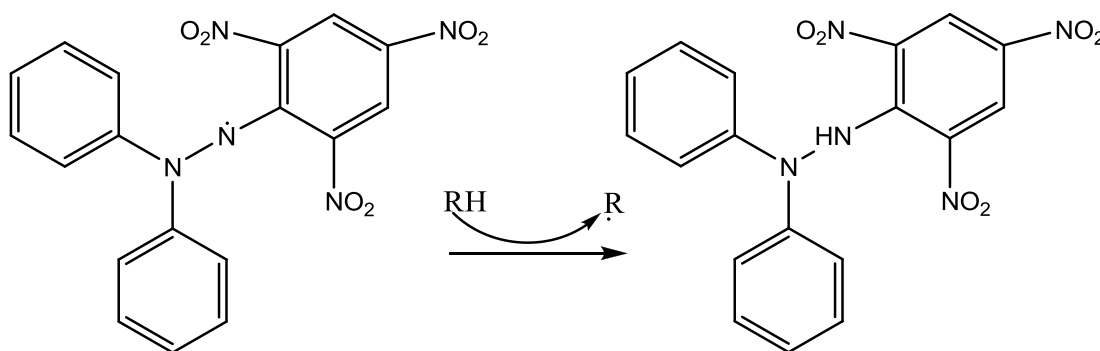
Οι απορροφήσεις των δειγμάτων και στις δύο περιπτώσεις μετρήθηκαν στα 234 nm για 30".

Μόνο για τα 3 δείγματα του H₂O, τα διαλύματα standard και sample στη θέση των 10 μ L DMSO, περιείχαν 10 μ L απεσταγμένου νερού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Β.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΣΤΑΘΕΡΗ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΚΗ ΡΙΖΑ (DPPH)

Μια χρήσιμη παράμετρος που σχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων είναι η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες βρίσκονται επικεντρωμένες στο άτομο του αζώτου, εκφράζοντας έτσι έμμεσα και την αναγωγική ικανότητά τους.

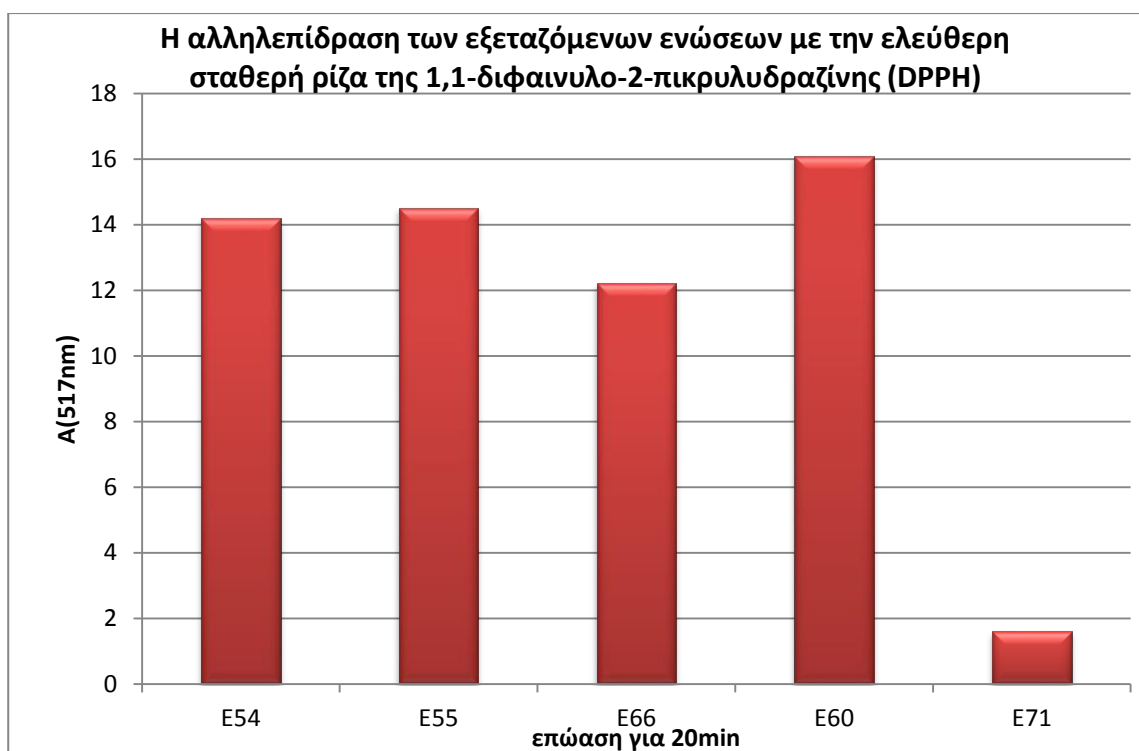


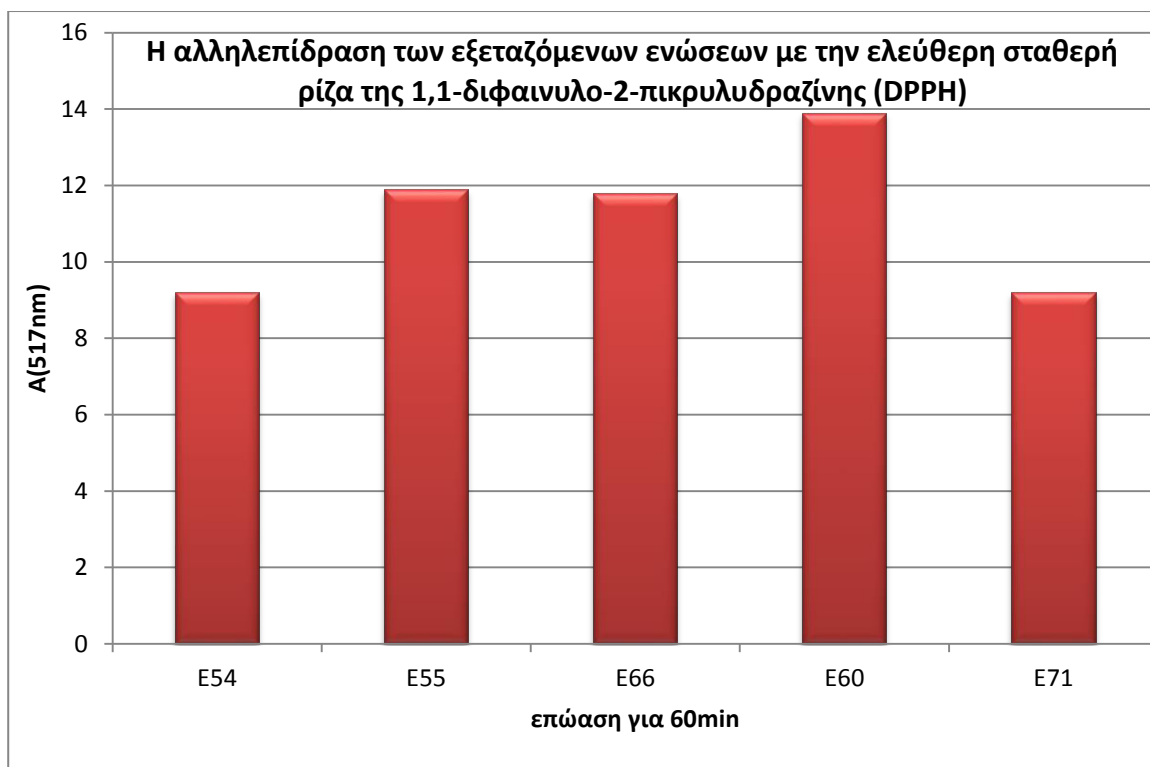
Σχήμα 16: 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH)

Η αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνης (DPPH), που είναι ένα τέτοιο οξειδωτικό σώμα, μπορεί να εκφράσει το αναγωγικό δυναμικό των ενώσεων, καθώς και την ικανότητά τους να παγιδεύουν σταθερές ελεύθερες ρίζες σε ένα σύστημα όπου απουσιάζει ο σίδηρος. Η ρίζα αυτή ευρύτερη περιοχή⁸⁰ παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα, λόγω μεσομέρειας κατά την οποία το μονήρες ηλεκτρόνιο βρίσκεται κατανομημένο σε. Όπως φαίνεται, πρόκειται για λιπόφιλο μόριο με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο επικεντρωμένο στο άζωτο, όμως, λόγω εκτεταμένης συζυγίας στο μόριο εμφανίζεται ιδιαίτερα σταθερό, αφού το ηλεκτρόνιο κατανέμεται σε μεγάλη περιοχή. Λόγω του ηλεκτρονίου που κατέχει η ρίζα DPPH, παρουσιάζει μεγάλη απορρόφηση στα 517 nm (περιοχή του ορατού με βαθύ πορφυρό χρώμα). Κατά την αναγωγή της, η ρίζα προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και μετατρέπεται σε σταθερό διαμαγνητικό μόριο χάνοντας το έντονο χρώμα της.

Ο αποχρωματισμός που προκύπτει είναι στοιχειομετρικός με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται και παρουσιάζεται όταν το ασύζευκτο μονήρες ηλεκτρόνιο συζεύγνυται, ενώ επιπλέον είναι αντιπροσωπευτικός της ικανότητας των ενώσεων να σαρώνουν τις σταθερές ελεύθερες ρίζες, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε ενζυμική δραστηριότητα. Σε αυτήν την ιδιότητα του DPPH βασίζεται και ο χρωματομετρικός προσδιορισμός της αναγωγικής ικανότητας των εξεταζόμενων ενώσεων.

Η μελέτη της πορείας της αντίδρασης έγινε σε συνάρτηση με το χρόνο, για διάστημα 20 και 60 λεπτών και τα αποτελέσματα παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

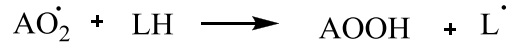
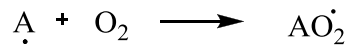
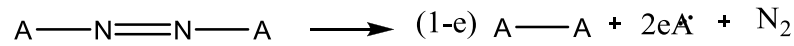




Σχόλια: Τα αποτελέσματα από την αλληλεπίδραση των ενώσεων με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH είναι περιορισμένα πιθανά εξαιτίας των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή (αύξηση) με την πάροδο του χρόνου με εξαίρεση την ένωση E71 της οποίας η αλληλεπίδραση αυξάνεται.

B.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΛΙΝΕΛΑΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΪΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΑΛΑΣ ΤΟΥ 2,2'- ΔΙΑΖΩ-2-ΑΜΙΔΙΝΟΠΡΟΠΑΝΙΟΥ (AAPH)

Η AAPH είναι μια υδατοδιαλυτή αζω-ένωση που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών σε μελέτες λιπιδικής υπεροξειδωσης, για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων. Επιπλέον δίνει ένα μόριο αζώτου και δύο εντοπισμένες στον άνθρακα ρίζες που μπορούν να «συνενωθούν» παράγοντας σταθερά προϊόντα ή να αντιδράσουν με μοριακό οξυγόνο και να δώσουν υπεροξυ-ρίζες:



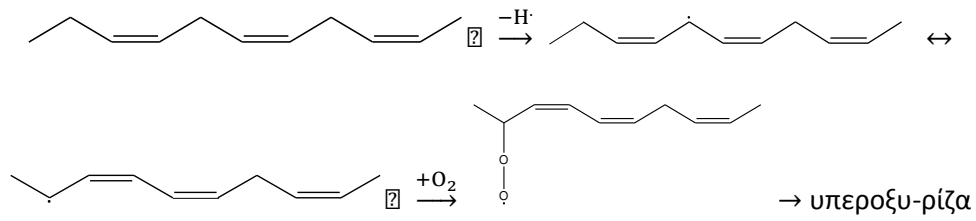
Σχήμα 17: Δημιουργία υπεροξυ-ριζών

Η οξειδωτική αλλοίωση των πολυακόρεστων λιπιδίων ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή από παλιά και προκαλεί το «τάγγισμα» των λιπών και των ελαίων.

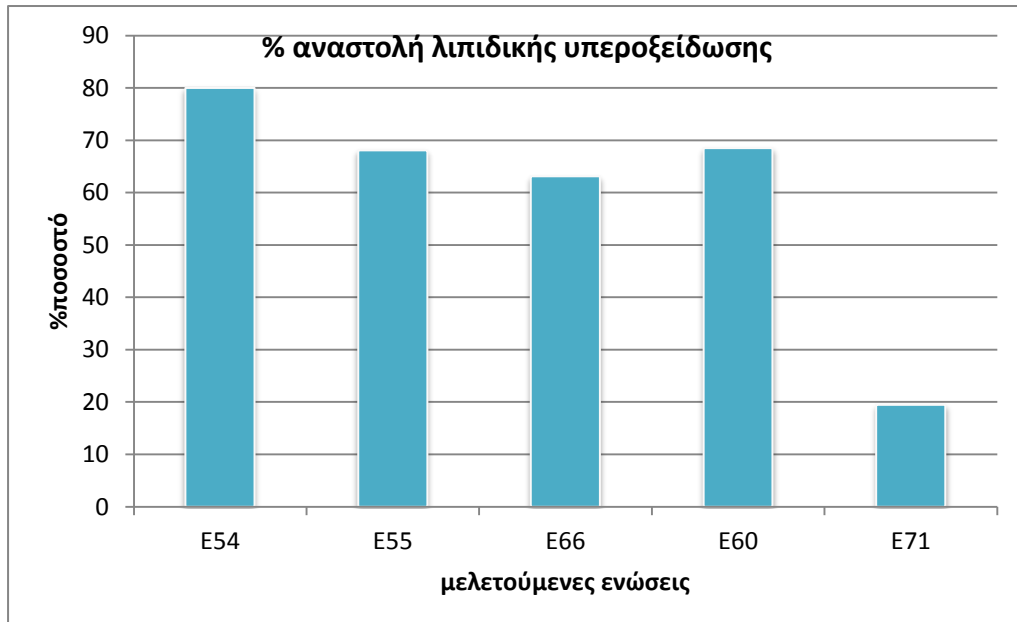
Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν συστατικά των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Περιέχουν μη διακλαδιζόμενες αλυσίδες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα (συνήθως 14-24) με *cis* διπλούς δεσμούς. Τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών διατάσσονται σε διπλοστοιβάδα. Σε κάθε πλευρά της μεμβράνης μπορούν να κινούνται ταχύτατα, καθώς διαχέονται, μόρια λιπιδίων και πρωτεϊνών. Η ικανότητα αυτή προσδίδει τον δυναμικό, και όχι στατικό χαρακτήρα της μεμβράνης και αποτελεί βασική ιδιότητα αυτής, τη ρευστότητα. Η ρευστότητα διευκολύνεται και από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα λόγω του χαμηλού σημείου τήξεώς τους. Κατά συνέπεια, κάθε αλλοίωση αυτών συνεπάγεται τη μείωση της ρευστότητας και τελικώς την απώλεια της λειτουργικότητας της μεμβράνης.

Η διαδικασία της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Σχήμα 18) ξεκινά με την προσβολή του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος από οποιοδήποτε χημικό είδος ικανό να προκαλέσει την απόσπαση ατόμου υδρογόνου από μεθυλενική ομάδα, π.χ. ρίζα υδροξυλίου, ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου κ.ά.. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου, η επικεντρωμένη στο άτομο του άνθρακα λιπιδική ρίζα βρίσκεται σε ισορροπία με τη διενική της μορφή. Στη συνέχεια εισάγεται ένα μόριο οξυγόνου και προκύπτει η υπεροξυ-ρίζα, οπότε αρχίζει η διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης. Μια υπεροξυ-ρίζα μπορεί να: α) δώσει κυκλικά υπεροξειδία, β) αποσπάσει άτομο υδρογόνου από άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, ώστε να αρχίσει η προηγούμενη διαδικασία, γ) δώσει υπεροξειδίο λιπιδίου και τέλος δ) δύο μόρια ριζών να συνενωθούν δίνοντας ένα «συζευγμένο διένιο» (η αντίδραση αυτή γίνεται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου). Η απόσπαση του υδρογόνου μπορεί να γίνει σε διάφορα σημεία της ανθρακικής αλυσίδας, π.χ. για το αραχιδονικό οξύ στους άνθρακες C-7, C-10 και

C-13. Κύριο προϊόν είναι η μηλονική διαλδεΐδη, ενώ προκύπτουν και άλλα προϊόντα πολυμερισμού.



Σχήμα 18: Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης



Σχόλια: Όλες οι ενώσεις προκαλούν ισχυρή αναστολή στην λιπιδική υπεροξειδωση (55 - 80 %) συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη της ένωσης αναφοράς trolox (63%) με μοναδική εξαίρεση την E71.

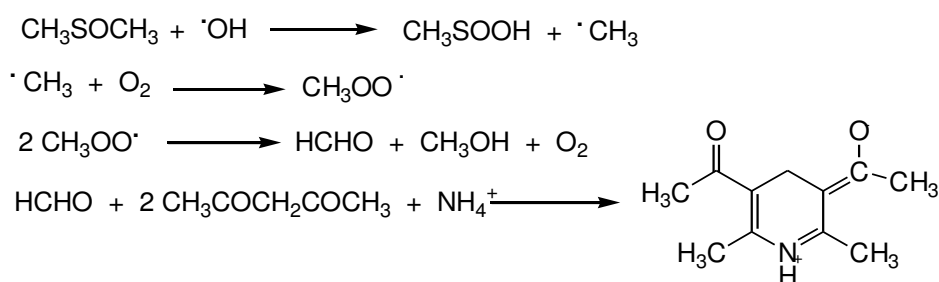
Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να ανταγωνίζονται το DMSO στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών ·OH

Η εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να παγιδεύουν ρίζες υδροξυλίου έγινε με βάση την ικανότητα τους να ανταγωνίζονται το DMSO (δι-μεθυλο-σουλφοξειδίο) (33 mM) γι' αυτές τις πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες.

Η ρίζα υδροξυλίου είναι η δραστικότερη μορφή ρίζας, που απαντάται στα βιολογικά συστήματα. Αντιδρά ταχύτατα με πλειάδα βιολογικών μακρομορίων προκαλώντας σοβαρές βλάβες, ενώ ο σχηματισμός της έχει επιβεβαιωθεί σε μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων. In vivo, οι ρίζες υδροξυλίου παράγονται κύρια μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss με την παρουσία ιόντων σιδήρου ή χαλκού.

Ως σύστημα δημιουργίας ριζών υδροξυλίου χρησιμοποιήθηκε Fe^{+3} συμπλοκοποιημένος με EDTA, που καταλύει την αυτοοξειδωση του ασκορβικού οξέος. Οι ρίζες του υδροξυλίου που σχηματίζονται οξειδώνουν το DMSO προς σχηματισμό φορμαλδεΐδης. Η αντίδραση περιλαμβάνει αρχική αλληλεπίδραση του DMSO με τις ρίζες υδροξυλίου δίνοντας ρίζες μεθυλίου με τελικό προϊόν τη φορμαλδεΐδη, που προσδιορίζεται χρωματομετρικά με τη μέθοδο Nash. [Klein et al 1981] [Nash 1953] Η μέτρηση γίνεται στα 417 nm, όπου απορροφά η φορμαλδεΐδη.

Το DMSO είναι πολύ καλός σαρωτής ριζών υδροξυλίου και στις πειραματικές συνθήκες, που χρησιμοποιήθηκαν, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων ουσιαστικά εκφράζεται ως η ικανότητα τους να ανταγωνίζονται το DMSO στη σάρωση των παραγόμενων ριζών υδροξυλίου.

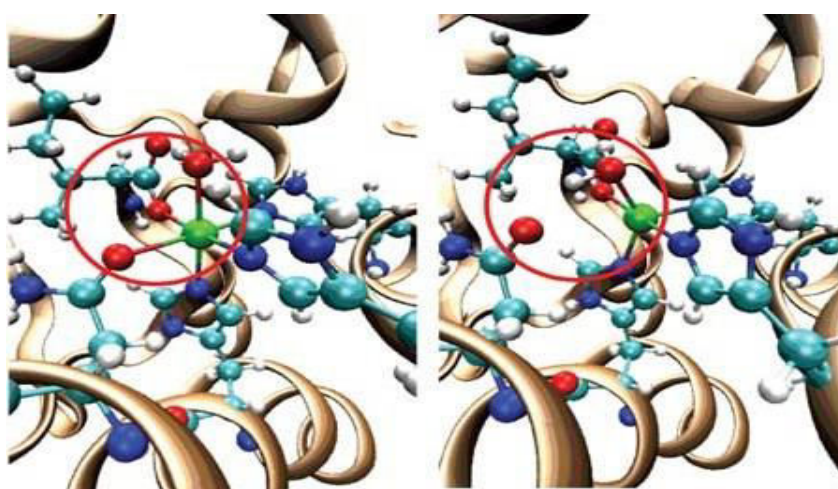


Σχήμα 10.2-2: Μηχανισμός Δράσης ·OH επί του DMSO. Αντίδραση Hantzsch

Σχόλια: Οι ενώσεις ανταγωνίζονται μέτρια το DMSO για ρίζες υδροξυλίου

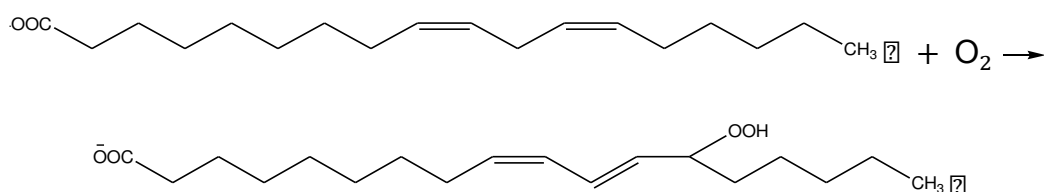
ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ.

Η λιποξυγονάση (εικόνα 3) αποτελεί καθοριστικό ένζυμο που συμμετέχει στο μηχανισμό της φλεγμονής. Όπως αναφέρθηκε, τελικά προϊόντα από τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος δια μέσου της λιποξυγονάσης είναι τα λευκοτριένια, που εμπλέκονται σε αρκετές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το άσθμα, η ψωρίαση και οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου.



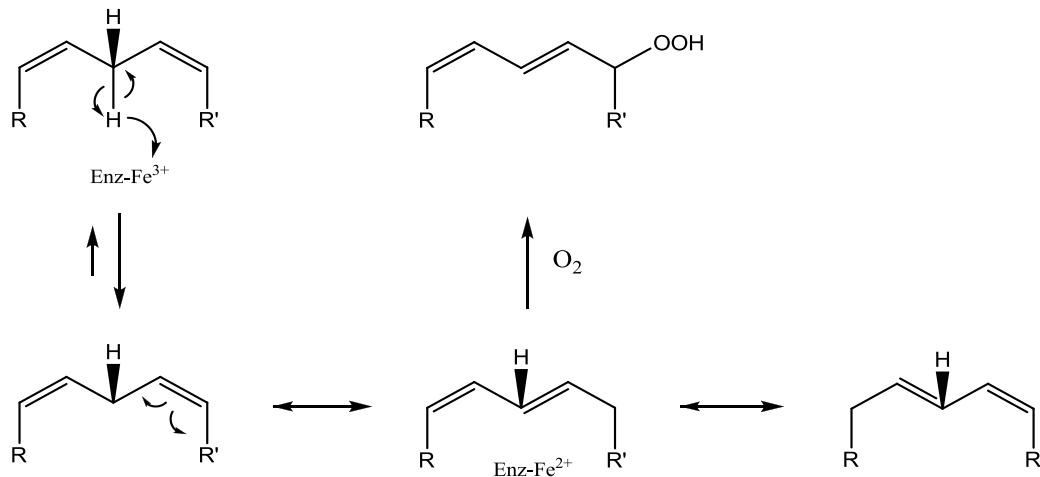
Εικόνα 3: Λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης

Οι ενώσεις που συντέθηκαν δοκιμάστηκαν για τη δράση τους στη λιποξυγονάση χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το λινελαϊκό οξύ. Η λιποξυγονάση καταλύει την είσοδο δύο ατόμων οξυγόνου με τη μορφή της υπεροξυ-ρίζας στο άκρο ενός *cis*-1,4-διενίου. Το αλλυλικό υδρο-υπεροξείδιο που προκύπτει απορροφά στα 234 nm. Στην περίπτωση του λινελαϊκού οξέος, η αντίδραση ακολουθεί σχηματικά την παρακάτω πορεία (Σχήμα 19):

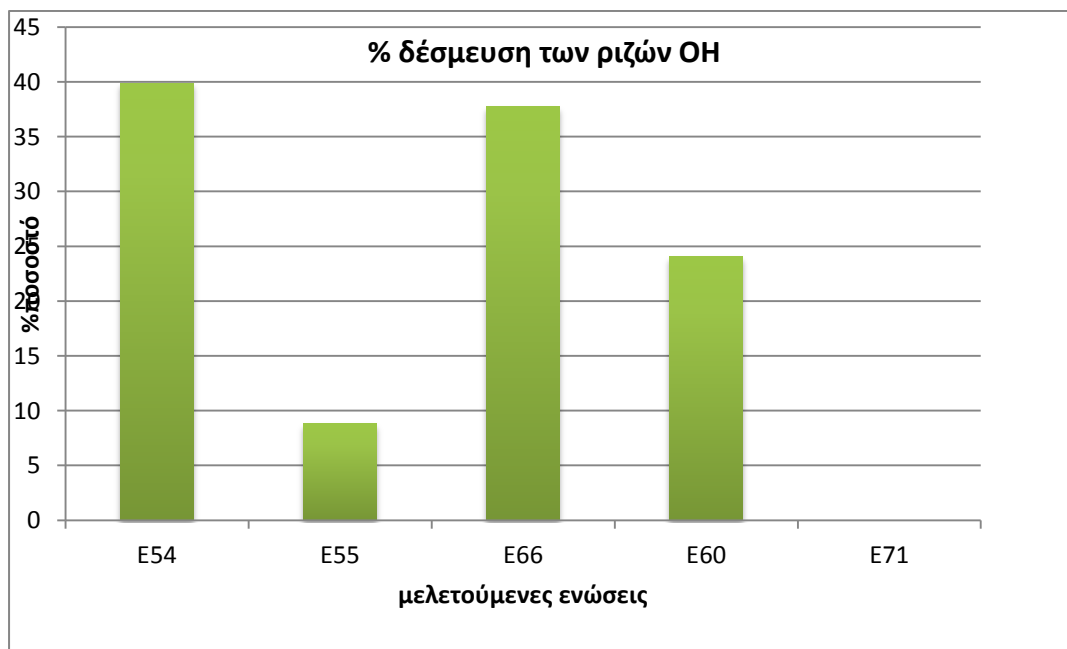


Σχήμα 19: Αντίδραση του λινελαϊκού οξέος με το οξυγόνο

Έχει βρεθεί ότι υπάρχει ποιοτική αναλογία μεταξύ της αναστολής που προκαλείται από NSAIDs στην φυτική προέλευσης (σόγια) LOX και της αναστολής της ζωικής LOX⁸¹. Έτσι, η φυτική LOX μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια απλή κατά προσέγγιση δοκιμασία αναστολής (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Μηχανισμός αναστολής της λιποξυγονάσης



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα από την αλληλεπίδραση των ενώσεων με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH είναι περιορισμένα πιθανά εξαιτίας των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή (αύξηση) με την πάροδο του χρόνου με εξαίρεση την ένωση E71 της οποίας η αλληλεπίδραση αυξάνεται. Οι ενώσεις ανταγωνίζονται μέτρια το DMSO για ρίζες υδροξυλίου. Όλες οι ενώσεις προκαλούν ισχυρή αναστολή στην λιπιδική υπεροξειδωση (55 - 80 %) συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη της ένωσης αναφοράς trolox (63%) με μοναδική εξαίρεση την E71. Γενικά η παρουσία των εστερικών ομάδων στους R_2 & R_3 υποκαταστάτες σε συνδυασμό με τον σκελετό της χρωμόνης υποστηρίζει το αντιοξειδωτικό προφίλ. Ιδιαίτερα φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι ο συνδυασμός των ομάδων Me, CH_2COOEt ή CH_2COOMe , $COOEt$ και Me, CH_2COOMe , $COOMe$ οδηγεί σε συνδυασμένη καλύτερη αντιοξειδωτική συμπεριφορά.

Παραπομπές

1. Κυρανάς Ε., Πρόσθετα Τροφίμων και Νομοθεσία, 2012
2. Motai T., Kitanaka S., *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1732.
3. Bhat A. S., Whetstone J. L., Brueggemeier R. W., *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 2469.
4. Horton D. A., Bourne G. T., Smythe M. L., *Chem. Rev.* 2003, 3, 909.
5. Galiotta L. J. V., Springsteel M. F., Eda M., Niedzinski E. J., By K., Haddadin M.J., Kurth M. J., Nantz M. H., Verkman A. S., *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 19723.
6. Kumar V. N., Reddy Y.T., Narasimhareddy P., Rajithaa B., Clercq E. D., *ARKIVOC* 2006, XV, 181.
7. Oi G. F., Yang Z. Y., Qin D. D., *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 1, 69
8. Ellis G. P., *The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Chromenes, Chromanones, and Chromones.* Ellis, G. P., Ed., Interscience: USA, 1977, Vol. 33, 495.
9. Varna R. S., *J. Heterocycl. Chem.* 1999, 36, 1565.
10. Bhat A. S., Whetstone J. L., Brueggemeier R. W., *J. Comb. Chem.* 2000, 2, 597.
11. Reddy G. J., Latha D., Rao K. S., *Heterocyclic Commun.* 2004, 10, 279.
12. Reddy G. J., *Org. Prep. Proced. Int.* 2004, 36, 287.
13. Harikrishnan L. S., Showalter H. D. H., *Tetrahedron* 2000, 56, 515.
14. Dalvi N. R., Shelke S.N., Karale B. K., Gill H. C., *Syn. Comm.* 2006, 37, 1421.
15. Dusemund J., Schurreit T., *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 1986, 317, 377.
16. Young I.S., Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176 –18
17. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1990). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915 – 7922
18. Young I.S., Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical*
19. Swanson C. (1998). *Vegetables, Fruits, and Cancer Risk: The Role of Phytochemicals.*
20. Γαλάρης Δ. και Δούλιας Π-Θ. (2001). Βιολογικά αντιοξειδωτικά. Χημικά Χρονικά.
21. Vinson A.J. (1998). *Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. Flavonoids in the Living System.* Edited by Manthley and Buslig. New York, Plenum Press. 151 - 164
22. Boskou D. C. (1999). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr. Reviews* 56(11): 317-333
23. Colic M., Pavelic K. (2000). Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J Mol Med.* 78: 333 – 336'
24. Dufresne J.C., Farnworth R.E. (2001). A Review of Latest Research Findings on the Health Promotion Properties of Tea. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 12, pp. 404-421.

25. J. G. Salway, *Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά*, 2η Έκδοση. Blackwell Publishing, 2006.
26. Lelli JL, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB (1998). "ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells". *Free Radic. Biol. Med.* **25** (6): 694–702
27. Krause Mendelson, M. (2004). Food, Nutrition and Diet Therapy, 11th ed. In: Mahan L.K., Escott-Stymp S. (eds). USA: W.B. Saunders Company
28. Prior, R.L. and Cao, G. Antioxidant Capacity and Polyphenolic Components of Teas: Implications for Altering In vivo Antioxidant Status. Society for Experimental Biology and Medicine. 1999: 220 (4), pp. 255-261
29. Groff J. L. and Gropper S. S. (2000). Advanced Nutrition and Human Metabolism. Wadsworth Thompson Learning.
29. Μπόσκου, Δ. Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη: Θεσσαλονίκη, 1997.
30. Matala A.L., Zampelas A., Stavrinou V., Wolinsky I. (2001). The Mediterranean Diet: Constituents and Health promotion. USA, CRC Press. 59 – 60
31. Weisburger H.J. (2000). Eat to Live, Not Live to Eat. Nutrition. 16: 767 – 773
32. Hung L.M., Chen J.K., Lee R.S., Liang H.C., Su M.J. (2001). Beneficial effects of astringinin, a resveratrol analogue, on the ischemia and reperfusion damage in rat heart. Free Radical Biology & Medicine. 30 (8): 877 – 883
33. Harborne J.B. (1993). The flavonoids: Advances in research since 1986. London
34. Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism and Nutritional Significance. Nutrition Reviews. 56 (11): 317 – 333
35. Fairweather-Tait, J.S. (1999). The Importance of Trace Element Speciation in Nutritional Sciences. Fresenius J. Anal. Chem. 363, pp. 536-540.
36. Scalbert A., Williamson G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. The Journal of Nutrition. 130 (8S), pp. 2073S-2085S.
37. Καστανάς Η. (2002). Επιδράσεις Αντιοξειδωτικών στην Αθηρογένεση και την καρκινογένεση. Πρακτικά Ημερίδας για τα Λειτουργικά Τρόφιμα, Αθήνα 31-5-2002. Ένωση Ελλήνων Χημικών
38. de Lorgeril M. (1998) Medirerranean diet in the prevention of coronary heart disease. Nutrition 14:55-57
39. Trichopoulou A., Vasilopoulou E. (2000). Mediterranean diet and longevity. Br. J. Nutr. 84:205-209
40. Τριχόπουλος Δ., Καλαπαθάκη Β., Πετρίδου Ε. (2000). Προληπτική Ιατρική και Δημόσια Υγεία. Αθήνα, Εκδόσεις «Ζήτα», 408-409
41. Hassapidou N. M. and Bairactari M. (2001). Dietary intake of pre-adolescent children in Greece. Nutrition & Food Science. 31 (3): 136 –140
42. Rice-Evans C., Miller, J.N. (1995). Antioxidants-the Case for Fruits and Vegetables in the Diet. British Food Journal. 97 (9), pp. 35–40.
43. Bartolomé B., Estrella I. and Hernández T. (1997). Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. Z Lebensm Unters Forsch A. 205: 290 – 294, 7915 –7922

44. Shahidi F., Wanasundara P.K.J.P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 23:67-103
45. Ratty A.K., Das N.P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.* 39:69-79
46. Manach C., Regeat F., Texier O. et al (1996). Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Res.* 16:517-44
47. Afanas I.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V. et al (1989). Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 38:1763-9
48. Hagerman A.E., Riedi K.M., Jones G.A. et al (1987). High-molecular-weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem.* 46:1887-92

Ιστοσελίδες:

USDA για τα φλαβονοειδή

<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/flav.pdf>