



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της επίδρασης χυμού από ρόδι στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος ασθενών υπό φαρμακευτική αντιμετώπιση της εξάρτησης από οπιοειδή με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη

Study of the effects of pomegranate juice on blood redox status of opioid-addicted patients under opioid maintenance treatment with methadone and buprenorphine

Παπαγεωργίου Καλλιόπη του Νικολάου

Λάρισα 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αριστείδης Βεσκούκης (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κουρέτας Δημήτριος (συνεπιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο εθισμός στα ναρκωτικά είναι ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη κοινωνία. Η βουπρενορφίνη και η μεθαδόνη είναι οπιοειδή φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία υποκατάστασης ασθενών που είναι εθισμένοι στα οπιοειδή. Είναι γνωστό, ωστόσο, από τις ελάχιστες διαθέσιμες μελέτες ότι η φαρμακευτική αντιμετώπιση της εξάρτησης από οπιοειδή με τις παραπάνω ουσίες προκαλεί οξειδωτικό στρες. Η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι μέρος μιας ευρύτερης πειραματικής προσέγγισης (μελέτη NUTRIDOPE, NUTRItion-driven Detoxification of OPioid addicted patiENts) που έχει ως στόχο την υιοθέτηση διατροφικών παρεμβάσεων από ασθενείς εξαρτημένους σε οπιοειδή, ώστε να επιτευχθεί η ομαλή απεξάρτησή τους. Σκοπός, επομένως, της πτυχιακής μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης χυμού από ρόδι, που είναι πλούσιος σε συστατικά με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος ασθενών υπό φαρμακευτική αντιμετώπιση της εξάρτησης από οπιοειδή με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη. Στη μελέτη συμμετείχαν 58 ασθενείς του Οργανισμού κατά των Ναρκωτικών (OKANA), οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε ομάδα ελέγχου (18 ασθενείς) και ομάδα μελέτης (40 ασθενείς). Στους ασθενείς της ομάδας μελέτης χορηγήθηκε χυμός από ρόδι σε δοσολογία 250 ml/ημέρα, 7 ημέρες/εβδομάδα, 120 ημέρες. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στα ερυθροκύτταρα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε σε τρεις χρονικές στιγμές (πριν την έναρξη του πειράματος, στις 60 και στις 120 ημέρες). Συνολικά βρέθηκε ότι ο χυμός από ρόδι είχε ευεργετική επίδραση στην GSH των ασθενών υπό μεθαδόνη μόνο στις 60 ημέρες χωρίς να επηρεάσει τους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη. Επίσης, μείωσε την TAC των ασθενών υπό μεθαδόνη, σε σύγκριση με τους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη. Αναφορικά με τα TBARS, αύξησε τη συγκέντρωσή τους στους ασθενείς υπό μεθαδόνη στις 120 ημέρες και στους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη στις 60 ημέρες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μετά από μικρές τροποποιήσεις στη δοσολογία, ο χυμός από ρόδι μπορεί να αποτελέσει διατροφική παρέμβαση σε αυτούς τους ασθενείς με ευεργετικά αποτελέσματα. Ο απώτερος στόχος της μελέτης NUTRIDOPE είναι η εισαγωγή στο εβδομαδιαίο διατροφικό πρόγραμμα του

ΟΚΑΝΑ του φυσικού χυμού από ρόδι, ώστε να βελτιωθούν η οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος των ασθενών καθώς και άλλες βιοχημικές και ψυχοκοινωνικές παράμετροι αποσκοπώντας στην ομαλή τους απεξάρτηση και επανένταξη στο κοινωνικό σύνολο.

Λέξεις-Κλειδιά: Οξειδωτικό Στρες, Αντιοξειδωτικά, Οπιοειδή, Μεθαδόνη, Βουπρενορφίνη, Ρόδι, Γλουταθειόνη, Λιπιδική υπεροξείδωση

ABSTRACT

Drug addiction is a serious public health problem for modern society. Buprenorphine and methadone are opioid drugs used as maintenance treatment for patients addicted to opioids. However, scarce research evidence indicates that they induce oxidative stress. This thesis is part of a broader experimental approach (NUTRIDOPE, NUTRItion-driven Detoxification of OPioid addicted patients Study) aiming to propose dietary interventions adopted by opioid-addicted patients to achieve rehab. The purpose of the present study was to evaluate the effects of consumption of pomegranate juice, which is rich in antioxidant compounds, on blood redox status of opioid-addicted patients under opioid maintenance treatment with methadone and buprenorphine. For this study, 58 patients of the Greek Organization against Drugs (OKANA) were divided into control (N=18 patients) and experimental groups (N=40). The participants consumed pomegranate juice at the following dosage: 250 ml/day, 7 days/week, 120 days. Blood redox status was evaluated through the spectrophotometric measurement of the levels of reduced glutathione (GSH) in red blood cells, and total antioxidant capacity (TAC) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma. Blood samples were collected at three time points of the experiment, namely pre, 60 and 120 days. Overall, pomegranate juice was found to exert a beneficial effect on GSH of patients under methadone only at 60 days without affecting patients on buprenorphine. It also reduced TAC levels of patients under methadone, compared with patients under buprenorphine. Regarding TBARS, it increased their concentration in patients under methadone at 120 days and in patients under buprenorphine at 60 days compared with the control group. The ultimate goal of the NUTRIDOPE study is to introduce pomegranate juice, probably after slight modification in its dosage, as a nutritional intervention into the programs of OKANA to improve the redox status of the patients as well as other biochemical and psychosocial parameters towards their successful rehab and societal reintegration.

Keywords: Oxidative Stress, Antioxidants, Opioids, Methadone, Buprenorphine, Pomegranate, Glutathione, Lipidperoxidation

Περιεχόμενα

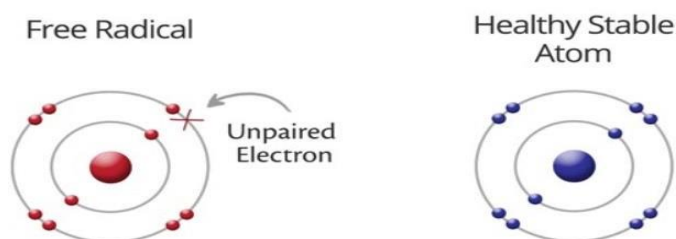
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Ελεύθερες ρίζες	8
1.1.1. Παραγωγή ελεύθερων ριζών.....	9
1.1.1.1. Ενδογενείς πηγές	9
1.1.1.2. Εξωγενείς πηγές.....	12
1.1.2. Επιδράσεις των ελεύθερων ριζών.....	12
1.1.2.1. Θετικές επιδράσεις.....	12
1.1.2.2. Αρνητικές επιδράσεις.....	13
1.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	16
1.2.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	16
1.2.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	18
1.3. Οξειδωτικό στρες	22
1.4. Εξαρτησιογόνες ουσίες – Οπιοειδή	23
1.4.1. Ιστορική αναδρομή των οπιοειδών.....	23
1.4.2. Οπιοειδή.....	25
1.5. Θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών	27
1.5.1. Μεθαδόνη	27
1.5.2. Βουπρενορφίνη	28
1.5.3. Θεραπεία υποκατάστασης και οξειδωτικό στρες.....	29
1.6. Αντιοξειδωτική δράση του ροδιού	30
1.6.1. Καρπός της ροδιάς.....	30
1.6.2. Χημική σύσταση του χυμού του ροδιού.....	30
1.6.3. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροδιού	32
1.6.4. Φαρμακευτικές ιδιότητες του ροδιού.....	32
2. ΣΚΟΠΟΣ	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1. Μεθοδολογία.....	33
3.2. Πρωτόκολλα για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής που μελετήθηκαν.....	37

3.2.1. Γλουταθειόνη στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	37
3.2.2. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα.....	40
3.2.3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (total antioxidant capacity, TAC) στο πλάσμα ..	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
4.1. Αποτελέσματα GSH.....	45
4.2. Αποτελέσματα TAC	46
4.3. Αποτελέσματα TBARS	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
6.Βιβλιογραφία.....	53
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	53
Ελληνική βιβλιογραφία	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο, άτομο ή ιόν που περιέχει στην εξωτερική στοιβάδα σθένους ένα ή περισσότερα ασύζευκτα (μονήρη) ηλεκτρόνια (Jenkins, 1988, Cheeseman & Slater, 1993) (Εικόνα 1). Αυτά τα ηλεκτρόνια καθιστούν την ελεύθερη ρίζα εξαιρετικά δραστική (Poprac et al, 2017). Η διαμόρφωση αυτή δημιουργείται από την απώλεια ή την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999) (Εικόνα 1). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς δομές με σύντομη διάρκεια ζωής και έχουν τη δυνατότητα ανεξάρτητης ύπαρξης. Αντιδρούν γρήγορα με γειτονικά μόρια-στόχους, προσπαθώντας να αποκτήσουν το απαραίτητο ηλεκτρόνιο, προκειμένου να φτάσουν σε σταθερή κατάσταση. Το μόριο που χάνει το ηλεκτρόνιό του γίνεται το ίδιο μια ελεύθερη ρίζα, ξεκινώντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση (Khan et al., 2018). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο (Halliwell, 2005).



Εικόνα 1 : Δημιουργία ελεύθερων ριζών - <https://www.rejuvent.com/tag/free-radicals/>

Οι ελεύθερες ρίζες ανήκουν σε μία ευρύτερη κατηγορία δραστικών δομών που λέγονται δραστικές μορφές και μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες ανάλογα με το κεντρικό άτομο που διαθέτουν. Συγκεκριμένα, αναφέρονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), οι δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS) και οι δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) με κεντρικό άτομο αντίστοιχα το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο και το χλώριο (Veskoukis et al., 2012). Οι πιο καλά μελετημένες δραστικές μορφές

στους ζωντανούς οργανισμούς είναι οι ROS. Στις ROS ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}), υδροξυλίου ($\cdot OH$), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), υπεροξειδίου (ROO^{\cdot}), και οι μη ρίζες υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μονήρες οξυγόνο (1O_2), όζον (O_3), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) και περοξυνιτρικό ($ONOO^-$), όπως απεικονίζονται στον Πίνακα 1 (Sharma et al., 2018, Buonocore et al., 2010).

Πίνακας 1: Οι πιο κοινές δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Ελεύθερες ρίζες	Μη ρίζες
Ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
Υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO_2^{\cdot})	Μονήρες οξυγόνο (1O_2)
Ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$)	Όζον (O_3)
Ρίζα αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)
Ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\cdot})	Περοξυνιτρικό ιόν ($ONOO^-$)

1.1.1. Παραγωγή ελεύθερων ριζών

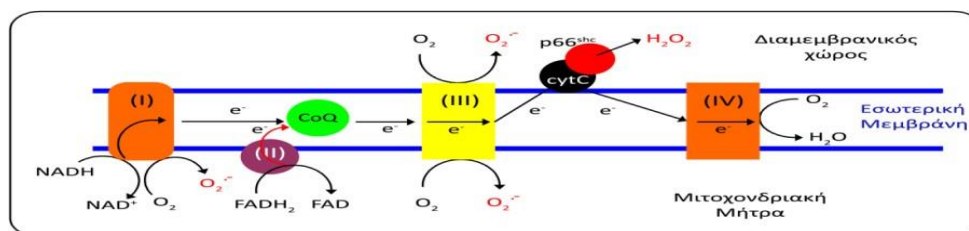
Η παραγωγή ελεύθερων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι αναπόφευκτη. Υπάρχουν πολλές πηγές παραγωγής οι οποίες είναι τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς.

1.1.1.1. Ενδογενείς πηγές

Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Στα μιτοχόνδρια παράγεται το μεγαλύτερο μέρος της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP) που απαιτείται για τις κυτταρικές διεργασίες. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα οργανίδια του κυττάρου στα οποία δημιουργούνται οι ROS (Aklima et al., 2021). Η δημιουργία των ROS συνδέεται κυρίως με τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία πραγματοποιείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Γαλάρης, 2015). Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση η ATP συντίθεται από τη ροή των ηλεκτρονίων από το NADH ή το

FADH₂ προς το οξυγόνο μέσω μίας βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Berg et al., 2017). Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στο οξυγόνο μέσω μιας αλυσίδας τριών μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I), την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III), την οξειδάση κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV) και δύο ελεύθερων διαχεόμενων μορίων (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 (Averbeck & Rodriguez, 2021). Τα ηλεκτρόνια από τη FADH₂ (που προέρχεται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος) εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (Berg et al., 2017). Η σύνθεση της ATP πραγματοποιείται από το σύμπλοκο που ονομάζεται συνθάση του ATP και αφορά το 95-99% του οξυγόνου (Γαλάρης, 2015). Σε φυσιολογικές συνθήκες το μοριακό οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να ανάγεται πλήρως προς νερό. Η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων οδηγεί σε δύο μόρια νερού. Ωστόσο, η μερική αναγωγή του οξυγόνου παράγει ROS, διότι το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται περισσότερο στα μιτοχόνδρια. Για παράδειγμα η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο O₂ δημιουργεί το O₂^{•-}, ενώ η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων σχηματίζει το H₂O₂ (Berg et al., 2017). Κύριες θέσεις παραγωγής των ROS στα μιτοχόνδρια είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q και η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c, δηλαδή τα σύμπλοκα I και III αντίστοιχα (Herb & Schramm., 2021). Το σύμπλοκο I παράγει O₂^{•-} στη μιτοχονδριακή μήτρα, ενώ στο σύμπλοκο III το O₂^{•-} απελευθερώνεται και στις δύο πλευρές της εσωτερικής μεμβράνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 (Γαλάρης, 2015). Πιστεύεται ότι μόνο το 2-5% του O₂ στα μιτοχόνδρια ανάγεται με τον τρόπο αυτόν σε O₂^{•-}. Το O₂^{•-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD2 ή MnSOD) (Averbeck & Rodriguez, 2021).



Εικόνα 2: Ο μηχανισμός της παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια (Γαλάρης, 2015)

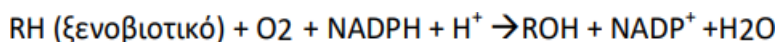
Παραγωγή ROS από τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης

Τα φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά από φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών. Οι ενώσεις αυτές είναι απαραίτητες για τη θανάτωση πολλών μικροβίων. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για αυτή τη διαδικασία είναι η οξειδάση του NADPH, η οποία αξιοποιεί τα αναγωγικά ισοδύναμα του NADPH για την αναγωγή του οξυγόνου της ατμόσφαιρας σε $O_2^{\cdot-}$.

Κατόπιν, το $O_2^{\cdot-}$ μετατρέπεται από τα λευκοκύτταρα σε άλλες δραστικές ενώσεις, όπως το H_2O_2 , το HOCl και οι N-χλωραμίνες (RNC1). Κάθε μία από αυτές τις ενώσεις έχει ισχυρές μικροβιοκτόνες ιδιότητες. Σε συνθήκες ηρεμίας τα φαγοκύτταρα δεν παράγουν ROS. Ωστόσο, μέσα σε 15-30 sec μετά τη σύνδεση μικροοργανισμών στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας αρχίζει η παραγωγή $O_2^{\cdot-}$, ένα φαινόμενο γνωστό ως αναπνευστική έκρηξη (Roos, 1991). Τα μακροφάγα εμπλέκονται στην παραγωγή ROS και RNS (Herb & Schramm., 2021).

Κυτόχρωμα P-450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 (cytochrome P, CYP) είναι μονοοξυγενάσες αίμης και ονομάζονται από τη ζώνη απορρόφησης στα 450 nm που παρατηρήθηκε μετά τη δέσμευση του μονοξειδίου του άνθρακα. Έχουν κρίσιμο ρόλο στην αποτοξίνωση των ναρκωτικών και των ξενοβιοτικών, αλλά και στον αναβολισμό στερολών, λιπαρών οξέων, εικοσανοειδών και βιταμινών (Herb & Schramm., 2021). Κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450 σε ορισμένα κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στο O_2 οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. ξενοβιοτικό) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Kahl & Kappus, 1993):



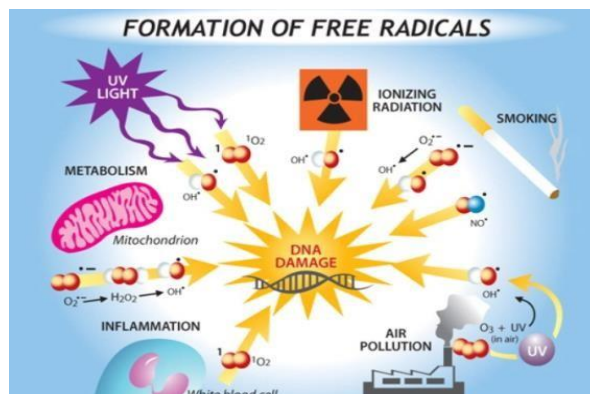
Υπεροξειδισώματα

Τα υπεροξειδισώματα είναι μεμβρανικά οργανίδια που υπάρχουν σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Herb & Schramm., 2021). Αποτελούν μία ακόμη σημαντική ενδογενή πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 που είναι δυνητικά επιβλαβές. Επιπλέον,

αποτελούν πηγή μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]) και RNS (Sandalio & Romero-Puertas, 2015).

1.1.1.2. Εξωγενείς πηγές

Εκτός από τις ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών, εξίσου σημαντικοί είναι και οι εξωγενείς παράγοντες που συμβάλλουν στην παραγωγή τους. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ατμοσφαιρική ρύπανση, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, το όζον, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ο αυξημένος αερόβιος μεταβολισμός κατά τη διάρκεια της άσκησης, τα βιομηχανικά απόβλητα, πολλά φάρμακα, καθώς και ξеноβιοτικά, όπως τοξίνες και εντομοκτόνα. Η διατροφή μπορεί, επίσης, να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Τέλος, μία άλλη πολύ σημαντική πηγή είναι το άγχος (Suzuki et al., 1995, Nakajima et al., 1998) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Οι πιο σημαντικές εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών

<https://giftofhealthblog.com/2013/06/25/on-the-subject-of-antioxidants-what-are-the-free-radicals/>

1.1.2. Επιδράσεις των ελεύθερων ριζών

1.1.2.1. Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Συγκεκριμένα, ενισχύουν τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης από τα μακροφάγα (Jenkins, 1988). Τα φαγοκύτταρα (συδετερόφιλα, μακροφάγα και μονοκύτταρα) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες, για να καταστρέψουν τα εισβάλλοντα παθογόνα μικρόβια (Di meo & Venditti, 2020). Ειδικότερα, σε μεγάλες ποσότητες παράγονται

από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος το NO[•] και το O₂^{•-} με σκοπό την εξουδετέρωση ιών και βακτηρίων (Khan et al., 2018).

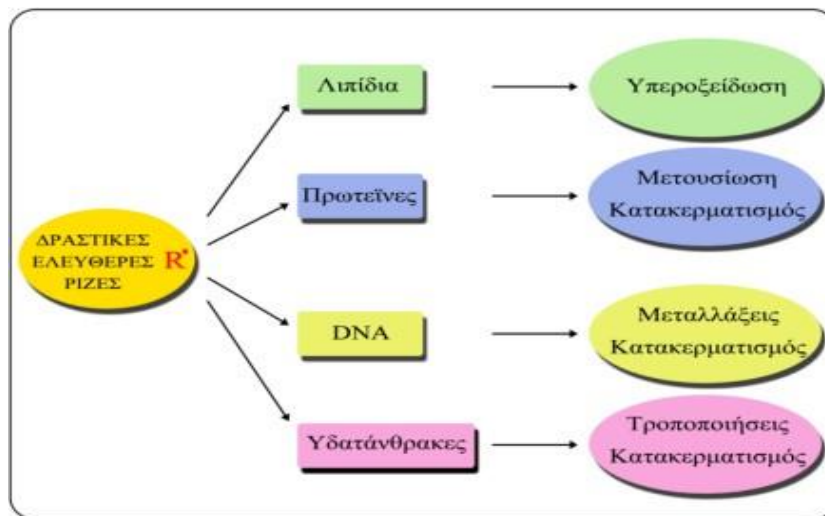
Ακόμη, εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά (Reid, 2001). Συγκεκριμένα, σε χαμηλά επίπεδα μερικές δραστικές μορφές (ελεύθερες ρίζες και μη) δρουν ως σηματοδοτικά μόρια στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των γονιδίων (Khan et al., 2018). Επιπλέον, έχουν βασικό ρόλο στη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και στην αύξηση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων Ca²⁺. Αποτελούν φυσιολογικούς μεσολαβητές ελέγχου για αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμίζουν τους μηχανισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του μεταβολισμού (Kumar et al., 2012).

Επίσης, εμπλέκονται στη φυσιολογική μυϊκή σύσπαση. Βασική προϋπόθεση για κανονική κίνηση είναι τα χαμηλά επίπεδα ROS στους σκελετικούς μύες (Di meo & Venditti 2020). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης (Reid, 2001).

Εξίσου σημαντική είναι η συμβολή των ROS και σε πολύπλοκες λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης και της γνωστικής λειτουργίας (Di meo & Venditti, 2020). Έχει διαπιστωθεί ότι οι ROS συμβάλλουν θετικά στην θεραπεία του καρκίνου. Είναι αξιοσημείωτο ότι αντικαρκινικά φάρμακα στοχεύουν στην αύξηση των ελεύθερων ριζών στο σώμα προκειμένου να θανατώσουν τα καρκινικά κύτταρα (Khan et al., 2018).

1.1.2.2. Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες εκτός από τις πολύ χρήσιμες διεργασίες που επιτελούν στον οργανισμό μπορούν να είναι και επιβλαβείς, όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις λόγω της υψηλής δραστικότητας που έχουν. Επηρεάζουν πολλά κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των λιπιδίων (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών στα κυτταρικά συστατικά (Γαλάρης, 2015)

Επίδραση στα λιπίδια

Ειδικότερα, τα λιπίδια υφίστανται οξειδωτική τροποποίηση που ονομάζεται υπεροξειδωση μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Λιπίδια, όπως είναι οι εστέρες χοληστερόλης, τα φωσφολιπίδια και τα τριγλυκερίδια είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε τροποποιήσεις από ελεύθερες ρίζες καθώς οι κυτταρικές τους μεμβράνες περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFA), τα οποία είναι επιρρεπή στη δράση των ελευθέρων ριζών (Sbodio et al., 2019). Με την οξείδωση των PUFA ξεκινά ο καταρράκτης αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης, που οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου (ROO[•]), συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΐδης (malonyl dialdehyde, MDA) (Young & McEneny, 2001). Εκτεταμένη λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να προκαλέσει στις κυτταρικές μεμβράνες διαταραχή στην ρευστοτητά τους, μείωση του μεμβρανικού δυναμικού, αύξηση της διαπερατότητάς στα H⁺ και στα Ca²⁺ και πιθανόν λύση με ταυτόχρονη απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών στον διακυτταρικό χώρο. Παρόμοιες επιβλαβείς επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί και στη λειτουργία πρωτεϊνών που συνδέονται με τη μεμβράνη, όπως είναι τα ένζυμα (φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, αδενυλική κυκλάση κ.ά.) και οι υποδοχείς (Khan et al., 2018, Γαλάρης, 2015).

Επίδραση στις πρωτεΐνες

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να επιδράσουν δυσμενώς και στις πρωτεΐνες προκαλώντας οξειδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων τους, διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών και συσσωμάτωση μεταξύ των πρωτεϊνών (Juan et al., 2021). Η καρβονυλίωση είναι η πιο κοινή οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών. Η κυστεΐνη και η μεθειονίνη είναι τα πιο ευαίσθητα αμινοξέα στην οξειδωτική τροποποίηση από όλες τις μορφές ROS λόγω των ατόμων θείου τους. Για παράδειγμα, η σουλφυδρυλομάδα (-SH) της κυστεΐνης, όταν εκτίθεται σε ROS, οξειδώνεται εύκολα σε σουλφενικό οξύ (RSOH) το οποίο μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω σε σουλφινικό οξύ (RSO₂H) και σουλφονικό οξύ (RSO₃H) (Sbodio et al., 2019; Lo Conte & Carroll 2013). Σε αντίθεση με την κυστεΐνη και τη μεθειονίνη, άλλα αμινοξέα οξειδώνονται δυσκολότερα, επομένως επηρεάζονται αναλόγως τόσο η δομή όσο και η λειτουργία τους (Khan et al., 2018).

Επίδραση στο DNA

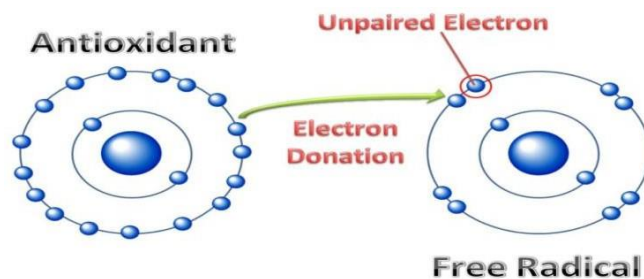
Το DNA είναι ένα εξαιρετικά σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο. Εντούτοις, οι ROS, όταν αλληλεπιδρούν με αυτό έχουν την ικανότητα να το οξειδώνουν επηρεάζοντας τη φυσιολογική του λειτουργία. Ειδικότερα, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν στο DNA τροποποιήσεις στις βάσεις του και στο σάκχαρο (δεοξυριβόζη), μονόκλωνα και δίκλωνα σπασίματα των αλυσίδων του και βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσής του (Γαλάρης, 2015). Η πιο γνωστή οξειδωτική τροποποίηση στις βάσεις του DNA αφορά τη γουανίνη που αλληλεπιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες μετατρέπεται σε 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη, η οποία ζευγαρώνει με αδενίνη αντί για κυτοσίνη προκαλώντας μεταλλάξεις (Sbodio et al., 2019, Aust & Eveleigh, 1999). Η 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη αποτελεί τον πιο αξιόπιστο βιολογικό δείκτη μέτρησης της οξειδωσης του DNA (Aust & Eveleigh, 1999).

Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται με πλήθος ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο, όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson, Huntington), ο σακχαρώδης διαβήτης, αυτοάνοσα, διπολική διαταραχή και πολλές άλλες νόσους συμπεριλαμβανομένης και της διαδικασίας της γήρανσης (Di meo & Venditti, 2020). Παρόλα αυτά, παρότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν αιτιατό των παθήσεων αυτών, δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή ερευνητικά δεδομένα που να δείχνουν ότι μπορούν να αποτελέσουν και αίτιο (Veskoukis et al.

2020). Όσον αφορά τη γήρανση υποστηρίζεται ότι αποτελεί άμεση συνέπεια της καταστροφής του μιτοχονδριακού DNA, εξαιτίας της δράσης των ελευθέρων ριζών (Kumar et al., 2012).

1.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αντιοξειδωτική ουσία ορίζεται κάθε ουσία που καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση υποστρωμάτων (Halliwell and Gutteridge 2015). Βασικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η ελαχιστοποίηση των επιπέδων των ROS μέσω της πρόληψης σχηματισμού τους, της μετατροπής τους σε λιγότερο δραστικά μόρια και την πρόληψη της βλάβης σε κυτταρικά συστατικά που προκύπτει ως αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών (Young & Woodside, 2001). Το αντιοξειδωτικό είναι μία αρκετά σταθερή δομή που μπορεί να δωρίσει ένα ηλεκτρόνιο σε μία ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνοντας την, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5 (Lobo et al., 2010). Αυτός είναι ο πιο απλός χημικά τρόπος μέσω του οποίου μπορεί να δράσει ένα αντιοξειδωτικό.



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας -<https://www.biosciencenotes.com/antioxidant/>

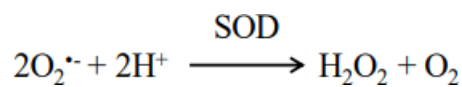
Τα αντιοξειδωτικά προέρχονται τόσο από ενδογενείς πηγές, όσο και από εξωγενείς μέσω της διατροφής και των συμπληρωμάτων (George & Abrahamse, 2020). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί.

1.2.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα, όπως η SOD, η καταλάση (catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR) (Polgsak et al., 2013).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

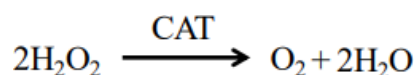
Πρόκειται για ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα που παράγονται ενδοκυτταρικά. Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα σύμφωνα με τον μεταλλικό συμπάραγοντα που σχετίζεται με το ένζυμο: SOD που περιέχει χαλκό- ψευδάργυρο (CuZnSOD), SOD που περιέχει μαγγάνιο (MnSOD, επίσης γνωστή ως SOD2) και SOD που περιέχει σίδηρο (FeSOD) (Sharma et al., 2018). Τρεις τύποι SOD έχουν ταυτοποιηθεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα, το κυτταροπλασματικό SOD χαλκού/ψευδαργύρου (CuZn-SOD), το εξωκυτταρικό (CuZn-SOD), και το μιτοχονδριακά εντοπισμένο SOD μαγγανίου (Mn-SOD) (Rosa et al., 2021). Η κυτταροπλασματική μορφή (Cu/ZnSOD) βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα μυϊκά κύτταρα (Das et al., 1997). Όλα τα μέλη της οικογένειας καταλύουν αποτελεσματικά τη μετατροπή του $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 και O_2 , όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Qiu et al., 2008).



Το H_2O_2 είναι επιβλαβές και αποικοδομείται από άλλα ένζυμα, όπως η καταλάση (Rosa et al., 2021). Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\bullet-}$ παράγεται στα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα όπου ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD.

Καταλάση (CAT)

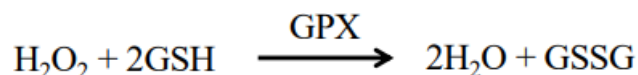
Η CAT είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που εκτίθενται στο οξυγόνο, όπως στα φυτά, τα ζώα καθώς και σε αερόβια βακτήρια. Εντοπίζεται, κυρίως, εντός των υπεροξειδιοσωμάτων ενώ βρίσκεται, επίσης, στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια σε μικρή συγκέντρωση. Υψηλά επίπεδα CAT εντοπίζονται στο ήπαρ, τα νεφρά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 , όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Η αντιοξειδωτική δράση της CAT είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αποτρέπει τη μετατροπή του H₂O₂ στην εξαιρετικά επιβλαβή OH[•] και προστατεύει το κύτταρο από την επιβλαβή δράση των ROS (George & Abrahamse, 2020, Sharma et al., 2018, Veskoukis et al., 2012) .

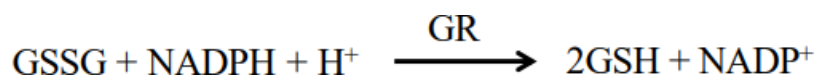
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η GPx αποτελεί την κύρια πηγή προστασίας από τα χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες. Η κυτταροπλασματική GPx αποτελεί την σημαντικότερη μορφή η οποία επίσης βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στον εξωκυττάριο χώρο (Sharma et al., 2018). Η GPx ανταγωνίζεται την CAT για την αναγωγή του H₂O₂ (Obeagu, 2018). Ωστόσο η GPx ενεργοποιείται, όταν το H₂O₂ βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, ενώ η CAT δρα σε υψηλή συγκέντρωση H₂O₂ (Halliwell & Gutteridge, 2015). Η GPx καταλύει τη μετατροπή του H₂O₂ σε H₂O και O₂ με ταυτόχρονη οξείδωση της GSH (ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης) σε GSSG (οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (George & Abrahamse, 2020):



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την GSSG στην GSH όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Χρησιμοποιεί μια προσθετική ομάδα FAD και NADPH. Η GR διατηρεί την αναλογία GSH/GSSG στα κύτταρα καταλύοντας την εξαρτώμενη από NADPH αναγωγή της GSSG σε δύο μόρια GSH, γεγονός που συμβάλει στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση των κυττάρων (Lienkamp et al., 2020).

1.2.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, το β-καροτένιο, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε είναι μια ομάδα οκτώ λιποδιαλυτών ουσιών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες περιλαμβάνουν τέσσερις τοκοφερόλες και τέσσερις τοκοτριενόλες με μια α, β, γ και δ ισομορφή. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο άφθονη και η πιο δραστική. Χαρακτηρίζεται από καλύτερη απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα. Εντοπίζεται στα φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τις πλασματικές μεμβράνες. Προστατεύει τις μεμβράνες από οξείδωση αντιδρώντας με τις λιπιδικές ρίζες κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης σχηματίζοντας μια ρίζα α-τοκοφερόλης η οποία μπορεί να αναχθεί στην αρχική της μορφή από ασκορβικό οξύ, ρετινόλη ή ουμπικινόλη (Lobo et al., 2010). Η κύρια δράση της βιταμίνης Ε είναι η προστασία του κυττάρου από την υπεροξειδωση των λιπιδίων καθώς και η προστασία της λιπιδικής δομής των κυτταρικών μεμβρανών από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (Sotler et al., 2019). Η προστατευτική της δράση είναι αποτέλεσμα της αναστολής του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και της ενεργοποίησης των ενδονουκλεασών (Sharma et al., 2019). Η βιταμίνη Ε προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής. Εντοπίζεται κυρίως στα φυτικά έλαια (ελαιόλαδο, αραβοσιτέλαιο, έλαιο σόγιας) και τους ξηρούς καρπούς.

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C, γνωστή ως ασκορβικό οξύ, είναι το κύριο υδρόφιλο αντιοξειδωτικό και δρα σε υδατικά περιβάλλοντα του σώματος (Sharma et al., 2019). Η βιταμίνη C είναι ένας αναγωγικός παράγοντας (δότης ηλεκτρονίων) και επομένως μπορεί να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες. Προστατεύει αποτελεσματικά τις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες από την οξείδωση από ROS ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις (Obeagu, 2018, Timoshnikov et al., 2020, Sotler et al., 2019). Είναι ισχυρός αναστολέας της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και προάγει την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Sotler et al., 2019). Η βιταμίνη C δεν συντίθεται από τον άνθρωπο, διότι δεν εκφράζεται σε αυτόν το λειτουργικό ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης και επομένως πρέπει να λαμβάνεται μέσω της διατροφής. Βασική πηγή βιταμίνης C είναι τα φρούτα και τα λαχανικά (Lobo et al., 2010, Dosedel et al., 2021).

Β-καροτένιο

Τα καροτενοειδή είναι πορτοκαλί, κίτρινες και κόκκινες χρωστικές ουσίες που υπάρχουν σε πολλά φρούτα και λαχανικά, καθώς και σε άλλες ομάδες τροφίμων (Moran et al., 2018). Είναι λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά που υπάρχουν ως α ή β ισομορφές στις κυτταρικές μεμβράνες. Το β-καροτένιο αποτελεί μια σημαντική προβιταμίνη Α (George & Abrahamse, 2020). Δρα τόσο ως αντιοξειδωτικό όσο και ως προ-οξειδωτικό, γεγονός που εξαρτάται από την συγκέντρωση του οξυγόνου. Ειδικότερα, σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου εμφανίζει αντιοξειδωτικές επιδράσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου μπορεί να έχει προ-οξειδωτικές επιδράσεις (Sharma et al., 2019). Επιπλέον, έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E (Aune et al., 2018). Θεωρείται ότι μπορεί να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες και να μειώσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Halliwell & Gutteridge, 1998). Επομένως, μέσω της αντιοξειδωτικής του ιδιότητας ενισχύει σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα (Tan et al., 2019).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Είναι ένα ενδογενώς παραγόμενο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που τροποποιείται τόσο από τα φάρμακα όσο και από τη διατροφή. Δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό στο πλάσμα του αίματος, καθώς αντιπροσωπεύει το 60% της συνολικής αντιοξειδωτικής του ικανότητας (Crotty et al., 2017). Έχει αποδειχθεί επιστημονικά ότι εξουδετερώνει διάφορες ελεύθερες ρίζες, ενώ αλληλεπιδρά και σταθεροποιεί άλλα αντιοξειδωτικά, όπως η SOD και η βιταμίνη C. Μια άλλη αντιοξειδωτική λειτουργία του ουρικού οξέος είναι ότι προστατεύει το DNA από οξειδωτική βλάβη (Crotty et al., 2017, Bowman et al., 2010).

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ελεύθερων ριζών. Είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται στο ήπαρ και αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη (γ-Glu-Cys-Gly). Η γλουταθειόνη υπάρχει στα κύτταρα σε 2 μορφές, την GSH και την GSSG (Pizzorno, 2014). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα περίπου το 90% της

ενδοκυτταρικής GSH εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και το υπόλοιπο στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρήνα. Πιστεύεται ότι η βιοσύνθεση της GSH πραγματοποιείται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο μέρος της γλουταθειόνης βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή. Η αναλογία GSH προς GSSG χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός κυττάρου (Barycki, 2007). Η γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των καρποτενοειδών και των αντιοξειδωτικών βιταμινών E και C (Abelgr, 2018). Σε συνθήκες ηρεμίας, η GSH βρίσκεται σε ισορροπία με την GSSG. Όμως, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η GSH με τη συνέργεια της GPx εξουδετερώνει το ενδοκυτταρικό H₂O₂ και μετατρέπεται σε GSSG προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό τα βιομόρια από οξειδωτικές τροποποιήσεις. Στη συνέχεια, η GR ανάγει την GSSG σε GSH χρησιμοποιώντας το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων συντελώντας στην αναγέννηση της GSH.

Η GSH εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως στη βιοσύνθεση κυστεΐνης, λευκοτριενίων και προσταγλανδινών, στη ρύθμιση της σύνθεσης πρωτεϊνών και DNA. Ωστόσο, η βασική λειτουργία της GSH είναι η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης παρέχοντας προστασία από ROS, RNS και ξеноβιοτικά (Barycki, 2007). Η γλουταθειόνη προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής αλλά συντίθεται επίσης και στον οργανισμό. Τα καλύτερα επίπεδα γλουταθειόνης επιτυγχάνονται μέσω μιας διατροφής που είναι πλούσια σε αμινοξέα που περιέχουν θείο (π.χ. σπαράγγια, αβοκάντο, μπρόκολο, σπανάκι, σκόρδο και μη επεξεργασμένα κρέατα) και ενισχύονται με συμπληρώματα διατροφής, όπως βιταμίνες C και E, N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), σελήνιο και κουρκουμίνη (John, 2007).

Συνένζυμο Q-10

Το συνένζυμο Q-10 (CoQ10) είναι ένα ενδογενές λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλοντας την έναρξη και την εξέλιξη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες (Liu et al., 2016). Συμμετέχει στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα για τη σύνθεση ATP (Ho et al., 2020). Απαντάται σε δύο μορφές την ανηγμένη, γνωστή ως ουβικινόλη και την οξειδωμένη με το όνομα ουβικινόνη. Και οι δύο μορφές συνυπάρχουν και μέσω διαδοχικών αντιδράσεων οξειδοαναγωγής χρησιμεύουν για την αναγέννηση η μία της άλλης (κύκλος Q). Η ουβικινόνη δρα ως φορέας ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή

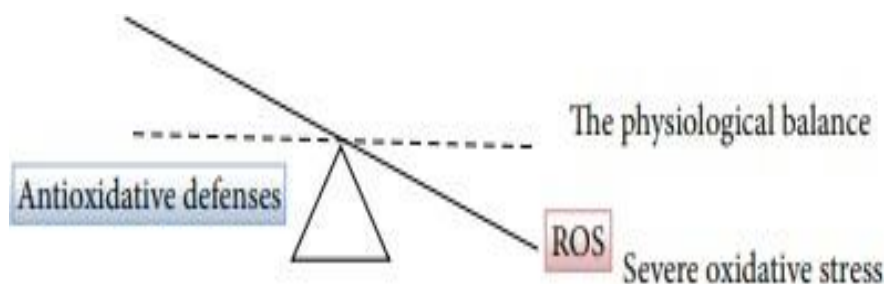
αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, συμμετέχοντας στη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των συμπλόκων I ή II και του συμπλόκου III (Pastor- Maldonado et al., 2020) Παράλληλα, είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης (Siemieniuk et al., 2005).

Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, στον κυτταρικό κύκλο και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού, λόγω της συμβολής του στις πρωτεΐνες που εξαρτώνται από σελήνιο. Το σελήνιο βρίσκεται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των βραζιλιάνικων ξηρών καρπών, των τροφών και των δημητριακών ολικής αλέσεως, των ψαριών, του βόειου κρέατος και των αυγών (Habibi et al., 2020). Λειτουργεί ως συμπαράγοντας της GPx που είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία των κυττάρων από τις οξειδωτικές βλάβες (Bermingham et al., 2014). Η συνιστώμενη διατροφική πρόσληψη σεληνίου υπολογίζεται με βάση την ποσότητα σεληνίου που απαιτείται για τη μεγιστοποίηση της σύνθεσης της GPx (Habibi et al., 2020).

1.3. Οξειδωτικό στρες

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στον οργανισμό. Ωστόσο, η συκέντρωσή τους είναι δυνατόν να αυξηθεί σημαντικά διαταράσσοντας την οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μια κατάσταση που περιγράφεται ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress, OS) (Żukowski et al., 2018). Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού διαταράσσοντας την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (Jones 2006, Young & Woodside, 2001) (Εικόνα 6). Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής μπορεί να οφείλεται είτε στην αύξηση των ελεύθερων ριζών και την αδυναμία του οργανισμού να τις εξουδετερώσει, είτε σε φυσιολογική παραγωγή τους και στην ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Poljsak et al., 2013).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες (η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη φυσιολογική ισορροπία) (Poljsak et al., 2013)

Παράγοντες που μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης οξειδωτικού στρες είναι η μειωμένη αντιοξειδωτική επάρκεια εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Mylonas & Kouretas, 1999). Επιπλέον, η ανεπαρκής πρόσληψη αντιοξειδωτικών από τη διατροφή, η παχυσαρκία, οι δίαιτες που είναι πλούσιες σε λιπαρά και ζάχαρη, τα επεξεργασμένα τρόφιμα, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η έκθεση σε ακτινοβολία, η ρύπανση καθώς και ορισμένα φάρμακα (Hao et al., 2021). Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την οξειδωτική τροποποίηση των μακρομορίων συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, ενώ μπορεί ακόμη να προκαλέσει και κυτταρικό θάνατο. Μελέτες έχουν δείξει ότι εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών νοσημάτων, όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης τύπου 2, ο καρκίνος αλλά και αρκετές νευρολογικές διαταραχές, χωρίς ωστόσο να είναι ακόμα γνωστοί οι μηχανισμοί (Hao et al., 2021; Veskoukis et al. 2020).

1.4. Εξαρτησιογόνες ουσίες – Οπιοειδή

1.4.1. Ιστορική αναδρομή των οπιοειδών

Το όπιο παράγεται από το φυτό *Papaver somniferum* L. (μήκων η υψοφόρος) που είναι ενδημικό φυτό της Δυτικής Ασίας και της Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Από την άγουρη κάψα του καρπού (κώδιο) εξέρχεται με εγχάραξη πηκτός γαλακτώδης χυμός (οπός) που προοδευτικά γίνεται σκουρόχρωμος και συλλέγεται (Λώλα, 2010) (Εικόνα 7 & 8).



Εικόνα 7 (αριστερά): Κώδιο παπαρούνας με εγχάραξη-<https://www.ardeaprints.com/opium-poppyscarlet-1295987.html>

Εικόνα 8 (δεξιά): Κώδιο παπαρούνας με εγχάραξη-<https://pixels.com/featured/unripe-seed-capsule-of-opium-poppv-dr-jeremy-buraesscience-photo-library.html>

Η αρχαιότερη αναφορά για την υπναγωγό παπαρούνα γίνεται σε ένα κείμενο των Σουμερίων περίπου το 3400 π.Χ. όπου χαρακτηρίζεται ως φυτό της χαράς πιθανώς για τις ευφορικές της ιδιότητες. Η χρήση του φυτού έγινε γνωστή στους Ασσύριους και τους Βαβυλώνιους από τους Σουμέριους. Οι Αιγύπτιοι το γνώρισαν από τους Βαβυλώνιους περίπου το 1500-1300 π.Χ. και το χρησιμοποιούσαν για θεραπευτικούς σκοπούς ως αναλγητικό, αναισθητικό και υπνωτικό (Booth, 1998). Αρχικά, οι Αιγύπτιοι έκαναν εισαγωγή οπίου, αργότερα όμως άρχισαν να καλλιεργούν το φυτό και να παράγουν οι ίδιοι το όπιο. Ήταν φημισμένο το *opium thebaicum* που καλλιεργούνταν κοντά στην πρωτεύουσα των Θηβών και περιείχε πολλές δραστικές ουσίες (Kritikos & Papadaki, 1967, Booth, 1998).

Από τους Αιγύπτιους η χρήση του οπίου έγινε γνωστή στους αρχαίους Έλληνες και η μεταφορά του γινόταν με πλοία μέσα σε αγγεία που είχαν το σχήμα και το χρώμα των κωδίων της παπαρούνας (Kritikos & Papadaki, 1967). Απόδειξη της χρήσης της υπναγωγού παπαρούνας στην Κρήτη και γενικότερα σε όλη την Ελλάδα ήταν η εύρεση αγάλματος Μινωικής εποχής (1450 π.Χ.) με κεφάλι που έφερε τρεις καρφίδες που παρίσταναν κώδια της παπαρούνας (Παπαδόπουλος, 1999). Στην Οδύσσεια του Ομήρου αναφέρεται μια ουσία που ονομαζόταν *νηπενθές*, χρησιμοποιούνταν ως φάρμακο της λήθης και θεωρείται ότι περιείχε όπιο (Kritikos & Papadaki, 1967). Ο Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.) γνώριζε τις θεραπευτικές ιδιότητες του οπίου και το χρησιμοποιούσε σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα, ως «μηκώνιο», ωστόσο το συνιστούσε με επιφύλαξη. Η χρήση της παπαρούνας έγινε γνωστή στους Ρωμαίους από τους Έλληνες γιατρούς. Η ιατρική της χρήση αναφέρεται από τον

Θεόφραστο, τον Διοσκουρίδη, τον Πλίνιο, τον Γαληνό κ.ά. (Λώλα, 2010). Ο Γαληνός θεωρούσε το όπιο ως το πιο ισχυρό από τα φάρμακα που μπορούσε να προκαλέσει θανατηφόρο ύπνο και συνιστούσε την αποφυγή υπερβολικής χρήσης. Ο Πλίνιος (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) περιγράφει τον τρόπο παραγωγής του οπίου από το κώδιο της παπαρούνας (Kritikos & Papadaki, 1967, Πλίνιος Ν.Η, XX 77).

Κατά τη διάρκεια των βυζαντινών χρόνων, αρκετοί γιατροί αναφέρουν στα έργα τους φάρμακα που περιέχουν ως βασικό συστατικό το όπιο. Στην εποχή της Αναγέννησης, ήταν γνωστή η αναλγητική ικανότητα του οπίου, όπως και οι παρενέργειές του (Λώλα, 2010). Στην εποχή των ανακαλύψεων, το όπιο διαδόθηκε και στον Νέο Κόσμο. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, αλληλοσυγκρουόμενα συμφέροντα γύρω από το όπιο οδήγησαν τις Κίνα, Αγγλία και Γαλλία στον «Πόλεμο του Οπίου» (Booth, 1998). Το 1803, ο Friedrich Sertumer απομόνωσε το ενεργό συστατικό του οπίου, τη μορφίνη που πήρε το όνομα της από τον Μορφέα που είναι θεός του ύπνου και των ονείρων (Hamilton, 2000).

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι το όπιο περιέχει τουλάχιστον 25 αλκαλοειδή που διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες και συγκεκριμένα τα παράγωγα του φαινανθρενίου (μορφίνη, κωδεΐνη, θηβαΐνη) και τα παράγωγα της βενζυλισκοκινόλης. Η μορφίνη αντιπροσωπεύει το 10% των αλκαλοειδών, ενώ η κωδεΐνη και η θηβαΐνη αντιπροσωπεύουν το 0,5 και 0,2% αντίστοιχα. Η παπαβερίνη είναι το κύριο αλκαλοειδές της δεύτερης κατηγορίας και αντιπροσωπεύει το 1% των αλκαλοειδών του οπίου (Carod-Artal, 2013). Το 1899 παράχθηκε από τη μορφίνη η ηρωΐνη, κατά την διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου παράχθηκαν η υδροκωδεΐνη, η πεθιδίνη, η μεθαδόνη και το 1960 η φαιντανύλη και τα παράγωγα της.

1.4.2. Οπιοειδή

Τα οπιοειδή είναι εξαιρετικά ισχυρά και αποτελεσματικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής μορφής πόνου. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα συνταγογραφούμενα αναλγητικά οξυκωδόνη, υδροκωδόνη, κωδεΐνη, μορφίνη, φαιντανύλη, καθώς και η ηρωΐνη (Maglione et al., 2018). Τα οπιοειδή συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος, δηλαδή στις συνάψεις του νωτιαίου μυελού και του εγκεφάλου και των περιφερικών οργάνων, όπως η καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία, οι νεφροί, τα συμπαθητικά γάγγλια και ο μυελός των επινεφριδίων (Zhang et al., 2020, Decaillot et al., 2007).

Υπάρχουν τέσσερις τύποι υποδοχέων οπιοειδών που είναι οι εξής: οι μ (mu-opioid receptor/MOR), κ (kappa-opioid receptor/KOR), δ (delta-opioid receptor/DOR) και ο υποδοχέας της ορφανίνης (noniceptin or orphanin FQ receptor-NOP). Σύμφωνα με έρευνες, οι υποδοχείς διακρίνονται σε υποομάδες (υπότυπους). Ειδικότερα, οι μ -υποδοχείς περιλαμβάνουν τους MOR1, MOR2, MOR3. Οι κ -υποδοχείς είναι πιο πολύπλοκοι, καθώς διακρίνονται σε KOR1, KOR2, KOR3 οι οποίοι υποδιαιρούνται περαιτέρω σε KOR1a, KOR1b, KOR2a και KOR2b. Οι δ -υποδοχείς χωρίζονται σε δύο υποομάδες, DOR1 και DOR2 (Dietis et al., 2011). Κάθε υποδοχέας κωδικοποιείται αντίστοιχα από τα γονίδια Oprm1, Oprk1, Oprd1, και Oprl1. Οι υποδοχείς οπιοειδών ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (G protein-coupled receptors, GPCRs), οι οποίοι αποτελούν την πιο άφθονη κατηγορία υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας που δεσμεύουν εξωκυτταρικές ουσίες και μεταδίδουν ενδοκυτταρικά σήματα μέσω μιας πρωτεΐνης G (Kudla & Przewlocki, 2021). Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται από ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια, όπως οι β -ενδορφίνες, οι εγκεφαλίνες και οι δινورφίνες και από οπιοειδή φάρμακα, όπως η μορφίνη, η κωδεΐνη, η φαιντανύλη, η βουπρενορφίνη, η μεθαδόνη κ.ά. (Paul et al., 2021) Τα ενδογενή οπιοειδή προέρχονται από τις αντίστοιχες πρόδρομες ουσίες, την προοπιομελανοκορτίνη (POMC), την προεγκεφαλίνη (PENK) και την προδυνορφίνη (PDYN) (Machelska & Celik, 2020). Κάθε ένας από τους υποδοχείς των οπιοειδών προκαλεί διαφορετικά αποτελέσματα (Corder et al., 2018). Οι MOR δεσμεύουν τις ενδορφίνες και συμμετέχουν στη πρόκληση αναλγησίας, ευφορίας, αναπνευστικής καταστολής και σωματικής εξάρτησης. Οι KOR συνδέονται με δυνορφίνες και προκαλούν αναλγησία, καταστολή και φαινόμενα δυσφορίας. Οι DOR συνδέονται με εγκεφαλίνες και σχετίζονται με αναλγησία, ενώ μπορεί να μειώσουν τα επίπεδα του άγχους και να μετριάσουν τα καταθλιπτικά συμπτώματα (Wang, 2019).

Τα οπιοειδή μπλοκάρουν τους μ -υποδοχείς εμποδίζοντας την έκκριση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), ενός νευροδιαβιβαστή που δρα στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, αναστέλλοντας την απελευθέρωση ενός άλλου νευροδιαβιβαστή της ντοπαμίνης. Η ανασταλτική δράση των οπιοειδών στο GABA προκαλεί αυξημένη απελευθέρωση ντοπαμίνης από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου (VTA) σε μια άλλη περιοχή του εγκεφάλου, τον επικλινή πυρήνα (NAc). Ο επικλινής πυρήνας είναι ο νευρικός διαμεσολαβητής μεταξύ κινήτρων και δράσης και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάρτηση από ουσίες

και την συμπεριφορά. Η εξάρτηση οφείλεται στην αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης που προκαλείται από ερεθίσματα που έχουν σχέση με την ευχαρίστηση από την ουσία προκαλώντας απομνημόνευση σημάτων που αναγγέλλουν την ανταμοιβή. Όταν το σύστημα ντοπαμίνης υπερδιεγείρεται, η επιθυμία για επανάληψη αυτής της εμπειρίας υπερτερεί έναντι άλλων στόχων (Leventelis et al., 2019). Μελέτες καταδεικνύουν μια σχέση μεταξύ του εθισμού από οπιοειδή και του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα των νευρώνων. Επαναλαμβανόμενη χρήση οπιοειδών προκαλούν βλάβη στον μηχανισμό της ντοπαμίνης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης οδηγεί στην αυτοοξειδωσή της σχηματίζοντας κινόνες και H_2O_2 . Το H_2O_2 μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με ιόντα μετάλλων (Fe^{++} και Cu^+) και μέσω της αντίδρασης Fenton θα δημιουργηθούν οι πολύ δραστικές ρίζες OH^\bullet που θα προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Τα οπιοειδή που συνδέονται με τις ROS ενεργοποιούν την οδό της Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK) προκαλώντας απόπτωση του νευρικού κυττάρου (Leventelis et al., 2019).

1.5. Θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών

Η βουπρενορφίνη και η μεθαδόνη είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία υποκατάστασης ασθενών που είναι εθισμένοι στα οπιοειδή. Η θεραπεία αυτή περιλαμβάνει τη συνταγογράφηση αυτών των φαρμάκων ως φαρμακευτικής υποστήριξης της εξάρτησης.

1.5.1. Μεθαδόνη

Η μεθαδόνη είναι πλήρης αγωνιστής του μ -υποδοχέα των οπιοειδών (Mooly et al., 2015). Είναι ένα συνθετικό οπιοειδές που αποτελείται από δύο εναντιομερή σε ίση ποσότητα, το ενεργό l(R) και το ανενεργό d(S) με την R μορφή να εμπλέκεται στα περισσότερα βιολογικά αποτελέσματα. Το ενεργό εναντιομερές l(R) έχει χρόνο ημιζωής 36-48 ώρες, ενώ το ανενεργό περίπου 16 ώρες. Η μεθαδόνη πληροί δύο βασικά κριτήρια για θεραπεία συντήρησης, την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα πάνω από 90% όταν χορηγείται από το στόμα και τον μεγάλο χρόνο ημιζωής για μακροχρόνια θεραπεία. Όταν λαμβάνεται σε υγρή μορφή από το στόμα υπόκειται σε μεταβολισμό πρώτης διόδου και, επομένως, είναι ανιχνεύσιμη στο πλάσμα περίπου 30 m μετά τη χορήγηση και ανέρχεται στα ανώτερα επίπεδα εντός 2 έως 4 ωρών με παρατεταμένη διάρκεια 24 ωρών. Λειτουργεί, επίσης, ως ανταγωνιστής του NMDA υποδοχέα επηρεάζοντας σημαντικά την ανάπτυξη ανοχής (Kreek et al., 2010, Oesterle et al.,

2019). Η μεθαδόνη μεταβολίζεται στο ήπαρ από το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C19 και CYP1A2) σε δύο μεταβολίτες, την πυρρολίνη και την πυρρολιδίνη και απεκκρίνεται μέσω των ούρων και των κοπράνων (Chiang et al., 2017, Kreek et al., 2010). Κατά τη διάρκεια του προγράμματος απεξάρτησης τα επίπεδα της μεθαδόνης είναι σταθερά, εξαιτίας της σταδιακής απελευθέρωσής της στο αίμα από τα ηπατικά αποθέματα (Kreek et al., 2010).

Στην έναρξη του θεραπευτικού προγράμματος χορηγούνται αρχικά 20-40 mg μεθαδόνης την ημέρα με σταδιακή αύξηση της δόσης κατά 10 mg κάθε 4-7 ημέρες, για να μην ξεπεραστεί το επίπεδο ανοχής από υπερδοσολογία που θα οδηγήσει σε αναπνευστική καταστολή (Kreek et al., 2010). Οι περισσότεροι ασθενείς απαιτούν 80-120 mg μεθαδόνης την ημέρα, ενώ φαίνεται ότι οι χαμηλότερες δόσεις είναι λιγότερο αποτελεσματικές για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος (Oesterle et al., 2019). Η μεθαδόνη συνταγογραφείται με τη μορφή δισκίων, αλλά μπορεί να χορηγηθεί και σε ενέσιμη μορφή για ενδομυϊκή, υποδόρια ή ενδοφλέβια χρήση. Το υγρό σκεύασμα αποτελεί την πιο κοινή και οικονομικά συμφέρουσα στρατηγική χορήγησης μεθαδόνης (Ferrari et al., 2004). Τα ακόλουθα προϊόντα μεθαδόνης είναι εγκεκριμένα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA): ταμπλέτες δολοφίνης (υδροχλωρική μεθαδόνη) και μεθαδόζη (υδροχλωρική μεθαδόνη) πόσιμο συμπύκνωμα (FDA, 2019).

1.5.2. Βουπρενορφίνη

Η βουπρενορφίνη, όπως και η μεθαδόνη, χρησιμοποιείται ως φάρμακο υποκατάστασης για τη διαχείριση του εθισμού στα οπιοειδή. Είναι ένα ημισυνθετικό οπιοειδές που προέρχεται από τη θηβαΐνη. Συνδέεται με υψηλή συγγένεια και με τις τρεις κύριες κατηγορίες υποδοχέων οπιοειδών (μ, κ, δ) και με χαμηλότερη συγγένεια με τον υποδοχέα της ορφανίνης. Αποτελεί μερικό αγωνιστή των μ-υποδοχέων των οπιοειδών και ανταγωνιστή των κ και δ υποδοχέων (Rosenthal & Gorađia, 2017). Ως μερικός αγωνιστής, το μέγιστο αποτέλεσμα που παράγεται από αυτό το φάρμακο είναι μικρότερο από αυτό που παράγεται από έναν πλήρη αγωνιστή του μ-υποδοχέα, όπως είναι η μεθαδόνη. Η βουπρενορφίνη είναι αρκετά δύσκολο να εκτοπιστεί από τον μ-υποδοχέα λόγω της υψηλής συγγένειάς της, γεγονός που εξηγεί την ικανότητά της να εμποδίζει τις επιδράσεις άλλων οπιοειδών, όπως η ηρωίνη. Αυτή η δέσμευση του μ-υποδοχέα από την βουπρενορφίνη φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη και

μπορεί να ξεπεραστεί με υψηλότερες δόσεις άλλων οπιοειδών ή με οπιοειδή υψηλής συγγένειας, όπως η φαιντανύλη (Oesterle et al., 2019, Coe et al., 2019). Ακόμη, η βουπρενορφίνη έχει υψηλή δραστηριότητα και συνεπώς η δόση που απαιτείται, για να προκληθεί ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι χαμηλότερη από αυτή που απαιτούν οι πλήρεις αγωνιστές οπιοειδών (Aquino et al., 2021). Η βουπρενορφίνη έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από 24 έως 42 ώρες δίνοντας τη δυνατότητα στους ασθενείς να ασχολούνται φυσιολογικά με τις καθημερινές τους δραστηριότητες (Coe et al., 2019). Η έναρξη των επιδράσεων της βουπρενορφίνης αρχίζει 30-60 λεπτά μετά τη χορήγηση και τα μέγιστα κλινικά αποτελέσματα παρατηρούνται σε 1-4 ώρες (Khanna & Pillarisetti, 2015).

Στην έναρξη του θεραπευτικού προγράμματος χορηγούνται αρχικά 2-4 mg βουπρενορφίνης με σταδιακή αύξηση μέχρι τα 14-16 mg την ημέρα (Saxon et al., 2013). Μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων του συνδρόμου στέρησης, είναι δυνατή η αύξηση της δοσολογίας μέχρι 32 mg την ημέρα (Nutt 2015, Saxon et al., 2013). Η βουπρενορφίνη διατίθεται με τη μορφή υπογλώσσιων ή στοματικών δισκίων ή φιλμ, δερματικών εμπλάστρων και παρεντερικών σκευασμάτων παρατεταμένης αποδέσμευσης (ένεση ή εμφύτευμα). Παρασκευάζεται σε σκευάσματα που περιέχουν μόνο βουπρενορφίνη ή σε συνδυασμό με ναλοξόνη (BUP/NX) ώστε να αποφεύγεται η κατάχρηση (Zoozob & Grubb, 2018). Τα ακόλουθα προϊόντα βουπρενορφίνης είναι εγκεκριμένα από τον FDA: γενικά υπογλώσσια δισκία BUP/NX, υπογλώσσια δισκία βουπρενορφίνης (Subutex), υπογλώσσια φιλμ BUP/NX (Suboxone), υπογλώσσια δισκία BUP/NX (Zubsolv), στοματικό φιλμ BUP/NX (Bunavail), εμφυτεύματα βουπρενορφίνης (προβουφίνη), ένεση βουπρενορφίνης παρατεταμένης αποδέσμευσης (Sublocade) (FDA, 2019). Η θεραπεία συντήρησης με βουπρενορφίνη είναι σχετικά ασφαλής. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν άγχος, δυσκοιλιότητα, ζάλη, υπνηλία, πονοκέφαλο, ναυτία και καταστολή (Zoozob & Grubb, 2018). Ωστόσο, όταν συνδυάζεται με κατασταλτικά του αναπνευστικού, όπως είναι οι βενζοδιαζεπίνες και το αλκοόλ υπάρχει αυξημένος κίνδυνος υπερδοσολογίας και θανάτου (Oesterle et al., 2019).

1.5.3. Θεραπεία υποκατάστασης και οξειδωτικό στρες

Η φαρμακευτική υποστήριξη της εξάρτησης τόσο με βουπρενορφίνη όσο και με μεθαδόνη προκαλεί οξειδωτικό στρες και εξασθενεί την αντιοξειδωτική άμυνα. Αυτό αποδείχθηκε από την μειωμένη συγκέντρωση GSH και την δραστηριότητα CAT στα

ερυθροκύτταρα και αυξημένες συγκεντρώσεις βιοδεικτών οξειδωσης λιπιδίων (ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) και πρωτεϊνών (πρωτεϊνικά καρβονύλια) στο πλάσμα ασθενών (Leventelis et al., 2019). Παρόλο που η βουπρενορφίνη και η μεθαδόνη προκαλούν οξειδωτικό στρες, αυτό γίνεται σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τα οπιοειδή (π.χ. ηρωίνη) από τα οποία μπορεί να έχει εξάρτηση ένας ασθενής. Η μεθαδόνη έχει πιο έντονη οξειδωτική δράση σε αντίθεση με την βουπρενορφίνη που φαίνεται να έχει λιγότερο σοβαρές επιπτώσεις στο οξειδωτικό στρες, καθώς διατηρεί υψηλότερη ποσότητα εγγενών αντιοξειδωτικών. Ταυτόχρονη εξωγενής χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να δράσει προστατευτικά έναντι της δημιουργίας ελεύθερων ριζών από τα οπιοειδή που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία συντήρησης (Leventelis et al., 2019).

1.6. Αντιοξειδωτική δράση του ροδιού

1.6.1. Καρπός της ροδιάς

Η ροδιά (*Punica granatum L.*) είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος που καλλιεργείται ευρέως στη Μέση Ανατολή, την Ευρώπη και τις χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας. Ανήκει στην οικογένεια πουνικίδες (Punicaceae) και στο γένος *Punica*, ενώ υπάρχουν δύο είδη: *Punica granatum* και *Punica protopunica* (Das et al., 2021, Kandyliis & Kokkinomagoulos, 2019). Ο καρπός της ροδιάς αποτελείται από τρία μέρη, τους σπόρους, τον χυμό και τον φλοιό και το κάθε μέρος έχει το δικό του χημικό χαρακτήρα. Οι σπόροι είναι ενσωματωμένοι σε μια λευκή μεμβράνη που περιβάλλεται από το περικάρπιο, ένα παχύ στρώμα μεμβράνης που αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% του βάρους του καρπού. Οι σπόροι (10%) περιβάλλονται από μία ημιδιάφανη κόκκινη μεμβράνη που περιλαμβάνει τον χυμό, δημιουργώντας ένα «σάκο» που ονομάζεται aril (40%). Αυτά τα δύο (σπόροι και arils) αποτελούν το βρώσιμο μέρος και αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο 50% του καρπού (Kandyliis & Kokkinomagoulos, 2019, Magangana et al., 2020).

1.6.2. Χημική σύσταση του χυμού του ροδιού

Ο χυμός του ροδιού αποτελεί πηγή πολύτιμων θρεπτικών ουσιών. Η περιεκτικότητά του στα διάφορα συστατικά εξαρτάται από την ποικιλία του ροδιού, την περιοχή της καλλιέργειας, το κλίμα και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού. Σύμφωνα με έρευνες, ο χυμός του ροδιού αποτελείται από νερό (85,4%), πολυφαινόλες (0,2–1%), σάκχαρα (10,6%) όπως φρουκτόζη, σακχαρόζη και γλυκόζη και πηκτίνη (1,4%). Περιέχει

επίσης μικρές ποσότητες λιπαρών οξέων, στερολών, οργανικών οξέων (ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ, φουμαρικό οξύ και μηλικό οξύ) και τριτερπενοειδών. Επιπλέον, περιέχει μικρές ποσότητες όλων των αμινοξέων, ειδικότερα προλίνη, μεθειονίνη και βαλίνη. Στον χυμό περιλαμβάνονται μεσαίες συγκεντρώσεις μετάλλων, όπως ασβεστίου, νατρίου, μαγνησίου, σεληνίου, ψευδαργύρου, καυσίου, κοβαλτίου κ.ά. (Moga et al., 2021, Zarfeshany et al., 2014). Η χημική σύνθεση του ροδιού ανά 100 γραμμάρια φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Χημική σύσταση ροδιού (Zarfeshany et al., 2014)

Θρεπτικές Ουσίες	Μονάδες	Τιμή ανά 100g
Νερό	g	77,93
Ενέργεια	Kcal	83
Πρωτεΐνες	g	1,67
Λιπαρά	g	1,17
Υδατάνθρακες	g	18,70
Σάκχαρα	g	13,67
Ασβέστιο	Mg	10
Σίδηρος	Mg	0,3
Κάλιο	Mg	236
Νάτριο	Mg	3

Τόσο ο χυμός όσο και ο φλοιός είναι πλούσια σε πολυφαινόλες. Οι μεγαλύτερες κατηγορίες περιλαμβάνουν τανίνες και φλαβονοειδή με αντιοξειδωτική δράση. Η οικογένεια των υδρολυόμενων τανινών περιέχει δύο μέλη, τις ελλαγιταννίνες και τις γαλλοταννίνες, οι οποίες μπορεί να υδρολυθούν σε ελλαγικό και γαλλικό οξύ, αντίστοιχα. Δύο άλλες ελλαγιταννίνες που βρίσκονται τόσο στο χυμό όσο και στο φλοιό του ροδιού είναι η πουνικαλαγίνη και η πουνικαλίνη. Η πουνικαλαγίνη είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης του χυμού του ροδιού. Ένα άλλο πολύ σημαντικό συστατικό στο χυμό του

ροδιού είναι οι ανθοκυανίνες. Είναι υδατοδιαλυτές φυτικές χρωστικές, ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών και ευθύνονται για το κόκκινο χρώμα του χυμού. Οι ανθοκυανίνες είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις στον χυμό του ροδιού. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο φλοιός του ροδιού συγκεντρώνει περισσότερες φαινολικές ενώσεις σε σχέση με τον χυμό. (Zarfeshany et al., 2014, Kandylyis & Kokkinomagoulos, 2019). Οι σπόροι του ροδιού περιέχουν υψηλά επίπεδα τανινών και ανθοκυανινών. Περιέχουν έλαιο που αντιπροσωπεύει περίπου το 12-20% του βάρους του καρπού και έχει αρκετές θεραπευτικές ιδιότητες. Το έλαιο των σπόρων αποτελείται κυρίως από λιπαρά οξέα (>95%). Το πουνικικό οξύ, το οποίο είναι ένα ισομερές του λινολεϊκού οξέος, μπορεί να βρεθεί αποκλειστικά στους σπόρους του ροδιού και αντιπροσωπεύει σχεδόν το 76% του σπορέλαιου.

1.6.3. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροδιού

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα του ροδιού και την ευεργετική του δράση έναντι των ελεύθερων ριζών. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροδιού σχετίζονται κυρίως με τις υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών, όπως οι ελλαγιταννίνες, οι υδρολύμενες τανίνες, οι ανθοκυανίνες, διάφορα άλλα φλαβονοειδή και τα πολυφαινολικά οξέα. Η πουνικαλαγίνη είναι η κύρια ελλαγιταννίνη που είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του ροδιού. Η αντιοξειδωτική δράση του χυμού του ροδιού φαίνεται ότι είναι 3 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι και 2 έως 6 φορές ισχυρότερη σε σύγκριση με άλλα φυσικά ποτά (Caliskan et al., 2016). Οι Sharma et al., (2017) ισχυρίζονται ότι αυτό οφείλεται στις ανθοκυανίνες που περιέχει το ρόδι που έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα αναγνωρισμένα αντιοξειδωτικά στο κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι. Οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν ισχυρή δράση έναντι του H₂O₂, με κυριότερη αυτή της πελαργονιδίνης (Noda et al., 2002). Βρέθηκε, επίσης, ότι ο χυμός του ροδιού αυξάνει τα επίπεδα της GSH στα ερυθροκύτταρα και μειώνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την οξείδωση των πρωτεϊνών (Das et al., 2021).

1.6.4. Φαρμακευτικές ιδιότητες του ροδιού

Μελέτες έχουν δείξει ότι το ρόδι και τα συστατικά του μπορούν να επηρεάσουν αποτελεσματικά το μονοπάτι σηματοδότησης που εμπλέκεται στη φλεγμονή, την αγγειογένεση, την έναρξη της ογκογένεσης και, τελικά, την καταστολή των τελικών σταδίων ογκογένεσης και μετάστασης (Sharma et al., 2017). Επιπλέον, βελτιώνει την

επούλωση των πληγών και είναι ευεργετικό για το αναπαραγωγικό σύστημα. Αν και έχουν γίνει πολλές κλινικές δοκιμές σε πειραματόζωα, για να αποδειχθεί η θεραπευτική δράση του ροδιού, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σε ανθρώπους για την κατανόηση των θεραπευτικών του δυνατοτήτων (Zarfeshany et al., 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ

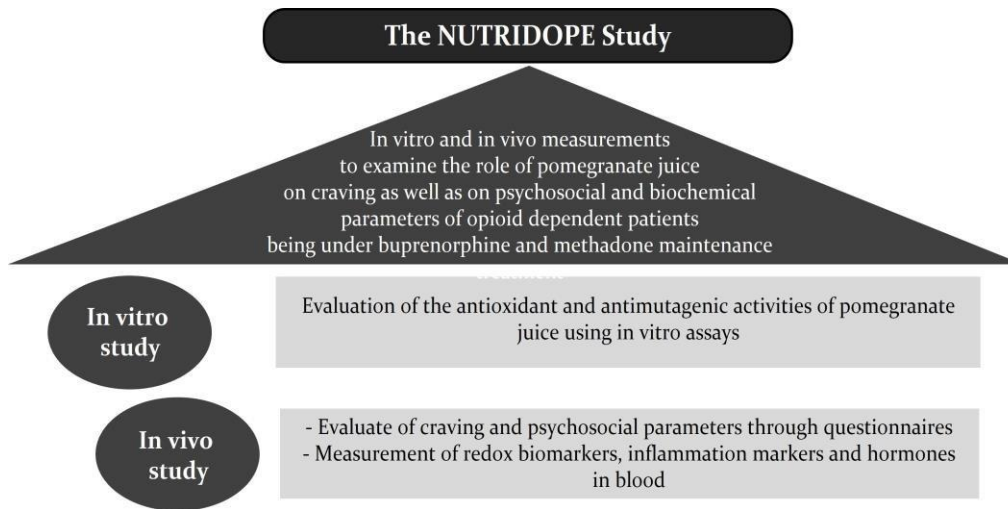
Η βουπρενορφίνη και η μεθαδόνη χρησιμοποιούνται σήμερα ως θεραπείες υποκατάστασης για την αντιμετώπιση της εξάρτησης από οπιοειδή. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι προκαλούν οξειδωτικό στρες στους ασθενείς, αν και σε χαμηλότερο βαθμό από οπιοειδή όπως η ηρωίνη. Επομένως, η υιοθέτηση κάποιας διατροφικής παρέμβασης με αντιοξειδωτικές ιδιότητες θα μπορούσε να βοηθήσει προς την κατεύθυνση της επιτυχημένης απεξάρτησης. Σε αυτή τη βάση, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία αποτελεί ένα κομμάτι μίας μεγάλης ερευνητικής προσέγγισης, είναι η αξιολόγηση της επίδρασης χυμού από ρόδι πλούσιου σε αντιοξειδωτικά συστατικά στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος ασθενών ενταγμένων σε προγράμματα υποκατάστασης της εξάρτησης από οπιοειδή υπό μεθαδόνη και βουπρενορφίνη. Ανώτερος στόχος της μελέτης είναι η βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών και η μείωση της επιθυμίας χρήσης οπιοειδών ώστε να επιτευχθεί η ομαλή απεξάρτηση και η επανένταξή τους στο κοινωνικό σύνολο.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Μεθοδολογία

Σχεδιασμός και περιγραφή της μελέτης

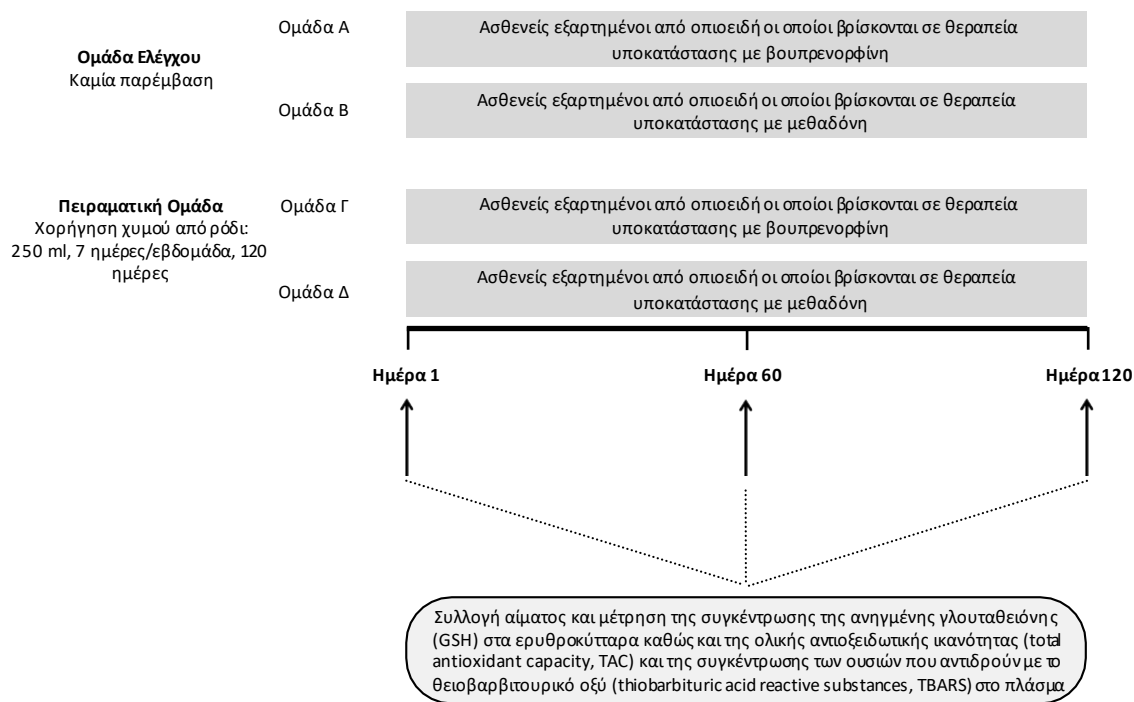
Η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι μέρος μιας ευρύτερης πειραματικής προσέγγισης, της μελέτης NUTRIDOPE (NUTRItion-driven Detoxification of OPIoid addicted patiEnts), η οποία ως προς τη δεοντολογία και τη μεθοδολογία έχει εγκριθεί από το Συμβούλιο Αναθεώρησης του Οργανισμού Κατά των Ναρκωτικών (OKANA, Αθήνα, Ελλάδα) (αριθμός αναφοράς 44482-2/12/2020) και οι διαδικασίες που εφαρμόζονται είναι σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, όπως αναθεωρήθηκε το 2013. Η μελέτη NUTRIDOPE είναι μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, η λογική της οποίας απεικονίζεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Περιγραφή της μελέτης NUTRIDOPE

Το Σχήμα 2 απεικονίζει τον πειραματικό σχεδιασμό της παρούσας μελέτης. Σύμφωνα με αυτόν, οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν τυχαία, με χρήση λογισμικού υπολογιστή, στις παρακάτω τέσσερις ομάδες: Ομάδα Α: Ασθενείς εξαρτημένοι από οπιοειδή οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης με βουπρενορφίνη στους οποίους δεν εφαρμόστηκε καμία παρέμβαση (N=8), Ομάδα Β: Ασθενείς εξαρτημένοι από οπιοειδή οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης με μεθαδόνη στους οποίους δεν εφαρμόστηκε καμία παρέμβαση (N=10), Ομάδα Γ: Ασθενείς εξαρτημένοι από οπιοειδή οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης με βουπρενορφίνη στους οποίους χορηγήθηκε χυμός από ρόδι (N=19) και Ομάδα Δ: Ασθενείς εξαρτημένοι από οπιοειδή οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης με μεθαδόνη στους οποίους χορηγήθηκε χυμός από ρόδι (N=21). Ο χυμός ροδιού, που είναι η εξεταζόμενη διατροφική παρέμβαση, χορηγήθηκε στους συμμετέχοντες της πειραματικής ομάδας σε δοσολογία 250 ml/ημέρα, 7 ημέρες/εβδομάδα, 120 ημέρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η χορήγηση χυμού από ρόδι σε παρόμοια δόση ασκεί ευεργετικά αποτελέσματα σε υπέρβαρους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και σε ασθενείς με μέτριο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. Επιπλέον, δεν έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες, ωστόσο παράμετροι των συμμετεχόντων όπως η αρτηριακή πίεση, ο καρδιακός ρυθμός και οι συγκεντρώσεις των ηπατικών τρανσαμινασών μετρούνταν τακτικά χωρίς να διαπιστωθούν προβλήματα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν

αιμοληψίες σε τρεις χρονικές στιγμές και συγκεκριμένα πριν από την έναρξη του το πείραμα (ημέρα 1), στη μέση (ημέρα 60) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 120).



Σχήμα 2. Ο πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης

Προμήθεια του χυμού ροδιού

Ο χυμός από ρόδι που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι ένα 100% φυσικό προϊόν χωρίς συντηρητικά. Παραχωρήθηκε ευγενικά από την εταιρεία Rodi Hellas SA, Πέλλα, Ελλάδα. Το προϊόν είναι σύμφωνο με τα πιστοποιητικά διασφάλισης ποιότητας ISO 22000:2005, Global Gap, Grasp και Kosher.

Συμμετέχοντες

Στην έρευνα αυτή συμμετείχαν ασθενείς υπό θεραπεία υποκατάστασης που είναι μέλη των θεραπευτικών μονάδων του Οργανισμού κατά των Ναρκωτικών (ΟΚΑΝΑ). Τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού φαίνονται στον Πίνακα 3. Οι ασθενείς ενημερώθηκαν για τους στόχους της μελέτης, τους κινδύνους και τις δυσκολίες που θα αντιμετωπίσουν δυνητικά, καθώς και τα αναμενόμενα οφέλη που θα αποκομίσουν μετά την ολοκλήρωση αυτής της έρευνας. Κάθε ασθενής συμπλήρωσε μια γραπτή φόρμα συναίνεσης πριν από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Όλα τα προσωπικά δεδομένα και οι πληροφορίες λήφθηκαν είναι κατηγορηματικά

εμπιστευτικά και μόνο οι ερευνητές έχουν αυστηρή πρόσβαση σε αυτά. Επιπλέον, τα δεδομένα που λήφθηκαν φυλάσσονται σε υπολογιστές με κωδικό πρόσβασης που παραμένουν εντός του OKANA και δεν θα μεταφερθούν ποτέ εκτός των εγκαταστάσεων του Ιδρύματος αυτού.

Πίνακας 3: Τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού των ασθενών.

Κριτήρια ένταξης ασθενών	Κριτήρια αποκλεισμού ασθενών
Να έχουν συμπληρώσει το 20ό έτος της ηλικίας τους	Να πάσχουν από σοβαρές ψυχοπαθολογικές και άλλες σοβαρές παθήσεις (π.χ. AIDS, ηπατίτιδα)
Να κάνουν μακροχρόνια χρήση ηρωίνης ή άλλων οπιοειδών	Χρήση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων
Να υποφέρουν από φυσική ή πνευματική εξάρτηση λόγω της χρήσης οπιοειδών	Επανακύλιση στη χρήση ψυχοδραστικών ουσιών (πραγματοποίηση εξετάσεων στα ούρα σε εβδομαδιαία βάση)

Φαρμακευτική θεραπεία για τον εθισμό

Οι ασθενείς υπό θεραπεία υποκατάστασης για την αντιμετώπιση της εξάρτησης σε οπιοειδή λαμβάνουν καθημερινά διάλυμα υδροχλωρικής μεθαδόνης (10 mg/ml) και χάπια βουπρενορφίνης/βουπρενορφίνης-ναλοξόνης (2 mg - 8 mg), σύμφωνα με τις υπάρχουσες οδηγίες δόσης.

Δημογραφικά δεδομένα

Πριν από την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών συλλέχθηκαν δημογραφικά στοιχεία από όλους τους συμμετέχοντες και συγκεκριμένα πληροφορίες, όπως το φύλο, η ηλικία, το μορφωτικό επίπεδο, η εθνικότητα, η οικογενειακή κατάσταση, η επαγγελματική κατάσταση, η περιοχή διαμονής, ο αριθμός των ετών που παρακολουθούν πρόγραμμα απεξάρτησης στον OKANA, η ηλικία από την οποία άρχισαν να χρησιμοποιούν οπιοειδή (π.χ. ηρωίνη), και οι χρόνιες ασθένειες από τις οποίες πάσχουν.

Συλλογή και χειρισμός αίματος

Ολικό αίμα συλλέχθηκε στις χρονικές στιγμές που αναφέρθηκαν παραπάνω και τοποθετήθηκε σε φιαλίδια με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ως αντιπηκτικό παράγοντα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το πλάσμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τις αναλύσεις. Στη συνέχεια, απεσταγμένο νερό προστέθηκε στα ερυθροκύτταρα (1:1 v:v) και μετά από φυγοκέντρηση, το προϊόν

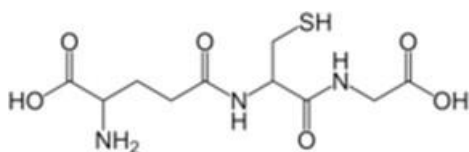
λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα) συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε επίσης στους -80°C .

3.2. Πρωτόκολλα για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής που μελετήθηκαν

3.2.1. Γλουταθειόνη στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Η γλουταθειόνη (γ -γλουταμυλοκυστείνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη ένωσηθειόλης (SH) στους ιστούς των ζώων. Είναι ένα τριπεπίδιο που προκύπτει φυσικά και περιέχει μια πεπτιδική σύνδεση μεταξύ γλουταμινικού, γλυκίνης και κυστεΐνης. Οι αναγωγικές ιδιότητες της γλουταθειόνης παίζουν κεντρικό ρόλο στα μεταβολικά μονοπάτια, καθώς και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στην ανηγμένη της μορφή (GSH), καθώς το ένζυμο, που την επαναφέρει από την οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG), η αναγωγή της γλουταθειόνης, είναι ιδιόσυστα ενεργό και επαγωγίμο στο οξειδωτικό στρες. Στην πραγματικότητα, η αναλογία ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη εντός των κυττάρων χρησιμοποιείται συχνά επιστημονικά ως μέτρο κυτταρικής τοξικότητας.

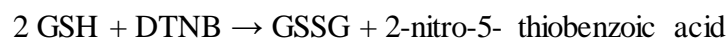


Εικόνα 9: Σκελετική δομή της γλουταθειόνης

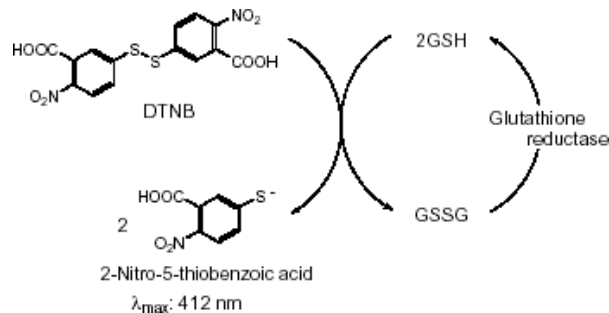
Η GSH απαιτείται ως συνένζυμο από μια ποικιλία ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της θειολοτρανσφεράσης. Η GSH διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων, στον μεταβολισμό του ασβεστίου, στον κύκλο της γ -γλουταμύλης, στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων και της κυτταρικής μεμβράνης. Η GSH είναι ζωτικής σημασίας για μια ποικιλία διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της αποτοξίνωσης των ξеноβιοτικών, της διατήρησης του επιπέδου $-SH$ των πρωτεϊνών, της ανταλλαγήςθειόλης-δισουλφιδίου, της απομάκρυνσης των υδροϋπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών, και της μεταφοράς αμινοξέων μέσω των

μεμβρανών. Οι φυσιολογικές τιμές για τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής GSH κυμαίνονται γενικά από 1 έως 10 mM.

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το δίθειο-δύο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, ένα έγχρωμο ιόν, το οποίο απορροφά το φως στα 412 nm. Δεδομένου ότι το DTNB είναι ένα κίτρινο προϊόν, η συγκέντρωση της GSH σε ένα διάλυμα δείγματος μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση απορρόφησης στα 412 nm.



Η GSH παράγεται από τη GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Επομένως, αυτή η αντίδραση ανακύκλωσης βελτιώνει την ευαισθησία της ανίχνευσης της ολικής γλουταθειόνης (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Αρχή της ποσοτικοποίησης της γλουταθειόνης

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 7,95)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

Για την παρασκευή 500 mL από το phosphate buffer, φτιάχτηκαν 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 475 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίστηκαν 0,227 g και διαλύθηκαν σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίστηκαν 5,94 g και διαλύθηκαν σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμίχτηκαν 475 διαλυμάτων Na₂HPO₄ και KH₂PO₄. Εάν απαιτείται, γίνεται διόρθωση με NaOH ή 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 ($C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, tri-sodium dihydrate), MB:294,10

Φτιάχνεται πρώτα το κιτρικό νάτριο 1% διαλύοντας 1 g κιτρικού νατρίου σε 100 mL νερό. Στη συνέχεια, διαλύθηκαν 0,0396 g DTNB. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο, το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματική διαδικασία

Οι παρακάτω ποσότητες προστέθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια:

	Τυφλό (μl)	Δείγμα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα	660	660
DTNB 1 mM	330	330
Απεσταγμένο νερό (dH₂O)	20	—
Ερυθροκυτταρικό Αιμόλυμα	—	20

Τα σωληνάρια αναδεύτηκαν και επώαστηκαν 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. Το περιεχόμενό τους μεταφέρθηκε σε πλαστική κυψελίδα και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412 nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση GSH (mmol/g Hb) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta A_{\text{τυφλού}} / 13,6) \times 262,6$, όπου το 262,6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο της αντίδρασης (1010 μ L) με τον όγκο του δείγματος (20 μ L) ($1010 / 20 = 50,5$), πολλαπλασιάζοντας επί 2 για να ληφθεί υπόψη η πρώτη αραίωση που έγινε με απεσταγμένο νερό (1:1) κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και τέλος με $2 \times 1,3$ για να ληφθεί υπόψη η δεύτερη και η τρίτη αραίωση που έγινε από το TCA 5 % (500 μ L / 500 μ L και είτε 390 μ L / 300 μ L είτε 260 μ L / 200 μ L). Το 13,6 (L/mmol/cm) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Για τον καθαρισμό προστέθηκαν 500 μl αιμολύματος και 500 μl 5% TCA σε φιαλίδια και αναδεύτηκαν. Φυγοκεντρήθηκαν στα 28620g, 5 λεπτά, 5 °C. Έπειτα 300 μl από το υπερκείμενο προστέθηκαν σε φιαλίδια. Προστέθηκαν 90 μl 5% TCA σε κάθε φιαλίδιο και αναδεύτηκαν. Φυγοκεντρήθηκαν στα 28620g, 5 λεπτά, 5 °C . Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό φιαλίδιο για την γλουταθειόνη (80-100μl).

Hb: Η αιμοσφαιρίνη.

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίστηκε με εμπορικά διαθέσιμο kit.

3.2.2. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων. Η αποσύνθεση των ασταθών υπεροξειδίων που προέρχονται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μαλονδιαλδεΐδης (MDA), η οποία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μετά την ελεγχόμενη αντίδρασή της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Η μέτρηση αυτών των «αντιδρώντων ουσιών με θειοβαρβιτουρικό οξύ» (TBARS) είναι μια καθιερωμένη μέθοδος για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης (MDA). Η μαλονδιαλδεΐδη (MDA) σχηματίζει ένα προϊόν προσθήκης 1:2 με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), το οποίο μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία. Τα TBARS επιστρέφουν σε φυσιολογικά επίπεδα με την πάροδο του χρόνου, ανάλογα με την παρουσία αντιοξειδωτικών. Η δοκιμή TBARS είναι ένας γρήγορος και εύκολος τρόπος για την αξιολόγηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων ως τα επίπεδα της παραγοντοποιημένης MDA. Το προϊόν είναι το προϊόν προσθήκης MDA(TBA)₂, του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 530 nm.

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7,4)

MB (Tris): 121,14

MB (HCl): 36,46 (stock 37%) [10,1 N]

Για την παρασκευή ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχτηκαν 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0,1 N). Για το Tris ζυγίστηκαν 0,61 g και διαλύθηκαν σε 25 mL

νερού. Για το HCl διαλύθηκαν 0,42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως μεταφέρθηκαν τα 25 mL από το Tris και προστέθηκαν αργά τα 42 mL του HCl και μετά προστέθηκε νερό ως τα 100 mL. Το pH ρυθμίστηκε στο 7,4. Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxymethylaminomethane) για την 2-αμινο-2-υδροξυμεθυλ-1,3-προπανοδιόλη. Χρησιμοποιείται ευρέως ως συστατικό ρυθμιστικών διαλυμάτων, όπως σε ρυθμιστικά διαλύματα TAE και TBE, με αποτελεσματικό εύρος pH μεταξύ 6,5 και 9,7.

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144,1

MB (Na₂SO₄): 142,04

Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίστηκαν 2,84 g Na₂SO₄ και 0,08 g TBA, μεταφέρθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 10 mL νερού. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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

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

Πειραματική διαδικασία

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες 15 ml προστέθηκαν 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή αποσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προστέθηκαν 500 μL TCA 35% και 500 μL TrisHCl και αναδεύτηκαν.
3. Επώστηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προστέθηκαν 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επώστηκαν στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.
5. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρθηκαν στον πάγο και αφήθηκαν να κρυώσουν για 5 min.
6. Προστέθηκαν 1 mL TCA 70% και αναδεύτηκαν.
7. Μεταφέρθηκαν 1 mL σε πλαστικά φιαλίδια και φυγοκεντρήθηκαν στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
8. Μεταφέρθηκαν με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε καθαρή κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 530 nm.

Το TCA προστίθεται στον ορό προκειμένου οι πρωτεΐνες του ορού να κατακρημνιστούν. Το Tris-HCl είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας, που βοηθά στη δημιουργία ενζυματικών αντιδράσεων. Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται ως ξηραντικός παράγοντας για οργανικά διαλύματα.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3.100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3.100 / 100 = 31). Το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156.000 (L/mol/cm) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

3.2.3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (total antioxidant capacity, TAC) στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity, TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Είναι ένας δείκτης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Κάθε αντιοξειδωτικό συστατικό του πλάσματος έχει από μόνο του μια αντιοξειδωτική δράση και το καθένα συνεισφέρει διαφορετικά στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι ο ισχυρότερος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για το TAC, ενώ οι ολικές θειόλες, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E συμβάλλουν επίσης στο TAC. Η TAC του πλάσματος υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) που είναι μια εμπορική ελεύθερη ρίζα. Παρουσία ενός δότη υδρογόνων (δηλαδή ενός αντιοξειδωτικού μορίου) που υπάρχει στο πλάσμα, η ελεύθερη ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης. Η εξάντληση της ρίζας αξιολογείται φασματοφωτομετρικά με τη μείωση της απορρόφησης στα 520 nm. Κανονικά, η τιμή TAC του θετικού μάρτυρα (το δείγμα που περιέχει ασκορβικό οξύ) πρέπει να είναι χαμηλότερη από την τιμή του δείγματος ενώ η τιμή TAC του τυφλού θα πρέπει να είναι η υψηλότερη.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 10 mM (pH 7,4)

MB (KH_2PO_4): 136 g/mol

MB (Na_2HPO_4): 178g/mol

Για την παρασκευή 500 mL του phosphate buffer, φτιάχτηκαν 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίστηκαν 0,136 g και διαλύθηκαν σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίστηκαν 0,712 g και διαλύθηκαν σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμείχτηκαν τα 400 από τα διαλύματα Na_2HPO_4 και KH_2PO_4 . Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7,4.

DPPH (2,2-diphenyl-1 picryl hydrazyl) 0.1 mM. MB: 394,32

Διαλύθηκαν 0,02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και αναμείχτηκαν με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώθηκαν 100 φορές με μεθανόλη και αναμείχτηκαν ξανά με μαγνητάκι για τελική συγκέντρωση 0,1 mM. Τυπικά γίνεται αραιώση 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19,8 mL μεθανόλης. Το ποτήρι ζέσεως στο οποίο φτιάχνεται το DPPH καλύπτεται με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

Ασκορβικό οξύ ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) MB: 176,12 g/mol

Διαλύθηκαν 1,76 mg σε 1 mL αποσταγμένο νερό για να παραχθεί ένα διάλυμα 10 mM. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C έτοιμο προς χρήση.

Πειραματική διαδικασία

Οι ακόλουθες ποσότητες προστέθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια

	Τυφλό (μl)	Δείγμα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα	500	480
DPPH 0,1 mM	500	500
Πλάσμα	—	20

Τα φιαλίδια ανακινούνται αρκετές φορές και επωάζονται στο σκοτάδι για 60 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στα 15.000 g στους 25°C . Μεταφέρονται 900 mL του υπερκειμένου από κάθε σωληνάριο σε πλαστική κυψελίδα και διαβάζεται η απορρόφηση στα 520 nm.

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

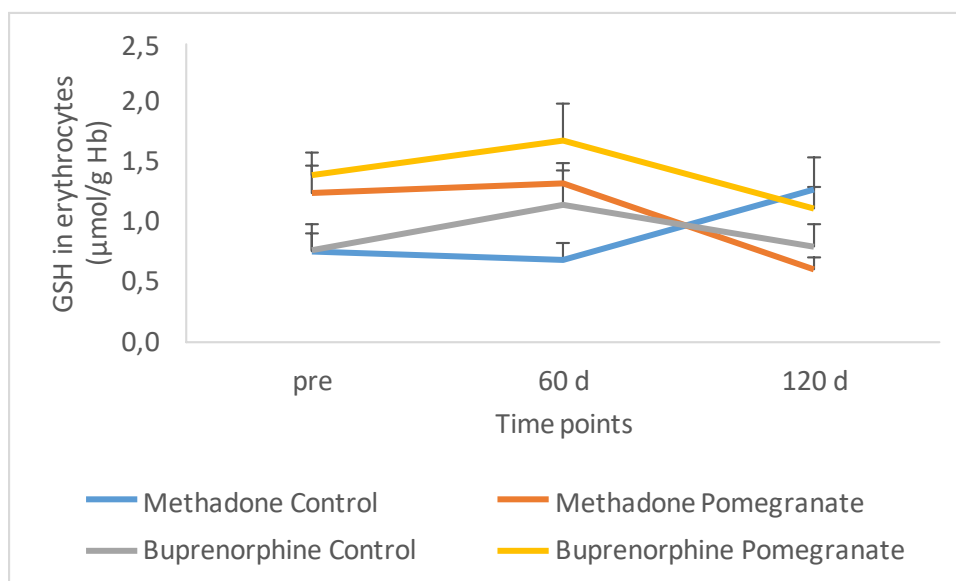
Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης. Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$. Πολλαπλασιάζουμε με το 50 για να λάβουμε υπόψη την αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα (1000 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L} = 50$). Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L πλάσματος σε mL πλάσματος .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 4. Τα δημογραφικά δεδομένα των ασθενών. SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation).

Δημογραφικά χαρακτηριστικά		Ασθενείς υπό μεθαδόνη N (%)	Ασθενείς υπό βουπρενορφίνη N (%)
Φύλο	Γυναίκες	13 (58,1)	4 (14,8)
	Άνδρες	18 (42,0)	23 (85,2)
Εκπαιδευτικό επίπεδο	Κανένα	0 (0)	0 (0)
	Πρωτοβάθμια εκπαίδευση	6 (19,4)	10 (37,0)
	Δευτεροβάθμια εκπαίδευση	24 (77,44)	17 (63,0)
	Τριτοβάθμια εκπαίδευση	0 (0)	0 (0)
Εθνικότητα	Μεταπτυχιακές σπουδές	1 (3,2)	0 (0)
	Ελληνική	30 (96,7)	22 (81,5)
Ασφάλεια	Άλλη	1 (3,3)	5 (18,5)
	Ναι	22 (71,0)	20 (74,1)
Κοινωνική κατάσταση	Όχι	9 (29,0)	7 (25,9)
	Έγγαμη/ος	9 (29,0)	11 (40,7)
	Άγαμη/ος	0 (0)	2 (7,4)
	Σε χηρεία	0 (0)	0 (0)
Επαγγελματική κατάσταση	Διαζευγμένη/ος	23 (76,7)	14 (51,9)
	Σε διάσταση	0 (0)	0 (0)
	Πλήρης απασχόληση	7 (23,3)	11 (40,7)
Περιοχή διαμονής	Μερική απασχόληση	8 (7,3)	32 (9,6)
	Προσωρινή ανεργία	7 (6,4)	17 (5,1)
	Άνεργη/ος	65 (59,1)	221 (66,2)
	Αστική	31 (100,0)	27 (100,0)
Χρόνια νόσος	Μη αστική	0 (0,0)	0 (0,0)
	Σακχαρώδης διαβήτης	1 (3,2)	3 (1,1)
	Νεοπλασματική νόσος	1 (3,2)	3 (1,1)
	Καρδιαγγειακά νοσήματα	2 (6,5)	2 (7,4)
	Αναπνευστική νόσος	2 (6,5)	1 (3,7)
	Συστηματική νόσος	0 (0,0)	0 (0,0)
	Ψυχιατρικό νόσημα	9 (29,0)	4 (14,8)
	Καμία	16 (51,6)	14 (51,9)
		Έτη (Μέσος όρος±SD)	
Ηλικία		47,2 ± (7,2)	45,9 ± (6,8)
Διάρκεια στον ΟΚΑΝΑ		13,3 ± (5,7)	8,55 ± (3,7)
Ηλικία έναρξης χρήσης ουσιών		17,6 ± (5,5)	23,0 ± (7,7)
Διάρκεια χρήσης ουσιών (πριν την εισαγωγή στον ΟΚΑΝΑ)		13,7 ± (8,3)	16 ± (8,6)

4.1. Αποτελέσματα GSH

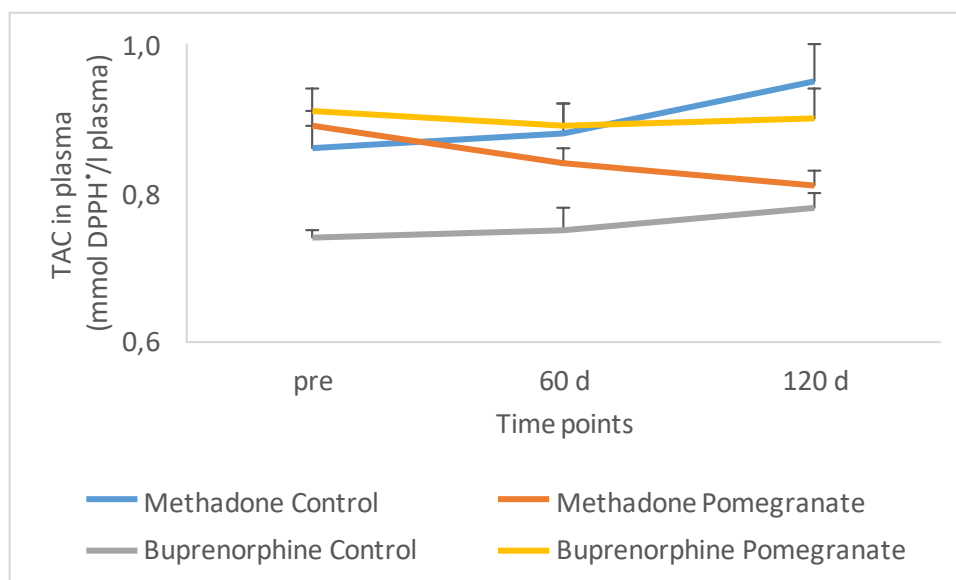


Σχήμα 3: Αποτελέσματα της επίδρασης της χορήγησης χυμού από ρόδι στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GR) των ερυθροκυττάρων.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης της επίδρασης της χορήγησης χυμού από ρόδι στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) των ερυθροκυττάρων

Κύρια Επίδραση	Ζευγαρωτές Συγκρίσεις (p)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meth-60 d-CON</i> <u>vs</u> <i>Meth-60 d-POM</i> ($p=0,05$) <p>Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) αύξησε τη συγκέντρωση της GSH στις 60 ημέρες (60 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CON)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meth-120 d-CON</i> <u>vs</u> <i>Meth-120 d-POM</i> ($p=0,01$) <p>Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε τη συγκέντρωση της GSH στις 120 ημέρες (120 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CON)</p>
• Βρέθηκε αλληλεπίδραση της παρέμβασης με τη θεραπεία υποκατάστασης ($p=0,05$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>POM-Meth-60 d</i> <u>vs</u> <i>POM-Meth-120 d</i> ($p=0,025$) <p>Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε τη συγκέντρωση της GSH στις 120 ημέρες (120 d) σε σύγκριση με τις 60 ημέρες (60 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth)</p>

4.2. Αποτελέσματα TAC



Σχήμα 4: Αποτελέσματα της επίδρασης της χορήγησης χυμού από ρόδι στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης της επίδρασης της χορήγησης χυμού από ρόδι στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος

Κύρια Επίδραση (p)	Ζευγαρωτές Συγκρίσεις (p)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meth-60 d-CON vs Meth-60 d-POM</i> ($p=0,05$) Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε την TAC στις 60 ημέρες (60 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CON)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meth-120 d-CON vs Meth-120 d-POM</i> ($p=0,027$) Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε την TAC στις 120 ημέρες (120 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CON)
• Βρέθηκε αλληλεπίδραση της παρέμβασης με τη θεραπεία υποκατάστασης ($p=0,05$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-pre-Meth vs CON-pre-Bupr</i> ($p=0,018$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) είχαν μειωμένα επίπεδα TAC πριν την έναρξη του πειράματος (pre) σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth)
• Βρέθηκε αλληλεπίδραση της παρέμβασης με τον χρόνο ($p=0,03$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-120 d-Meth vs CON-120 d-Bupr</i> ($p=0,022$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) είχαν μειωμένα επίπεδα TAC στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) • <i>CON-Bupr-pre vs CON-Bupr-60 d</i> ($p=0,030$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) είχαν αυξημένα επίπεδα TAC στις 60 ημέρες (60 d) σε σύγκριση με τα επίπεδα της TAC πριν την έναρξη του πειράματος (pre) • <i>CON-Bupr-pre vs CON-Bupr-120 d</i> ($p=0,015$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) είχαν

αυξημένα επίπεδα TAC στις 120 ημέρες (120 d) σε σύγκριση με τα επίπεδα της TAC πριν την έναρξη του πειράματος (pre)

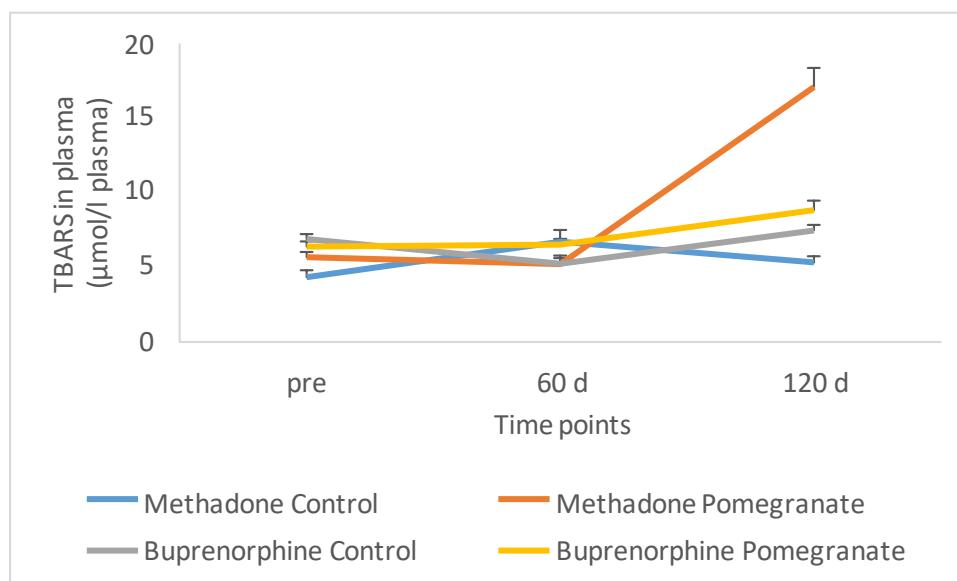
• *CON-Bupr-60d vs CON-Bupr-120d* ($p=0,026$)
Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) είχαν αυξημένα επίπεδα TAC στις 120 ημέρες (120 d) σε σύγκριση με τα επίπεδα της TAC στις 60 ημέρες (60 d)

• *POM-Meth-pre vs POM-Meth-60 d* ($p=0,037$)
Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε την TAC στις 60 ημέρες (60 d) σε σχέση με τα επίπεδα της TAC πριν την έναρξη του πειράματος (pre) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth)

• *POM-Meth-pre vs POM-Meth-120d* ($p=0,029$)
Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε την TAC στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με τα επίπεδα της TAC πριν την έναρξη του πειράματος (pre) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth)

• *POM-Meth-60d vs POM-Meth-120d* ($p=0,041$)
Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) μείωσε την TAC στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με τα επίπεδα της TAC στις 60 ημέρες (60 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth)

4.3. Αποτελέσματα TBARS



Σχήμα 5: Αποτελέσματα της επίδρασης της χορήγησης χυμού από ρόδι στη συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) του πλάσματος.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης της επίδρασης της χορήγησης χυμού από ρόδι στις ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) του πλάσματος

Κύρια Επίδραση	Ζευγαρωτές Συγκρίσεις (p)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meth-120 d-CON vs Meth-120 d-POM</i> ($p=0,002$) Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS στις 120 ημέρες (120 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CON)
• Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ($p=0,02$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meth-60 d-CON vs Meth-60 d-POM</i> ($p=0,021$) Η χορήγηση χυμού από ρόδι (POM) αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS στις 60 ημέρες (60 d) στους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CON)
• Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου ($p=0,000$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-pre-Meth vs CON-pre-Bupr</i> ($p=0,005$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) έχουν αυξημένα επίπεδα TBARS σε ηρεμία σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) κατά την έναρξη του πειράματος (pre)
• Βρέθηκε αλληλεπίδραση της παρέμβασης με τη θεραπεία υποκατάστασης ($p=0,036$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-120 d-Meth vs CON-120 d-Bupr</i> ($p=0,011$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) έχουν αυξημένα επίπεδα TBARS σε ηρεμία σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) στις 120 ημέρες (120 d)
• Βρέθηκε αλληλεπίδραση της παρέμβασης με τον χρόνο ($p=0,019$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>POM-120 d-Meth vs POM-120 d-Bupr</i> ($p=0,011$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) έχουν μειωμένα επίπεδα TBARS σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) στις 120 ημέρες (120 d) μετά τη χορήγηση του χυμού από ρόδι (POM)
• Βρέθηκε αλληλεπίδραση της παρέμβασης με τη θεραπεία υποκατάσταση και τον χρόνο ($p=0,002$)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-Meth-pre vs CON-Meth-120d</i> ($p=0,003$) Οι ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) έχουν αυξημένα επίπεδα ηρεμίας (CON) TBARS στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με την έναρξη του πειράματος (pre)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-Bupr-pre vs CON-Bupr-60 d</i> ($p=0,028$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) έχουν αυξημένα επίπεδα TBARS στις 60 ημέρες (60 d) σε σχέση με την έναρξη του πειράματος (pre)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CON-Bupr-60 d vs CON-Bupr-120 d</i> ($p=0,001$) Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (Bupr) έχουν αυξημένα επίπεδα TBARS στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με τις 60 ημέρες (60 d)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>POM-Meth-pre vs POM-Meth-120 d</i> ($p=0,003$) Οι ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) είχαν αυξημένα επίπεδα TBARS στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με την έναρξη του πειράματος (pre) μετά τη χορήγηση του χυμού από ρόδι (POM)
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>POM-Meth-60 d vs POM-Meth-120 d</i> ($p=0,012$) Οι ασθενείς υπό μεθαδόνη (Meth) είχαν αυξημένα επίπεδα TBARS στις 120 ημέρες (120 d) σε σχέση με τις 60 ημέρες (60 d) μετά τη χορήγηση του χυμού από ρόδι (POM)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση του χυμού από ρόδι στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος ασθενών υπό φαρμακευτική αντιμετώπιση της εξάρτησης από οπιοειδή με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Οι δείκτες αυτοί επιλέχτηκαν καθώς αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης της παρουσίας οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς. Είναι γνωστό ότι η φαρμακευτική αντιμετώπιση της εξάρτησης τόσο με βουπρενορφίνη όσο και με μεθαδόνη προκαλεί οξειδωτικό στρες και εξασθενεί την αντιοξειδωτική άμυνα (Leventelis et al. 2019, Arezoomandan et al. 2022). Η μεθαδόνη έχει πιο έντονη οξειδωτική δράση σε αντίθεση με την βουπρενορφίνη που φαίνεται να έχει λιγότερο σοβαρές επιπτώσεις στο οξειδωτικό στρες, καθώς διατηρεί υψηλότερη ποσότητα εγγενών αντιοξειδωτικών (Leventelis et al. 2019). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροδιού σχετίζονται κυρίως με τις υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινόλων. Στην πουνικαλαγίνη οφείλεται κυρίως η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του ροδιού (Caliskan et al., 2016).

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση χυμού από ρόδι αύξησε τη συγκέντρωση της GSH στις 60 ημέρες στους ασθενείς υπό μεθαδόνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, η συγκέντρωση της GSH μειώθηκε στην ίδια ομάδα ασθενών μετά από 120 ημέρες χορήγησης του χυμού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, η χορήγηση χυμού από ρόδι μείωσε τη συγκέντρωση της GSH στις 120 ημέρες σε σύγκριση με τις 60 ημέρες στην ίδια ομάδα ασθενών. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο χυμός από ρόδι είχε ευεργετική επίδραση στην GSH των ασθενών υπό μεθαδόνη μόνο στις 60 ημέρες, ενώ η συγκέντρωση της δεν επηρεάστηκε από καμία παράμετρο του πειράματος στους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη. Η μείωση της GSH στις 120 ημέρες είναι μία ένδειξη της προοξειδωτικής δράσης του ροδιού που πιθανόν να συσχετίζεται με την διάρκεια του πειράματος, την δοσολογία του ροδιού ή της χημικής ουσίας (βουπρενορφίνη, μεθαδόνη). Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία καθώς έχει βρεθεί ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών σε άτομα που βρίσκονται σε οξειδωτικό στρες, όπως είναι οι συμμετέχοντες στην παρούσα μελέτη, μπορεί υπό συνθήκες να οδηγήσει σε

προοξειδωτικά φαινόμενα. Αυτά οφείλονται στην αντίδραση Fenton που πραγματοποιείται μετά την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή από τα αντιοξειδωτικά, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών ριζών υδροξυλίου (Gutteridge & Halliwell 2018).

Αναφορικά με την TAC, η χορήγηση χυμού από ρόδι την μείωσε τόσο στις 60 όσο και στις 120 ημέρες στους ασθενείς υπό μεθαδόνη, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη της ομάδας ελέγχου είχαν μειωμένη TAC τόσο πριν την έναρξη του πειράματος (pre) όσο και στις 120 ημέρες σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη στην ομάδα ελέγχου. Φαίνεται ότι ο χυμός από ρόδι μειώνει την TAC των ασθενών υπό μεθαδόνη, οι οποίοι στην ομάδα ελέγχου είχαν αυξημένη TAC τόσο κατά την έναρξη του πειράματος όσο και στις 120 ημέρες στην ομάδα ελέγχου, σε σύγκριση με τους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη (η ομάδα αυτή έχει μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ομάδα των ασθενών υπό μεθαδόνη).

Όσον αφορά τα TBARS η χορήγηση χυμού από ρόδι αύξησε τη συγκέντρωσή τους στις 120 ημέρες στους ασθενείς υπό μεθαδόνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, αύξησε τη συγκέντρωσή τους στις 60 ημέρες στους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη της ομάδας ελέγχου είχαν αυξημένη συγκέντρωση TBARS τόσο πριν την έναρξη του πειράματος (pre) όσο και στις 120 ημέρες σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη της ομάδας ελέγχου. Οι ασθενείς υπό μεθαδόνη είχαν αυξημένη συγκέντρωση TBARS στις 120 ημέρες σε σχέση με την έναρξη του πειράματος (pre) και τις 60 ημέρες μετά τη χορήγηση του χυμού από ρόδι (POM). Επομένως, φαίνεται ότι ο χυμός από ρόδι αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS στους ασθενείς υπό μεθαδόνη στις 120 ημέρες συγκριτικά με τον ομάδα ελέγχου και συγκριτικά με την έναρξη του πειράματος (pre) και τις 60 ημέρες. Ακόμη, ο χυμός από ρόδι αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS στους ασθενείς υπό βουπρενορφίνη στις 60 ημέρες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη αντιμετωπίζουν πιο έντονη λιπιδική υπεροξειδωση στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη. Τα αποτελέσματα στην TAC και τα TBARS συμφωνούν, επίσης, με τη λογική της εμφάνισης προοξειδωτικών φαινομένων λόγω κατανάλωσης προϊόντων πλούσιων σε πολυφαινόλες με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ιδιαίτερα όταν αυτή η χορήγηση έχει μεγάλη διάρκεια (π.χ. 120 ημέρες) (Gutteridge & Halliwell 2018).

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στη μελέτη των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του ροδιού και τη συμβολή του στην υγεία. Σύμφωνα με έρευνα των Matthaïou et al (2014) όπου αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του χυμού από ρόδι σε υγιείς ανθρώπους, η κατανάλωση του χυμού από ρόδι αύξησε τα επίπεδα της GSH, μείωσε τη συγκέντρωση των TBARS, βελτιώνοντας τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση των επιπέδων της GSH στους ασθενείς υπό μεθαδόνη μετά από κατανάλωση χυμού από ρόδι αλλά μόνο στις 60 ημέρες. Η μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης από την 60^η ημέρα μέχρι και την 120^η ημέρα πιθανόν να οφείλεται στην προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινόλων που περιέχει το ρόδι και ιδιαίτερα της πουνικαλαγίνης (Danesi et al., 2014). Σε μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση για την επίδραση του χυμού από ρόδι στον έλεγχο του οξειδωτικού στρες παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση του χυμού προκάλεσε μια ελάχιστη μείωση στα επίπεδα των TBARS με παράλληλη ελάχιστη αύξηση των επιπέδων της TAC (Morvaridzadeh et al., 2020). Είναι ελάχιστα τα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ασθενών υπό φαρμακευτική υποκατάσταση της εξάρτησης (Leventelis et al. 2019, Arezoomandan et al. 2022) ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να έχουν εξετάσει την επίδραση του χυμού στους ασθενείς αυτούς σε συνδυασμό με την θεραπεία τους.

Τα συνολικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η ευεργετική, αντιοξειδωτική δράση του χυμού από ρόδι εξαρτάται από τον βιοδείκτη (αύξηση της συγκέντρωσης της GSH στους ασθενείς υπό μεθαδόνη) ενώ η τετράμηνη χορήγηση φαίνεται ότι δίνει την ευκαιρία στην εμφάνιση προοξειδωτικών φαινομένων. Η πτυχιακή αυτή είναι κομμάτι της ευρύτερης μελέτης NUTRIDOPE, τα πρώτα δεδομένα της οποίας δείχνουν ότι ο χυμός από ρόδι βελτίωσε διάφορες ψυχοκοινωνικές παραμέτρους των ασθενών όπως η επιθυμία για λήψη οπιοειδών (π.χ ηρωίνη), η διάθεση, η ποιότητα του ύπνου και η ποιότητα της ζωής. Συμπερασματικά, είναι σαφές ότι μετά από μικρές τροποποιήσεις στη δοσολογία, ο χυμός από ρόδι μπορεί να αποτελέσει διατροφική παρέμβαση σε αυτούς τους ασθενείς με ευεργετικά αποτελέσματα. Ο απώτερος στόχος της μελέτης NUTRIDOPE είναι η εισαγωγή στο εβδομαδιαίο διατροφικό πρόγραμμα του OKANA του φυσικού χυμού από ρόδι, ώστε να βελτιωθούν η οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος των ασθενών καθώς και άλλες βιοχημικές και

ψυχοκοινωνικές παράμετροι, όπως η φλεγμονή, επιθυμία για εκ νέου χρήση ουσιών, ποιότητα ζωής και ο ύπνος.

6.Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Aklima, J., Onojima, T., Kimura, S., Umiuchi, K., Shibata, T., Kuraoka, Y., Oie, Y., Suganuma, Y., Ohta, Y. (2021). Effects of Matrix pH on Spontaneous Transient Depolarization and Reactive Oxygen Species Production in Mitochondria. *Front Cell Biol*, 9,692776
- Andres, J., Manuel Perez de la Lasta, J., Plou, F.J., Perez-Federa, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci*, 22(9),4642
- Aquino, J.P.DE., Parida, S., Sofuoglu, M.(2021). The Pharmacology of Buprenorphine Microinduction for Opioid Use Disorder. *Clin Drug Investig*, 5, 1-12
- Arezoomandan M, Zhiani R, Mehrzad J, Motavalizadehkakhky A, Eshrati S, Arezoomandan R. Inflammatory, oxidative stress and cognitive functions in patients under maintenance treatment with methadone or buprenorphine and healthy subjects. *J Clin Neurosci*. 2022 Jul;101:57-62. doi: 10.1016/j.jocn.2022.04.018.
- Aune, D., Keum, N., Giovannucci, E., Fadnes, L.T., Boffetta, P., Greenwood, D.C., Tonstad, S., Vatten, L.J., Riboli, E., Norat.(2018). Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*, 108(5), 1069-1091
- Aust, A.E. & Eveleigh, J.F. (1999). Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222(3),246-52
- Averbeck, D. & Rodriguez-Lafrasse, C. (2021). Role of Mitochondria in Radiation Responses: Epigenetic, Metabolic, and Signaling Impacts. *Int Mol Sci*, 22(20), 11047

- Barycki, J.J. (2007). Antioxidant molecules and redox cofactors: glutathione. Banerjee, R., Becker, D.F., Dickman, M.B., Gladyshev, V.N., Ragsdale, S.W. Redox biochemistry. Wiley, Hoboken
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J., Stryer, L. (2015). Biochemistry. W.H. Freeman and Company. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Bermingham, E.N., Hesketh, J.E., Sinclair, B.R., Koolaard, J.P., Roy, N.C.(2014). Selenium-Enriched Foods Are More Effective at Increasing Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Compared with Selenomethionine: A Meta-Analysis. *Nutrients*, 6(10), 4002-4031
- Booth, M. (1998). Opium - a History, New York, St Martin's Griffin.
- Bowman, G.L., Shannon, J., Frei, B., Kaye, J.A., Quin, J.F. (2011). Uric Acid as a CNS Antioxidant. *J Alzheimers Dis*, 19(4), 1331-1336
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15(4), 186-90
- Caliskan, D., Koca, T., Doguc, D.K., Ozgocmen, M., Akcam, M. (2016). The protective effect of pomegranate juice in paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *Turk Pediatri Ars*, 51(2),72-78
- Carod-Artal, F.J. (2013). Psychoactive plants in ancient Greece. *Neurosciences and History*, 1 (1), 28-38
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F.(1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3), 481-93
- Chiang, YC, Wang, RY, Huang, CL, Chen, SW, Ho, WJ, Lane, HY, Ho, IK, Yang, HT, Ma, WL.(2017). Reduced dosing and liability in methadone maintenance treatment by targeting oestrogen signal for morphine addiction. *J Cell Mol Med*, 21(12), 3552-3564

- Coe, M.A., Lofwall, M.R., Walsh, S.L.(2020). Buprenorphine Pharmacology Review: Update on Transmucosal and Long-Acting Formulations. *J Addict Med*, 13(2), 93-103
- Corder, G., Castro, D.C., Bruchas, M.R., Scherrer, G.(2018). Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci*, 41, 453-473
- Crotty, G.F., Ascherio, A., Schwarzschild, M.A. (2017). Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Neurol*, 298(ptB), 210-224
- Das, K.C., Lewis-Molock Y., White, C.W. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17, 713–726
- Das, A.K., Nanda, P.K., Chowdhury, N.R., Dandapat, P., Gagaoua, M., Chauhan, P., Pateiro, M., Lorenzo, J.M. (2021). Application of Pomegranate by-Products in Muscle Foods: Oxidative Indices, Colour Stability, Shelf Life and Health Benefits. *Molecules*, 26(2), 467
- Di Meo, S. & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev*, 2020,9829176
- Dietis N., Rowbotham, D.J., Lambert, D.G. (2011). Opioid receptor subtypes: fact or artifact?. *Br J Anaesth*, 107(1), 8-18
- Dosedel, M., Jirkovsky, E., Macakova, K., Krcmova, L.K., Javorska, L., Pourova, J., Mercolini, L., Remiao, F., Novakova, L., Mladenka, P.(2021). Vitamin C—Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. *Nutrients*, 13(2), 615
- Ferrari, A., Coccia, C.P.R., Bertolini, A., Sternieri.(2004). Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res*, 50(6), 551-9
- U.S. Food and Drug Administration (2019)
- George, S. & Abrahamse, H. (2020). Redox Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. *Antioxidants*, 9(11), 1156

- Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B. (2018). Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochem Biophys Res Commun*, 502(2), 183-186. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.045.
- Habibi, N., Grieger, J.A., Bianco-Miotto, T. (2020). A Review of the Potential Interaction of Selenium and Iodine on Placental and Child Health. *Nutrients*, 12(9), 2678
- Halliwell, B. (2005). *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons .
- B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. New York Oxford University Press, 2015.
- Hao, Y., Xing, M., Gu, X. (2021). Research progress on oxidative stress and its nutritional regulation strategies in pigs. *Animals* , 11(5),1384
- Herb, M. & Schramm, M. (2021). Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants*, 10(2), 313
- Ho, CC, Tseng, CY, Chen, HW, Chiu, YW, Tsai, MC, Chang, PS. (2020). Coenzyme Q10 status, glucose parameters, and antioxidative capacity in college athletes. *J Int Soc Sports Nutr*, 17,5
- Jenkins, R.R.(1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*, 5(3), 156-70
- Jones DP (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8 (9-10):1865-79
- Kahl, R. & Kappus, H. (1993). Toxicology of the Synthetic Antioxidants BHA and BHT in Comparison with Natural Antioxidant Vitamin E. *Zeitschrift-fur, Lebensmittel-Untersuchung Forschung*, 196, 329-338.
- Kandyli, P. & Kokkinomagoulos, E.(2020). Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. *Foods*, 9(2), 122

- Khan, F., Garg, V., Singh, A., Kumar, T. (2018). Role of free radicals and certain antioxidants in the management of huntington's disease: a review. *Analytical & Pharmaceutical Research*, 7(4), 386-392
- Khanna, I.K., Pillarisetti, S.(2015). Buprenorphine – an attractive opioid with underutilized potential in treatment of chronic pain. *J Pain Res*, 8, 859-870
- Kreek, M.J., Borg, L., Ducat, E., Ray, B.(2010). Pharmacotherapy in the Treatment of Addiction: Methadone. *J Addict Dis*, 29(2), 200-216
- Kritikos, P.G., Papadaki, S.P. (1967). The history of poppy and opium and their expansion in antiquity in the Eastern Mediterranean Area. *Bulletin of Narcotics*, 19(3), 17-38
- Kudla, L. & Przewlocki, R.(2021). Influence of G protein-biased agonists of μ -opioid receptor on addiction-related behaviors. *Pharmacol Rep*, 73(4), 1033-1051
- Kumar, H., Lim, H-W., More, S.V., Kim, BW., Koppula, S., Kim, I.S., Choi, DK. (2012). The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's Disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci*, 13(8), 10478-504
- Leventelis, C., Goutzourelas, N., Kortsinidou, A., Spanidis, Y., Toulia, G., Kampitsi, A., Tsitsimpikou, C., Stagos, D., Veskoukis A.S., Kouretas, D.(2019). Buprenorphine and Methadone as Opioid Maintenance Treatments for Heroin-Addicted Patients Induce Oxidative Stress in Blood. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 9417048
- Lienkap, A.C., Heine, T., Tischler, D. (2020). Glutathione: A powerful but rare cofactor among Actinobacteria. *Adv Appl Microbiol*, 110, 181-217
- Liu, HT, Huang, YC, Cheng, SB, Huang, YT, Lin, PT.(2016). Effects of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant capacity and inflammation in hepatocellular carcinoma patients after surgery: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J*, 15,85
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-26

- Lo Conte M, Carroll KS. The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26480-8. doi: 10.1074/jbc.R113.467738. Epub 2013 Jul 16.
- Lok, A.S.F. & McMahon, B.J.(2007). Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 45(2), 507-39
- Machelska, H. & Celik, M.O.(2020). Opioid Receptors in Immune and Glial Cells—Implications for Pain Control. *Front Immunol*, 11, 300
- Magangana, T.P., Makunga, N.P., Fawole, O.A. (2020). Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Waste: A Review. *Molecules*, 25(20), 4690
- Maglione, M.A., Raaen, L., Chen, C., Azhar, G., Shahidinia, N., Shen, M., Maksabedian, E., Shanman, R.M., Newberry, S., Hempel, S.(2018). Effects of medication assisted treatment (MAT) for opioid use disorder on functional outcomes: A systematic review. *J Subst Abuse Treat*, 89, 28-51
- Matthaiou, C.M., Goutzourelas, N., Stagos D., Sarafoglou E., Jamurtas A., Koulocheri, S.D., Haroutounian, S.A., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D.(2014).Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food Chem Toxicol*, 73:1-6
- Mitchell, P., Liew, G., Gopinath, B., Wong, T.Y.(2018). Age-related macular degeneration. *Lancet*, 392(10153), 1147-1159
- Moga, M.A., Dimienescu, O.G., Balan, A., Toma, S.I., Bigiu, N.F., Blidaru, A.(2021). Pharmacological and Therapeutic Properties of *Punica granatum* Phytochemicals: Possible Roles in Breast Cancer. *Molecules*, 26(4), 1054
- Morvaridzadeh, M., Sepidarkish, M., Daneshzad, E., Akbari, A., Mobini, G.R., Heshmati, J.(2020). The effect of pomegranate on oxidative stress parameters :A systematic review and meta-analysis.*Complementary Therapies in Medicine.* 48

- Moran, N.E., Mohn, E.S., Hason, N., Erdman, J.W., Johnson, E.J. (2018). Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Absorption, Metabolism, and Health Effects of Dietary Carotenoids. *Adv Nutr*, 9(4), 465-492
- Mouly, S., Bloch, V., Peoch, K., Houze, P., Labat, L., Ksouda, K., Simoneau, G., Decleves, X., Bergmann, J.F., Scherrmann, JM, Laplanche, JL, Lepine, JP, Vorspan, F.(Methadone dose in heroin-dependent patients: role of clinical factors, comediations, genetic polymorphisms and enzyme activity. *Br J Pharmacol*, 79(6), 967-977
- Mylonas, C., Kouretas, D.(1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13(3), 295-309
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., Packer, L.(2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*, 50(1), 166-71
- Nutt, J.D. (2015). Considerations on the role of buprenorphine in recovery from heroin addiction from a UK perspective. *Journal of Psychopharmacology*, 29(1), 43-49
- Obeagu, E.I. (2018). A review on Free Radicals and Antioxidants. *International journal of current research in medical sciences*, 4(2), 123-133
- Oesterle, T.S., Thusius, N.J., Rummans, T.A., Gold, M.S.(2019). Medication-Assisted Treatment for Opioid-Use Disorder. *Mayo Clin Proc*, 94(10), 2072-2086
- Pastor-Maldonado, C., Suarez-Rivero, J.M., Povea-Cabello, S., Alvarez-Cordoba, M., Villalon-Garcia, I., Munuera-Cabeza, M., Suarez-Carrilo, A., Talaveron-Rey, M., Sanchez-Alcazar, J.A. (2020). Coenzyme Q₁₀: Novel Formulations and Medical Trends. *Int J Sci*, 21(22), 8432
- Paul, A.K., Smith, C.M., Rahmatullah, M., Nissapatorn, V. Wilairatana, P., Spetea, M., Gueven, N., Dietis, N.(2021). Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1091
- Pizzorno, J. (2014). Glutathione!. *Integr Med(Encinitas)*, 13(1), 8-12

- Poljsak, B., Suput, D., Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants : when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*, 2013,956792
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes., Valko, M.(2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 38(7), 592-607
- Qiu, X., Aiken, K.J., Chokas, A.L., Beachy, D.E., Nick, H.S. (2008). Distinct Functions of CCAAT Enhancer-binding Protein Isoforms in the Regulation of Manganese Superoxide Dismutase during Interleukin-1 β Stimulation. *J Biol Chem*, 283(38), 25774-25785
- Roos, D. (1991). The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin Wochenschr*, 69(21-23), 975-80
- Rosa, A.C., Corsi, D., Cavi, N., Bruni, N., Dosio. (2021). Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules*, 26(7), 1844
- Rosenthal, R.C. & Goradia, V.V.(2017). Advances in the delivery of buprenorphine for opioid dependence. *Drug Des Devel Ther*, 11, 2493-2505
- Sandalio, L.M. & Romero-Puertas, M.C (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann Bot*, 116(4), 475-85
- Saxon, J.A., Yih-Ing Hser, Y-I, Woody G., Ling W. (2013). Medication-assisted treatment for opioid addiction: Methadone and buprenorphine. *Journal of food and drug analysis*, 21, 69-72.
- Sbodio, J.I., Snyder, S.H, Paul, B.D. (2019). Redox Mechanisms in Neurodegeneration: From Disease Outcomes to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 30(11), 1450-1499

- Sharma, G.N., Gupta, G., Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 28(2), 139- 154
- Sharma, P., McClees, S.F., Afaq, F.(2017). Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules*, 22(1), 177
- Siemieniuk, E. & Skrzydlewska, E.(2005). [Coenzyme Q10: its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans]. *Postery Hig Med Dosw*, 59, 150-9
- Sotler, R., Poljsak, B., Dahmane, R., Jukic, T., Jukic, D.P., Rotim, C., Trebse, P., Starc, A.(2019). Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clin Croat*, 58(4), 726-736
- Tan, K., Zhang, H., Lim, LS, Ma, H., Li, S., Zheng, H.(2020). Roles of Carotenoids in Invertebrate Immunology. *Front Immunol*, 10, 3041
- Timoshnikov, V.K., Kobzeva, T.V., Polyakov, N.E., Kontoghiorghes. (2020). Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone. *Int J Sci*, 21(11), 3967
- Veskoukis, A.S., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*, 17(1), 11-21
- Veskoukis AS, Tsatsakis A, Kouretas D. Approaching reactive species in the frame of their clinical significance: a toxicological appraisal. *Food and Chemical Toxicology*, 138:111206, 2020.
- Wang, S.(2019). Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors. *Cell Transplant*, 28(3), 233-238
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T.(2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomed Pharmacother*, 78, 39-49
- Young, I.S. & Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54(3), 176-86

Young, I.S. & McEnemy, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem SocTrans*, 29(pt2), 358-62

Zarfeshany, A., Asgary, S., Javanmard, S.H. (2014). Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*, 3, 100

Zoorob, R., Kowalchuk, A., Mejia, M.(2018). Buprenorphine Therapy for Opioid Use Disorder. *Am Fam Physician*, 97(5), 313-320

Zukowski, P., Maciejczyk, M., Waszkiel, D. (2018). Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Arch Oral Biol*, 92,8-17

Ελληνική βιβλιογραφία

Γαλάρης, Δ. (2015). Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες. *Heallink*

Λάλα, Κ. (2010). Ιστορική αναδρομή της θεραπείας του πόνου. Διατριβή Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παπαδόπουλος, Γ. (1999). Η εξέλιξη της αναισθησιολογίας. *University studio press*

Πλίνιος Ν.Η, XX 77