



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

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΧΥΜΟΥ
ΡΟΔΙΟΥ**



**ΣΑΡΑΦΟΓΛΟΥ ΕΛΕΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτριος Κουρέτας Καθηγητής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στάγκος Δημήτριος Λέκτορας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σέρκο Χαρουτουιάν Καθηγητής Γ.Π.Α.

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα 2012-2013 στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω, με αφορμή την ολοκλήρωση της Μεταπτυχιακής διατριβής μου, ιδιαίτερα τον κ. Δημήτριο Κουρέτα , για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου και την καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της Μεταπτυχιακής μου σπουδής.

Οφείλω, επίσης, να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα φυσιολογίας ζωικών οργανισμών για την πολύτιμη βοήθεια του στο εργαστήριο, για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια των Μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον κ. Νικόλαο Γκουτζουρέλα, διδακτορικός φοιτητής γιατί χωρίς τις υποδείξεις του και την στήριξη του θα ήταν αδύνατο να έρθει σε πέρας η παρούσα διατριβή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| Περίληψη | 7 |
| Abstract | 8 |
| Περιεχόμενα | 9 |
| 1. Εισαγωγή | 9 |
| 1.1. Ελεύθερες ρίζες | 11 |
| 1.2. Ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών | 12 |
| 1.2.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση | 12 |
| 1.2.β. Κυτόχρωμα P 450 | 13 |
| 1.2.γ. Υπεροξειδιοσώματα | 13 |
| 1.2.δ. Άσκηση | 13 |
| 1.2.ε. Αιμοσφαιρίνη | 13 |
| 1.2.στ. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων | 14 |
| 1.2.ζ. Το φαινόμενο της ισχαιμίας- επαναιμάτωσης | 14 |
| 1.3. Εξωτερικές πηγές ελευθέρων ριζών | 14 |
| 1.4.Βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες | 14 |
| 1.4.α. Βλάβες στο DNA | 15 |
| 1.4.β. Βλάβες στις πρωτεΐνες | 16 |
| 1.4.γ. Βλάβες στα λιπίδια | 17 |
| 1.4.δ. Δράση στα ιόντα του Ca | 17 |

| | |
|--|----|
| 1.4.ε. Δράση στην επικοινωνία των κυττάρων | 17 |
| 1.4.στ. Αθηροσκλήρωση | 17 |
| 1.4.ε. Καρκινογένεση | 18 |
| 1.5. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί | 18 |
| 1.5.α. Καταλάση | 19 |
| 1.5.β. Υπεροξειδική δισμουτάση | 19 |
| 1.5.γ. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης | 19 |
| 1.5.δ. Αναγωγάση της γλουταθειόνης | 19 |
| 1.6. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά | 20 |
| 1.6.α. Γλουταθειόνη | 20 |
| 1.6.β. Βιταμίνη C | 20 |
| 1.6.γ. Βιταμίνη E | 21 |
| 1.6.δ. Καροτενοειδή | 21 |
| 1.6.ε. Ουρικό Οξύ | 21 |
| 1.6.στ. Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q | 21 |
| 1.6.ζ. Σελήνιο | 22 |
| 1.7. Φυτικές πολυφαινόλες | 22 |
| 1.7.α. Φλαβονοειδή | 23 |
| 1.7.β. Φλαβονόλες | 24 |
| 1.7.γ. Φλαβόνες | 24 |
| 1.7.δ. Φλαβανόλες | 24 |
| 1.7.ε. Ισοφλαβόνες | 24 |
| 1.7.στ. Φλαβανόνες | 25 |
| 1.7.ζ. Ανθοκυανιδίνες | 26 |
| 1.7.η. Φαινολικά Οξέα | 26 |
| 1.8. Διατροφική αξία του Ροδιού | 31 |
| 1.8.α. Η καλλιέργεια της ροδιάς | 32 |
| 1.8.β. Εδώδιμες ποικιλίες ροδιάς | 33 |
| 1.9. Βιοδραστικότητα ροδιού | 39 |
| | |
| 2. Σκοπός | 41 |
| | |
| 3. Υλικά και μέθοδοι | 42 |
| 3.1. Πειραματικό Πρωτόκολλο | 42 |
| 3.2. Επεξεργασία του αίματος μετά από αιμοληψία | 43 |
| 3.3. Προσδιορισμός MDA | 43 |
| 3.4. Προσδιορισμός Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων | 46 |
| 3.5. Προσδιορισμός Καταλάσης | 48 |
| 3.6. Προσδιορισμός Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας του πλάσματος | 51 |
| 3.7. Ανηγμένη Γλουταθειόνη στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα | 54 |
| | |
| 4. Αποτελέσματα | 56 |
| 4.1. Πρωτεϊνικά καρβονύλια | 56 |
| 4.2. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα | 56 |
| 4.3. MDA | 57 |
| 4.4. Ανηγμένη Γλουταθειόνη | 58 |
| 4.5. Καταλάση | 58 |
| 5. Συζήτηση | 59 |
| 6. Βιβλιογραφία | 61 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιστημονική κοινότητα, πρόσφατα, έχει δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για το Ρόδι (*Punica granatum L.*), χάρη στην αντιοξειδωτική και αντικαρκινική του δράση. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε φυσικός χυμός ροδιού και το πώς μπορούν τα συστατικά του, όπως διάφορα οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, να βοηθήσουν στην πρόληψη της εμφάνισης οξειδωτικού στρες.

Το ρόδι είναι μια πλούσια πηγή δύο τύπων πολυφαινολικών ενώσεων, τις ανθοκυανίνες και τις υδρολύσιμους τανίνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 92% της αντιοξειδωτικής ικανότητας ολόκληρου του φρούτου. Από αποτελέσματα ερευνών φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού ροδιού ήταν υψηλότερη από ό,τι άλλων χυμών φρούτων, όπως το μύρτιλλο, το cranberry, και το πορτοκαλί (Seeram, 2005).

Το πείραμα περιελάμβανε 14 υγιείς εθελοντές, που δεν λάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή ή συμπληρώματα διατροφής. Οι εθελοντές κατανάλωσαν ½ λίτρο φυσικό χυμό ροδιού, για 15 ημέρες. Πάρθηκαν δείγματα αίματος σε κάθε μία από τις παρακάτω χρονικές περιόδους:

- Μία ημέρα πριν από την κατανάλωση χυμού ροδιού
- 16 ημέρες ακριβώς μετά την έναρξη της κατανάλωσης χυμού
- 23 ημέρες αργότερα
- 37 ημέρες αργότερα

Μελετήσαμε δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα του αίματος, όπως τη GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη), την καταλάση, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα της MDA και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά αμέσως μετά την παύση της κατανάλωσης χυμού κατά 22,6%, και τα επίπεδα της MDA μειώθηκαν κατά 19,6% αμέσως μετά την παύση της κατανάλωσης χυμού και 17,7% μια βδομάδα μετά. Επιπλέον, η καταλάση και η TAC δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική διαφορά. Η παρούσα έρευνα δείχνει ότι η κατανάλωση χυμού ροδιού μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις στην υγεία μέσω της πρόληψης του οξειδωτικού στρες.

SUMMARY

Pomegranate (*Punica granatum* L.) has recently become of great interest to the scientific society, due to antioxidant and anti-cancer activity. In the present review we studied pomegranate's natural juice and how its constituents such as organic acids, phenolics and flavonoids, help prevent cells from oxidative stress.

Pomegranate fruit is a rich source of two types of polyphenolic compounds, anthocyanins and hydrolyzable tannins, which account for 92% of the antioxidant activity of the whole fruit. In researches, it appears that the antioxidant level in pomegranate juice was higher than found in other fruit juices, such as blueberry, cranberry, and orange (Seeram, 2005).

The experiment included 14 health volunteers, without taking any medication, after consuming ½ l of natural pomegranate juice, for 16 days. We took blood samples from each one in specific periods:

- One day before consuming pomegranate juice
- 16 days just after consumption stopped
- 23 days later
- 37 days later

We studied specific indicators in blood cells, which indicates the oxidative levels, like GSH (open glutathione), catalase, total antioxidant capacity (TAC), MDA levels and protein CARBS. GSH increased significantly after the pause of juice consumption at 22,6%, also MDA and CARBS were decreased at 19,6% and 17,7% each. In addition catalase and TAC didn't display significant alteration. The resulting from this research shows that consumption of pomegranate juice can have positive effects in health through prevention of oxidative stress.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τα αρχαία χρόνια το ρόδι βρίσκεται στις πρώτες θέσεις των “φαρμακευτικών φυτών”. Αναφορές για την χρήση ροδιού, στην αρχαία Ελλάδα έχουν γίνει από τον Θεόφραστο, τον Όμηρο και πολλούς άλλους, αλλά και η ανακάλυψη αρχαίων καρπών ροδιού στην προϊστορική πόλη του ακρωτηρίου στην Σαντορίνη.

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες έρευνες γίνονται προκειμένου να αποδείξουν τις ιδιότητες του ροδιού, όπως για παράδειγμα την αντιοξειδωτική του δράση, τις αντικαρκινικές ιδιότητες, δράση ενάντια στον διαβήτη, αντιμικροβιακή δράση. Στην παρούσα in vivo μελέτη, έγινε προσπάθεια εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης του χυμού του ροδιού. Εξετάστηκαν συγκεκριμένοι δείκτες στο πλάσμα και στο αιруθροκυτταρικό αιμόλυμα μάρτυρες της οξειδωτικής κατάστασης των κυττάρων στον οργανισμό, 14 ατόμων, μετά από κατανάλωση μισό λίτρο φυσικού χυμού από ρόδι καθημερινά για 16 ημέρες.

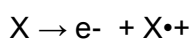
Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στο αίμα σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους, πριν την κατανάλωση του χυμού, αμέσως μετά την διακοπή κατανάλωσης του χυμού την 16^η ημέρα, μια εβδομάδα μετά την διακοπή κατανάλωσης του χυμού την 23^η ημέρα και τελευταία μέτρηση μετά από τρεις εβδομάδες μετά την διακοπή κατανάλωσης του χυμού την 37^η ημέρα. Μελετήθηκαν τα επίπεδα της ανοιγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) στα αιруθροκύτταρα, και στο πλάσμα μελετήθηκαν, τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA, δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB, δείκτης πρωτεϊνικής οξειδωσης) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TAC). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη κρίθηκαν αρκετά ικανοποιητικά, παρουσιάζοντας σημαντική δράση ενάντια στο οξειδωτικό στρες στον οργανισμό.

1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

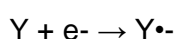
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή ένα μόριο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. (Jenkins, 1988) Στα περισσότερα μόρια τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε στοιβάδα τείνουν να ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις, έτσι το μόριο χαρακτηρίζεται σχετικά σταθερό και λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο αλλάζει ενεργειακή κατάσταση, γίνεται ασταθές και

συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια. Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ασκούν τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων οξειδωσης (απώλεια ηλεκτρονίων,) ή αναγωγής (απόκτηση ηλεκτρονίων) μεταξύ ατόμων ή μορίων. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

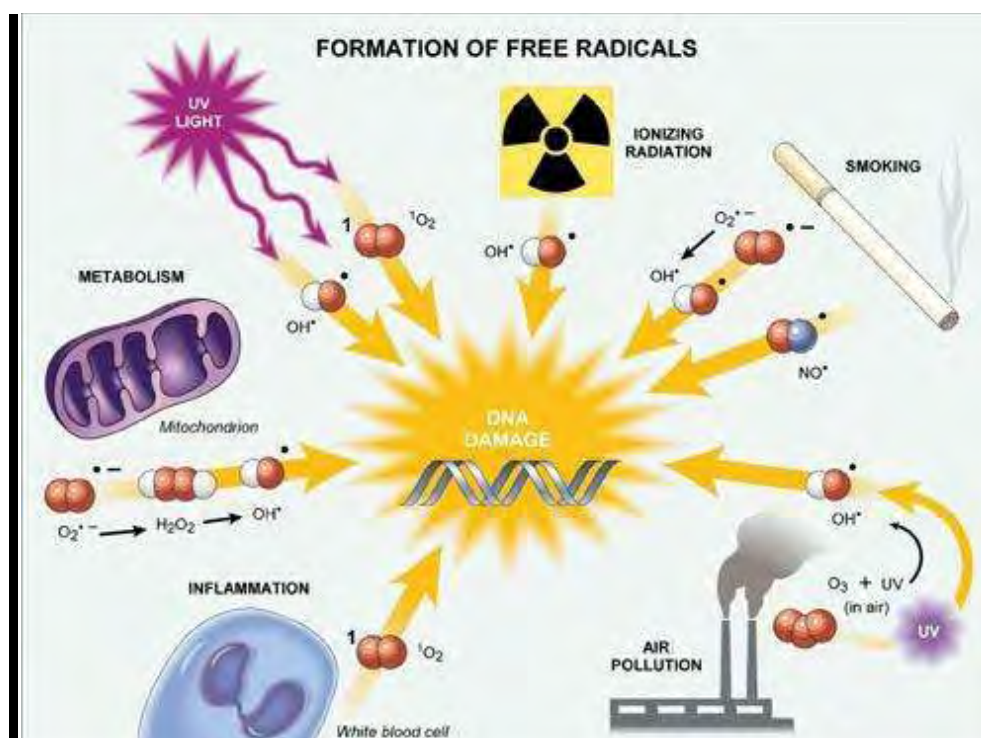
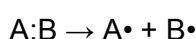
- Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:



- Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο:



- Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού:



Εικόνα 1: Πηγές ελεύθερων ριζών

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο και ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν τη δραστική

ομάδα ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) όπως του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}), του υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}), η ρίζα υδροξυλίου (OH), Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman, 1993). 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) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2001). Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002).

1.2. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

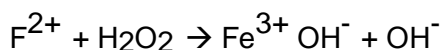
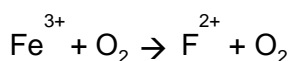
Μέρος των ελευθέρων ριζών αποτελούν φυσικά προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων. Πρόκειται για χημικά ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από το οξυγόνο το οποίο σε συγκεντρώσεις πάνω από 21% είναι τοξικό. Στη τοξικότητά του αυτή στηρίχθηκαν, οι McCord και Fridovich το 1969, ώστε να επιβεβαιώσουν πως η τοξικότητα των δραστικών μορφών του οξυγόνου οφείλεται σε ακριβώς αυτή του την ιδιότητα. (Παπαγεωργίου, 2005)

Αν και κατά βάση οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται επιβλαβείς σε χαμηλές συγκεντρώσεις εξασφαλίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και εξυπηρετούν σε συγκεκριμένες διεργασίες όπως για παράδειγμα τη μεταγωγή σήματος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φαγοκυττάρωση, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην αναδίπλωση των νεοσυστατών πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η διαδικασία αυτή απαιτεί την ύπαρξη ενός οξειδωμένου περιβάλλοντος. χρυσαυγη Το οξειδωτικό στρες περιγράφει την ανισορροπία μεταξύ των ελεύθερων ριζών (ή οποιονδήποτε άλλων δραστικών μορφών) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού. Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες συνεπάγεται παραγωγή και συσσώρευση οξειδωτικών προϊόντων που εμπλέκονται στη παθογένεια, κατά κύριο λόγο εκφυλιστικών νοσημάτων και φλεγμονών. Χαρακτηρίζεται από τις μεταβολές που προκαλεί στα βιομόρια του οργανισμού (Raymond C.S.Seet, 2010).

Σε αντίθετη περίπτωση αν η περίσσεια τους δεν αδρανοποιηθεί τότε θα αντιδράσει με τα κυτταρικά στοιχεία του οργανισμού, δηλαδή λίπη – πρωτεΐνες - νουκλεϊκά οξέα, με συνέπεια να προκληθούν μη αναστρέψιμες μεταβολές (Pilar Codo Ner-Franch, 2011).

1.2.α. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται το μεγαλύτερο μέρος ATP που συνθέτουν οι περισσότεροι οργανισμοί, λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου και περιέχονται όλα τα ένζυμα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, αμινοξέων, τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέως. Περιλαμβάνει αναγωγή του O_2 σε H_2O με ηλεκτρονία που προκύπτουν από NADH και το $FADH_2$. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 . Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

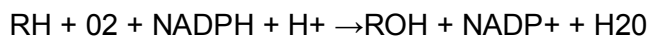


Όπως προκύπτει, κατά την αναγωγή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες, επικίνδυνες για τα κύτταρα καθώς προκαλούν βλάβες στα ένζυμα στα μεμβρανικά λιπίδια και στα νουκλεϊκά οξέα.

1.2.β. Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450

Το ενζυμικό σύστημα P450 κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών για τον οργανισμό, τα ένζυμα του αποτελούνται από αιμοπρωτεΐνες, βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Κύριος μηχανισμός λειτουργίας είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και NADPH στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας έτσι το υπόστρωμα.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε ένα ξενοβιοτικό RH είναι η ακόλουθη:



Η υδροξυλίωση των ξενοβιοτικών τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά και επιτρέπει την απέκκρισή τους στα ούρα, κάποιες φορές όμως η υδροξυλίωση μερικών ενώσεων τις μετατρέπει σε τοξικές ουσίες.

1.2.γ. Υπεροξειδιοσώματα

Είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο.

1.2.δ. Άσκηση

Μελέτες έδειξαν πως η έντονη άσκηση σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και σε συνδυασμό με αυξημένη ποσότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ανθρώπους μετά από χρόνια άσκηση σε ήπαρ, καρδιά.

1.2.ε. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα κύτταρα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει παραγωγή ROS (Ames, 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα O_2^- (Cooper, 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brandley, 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

1.2.στ. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

Κατά την έντονη αερόβια άσκηση, όμως, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου είναι αυξημένη κατά 20 φορές και τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυική ίνα είναι αυξημένα κατά 100 φορές (Ji, 1999). Έτσι, άμεσα αυξάνεται η παραγωγή ριζών οξυγόνου που ξεφεύγουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια προκαλείται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

1.2.ζ. Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

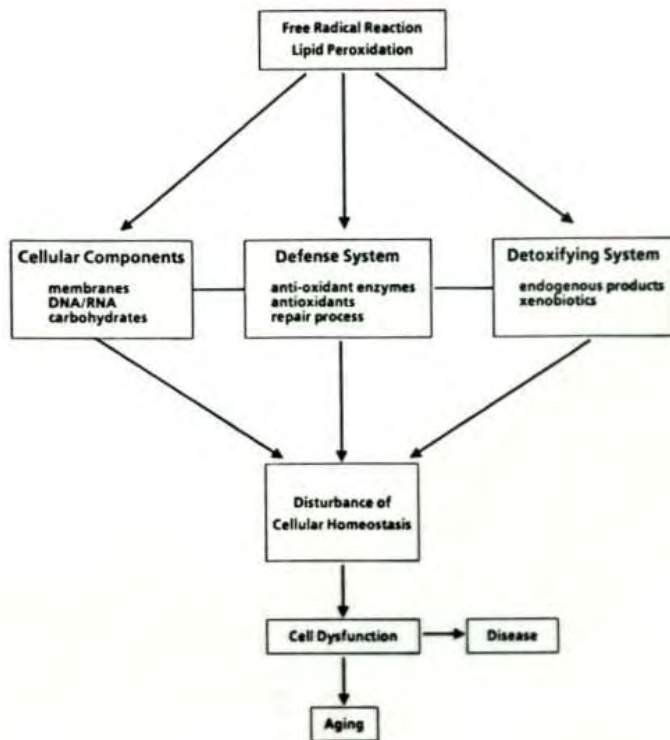
Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό μετά σε AMP. Τότε, η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνει το AMP σε υποξανθίνη. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak, 1996; Vina, 2000). Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα O_2^- και H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (XO) (Ji, 1999).

1.3. ΕΞΩΤΕΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

- Ακτινοβολία (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία)
- Φλεγμονή
- Κάπνισμα
- Ρυπασμένη ατμόσφαιρα
- Εκθεση στο όζον
- Υπεροξία
- Ιόντα βαρέων μετάλλων

1.4. ΒΛΑΒΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Όπως είπαμε οι ελεύθερες ρίζες είναι αρκετά δραστικά μόρια με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού. Προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA αλληλεπιδρώντας με τις βάσεις, αλλοιώνουν τις κυτταρικές μεμβράνες, έχουν σχέση σε ένα βαθμό με παθήσεις όπως ο διαβήτης, αρτηριοσκλήρυνση ακόμα και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) και γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).



Εικόνα 2: Λιπιδική υπεροξειδωση και γήρανση

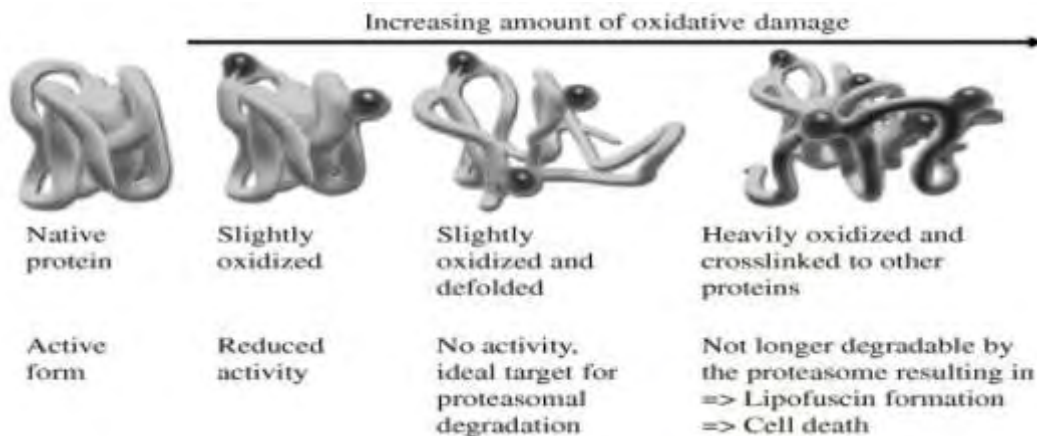
1.4.α. Βλάβες στο DNA

Το μόριο του DNA όπως γνωρίζουμε είναι εξαιρετικά σταθερό και δύσκολα αλλοιώσιμο, ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την φυσιολογική του λειτουργία με καταστροφικά αποτελέσματα. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA, αλλαγές στις βάσεις, βλάβες στη δομή του DNA μιας και επιδρούν στη δεοξυριβόζη, στις βάσεις πυριμιδίνη και πουρίνη. (Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, 2007), και προκαλούν βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA ενεργοποιώντας τη λειτουργία της πολυμεράσης της ριβόζης. Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην επισκευή, στη μετάφραση, στην αντιγραφή και στον ανασυνδυασμό του DNA. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω από 100 οξειδωτικές τροποποιήσεις έχουν αναγνωριστεί στο DNA έως τώρα. (Klaunig & Kamendulis, 2004; Dizdarglu, 2002; Cox, 2001). Όλα αυτά έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία μεταλλάξεων και κατά συνέπεια εμφάνιση καρκινογένεσης. Το διατομικό Οξυγόνο (O_2) δεν έχει την ικανότητα να οξειδώσει άμεσα το DNA στη θερμοκρασία του σώματος των ζωντανών οργανισμών. Ορισμένα όμως οξυγονούχα προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού, όπως το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με το DNA όταν οι συγκεντρώσεις τους ξεπεράσουν τα φυσιολογικά επίπεδα (Halliwell B, 1991,) Οι περισσότερες όμως

οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες (όπως η ρίζα υδροξυλίου, HO•), αζωτούχες ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν συγκεκριμένες βλάβες στη δομή του DNA, μεταλλάξεις και πρόσθετα-DNA. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί από πειραματικά αποτελέσματα πάνω από 100 είδη οξειδωτικών μετατροπών στο DNA (Cadet J, 1997)

1.4.β. Βλάβες στις πρωτεΐνες

Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί αλλοιώσεις και τροποποιήσεις στην δομή τους με αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Τα αμινοξέα αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, όταν ελεύθερες ρίζες, κυρίως υδροξυλικές ρίζες (OH•) αντιδρούν με τα αμινοξέα παράγονται οξειδωμένα αμινοξέα και πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία χρησιμοποιούνται και ως δείκτες οξειδωτικού στρες καθώς και ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής καταστροφής. Τα αμινοξέα που είναι ευαίσθητα στην οξείδωση είναι η λυσίνη, η αργινίνη, η προλίνη, η θρεονίνη. Επίσης, η αλβουμίνη, ανευρίσκεται στο πλάσμα, και αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες μιας και δέχεται πολλές διαφορετικές τροποποιήσεις λόγω της οξείδωσης.



Εικόνα 3: Βλάβες ROS στις πρωτεΐνες

1.4.γ. Βλάβες στα λιπίδια

Τα λιπίδια και πιο συγκεκριμένα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα λιπαρά οξέα των μεμβρανικών λιπιδίων όπου αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να καταλήξουν σε λιπιδική υπεροξείδωση. Λιπιδική υπεροξείδωση σημαίνει παραγωγή νέων ριζών με αποτέλεσμα, η κυτταρική μεμβράνη χάνει την σταθερότητα της την αύξηση της

ρευστότητας αποσταθεροποιεί υποδοχείς και επιπλέον προκαλεί ανοσολογική απάντηση με απόρροια τη μετατροπή των λιπιδίων σε φωσφολιπίδια και σταδιακά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξειδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

1.4.δ. Δράση στα ιόντα του Ca⁺⁺

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε κακή λειτουργία του μεταβολισμού του ασβεστίου, βλάβη των μιτοχονδρίων και μεγαλύτερη απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου. Μια κοινή συνέπεια των εκτεταμένων εκθέσεων σε εξωκυτταρικά Ca⁺⁺ είναι η δημιουργία φουσαλίδων που προκαλείται από την διάσπαση του κυτταροσκελετού.

1.4.ε. Δράση στην επικοινωνία των κυττάρων

Η σημαντικότερη μάλλον δράση των ελευθέρων ριζών είναι η διαταραχή που επέρχεται στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων. Για να επιτευχθεί ομοιόσταση του κυττάρου είναι απαραίτητο να υπάρχει ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης ελευθέρων ριζών. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων όπως κινάσες, φωσφατάσες και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζονται από την ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση. Η έκθεση κυττάρων σε οξειδωτικές ουσίες που εξαντλούν τα αποθέματα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, επάγει την G1 φάση του κυττάρου και οδηγεί σε πληθώρα αλλαγών σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο.

1.4.στ. Αθηροσκλήρωση

Με τον όρο αθηροσκλήρωση εννοούμε την εναπόθεση λιπιδίων στο εσωτερικό των αγγείων που οδηγεί σε προοδευτική απόφραξη αυτών. Έχει βρεθεί ότι η οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Η οξειδωμένη LDL οδηγεί στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων. Στα αρχικά στάδια η LDL εναποτίθεται υπενδοθηλιακά και παγιδύεται εκεί, και στη συνέχεια με τη επίδραση ελευθέρων ριζών, παραγομένων από μυϊκά κύτταρα και μονοκύτταρα λευκά αιμοσφαίρια, οξειδώνεται. Η οξειδωμένη LDL οδηγεί στην παραγωγή χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 των μονοκυττάρων (MCP-1), η οποία με τη σειρά της οδηγεί

στη συσσώρευση μονοπύρηνων. Τα τελευταία ενδοκυτταρώνουν την οξειδωμένη LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα.

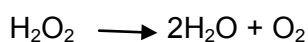
1.4.ε. Καρκινογένεση

Σήμερα γνωρίζουμε πως το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει μηχανισμούς στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ο ακριβής τρόπος δεν είναι ακόμα γνωστός. Οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν στις οδούς μεταγωγής σήματος με αποτέλεσμα την μετατροπή της έκφρασης γονιδίων αλλά και επιφέρουν γενετικές αλλαγές που μπορεί να οδηγήσουν σε έναρξη καρκινογένεσης.

1.5. ENZYMΙΚΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

1.5.α. Καταλάση (CAT)

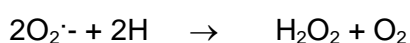
Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο μέρος εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ και λιγότερο στην καρδιά και στον μυϊκό ιστό και στον εγκέφαλο. Η καταλάση καταλύει την διάσπαση του H₂O₂ σε H₂O και O₂.



Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H₂O₂ το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂ (Halliwell & Gutteridge, 1998). Σημαντικό ένζυμο για τον οργανισμό καθώς προστατεύει από τις ROS. Η καταλάση χρησιμοποιεί επίσης το υπεροξειδίο του υδρογόνου για να σπάει τις επιβλαβείς τοξίνες στον οργανισμό και είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά ένζυμα που βρίσκονται στα κύτταρα.

1.5.β. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το βιολογικό καταλύτη για την αντίδραση μετατροπής του σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες του O₂^{•-}.

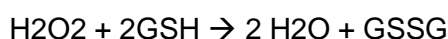


Το O₂^{•-} παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD. Στη φύση απαντώνται τρία είδη SOD. Καθένα ξεχωριστά απαιτεί ένα τουλάχιστον οξειδοαναγωγικό μέταλλο που θα αποτελέσει το ενεργό του κέντρο ώστε να διεκπεραιώνεται επιτυχώς η καταλυτική τους δράση. SODs χαλκού – ψευδαργύρου που βρίσκεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα στο κυτόπλασμα της πλειοψηφίας των κυττάρων των θηλαστικών. Επιπλέον, υπάρχουν και οι SODs που ανευρίσκονται εξωκυτταρικά γνωστές ως EC – SOD, που η δράση τους αφορά τη μείωση της συγκέντρωσης O₂^{•-} στο πλάσμα του αίματος. SODs μαγγανίου που απαντώνται στα προκαρυωτικά κύτταρα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. SODs του σιδήρου που υπάρχει μόνο στα προκαρυωτικά κύτταρα (Παπαγεωργίου, 2005). Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Βρίσκεται στα περισσότερα όργανα, σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων.

1.5.γ. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο. Περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο το ιχνοστοιχείο σελήνιο. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης ανάγουν οργανικά και ανόργανα υπεροξεία προς τις αντίστοιχες αλκοόλες. Η κυριότερη αντίδρασή της αφορά τη μετατροπή του H₂O₂ σε H₂O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH)

GPX



1.5.δ. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

1.6. ΜΗ ENΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

1.6.α. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο αποτελούμενο από τα αμινοξέα L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεινυλο-γλυκίνη. Θεωρείται η σπουδαιότερη θειόλη και αποτελεί τον σημαντικότερο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Έχει βρεθεί σε φυτικά και ζωικά κύτταρα, αερόβια βακτήρια και πιο σπάνια σε αναερόβια βακτήρια. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση γλουταθειόνης στα κύτταρα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και 10% στα μιτοχόνδρια, τα οποία δεν διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα για την σύνθεση της γση και έτσι την προσλαμβάνουν από το κυτταρόπλασμα, καθώς και ένα μικρό ποσοστό στον πυρήνα. Η γλουταθειόνη εντοπίζεται στο κύτταρο είτε σε ανηγμένη μορφή (GSH) είτε σε οξειδωμένη (GSSG), δεσμεύει άμεσα την ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Σε φυσιολογικά κύτταρα που δεν έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες η συγκέντρωση της ανοιγμένης γλουταθειόνης είναι περίπου 99%. Ο λόγος GSH/ GSSG αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες.

- Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Επαναφέρει στην ενεργό μορφή το ασκορβικό οξύ και τη βιταμίνη Ε άμεσα ή έμμεσα μέσα από τον λόγο GSH/GSSG.
- Λειτουργεί και ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου όπως υπεροξειδάσες, τρανσφεράσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες θειόλης, αφυδρογονάση φορμαλδεΐδης, γλυοξυλάση.
- Εμποδίζει την οξείδωση των SH- ομάδων στις πρωτεΐνες. Αποτελεί αποθήκη και μεταφορέα του NO και σχετίζεται με την μεταφορά χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς το δεσμεύει και εμποδίζει ταυτόχρονα την αντίδραση του με τις ελεύθερες ρίζες.
- Χρησιμεύει ως ραδιοπροστατευτικός παράγοντας.
- Εμπλέκεται στη νευροπροστατευτική δράση ενάντια σε πληθώρα εξωγενών και ενδογενών νευροτοξινών, ενώ αλλαγές τον μεταβολισμό της έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον, και η νόσος Αλτσχάιμερ.

1.6.β. Βιταμίνη C

Κατατάσσετε στους μονοσακχαρίτες και δεν συντίθεται στον ανθρώπινο οργανισμό. Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμα όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το

υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα.

1.6.γ. Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική λιποδιαλυτή αντιοξειδωτική βιταμίνη. Αποτελείται από 8 δομικά ισομερή τοκοφερολών (α, β, γ, δ) και τοκοτριενολών (α, β, γ, δ) και η πιο δραστική είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξείδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.6.δ. Καροτενοειδή

Φυσικές χρωστικές στα φυτά και σε ορισμένους μικροοργανισμούς, δίνοντας στα φρούτα και τα λαχανικά τα χαρακτηριστικά κόκκινα, πορτοκαλί και κίτρινα χρώματα. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.6.ε. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ βρίσκεται τόσο στα κύτταρα όσο και σε όλα τα υγρά του σώματος σε μικρές συγκεντρώσεις. Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Το ουρικό οξύ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό μέσο, παρέχοντας ηλεκτρόνια και έτσι δρα προστατευτικά ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες. (Παπαγεωργίου 2005)

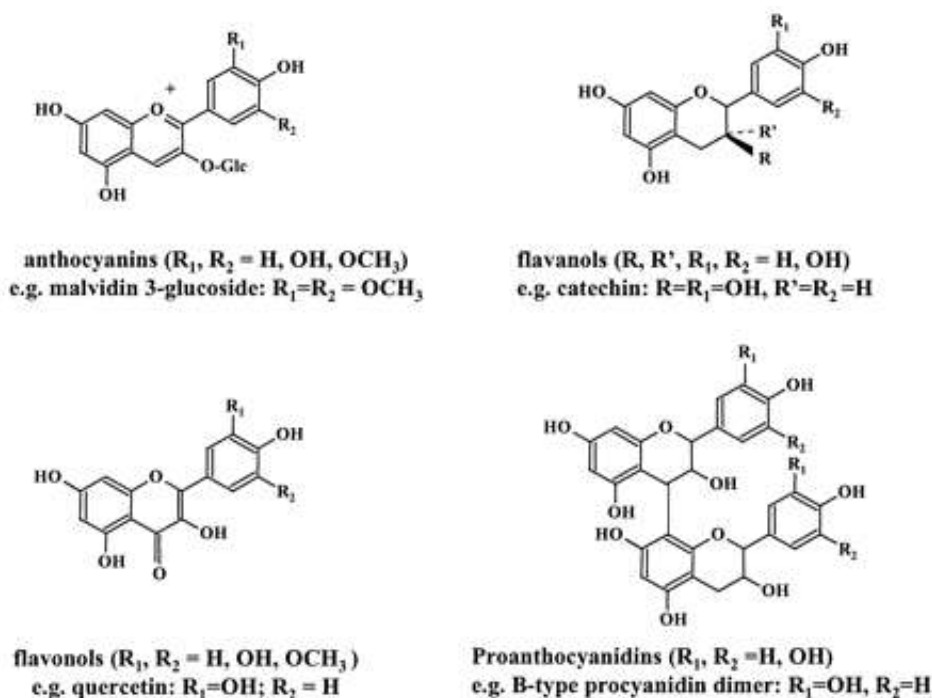
1.6.στ. Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q

Πρόκειται για ένα λιποδιαλυτό παράγωγο της κινόνης που συντίθεται στα κύτταρα και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP και επιπροσθέτως λειτουργεί και ως αντιοξειδωτικό μέσο. Η ουβικινόνη μπορεί να αναστείλλει τη πρόοδο της υπεροξειδωσης των λιπιδίων καθώς και να αναγεννήσει τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη της μορφή.

1.6.ζ. Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.7. ΦΥΤΙΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ



Εικόνα 4: Σημαντικά φυτοχημικές ενώσεις στο ρόδι

Από τις μεγαλύτερες κατηγορίες χημικών ενώσεων. Αποτελούν τα δευτερογενή παράγωγα του μεταβολισμού των φυτών. Είναι υπεύθυνες για το χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, στην καθημερινή μας διατροφή τις συναντούμε σε πολλά εδώδιμα είδη όπως σταφύλια, ψυχανθή, σε πολλά είδη φυτικών αφεψημάτων στο κόκκινο κρασί, στον καφέ και σε πολλά άλλα βρώσιμα φυτά. Συνδέονται στενά με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών στα φυτά, αναγκαίων για την επιβίωσή τους. Παράλληλα παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες βασικές λειτουργίες των φυτικών οργανισμών όπως είναι η επικοινωνία, η προστασία των φυτικών ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία, ο ανταγωνισμός με άλλα είδη κτλ.

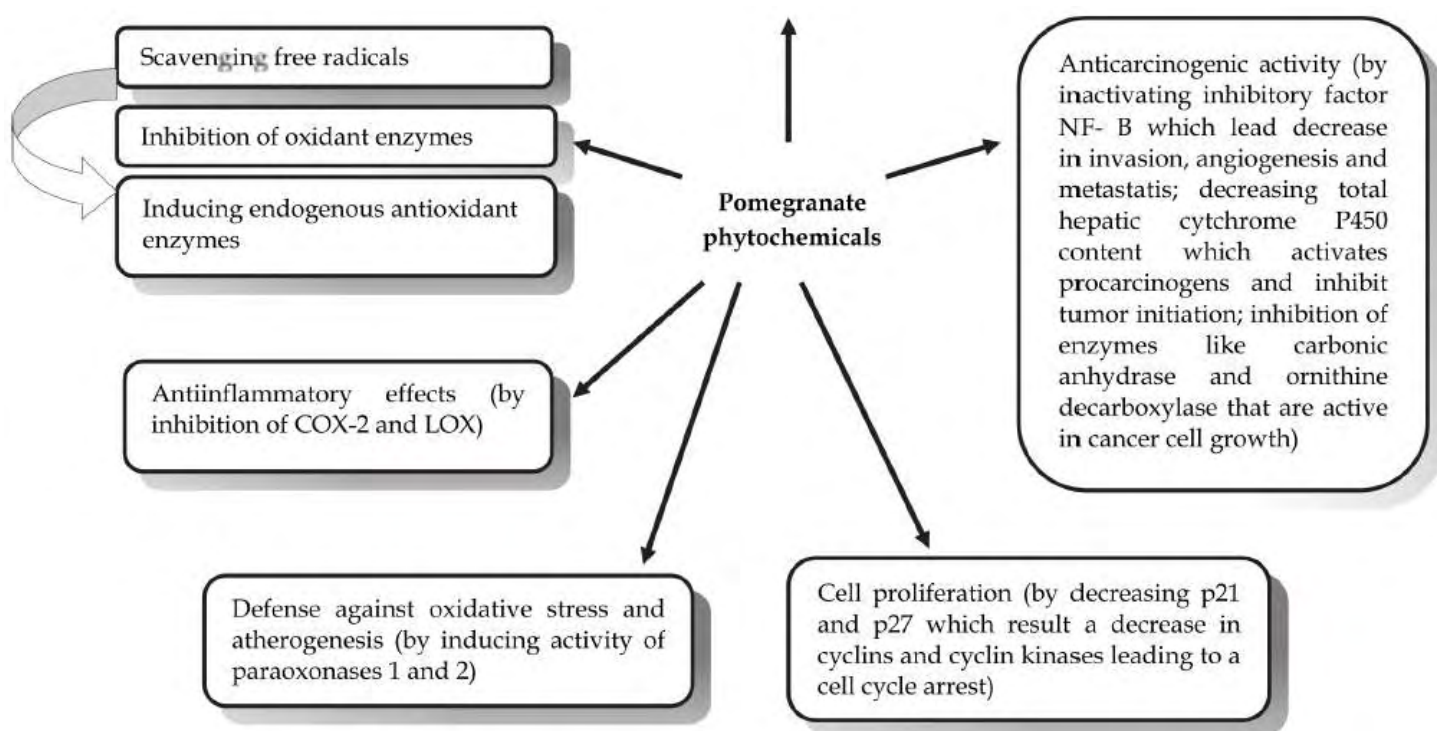
Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ένας τουλάχιστον αρωματικός δακτύλιος (C_6) και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες δεσμευμένες στους άνθρακες του αρωματικού

δακτυλίου. Μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, προσθήκης ή πολυμερισμού του βασικού δακτυλίου, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων.

Οι φυτικές πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα σπιλβένια και τα λιγνάνια.

1.7.α. Φλαβονοειδή

Αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών με μεγάλο αριθμό φαινολικών ενώσεων που σαν κύριο χαρακτηριστικό έχουν δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο και έχουν τον βασικό τύπο χημικής δομής $C_6C_3C_6$. Βρίσκονται κυρίως στην επιδερμίδα των φύλλων και στον φλοιό των φρούτων.



Εικόνα 5: Θετικές επιδράσεις των φυτοχημικών του ροδιού στον οργανισμό σε μοριακό επίπεδο

Ανάλογα με τον βαθμό οξειδωσης του κεντρικού δακτυλίου μπορούν να διακριθούν σε αρκετές ομάδες με ποια χαρακτηριστικές:

1.7.β. Φλαβονόλες

Είναι ευρύτατα διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, βρίσκονται στα κρεμμύδια, μπρόκολα, βατόμουρα, τσάι, στον χυμό του ροδιού. Απαντώνται σε γλυκοσιδιομένη

μορφή με τα συζευγμένα σάκχαρα να είναι κυρίως η γλυκόζη ή η ραμνόζη. Φέρουν ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C. Οι πιο αντιπροσωπευτικές είναι οι καμπφερόλη, κερκετίνη, μυρικετίνη, ισοραμνετίνη.

1.7.γ. Φλαβόνες

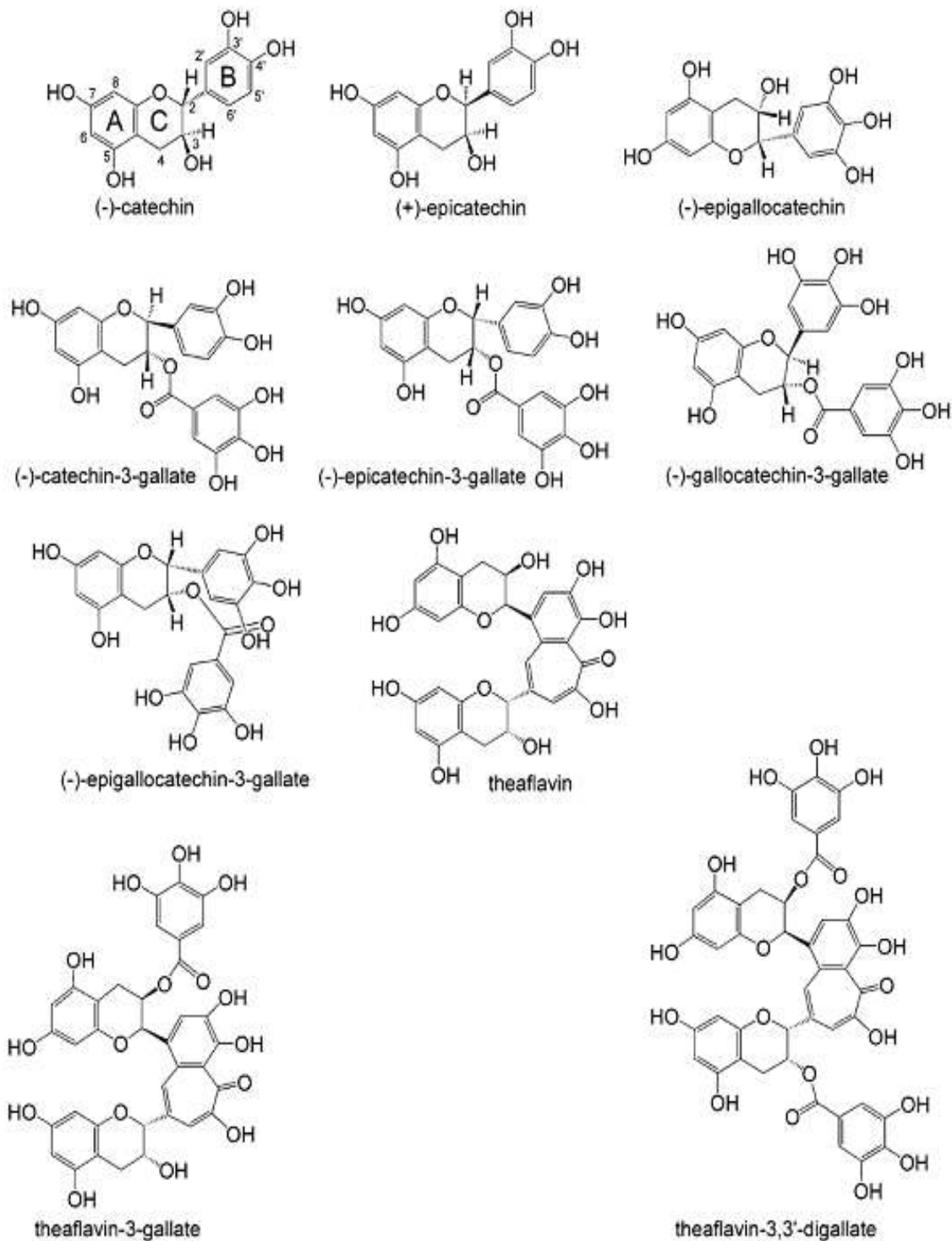
Έχουν παρόμοια χημική δομή με τις φλαβονόλες, μόνο που δεν έχουν ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C. Στην φύση τις συναντούμε ως 7- γλυκοζίτες, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία η οποία οφείλεται στις χημικές μεταβολές που υπεισέρχονται όπως υδροξυλίωση, μεθυλίωση O- και C- αλκυλίωση καθώς και γλυκοζυλιώσεις. Βρίσκονται στο σέλινο, μαιντανό, στο ρόδι και στα εσπεριδοειδή. Οι πιο αντιπροσωπευτικές είναι οι λουτεολίνη, απιγενίνη.

1.7.δ. Φλαβανόλες

Απαντώνται στην φύση είτε ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη) είτε ως πολυμερή (προκυανιδίνες), αποτελούν τις πιο συχνές ενώσεις μαζί με τις φλαβόνες, στο περικάρπιο και στα φύλλα του ροδιού δεν τις συναντούμε σε γλυκοζυλιωμένη μορφή.

1.7.ε. Ισοφλαβόνες

Χαρακτηρίζονται και ως φυτοοιστρογόνα, έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα αν και δεν ανήκουν στα στεροειδή. Έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων με υδροξυλομάδες στις θέσεις 7 και 4 του δακτυλίου, παρόμοια διαμόρφωση με αυτή της οιστραδιόλης, παράλληλα έχουν τον δεύτερο δακτύλιο στη θέση C3 και όχι στην θέση C2 του βασικού σκελετού. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή. Οι πιο αντιπροσωπευτικές είναι οι γενιστείνη, ντετζεινη.



Εικόνα 6: Κύριες χημικές ενώσεις φλαβονοειδών στο ρόδι

1.7.στ. Φλαβανόνες

Δεν είναι ευρύτατα διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, έχουν τον C δακτύλιο κορεσμένο με χημική δομή που τους επιτρέπει την σύνδεση υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες. Βρίσκονται στις ντομάτες, τα εσπεριδοειδή, την μέντα. Οι πιο αντιπροσωπευτικές είναι οι ναριγενίνη, εσπεριτίνη.

1.7.ζ. Ανθοκυανιδίνες

Προκύπτουν από την γλυκόλυση των ανθοκυανών. Θεωρείται από η πιο μεγάλη και πιο σημαντική ομάδα στην κατηγορία των φλαβονοειδών. υπάρχει στα επισπέρματα και στον χυμό του ροδιού. Δίνουν στα άνθη, τους καρπούς και στα φύλλα το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό, και ιώδες χρώμα ανάλογα την ποικιλία. Δεν βρίσκονται ελεύθερες στην φύση αλλά ενωμένες με σάκχαρα όπως γλυκόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη ή ραμνόζη.

| Compound name | Plant part* | Bio activity | Reference |
|---|-------------|---|--|
| Apigenin | L | Antioxidant; anti-inflammatory; anti-neoplastic | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Apigenin 4'- <i>O</i> -glucopyranoside | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Catechin | J, P | Anti-neoplastic; antioxidant | de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000 |
| Catechol | J | Antioxidant; anti-neoplastic | Liu HX <i>et al.</i> 2002 |
| Cyanidin | P | Antioxidant | Noda <i>et al.</i> 2002 |
| Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside | J | Antioxidant | Hernández <i>et al.</i> 1999 |
| Cyanidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside | J | Antioxidant | Hernández <i>et al.</i> 1999 |
| Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside | J | | Hernández <i>et al.</i> 1999 |
| Delphinidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside | J | | Hernández <i>et al.</i> 1999 |
| Epicatechin | J, P | Anti-neoplastic | de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000 |
| Epigallocatechin 3-gallate | J, P | Anti-neoplastic | de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000 |
| Flavan-3-ol | J, P | Anti-neoplastic | de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000 |
| Isoquercetin | J | Hepatoprotective | Liu HX <i>et al.</i> 2002; Rena <i>et al.</i> 2009 |
| Kaempferol | P | Antioxidant; anti-inflammatory | van Elswijk <i>et al.</i> 2004 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside | P | Antioxidant | van Elswijk <i>et al.</i> 2004 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnoglucoside | P | Anti-hypertensive | van Elswijk <i>et al.</i> 2004 |
| Luteolin | P | Antioxidant; anti-inflammatory | van Elswijk <i>et al.</i> 2004 |
| Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside | P | Antioxidant | van Elswijk <i>et al.</i> 2004 |
| Luteolin 4'- <i>O</i> -glucopyranoside | L | Antioxidant | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Luteolin 3'- <i>O</i> -glucopyranoside | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Luteolin 3'- <i>O</i> -xylopyranoside | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Naringenin-4'-methylether-7- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside | B | | Srivastava <i>et al.</i> 2001 |
| Naringin | P | Antiviral; antibacterial | Lansky <i>et al.</i> 2007 |
| Pelargonidin | P | Anti-oxidant; antibacterial | Noda <i>et al.</i> 2002 |
| Pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside | J | Antioxidant | Hernández <i>et al.</i> 1999 |
| Pelargonidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside | J | | Hernández <i>et al.</i> 1999 |
| Procyanidin | J | Antioxidant; anti-neoplastic; anti-inflammatory | Liu <i>et al.</i> 2002 |
| Prodelfinidin | P | Antioxidant | Plumb <i>et al.</i> 2003 |
| Punicaflavone | F | | Ali M <i>et al.</i> 2006 |
| Quercetin | J, P | Anti-neoplastic; antioxidant; antiviral | Artik 1998 |
| Quercetin-3,4-dimethylether-7- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside | B | Antioxidant | Chauhan <i>et al.</i> 2001 |
| Rutin | P, J | Antioxidant; anti-hypertensive; antiviral | Artik 1998 |

*B: bark; F: flowers; J: juice; L: leaves; P: pericarp.

Εικόνα 7: Κυριότερα φλαβονοειδή στο ρόδι

1.7.η. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα έχουν απλούστερη δομή από τα φλαβονοειδή, αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο και βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα.

Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, στα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος και στα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος.

Παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέος

Τα κυριότερα οξέα σε αυτή την κατηγορία είναι το ρ- υδροξυβενζοϊκό, το βανιλλικό, το συρινγικό το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ. Η περιεκτικότητα υδροξυβενζοϊκού οξέως στα εδώδιμα φυτά είναι σχετικά χαμηλή με εξαίρεση το τσάι, τα κρεμμύδια, τα κόκκινα φρούτα και τα ραπανάκια.

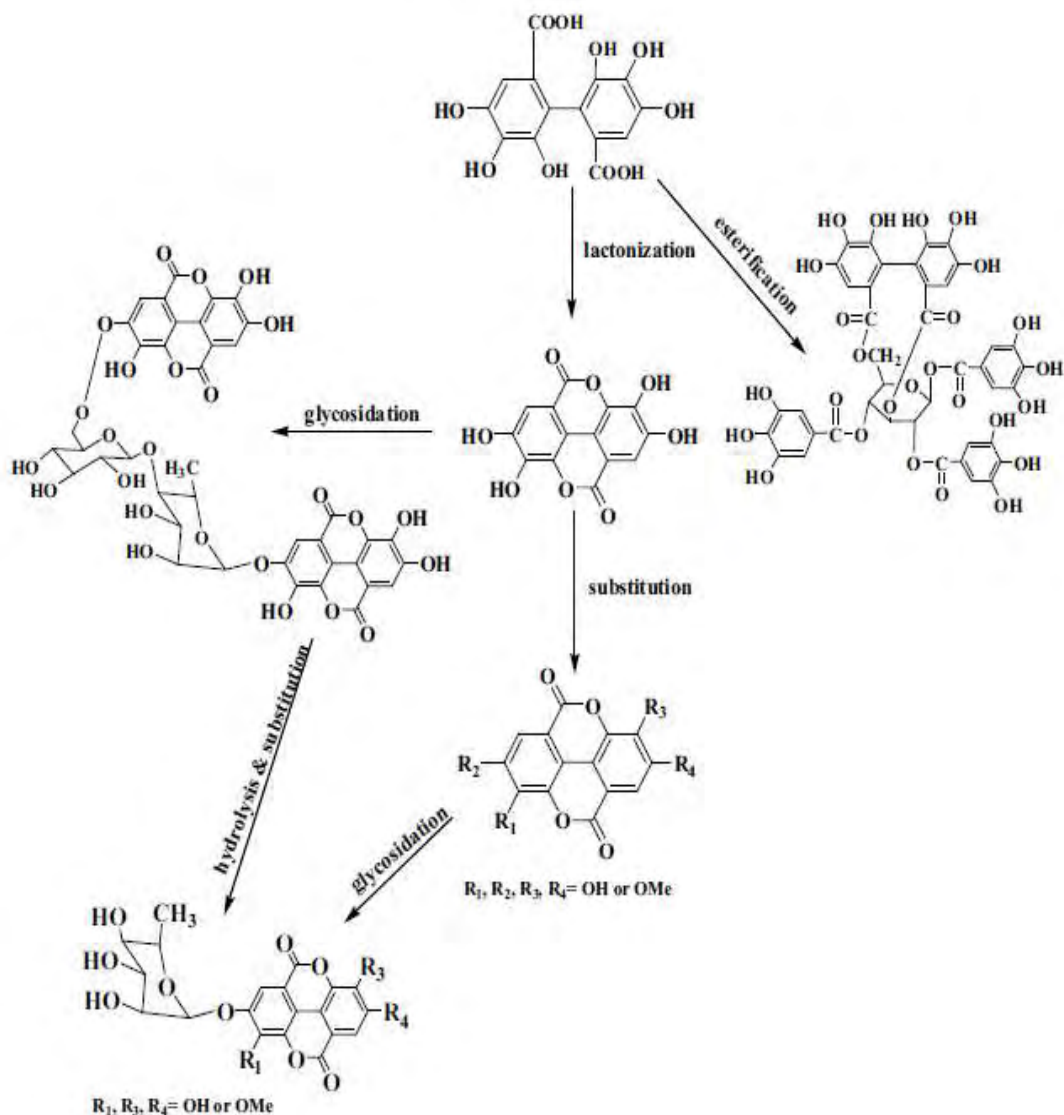
Ταννίνες

Αποτελούν συστατικά σύνθετων μορίων όπως οι υδρολυμένες ταννίνες, πιο συγκεκριμένα οι γαλλοταννίνες και οι ελαγταννίνες όπου και αποτελούν τις πιο διαδεδομένες ενώσεις σε πολλά μέρη στο ρόδι. Οι ελαγταννίνες βρίσκονται κυρίως στο περικάρπιο, στα σπέρματα και στα άνθη. Στον χυμό του ροδιού περιέχονται κυρίως γαλλικό και ελλαγικό οξύ με το τελευταίο να βρίσκεται άφθονο σε συγκέντρωση 0,1% στα άνθη και 0,2% στο περικάρπιο (Amakura et al., 2000).

| Compound name | Plant part* | Bioactivity | Reference |
|--|-------------|---|---|
| Brevifolin | L | Hypolipidemic; antioxidant; hepatoprotective | Nawwar <i>et al.</i> 1994; Wang <i>et al.</i> 2005 |
| Brevifolin carboxylic acid | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Ethyl brevifolin carboxylate | F, L | Antiviral | Hussein <i>et al.</i> 1997 |
| Brevifolin carboxylic acid monopotassium sulphate | L | | Hussein <i>et al.</i> 1997 |
| 3,4,8,9,10-penta-hydroxydibenzo[<i>b,d</i>]pyran-6-one | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994a |
| Castarimin | P | Antiviral; antioxidant | Sakomi <i>et al.</i> 1993 |
| Corilagin | L, P | Anti-hypertensive; anti-neoplastic | Sakomi <i>et al.</i> 1993; Nawwar <i>et al.</i> 1994b |
| Ellagic acid | F, J, L, P | Anti-neoplastic; skin-whitening | Amakura <i>et al.</i> 2000a; Wang <i>et al.</i> 2004 |
| Gallagylidilacton | P | Anti-inflammatory; anti-neoplastic | Sakomi <i>et al.</i> 1993 |
| Gallic acid | F, J, L, P | Anti-inflammatory; anti-mutagenic; antioxidant; antiviral | Amakura <i>et al.</i> 2000a; Huang <i>et al.</i> 2005a |
| Methyl gallate | P | | Kasimu <i>et al.</i> 2009 |
| 1,2,3-tri- <i>O</i> -galloyl- β - ⁴ C1-glucose | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994b |
| 1,2,4-tri- <i>O</i> -galloyl- β -glucose | L | | Hussein <i>et al.</i> 1997 |
| 1,3,4-tri- <i>O</i> -galloyl- β -glucose | L | | Hussein <i>et al.</i> 1997 |
| 1,2,6-tri- <i>O</i> -galloyl- β - ⁴ C1-glucose | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994b |
| 1,4,6-tri- <i>O</i> -galloyl- β - ⁴ C1-glucose | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994b |
| 1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose | L | | Tanaka <i>et al.</i> 1985 |
| 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose | L | | Tanaka <i>et al.</i> 1985 |
| 3,6-(<i>R</i>)-hexahydroxydiphenoyl-(α / β)- ¹ C4-glucose | L | | Nawwar <i>et al.</i> 1994b |
| 1,4-di- <i>O</i> -galloyl-3,6-(<i>R</i>)-hexahydroxydiphenoyl- β -glucose | L | | Hussein <i>et al.</i> 1997 |
| 1,2-di- <i>O</i> -galloyl-4,6- <i>O</i> -(<i>S</i>)-hexahydroxydiphenoyl- β -D-glucopyranoside | F | Anti-neoplastic | Xie <i>et al.</i> 2008 |
| 2- <i>O</i> -galloylpunicalin | B, W | | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| 2,3-(<i>S</i>)-HHDP-D-glucose | B | | Tanaka <i>et al.</i> 1986; Liu <i>et al.</i> 2007 |
| 6- <i>O</i> -galloyl-2,3-(<i>S</i>)-HHDP-D-glucose | B | | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| Granatin A | P | | Tanaka <i>et al.</i> 1990 |
| Granatin B | P | Anti-inflammatory | Tanaka <i>et al.</i> 1990; Liu <i>et al.</i> 2007 |
| 3- <i>O</i> -methylellagic acid | W | | El-Toumy <i>et al.</i> 2003 |
| 3,3'-di- <i>O</i> -methylellagic acid | S | Antioxidant | Wang <i>et al.</i> 2004 |
| 4,4'-di- <i>O</i> -methylellagic acid | W | | El-Toumy <i>et al.</i> 2003 |
| 3,3',4'-tri- <i>O</i> -methylellagic acid | S | Antioxidant | Wang <i>et al.</i> 2004 |
| 3'- <i>O</i> -methyl-3,4-methylenedioxyellagic acid | W | | El-Toumy <i>et al.</i> 2003 |
| Pedunculagin | P | Anti-neoplastic; antioxidant | Sakomi <i>et al.</i> 1993 |
| Pomegranate | F | | Wang <i>et al.</i> 2006a |
| Punicacortein A | B | Anti-HIV | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| Punicacortein B | B | Anti-HIV | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| Punicacortein C | B | Anti-HIV | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| Punicacortein D | B | Anti-HIV | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| Punicafolin | L | Anti-neoplastic | Nawwar <i>et al.</i> 1994b |
| Punicalagin | B, L, P, R | Antioxidant; anti-hypertensive | Gil <i>et al.</i> 2000; Anand <i>et al.</i> 2004; Liu <i>et al.</i> 2007 |
| Punicalin | B, L, P, R | Antioxidant; anti-HIV | Tanaka <i>et al.</i> 1986; Gil <i>et al.</i> 2000; Liu <i>et al.</i> 2007 |
| Puniglucomin | B | Antioxidant | Tanaka <i>et al.</i> 1986 |
| Tellimagrandin | P | Anti-neoplastic | Sakomi <i>et al.</i> 1993 |
| Diellagic acid rhamnosyl(1 \rightarrow 4)glucopyranoside | W | | Sayed <i>et al.</i> 2002 |
| 5- <i>O</i> -galloylpunicacortein D | W | | Sayed <i>et al.</i> 2002 |

*B: bark; F: flowers; J: juice; L: leaves; P: pericarp; S: seeds; W: wood.

Εικόνα 8: Σημαντικότερες ταννίνες στο ρόδι



Εικόνα 9: Βιοσυνθετικό μονοπάτι της ελλαγιτανίνης στο ρόδι

Παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος

Εντοπίζονται πιο συχνά σε σχέση με τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος, με κυριότερα το καφεϊκό οξύ, και το κουμαρικό οξύ. Στον χυμό του ροδιού περιέχονται κυρίως καφεϊκό αλλά και χλωρογενικό και p-κουμαρικό οξύ) (Poyrazoglu et al., 2000)

Αλκαλοειδή

Αποτελούν οργανικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο στο μόριο τους, βρίσκονται πιο συχνά στον χυμό του ροδιού. Υπάρχουν 2 κύρια είδη, η πιπεριδίνη, ετεροκυκλική αμίνη αποτελούμενη από έναν εξαμελή δακτύλιο με ένα άτομο αζώτου, και η πυρολιδίνη, ετεροκυκλική αμίνη αποτελούμενη από έναν πενταμελή δακτύλιο.

| Compound name | Plant part* | Bioactivity | Reference |
|--|-------------|--|--|
| Tryptamine | J | | Badria 2002 |
| Serotonin | J | Antioxidant | Badria 2002 |
| Melatonin | J | Antioxidant; anti-inflammatory; hepatoprotective | Badria 2002 |
| Pelletierine | B, P, R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993; Vidal <i>et al.</i> |
| N-methylpelletierene | B, R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| Pseudopelletierene | B, R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| Norpseudopelletierene | R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| Sedridine | R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| 2-(2'-hydroxypropyl) Δ 1-piperidine | R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| 2-(2'-propenyl) Δ 1-piperidine | R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| N-(2',5'-dihydroxyphenyl)pyridium chloride | L | | Andreas <i>et al.</i> 2007 |
| Hygrine | R | Anti-neoplastic | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| Norhygrine | R | | Neuhofer <i>et al.</i> 1993 |
| N-acetyl-sedridine | B, R | | Neuhofer 1990 |

*B: bark; F: flowers; J: juice; L: leaves; P: pericarp; R: root.

Εικόνα 10: Κύρια αλκαλοειδή στο ρόδι

Στιλβένια

Ανήκουν σε μια κατηγορία ενώσεων που ονομάζεται φυτοαλεξίνες. Οι φυτοαλεξίνες είναι φαινολικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους με σημαντική αντιμικροβιακή δράση και ευρύ φάσμα μυκητοτοξικότητας. Τα στιλβένια βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα φυτικά τρόφιμα, είναι μέρος μηχανισμών άμυνας στους φυτικούς οργανισμούς και η σύνθεσή τους ενεργοποιείται στη προσπάθεια των φυτών να καταπολεμήσουν εξωτερικούς κινδύνους όπως μικρόβια, αντίξοες καιρικές συνθήκες κ.α.. Αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους με μια γέφυρα μεθυλενίου. Ο πιο σημαντικός αντιπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι η ουσία *trans*-ρεσβερατρόλη, βρίσκεται κυρίως στο κόκκινο κρασί, στο τσάι, στα μούρα, στην οποία αποδίδονται και οι αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιογόνες δράσεις.

Λιγνάνια

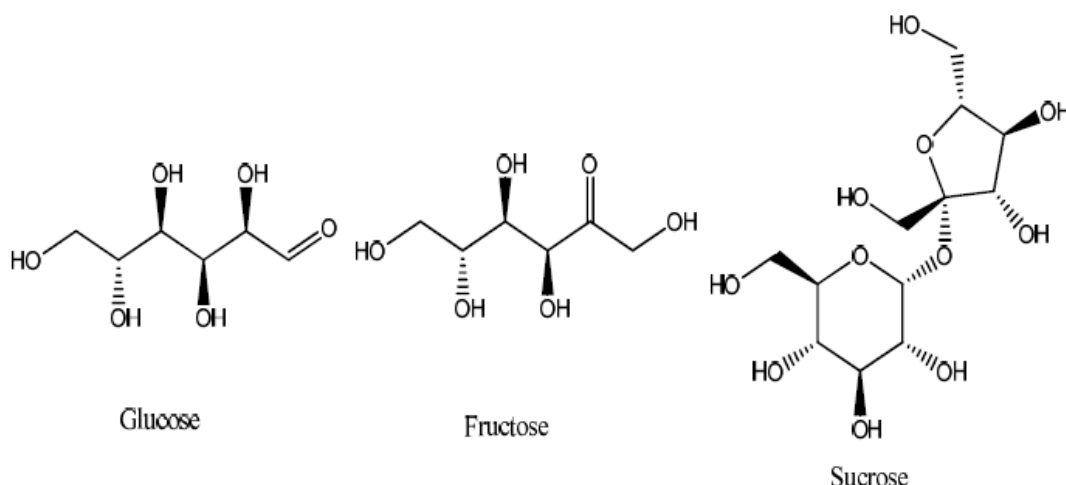
Τα λιγνάνια, συστατικά πολύ διαδεδομένα στο καθημερινό διαιτολόγιο, σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκοΐσολαρισειρινόλη και η ματαιρεισινόλη, τα οποία μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα των θηλαστικών στα αντίστοιχα ζωικά παράγωγα την εντεροδιόλη και την εντερολακτόνη. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες στα ψυχανθή (φακές), στα δημητριακά (σιτάρι), στα λαχανικά (σκόρδο, σπαράγγια, καρότα), και στα φρούτα (αχλάδια, δαμάσκηνα) (Manach *et al.*, 2004).

1.8. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΡΟΔΙΟΥ

Ο πολτός του καρπού Ροδιάς (επισπέρματα) αποτελείται από **82.3%** νερό και περιέχει **187 Kcal/100 g**. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η περιεκτικότητα ενός μέτριου καρπού Ροδιάς σε θρεπτικά στοιχεία.

| | | | |
|-----------------------|-------|-----------------------------|-------|
| Θερμίδες (kcal) | 187.0 | % Θερμίδες από λίπη | 3.6 |
| Συνολικά λιπαρά (g) | 0.8 | % Θερμίδες από Υδατάνθρακες | 91.3 |
| Κεκορεσμένα λιπαρά(g) | 0.1 | % Θερμίδες από Πρωτεΐνη | 5.0 |
| Μονοακόρεστα λιπαρά | 0.0 | Βιταμίνη C (mg) | 17.0 |
| Πολυακόρεστα λιπαρά | 0.3 | Βιταμίνη A | 0.0 |
| Χοληστερόλη(mg) | 0.0 | Βιταμίνη B6 (mg) | 0.0 |
| Υδατάνθρακες(g) | 47.2 | Βιταμίνη B12 (mg) | 0.29 |
| Ίνες (g) | 1.7 | Βιταμίνη B1 (mg) | 0.008 |
| Πρωτεΐνη(g) | 2.6 | Βιταμίνη B2 (mg) | 0.008 |
| Νάτριο(mg) | 8.0 | Φολικό οξύ (mg) | NAI |
| Κάλιο(mg) | 712.0 | Νιασίνη (mg) | 0.80 |
| Ασβέστιο (mg) | 8.0 | Καφεΐνη (mg) | 0.00 |
| Σίδηρος (mg) | 0.8 | Αλκοόλη (Θερμίδες) | 0.0 |
| Ψευδάργυρος (mg) | 0.3 | | |

Πιο συγκεκριμένα, ο χυμός του ροδιού αποτελείται κατά 85% από νερό, 10% σάκχαρα όπως γλυκόζη, σουκρόζη και φρουκτόζη, 1,5% από πηκτίνη.



Εικόνα 11: Τα σάκχαρα που περιέχονται στον χυμό του ροδιού

1.8.α. Η καλλιέργεια της ροδιάς

Το φυτό της Ροδιάς υπάρχει από τα αρχαία χρόνια, το συναντούμε σε πολλές αναφορές ανά περιοχές, όχι μόνο σαν βρώσιμο φυτό αλλά και για τις θεραπευτικές ιδιότητες των καρπών. Ως χώρα προέλευσης του ροδιού θεωρείται η κεντρική Ασία, χάρη στην καλή προσαρμοστικότητα του ροδιού σε διαφορετικά κλίματα και εδάφη, πλέον η καλλιέργεια του έχει επεκταθεί σε πολλές περιοχές όπως Νότια Αμερική, Αφρική και Αυστραλία.

Θεωρείτε το αρχαιότερο καλλιεργούμενο καρποφόρο δέντρο. Άγρια φυτά ροδιάς συναντούμε στην κεντρική Ασία, από το Ιράν μέχρι την Β. Ινδία. υπολογίζεται ότι η καλλιέργεια ροδιάς ξεκίνησε κάπου στην νεολιθική εποχή βάση ευρημάτων, (ινδούς κείμενο). Η χρήση του ροδιού στα αρχαία χρόνια μαρτυράτε από αναφορές σε κειμήλια και γραφές, σε Αίγυπτο, Ισραήλ, Αρμενία Μεσοποταμία.



Εικόνα 12 Περιδέραιο με χρυσά περίαπτα ρόδια στον τάφο III στις Μυκήνες, Ταφικός κύκλος A, 16ος αιώνας, Αθήνα, Εθνικό Αρχαιολογικό Μουσείο

Ανήκει στην οικογένεια Lythraceae, τάξη Myrtales, γένος *Punica* με είδη *Punica granatum* L. και Η ροδιά είναι δεικνύουσα θάμνος με γρήγορη ανάπτυξη όπου με κατάλληλο κλάδεμα διαμορφώνεται σε μικρό δέντρο ύψους 5-7 μέτρων, είναι φυλλοβόλο, αν και έχουν εντοπιστεί ποικιλίες αειθαλών φυτών στην Ινδία. Ο κορμός διακλαδίζεται από χαμηλά σχηματίζοντας πυκνή κόμη, τα φύλλα είναι μικρά, λεία με πυκνή και αντίθετη διάταξη, λογχοειδούς σχήματος.

Οι οφθαλμοί της ροδιάς διακρίνονται σε βλαστοφόρους και μικτούς, οι βλαστοφόροι εκπύσσονται την άνοιξη και δίνουν είτε κανονική βλάστηση είτε λογχοειδή, οι μικτοί εκπύσσονται τον Μάιο και δίνουν βραχεία βλάστηση, συνήθως χωρίς φύλλα και άνθη που βρίσκονται επάκρια.

Τα άνθη έχουν λευκό, κόκκινο ή κίτρινο χρώμα ανάλογα με την ποικιλία στην οποία ανήκουν, εκπύσσονται στην μασχάλη των βλαστών ή σε ομάδες (3-7 άνθη) στις κορυφές των κλαδίσκων, η έκπτυξη τους γίνεται μετά αυτή των φύλλων, από τον Μάιο έως τον Ιούνιο ανάλογα την ποικιλία. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα μακρόστυλα ή

αλλιώς ερμαφρόδιτα άνθη και τα βραχύστευλα ή αλλιώς άγονα άνθη. Η ανθοφορία της ροδιάς πραγματοποιείται σε στάδια ανθίσεων, το πρώτο στάδιο παρουσιάζει και το μεγαλύτερο ποσοστό καρπόδεσης αλλά και καλύτερης ποιότητας καρπούς, με διάρκεια από 8 έως 10 εβδομάδες.

Τα ρόδια σχηματίζονται στην κορυφή των βλαστών, ο καρπός είναι ράγα, με διάμετρο 5 έως 8 εκατοστά, με μέσο βάρος 200-400 γραμμάρια, εσωτερικά χωρίζεται συνήθως σε 9 χώρους με λεύκα τοιχώματα επάνω στα οποία προσφύονται πολυάριθμα καρπίδια που περιέχουν το σπέρμα. Η καρποφορία της ροδιάς αρχίζει από το τρίτο με τέταρτο έτος μετά την εγκατάσταση του σπρωώνα, και φτάνει σε πλήρη παραγωγή μετά το έβδομο με όγδοο έτος με παραγωγή 2,5 με 3,5 τόνους ανά στρέμμα. Η ωρίμανση των καρπών γίνεται κατά τον Αύγουστο με Οκτώβρη ανάλογα την ποικιλία. Η απόδοση ελαττώνεται βαθμιαία μετά το 25^ο με 30^ο έτος της ηλικίας των δέντρων.

1.8.β. Εδώδιμες ποικιλίες ροδιάς

Εγχώριες ποικιλίες (πληθυσμοί)

Κατάταξη ανά περιεκτικότητα σακχάρων –οξέων. Από τους εγχώριους πληθυσμούς της ροδιάς που υπάρχουν στην χώρα μας, έχει γίνει επιλογή περίπου 40 γενοτύπων οι οποίοι έχουν φυτευτεί κατά καιρούς σε πειραματικές φυτείες σε αρκετά ινστιτούτα ανά την χώρα μας οι οποίες αξιολογούνται και περιγράφονται τα τελευταία χρόνια εκτενέστερα. Οι ποικιλίες της ροδιάς ανάλογα με ορισμένα κριτήρια διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια είναι αυτό των οξέων σύμφωνα με το οποίο μπορούμε να διαχωρίσουμε τρεις υποκατηγορίες

Γλυκές ποικιλίες: είναι αυτές στις οποίες η περιεκτικότητα σε οξέα είναι κατώτερη από 0,9%.

- Πολίτικη: ο καρπός της είναι μετρίου μεγέθους με βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 600-900g. Η επιδερμίδα είναι λεπτή, πρασινωπή ή ελαφρώς κιτρινωπή. Οι σπόροι είναι κόκκινοι σαρκώδεις με ιδιαίτερα γλυκιά γεύση. Πρόκειται για ποικιλία με ποιοτικούς καρπούς που δυστυχώς δεν έχουν μεγάλη μετασυλλεκτική διάρκεια ζωής.
- Καραβέλος: ο καρπός είναι μεγάλου μεγέθους με βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 600-900g. Η επιδερμίδα είναι πρασινωπή προς ρόδινη, οι σπόροι είναι μεγάλοι

σαρκώδεις με ανοιχτό πορφυρό χρώμα και γλυκιά γεύση. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της είναι η μεγάλη μετασυλλεκτική διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Ημίγλυκες ποικιλίες: οι ποικιλίες που χαρακτηρίζονται ως ημίγλυκες είναι εκείνες στις οποίες η περιεκτικότητα του χυμού τους σε οξέα είναι μεταξύ 0,9 –1,8%.

Ξινές ποικιλίες: οι ποικιλίες που χαρακτηρίζονται ως ξινές είναι εκείνες στις οποίες η περιεκτικότητα του χυμού τους σε οξέα είναι μεγαλύτερη από 1,8%. Οι ροδιές αυτές ξεχωρίζουν από τα μονήρη και μεγάλα άνθη τους. Οι κυριότερες από αυτήν την κατηγορία στην Ελλάδα είναι οι εξής:

- Τα λειφάνια: η ποικιλία αυτή χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλους καρπούς, με φλοιό πολύ λεπτό, ερυθρό ρόδινο χρωματισμό και σπόρους μετρίου μεγέθους. Έχει το μειονέκτημα ότι οι καρποί της δεν μπορούν να συντηρηθούν για πολύ χρόνο.
- Τα τσιπορόδια: οι καρποί αυτής της ποικιλίας είναι μετρίου μεγέθους. Ο φλοιός τους είναι λεπτός με βαθύ κόκκινο χρώμα. Οι σπόροι των ροδιών της είναι ογκώδεις με ξανθό χρώμα και οι οποίοι αποκτούν ελαφρά γλυκιά γεύση με την πρόοδο της ωρίμανσης.
- Τα χονδρορόδια: οι καρποί της είναι πολύ μεγάλοι με χονδρό κόκκινο φλοιό. Οι σπόροι της είναι μετρίου μεγέθους η γεύση τους είναι χαρακτηριστικά γλυκόξινη.
- Τα κρασορόδια: έχουν μικρό έως μέτριο μέγεθος οι καρποί τους, με φλοιό λεπτό και πολύ ερυθρό που έχει όμως το μειονέκτημα να σχίζεται εύκολα. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό μειονέκτημα αυτής της ποικιλίας. Οι σπόροι της είναι κόκκινοι, οι δε καρποί της, δεν διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Οι γούνες: οι καρποί της έχουν μικρό έως μέτριο μέγεθος, χαρακτηρίζονται από χονδρό φλοιό από χονδρό φλοιό αλλά με μαλακή υφή και πολύ βαθύ κόκκινο χρώμα στα σημεία που τους χτυπούν οι ακτίνες του ηλίου. Οι σπόροι των καρπών της έχουν πολύ κόκκινο χρώμα.
- Τα ξινορόδια: οι καρποί της ποικιλίας αυτής είναι μικροί με χονδρό και πολύ κόκκινο φλοιό.

Κατάταξη ανά περιοχή προέλευσης

Ένας άλλος τρόπος διάκρισης των κατηγοριών τη ροδιάς, είναι σύμφωνα με τον τόπο προελεύσεως τους. Στην Ελλάδα οι εντόπιες ποικιλίες συνηθίζουν να παίρνουν το όνομα της περιοχής στην οποία καλλιεργούνται. Οι κυριότερες ποικιλίες αυτής της κατηγορίας είναι:

- Ερμιόνης: Ποικιλία μεγαλόκαρπη, με έντονο κόκκινο χρωματισμό και γλυκιά γεύση. Πολύ αξιόλογη ποικιλία που καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια στη περιοχή της Ερμιόνης αλλά και αλλού. Με ρόδια αυτής της ποικιλίας τροφοδοτείται κυρίως η αγορά των Αθηνών.
- Γλυκιά Πατρών: Η ποικιλία αυτή ωριμάζει κατά τους μήνες Αύγουστο με Σεπτέμβριο. Είναι ποικιλία που έχει πολύ ογκώδεις καρπούς με χρωματιστό περίβλημα και σπόρους μικρούς με υπέροχη γεύση
- Ξινή Πατρών: Ωριμάζει τον Οκτώβριο. Έχει καρπούς πολύ ογκώδεις, με λεπτό, σκληρό χρωματιστό περίβλημα. Οι σπόροι της είναι πολύ κόκκινοι με ξινή γεύση. Η ποικιλία αυτή είναι κατάλληλη για παραγωγή χυμού και γρεναδίνης.
- Τανάγρας: Ωριμάζει τον Οκτώβριο μήνα. Έχει καρπούς ογκώδεις, με χρωματιστό και χονδρό περίβλημα. Οι σπόροι της είναι κόκκινοι. Η ποικιλία αυτή θεωρείται σαν μια πολύ παραγωγική και προσαρμοζόμενη σε διάφορα περιβάλλοντα ποικιλία.
- Χίου: η ποικιλία αυτή ωριμάζει τον Οκτώβριο μήνα. Έχει καρπούς ογκώδεις με χρωματιστό περίβλημα. Οι σπόροι της είναι μικροί κόκκινοι και χυμώδεις. Η ροδιά αυτή θεωρείται σαν μία πολύ καλή εμπορική ποικιλία.

Στην Ελλάδα όπως αναφέρθηκε εξαρχής δεν υπάρχουν καθαρές ποικιλίες ροδιάς αλλά αυτές που έχουν καταγραφεί είναι στην ουσία πληθυσμοί. Αυτό συμβαίνει διότι η σταυρογονιμοποίηση είναι εφικτή ανάμεσα στα δένδρα επομένως σε βάθος χρόνου έχουν δημιουργηθεί ομάδες γενοτύπων με πολλά κοινά χαρακτηριστικά όπου έχουν δώσει αυτούς τους πληθυσμούς. Μέσα από συστηματική μελέτη όπως συμβαίνει στο Ινστιτούτο φυλλοβόλων δένδρων της Νάουσας έχουν καταφέρει να απομονώσουν ορισμένους αξιόλογους γενοτύπους οι οποίοι είναι οι εξής:

- **11010:** Μικρό μέγεθος καρπού (245 γρ.) με εντυπωσιακό κόκκινο χρώμα. Τα γίγαρτα είναι μέσης σκληρότητας. Ο χυμός είναι γλυκός και έχει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Το δένδρο έχει σχετικά υψηλή αντοχή σε παγετό.
- **11015:** Μικρό μέγεθος καρπού (273 γρ.) με εντυπωσιακό κόκκινο χρώμα και υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα γίγαρτα είναι μέσης σκληρότητας.
- **11041:** Πολύ μεγάλο μέγεθος καρπού (403 γρ.), ωραίο κόκκινο χρωματισμό, αντοχή σε παγετό αλλά είναι ξινό (2,4% οξέα). Τα γίγαρτα είναι μέσης σκληρότητας. Ο τελευταίος είναι κατάλληλος για την παραγωγή χυμού και την καλλιέργεια σε βορειότερα σημεία της χώρας μας που εγκυμονούν κινδύνους παγετό

Κυπριακές ποικιλίες

Οι ποικιλίες που παραδοσιακά καλλιεργούνται στην Κύπρο είναι οι εξής:

- Η Πρασινόφυλλη: η ροδιά αυτή έχει μεγάλους καρπούς που χαρακτηρίζονται από τον παχύ φλοιό τους και τους μεγάλους σπόρους.
- Το Αρσινάκι: Η ποικιλία αυτή είναι υπερπρώιμη με χαρακτηριστικούς μικρού μεγέθους καρπούς
- Η Ζαΐτικη ή Κουφοροδιά: Είναι πρώιμη ποικιλία που δίνει μεγάλους καρπούς οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την λεπτή φλούδα που έχουν. Οι σπόροι των καρπών της είναι μεγάλοι, χυμώδεις με μικρά, μαλακά ατροφικά σπέρματα. Στην πραγματικότητα είναι τόσο ατροφικά που μοιάζει να μην έχει καθόλου σπέρματα.
- Η Μαϊχάσιμη: Όψιμη ποικιλία όχι τόσο διαδεδομένη

ΞΕΝΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

- **Wonderful** είναι η πιο διαδεδομένη. Προέρχεται από την Φλόριντα των ΗΠΑ. Παράγει καρπούς μεγάλου μεγέθους χαρακτηριστικά πεπλατυσμένους. Έχουν ερυθροϊώδες χρώμα και περικάρπιο μετρίου πάχους. Τα σπέρματα αυτής της ποικιλίας είναι μέτριας σκληρότητας, κόκκινα και με χυμό πολύ καλής ποιότητας. Τα δένδρα αυτής της ποικιλίας είναι πολύ ζυγηρά και παραγωγικά. Φτάνουν σε ύψος τα 6 μέτρα. Τα ρόδια της ποικιλίας Wonderful ωριμάζουν στα τέλη Σεπτεμβρίου. Η ποικιλία αυτή

προσαρμόζεται σε διάφορα περιβάλλοντα και γι' αυτό καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου.



Εικόνα 13: Ποικιλία δέντρων Wonderful

- **Granada**, η οποία προήλθε από την ποικιλία Wonderful μέσα από γενετική επιλογή αλλά ωριμάζει ένα μήνα νωρίτερα από εκείνη. Ο καρπός της είναι μεγάλος με χονδρό και σκληρό περικάρπιο έντονου κόκκινου χρώματος . Ο τόπος προέλευσης της ποικιλίας είναι η Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Τα άνθη της έχουν βαθύ κόκκινο χρώμα όπως και τα σπόρια της. Πρόκειται για ιδιαίτερα χυμώδεις καρπούς με ιδιαίτερη γεύση όπως αυτή του κρασιού. Τα σπέρματα δεν είναι ιδιαίτερα σκληρά. Η ποικιλία αυτή είναι πολύ παραγωγική. Χαρακτηριστικό είναι δε ότι χρησιμοποιείται και στην κηποτεχνία.
- **Angel Red** είναι μία πρόσφατη ποικιλία ροδιάς. Έχει αρχίσει να γίνεται δημοφιλής τα τελευταία χρόνια. Τα ρόδια που παράγει ωριμάζουν τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρίου, νωρίτερα δηλαδή από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Πρόκειται για ιδιαίτερα παραγωγική ποικιλία. Ο καρπός έχει ένα φωτεινό κόκκινο χρώμα και είναι πολύ χυμώδης. Μάλιστα τα ρόδια αυτής της ποικιλίας προτιμούνται για την παραγωγή χυμού. Ένα ακόμη πλεονέκτημα που έχει είναι ότι τα καρπίδια είναι συνήθως μαλακά, έχουν γλυκιά γεύση και μπορούν να καταναλωθούν
- **Sweet**: Έχει καρπό με περικάρπιο ανοιχτού χρώματος που παραμένει πρασινοκόκκινος. Ο χυμός αυτής της ποικιλίας έχει ρόδινο χρώμα και πολύ γλυκιά γεύση. Είναι πολύ παραγωγικό δένδρο. Η ποικιλία αυτή χρησιμοποιείται επίσης πολύ στην κηποτεχνία επειδή είναι ιδιαίτερα καλλωπιστική. Το ύψος του δέντρου φτάνει τα 4

μέτρα. Ωριμάζει νωρίς τον Σεπτέμβριο πριν την Wonderful. Μέγιστο ύψος και διάμετρος κόμης είναι τα 4 μέτρα. Αναπτύσσεται καλά σε αλκαλικά εδάφη όπου άλλες ποικιλίες δεν θα ευδοκίμουν.

- **Fleshman:** Μεγάλοι στρόγγυλοι καρποί μεγάλης διαμέτρου 7,5 cm, οι οποίοι είναι ρόδινοι εσωτερικά και εξωτερικά. Η ποικιλία αυτή παράγει καρπούς καλής ποιότητας με μαλακούς σπόρους και γλυκιά γεύση.
- **Utah sweet:** Πολύ γλυκείς καρποί πολύ καλής ποιότητας. η επιδερμίδα και τα καρπίδια κατά την ωρίμανση τους αποκτούν ρόδινο χρώμα. Τα σπέρματα είναι πιο μαλακά από αυτά της Wonderful αλλά και από άλλες ποικιλίες. Παράγει πολύ όμορφα ρόδινα πορτοκαλί άνθη.
- **Desertnyi:** Προέρχεται από το Τουρμεκιστάν. Ο χυμός των καρπών της συγκεκριμένης ποικιλίας θυμίζει την γεύση του πορτοκαλιού κάτι που την ξεχωρίζει από όλες τις άλλες ποικιλίες που υπάρχουν. Το πορτοκαλόχρως περικάρπιο της (εικόνα 10) έρχεται σε αντίθεση με το βαθύ ερυθρό χρώμα των καρπιδίων της, τα οποία αναδύουν επίσης άρωμα εσπεριδοειδούς ιδιαίτερα κατά την κατανάλωση τους. Η γεύση τους είναι γλυκώξινη και τα σπέρματα μαλακά.
- **Francis:** Παραγωγική ποικιλία με καρπούς πολύ γλυκιάς γεύσης. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι ανθεκτική στο σχίσσιμο. Ο καρπός της αποκτά ελαφρά ρόδινο χρώμα.
- **Early wonderful:** Καρποί μεγάλοι με βαθύ κόκκινο χρώμα και λεπτή επιδερμίδα. Παράγει καρπούς άριστης γεύσης. Ωριμάζει 2 εβδομάδες νωρίτερα από την ποικιλία Wonderful. Παράγει πολυάριθμα ρόδινα –πορτοκαλί άνθη και πρόκειται για μία πολύ παραγωγική ποικιλία.
- **Acco:** Πρόκειται για μια Ισραηλινή ποικιλία. Είναι πρώιμη καθώς ωριμάζει τέλη Αυγούστου έως το πρώτο δεκαπενθήμερο του Σεπτεμβρίου. Έχει γλυκιά γεύση και ο καρπός είναι κόκκινος τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά. Ο καρπός της προορίζεται για νωπή κατανάλωση και είναι ιδιαίτερα ελκυστικός όχι μόνο εμφανισιακά αλλά και στο εμπόριο λόγω της μεγάλης σχετικά αντοχής του στην αγορά (3 –4 εβδομάδες).

- **Green globe:** Και αυτή η ποικιλία προέρχεται από την Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Ο καρπός είναι μεγάλος γλυκιάς γεύσεως και χαρακτηριστικά αρωματικός. Το χρώμα του φλοιού είναι πράσινο. Η ποικιλία αυτή μας δίνει καρπούς άριστης ποιότητας.
- **Spanish–Rudy:** Η ποικιλία αυτή ωριμάζει τον Οκτώβριο. Οι καρποί της είναι σφαιρικοί, μέτριου μεγέθους, με περικάρπιο έντονου κόκκινου χρώματος. Οι σπόροι της είναι κόκκινοι, γλυκείς, με αρωματική σάρκα, με σχετικά μαλακά σπέρματα αλλά γενικότερα μέτριας ποιότητας. Η ποικιλία αυτή είναι ιδιαίτερα παραγωγική και ανθεκτική σε διάφορα περιβάλλοντα.
- **Paper shell:** Ωριμάζει τον Σεπτέμβριο με Οκτώβριο. Οι καρποί της είναι μεγάλοι, ερυθροί, οι σπόροι της είναι μικροί αρωματικοί με πολύ γλυκιά γεύση. Η ποικιλία αυτή είναι ανθεκτική σε διάφορα περιβάλλοντα και ιδιαίτερα παραγωγική
- **Balegal:** Προέρχεται από την Καλιφόρνια. Ο καρπός της είναι στρόγγυλος μετρίου μεγέθους. Χαρακτηριστικό είναι το ροζ χρώμα του περικαρπίου των καρπών της

1.9. ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΟΔΙΟΥ

Τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερες έρευνες πραγματοποιούνται σχετικά με το ρόδι και την αντιοξειδωτική του δράση, καθώς αποτελεί την βάση για την αντιμετώπιση πολλών παθήσεων όπως αρτηριοσκλήρωση, διαβήτης, καρκίνος (Lansky, 2007.) Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών βρίσκεται στα φύλλα του φυτού της ροδιάς, στον χυμό, στα σπέρματα και στο περικάρπιο. Έχει αναφερθεί πως ο χυμός του ροδιού και το υδατικό εκχύλισμα από τα φύλλα μπορούν να εξουδετερώσουν αποτελεσματικά τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, σουπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου και νιτρικά (NO), αλλά και συγκριτικά με εκχυλίσματα από τα υπόλοιπα φρούτα – λαχανικά που εμφανίζουν αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά (Halvorsen et al. 2002, Xu et al. 2005, Gurpreet, 2006, Guo, 2007). Παράλληλα έρευνες, έδειξαν ότι ο χυμός του ροδιού αναστέλλει την παραγωγή oxLDL σε in vitro πειράματα (Fuhrman and Aviram, 2001) και μειώνει δραστικά τα επίπεδα oxLDL σε ποντίκια σε in vivo πειράματα (Χυ, 2005). Μελέτες έδειξαν πως η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο ρόδι ήταν ανάλογη με την περιεκτικότητά του σε και φαινολικά συστατικά (Surveswaran, 2007). Οι ταννίνες δείχνουν να είναι τα συστατικά με την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, τις συναντούμε σχεδόν σε όλα τα μέρη του φυτού της ροδιάς. Έχουν την ικανότητα να παρέχουν πρωτόνια μετασχηματίζοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες σε πιο σταθερές μορφές, κάτι το οποίο τις καθιστά ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις. Το ελλαγικό οξύ επίσης

αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες και θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό ενάντια στην λιπιδική υπεροξειδωση στα μιτοχόνδρια (Oswa, 1987.). Η πουνικαλαγίνη θεωρείται το βασικότερο αντιοξειδωτικό συστατικό στο ρόδι, βρίσκεται στο περικάρπιο και στον χυμό, παρέχοντας ηλεκτρόνια με σκοπό την εξουδετέρωση των ριζών που προήλθαν από την λιπιδική υπεροξειδωση (Anand, 2004). Τα φλαβονοειδή επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του ροδιού. Αντικαρκινικές ιδιότητες εμφάνισαν οι πολυφαινόλες από χυμό ροδιού σε εργαστηριακά πειράματα σε καρκινικά κύτταρα μαστού, πιο συγκεκριμένα, αποτέλεσμα της δράσης των πολυφαινολών ήταν ο περιορισμός του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μαστού αλλά και η παράλληλη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Toi M, 2003), επίσης θετικά αποτελέσματα είχαν οι επιδράσεις πολυφαινολών από εκχυλίσματα ροδιού σαν χημειοπροστατευτικά σε πειράματα που έγιναν σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα .

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σε προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου μας μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση διαφόρων εκχυλισμάτων ροδιού *in vitro* και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διάφορα εκχυλίσματα είχαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι τέθηκε η υπόθεση εάν ο χυμός ροδιού πλούσιος σε πολυφαινόλες είχε την ικανότητα να επηρεάσει τους δείκτες οξειδωτικού στρες σε ανθρώπους.

Σκοπός, λοιπόν, της διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετήσει τις επιδράσεις της χορήγησης φυσικού χυμού ροδιού για 15 ημέρες σε ανθρώπους. Ο χυμός χορηγήθηκε κάθε ημέρα σε 2 δόσεις των 250ml με σκοπό να μελετηθούν 5 δείκτες οξειδωτικού στρες πριν και μετά το διάστημα χορήγησης, καθώς και αφού περάσει ένα διάστημα από την διακοπή της λήψης του χυμού.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πειραματικό Πρωτόκολλο

Στην παρούσα μελέτη, συμμετείχαν 14 υγιή εθελοντές, οι οποίοι δεν έκανα χρήση φαρμακευτικής αγωγής ή άλλων συμπληρωμάτων διατροφής. Κατανάλωσαν μισό λίτρο φυσικό χυμό ρόδι καθημερινά για 15 ημέρες. Ο χυμός που καταναλώθηκε ήταν της εταιρείας 'VITOM Αφοι Χριστοδούλου'. Στη συνέχεια ακολούθησαν 4 δειγματοληψίες αίματος τις εξής χρονικές στιγμές :

- Πριν την έναρξη της λήψης του χυμού
- Αμέσως μετά τη διακοπή της λήψης χυμού (16^η ημέρα)
- Έπειτα από μια βδομάδα μετά τη διακοπή της λήψης χυμού (23^η ημέρα)
- Έπειτα από τρεις βδομάδες μετά τη διακοπή της λήψης χυμού (37^η ημέρα)

Στη συνέχεια έγιναν μετρήσεις των παρακάτω δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα για να διαπιστωθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού του ροδιού στον οργανισμό, κατά πόσο δηλαδή βοήθησε ο χυμός του ροδιού να ενεργοποιηθούν σημαντικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και κατά πόσο βελτιώθηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες στον οργανισμό.

Οι δείκτες που μελετήθηκαν:

Στα ερυθροκύτταρα:

- Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)
- Η δραστικότητα καταλάσης (CAT)

Στο πλάσμα:

- α) Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TAC)
- β) Τα επίπεδα της μαλονικής διαλδεΰδης (MDA, δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης)
- γ) Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB, δείκτης πρωτεϊνικής οξειδωσης)

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS (one way ANOVA). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$.

3.2. Επεξεργασία του αίματος μετά από αιμοληψία

Από του εθελοντές έγινε αιμοληψία και ελήφθησαν 6ml αίματος σε σωληνάρια με EDTA. Το αίμα αμέσως φυγοκεντρήθηκε στα 1370g για 10 λεπτά με σκοπό τον διαχωρισμό του σε ερυθροκύτταρα και πλάσμα. Στη συνέχεια τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία αιμολύματος 1:1 (σε 500μl ερυθροκυττάρων προστέθηκαν 500μl νερού) για τον προσδιορισμό της GSH και της CAT. Το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Συλλογή πλάσματος και ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

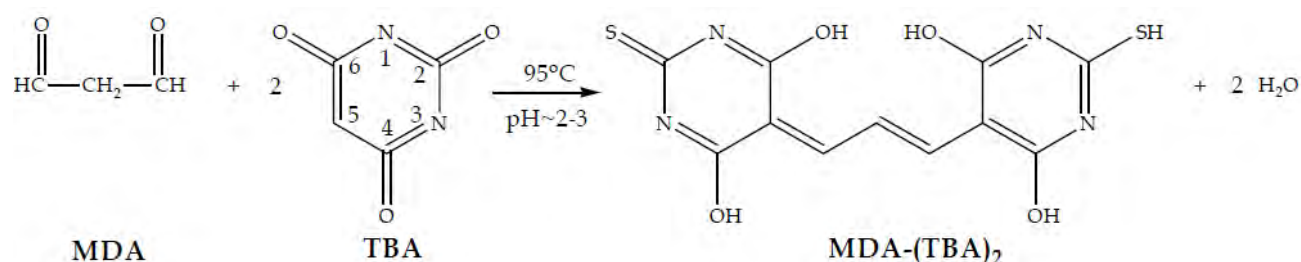
1. Συλλέγουμε το αίμα σε σωληνάρια falcon (15 mL) με 200 μL EDTA 7.5% και το ανακινούμε μερικές φορές (20 μL 7.5% EDTA για κάθε 1mL αίματος).
 2. Φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
 3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
 4. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
 5. Ανακινούμε βίαια.
 6. Φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
 7. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL).
 8. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
- Διατήρηση στους -20 °C.

3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ MDA

Κατά την οξειδωση των λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα κατά την υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προκύπτει, μαζί με άλλα προϊόντα, σαν κύριο προϊόν η μηλονική διαλδεΐδη (MDA) όπου και αποτελεί σημαντικό δείκτη στον προσδιορισμό της οξειδωσης των λιπιδίων. Η αλδεΐδη αυτή μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα τοξική, αλληλεπιδρώντας με το DNA και τις πρωτεΐνες στον οργανισμό προκαλώντας μεταλλάξεις (Del Rio et al., 2005), όπως και να προκαλέσει αντιδράσεις μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών καταλήγοντας έτσι σε δημιουργία καρκίνου. Σε έρευνες που έγιναν σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, του στήθους, του τραχήλου της μήτρας και του στομάχου, έδειξαν αυξημένα επίπεδα MDA (Gonenc, 2001; Kolanjiapan, 2002; Bakan,

2002). Όπως και αυξημένα επίπεδα MDA εμφάνισαν και οι ασθενείς με την νόσο Alzheimer και ασθενείς με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη, ασθένειες οι οποίες έχουν σχετιστεί στενά με αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Ο προσδιορισμός της MDA πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), με την δημιουργία συμπλόκου MDA – TBA₂ με χαρακτηριστικό έντονο ρόζ χρώμα. Η μέθοδος του θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBARS) βασίζεται στην αντίδραση 1 μορίου μηλονικής διαλδεϋδης με 2 μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέως.



Εικόνα 14: Αντίδραση της MDA με το TBA και σχηματισμός συμπλόκου MDA-TBA₂

Πειραματική διαδικασία υπολογισμού MDA

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)

MB (Tris): 121.14

MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]

Για να φτιάξουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.*

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxymethylaminomethane). Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144.1

MB (Na₂SO₄): 142.04

[Οδηγίες για παρασκευή 10 mL διαλύματος. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος]. Ζυγίζουμε 2.84 g Na_2SO_4 και 0.08 gθειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως.

TCA 35%: Ζυγίζουμε 35 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

TCA 70%: Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

- 1) Σε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon προσθέτουμε 100μL πλάσμα για τα δείγματα και απεσταγμένο νερό για το τυφλό
- 2) Προσθέτουμε 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl και αναδεύουμε
- 3) Επιδιώκουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 4) Προσθέτουμε 1 ml Na_2SO_4 – TBA και επιδιώκουμε στους 95°C για 45 λεπτά στο υδατόλουτρο
- 5) Μεταφέρουμε τους σωλήνες Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 λεπτά
- 6) Προσθέτουμε 1ml TCA 70% και αναδεύουμε
- 7) Μεταφέρουμε 1 ml σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200g (10000rpm) στους 25°C για 3 λεπτά
- 8) Μεταφέρουμε με πιπέτα 900μl από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0,156 \times 31$, όπου 31 ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100μL) με τον όγκο του πλάσματος (100μL) ($3100/100 = 31$). Το 0,156 προέρχεται από τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης (ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L) της MDA που είναι 156000 mol/L διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει εκτός από το πλάσμα και στο αιρυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Η ποσότητα αιμόλυματος που χρησιμοποιείται είναι όση και αυτή του πλάσματος (πχ 100μL). Τα βήματα της μεθόδου παραμένουν τα ίδια, η μόνη διαφορά είναι στους υπολογισμούς της συγκέντρωσης των TBARS στα ερυθροκύτταρα. Οι υπολογισμοί είναι οι ακόλουθοι :

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0,156 \times 31 \times 2$, όπου 31 ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (100 μL) ($3100/100 = 31$) και το 2 προκύπτει από την 1:1 λύση των αιρυθροκυττάρων με απιονισμένο νερό. Το 0,156 προέρχεται από τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 mol/L διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των TBARS εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με την βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με την συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως ($\mu\text{mol/L}$). Έτσι μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL . Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά την λύση των ερυθροκυττάρων.

3.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένα αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Καρβονύλια μπορούν να παραχθούν και από οξειδωση λιπιδίων και νουκλεϊνικών οξέων

και ο σίδηρος παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τους. Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται δεν επανέρχονται στην πρωταρχική μορφή τους και χάνουν την φυσιολογική λειτουργία τους.

Πειραματική διαδικασία υπολογισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl 2.5 N

HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

DNPH 14 mM (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

- 1) Σε eppendorfs προσθέτουμε 50 μL πλάσματος και 50 μL TCA 20%, και αναδεύουμε στο Vortex, προσέχουμε κάθε δείγμα να έχει και το τυφλό του (το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από DNPH 0,5 mL το οποίο αντικαθιστάται από 0,5 mL HCl 2.5N). Το TCA 20% προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA χρησιμοποιείται ευρέως στην βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA, και RNA
- 2) Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C
- 3) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 4) Προσθέτουμε στο ίζημα στα δείγματά μας 0,5 mL DNPH 14mM (διαλυμένο σε 2,5N HCl) και 0,5 2,5N HCl στα τυφλά, στη συνέχεια διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο Vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C

- 5) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 6) Προσθέτουμε 1 mL TCA 10%, αναδεύουμε και διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα εάν χρειάζεται και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C
- 7) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 8) Προσθέτουμε 0,5 mL αιθανόλης και 0,5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος 1:1 v/v), αναδεύουμε στο Vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα πλένεται με TCA 10% και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει
- 9) Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμη φορές
- 10) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- 11) Προσθέτουμε 1 mL ουρία pH 2.3, αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς, αυξάνοντας την διαλυτότητά τους
- 12) Φυγοκεντρούμε στα 15000g για 3 λεπτά στους 4°C
- 13) Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 μL σε μια κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0,022 \times 1000/50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22\text{mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα/50 μL δείγματος)

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης :

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg) = συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων nmol/mL / συγκέντρωση πρωτεϊνών mg/mL. Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70mg/mL.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει εκτός από το πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι στην ποσότητα του αιμόλυματος που χρησιμοποιείται (50μL αραιωμένα 1/10 σε αντίθεση με το πλάσμα που δεν γίνεται αραίωση) και στους υπολογισμούς της συγκέντρωσης των καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα. Οι υπολογισμοί είναι οι ακόλουθοι:

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0,022 \times 1000/50 \times 2 \times 10$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22\text{mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα/50 μL δείγματος).

Πολλαπλασιάζουμε με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση κατά την λύση των ερυθροκυττάρων και με 10 για να συνυπολογίσουμε την 1:10 αραίωση του δείγματος.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των καρβονυλίων εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με την βοήθεια ενός kit και πρέπει να

εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να βρίσκεται σε συμφωνία με την συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως (μmol/L). Έτσι μετά την φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL . Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά την λύση των ερυθροκυττάρων . Συγκέντρωση καρβονυλίων ανά mg αιμοσφαιρίνης.

3.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

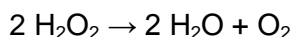
Σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο για τους αερόβιους οργανισμούς, απομακρύνει καταλυτικά τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μη-ρίζες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η παραγωγή H_2O_2 είναι αρκετά συχνή και θεωρείται ισχυρό οξειδωτικό. Η καταλάση δρα καταλυτικά μέσω της διάσπασης του H_2O_2 σε οξυγόνο και νερό:



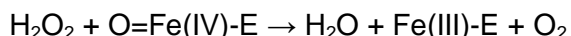
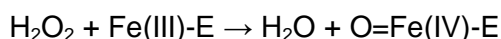
Στα ερυθροκύτταρα η καταλάση προστατεύει από την οξειδωτική δράση του H_2O_2 ως αποτέλεσμα της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης. Επειδή το H_2O_2 εύκολα, τα ερυθροκύτταρα με αυτό τον τρόπο προστατεύουν και άλλους ιστούς από οξειδωτικές βλάβες, όπως τον εγκέφαλο, την καρδιά και τους μύς του σκελετού που περιέχουν μικρότερες συγκεντρώσεις καταλάσης απ' ότι το ήπαρ.

Ένα μόριο καταλάσης είναι ικανό να διασπάσει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο πάνω από 500 αμινοξέα, με 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 , συνδέεται με το NADPH για την ελάττωση και την αποτροπή του οξειδωτικού στρες.

Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο)

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



Πειραματική διαδικασία υπολογισμού καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4)

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε πρώτα 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

| | Δείγμα |
|--------------------------------|--------------------|
| Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4 | 2991 μL |
| Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10 | 4 μL |

1. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.
2. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
3. Προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$. Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής

απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3000 / 4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως ($\mu\text{mol/L}$). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL . Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta \text{Abs (min)}$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι 16 mM .

$U = \mu\text{mol/min}$

$\Delta \text{Abs (min)}$ = οι αλλαγές στην απορρόφηση ανα λεπτό

$\Delta \text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντα μηδέν έτσι ώστε να μην χρειάζεται να μετρηθεί το τυφλό .

Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM

3.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (ΤΑC) ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Αρχή της μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της

όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

DPPH 0.1 mM, MB: 394.32

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματος, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

Ασκορβικό οξύ 10 mM είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

| | Blank | Θετικός control | Δείγμα |
|--------------------------------|--------|-----------------|--------|
| Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4 | 500 μL | 495 μL | 480 μL |
| DPPH 0.1 mM | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| Ασκορβικό Οξύ 10 mM | — | 5 μL | — |
| Πλάσμα | — | — | 20 μL |

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη.

Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$$

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος = $[(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

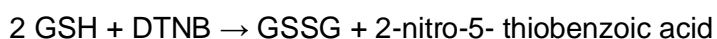
Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5$ μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH που απομακρύνθηκαν / L πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH/L..

3.7. ΑΝΗΓΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH) ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο αποτελούμενο από τρία αμινοξέα (L- γλουταμίνη, L- κυστεΐνη και γλυκίνη). Κύριος ρόλος της είναι να προστατεύει τα ερυθροκύτταρα (GSH – αναχθείσα γλουταθειόνη) με την οξειδωση της (GSSG – οξειδωμένη γλουταθειόνη), όπου μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την οξειδωση της αιμοσφαιρίνης (Fe^{2+}) σε μεθαιμοσφαιρίνη (Fe^{3+}). Η συνεχής αναγωγή της GSH σε GSSG είναι απαραίτητη, και επιτυγχάνεται με την βοήθεια του ενζύμου αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase) παρουσία του συνένζυμου NADPH όπου αποτελεί την αναχθείσα μορφή του ενζύμου NADP. Για την συνεχή αναγωγή του NADP σε NADPH είναι απαραίτητη η παρουσία του ενζύμου G6PD – glucose – 6 – phosphate dehydrogenase. Τελικός σκοπός σε όλο αυτό το μεταβολικό μονοπάτι είναι η προστασία της αιμοσφαιρίνης και των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης από οξειδωτικούς παράγοντες. Ο λόγος της ανοιγμένης γλουταθειόνης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη αποτελεί συχνό δείκτη παρουσίας οξειδωτικού στρες.

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξειδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρίεται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95)

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό

DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

Κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB:294.10

Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια Eppendorf:

| | Blank | Sample |
|---------------------------------|--------|--------|
| Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95 | 660 μL | 660 μL |
| DTNB 1 mM | 330 μL | 330 μL |
| Απεσταγμένο νερό | 20 μL | — |
| Αιμόλυμα | — | 20 μL |

Αναδεύουμε τα εppendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta Abs_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

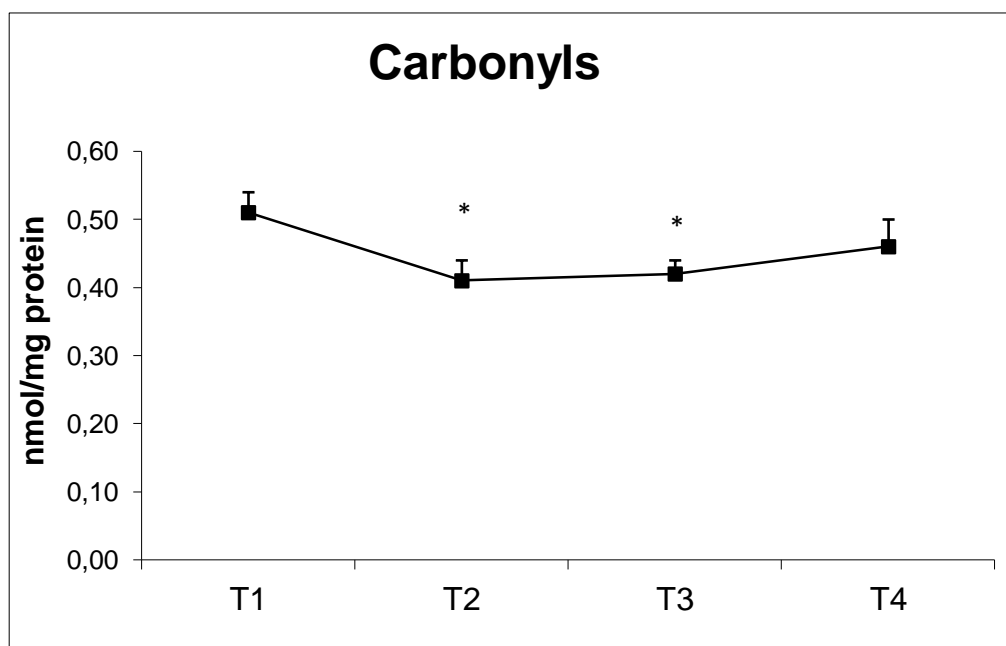
Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Συγκέντρωση GSH ανά g αιμοσφαιρίνης GSH (mmol/ g Hb)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

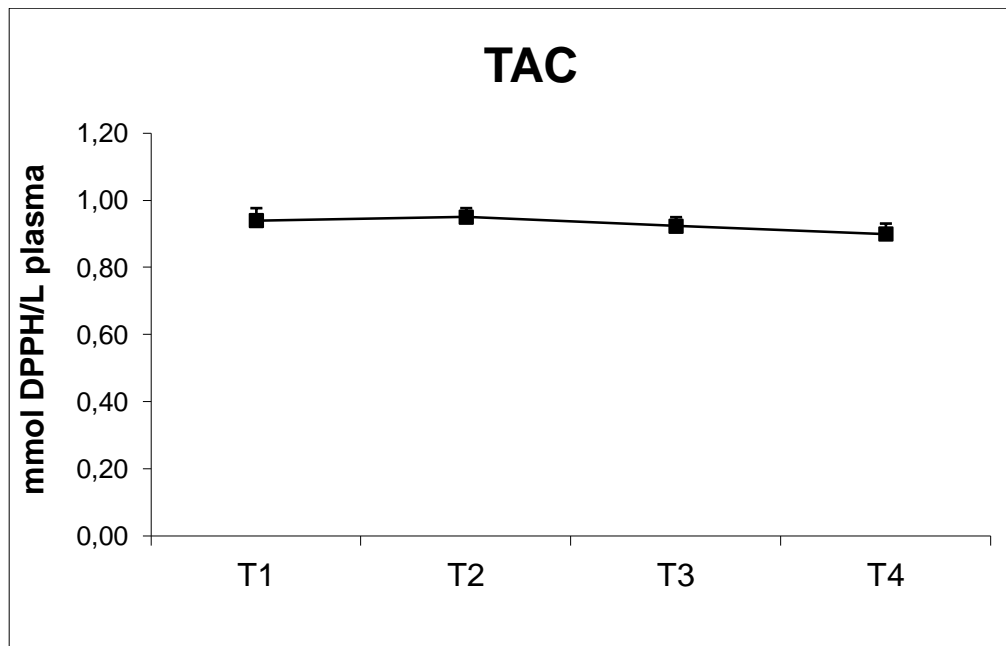
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων την χρονική στιγμή T2 (αμέσως μετά από τις 15 ημέρες λήψης χυμού) και τη χρονική στιγμή T3 (1 βδομάδα μετά την διακοπή της λήψης του χυμού).



Γράφημα 1: Η επίδραση της χορήγησης του χυμού στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν την χορήγηση ($P < 0,05$).

4.2. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα

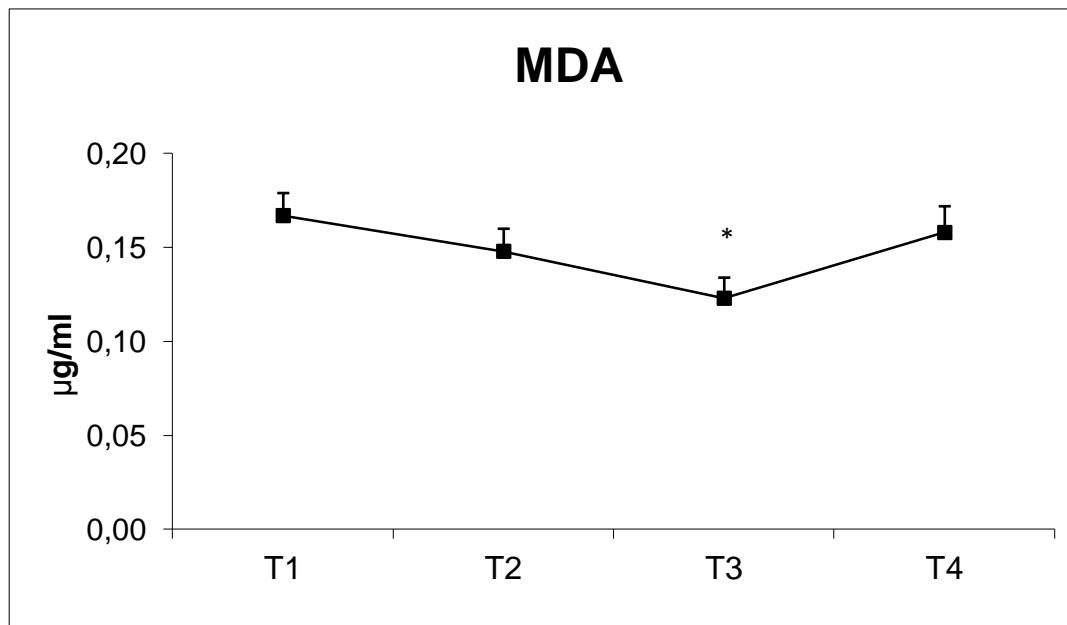
Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.



Γράφημα 2: Η επίδραση της χορήγησης του χυμού στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

4.3. MDA

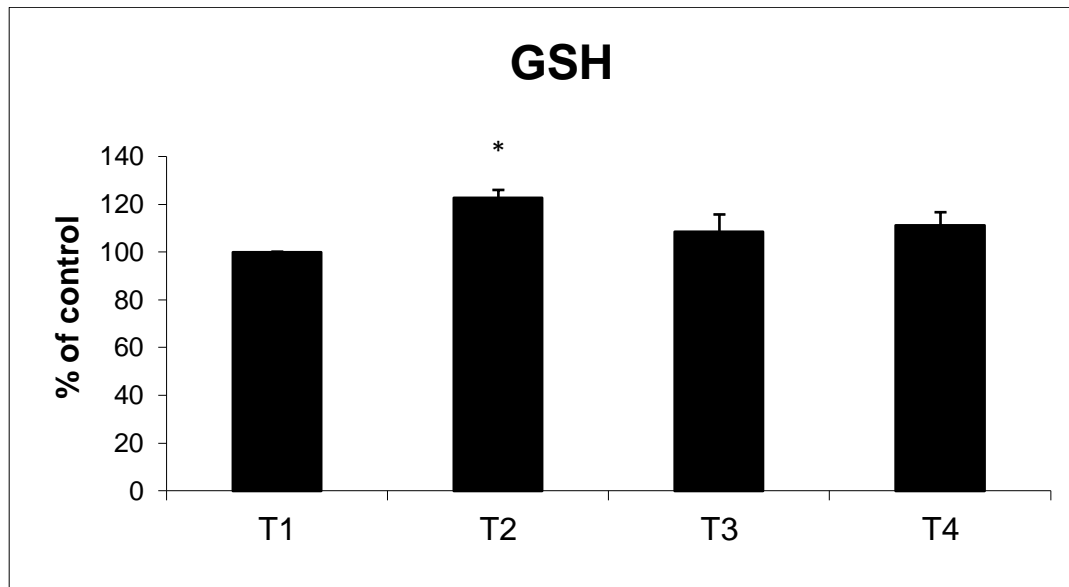
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των της MDA την χρονική στιγμή T3 (1 βδομάδα μετά την διακοπή της λήψης του χυμού).



Γράφημα 3: Η επίδραση της χορήγησης του χυμού στη συγκέντρωση της MDA. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν την χορήγηση ($P < 0,05$).

4.4. Ανηγμένη Γλουταθειόνη

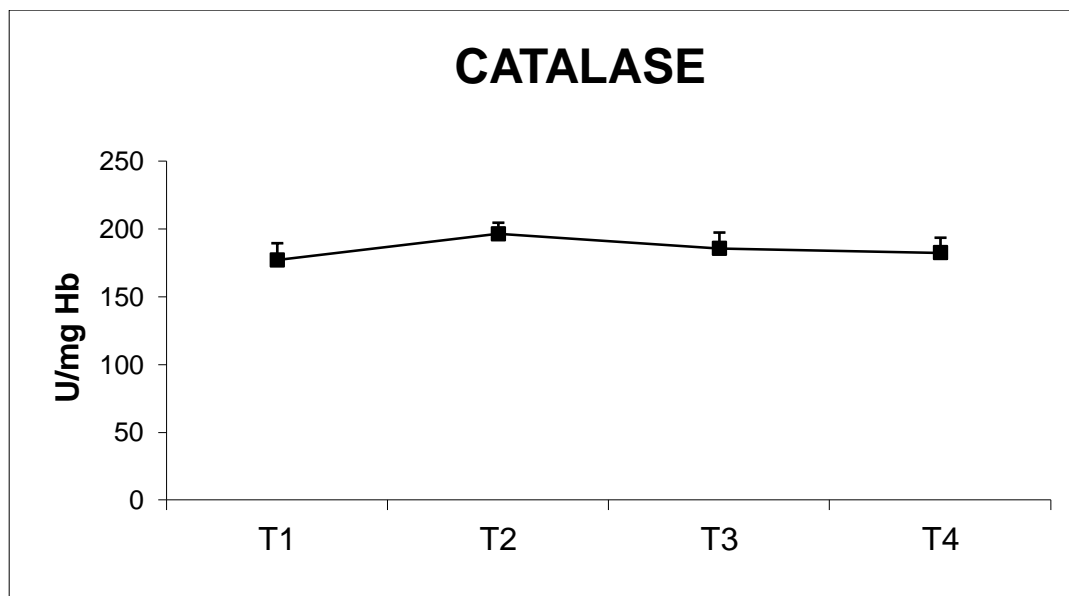
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ποσοστιαία αύξηση της GSH την χρονική στιγμή T2 (αμέσως μετά από τις 15 ημέρες λήψης χυμού).



Γράφημα 4: Η επίδραση της χορήγησης του χυμού στα επίπεδα της GSH. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν την χορήγηση ($P < 0,05$).

4.5. Καταλάση

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.



Γράφημα 5: Η επίδραση της χορήγησης του χυμού στη δραστικότητα της καταλάσης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα τη μελέτης μας έδειξαν ότι η κατανάλωση χυμού ροδιού ενισχύει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των εθελοντών που συμμετείχαν στη μελέτη και το πιο σημαντικό αποτέλεσμα είναι ότι η αντιοξειδωτική τους άμυνα ήταν αυξημένη μία εβδομάδα μετά τη διακοπή της πρόσληψης του χυμού. Ειδικότερα, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών, μειώθηκε σημαντικά τόσο αμέσως όσο και μία εβδομάδα μετά τη διακοπή της κατανάλωσης χυμού κατά 19,6% και 17,7% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα πριν από την έναρξη της κατανάλωσης χυμού. Παρόμοια με τα αποτελέσματά μας, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση χυμού ροδιού για τέσσερις εβδομάδες (Guo, 2008), ή τρεις φορές την εβδομάδα για 1 έτος (Shema-Didi, 2012) μειώθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα. Τα δεδομένα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο χυμός ροδιού έχει την ικανότητα να προστατεύει τις κυτταρικές πρωτεΐνες από οξειδωτική βλάβη. Η καλή λειτουργία των πρωτεϊνών είναι σημαντική καθώς σε πολλές παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται αλλοίωση των πρωτεϊνών.

Εκτός από τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, η κατανάλωση του χυμού μείωσε την λιπιδική υπεροξειδωση. Ειδικότερα, τα επίπεδα της MDA που αποτελούν ένα δείκτης της υπεροξειδωσης λιπιδίων, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες μία εβδομάδα μετά τη διακοπή της κατανάλωσης του χυμού σε σύγκριση με εκείνα πριν από την έναρξη της κατανάλωσής του. Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η κατανάλωση του χυμού για δύο εβδομάδες (Aviram, 2000), τέσσερις εβδομάδες (Guo, 2008), τρεις μήνες (Rosenblat, 2006), ή τρεις φορές την εβδομάδα για 1 έτος (Shema-Didi, 2012) μείωσε τη υπεροξειδωση των λιπιδίων στο πλάσμα. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια διαδικασία που δημιουργείται φυσικά, όταν δραστικά είδη οξυγόνου προσβάλουν εύκολα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης, ξεκινώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση οξειδωσης (Μυλωνάς και Κουρέτας, 1999). Η καταστροφή των λιπιδίων της μεμβράνης και των τελικών προϊόντων των αντιδράσεων υπεροξειδωσης λιπιδίων είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, και ακόμη και για τους ιστούς. Επιπλέον, η υπεροξειδωση των λιπιδίων στο πλάσμα θεωρείται ένας από τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες για την αθηρογένεση. Έτσι, η προστατευτική επίδραση του χυμού ροδιού κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων στο πλάσμα μπορεί να αποτρέψει την παθογένεση πολλών ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις (Aviram, 2000).

Επιπλέον, η κατανάλωση χυμού ροδιού αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα αμέσως μετά τη διακοπή της κατανάλωσης. Μια άλλη μελέτη ανέφερε επίσης ότι η κατανάλωση χυμού ροδιού για τρεις μήνες αύξησε τα επίπεδα της γλουταθειόνης στον ορό (Rosenblat, 2006). Η αύξηση της GSH που

προκαλείται από την κατανάλωση του χυμού είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική κατάσταση του ανθρώπινου οργανισμού, αφού GSH, ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμινικό, είναι ένα από τα πιο σημαντικά ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια, που προστατεύει τα κυτταρικά συστατικά από βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες.

Φαίνεται ότι η παρατηρούμενη αύξηση στην αντιοξειδωτική κατάσταση των εθελοντών που έλαβαν χυμό ροδιού δεν αποδίδεται στην αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης σε ερυθροκύτταρα, ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Πιθανόν κάτι τέτοιο να συνέβη λόγω της μείωσης του οξειδωτικού στρες που φαίνεται από τους άλλους δείκτες. Παρόμοια η κατανάλωση χυμού δεν επηρέασε τα επίπεδα των TAC στο πλάσμα σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο της συλλογής αίματος. Αυτό ήταν ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα, δεδομένου ότι η χορήγηση χυμού δείχνει να βελτιώνει την αντιοξειδωτική κατάσταση στο πλάσμα, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων της MDA και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Η αντιοξειδωτική δράση του χυμού του ροδιού έχει αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στο υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο του (Gil, 2000, Seeram, 2005 και Lansky, 2006). Διαφορετικές τάξεις των πολυφαινολών, όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, και στυλβένια έχουν εντοπιστεί στο χυμό ροδιού (Elfalleh, 2011). Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι οι κύριες πολυφαινολικές ενώσεις που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού ροδιού είναι τα υδροξυβενζοϊκά οξέα όπως το γαλλικό οξύ και ελλαγικό οξύ. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα παράγωγα του γαλλικού οξέος και ελλαγικού οξέος όπως οι γαλοταννίνες και ελλαγιταννίνες (π.χ. πουνικαλαγίνη), αντιστοίχως, και οι ανθοκυάνες (3-γλυκοζίτες και 3,5-γλυκοζίτες της δελφινιδίνης, κυανιδίνη, και πελαργονιδίνη), είναι επίσης υπεύθυνα για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση του χυμού ροδιού (Gil, 2000, Seeram, 2005, Lansky, 2006 και Elfalleh, 2011).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα εδώ υποστηρίζουν περαιτέρω την απόδειξη ότι η κατανάλωση του χυμού ροδιού μπορεί να ενισχύσει την αντιοξειδωτική κατάσταση στον άνθρωπο ελαττώνοντας την οξειδωτική βλάβη σε λιπίδια και πρωτεΐνες, ενώδείχθηκε επίσης ότι μπορεί να ενισχύσει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε ερυθροκύτταρα με την αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης. Επιπλέον, αυτή η μελέτη αποδεικνύει ότι ακόμη και μια εβδομάδα μετά τη διακοπή της κατανάλωσης του χυμού ροδιού μερικά από τα ευεργετικά αποτελέσματα όσον αφορά την αντιοξειδωτική κατάσταση μπορεί να εξακολουθούν να παραμένουν στον οργανισμό. Έτσι, ο χυμός ροδιού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y (2000a) High performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A* 896,87-93.
- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y (2000b) Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 891, 183-188
- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
- Anand P, Kulkarni S, Mallikarjuna A, Soundar D (2004) Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry* 87, 551-557
- Aviram, L. Dornfeld, M. Rosenblat, N. Volkova, M. Kaplan, R. Coleman. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (2000), pp. 1062–1076
- Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997, **131**:1-87)
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605
- Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry”
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.

- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15:316–328. doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.003.
- Elfalleh, N. Tlili, N. Nasri, Y. Yahia, H. Hannachi, N. Chaira. Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits *J. Food Sci.*, 76 (5) (2011), pp. C707–713
- Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993
- Fuhram B, Aviram M (2001) Flavonoid protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current opinion in Lipidology* 12, 41-48
- Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88
- Gil, F.A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, A.A. Kader. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (10) (2000), pp. 4581–4589
- Guo, J. Wei, J. Yang, J. Xu, W. Pang, Y. Jiang. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr. Res.*, 28 (2) (2008), pp. 72–77
- Gonenc A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of Clinical and Therapeutics* (2001) 26, 141-144.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*.
- Halliwell B, “Free Radicals and other reactive species in Disease”, National University of Singapore, 2001.
- Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991, 281:9-19
- Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerord H, Andersen LF, Moskaug O, Blomhoff R (2002) A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*

132, 461-471

- Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
- Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.
- Lansky EP, Newman RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177–206.
- Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7): 829-38
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727- 47.
- McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760. *Med.* 222:283-292 New York: Oxford Science Publications.
- Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13: 295-309.
- Oswa T, Ide A, Su JD (1987) Inhibiting of lipid peroxidation by ellagic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 808-812
- Patsoukis, G, Zervoudakis, N.T, Panagopoulos, C.D, Georgiou, F, Angelatou, N.A, Matsokis. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.*, 357 (2004), pp. 83–86
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.

- Seeram, L.S. Adams, S.M. Henning. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.*, 16 (2005), pp. 360–367
- Shema-Didi, S. Sela, L. Ore, G. Shapiro, R. Geron, G. Moshe. One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: a randomized placebo-controlled trial. *Free Radic. Biol. Med.*, 53 (2) (2012), pp. 297–304
- Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 indian medicinal plants. *Food Chemistry* 102, 938-953.
- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8):716 8.
- Toi M, Bando H, Ramachandran C (2003) Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. *Angiogenesis* 6, 121-128
- Xu J, Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Pang W, Jiang YG, Cheng S (2005) Intervention of antioxidant system function of aged rats by giving fruit juices with different antioxidant capacities. *Chinese Journal of Preventive Medicine* 39, 80-83.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.