



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΗΣ



Επιβλέπουσα: Ανδριάννα Καλιώρα, Επ. Καθηγήτρια

Μέλη: Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αν. Καθηγητής

Τζώρτζης Νομικός, Επ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2016



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ ΣΤΗΝ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΗΣ**

Επιβλέπουσα: Ανδριάννα Καλιώρα, Επ. Καθηγήτρια

Μέλη: Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αν. Καθηγητής
Τζώρτζης Νομικός, Επ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη, αποτελεί μέρος μεγαλύτερης μελέτης παρέμβασης, που εξετάζει την επίδραση της κατανάλωσης Κορινθιακής σταφίδας σε φαινομενικά υγιείς καπνιστές στο πλαίσιο της Διδακτορικής διατριβής του Παναγιώτη Κανέλλου. Μέρος της μελέτης έλαβε χώρα στο εργαστήριο της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», η ανάλυση των βιοχημικών δεικτών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ, ενώ η ανάλυση δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016 υπό την επίβλεψη της κ Ανδριάνας Καλιώρα, Επίκουρης Καθηγήτριας του τμήματος.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Καλιώρα για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα και την καθοριστική συμβολή της στην περάτωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, τον κ. Καλογερόπουλο και τον κ. Νομικό για την συνεργασία τους και τον χρόνο που διέθεσαν ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κ. Μ. Χρηστέα, καθώς και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την τεχνική και ηθική υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράζω την βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου για την Α. Στεργίου για την υπέρτατη θετική ενέργεια και συμπαράσταση που μου προσέφερε.

Κλείνοντας, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τον Υποψήφιο Διδάκτορα Παναγιώτη Κανέλλο για την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη αρωγή που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης, τόσο κατά τη διάρκεια των αναλύσεων στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, όσο και κατά την συγγραφή της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Αθήνα, 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η παρούσα κλινική δοκιμή είναι η πρώτη μελέτη που εξετάζει την επίδραση της κατανάλωσης Κορινθιακής σταφίδας στην ενδοθηλιακή λειτουργία, την αρτηριακή σκληρία και τους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής σε φαινομενικά υγιείς βαρείς καπνιστές με χαμηλή συμμόρφωση στη Μεσογειακή διατροφή.

Μεθοδολογία: Στην μελέτη εντάχθηκαν 20 εθελοντές στην ομάδα παρέμβασης και 12 εθελοντές στην ομάδα ελέγχου. Οι εθελοντές ήταν φαινομενικά υγιείς βαρείς καπνιστές, με φυσιολογικό ΔΜΣ και είχαν MedDiet Score ≤ 30 . Η παρέμβαση περιελάμβανε την κατανάλωση ποσότητας σταφίδας ίσης με 5 ισοδύναμα από την ομάδα των φρούτων για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων.

Αποτελέσματα: Αναφορικά με τους δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας και σκληρίας: sICAM-1, FMD και PWV δεν φάνηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως, οι δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής: MDA, AOPPs, CRP, λεπτίνη και η αντίσταση του ορού στην οξείδωση δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το ποσοστό λιπώδους μάζας αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα παρέμβασης ($p=0,030$), ενώ σημαντική ήταν η διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0,010$). Επίσης, τα επίπεδα αλβουμίνης σημείωσαν σημαντική αύξηση στην ομάδα ελέγχου ($p=0,014$), ενώ σημαντική ήταν η διαφορά τους ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0,019$). Τέλος, η αντίσταση του ορού σημείωσε σημαντική αύξηση στην ομάδα ελέγχου ($p=0,010$) και με σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0,035$).

Συμπέρασμα: Από τα αποτελέσματα της μελέτης, η παρέμβαση με σταφίδα δεν φάνηκε ότι έχει επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία, την αρτηριακή σκληρία και τους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής σε υγιείς καπνιστές. Περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα και με μεγαλύτερη διάρκεια παρέμβασης απαιτούνται για την τεκμηρίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

ABSTRACT

Objective: The present clinical trial is the first study that investigates the effect of Greek currants in endothelial function, arterial stiffness and biomarkers of oxidative stress and inflammation in healthy heavy smokers with low adherence to the Mediterranean Diet.

Methods: A total of 32 subjects were recruited to the study and remained until the end of the intervention, 20 subjects to the intervention group and 12 to the control group. All subjects were healthy heavy smokers, had normal BMI and MedDiet Score ≤ 30 . The subjects in the intervention group were instructed to consume an amount of Greek currants equivalent equal with 5 equivalents of fruit for 4 weeks.

Results: No alterations have been observed regarding the markers of endothelial dysfunction and arterial stiffness, naming: sICAM-1, FMD και PWV. Moreover, the markers of oxidative stress and inflammation, namely: MDA, AOPPs, CRP, leptin and serum oxidation resistance appeared to have no significant difference. The percentage of fat mass increased in intervention arm ($p=0,030$) and there was significant difference between the two groups ($p=0,010$). The levels of albumin increased in control arm ($p=0,014$) and there was, also, significant difference between the two groups ($p=0,019$). In addition, serum oxidation resistance increased in control arm ($p=0,010$) and an there was significant difference between the two groups ($p=0,035$).

Conclusions: The results of the present study indicate that the intervention with Greek currants had no effects to the endothelial function, arterial stiffness and the markers of oxidative stress and inflammation in healthy heavy smokers. More studies with larger sample and longer duration of intervention is needed to confirm the above results.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

ACE	Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης
ADMA	Ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη
ALP	Αλκαλική φωσφατάση
AOPP's	Προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών
CRP	C- αντιδρώσα πρωτεΐνη
CS	Κάπνισμα τσιγάρου
CVD	Καρδιαγγειακά νοσήματα
DPI	Αναστολέας NOX
ELAM-1	Μόριο προσκόλλησης ενδοθηλιακών λευκοκυττάρων - 1
eNOS	Ενδοθηλιακή NOS
FMD	Ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή
GPX	Υπεροξειδάση γλουταθειόνης
GSH	Γλουταθειόνη (ανηγμένη)
GSSG	Γλουταθειόνη (οξειδωμένη)
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
ICAM-1	Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης - 1
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MDA	Μηλονική Διαλδεΰδη
MPO	Μυελοπεροξειδάση
MPPs	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
NOS	Συνθάση του NO
NOX	Οξειδάση του NADPH
OxLDL	Οξειδωμένη LDL
PWV	Ταχύτητα αγωγής σφυγμικού κύματος
PWV-FEM	Καρωτιδο-μηριαία ταχύτητα αγωγής σφυγμικού κύματος
PWV-RAD	Καρωτιδο-ακτινική ταχύτητα αγωγής σφυγμικού κύματος

RNS	Δραστικές μορφές αζώτου
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου
SGOT	Ασπαραγινική Τρανσαμινάση
SGPT	Πυροσταφυλική Τρανσαμινάση
sICAM-1	Διαλυτή ισομορφή ICAM-1
SMCs	Λεία μυϊκά κύτταρα
sVCAM	Διαλυτή ισομορφή VCAM
TAC	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TAG	Τριακυλογλυκερόλες
TIMPs	Αναστολείς MMPs
UA	Ουρικό οξύ
VCAM	Αγγειακό μόριο προσκόλλησης
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
γGT	γ-γλουταμυλτρανσπεπτιδάση
ΔΑΠ	Διαστολική αρτηριακή πίεση
ΔΜΣ	Δείκτης μάζας σώματος
ΛΜ	Λιπώδης μάζα
ΠΙ	Περιφέρεια Ισχίου
ΠΜ	Περιφέρεια μέσης
ΣΑΠ	Συστολική αρτηριακή πίεση
ΣΒ	Σωματικό βάρος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ	13
1.1 Η επιδημία του καπνίσματος	13
1.2 Η χημεία του καπνίσματος.....	14
1.3 Οι φάσεις του καπνού	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	17
2.1 Γενικά.....	17
2.2 Πηγές ROS/RNS.....	19
2.3 Βιολογική δράση των ROS/RNS	21
2.4 Οξειδωτικό στρες – Οξειδωτική βλάβη	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ	25
3.1 Επιπολασμός και παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου	25
3.2 Αθηροσκλήρωση.....	26
3.3 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	28
3.4 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	30
3.4.1 Μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO	30
3.4.2 Οξείδωση λιποπρωτεϊνών	32
3.4.3 Ακρολεΐνη	33
3.5 Αντιοξειδωτικά στην καρδιαγγειακή νόσο	34
3.5.1 Αντιοξειδωτική άμυνα	34
3.5.2 Διαιτητικά αντιοξειδωτικά	36
3.5.3 Πολυφαινόλες.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΞΗΡΑΜΕΝΑ ΦΡΟΥΤΑ	41
4.1 Φρούτα και λαχανικά.....	41
4.1.1 Η χαμηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών ως παγκόσμιο ζήτημα	44
4.1.2 Παραδοσιακά αποξηραμένα φρούτα.....	46
4.2 Η σταφίδα	47

4.2.1	Συστατικά σταφίδας	49
4.2.2	Φυτοχημικά σταφίδας	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....		53
5.1	Σκοπός μελέτης.....	53
5.2	Χαρακτηριστικά δείγματος.....	53
5.3	Σχεδιασμός μελέτης	55
5.3.1	Προκαταρκτικό στάδιο.....	55
5.3.2	Στάδιο παρέμβασης	57
5.3.3	Στάδιο Αξιολόγησης	58
5.4	Κλινικο-εργαστηριακές μετρήσεις.....	58
5.4.1	Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	58
5.4.2	Μέτρηση αρτηριακής πίεσης	58
5.4.3	Βιοχημικές παράμετροι	58
5.4.4	Μετρήσεις δεικτών έκθεσης στο κάπνισμα	58
5.4.5	Μετρήσεις δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής	59
5.4.6	Μετρήσεις δεικτών ενδοθηλιακής λειτουργίας.....	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		71
6.1	Χαρακτηριστικά του δείγματος	71
6.2	Επίπεδα των υπό μελέτη μεταβλητών πριν και μετά την παρέμβαση	74
6.3	Συζήτηση.....	77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ

1.1 Η επιδημία του καπνίσματος

Το κάπνισμα ορίζεται ως η εισπνοή των αερίων και των ατμών των υδρογονανθράκων που παράγονται από την αργή καύση του τσιγάρου και γενικότερα προϊόντων καπνού. Η καπνιστική συνήθεια χαρακτηρίζεται από φυσική εξάρτηση σε προϊόντα καπνού, σε αντίθεση με το περιστασιακό κάπνισμα το οποίο μπορεί να συμβαίνει ενίοτε για κοινωνικούς λόγους είτε για ψυχολογικούς, όπως η χαλάρωση από το άγχος. Προϊόντα καπνού αποτελούν τα τσιγάρα (εργοστασιακά, στριφτά, με ή χωρίς φίλτρο, με ή χωρίς γεύση), τα πούρα, οι πίπες, ηλεκτρονικά τσιγάρα, καθώς και προϊόντα που δεν καπνίζονται, όπως ο μασούμενος καρπός. Ωστόσο, όταν γίνεται αναφορά στο κάπνισμα χωρίς ιδιαίτερη επισήμανση αυτή αφορά το κάπνισμα τσιγάρων (cigarette smoke, cigarette smoking) (IARC 2012, Kim et al., 2014).

Το κάπνισμα είναι από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες θνησιμότητας. Έχει θεωρηθεί υπεύθυνο για θανάτους που προκλήθηκαν από καρκίνο, (ιδιαίτερα καρκίνο των πνευμόνων), καρδιαγγειακά νοσήματα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και εκφυλιστικές νόσους (Talhout et al., 2011). Το 90% των θανάτων από ΧΑΠ αποδίδεται στο κάπνισμα (Zuo et al., 2013), το οποίο έχει συσχετιστεί με την αθηροσκλήρωση και την ισχαιμική καρδιακή νόσο και αποτελεί παράγοντα κινδύνου για οξεία καρδιακή θρόμβωση. Το 75% των ξαφνικών καρδιακών θανάτων που αποδίδονται σε οξεία θρόμβωση αφορά καπνιστές (Hadi et al., 2005).

Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) για το 2009, οι καπνιστές ξεπερνούσαν το 1 δισεκατομμύριο σε παγκόσμιο επίπεδο, που αντιπροσωπεύει περίπου το 22% των ενηλίκων καπνιστών. Το συστηματικό κάπνισμα συνεπάγεται, επίσης, αυξημένη πιθανότητα πρόωρου θανάτου (περίπου 10 χρόνια λιγότερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τους μη-καπνιστές). Κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα το κάπνισμα και η κατανάλωση προϊόντων καπνού ήταν υπεύθυνα για την πρόκληση 100 εκατομμυρίων θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο (IARC, 2012).

Σύμφωνα με τον WHO, ο επιπολασμός του καπνίσματος στην Ελλάδα ήταν 52,6% για το 2015 (μεταξύ ατόμων άνω των 15 ετών). Το ποσοστό αυτό κατατάσσει την Ελλάδα

στην πρώτη θέση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για το έτος αυτό. Τα χαμηλότερα επίπεδα επιπολασμού στην ΕΕ παρατηρούνται στη Δανία με ποσοστό 17,6%. Στις ΗΠΑ, ο επιπολασμός ήταν 19,5% και στον Καναδά 17,7%. Συγκριτικά, φαίνεται ότι στην Ευρώπη επικρατεί μεγαλύτερο ποσοστό καπνίσματος από ότι στην Αμερική (Rigotti et al., 2013). Έχει εκτιμηθεί ότι το κάπνισμα μπορεί να είναι υπαίτιο για τον θάνατο 10 εκατομμυρίων ανθρώπων ετησίως έως το 2025 αν δεν μειωθούν οι καπνιστικές συνήθειες που επικρατούν σήμερα (Talhout et al., 2011). Αυτό σημαίνει, ότι αναμένεται περίπου 1 δισεκατομμύριο θάνατοι τον 21^ο αιώνα να έχουν ως αιτία τις ασθένειες που προκαλεί το (ενεργητικό και παθητικό) κάπνισμα (Lin et al., 2013).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι και το παθητικό (δευτερογενές) κάπνισμα έχει αρνητικές επιδράσεις στην υγεία (Lin et al., 2013). Οι επιπτώσεις του παθητικού καπνίσματος στην υγεία δεν μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες, καθώς προκαλεί περισσότερους από 3.000 θανάτους καρκίνου του πνεύμονα και 46.000 θανάτους από καρδιακή νόσο κάθε έτος στις ΗΠΑ.

Ο όρος *mainstream smoke* χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον καπνό του τσιγάρου κατά το κάπνισμα που εισπνέει ο καπνιστής απευθείας από το τσιγάρο στο στόμα του μέσω του φίλτρου. Η σύστασή του είναι περίπου 92% αέρια φάση και 8% πίσσα. *Sidestream smoke* χαρακτηρίζεται ο καπνός που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από την περιοχή του τσιγάρου που καίγεται και περιέχει σχετικά υψηλότερη συγκέντρωση τοξικών ενώσεων από το *mainstream*. Το ενεργητικό κάπνισμα (*active smoking*) χαρακτηρίζεται κυρίως από το *mainstream* καπνό, ενώ το παθητικό (δευτερογενές) συνίσταται τόσο από το *sidestream*, όσο και από τον εκπνεόμενο *mainstream* καπνό του καπνιστή.

1.2 Η χημεία του καπνίσματος

Το κάπνισμα περιέχει περισσότερες από 5.300 χημικές ενώσεις. (IARC, 2012) Ο αριθμός αυτός έχει ανοδική τάση, καθώς οι τεχνικές της αναλυτικής χημείας βελτιώνονται. Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται διάφορες χημικές τάξεις οργανικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα: αμίνες, αμίδια, αιθέρες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, φαινόλες, κινόνες, αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, N-νιτροζαμίνες, N-ετεροκυκλικές ενώσεις, μονοκυκλικοί και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH's). Παράλληλα, περιέχονται διάφορα αέρια, όπως N₂, CO₂, CO, μεταλλικά στοιχεία και ιόντα, καθώς και δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) (Colombo et al., 2014, IARC, 2012).

Το NO στον καπνό περιέχεται σε συγκεντρώσεις της τάξης των 500-1.000 ppm. Επομένως, το κάπνισμα μπορεί να θεωρηθεί από τις σημαντικότερες εξωγενείς πηγές NO (Rahman et al., 1996).

Η πλειονότητα των ενώσεων αυτών είναι τοξικές, καρκινογόνες ή μεταλλαξιογόνες (Valavanidis et al., 2009). Για αυτόν τον λόγο, έχει χαρακτηριστεί ως «τοξικό και θανατηφόρο μίγμα» (IARC, 2012). Τοξικές ενώσεις αποτελούν μέταλλα όπως χρώμιο (Cr), αρσενικό (As), κάδμιο (Cd), μόλυβδος (Pb) και νικέλιο (Ni), καθώς και το πολώνιο και το ράδιο σε ισότοπες μορφές: ^{210}Po , ^{226}Ra , ^{228}Ra (Valavanidis et al., 2009). Στα δηλητηριώδη αέρια που περιέχονται στον καπνό συγκαταλέγονται το CO, η αμμωνία, το υδροκυάνιο, το βουτάνιο και η τολουίνη. Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται και οι ελεύθερες ρίζες (free radicals), καθώς και άλλες ενώσεις που προκαλούν οξείδωση (oxidants) (IARC, 2012).

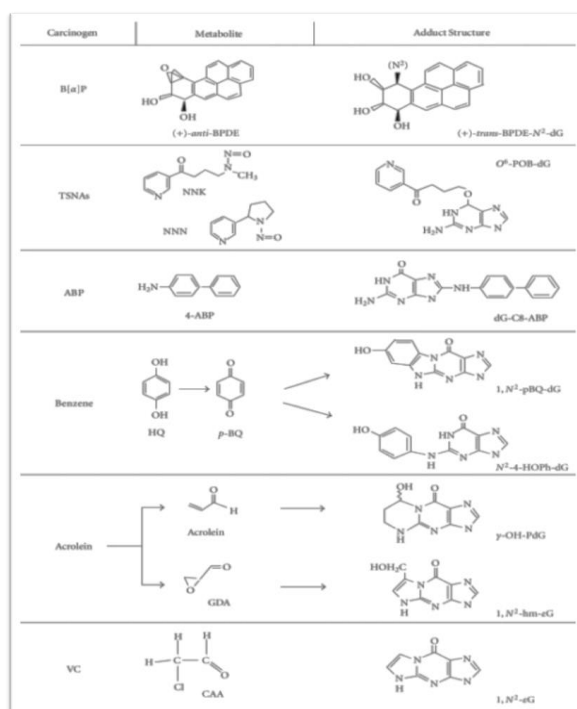
Περισσότερες από 70 ενώσεις που περιέχονται στον καπνό έχουν προσδιοριστεί ως καρκινογόνες από τον International Agency for Research on Cancer (IARC). Πιθανή καρκινογόνο δράση εμφανίζουν οι N-νιτροζαμίνες που περιέχονται στον καπνό και προέρχονται κυρίως από την νικοτίνη (NNK, NNN), οι PAH's, οι αρωματικές αμίνες, οι αλδεΐδες (όπως φορμαλδεΐδη και ακεταλδεΐδη) και ορισμένες πτητικές ενώσεις (όπως 1,3-βουταδιένιο και βενζόλιο). Οι ενώσεις αυτές περιέχονται σε διάφορες ποσότητες στο τσιγάρο. Για παράδειγμα, οι αρωματικές αμίνες βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-20ng/τσιγάρο), σε αντίθεση με τις αλδεΐδες που τα επίπεδά τους φτάνουν τα 10-30μg φορμαλδεΐδη/τσιγάρο και τα 800-900μg ακεταλδεΐδη/τσιγάρο (IARC, 2012).

Η καπνιστική συμπεριφορά του κάθε καπνιστή, η ένταση του καπνίσματος και η μάρκα των τσιγάρων μπορούν να μεταβάλλουν την ποσότητα, τον αριθμό και το είδος των χημικών ενώσεων στα οποία εκτίθεται ο καπνιστής (Messner et al., 2016). Επιπλέον, και το ηλεκτρονικό τσιγάρο αποδεδειγμένα περιέχει τοξικές και καρκινογόνες ενώσεις (όπως φορμαλδεΐδη και ακεταλδεΐδη), καθώς και νιτροζαμίνες, που έχουν πιθανή καρκινογόνο δράση. Το κάπνισμα μπορεί να προκαλέσει εθισμό, λόγω της νικοτίνης που περιέχεται στον καπνό. Η νικοτίνη αποτελεί το κύριο αλκαλοειδές που περιέχεται στο τσιγάρο και έχει εθιστικές ιδιότητες, χωρίς ωστόσο να θεωρείται καρκινογόνο (IARC, 2012).

1.3 Οι φάσεις του καπνού

Ο καπνός αποτελείται από δύο φάσεις: την αέρια (gasphase) και την πίσσα ή στερεή φάση (tarphase) (Cano et al., 2010). Η πίσσα αποτελείται από σωματίδια μεγέθους $>0,1\ \mu\text{m}$.

Η αέρια φάση αποτελείται από μόρια μικρότερου μεγέθους (που είναι διαπερατά από το φίλτρο) (Ambros et al., 2014). Και στις δύο φάσεις περιέχεται πληθώρα ελεύθερων ριζών και ROS/RNS (Cano et al., 2010). Η αέρια φάση, που βρίσκεται σε ποσότητα 0,4-0,5 g/τσιγάρο, περιέχει περίπου 10^{15} ελεύθερες ρίζες σε κάθε ρουφηξιά και η πίσσα $>10^{18}$ ελεύθερες ρίζες ανά γραμμάριο (Valavanidis et al., 2009, Rahman et al., 1996). Στην αέρια φάση περιέχονται κυρίως ελεύθερες ρίζες υψηλής δραστηριότητας, αλλά μικρού χρόνου ζωής. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες, αν και έχουν μικρό χρόνο ζωής (δευτερόλεπτα) μπορούν να αναγεννώνται συνεχώς (για αρκετά λεπτά) μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται στην δράση του NO (Colombo et al., 2014). Οι ελεύθερες ρίζες της πίσσας είναι σχετικά πιο σταθερές (ώρες έως μέρες) από εκείνες της αέριας φάσης και στην πλειονότητά τους είναι οργανικές ενώσεις. Στην πίσσα είναι σημαντική η παρουσία του συστήματος κινόνης/ημικινόνης/υδροκινόνης (Q/QH $\cdot$ /QOH $_2$) που συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες (Colombo et al., 2014, Valavanidis et al., 2009). Στο παθητικό κάπνισμα, η αέρια φάση και η πίσσα περιέχουν ανάλογες ενώσεις συγκριτικά με το ενεργητικό, γεγονός που καθιστά και το παθητικό κάπνισμα πλούσιο σε ελεύθερες ρίζες υψηλής δραστηριότητας και παράγοντα κινδύνου για πνευμονοπάθειες σε μη-καπνιστές (Valavanidis et al., 2009).

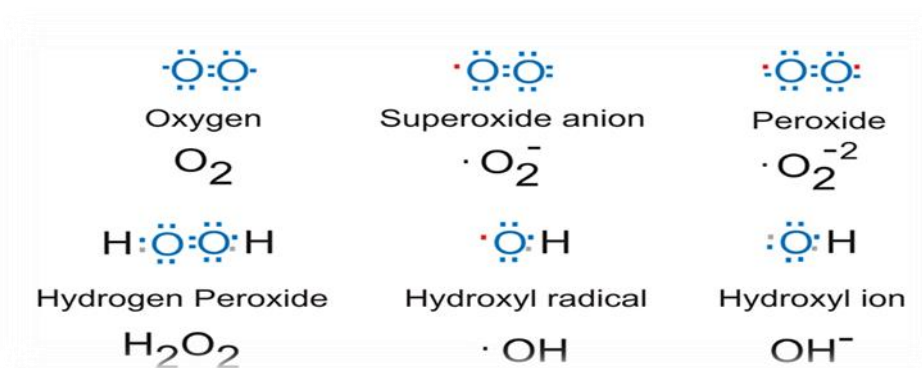


Σχήμα 1.1 Χημικές δομές των κυριότερων καρκινογόνων ενώσεων που περιέχονται στον τσιγάρο. B[a]P: Βενζο[α]πυρένιο, TNSA: Νιτροζαμίνες-καπνού, ABP: 4-αμινοδιφαινύλιο, Βενζόλιο, Ακρολεΐνη, Χλωρο-ακεταλδεΐδη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

2.1 Γενικά

Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν μεταφορά ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων μεταξύ δύο ενώσεων (Salvare, 2015). Το μόριο που λαμβάνει το ηλεκτρόνιο υφίσταται αναγωγή και καλείται οξειδωτικό μέσο, ενώ το μόριο που έχει απώλεια ηλεκτρονίου υφίσταται οξείδωση (Cantin, 2010). Ως οξειδωτικά μέσα συμπεριφέρονται οι ελεύθερες ρίζες που είναι μόρια με ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (ηλεκτρόνια που δεν έχουν σχηματίσει ζεύγος ηλεκτρονίων). Οι ελεύθερες ρίζες είναι έντονα δραστικές, ασταθείς και έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Για να επιτύχουν σταθερότητα, «επιτίθενται» σε άλλα μόρια υφαρπάζοντας ηλεκτρόνια. Μόρια με απολεσθέντα ηλεκτρόνια μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες. Είναι κατανοητό ότι με αυτόν τον τρόπο συντελούνται αλυσιδωτές οξειδωτικές αντιδράσεις. Ωστόσο, υπάρχουν μόρια όπως το O_2 και το H_2O_2 τα οποία αν και δεν διαθέτουν μονήρη ηλεκτρόνια, εντούτοις είναι επιρρεπή στην αναγωγή (οξειδώνοντας άλλα μόρια).



Σχήμα 1.2 Τύποι κατά Lewis ορισμένων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Γενικώς, οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια που περιέχουν οξυγόνο (δραστικές μορφές οξυγόνου: ROS), άζωτο (δραστικές μορφές αζώτου: RNS), ή θείο (δραστικές μορφές θείου: RSS). Αντίδραση των ROS μεθειόλες μπορεί να σχηματίσει εύκολα RSS (Aslani et al., 2016). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS) συνίστανται εκτός από ελεύθερες ρίζες (radicals) και από μόρια χωρίς μονήρη ηλεκτρόνια (nonradicals). Είναι φανερό, ότι οι ROS/RNS διαθέτουν προ-οξειδωτικές/οξειδωτικές ιδιότητες. Στους δύο πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται ορισμένες ROS/RNS.

Πίνακας 1.1 Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες και μόρια που συνιστούν τις ROS και RNS

Δραστικές μορφές οξυγόνου – ROS	
<u>Ελεύθερες ρίζες</u>	
Ανιόν σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot-}$
Υδροξύλιο	$OH^{\cdot}$
Ρίζα αλκοξυλίου	$RO^{\cdot}$
Ρίζα περοξυλίου	$ROO^{\cdot}$
<u>Μόρια (non radicals)</u>	
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2
Οξυγόνο απλής κατάστασης (singlet oxygen)	1O_2
Όζον	O_3
Οργανικό υπεροξείδιο	$ROOH$
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$
Υποβρωμιώδες οξύ	$HOBr$
Δραστικές μορφές Αζώτου - RNS	
<u>Ελεύθερες ρίζες</u>	
Μονοξείδιο του αζώτου	NO
Διοξείδιο του αζώτου	NO_2
<u>Μόρια (non radicals)</u>	
Περοξυνιτρίτης / Περοξυνιτρώδες ανιόν	$ONOO^-$
Τριοξείδιο του διαζώτου	N_2O_3
Τετροξείδιο του διαζώτου	N_2O_4
Νιτρικό οξύ	HNO_2
Περοξυνιτρώδες οξύ	$ONOOH$
Νιτρώδες χλωρίδιο	NO_2Cl

2.2 Πηγές ROS/RNS

Η παραγωγή ROS πραγματοποιείται στα κύτταρα τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθολογικές καταστάσεις και συντελείται μέσω ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων (Aslani et al., 2016). Ενδογενώς, παραγωγή ROS παρατηρείται στα σημεία του κυττάρου όπου εμφανίζουν μεγάλη κατανάλωση οξυγόνου, όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισωμάτια και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Phaniendra et al., 2015). Παραγωγή ROS συντελείται τόσο στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια, όσο και μέσω διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων κατά τον μεταβολισμό του οξυγόνου. Στα ένζυμα αυτά περιλαμβάνονται η οξειδάση του NADPH, η οξειδάση της ξανθίνης, το κυτόχρωμα P450, η κυκλοξυγενάση, η μυελοπεροξειδάση, η λιποξυγονάση και η συνθάση του NO (Lipina et al., 2016).

Μιτοχόνδρια

Στα μιτοχόνδρια λαμβάνει χώρα η οξειδωτική φωσφορυλίωση κατά την οποία γίνεται παραγωγή ενέργειας μέσω της σύνθεσης μορίων ATP (Berg et al., 2012). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση απαιτεί τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τα μόρια NADH και FADH₂ προς το μοριακό οξυγόνο, μια διαδικασία που καλείται αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και πραγματοποιείται μέσω 4 πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα μόρια του οξυγόνου που λαμβάνουν ηλεκτρόνια υφίστανται αναγωγή προς σχηματισμό μορίων νερού ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2 H_2O$). Όταν η αναγωγή του οξυγόνου είναι ατελής μπορεί να σχηματίσει ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ή υπεροξειδίο (O_2^{2-}) με την μεταφορά ενός ή δύο ηλεκτρονίων στο οξυγόνο, αντίστοιχα. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, συμπεριλαμβανομένης και της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV) διαθέτουν την εξαιρετική ικανότητα να μην απελευθερώνουν ενδιάμεσες ενώσεις. Ωστόσο, συνεχώς διαρρέουν ελάχιστες ποσότητες μερικώς ανηγμένων μορίων/προϊόντων, γεγονός που αποτελεί την κυριότερη πηγή ROS ενδογενώς.

Διάφοροι παράγοντες που επιδρούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η αγγειοτενσίνη II, η oxLDL, τα προϊόντα της υπεροξυλίωσης των λιπιδίων, τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και η πρωτεϊνική κινάση C μπορούν να επάγουν τη μιτοχονδριακή παραγωγή σουπεροξειδίου (Münzel, 2010).

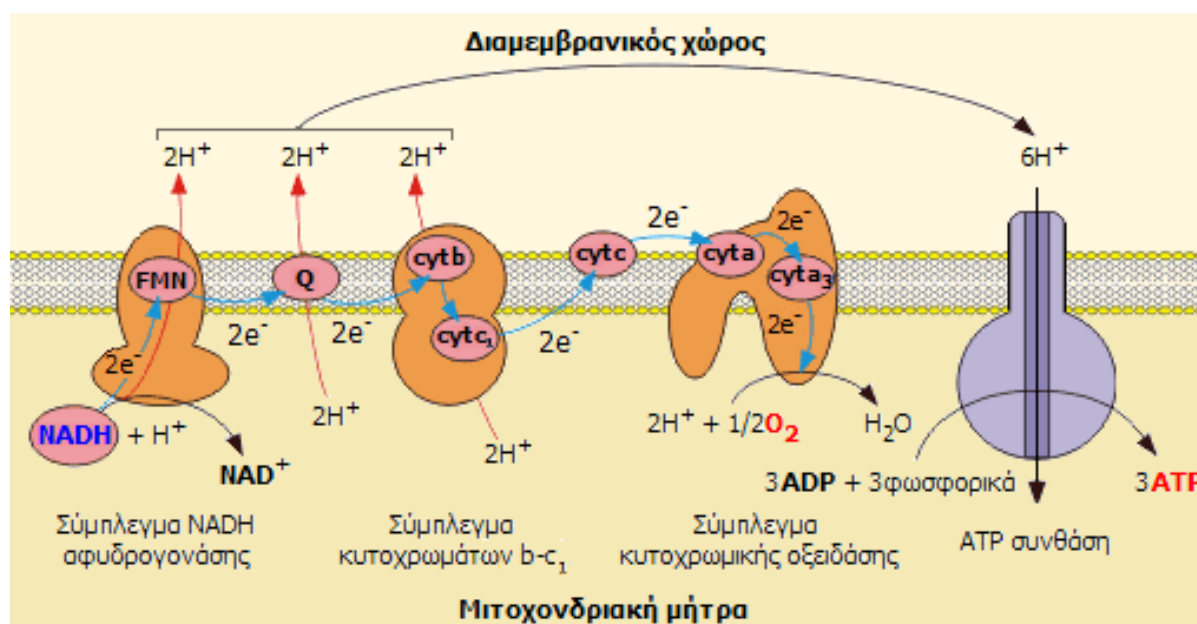
Υπεροξεισωμάτια (Peroxisomes)

Η κύρια λειτουργία των υπεροξεισωματίων είναι η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, διαδικασία κατά την οποία παράγονται μόρια H₂O₂. Στα υπεροξεισωμάτια βρίσκονται

διάφορα οξειδωτικά ένζυμα, όπως η οξειδάση του ουρικού οξέος, της ξανθίνης, του ακυλο-CoA, του D-ασπαρτικού και των D-αμινοξέων (με υπόστρωμα την D-προλίνη) που παράγουν διάφορα ROS, όπως: $\text{NO}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2 (Phaniendra et al., 2015).

Ενδοπλασματικό Δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο περιλαμβάνει, επίσης, οξειδωτικά ένζυμα με κυριότερο το κυτόχρωμα P-450. Η σύνθεση προσταγλανδινών, η αυτο-οξείδωση της επινεφρίνης (αδρεναλίνης), η ανηγμένη ριβοφλαβίνη, το FMNH_2 , το FADH_2 και κύτταρα φαγοκυττάρωσης μπορούν να παράγουν ROS μέσα στο κύτταρο. Σε καταστάσεις, όπως φλεγμονή, ανοσολογική απόκριση, άγχος (mental stress), υπερβολική άσκηση, μόλυνση, καρκίνος, γήρανση και ισχαιμία είναι δυνατή η παραγωγή ROS (Phaniendra et al., 2015).



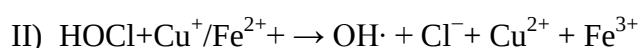
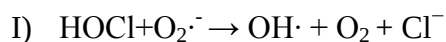
Σχήμα 1.3 Αναπαράσταση αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση

Παράλληλα, στην παραγωγή ROS μπορούν να συντελέσουν εξωγενείς παράγοντες, όπως το κάπνισμα, το αλκοόλ, η διατροφή, η ιονίζουσα ακτινοβολία, ορισμένοι ρύποι, φάρμακα, φυτοφάρμακα, ο τετραχλωράνθρακας (CCl_4), τα βαρέα μέταλλα (Fe, Cu, Co, Cr), μεταλλικά στοιχεία μετάπτωσης (Cd, Hg, Pb, As), οι βιομηχανικοί διαλύτες (industrial solvents) και η υψηλή θερμοκρασία (Aslani et al., 2016). Τα μεταλλικά στοιχεία, είτε

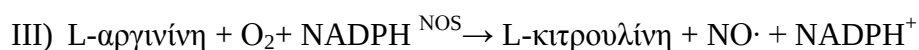
βρίσκονται ενδογενώς είτε περιέχονται στο τσιγάρο, συμβάλλουν στην παραγωγή ROS (Aslani et al., 2016). Στα μέταλλα αυτά περιλαμβάνονται ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr), ο μόλυβδος (Pb), ο υδράργυρος (Hg), το νικέλιο (Ni) και το βανάδιο (V). Ο πιο συνηθισμένος τρόπος που εμπλέκονται στην παραγωγή των ROS είναι η αντίδραση Fenton ή τύπου Fenton όπου παράγονται ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) (Aslani et al., 2016, Batinn, 2009).

2.3 Βιολογική δράση των ROS/RNS

Η δράση των ROS/RNS εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο κύτταρο (Pham-Huy et al., 2008). Σε χαμηλά επίπεδα η συγκέντρωσή των ROS είναι φυσιολογική. Συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, τη μεταγραφή γονιδίων (gene transcription), καθώς και τη ρύθμιση της δραστηριότητας της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης στα κύτταρα (sGC). Επιπλέον, τα ROS εμπλέκονται στην ανοσολογική άμυνα του οργανισμού εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών. Σε αυτήν την περίπτωση, τα μακροφάγα παράγουν HOCl και $\text{OH}\cdot$ που είναι αρκετά τοξικά για τα βακτήρια τα οποία στη συνέχεια υφίστανται φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Στις αντιδράσεις σχηματισμού HOCl και $\text{OH}\cdot$ συμμετέχει η οξειδάση του NADPH που σχηματίζει $\text{O}_2\cdot^-$ και στη συνέχεια μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) παράγεται H_2O_2 , που έπειτα μετατρέπεται σε HOCl. $\text{OH}\cdot$ μπορούν να παραχθούν με δύο τρόπους, όπως φαίνονται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Το μονοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}/\text{NO}\cdot$) είναι ένα μικρό μόριο, που παράγεται σε αρκετούς ιστούς στο ανθρώπινο σώμα, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των νευρώνων, των μακροφάγων, των αιμοπεταλίων και των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων. Το NO παρουσιάζει διάφορες δράσεις. Φυσιολογικά λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής, και ρυθμιστής της αρτηριακής πίεσης (αγγειοδιαστολέας). Επίσης, η ανοσολογική απόκριση των μακροφάγων διαμεσολαβείται κυρίως από το NO (Aslani et al., 2016). Διάφορες μορφές οξειδάσης του NO (NOS), όπως η ενδοθηλιακή οξειδάση (eNOS) καταλύουν τον σχηματισμό του μορίου υποβάλλοντας σε οξείδωση την L-αργινίνη προς L-κιτρουλίνη (Phaniendra et al., 2015)



Συνεπώς, είναι σημαντική η συμμετοχή των ROS στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, όταν εμφανίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προάγουν το οξειδωτικό στρες.

2.4 Οξειδωτικό στρες – Οξειδωτική βλάβη

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι συνεχής και αποτελεί φυσιολογική διαδικασία του μεταβολισμού. Η αναλογία οξειδωμένης/ανηγμένης μορφής ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους καλείται ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση (Hwang et al., 2013).

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, υπάρχει ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της αντιοξειδωτικής άμυνας που εξουδετερώνει τα σχηματιζόμενα ROS, η οποία επιτυγχάνεται κυρίως από τον έλεγχο παρά από τον περιορισμό των ROS επιπέδων. Ωστόσο, οι ROS συνεχώς προκαλούν βλάβη, καθώς είναι αδύνατον να επιτευχθεί πραγματική ισορροπία. Αυτό συμβαίνει, καθώς υπάρχουν μόρια που είναι αρκετά δραστικά, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), τα οποία οξειδώνουν ταχέως «γειτονικά» μόρια καθιστώντας ανεπαρκή την αντιοξειδωτική άμυνα.

Το κύτταρο διαθέτει ομοιοστατικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των τοξικών οξειδωτικών μορίων και της προστατευτικής επίδρασης των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της αντιοξειδωτικής άμυνας που ευνοεί την δημιουργία οξειδωτικού περιβάλλοντος καλείται οξειδωτικό στρες και ουσιαστικά δημιουργείται από την υπέρμετρη παραγωγή ROS ή από έλλειψη αντιοξειδωτικής άμυνας (είτε από συνδυασμό και των δύο).

Ο όρος «οξειδωτική βλάβη» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την τυχαία άνευ διακρίσεων βλάβη που συμβαίνει σε διάφορα βιομόρια. Εντούτοις, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η οξειδωτική βλάβη έχει συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους, όπως στην νόσο του Parkinson όπου η οξείδωση του DNA παρατηρείται μόνο στο νουκλεοτίδιο της γουανίνης. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, οξειδωτική βλάβη πραγματοποιείται διαρκώς σε περιορισμένο βαθμό (σε κατάσταση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας). Όταν λαμβάνει χώρα οξειδωτικό στρες δεν είναι απαραίτητο να αυξηθούν τα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης. Αυτό οφείλεται στην παρουσία των επιδιορθωτικών μηχανισμών που επιδιορθώνουν ή αντικαθιστούν προσβεβλημένα βιομόρια. Αυξημένη οξειδωτική βλάβη δεν είναι απαραίτητο να συνοδεύεται από αύξηση οξειδωτικού στρες. Αυτή μπορεί να οφείλεται σε διαταραγμένη λειτουργικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης/αντικατάστασης βλαβών (Halliwell, 2007).

Τα ROS είναι ικανά να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη τόσο στα λιπίδια, όσο και στις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα:

Λιπίδια

Τα μεμβρανικά λιπίδια και ιδιαίτερα τα τμήματα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων είναι σε σημαντικό βαθμό επιρρεπή στην οξείδωση από ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων άρχεται όταν οι ελεύθερες ρίζες αφαιρούν άτομο υδρογόνου από μία μεθυλομάδα ενός λιπαρού οξέος σχηματίζοντας ελεύθερη ρίζα λιπιδίου ($L\cdot$). Το $L\cdot$ μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο προς σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων ($LOO\cdot$). Το $LOO\cdot$ υφίσταται κυκλοποίηση προς σχηματισμό ενδοϋπεροξειδίων και περαιτέρω παραγωγή MDA και 4-HNA, τα οποία αποτελούν τα τοξικά προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων, που μπορούν με την σειρά τους να προκαλέσουν βλάβη σε πρωτεΐνες και DNA (Phaniendra et al., 2015). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να διαδώσει την οξείδωση άλλων λιπιδίων προκαλώντας γρήγορες αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης (Pham-Huy et al., 2008, Phaniendra et al., 2015).

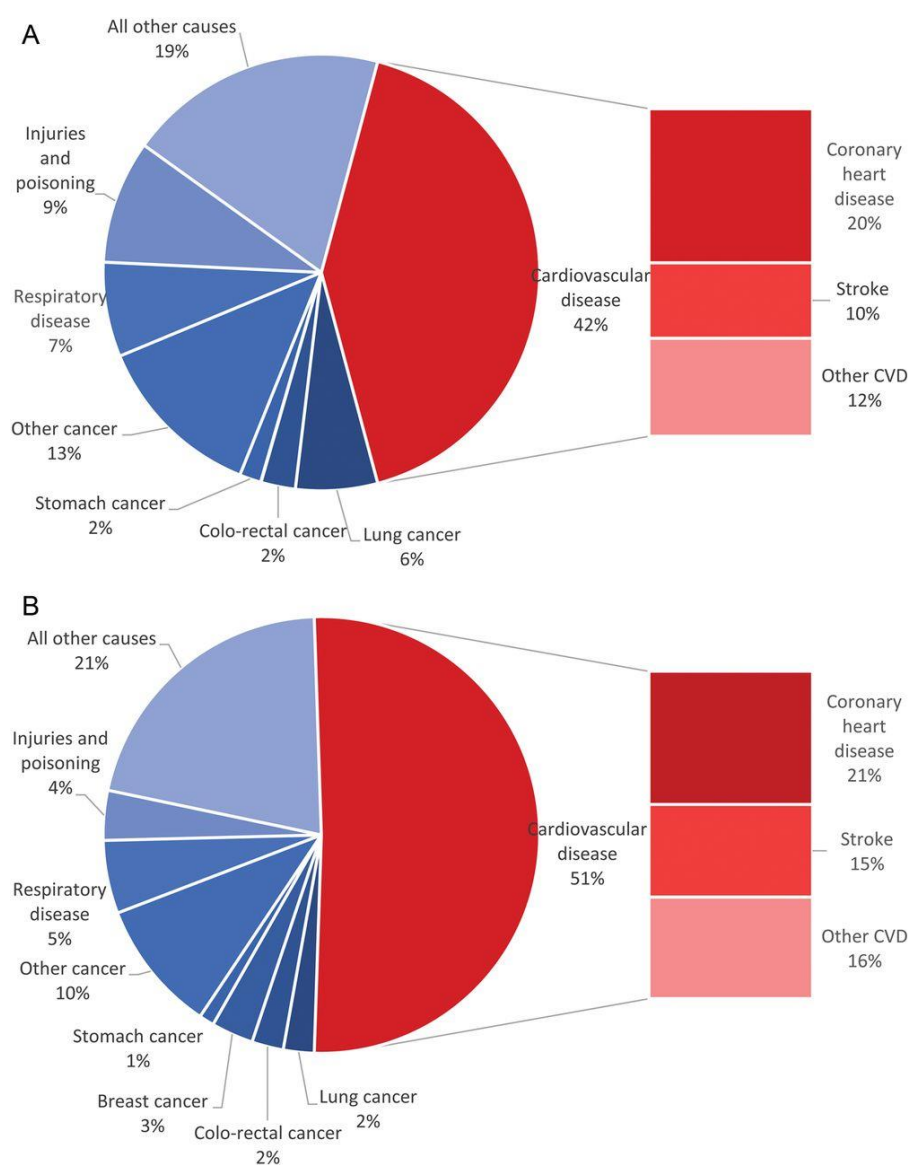
DNA/RNA

Η οξειδωτική βλάβη στο DNA μπορεί να επιφέρει μεταλλάξεις. Το κύτταρο διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς κατά της βλάβης, όπως τα επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA και αντιοξειδωτικά μόρια. Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες είναι ικανό να επάγει χρόνιες και εκφυλιστικές νόσους, καθώς και την διαδικασία της γήρανσης (Pham-Huy et al., 2008). Τα ROS και ιδιαίτερα το $OH\cdot$ μπορούν κατευθείαν να αντιδράσουν με όλα τα τμήματα του DNA, όπως οι αζωτούχες βάσεις και η δεοξυριβόζη. Το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη από ότι το DNA του πυρήνα, καθώς στο μιτοχόνδριο συντελείται η κύρια παραγωγή των ROS. Το RNA είναι πιο ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη σε σύγκριση με το DNA, καθώς είναι μονόκλωνο μόριο, απουσιάζουν επιδιορθωτικοί μηχανισμοί και είναι λιγότερο προστατευμένο από πρωτεΐνες σε σχέση με το DNA (Phaniendra et al., 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ

3.1 Επιπολασμός και παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου

Η καρδιαγγειακή νόσος (CVD) αποτελεί πρωταρχική αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες. Η καρδιαγγειακή νόσος περιλαμβάνει: τη στεφανιαία νόσο (έμφραγμα μυοκαρδίου), καρδιακή ανεπάρκεια, αγγειακή εγκεφαλική νόσο (αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο), περιφερική ανεπάρκεια και υπέρταση (WHO).



Σχήμα 3.1 Κατανομή θανάτων από κάθε αιτία στην Ευρώπη, ανάμεσα στους άντρες (A) και τις γυναίκες (B) (Nichols et al., 2014).

Στην Ευρώπη, αν και τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί μείωση του ποσοστού θνησιμότητας από CVD σε αρκετές χώρες, η καρδιαγγειακή νόσος εξακολουθεί να ευθύνεται για περισσότερο από 4 εκατομμύρια θανάτους ετησίως, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 46% (42% για τους άντρες και 51% για τις γυναίκες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1). Ακόμα μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ασθενών με CVD που νοσηλεύονται ή βρίσκονται υπό χρόνια θεραπεία.

Ωστόσο, και στις αναπτυσσόμενες χώρες έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση της επίπτωσης σε CVD τα τελευταία 25 έτη (Ravera et al., 2016). Παράγοντες κινδύνου για CVD αποτελούν: το φύλο, η ηλικία, η παχυσαρκία, η καθιστική ζωή, το κάπνισμα, η ανθυγιεινή διατροφή, η κατάχρηση αλκοόλ, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, η υπεργλυκαιμία, καθώς και το οικογενειακό ιστορικό (WHO, Stocker et al, 2004, He et al., 2015, Hadi et al., 2005). Τουλάχιστον 10% των θανάτων από καρδιαγγειακή νόσο αποδίδεται στο κάπνισμα (Csordas et al, 2013).

3.2 Αθηροσκλήρωση

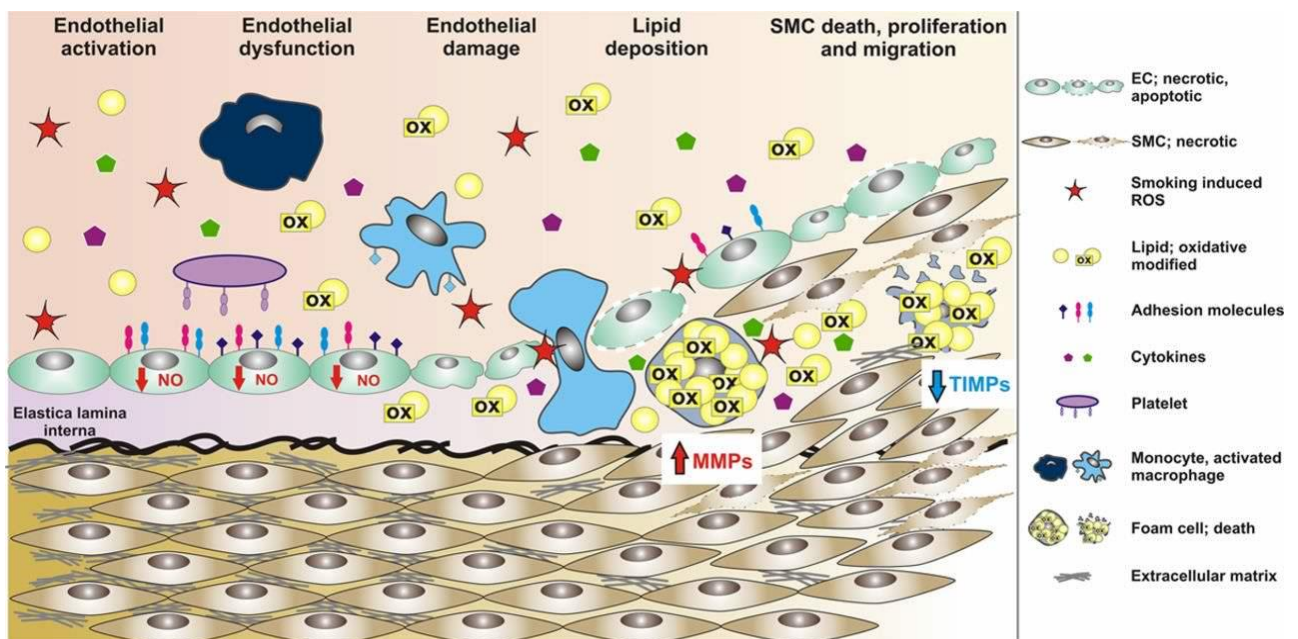
Η αθηροσκλήρωση είναι κυρίαρχη αιτία των επιπλοκών της CVD. Τα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ανοσολογική απόκριση και διαταραχή της ομοιόστασης των αγγείων (Barua et al., 2015).

Η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης μπορεί να διακριθεί σε 4 κύρια στάδια:

- ✓ Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων
- ✓ Σχηματισμός λιποειδών γραμμώσεων
- ✓ Αθηρωματική πλάκα
- ✓ Ρήξη αθηρωματικής πλάκας

Όπως διακρίνεται στην Εικόνα 3.1, η αθηροσκλήρωση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν διάφοροι μηχανισμοί. Αρχικά, ενεργοποιούνται τα μακροφάγα τα οποία εκφράζουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα μόρια προσκόλλησης. Μετά την προσκόλληση τα μακροφάγα προσλαμβάνουν οξειδωμένα λιπίδια επάγοντας τον σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων μέσα στο εσωτερικό των αρτηριακών τοιχωμάτων. Ο επακόλουθος

κυτταρικός θάνατος των αφρωδών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των λιπιδίων και την εναπόθεσή τους στα αγγεία δημιουργώντας αθηρωματικές πλάκες. Το πλάσμα περιέχει πληθώρα φυσικών αντιοξειδωτικών που εμποδίζουν την οξείδωση της LDL, γεγονός που υποδηλώνει ότι *in vivo* η LDL είναι πιθανόν να μην οξειδώνεται στο αίμα όταν βρίσκεται στην συστηματική κυκλοφορία (Salvayre et al., 2016). Επιπρόσθετα, το κάπνισμα επάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων προκαλώντας πύκνωση τους στο έσω χιτώνα και συμβάλλοντας περαιτέρω στον σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας (Messner et al., 2014).



Εικόνα 3.1 Σχηματική παρουσίαση των παραγόντων που συμμετέχουν στην αθηροσκλήρωση

Η πιθανότητα ρήξης της αθηρωματικής πλάκας εξαρτάται από την οξείδωση των λιπιδίων, το ινώδες κάλυμμα, την εξασθένηση των πρωτεϊνών στην εξωκυττάρια μήτρα, την απόκριση των φλεγμονωδών κυττάρων και την αιμορραγία στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας (Barua, 2013). Έχει φανεί ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνει και τη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) οι οποίες καθιστούν ασταθή και ευάλωτη την αθηρωματική πλάκα (Csordas et al, 2013). Επίσης, παρατηρείται μείωση της έκφρασης των αναστολέων των MMPs (TIMPs) (Messner et al., 2014).

Η διαδικασία αυτή μπορεί να παραμείνει σιωπηλή (ασυμπτωματική) για δεκαετίες μέχρι τη στιγμή που μία αθηροσκληρωτική κάκωση διαρυνγνύεται εκθέτοντας στην κυκλοφορία του αίματος τμήματα του αρτηριακού τοιχώματος. Με αυτόν τον τρόπο, είναι πιθανή η πρόκληση θρόμβωσης. Όταν η θρόμβωση οδηγεί σε ανεπαρκή αιματική παροχή αίματος (συνεπώς και οξυγόνου) στην καρδιά καλείται καρδιακή προσβολή (στεφανιαία αρτηριακή νόσος), ενώ η αντίστοιχη ισχαιμία στον εγκέφαλο προκαλεί αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (αγγειακή εγκεφαλική νόσος) (Stocker et al., 2004).

3.3 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

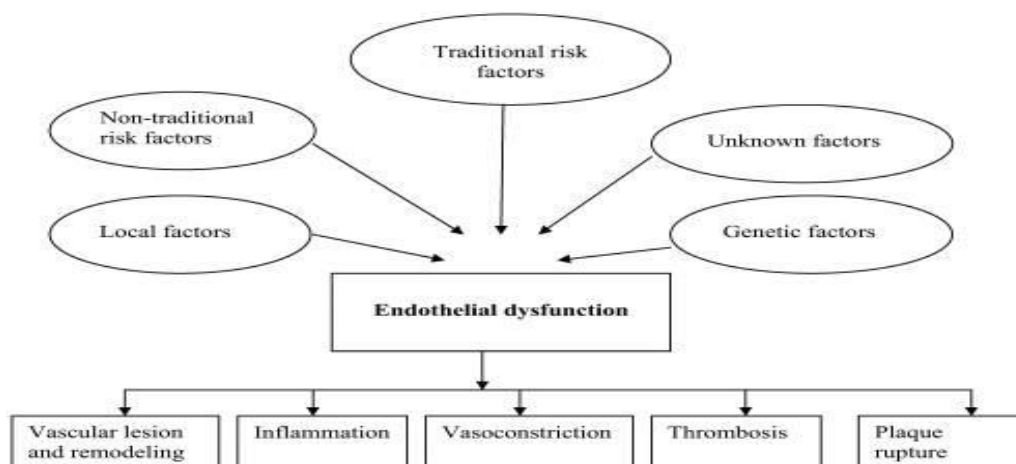
Οι βασικές δράσεις του ενδοθηλίου είναι η ρύθμιση της ροής του αίματος και του αγγειακού τόνου (vascular tone), ο έλεγχος της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και η συμμετοχή στους μηχανισμούς της αγγειακής ανάπτυξης (vascular growth), της πήξης και της φλεγμονής, κυρίως μέσω της σύνθεσης του NO (Tziomalos et al., 2008, Kim et al., 2011, Münzel, 2010).

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί μια συστηματική παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανισορροπία μεταξύ αγγειοσυσταλτικών και αγγειοδιασταλτικών παραγόντων που παράγονται και δρουν στο ενδοθήλιο. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προηγείται της αθηροσκλήρωσης και οδηγεί σε μειωμένη αγγειοδιαστολή, προ-φλεγμονώδη και προ-θρομβωτική κατάσταση (Gradinaru et al., 2015). Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ίσως προβλέπει την μακροπρόθεσμη εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής νόσου και τη συχνότητα των καρδιαγγειακών συμβαμάτων (Münzel, 2010). Η διαταραχή της ομοιόστασης του ενδοθηλίου έχει παρατηρηθεί σε ηλικιωμένους έπειτα από χρόνια ή «οξύ» κάπνισμα, σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα LDL ή TAG και σε ασθενείς με ΣΔ, υπέρταση ή μεταβολικό σύνδρομο (Münzel, 2010).

Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δημιουργία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας περιλαμβάνουν την υπέρταση, τη δυσλιπιδαιμία, τον ΣΔ και το κάπνισμα. (Kim et al., 2011) Το κάπνισμα και η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου μειώνουν την ικανότητα του ενδοθηλίου να ρυθμίσει τον αγγειακό τόνο και την αιμόσταση (Csordas et al, 2013).

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχετίζεται με ελάττωση της ελαστικότητας των αρτηριών (Eleftheriadou et al., 2013). Ήδη από το 1993 διατυπώθηκε ότι το κάπνισμα μειώνει την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (FMD) στις συστηματικές αρτηρίες υγιών

νέων ενηλίκων. Η FMD αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Φαίνεται, επομένως, ότι το κάπνισμα μπορεί να επάγει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω της μεταβολής που επιφέρει στην FMD (Messner et al., 2014). Επίσης, οι Amato et al. (2013) έδειξαν ότι το κάπνισμα τσιγάρων τύπου light είχε την ίδια αρνητική επίδραση στην FMD σε σύγκριση με τα κανονικά τσιγάρα.



Σχήμα 3.2 Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Hadi HAR et al., 2005).

Κατά την διαδικασία αθηροσκλήρωσης λαμβάνουν χώρα διάφοροι μηχανισμοί που συνδέονται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Το επαγόμενο από το κάπνισμα οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί το ενδοθήλιο επάγοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης (ICAM-1 και VCAM-1) τα οποία συμβάλλουν στην προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Τα μόρια προσκόλλησης αποτελούν σημαντικούς δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, καθώς η έκφρασή τους αυξάνεται σε αυτές τις καταστάσεις. Κυρίως προσδιορίζονται οι διαλυτές (soluble) ισομορφές των μορίων VCAM-1, ICAM-1 και E-σελεκτίνης: sVCAM-1, sICAM-1 και διαλυτή E-σελεκτίνη. Έχει φανεί από μελέτες ότι η συγκέντρωση των διαλυτών μορίων προσκόλλησης συνδέεται με τη μείωση της αγγειοδιασταλτικής ικανότητας του ενδοθηλίου. Η συγκέντρωση ICAM-1 ορού (sICAM-1) αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη εμφάνισης αθηροσκληρωτικής νόσου, ιδιαίτερα στεφανιαίας νόσου (Tziomalos et al., 2008). Η ενδοθηλιακή ενεργοποίηση χαρακτηρίζεται, επίσης, από μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO και απώλεια λειτουργικότητας των λείων μυικών κυττάρων (SMCs). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως απόκριση στο κάπνισμα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις και προαθηρωγενετικές κυτταροκίνες (Messner et al., 2014).

3.4 Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Το κάπνισμα είναι δυνατόν να επάγει την αθηροσκλήρωση μέσω του οξειδωτικού στρες που προκαλεί μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO, φλεγμονή, προθρομβωτική κατάσταση και οξείδωση λιποπρωτεϊνών. Οι ROS που σχετίζονται με το κάπνισμα προέρχονται από (Prasad et al., 2015, Csordas et al., 2013):

- ✓ τις ROS που περιέχονται στην πίσσα και κυρίως την αέρια φάση του καπνού
- ✓ την ενεργοποίηση των μακροφάγων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων
- ✓ την αποσύζευξη της eNOS στο ενδοθήλιο
- ✓ την ενεργοποίηση της οξειδάσης της ξανθίνης (OX)
- ✓ την ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH

Η OX μετατρέπει την ξανθίνη και την υποξανθίνη σε ουρικό οξύ ανάγοντας μοριακό οξυγόνο. Το H_2O_2 μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία του ενζύμου οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής O_2^- . Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF- α , αλλά και η οξειδωμένη κυστεΐνη μπορεί να μετατρέψουν την δεϋδρογονάση της ξανθίνης σε OX. Η OX αποτελεί σημαντική πηγή οξειδωτικών παραγόντων σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η υπέρταση, η αθηροσκλήρωση, η καρδιακή ανεπάρκεια και η ισχαιμία επαναιμάτωσης. Τα επίπεδα της OX συνδέονται με τη μειωμένη ικανότητα ενδοθηλιο-εξαρτώμενης αγγειοδιαστολής (Pennathur et al., 2007).

3.4.1 Μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία φαίνεται να συνδέεται με τη μειωμένη παραγωγή αγγειοδιασταλτικών και ομοιοστατικών μορίων, όπως το NO και η προστακυκλίνη ή την αυξημένη παραγωγή μορίων που προκαλούν αγγειοσυστολή, όπως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) κι η θρομβοξάνη A_2 (TXA_2) (Barua et al., 2015).

Το NO εκτός από ρυθμιστής της αιματικής ροής, έχει διάφορες άλλες αγγειοπροστατευτικές, καρδιοπροστατευτικές και αντι-αθηρογενετικές δράσεις:

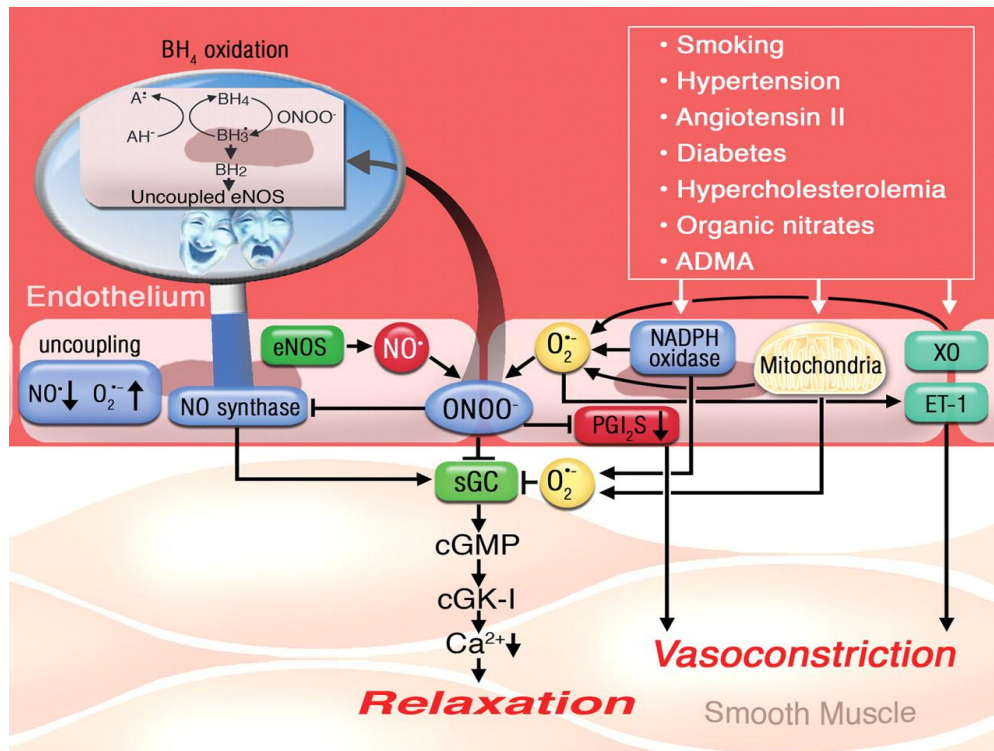
- ✓ Αναστέλλει την συσσώρευση αιμοπεταλίων και την προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο (αντι-θρομβωτική δράση) (Gradinaru et al., 2015).

- ✓ Αναστέλλει την σύνδεση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, όπως ICAM-1, VCAM-1 και ELAM-1 (**αντι-φλεγμονώδης δράση**).
- ✓ Αναστέλλει τη δράση της ενδοθηλίνης-1 και τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυικών κυττάρων (**αντι-αθηρογενετική δράση**) (Münzel et al., 2010, Gradinaru et al., 2015).
- ✓ Καταστέλλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (**αγγειοπροστατευτική και καρδιοπροστατευτική δράση**).
- ✓ Ρυθμίζει την μιτοχονδριακή κατανάλωση οξυγόνου και την οξειδωαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (**αντιοξειδωτική δράση**) (Gradinaru et al., 2015).

Η μείωση σχηματισμού του NO αποτελεί έναν τρόπο με τον οποίο το οξειδωτικό στρες επάγει την υπέρταση, η οποία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για CVD (Santilli et al., 2015). Το κάπνισμα συνδέεται με μειωμένη δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (eNOS), που συνδέεται με ενδογενή παραγωγή των ROS (Csordas et al, 2013). Η συνθάση του NO χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μοριακό οξυγόνο για την οξείδωση της L-αργινίνης προς L-κιτρουλίνη παράγοντας NO (Phaniendra, 2015). Στην αντίδραση αυτή συμμετέχουν το NADPH και η τετραϋδροβιοπτερίνη BH₄ ως συμπαραγόντας (Santilli et al., 2015). Η σύνθεση της eNOS φαίνεται να είναι αυξημένη κατά την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Αυτό δηλώνει ελλειψωμένη ικανότητα της eNOS να παράγει NO (Münzel et al, 2010). Οι Barua et al. (2001) μελέτησαν *in vitro* την επίδραση του ορού καπνιστών σε ενδοθηλιακά κύτταρα και έδειξαν ότι η έκθεση σε ορό καπνιστών σχετιζόταν με μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO, μειωμένη δραστηριότητα eNOS, αλλά και αυξημένη έκφραση eNOS στα εκτεθειμένα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα υψηλά επίπεδα ROS και ειδικά ο ONOO⁻ οξειδώνουν την BH₄ προς BH₂ προκαλώντας αποσύζευξη του ενζύμου και τον επαγόμενο σχηματισμό O₂⁻ με παράλληλη μείωση της παραγωγής NO. Το O₂⁻ που σχηματίζεται αντιδρά με το NO προς σχηματισμό ONOO⁻ το οποίο προκαλεί περαιτέρω οξείδωση της BH₄ (και συνεπώς περαιτέρω αποσύζευξη της eNOS). Με αυτόν τον τρόπο, οι ROS προκαλούν μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO και περαιτέρω παραγωγή ROS. Επίσης, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ADMA, μόριο που αναστέλλει τη δραστηριότητα της eNOS ή επάγει την αποσύζευξη του ενζύμου (ενισχύοντας την παραγωγή ROS), οδηγώντας σε έναν δεύτερο θετικό

ανατροφοδοτικό μηχανισμό. Αυξημένα επίπεδα ADMA έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες καταστάσεις, όπως η υπέρταση, ο ΣΔ, η υπερχοληστερολαιμία και η χρόνια νεφρική νόσος (Münzel et al, 2010).



Εικόνα 3.2 Μηχανισμοί που επάγουν την μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO

Ο ONOO⁻ μπορεί να δράσει ως αγγειοσυστολέας μέσω της αναστολής της διαλυτής γουανιλικής κυκλάσης (sGC). Επίσης, φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα της συνθάσης της προστακυκλίνης. Σημαντική είναι η δράση του ONOO⁻ και ως κυτταροτοξικό μόριο, καθώς μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. (Münzel et al, 2010) επηρεάζοντας την λειτουργία του αγγείου (Santilli et al., 2015). Τα οξειδωμένα από ONOO⁻ πρωτεϊνικά τμήματα που περιέχουν 3-νιτρο-τυροσίνη θεωρείται ότι συμβάλλουν στην κυτταρική βλάβη (Phaniendra et al., 2015). Σημαντικά επίπεδα ONOO⁻ παρατηρούνται όταν εμφανίζεται αυξημένη παραγωγή O₂⁻, όπως στην υπέρταση, τον ΣΔ, την υπερχοληστερολαιμία και τη γήρανση (Pennathur et al., 2007).

3.4.2 Οξείδωση λιποπρωτεϊνών

Αν και τα αυξημένα επίπεδα της LDL θεωρούνται παράγοντας κινδύνου για αθηροσκλήρωση, η LDL δεν είναι δυνατόν να προσληφθεί από τα μακροφάγα. Αντιθέτως,

μεγαλύτερη σημασία έχει η οξειδωμένη LDL (Santilli et al., 2015). Κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων, οι ROS οξειδώνουν κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα οδηγώντας σε αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και σε επακόλουθο σχηματισμό παραπροϊόντων, όπως οι δραστικές αλδεϋδες (MDA, ισοπροστανία, ακρολεΐνη) (Lee et al., 2013, Santilli et al., 2015). Τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται μπορούν να αντιδράσουν με την απολιποπρωτεΐνη B-100 επηρεάζοντας αρνητικά την LDL (Santilli et al., 2015). Η MDA αντιδρά κυρίως με πρωτεΐνες πλάσματος και έχουν βρεθεί *in vivo* αντισώματα έναντι των MDA-τροποποιημένων πρωτεϊνών. Αυξημένα επίπεδα MDA παρατηρούνται, επίσης, στο πλάσμα και τις αθηροσκληρωτικές πλάκες ασθενών με ΣΔΙΙ (Le, 2015).

Η oxLDL έχει την τάση να είναι αυξημένη σε άτομα που έχουν παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου (Gradinaru et al., 2015). Η σχηματιζόμενη oxLDL συμμετέχει στην αθηροσκληρωτική διαδικασία (Santilli et al., 2015), καθώς μπορεί να προσληφθεί από τα μακροφάγα προς σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, καθώς και να επάγει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυικών κυττάρων, την αύξηση της έκκρισης των MMPs και της παραγωγής κολλαγόνου, τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO (Gradinaru et al., 2015). και να επιδράσει αρνητικά στη δραστηριότητα της οξειδάσης του NADPH (Santilli et al., 2015). Το πλάσμα περιέχει πληθώρα φυσικών αντιοξειδωτικών που εμποδίζουν την οξείδωση της LDL, γεγονός που υποδηλώνει ότι *in vivo* η LDL είναι πιθανόν να μην οξειδώνεται στο αίμα όταν βρίσκεται στη συστηματική κυκλοφορία (Salvayre et al., 2016).

3.4.3 Ακρολεΐνη

Η αέρια φάση του καπνίσματος εκτός από ROS/RNS περιέχει και πιο σταθερά μόρια που έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται οι α-β-ακόρεστες αλδεϋδες, όπως η ακρολεΐνη, οι α-β-ακόρεστες κετόνες και οι κορεσμένες αλδεϋδες (Jaimes et al., 2004). Οι αλδεϋδες του καπνού, καθώς και εκείνες που παράγονται ενδογενώς από την υπεροξειδίωση των λιπιδίων έχουν εκτεταμένη προοξειδωτική επίδραση στα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας. Είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν την οξειδάση του NADPH που αποτελεί κύρια ενδοκυτταρική πηγή ROS επαγόμενη από το κάπνισμα (Csordas et al, 2013). Η ακρολεΐνη έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα οξειδωτικού στρες και αυξημένα επίπεδά της έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση και σε καπνιστές (Park et al., 2008).

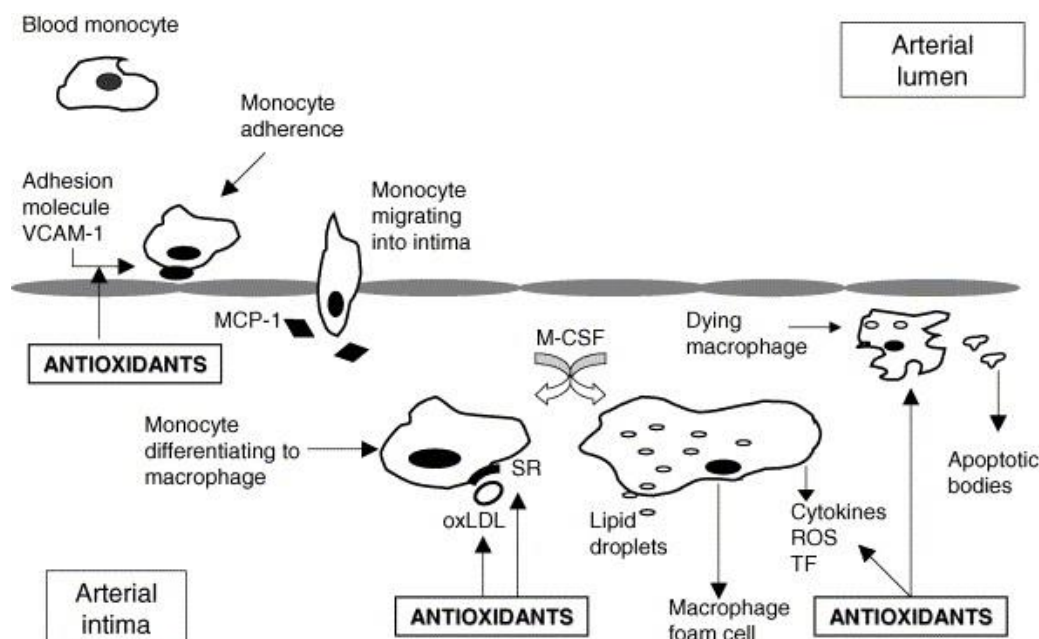
Οι Park et al., (2008) έδειξαν ότι η ακρολεΐνη αναστέλλει σημαντικά τη δράση της αναγωγής της θειορεδοξίνης (TR) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Προτείνουν, λοιπόν, ότι τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS που παρατηρούνται στο οξειδωτικό στρες οφείλονται στην αναστολή της TR. Η TR είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που έχει διάφορες δράσεις που αποσκοπούν στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στο κύτταρο. Για παράδειγμα, αντιδρά με το H_2O_2 και τα λιπιδικά υδρουπεροξειδία (lipid hydroperoxides), αναγεννά το ασκορβικό οξύ και επηρεάζει την δράση της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου. Επίσης, οι ερευνητές έδειξαν ότι η ακρολεΐνη επηρεάζει την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης COX-2 επιδρώντας στην αύξηση της σύνθεσης προσταγλαδινών που εμπλέκονται σε καταστάσεις φλεγμονής (Park et al., 2008).

Σε καταστάσεις ανοσολογικής απόκρισης, η οξειδάση του NADPH εντοπίζεται στα φαγοκύτταρα (μακροφάγα και ουδετερόφιλα) καταλύοντας τον σχηματισμό O_2^- με αναγωγή μοριακού οξυγόνου (Kim et al., 2014). Οι Orosz et al (2007) μελέτησαν την *in vitro* παραγωγή ROS κατά την έκθεση σε συμπυκνώματα καπνού (CS condensate) χορηγώντας αναστολέα NOX (DPI). Έδειξαν ότι η παραγωγή ROS οφειλόταν στην δράση της NOX (Orosz et al., 2006). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες (Kim et al., 2014).

3.5 Αντιοξειδωτικά στην καρδιαγγειακή νόσο

3.5.1 Αντιοξειδωτική άμυνα

Όταν ένας οξειδωτικός παράγοντας προκαλεί οξείδωση σε ένα μόριο παύει πλέον να έχει οξειδωτικές ιδιότητες. Ωστόσο, το οξειδωμένο μόριο που σχηματίζεται μετατρέπεται το ίδιο σε ελεύθερη ρίζα οδηγώντας σε μία αλυσιδωτή αντίδραση. Μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα μπορούν να συμβούν χιλιάδες αντιδράσεις οξείδωσης. Τα μόρια που έχουν την δυνατότητα να περιορίσουν ή να σταθεροποιήσουν την δράση των οξειδωτικών μορίων προλαμβάνοντας την οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως αντιοξειδωτικά (Kaliora et al., 2006). Τα αντιοξειδωτικά μόρια δρουν ως αναγωγικά μέσα και έχουν την δυνατότητα να αντιδρούν με τα ROS παρέχοντας τους ένα ή δύο ηλεκτρόνια (Espinoza-Diez et al., 2015).

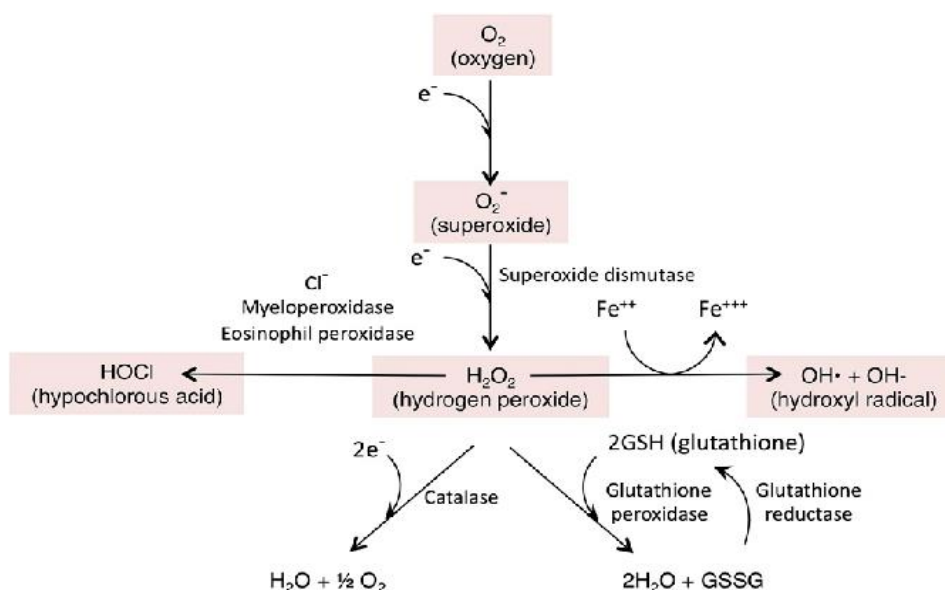


Εικόνα 3.3 Ο πιθανός ρόλος των αντιοξειδωτικών στην πρόληψη της αθηρογένεσης

Το κύτταρο περιέχει διάφορα αντιοξειδωτικά συστήματα με σκοπό τον έλεγχο των συνεχώς σχηματιζόμενων ROS. Τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, πρωτεΐνες που δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα, (Kaliora AC et al., 2006) και διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως το ουρικό οξύ, τη γλουταθειόνη, τη χολερυθρίνη, το συνένζυμο Q το λιποϊκό οξύ και τη μελατονίνη (ενδογενείς παράγοντες). Επίσης, στα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται από τη διατροφή (διαιτητικά αντιοξειδωτικά) περιλαμβάνονται ενώσεις, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή (όπως β-καροτίνη και λυκοπένιο), οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή οι ανθοκυανίνες, καθώς και σύνθετα αντιοξειδωτικά όπως τα BHT και BHA (εξωγενείς παράγοντες) (Kaliora et al., 2006, Salvayre et al., 2016).

Αρκετά ενζυμικά αντιοξειδωτικά ένζυμα ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS. Σε αυτά περιλαμβάνονται η δισμουτάση του σουπεροξειδίου ή υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση και το σύστημα της γλουταθειόνης (υπεροξειδάση και αφυδρογονάση της γλουταθειόνης). Η υπεροξειδική δισμουτάση καταλύει την αντίδραση του σουπεροξειδίου προς σχηματισμό H_2O_2 το οποίο, στην συνέχεια, υφίσταται αναγωγή σχηματίζοντας οξυγόνο και νερό από την καταλάση. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή (GSH) (Espinoza-Diez et al., 2015, Cantin, 2010) και μπορεί να υποστεί οξείδωση σχηματίζοντας την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) με αποβολή 2 ηλεκτρονίων. Η GSH θεωρείται το πιο άφθονο ενδογενές αντιοξειδωτικό και βρίσκεται σε

αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των 1-10mM. Μπορεί να δράσει με άμεσο τρόπο με το $O_2^{\cdot-}$ και άλλα ROS, ωστόσο, η πιο σημαντική της δράση είναι η αναζωογόνηση άλλων αντιοξειδωτικών. Η αναγωγή της γλουταθειόνης συντελεί στην αναγέννηση δύο μορίων GSH από ένα μόριο GSSG (Espinoza-Diez et al., 2015). Το κάπνισμα προκαλεί οξείδωση της GSH, μειώνοντας τα επίπεδά της στο πλάσμα (Yanbaeva et al., 2007). Άλλοι παράγοντες, όπως η ελλιπής σε βιταμίνες διατροφή, το αλκοόλ, διάφορα φάρμακα, οι τοξίνες, το τραύμα, οι μολύνσεις και η εξαντλητική φυσική δραστηριότητα εξασθενούν την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα (Kalliora et al., 2006).



Σχήμα 3.3 Αντιδράσεις που καταλύουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD, GSH & καταλάση

Επιπλέον, αρκετές ενδογενείς πρωτεΐνες διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες ή δεσμεύοντας μεταλλικά ιόντα και σύμπλοκα. Σε αυτές τις πρωτεΐνες συγκαταλέγονται η σερουλοαλβουμίνη, η λακτοφερρίνη, η τρανσφερρίνη, η σερουλοπλασμίνη, η φερριτίνη, η αποσφαιρίνη και η αιμοπηξίνη (Salvayre et al., 2016).

3.5.2 Διαιτητικά αντιοξειδωτικά

Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 3, η αυξημένη παραγωγή ROS εμπλέκεται στην παθολογία της αθηροσκλήρωσης. Έχει προταθεί ότι η μείωση του οξειδωτικού στρες στα αγγεία μπορεί να έχει ευεργετική δράση όχι μόνο στην αγγειακή λειτουργία, αλλά και στην πρόγνωση σε ασθενείς με CVD. Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί προς αυτήν την κατεύθυνση (Münzel et al., 2010). Η μελέτη CHAOS έδειξε ότι η υψηλή πρόσληψη βιταμίνης E συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφράγματος μυοκαρδίου (Stephens et al.,

1996), η μελέτη ARIC (1995) έδειξε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης βιταμίνης C και πάχους του καρωτιδικού τοιχώματος, η μελέτη αθηροσκλήρωσης Kuopio (1997) έδειξε ότι η ανεπάρκεια βιταμίνης C ίσως συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος μυοκαρδίου, η μελέτη Zutphen Eldery (1993) έδειξε ότι η υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών (30 mg/day έναντι 19 mg/day) συνδέεται με μειωμένη CVD-θνησιμότητα, η μελέτη ATBC έδειξε ότι η αυξημένη συγκέντρωση ορού βιταμίνης E συνδέεται με μειωμένη θνησιμότητα (Wright et al., 2006) και η μελέτη NHANES II έδειξε ότι η χαμηλή συγκέντρωση ορού της βιταμίνης C συνδεόταν με υψηλότερα ποσοστά καρκίνου και θανάτου από κάθε αιτία στους άντρες (Loria et al., 2000).

Ενδιαφέρον προκαλεί η μελέτη συνδυασμένης χορήγησης βιταμινών. Οι Tosoulis et al (2003) έδειξαν ότι η συμπληρωματική χορήγηση συνδυασμού βιταμινών C και E σε δόσεις 2 g/ημέρα και 800 IU/ημέρα αντίστοιχα, για 4 εβδομάδες μείωνε τα επίπεδα ορού των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 β , IL-6 και των μορίων προσκόλλησης sICAM και sVCAM και παρατήρησαν βελτιωμένη αγγειοδιασταλτική απόκριση σε αντιδραστική υπεραιμία σε υγιείς καπνιστές. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι δύο βιταμίνες C και E εμφανίζουν συνεργιστική δράση, καθώς κατά τη μονοθεραπεία δεν εμφανιζόταν σημαντική επίδραση. Ωστόσο, σε μετα-ανάλυση οι Ashor et al (2015) έδειξαν αντίθετα αποτελέσματα όταν εξέτασαν την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης των βιταμινών C και E σε μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό τους για τουλάχιστον 2 εβδομάδες στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι άτομα που λάμβαναν μονοθεραπεία με δόση βιταμίνης C 500-2.000 mg/day ή δόση βιταμίνης E 300-1.800 IU/ημέρα είχαν βελτίωση στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ενώ η συνδυαστική χορήγηση (βιταμίνη C: 500-2.000 mg/ημέρα και βιταμίνη E: 400-1.200 IU/ημέρα) δεν εμφάνιζε κάποια επίδραση. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η βιταμίνη C μπορεί να αναγεννά την οξειδωμένη βιταμίνη E. Σε αυτήν την ευεργετική αλληλεπίδραση έχουν βασιστεί οι *in vivo* κλινικές δοκιμές που εξετάζουν την πιθανή αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης συμπληρωματικής χορήγησης βιταμινών στην καρδιαγγειακή νόσο. Παράλληλα, *in vitro* δοκιμές έχουν δείξει ότι η συνεργιστική δράση των δύο βιταμινών μπορεί να παύει να υφίσταται υπό αναερόβιες συνθήκες και ίσως επιφέρει προ-οξειδωτικές ιδιότητες (μετατρέποντας τις βιταμίνες σε ελεύθερες ρίζες). Για παράδειγμα, έχει φανεί ότι ο σχηματισμός ελεύθερης ρίζας της α -τοκοφερόλης παρουσία άλλου αντιοξειδωτικού, όπως το ασκορβικό οξύ, ήταν ενισχυμένη με υψηλή δόση βιταμίνης E ή υπό αναερόβιες συνθήκες (Ashor et al., 2015). Οι ίδιοι ερευνητές σε προηγούμενη μετα-ανάλυσή τους (2014) έδειξαν ότι η συμπληρωματική χορήγηση βιταμινών συσχετιζόνταν με

μικρή μείωση της αρτηριακής σκληρίας (stiffness). Η αποτελεσματικότητα ήταν αυξημένη σε υγιή άτομα συγκριτικά με ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Η μετα-ανάλυση των Bjelakovic et al (2009) έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση β-καροτίνης, βιταμίνης Α και Ε ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό σχετιζόταν με αυξημένη θνησιμότητα.

Αν και κάποιες κλινικές δοκιμές κατάφεραν να δείξουν θετική επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης βιταμινών στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από CVD, στο σύνολο τους οι κλινικές δοκιμές έχουν αποτύχει να καταλήξουν σε θετικά αποτελέσματα. Οι περισσότερες διεξήχθησαν σε εθελοντές με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο ή που είχαν βιώσει ήδη έμφραγμα μυοκαρδίου. Για τον λόγο αυτόν η Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία το 2004 (AHA, 2004 AHA Science Advisory) αποθάρρυνε την συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών στην πρόληψη και την θεραπεία των CVD (Kris-Etherton et al., 2004). Επιπλέον, ο βασικός περιορισμός κυρίως των επιδημιολογικών μελετών είναι ότι η αυξημένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών (μέσω της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών) συνοδεύεται από έναν πιο «υγιεινό» τρόπο ζωής που περιλαμβάνει, για παράδειγμα, αποχή από το κάπνισμα (Münzel et al., 2010).

3.5.3 Πολυφαινόλες

Σε ανάλυση επιδημιολογικών δεδομένων του WHO το 1992 παρατηρήθηκε ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα στην περιοχή της Τουλούζης, Γαλλία, όπου αν και υπήρχε υψηλή κατανάλωση κορεσμένου λίπους, με συγκρίσιμα επίπεδα χοληστερόλης και παρόμοιους παράγοντες κινδύνου φάνηκε σημαντικά χαμηλότερη επίπτωση θανάτου από στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με άλλες χώρες, όπως οι ΗΠΑ και το Ηνωμένο Βασίλειο. Αυτή η φαινομενική αντίφαση έγινε γνωστή ως το «γαλλικό παράδοξο». Αυτή η παρατήρηση έδωσε το έναυσμα για εξήγηση αυτού του φαινομένου, όπου προτάθηκε ότι το κόκκινο κρασί και μάλιστα τα διάφορα συστατικά του πέρα από το αλκοόλ μπορεί να έχουν οφέλη για την υγεία. Προσφάτως, η έρευνα εστιάζει όλο και περισσότερο στη μελέτη του ρόλου των πολυφαινολών στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων, του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Οι πολυφαινόλες που αποτελούν μία κατηγορία φυτοχημικών (δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών), είναι ενώσεις που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο και μπορούν να ταξινομηθούν σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες. Έχουν βρεθεί περισσότερες από 8.000 φαινολικές δομές και περισσότερα από 4.000 φλαβονοειδή. Τρόφιμα πλούσια σε πολυφαινόλες είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά ολικής άλεσης, το τσάι, το κακάο και το κρασί (Tsao, 2010). Αν

και οι πολυφαινόλες δεν θεωρούνται θρεπτικά συστατικά, συνδέονται όλο και περισσότερο με τα οφέλη που προσφέρει η Μεσογειακή Διατροφή. Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στις ελιές, το ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί έχει φανεί ότι διαθέτουν σημαντικές αντιφλεγμονώδεις, καρδιοπροστατευτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Soditti et al., 2012). Έχει φανεί ότι η ρεσβερατρόλη, μία πολυφαινόλη που περιέχεται στα σταφύλια, τα φρούτα τύπου μπέρι και το κόκκινο κρασί, εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που διαθέτει ίσως επιβραδύνει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης μέσω της αναστολής της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, την καταστολή του πολλαπλασιασμού των αγγειακών SMCs και την αγγειοχάλαση (Riccioni et al., 2015).

Γενικώς, τα σταφύλια έχει φανεί ότι μειώνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την οξείδωση της LDL, το οξειδωτικό στρες και βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία (Wightman et al., 2014). Οι Lekakis et al. (2005) όταν χορήγησαν 600 mg εκχυλίσματος πολυφαινολών από κόκκινα σταφύλια σε 30 ασθενείς με στεφανιαία νόσο παρατήρησαν βελτίωση στη τιμή της FMD 60 λεπτά μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος. Οι Mink et al. (2007) σε προοπτική μελέτη που διεξήγαγαν σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με follow-up 16 ετών έδειξαν ότι η πρόσληψη φλαβονοειδών σχετιζόταν με μειωμένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα.

Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση των πολυφαινολών στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Για παράδειγμα, μελέτη σε αρουραίους είχε δείξει ότι προϊόντα από σταφύλια, όπως χυμός, εκχύλισμα και κρασί προκαλούσαν αγγειοχάλαση μόνο σε αορτικούς δακτύλιους (aortic rings) που περιείχαν ενδοθήλιο. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε από άλλες *in vivo* μελέτες που παρατήρησαν ότι προϊόντα από σταφύλια επάγουν την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοχάλαση αυξάνοντας τον σχηματισμό του NO. Σε μελέτη *in vitro* η έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε κόκκινο κρασί είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της eNOS αν και απαιτήθηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις από κόκκινο κρασί για να παρατηρηθεί το αποτέλεσμα. Η θετική επίδραση των πολυφαινολών στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να εξηγηθεί από την αύξηση της έκφρασης της eNOS, από τον περιορισμό της αυξημένης έκφρασης της οξειδάσης του NADPH και από την αναστολή του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II στα SMCs (Schini-Kerth et al., 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΞΗΡΑΜΕΝΑ ΦΡΟΥΤΑ

4.1 Φρούτα και λαχανικά

Η διατροφή αποτελεί ακρογωνιαίό λίθο της πρόληψης κατά των χρόνιων νοσημάτων όπως ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και η καρδιαγγειακή νόσος. Ήδη από τα αρχαία χρόνια ήταν γνωστό ότι η διατροφή επιδρά στην υγεία. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει εστιαστεί στον ρόλο ορισμένων τροφίμων και διατροφικών σχημάτων στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης και επιδείνωσης χρόνιων νοσημάτων, καθώς και στη μείωση του κινδύνου θνησιμότητας από συγκεκριμένη ή κάθε αιτία. Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η μελέτη που εστιάζει στη βέλτιστη διατροφή μέσω διατροφικών προτύπων που αποσκοπούν εκτός από την κάλυψη επαρκούς ενέργειας και θρεπτικών συστατικών, στη διατήρηση της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής, στην προαγωγή της υγείας, της ευεξίας και της μακροζωίας.

Η πρώτη μεγάλη, προοπτική μελέτη που ερεύνησε τη διατροφή και τον τρόπο ζωής ως μέρος των παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, ανάμεσα σε διαφορετικές χώρες ήταν η μελέτη των 7 χωρών την δεκαετία του '60. Η συγκεκριμένη μελέτη, ανέδειξε το ρόλο της Μεσογειακής Διατροφής στην καρδιαγγειακή νόσο και τη θνησιμότητα από κάθε αιτία. Πρόσφατες έρευνες, έχουν δείξει ότι δίαιτες που περιλαμβάνουν τα λαχανικά και τα φρούτα ως βασικό στοιχείο τους, όπως η Μεσογειακή Διατροφή, ίσως αποτελούν το ιδανικό διατροφικό σχήμα αποτελώντας πρότυπο προς υιοθέτηση. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν αντίστροφη σχέση μεταξύ διατροφής πλούσιας σε φρούτα και λαχανικά και του μειωμένου κινδύνου για χρόνιες ασθένειες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο καρκίνος, (Block et al., 1992, WHO 2008, Steinzer et al., 1996) η καρδιαγγειακή νόσος (Hung et al., 2004, Hu et al., 2003) και τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (Ness et al., 1997). Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών κατά την παιδική ηλικία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων κατά την ενήλικη ζωή (Maynard et al., 2003, Ness et al., 2005).

Διάφοροι οργανισμοί σε όλο τον κόσμο έχουν προχωρήσει στη δημιουργία συστάσεων που υπαγορεύουν την αύξηση της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών. Στις ΗΠΑ, ο USDA δημοσίευσε το 2015 τις Διαιτητικές Οδηγίες για τους Αμερικάνους (2015–2020 Dietary Guidelines for Americans) δίνοντας έμφαση στον συνδυασμό της κατανάλωσης

τροφίμων από κάθε ομάδα τροφίμων. Στο πλαίσιο της προώθησης μίας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής ο USDA έχει δημιουργήσει το διατροφικό πιάτο (ChooseMyPlate) το οποίο απεικονίζει τις 5 βασικές ομάδες τροφίμων, οι οποίες περιλαμβάνουν τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα πρωτεϊνούχα τρόφιμα και τα γαλακτοκομικά. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη σημασία της καθημερινής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών. Ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο περιλαμβάνει ποικιλία από λαχανικά, όπως πράσινα φυλλώδη, κόκκινα, πορτοκαλί και αμυλώδη, καθώς και ποικιλία από φρούτα κυρίως ολόκληρα έναντι των χυμών που διαθέτουν περιορισμένες διαιτητικές ίνες (USDA, 2015).



Εικόνα 4.1 Το διατροφικό πιάτο που έχει δημοσιεύσει ο USDA

Ο USDA προτείνει ως μερίδα φρούτων: $\frac{1}{4}$ της κούπας σταφίδες ή μισή κούπα από άλλο φρούτο, όπως φράουλες ή $\frac{3}{4}$ της κούπας 100% φυσικό χυμό από φρέσκα φρούτα.



$\frac{1}{4}$ cup portion of strawberries = $\frac{1}{2}$ cup-equivalent fruit



$\frac{1}{4}$ cup portion of 100% orange juice = $\frac{1}{4}$ cup-equivalent fruit



$\frac{1}{4}$ cup portion of raisins = $\frac{1}{2}$ cup-equivalent fruit

Παράλληλα, ο ΑΗΑ προτείνει την κατανάλωση 4-5 μερίδων φρούτων και λαχανικών ημερησίως για ένα διατροφικό πρότυπο που βασίζεται σε δίαιτα 2000 Kcal.

Στην Ελλάδα το 2014 εκδόθηκαν για πρώτη φορά Εθνικοί Διατροφικοί Οδηγοί από το Ινστιτούτο Προληπτικής, Περιβαλλοντικής και Εργασιακής Ιατρικής. Ο Διατροφικός Οδηγός για Ενήλικες συστήνει την κατανάλωση 3 μερίδων από ποικιλία φρούτων καθημερινά. 1 μερίδα αντιστοιχεί σε 1 μετρίου μεγέθους φρούτο, όπως μήλο ή αχλάδι, σε 2 μικρά φρούτα, όπως μανταρίνια, σε 4 αποξηραμένα φρούτα, όπως βερίκοκα ή δαμάσκηνα ή σε 1 $\frac{1}{2}$ κουταλιά της σούπας σταφίδες. Επίσης, συστήνει την προσθήκη φρούτων, όπως οι σταφίδες και το ρόδι, στις σαλάτες και τα δημητριακά πρωινού.

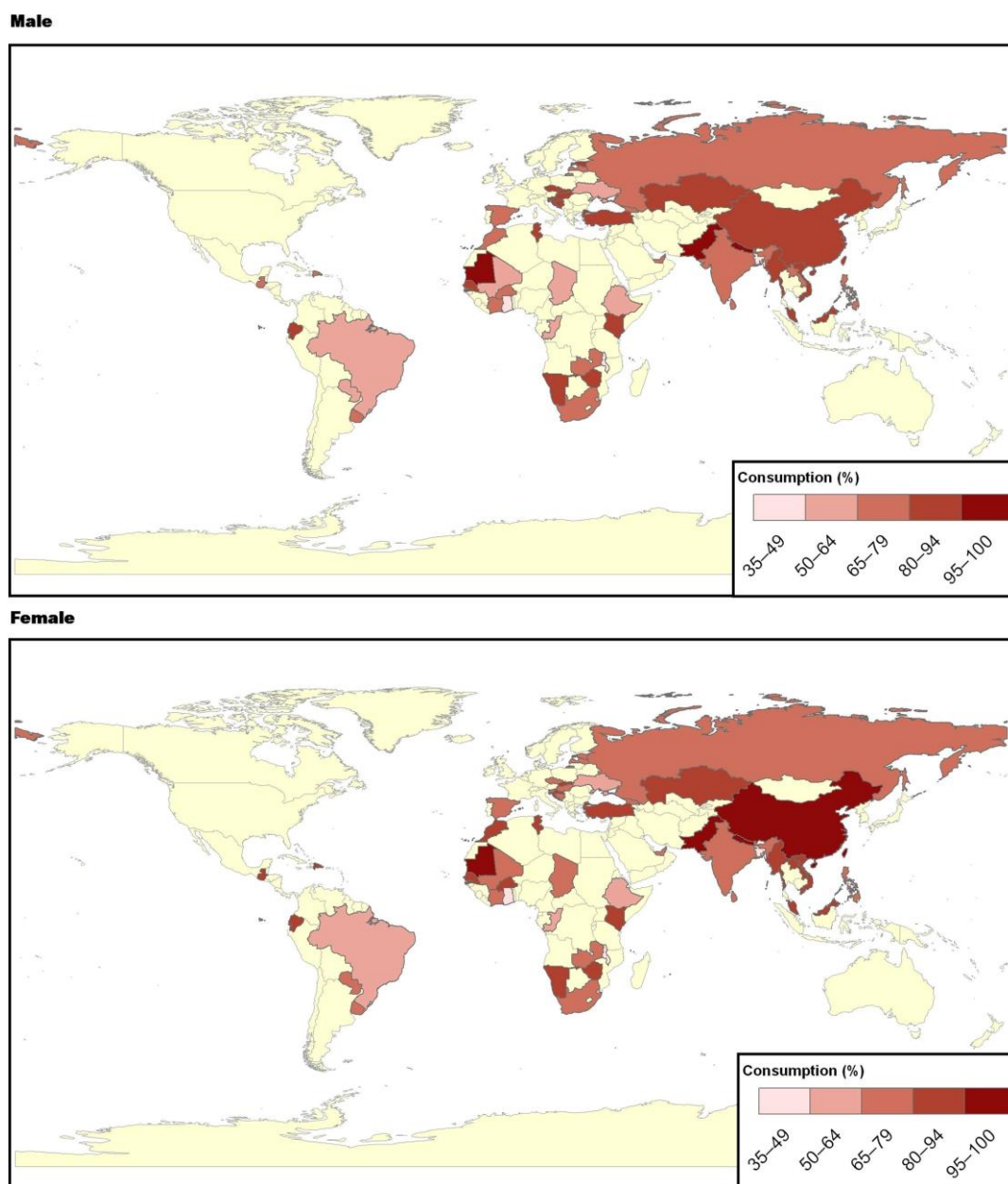
Υπάρχουν διάφορα ευρήματα που συσχετίζουν θετικά την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με δείκτες υγείας. Για παράδειγμα, μετα-ανάλυση του 2016 έχει δείξει ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για υπέρταση. Διάφοροι λόγοι μπορούν να ερμηνεύσουν αυτό το αποτέλεσμα. Το κάλιο (K) και τα αντιοξειδωτικά που περιέχουν τα φρούτα και τα λαχανικά έχει φανεί ότι μειώνουν την αρτηριακή πίεση μέσω της βελτίωσης της λειτουργίας του ενδοθηλίου, της αγγειοδιαστολής και της αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επίσης, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μπορεί να επηρεάσει τις διατροφικές συνήθειες αυξάνοντας την πρόσληψη διαιτητικών ινών και μειώνοντας την πρόσληψη λιπιδίων. Η υψηλή πρόσληψη λιπιδίων συσχετίζεται έντονα με την υπέρταση. (Li et al., 2016)

Στην μελέτη ΑΤΤΙΚΗ οι Panagiotakos et al. (2007) έδειξαν ότι ένα διατροφικό πρότυπο που περιέχει φρούτα και λαχανικά συνδέεται με μειωμένη θνησιμότητα από κάθε αιτία, καθώς και μειωμένη επίπτωση από στεφανιαία νόσο και από διάφορους τύπους καρκίνου. Στην ίδια μελέτη, οι Pitsavos et al (2005) έδειξαν ότι η προσκόλληση στη Μεσογειακή Διατροφή, όπως εκτιμάται από το MedDiet Score, συνδέεται με αυξημένα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC) και με μειωμένα επίπεδα oxLDL. Επίσης, έδειξαν ότι η TAC συνδεόταν θετικά, ενώ η oxLDL είχε αντίστροφη συσχέτιση με την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και ελαιολάδου. Η μελέτη CARDIO2000 έδειξε ότι ακόμα και η χαμηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, 2-3 μερίδες ημερησίως συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για στεφανιαία επεισόδια. Ακόμα και στους καπνιστές φάνηκε κάποια επίδραση. Επίσης, όσο η κατανάλωση αυξανόταν ο κίνδυνος εμφανιζόταν μειωμένος έως και 70% συγκριτικά με τη χαμηλή κατανάλωση. (Panagiotakos et al., 2003) Η μελέτη HALE project έδειξε ότι η Μεσογειακή Διατροφή όπως εκτιμήθηκε από MedDiet Score, Mediterranean Adequacy Index (MDI) και το Healthy Diet Index (HDI) σχετίζεται με μειωμένη θνησιμότητα (Knoops et al., 2006).

Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν σημαντικές πηγές διαιτητικών ινών, βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων όπως βιταμίνες του συμπλέγματος B, βιταμίνη C, φυλλικό οξύ, K, Mg, Se Cr. Εξίσου σημαντική είναι και η περιεκτικότητά τους σε φυτοχημικά, όπως οι πολυφαινόλες, ενώσεις οι οποίες αν και δεν αποτελούν θρεπτικά συστατικά έχουν ιδιαίτερη σημασία στην υγεία και την ευεξία, έχοντας συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων. Τα φυτοχημικά και κυρίως οι πολυφαινόλες έχουν αναδειχθεί πρόσφατα από την επιστημονική κοινότητα κυρίως για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που διαθέτουν και αναλύονται εκτενώς στην ενότητα 4.2.2.

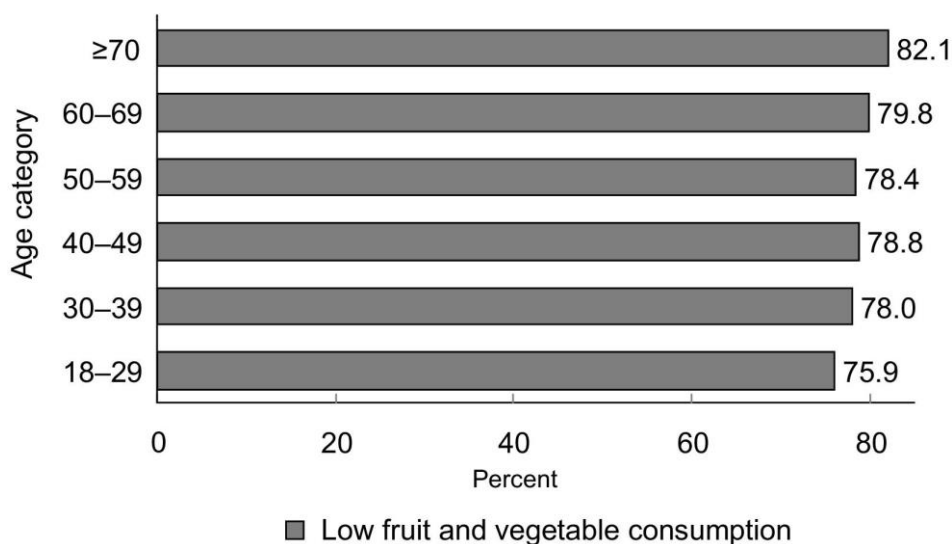
4.1.1 Η χαμηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών ως παγκόσμιο ζήτημα

Σύμφωνα με τον WHO, περίπου 1,7 εκατομμύρια (2,8%) θάνατοι παγκοσμίως μπορούν να αποδοθούν στην χαμηλή κατανάλωση λαχανικών και φρούτων. Η χαμηλή κατανάλωση αυτών των ομάδων τροφίμων αποτελεί έναν από τους 10 παράγοντες κινδύνου για παγκόσμια θνησιμότητα. Παγκοσμίως, η ανεπαρκής κατανάλωσή τους εκτιμάται ότι προκαλεί περίπου 14% των θανάτων που οφείλονται σε καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος, περίπου 11% των θανάτων από ισχαιμική καρδιακή νόσο και περίπου 9% των θανάτων από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

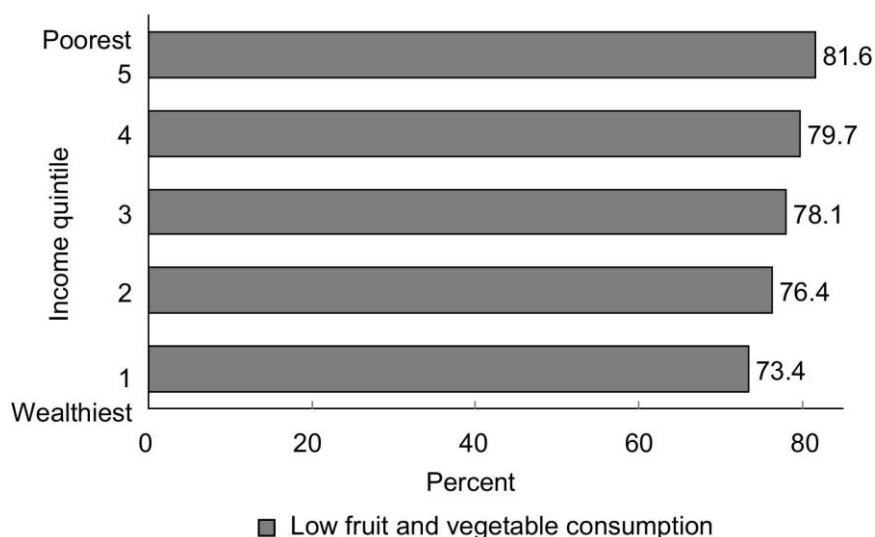


Σχήμα 4.1 Ποσοστά χαμηλής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών σε 52 χώρες σε άντρες (επάνω γράφημα) και γυναίκες (κάτω γράφημα). WHS, 2002–2003

Σύμφωνα με ανάλυση δεδομένων από τη μελέτη World Health Survey (2002-2003) στην οποία έλαβαν μέρος 52 χώρες, έχει φανεί ότι το χάσμα μεταξύ της ημερήσιας κατανάλωσης λαχανικών και φρούτων και των συστάσεων παραμένει μεγάλο. Έχει φανεί ότι η κατανάλωση αυτών των ομάδων τροφίμων διαφέρει τόσο μεταξύ των χωρών, όσο και μεταξύ των διάφορων ηλικιακών ομάδων και του διαφορετικού οικονομικού επιπέδου.



Σχήμα 4.2 Ποσοστά χαμηλής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών σε άντρες και γυναίκες αναλόγως την ηλικία τους. (Δείγμα από 52 χώρες)



Σχήμα 4.3 Ποσοστά χαμηλής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών σε άντρες και γυναίκες αναλόγως το εισόδημα. (Δείγμα από 52 χώρες)

4.1.2 Παραδοσιακά αποξηραμένα φρούτα

Τα παραδοσιακά αποξηραμένα φρούτα είναι μία κατηγορία φρούτων στα οποία έχει απομακρυνθεί ένα μεγάλο μέρος του αρχικού περιεχομένου τους, είτε με φυσικό τρόπο μέσω ξήρανσης, όπως οι σταφίδες και τα σύκα, είτε μέσω της χρήσης εξειδικευμένων στεγνωτηρίων ή αφυγραντήρων, όπως τα αποξηραμένα δαμάσκηνα. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα αποξηραμένα βερίκοκα και ροδάκινα, καθώς και εκείνα τα οποία υφίστανται επεξεργασία για να ανασταλεί η αμαύρωση με διοξείδιο του θείου πριν την διαδικασία ξήρανσης. Οι χουρμάδες, οι οποίοι εκ φύσεως διαθέτουν χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, μπορούν να χαρακτηριστούν, επίσης, ως αποξηραμένα φρούτα, αν και δεν υφίστανται ξήρανση. Στην κατηγορία αυτή δεν περιλαμβάνονται τα ξηρά φρούτα στα οποία έχει γίνει προσθήκη ζάχαρης, όπως ο αποξηραμένος ανανάς, διαλύματος ζάχαρης ή χυμού από φρούτα, όπως τα αποξηραμένα βατόμουρα και κεράσια, καθώς και αφυδατωμένα φρούτα με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Τα παραδοσιακά αποξηραμένα φρούτα διατηρούν το μεγαλύτερο ποσοστό της διατροφικής τους αξίας, για τον λόγο ότι επεξεργάζονται ελάχιστα.

Η διατροφή του ανθρώπου παρουσιάζει ποικιλομορφία ανά τον κόσμο και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το κλίμα και οι πολιτισμικές παραδόσεις. Διαφορετικές δίαιτες και διατροφικές συνήθειες έχουν διαφορετικό αντίκτυπο στην υγεία και ειδικότερα στην αρτηριακή πίεση, τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, και την θνησιμότητα από κάθε αιτία. Η επιστημονική κοινότητα συγκλίνει στην άποψη ότι η προσκόλληση και η υιοθέτηση διαιτών που ακολουθούν ορισμένα διαιτητικά πρότυπα συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο χρόνιων ασθενειών. Παραδείγματα τέτοιων διαιτών που μπορούν να αποτελέσουν πρότυπα διατροφής είναι η Μεσογειακή Δίαιτα, η δίαιτα DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) και οι φυτοφαγικές δίαιτες. Οι δίαιτες αυτές δίνουν έμφαση στα φυτικά τρόφιμα, και κυρίως στα λαχανικά και τα φρούτα. Τα παραδοσιακά αποξηραμένα φρούτα μπορούν να αποτελέσουν μέρος των προαναφερόμενων διαιτών. Αυτού του τύπου δίαιτες σχετίζονται με αυξημένη πρόσληψη διαιτητικών ινών και μειωμένη πρόσληψη κορεσμένου λίπους. Στο γεγονός αυτό, μπορεί να αποδοθεί η εξήγηση των αποτελεσμάτων μίας ανάλυσης της μελέτης NHANES (1999-2004), η οποία έδειξε ότι η πρόσληψη αποξηραμένων φρούτων συνδέεται με χαμηλότερο ΔΜΣ, μειωμένη περιφέρεια μέσης και μειωμένη κοιλιακή παχυσαρκία (Keast et al., 2011). Επιπλέον, η κατανάλωση αποξηραμένων φρούτων συσχετίζεται με υψηλότερη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, όπως διαιτητικές ίνες, βιταμίνες, μαγνήσιο, σίδηρο και κάλιο, καθώς και με κατανάλωση περισσότερων μερίδων

φρούτων ημερησίως και γενικότερα πιο υγιεινές διαιτητικές συνήθειες τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες υιοθέτησης υγιεινών διατροφικών προτύπων, όταν τα άτομα καταναλώνουν αποξηραμένα φρούτα.

Τα αποξηραμένα φρούτα είναι αναγκαίο να συμπεριλαμβάνονται στις διατροφικές συστάσεις κάθε χώρας, διότι συμβάλλουν στην υιοθέτηση των διατροφικών συστάσεων για την πρόσληψη φρούτων. Τα αποξηραμένα φρούτα είναι πιο εύκολα στην αποθήκευση και στην διανομή, είναι διαθέσιμα όλο τον χρόνο, ενσωματώνονται εύκολα σε άλλα τρόφιμα και παρουσιάζονται ως εναλλακτική λύση των σνακ που περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη, όπως οι καραμέλες και ο σοκολάτες. Σύμφωνα με τις συστάσεις των Εθνικών Διατροφικών Οδηγών ενδείκνυται η προσθήκη αποξηραμένων φρούτων σε δημητριακά πρωινού και σαλάτες.

4.2 Η σταφίδα

Η σταφίδα πρόκειται για ένα φρούτο με ιδιαίτερη πολιτισμική και διατροφική αξία. Η μοναδική της γεύση και η υψηλή διατροφική αξία της είναι ήδη γνωστές από τα αρχαία χρόνια, καθώς έχει θεωρηθεί ένα υγιεινό τρόφιμο εδώ και αρκετούς αιώνες. Η καλλιέργεια και το εμπόριο της σταφίδας άνθισαν στα μέρη όπου ευδοκίμωσε η καλλιέργεια της αμπελοργιάς. Η ευχάριστη γεύση της σε συνδυασμό με τη φυσική ανθεκτικότητα της στην αλλοίωση και την ευκολία αποθήκευσης έχουν καταστήσει ευρεία την κατανάλωση.

Η σταφίδα είναι ο καρπός ενός θαμνώδους αμπελιού που ανήκει στο γένος *Vitis* και την οικογένεια των αμπελιδών (*Ampelidae*, *Vitaceae*). Ανάμεσα στην ποικιλία ειδών που καταλαμβάνει το γένος *Vitis* ξεχωρίζει η άμπελος η οينوφόρος ή *Vitis Vinifera* var. *Apyrena* ή σταφιδάμπελος όπως κοινώς ονομάζεται. Η καλλιέργεια της σταφιδάμπελου στην Ελλάδα πιθανολογείται ότι άρχισε κατά την περίοδο της Φραγκοκρατίας (1212-1360μ.Χ.) όταν οι Φράγκοι είχαν υπό την κατοχή τους την Πελοπόννησο. Κατά τον 19^ο αιώνα ενισχύθηκε η καλλιέργεια και η εξαγωγή της σταφίδας που αποτέλεσε σημαντικό αγροτικό προϊόν. Μέχρι το 1860 οι εκτάσεις με σταφιδάμπελους έφτασαν τα 120.000-150.000 στρέμματα. Το εμπόριο σταφίδας που ακολούθησε τη συγκυριακή αυξημένη ζήτηση στην Ευρωπαϊκή αγορά και κυρίως στην Αγγλία γινόταν μέσω φορτηγών πλοίων που έφευγαν από το λιμάνι της Πάτρας προς μεγάλα λιμάνια της Γαλλίας και της Αγγλίας.

Ωστόσο, στα τέλη του 19^{ου} αιώνα η εξαγωγή Κορινθιακής σταφίδας πλήττεται εφόσον είχε ακολουθήσει αμιγώς συγκυριακή πορεία, αυτή της παροδικής πτώσης της Γαλλικής καλλιέργειας και οινοπαραγωγής, οδηγώντας στη μεγάλη σταφιδική κρίση που είχε οδυνηρό αντίκτυπο στην οικονομία της χώρας.



Εικόνα 4.2 Κιβώτια σταφίδας φορτώνονται στο λιμάνι της Πάτρας (19^ο αιώνας)

Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες σταφίδας:

- ✓ οι **σταφίδες** ή **raisins**, αποξηραμένα σκουρόχρωμα σταφύλια με σπόρους
- ✓ οι **σουλτάνες** ή **sultana** ή **Thompson Seedless**, ανοιχτόχρωμα αποξηραμένα σταφύλια χωρίς σπόρους
- ✓ η **Κορινθιακή σταφίδα** ή **currants** (**Vitis Vinifera var. Apyrena**) με βαθύ σκούρο χρώμα σχεδόν μαύρο που καλλιεργείται και παράγεται σχεδόν αποκλειστικά στην Βόρεια Πελοπόννησο (Belitz et al., 2006, Chiou et al., 2007)

Η Κορινθιακή σταφίδα υπερέχει στην ποιότητα έναντι των άλλων ποικιλιών και για αυτόν τον λόγο έχει χαρακτηριστεί ως προϊόν με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ).

Η ξήρανση της σταφίδας μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: απευθείας έκθεση στον ήλιο ή παραμονή στη σκιά. Η πρώτη μέθοδος είναι η πιο διαδεδομένη και πραγματοποιείται με τοποθέτηση της σταφίδας σε ακάλυπτα χωμάτινα ξηραντήρια (αλώνια) επάνω σε σταφιδόχορτο, σε ξηραντήρια από σκυρόδεμα και σε τζιβιέρες (σιδερένια ή ξύλινα πλαίσια με συρμάτινη επιφάνεια). Ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε ειδικά ξηραντήρια με

κάλυψη. Η ξήρανση σε ακάλυπτα ξηραντήρια διαρκεί 7-12 ημέρες, χρόνος που εξαρτάται από τις εκάστοτε καιρικές συνθήκες.

Η ξήρανση υπό σκιά προσφέρει ανώτερης ποιότητας σταφίδα. Αυτή η μέθοδος απαιτεί ανάρτηση των σταφυλιών σε σύρματα σε μόνιμο ξηραντήριο-στεγνωτήριο ή ξήρανση υπό του φυλλώματος του πρεμνού για χρονικό διάστημα περίπου 20 ημερών. Ακολουθεί έκθεση στον ήλιο για επιπλέον 2 ημέρες έως ότου επιτευχθεί πλήρης ξήρανση. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται περιορισμένα λόγω του μεγάλου απαιτούμενου χρόνου ξήρανσης (Χαλουλάκος, 1993).

4.2.1 Συστατικά σταφίδας

Η σταφίδα έχοντας γλυκιά γεύση μπορεί να αποτελέσει ένα γλυκαντικό, πλούσιο σε διαιτητικές ίνες, σύνθετους υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, ενώ όπως και τα υπόλοιπα φρούτα δεν περιέχει λίπος (Kaliora et al., 2009). Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα συστατικά της σταφίδας ανά 100 g τροφίμου και ανά 36 g που αντιστοιχεί σε ποσότητα σταφίδας ίση με ¼ της κούπας. Οι σταφίδες συγκριτικά με τα υπόλοιπα φρούτα είναι πλούσιες σε μαγνήσιο και σίδηρο. Επίσης, οι σταφίδες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες διατροφικές πηγές βορίου, περιέχοντας 2,2mg/100g (Carughi 2012). Το βόριο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την ανάπτυξη, καθώς συμβάλλει στην καλή υγεία των οστών και των αρθρώσεων.

Επιπλέον, η συνολική ποσότητα των διαιτητικών ινών είναι 6,8g/100g σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του USDA. Διατροφή πλούσια σε διαιτητικές ίνες συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης διαφόρων νοσημάτων, ιδιαίτερα της δυσκοιλιότητας, αλλά και καρδιακών παθήσεων, διαβήτη, παχυσαρκίας, εκκολπωμάτων και καρκίνου του παχέους εντέρου. Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Ιατρικής (Institute of Medicine, 2002) και τις Διαιτητικές Οδηγίες για τους Αμερικάνους (2015–2020 Dietary Guidelines for Americans, USDA 2015) συστήνεται η κατανάλωση 14g/ 1.000 Kcal προσλαμβανόμενης ενέργειας για ενήλικες και παιδιά άνω του 1 έτους. Οι σταφίδες, συνεπώς, είναι μία καλή πηγή διαιτητικών ινών.

4.2.2 Φυτοχημικά σταφίδας

Η σταφίδα διαθέτει, επίσης, πλούσιο περιεχόμενο σε φυτοχημικά συστατικά (Kanellos, et al., 2013). Έχει φανεί από μελέτες ότι η πληθώρα πολυφαινόλων που περιέχουν οι σταφίδες απορροφώνται σε σημαντικό βαθμό και είναι βιοδιαθέσιμες από τον οργανισμό (Williamson et al., 2010, Kanellos et al., 2013). Διάφορες πολυφαινόλες έχουν ανιχνευθεί σε σημαντικές ποσότητες στη σταφίδα, όπως το βανιλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το p-υδρόξυ-φαινυλοξικό οξύ, το p-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και η κερκετίνη, ενώ σε υψηλή συγκέντρωση ανιχνεύτηκε το τερπενικό ολεανολικό οξύ (Chiou et al., 2007, Kanellos et al., 2013).

Το περιεχόμενο ενός τροφίμου σε φαινόλες, πολυφαινόλες και τανίνες (PPT) μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορες μεθόδους. Καλύτερη μέθοδος θεωρείται η Υγρή Χρωματογραφία Πίεσης (HPLC) με ανίχνευση μάζας και κατάλληλα σημασμένα ισοτοπικά πρότυπα. Ωστόσο, αυτά είναι σπανίως διαθέσιμα και η φασματομετρία μάζας έχει υψηλό κόστος (Williamson et al., 2010). Για αυτόν τον λόγο, έχουν αναπτυχθεί μη αναλυτικές μέθοδοι όπως αυτές που χρησιμοποιούν τα αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Σε αυτήν την μέθοδο, οι σταφίδες, τα αποξηραμένα δαμάσκηνα και τα σύκα εμφανίζουν παρόμοιο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο που μπορεί να διαφέρει 9 με 12 mg σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά g φρούτων. Τα αποξηραμένα φρούτα εμφανίζουν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τα νωπά τους, λόγω της συμπύκνωσης που εμφανίζουν κατά την ξήρανση (Wu et al., 2004). Υπάρχουν ορισμένες *in vitro* μέθοδοι που προσδιορίζουν τη συνολική περιεκτικότητα σε PPT, καθώς μετρούν τα δραστικά οξειδοαναγωγικά συστατικά του εκχυλίσματος που κατά κύριο λόγο αντιπροσωπεύουν οι PPT. Κύρια αντιοξειδωτική δοκιμασία είναι η ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC).

Η βιοδιαθεσιμότητα των PPT που περιέχονται στις σταφίδες είναι σημαντική. Για παράδειγμα, το πρωτοκατεχικό οξύ που εντοπίζεται μόνο στη σταφίδα και όχι στα σταφύλια είναι αρκετά βιοδιαθέσιμο και αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του μεταβολισμού της ανθοκυανίνης *in vivo* σε ανθρώπους, έχοντας προταθεί ως κύριος παράγοντας που συντελεί στην υγεία του ανθρώπου από την ωφέλιμη δράση των ανθοκυανινών (Vitaglione et al., 2007).

Πίνακας 4.1 Διατροφική ανάλυση Κορινθιακής Σταφίδας (Currants, zante, dried)			
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Μ.Μ.	/100g	/36g
ΜΑΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΑ			
Νερό	g	19.21	6.92
Ενέργεια	kcal	283	102
Πρωτείνες	g	4.08	1.47
Λιπίδια	g	0.27	0.1
Κορεσμένα	g	0.028	0.01
Μονοακόρεστα	g	0.047	0.017
Πολυακόρεστα	g	0.18	0.065
Υδατάνθρακες	g	74.08	26.67
Διαιτητικές ίνες	g	6.8	2.4
Σάκχαρα	g	67.28	24.22
ΜΕΤΑΛΛΑ/ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ			
Ασβέστιο	mg	86	31
Σίδηρος	mg	3.26	1.17
Μαγνήσιο	mg	41	15
Φωσφόρος	mg	125	45
Κάλιο	mg	892	321
Νάτριο	mg	8	3
Ψευδάργυρος	mg	0.66	0.24
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ			
Βιταμίνη C	mg	4.7	1.7
Θειαμίνη	mg	0.16	0.058
Ριβοφλαβίνη	mg	0.142	0.051
Νιασίνη	mg	1.615	0.581
Βιταμίνη B6	mg	0.296	0.107
Φυλλικό οξύ	μg	10	4
Βιταμίνη B12	μg	0	0
Βιταμίνη A	μg	4	1
Βιταμίνη A	IU	73	26
Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)	mg	0.11	0.04
Βιταμίνη D (D2 + D3)	μg	0	0
Βιταμίνη D	IU	0	0
Βιταμίνη K	μg	3.3	1.2

Πηγή: USDA National Nutrient Database for Standard Reference 28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Σκοπός μελέτης

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη, που αποτελεί μέρος μεγαλύτερης μελέτης παρέμβασης, εξετάζει την επίδραση της κατανάλωσης Κορινθιακής σταφίδας σε φαινομενικά υγιείς καπνιστές. Η παρούσα κλινική δοκιμή έχει σκοπό να προσδιορίσει τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, καθώς και την λειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου και τις μεταβολές στην αρτηριακή σκληρία μετά από παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα σε φαινομενικά υγιείς βαρείς καπνιστές με χαμηλή συμμόρφωση στις συστάσεις για την υιοθέτηση του Μεσογειακού διατροφικού προτύπου, ειδικότερα αναφορικά με την κατανάλωση λαχανικών και φρούτων.

5.2 Χαρακτηριστικά δείγματος

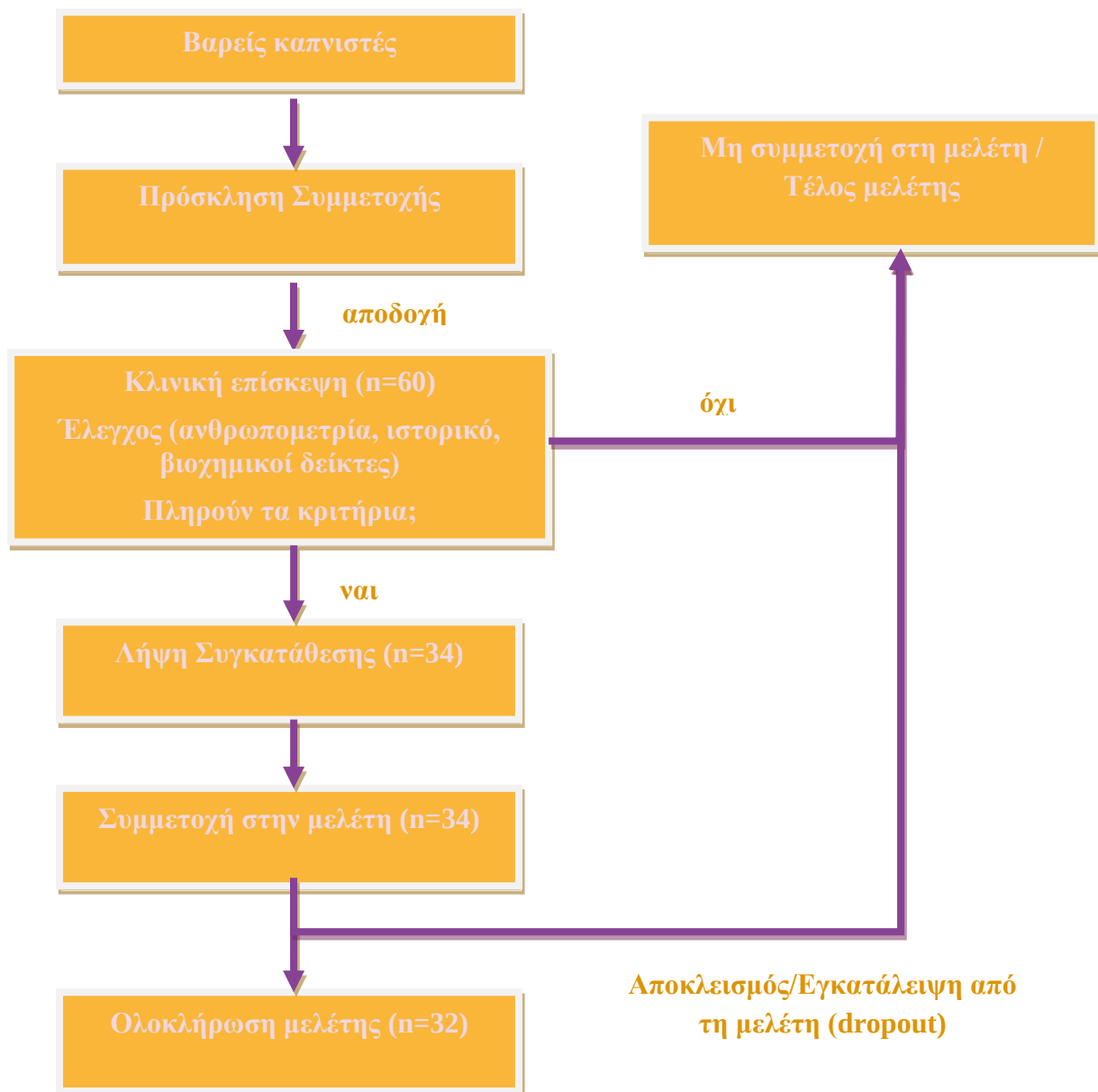
Μέγεθος δείγματος

Στην μελέτη είχε προβλεφθεί να συμμετέχουν συνολικά 40 φαινομενικά υγιείς βαρείς καπνιστές εθελοντές. Αρχικά, ενημερώθηκαν 60 εθελοντές και συμμετείχαν 34 εθελοντές στην μελέτη. Κατά την διάρκεια της μελέτης αποχώρησαν 2 εθελοντές και τελικά έμειναν 32 μέχρι το τέλος της παρέμβασης. Από αυτούς στην ομάδα ελέγχου εντάχθηκαν 12 και στην ομάδα παρέμβασης 20 εθελοντές.

Η μελέτη διεξάγεται σε καπνιστές, διότι:

- ο κίνδυνος για την εμφάνιση σειράς νοσημάτων είναι αυξημένος και συσχετίζεται με το οξειδωτικό στρες που επάγει η έκθεση στον καπνό του καπνίσματος
- έχει αναφερθεί πως οι καπνιστές έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών στο πλάσμα, ιδίως καροτενοειδών, σε σύγκριση με τους μη καπνιστές
- έχουν αναφερθεί διαφορές στις διατροφικές συνήθειες μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών
- το κάπνισμα μπορεί να επηρεάσει άμεσα την αντιοξειδωτική κατάσταση

- οι ελεύθερες ρίζες στις οποίες εκτίθενται οι καπνιστές μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια και μπορεί να εμπλέκονται στην ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων όπως η αρτηριοσκλήρωση και ο καρκίνος
- η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι ένα πρώιμο συμβάν στην αθηρογένεση που οδηγεί σε φλεγμονή, αγγειοσυστολή, και θρόμβωση
- η ζημιά που προκαλείται στο ενδοθήλιο από τον εισπνεόμενο καπνό του τσιγάρου συμβάλλει στον αγγειακό τραυματισμό, την αθηρογένεση και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου



Γράφημα 5.1 Διάγραμμα ροής διαδικασίας ένταξης των εθελοντών στη μελέτη.

Κριτήρια Επιλογής

Οι εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν ενήλικοι χρόνιοι βαρείς καπνιστές, με χαμηλή συμμόρφωση στις συστάσεις για την υιοθέτηση του Μεσογειακού διατροφικού προτύπου και είχαν φυσιολογικό ΔΜΣ. Αναλυτικά, τα κριτήρια επιλογής ήταν:

- ✓ Φαινομενικά υγιείς καπνιστές εθελοντές (άνδρες & γυναίκες)
- ✓ Ηλικία 20-60 έτη
- ✓ ΔΜΣ: 18,5-24,9kg/m²
- ✓ >15 τσιγάρα/ημέρα για τουλάχιστον 2 χρόνια
- ✓ Σκορ υιοθέτησης Μεσογειακής Διατροφής (MedDietScore) ≤ 30

Κριτήρια αποκλεισμού

Από τη συμμετοχή στην παρέμβαση εξαιρέθηκαν όσοι παρουσίαζαν τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω:

- ✓ νοητική νόσος
- ✓ κατάχρηση φαρμάκων ή αλκοόλης
- ✓ εγκυμοσύνη ή γαλουχία
- ✓ αλλεργίες
- ✓ χρόνια διάρροια
- ✓ αυτοάνοσα νοσήματα ή νοσήματα που καταστέλλουν το ανοσολογικό σύστημα ή λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων

5.3 Σχεδιασμός μελέτης

Το πρωτόκολλο της μελέτης έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μελέτη πρόκειται για μία κλινική δοκιμή διάρκειας 30 ημερών.

5.3.1 Προκαταρκτικό στάδιο

Επιλογή δείγματος

Αρχικά, προσκλήθηκαν υγιείς εθελοντές να συμμετάσχουν στην μελέτη. Όσοι ανταποκρίθηκαν στο κάλεσμα ενημερώθηκαν για τη μελέτη και σε όσους επιθυμούσαν να συμμετάσχουν ορίστηκε συνεδρία για λεπτομερή ενημέρωση. Η πρώτη επίσκεψη (baseline)

των εθελοντών έγινε στο εργαστήριο της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό». Κατά τη διάρκεια της πρώτης επίσκεψης συμπληρώθηκε το ερωτηματολόγιο της μελέτης και έγινε λήψη ιατρικού ιστορικού. Οι εθελοντές που πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής ενημερώθηκαν αναλυτικά για τη μελέτη, παρέλαβαν Πληροφοριακό Δελτίο, υπέγραψαν Δελτίο Συγκατάθεσης, και ενσωματώθηκαν στη μελέτη με έναν κωδικό αναγνώρισης.

Συμπλήρωση Ερωτηματολογίου

Το ερωτηματολόγιο της μελέτης περιελάμβανε 7 ενότητες:

- ✓ Γενικά Στοιχεία
- ✓ Ιστορικό Καπνίσματος
- ✓ Ιατρικό Ιστορικό
- ✓ Ανθρωπομετρικά Χαρακτηριστικά
- ✓ Ιατρικές Μετρήσεις
- ✓ Φυσική Δραστηριότητα
- ✓ Διατροφικές Συνήθειες

Η πρώτη ενότητα αφορά στοιχεία επικοινωνίας με τον εθελοντή, την επαγγελματική και οικογενειακή του κατάσταση καθώς και την ηλικία.

Το ιστορικό του καπνίσματος εξετάζει το σύνολο των ετών που καπνίζει ο εθελοντής, καθώς και τον αριθμό των τσιγάρων που καπνίζει ημερησίως.

Η λήψη του ιατρικού ιστορικού είναι απαραίτητη για να εξακριβωθεί η απουσία κάποιας παθολογικής κατάστασης και περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικά με τη λήψη οποιασδήποτε φαρμακευτικής αγωγής ή τη λήψη αντιμικροβιακής θεραπείας για τους τελευταίους 3 μήνες.

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά καθώς και οι ιατρικές εξετάσεις παρουσιάζονται αναλυτικότερα στην ενότητα 5.4.

Η φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκε με βάση τη φυσική δραστηριότητα στο σπίτι, την εργασία και την διασκέδαση για τις 7 τελευταίες ημέρες πριν την πρώτη επίσκεψη.

Τέλος, οι διατροφικές συνήθειες εκτιμήθηκαν μέσω τόσο μέσω του υπολογισμού του Μεσογειακού Διατροφικού Σκορ (MedDietScore), το οποίο περιλαμβάνει 11 ερωτήσεις και αξιολογεί τη συμμόρφωση στη Μεσογειακή διατροφή, όσο και μέσω 2 ανακλήσεων 24ώρου.

Αιμοληψία

Η αιμοληψία (40 mL αίματος) πραγματοποιήθηκε κατά την πρώτη επίσκεψη νωρίς το πρωί μετά από 12ωρη νηστεία και χωρίς οι εθελοντές να έχουν καπνίσει. Μετά την αιμοληψία ακολούθησε απομόνωση του ορού και του πλάσματος.

Απομόνωση ορού και πλάσματος

Η απομόνωση του ορού από το ολικό αίμα γίνεται με την παραμονή του δείγματος σε vacutainer χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (3000rpm, 10min, 4°C) και παραλαβή του υπερκείμενου. Τα δείγματα ορού θα χρησιμοποιούνται άμεσα για μέτρηση των απλών βιοχημικών παραμέτρων, ενώ θα φυλάσσονται και δείγματα ορού σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την ανάλυση των δεικτών φλεγμονής. Η απομόνωση του πλάσματος γίνεται με τη χρήση vacutainer με αντιπηκτικό παράγοντα και φυγοκέντρηση (3000rpm, 10min, 4°C). Τα δείγματα πλάσματος θα φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την ανάλυσή τους.

Εργαστηριακές Μετρήσεις

Στα δείγματα ορού των εθελοντών πραγματοποιήθηκε μέτρηση των απλών βιοχημικών παραμέτρων (γλυκόζη, λιπίδια, ηπατικά ένζυμα, ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη) στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ. Επίσης, στα δείγματα ορού πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των εξής δεικτών: CRP, ICAM-1 και εκτιμήθηκε η ικανότητα αντίστασης του ορού στην οξείδωση μετά από προσθήκη θειικού χαλκού (CuSO₄). Επιπλέον, στα δείγματα πλάσματος μετρήθηκαν τα επίπεδα MDA. Τέλος, εκτιμήθηκε η λειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου με μέτρηση της ενδιθηλιοεξαρτώμενης αγγειοδιαστολής (FMD), καθώς και η αρτηριακή σκληρία με μέτρηση της καρωτιδομηριαίας ταχύτητας αγωγής του σφυγμικού κύματος (PWV). Στην ενότητα 5.4 παρατίθενται αναλυτικά οι διεξαχθείσες μετρήσεις.

5.3.2 Στάδιο παρέμβασης

Κατά το στάδιο της παρέμβασης οι εθελοντές κλήθηκαν να καταναλώσουν ποσότητα σταφίδας ίση με 5 ισοδύναμα φρούτου κάθε μέρα για διάστημα 1 μήνα. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης, διατηρήθηκε επικοινωνία με τους εθελοντές μέσω αιφνίδιων ανακλήσεων 24ώρου τηλεφωνικώς για να ελεγχθεί η συμμόρφωση των εθελοντών στο πρωτόκολλο.

5.3.3 Στάδιο Αξιολόγησης

Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε επανεξέταση των εθελοντών 1 μήνα μετά την ένταξή τους στην μελέτη. Επαναλήφθηκαν οι ιατρικές μετρήσεις και οι μετρήσεις των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών, καθώς και δεύτερη αιμοληψία για την ανάλυση των παραπάνω εργαστηριακών αναλύσεων.

5.4 Κλινικο-εργαστηριακές μετρήσεις

5.4.1 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν περιλαμβάνουν ΣΒ, ύψος, περιφέρεια μέσης στο ύψος των μείζονων τροχαντήρων και περιφέρεια ισχίων σε ύψος 12cm από το άνω άκρο της επιγονατίδας. Ο ΔΜΣ υπολογίστηκε από τον τύπο $\Sigma B/Y^2$ (Kg/m^2). Το ποσοστό της λιπώδους μάζας σώματος προσδιορίστηκε μέσω του ζυγού TanitaWB - 100mA.

5.4.2 Μέτρηση αρτηριακής πίεσης

Η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης και των σφυγμών έγιναν με χρήση ηλεκτρονικού πιεσόμετρου OMRON. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε 3 φορές για να υπολογιστεί ο μέσος όρος.

5.4.3 Βιοχημικές παράμετροι

Οι μετρήσεις των απλών βιοχημικών παραμέτρων έγινε άμεσα στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ. Στα δείγματα ορού των εθελοντών πραγματοποιήθηκε μέτρηση γλυκόζης νηστείας, ολικής, LDL και HDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, ηπατικών ενζύμων (αλκαλική φωσφατάση, SGOT, SGPT, γGT), ουρίας, ουρικού οξέος, κρεατινίνης, λεπτίνης, αλβουμίνης, CRP, κοτινίνης, ICAM-1, αντίστασης ορού στην οξειδωση. Επιπλέον, απομονώθηκαν δείγματα πλάσματος για τον προσδιορισμό της MDA και των AOPP's.

5.4.4 Μετρήσεις δεικτών έκθεσης στο κάπνισμα

❖ Μέτρηση κοτινίνης πλάσματος

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο kit για τη μέτρηση της κοτινίνης (Abnova, Heidelberg, Germany)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISAreader (BiotekPowerWaveXS2)

Πιπέτες

Tips

Αρχή μεθόδου

Η κοτινίνη αποτελεί μεταβολίτη της νικοτίνης και είναι καλός δείκτης της έκθεσης στο κάπνισμα, καθώς έχει μεγαλύτερο χρόνος ημιζωής από τη νικοτίνη. Τα δείγματα τοποθετούνται στην πλάκα μαζί με το ένζυμο της κοτινίνης. Η κοτινίνη ανταγωνίζεται το ένζυμο για τις θέσεις πρόσδεσης στα μονοκλωνικά αντίσωμα της πλάκας. Στην συνέχεια, προστίθεται το υπόστρωμα. Η ένταση του χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της κοτινίνης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γίνεται με φωτομέτρηση στα 450 nm.

Αναλυτική πορεία

Όλα τα αντιδραστήρια χρειάζεται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C). Στην πλάκα προστίθενται 10 μL από τα πρότυπα, το τυφλό και τα δείγματα και 100 μL από το διάλυμα του ενζύμου. Ακολουθεί, επώαση για 60 min σε σκοτεινό μέρος. Με το πέρας της επώασης η πλάκα πλένεται, ακολουθεί προσθήκη του αντιδραστηρίου σε ποσότητα 100 μL και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Με το πέρας της επώασης γίνεται προσθήκη 100 μL του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 nm μέσα σε 15 min από τον τερματισμό της αντίδρασης. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μM κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.4.5 Μέτρησεις δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής

❖ Μέτρηση MDA πλάσματος

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο kit για τη μέτρηση του MDA (Cell Biolabs, San Diego, USA)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISAreader (Biotek Power Wave XS2)

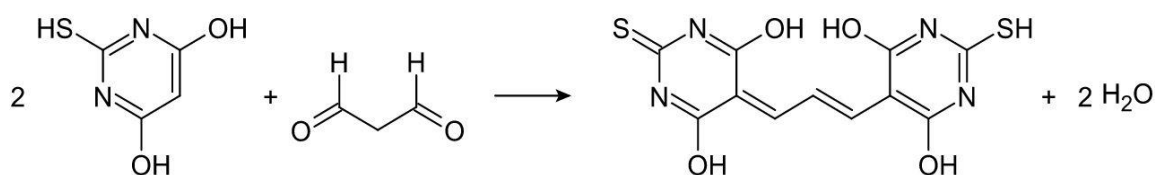
Συσκευή Vortex

Πιπέτες (50-500 μL)

Tips

Αρχή μεθόδου

Τα αντιδρώντα με το θειοβαρβιτουρικό οξύ συστατικά (TBARS) είναι μια καθιερωμένη δοκιμασία για τον έλεγχο και την ανίχνευση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Η άγνωστη συγκέντρωση MDA που περιέχουν τα δείγματα ή τα πρότυπα αντιδρά πρώτα με TBA στους 95°C. Η μέθοδος βασίζεται στην χρωματομετρική αντίδραση ενός μορίου MDA με δύο μόρια TBA. Το σύμπλεγμα είναι χαρακτηριστικής ερυθρή χρώσης που απορροφά στα 532nm.



Εικόνα 5.1: Σχηματισμός συμπλέγματος MDA-TBA

Αναλυτική πορεία

Τα επίπεδα της MDA στο πλάσμα μετρώνται σε φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε eppendorf tubes προστίθενται 100μL δείγματος ή προτύπου και 100μL SDS Lysis Solution. Ακολουθεί επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 250μL TBA σε κάθε eppendorf tube και επώάζονται στους 95°C για 45-60min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 15min και παραλαβή του υπερκείμενου. Για την πρόληψη της παρεμβολής της αιμοσφαιρίνης και των παραγώγων του ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: 300μL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε καθαρό eppendorf tube, προστίθενται 300μL n-βουτανόλης, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10000g για 5min. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 532nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μM κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα MDA (125μM). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, 1,95 και 0,98μM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι

μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $y=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της MDA σε μM και y η απορρόφηση στα 532nm.

❖ Μέτρηση AOPP's πλάσματος

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο kit για τη μέτρηση των AOPP's (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISA reader (Biotek Power Wave XS2)

Φυγόκεντρος (3000 g)

Συσκευή Vortex

Πιπέτες (10-1.000 μL)

Tips

Αρχή μεθόδου

Οι πρωτεΐνες είναι επιρρεπείς στην οξειδωτική βλάβη που προκαλεί το οξειδωτικό στρες σχηματίζοντας προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPP's). Η δοκιμασία βασίζεται στην φωτομέτρηση των τροποποιημένων πρωτεϊνών στα 340 nm.

Αναλυτική πορεία

Τα επίπεδα των AOPP's στο πλάσμα μετρώνται σε φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζονται όλα τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση. Στα δείγματα πλάσματος προστίθεται αντιδραστήριο απολιπιδίωσης και έπειτα από επώαση τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 5 λεπτά (3.000g). Στη συνέχεια, γίνεται αραίωση στα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα. Όταν τα αντιδραστήρια και τα δείγματα προσεγγίσουν θερμοκρασία δωματίου (18-26°C). Τα δείγματα, τα πρότυπα και το control τοποθετούνται στην πλάκα σε ποσότητα 200 mL το καθένα. Ακολουθεί άμεση μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μM κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

❖ Μέτρηση Λεπτίνης ορού

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση της λεπτίνης (R&D Systems, Abingdon, UK)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISAreader (Biotek Power Wave XS2)

Συσκευή Vortex

Πιπέτες (50-500μL)

Tips

Αρχή μεθόδου

Η λεπτίνη προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα, ενώ στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται αντίσωμα-ανιχνευτής της προσδεμένης λεπτίνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Μετά από πλύσιμο, προστίθεται υπόστρωμα και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική πορεία

Τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με χρήση εξειδικευμένου sandwich kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στα δείγματα γίνεται αραίωση 1:100. Στις αντίστοιχες θέσεις στην πλάκα προστίθεται αρχικά 100μL διαλύτη (AssayDiluent RD1-19) και 100μL προτύπου ή αραιωμένου δείγματος. Ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα με το διάλυμα πλύσης (x4). Μετά το τελευταίο ξέπλυμα απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 200μL του πολυκλωνικού αντισώματος. Ακολουθεί επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο και ξεπλένεται με διάλυμα πλύσης (x4). Απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 200μL από το υπόστρωμα. Επωάζονται για άλλα 30min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Στο τέλος προστίθενται 50μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε pg/mL κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα λεπτίνης (10000pg/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 και 15,6pg/mL. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι

μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $y=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της λεπτίνης σε $\mu\text{g/mL}$ και y η απορρόφηση στα 450nm .

❖ Προσδιορισμός αντίστασης του ορού στην οξείδωση

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα stock CuSO_4 20mM :

Διάλυμα εργασίας CuSO_4 $200\mu\text{M}$:

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Απιονισμένο H_2O

Πλάκα 96 πηγαδιών

Φωτόμετρο ELIS Areader (Biotek Power Wave XS2)

Συσκευή Vortex

Πεχάμετρο

Πιπέτες ($5\text{-}1000\mu\text{L}$)

Tips

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της *in vitro* οξείδωσης του πλάσματος προκαλούμενη από ιόντα Cu^{2+} , βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm . Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στα συζυγή διένια των υδροπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξειδίων, που παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, όταν προστίθενται ιόντα Cu^{2+} .

Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245nm παρέχεται η δυνατότητα να παρακολουθείται η κινητική της οξείδωσης που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξείδωσης των αντιοξειδωτικών η απορρόφηση στα 245nm αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του ορού στην οξείδωση και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση (Lagtime).

Αναλυτική πορεία

Στα δείγματα ορού που θα συλλεχθούν από την παραπάνω δοκιμασία προκαλείται οξείδωση με την προσθήκη θειικού χαλκού, όπως έχει περιγραφεί από τους Aurekoetxea et al. (2010). Τα δείγματα ορού αραιώνονται σε αναλογία 1:12 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (διάλυμα PBS) και τοποθετούνται σε πλάκα 96 πηγαδιών. Στον χρόνο μηδέν, στους αραιωμένους ορούς προστίθεται το διάλυμα εργασίας CuSO_4 παρέχοντας τελική συγκέντρωση Cu^{2+} 16 μM . Η πλάκα τοποθετείται σε φωτόμετρο ELISA reader και η απορρόφηση μετράται κάθε 3min επί 3,5h στους 37°C. Η χαλκο-επαγόμενη οξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό συζυγών διενίων που απορροφούν στα 245nm και η αύξηση στην απορρόφηση εκφράζεται συναρτήσει του χρόνου.

❖ Μέτρηση της CRP (hs-CRP) ορού

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο Elisa kit για τη μέτρηση της hsCRP (IBL, Hamburg, Germany)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISA reader (Biotek Power Wave XS2)

Συσκευή Vortex

Πιπέτες 10-1000 μL

Tips

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την παθητική προσκόλληση αντισωμάτων σε στερεά κατάσταση. Τα αντισώματα δεσμεύουν τα προς μέτρηση αντιγόνα. Τα αντιγόνα διαλύονται σε ειδικό διαλύτη που αποτρέπει τη μη ειδική σύνδεση ουσιών στα αντισώματα. Μετά από επώαση και ξέπλυμα, προκύπτει ένα σύμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου σε στερεά κατάσταση. Τα δεσμευμένα αντιγόνα προσδιορίζονται με την προσθήκη και επώαση με αντίσωμα, σημασμένο με ένζυμο. Το δεύτερο αντίσωμα μπορεί να είναι ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε για τη δέσμευση του αντιγόνου ή διαφορετικό, από άποψη προέλευσης. Μετά από επώαση και ξέπλυμα, προστίθεται χρωμοφόρο υπόστρωμα και στη συνέχεια διακόπτεται η αντίδραση και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική πορεία

Τα επίπεδα της hsCRP στον ορό μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με χρήση εξειδικευμένου ELISA kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα ορού αραιώνονται 1:1000 με διαλύτη (Specimen Dilution Buffer). Στις αντίστοιχες θέσεις στην πλάκα προστίθεται αρχικά 100μL αραιωμένου δείγματος ή προτύπου και ακολουθεί επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα με το διάλυμα πλύσης (x3). Μετά το τελευταίο ξέπλυμα απομακρύνουμε κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 100μL Conjugate solution. Ακολουθεί επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο και ξέπλυμα με διάλυμα πλύσης (x3). Απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 100μL από το υπόστρωμα και ακολουθεί επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος προστίθενται 50μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μg/mL κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς αραιώνονται τα 10x πρότυπα διαλύματα 1:100 σε τελικές συγκεντρώσεις 10, 5, 1 και 0,4μg/mL. Ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450nm. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $y=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της hsCRP σε μg/mL και y η απορρόφηση στα 450nm.

5.4.6 Μέτρησεις δεικτών ενδοθηλιακής λειτουργίας

❖ Μέτρηση ICAM-1 ορού

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση του ICAM-1 (Invitrogen, Camarillo, USA)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISA reader (Biotek Power Wave XS2)

Συσκευή Vortex

Πιπέτες (50-500μL)

Tips

Αρχή μεθόδου

Ο ICAM-1 προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα, ενώ στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται αντίσωμα-ανιχνευτής του προσδεμένου ICAM-1 στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Μετά από πλύσιμο, προστίθεται υπόστρωμα και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική πορεία

Τα επίπεδα ICAM-1 στον ορό μετρώνται σε φωτόμετρο ELISA με τη χρήση εξειδικευμένου ELISA kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ξεπλένονται τα πηγάδια που θα χρησιμοποιηθούν με 300μL διαλύματος πλύσης. Στα δείγματα γίνεται αραιώση 1:100 με διαλύτη (Sample Diluent). Στις αντίστοιχες θέσεις στην πλάκα προστίθεται αρχικά 100μL προτύπου ή αραιωμένου δείγματος και 50μL μονοκλωνικού αντισώματος ICAM-1 (HRP-Conjugate). Ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου, απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα (x3). Μετά το τελευταίο ξέπλυμα απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 100μL από το υπόστρωμα. Ακολουθεί επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε ng/mL, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα ICAM-1 Standard (10ng/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 10, 5, 2,5, 1,25 και 0,625ng/mL. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $y=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση του ICAM-1 σε ng/mL και y η απορρόφηση στα 450nm.

❖ Προσδιορισμός ενδοθηλιοεξαρτώμενης αγγειοδιαστολής (FMD)

Αρχή μεθόδου

Η εκτίμηση της FMD αποτελεί μία μη επεμβατική, εύκολη στην εφαρμογή, μέθοδο για την εκτίμηση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, ενώ έχει χαρακτηριστεί και ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ξεκίνησε να

χρησιμοποιείται από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Celermajer et al., 1994) και προοδευτικά καθιερώνεται ως μια αρκετά αξιόπιστη δοκιμασία της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε μελέτες που εξετάζουν την επίδραση της κατανάλωσης ενός γεύματος ή ενός τροφίμου στη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου (Tentolouris et al., 2008). Βασίζεται στη μέτρηση (με υπερηχοτομογράφο) της διαμέτρου της βραχιονίου αρτηρίας τόσο πριν, όσο και μετά την πρόκληση ισχαιμίας. Ουσιαστικά, η FMD μετράται ως η ποσοστιαία μεταβολή της διαμέτρου της αρτηρίας και είναι ένας δείκτης της ικανότητας της αρτηρίας να παράγει μονοξείδιο του αζώτου (που προκαλεί διαστολή των αρτηριών). Οι μετρήσεις γίνονται μετά από 8ωρη νηστεία και χωρίς να έχει καπνίσει ο εξεταζόμενος (Karatzi et al., 2007).

Αναλυτική πορεία

Με τη βοήθεια έγχρωμου υπερηχοτομογράφου υψηλής πιστότητας μπορεί να μετρηθεί η ταχύτητα ροής στη δεξιά βραχιόνιο αρτηρία καθώς και η διάμετρος αυτής σε κατάσταση ηρεμίας. Σε κατάσταση ηρεμίας πραγματοποιούνται 3 διαδοχικές μετρήσεις. Η ίδια διαδικασία μέτρησης της ταχύτητας ροής και της διαμέτρου της βραχιονίου επαναλαμβάνεται μετά από ισχαιμία, που εφαρμόζεται για 5min (3 μετρήσεις αμέσως μετά την ισχαιμία ανά 30sec η κάθε μία). Η ισχαιμία επιτυγχάνεται με περισφιξη του δεξιού αντιβραχίου, 15cm άνωθεν της πηγεοκαρπικής αρτηρίας, με τη χρήση της περιχειρίδος του μανομέτρου σε πίεση 200mmHg. Η μέτρηση του εύρους της βραχιονίου αρτηρίας τόσο κατά την ηρεμία, όσο και μετά την ισχαιμία, γίνεται πάντα στο δεξί χέρι και σε απόσταση 10cm κεντρικότερα από τον αγκώνα και στο τέλος της καρδιακής διαστολής (η οποία αντιστοιχεί στην κορυφή του QRS επάρματος του ηλεκτροκαρδιογραφήματος). Ταυτόχρονα με τη μέτρηση της FMD καταγράφεται ηλεκτροκαρδιογράφημα με τη βοήθεια ειδικού συστήματος που διαθέτει ο υπερηχοτομογράφος. Αφού ληφθούν οι εικόνες του αγγείου (πριν και μετά την ισχαιμία) από τον υπερηχοτομογράφο, ακολουθεί η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και αφού υπολογισθούν οι μέσοι όροι των μετρήσεων υπολογίζεται η FMD με τον κάτωθι τύπο:

$$FMD = (\text{διάμετρος μετά ισχαιμίας} - \text{διάμετρος προ ισχαιμίας}) / \text{διάμετρος προ ισχαιμίας} \times 100$$

❖ Ταχύτητα αγωγής του σφυγμικού κύματος (PWV)

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος (PWV) αποτελεί μια αναγνωρισμένη, για την αξιοπιστία της, μέθοδο μέτρησης της ελαστικότητας των αρτηριών με επαναληψιμότητα, άρα και του καρδιαγγειακού κινδύνου (Vlachopoulos et al., 2010). Το αρτηριακό σφυγμικό κύμα παράγεται με τη συστολή της αριστερής κοιλίας και την εξώθηση του αίματος στην αορτή. Το σφυγμικό κύμα μεταφέρεται σε ολόκληρο το αρτηριακό δίκτυο με μία συγκεκριμένη ταχύτητα. Με τη μέθοδο της τονομέτρησης μπορεί να μετρηθεί ο χρόνος μεταφοράς του σφυγμικού κύματος μεταξύ δύο σημείων στο αρτηριακό δίκτυο, συγκρίνοντας τη χρονική καθυστέρηση του σφυγμικού κύματος στα δύο σημεία με ένα ταυτόχρονο μετρούμενο QRS έπαρμα.

Αναλυτική πορεία

Η διαδικασία που περιγράφεται έχει χρησιμοποιηθεί σε παλιότερες μελέτες (Eleftheriadou et al., 2013). Η τονομέτρηση πραγματοποιείται με την ειδική συσκευή SphygmoCor (AtCorMedical, Sydney, Australia), αφού ο εθελοντής έχει παραμείνει σε ύπτια θέση για 15min και σύμφωνα με τις δημοσιευμένες κατευθυντήριες οδηγίες (Laurent et al., 2006). Για να υπολογισθεί η ταχύτητα του σφυγμικού κύματος θα πρέπει αρχικά να μετρηθούν, με μεζούρα, οι αποστάσεις μεταξύ καρωτίδας-κερκιδικής αρτηρίας και καρωτίδας-μηριαίας αρτηρίας. Η απόσταση μεταξύ καρωτίδας και κερκιδικής είναι η διαφορά των αποστάσεων μεταξύ σφαγιτιδικής εντομής του στέρνου και της κερκιδικής αρτηρίας και μεταξύ σφαγιτιδικής εντομής του στέρνου και της καρωτίδας. Παρόμοια, απόσταση μεταξύ καρωτίδας και μηριαίας αρτηρίας είναι η διαφορά των αποστάσεων μεταξύ σφαγιτιδικής εντομής του στέρνου και της μηριαίας αρτηρίας και μεταξύ σφαγιτιδικής εντομής του στέρνου και της καρωτίδας. Για τη λήψη της κυματομορφής χρησιμοποιείται ένα ενιαίο τονόμετρο επιπέδωσης υψηλής πιστότητας (Millar) συνδεδεμένο με τη συσκευή ανάλυσης κυματομορφής, με ταυτόχρονη καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος τριών ηλεκτροδίων. Έτσι, η ταχύτητα ροής του σφυγμικού κύματος υπολογίζεται διαιρώντας την απόσταση των δύο σημείων στο αρτηριακό δίκτυο με το χρόνο μεταφοράς του σφυγμικού κύματος μεταξύ των σημείων αυτών και εκφράζεται σε m/s.

5.5 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS for Windows, version 23, SPSSInc., Chicago, IL, USA). Αρχικά, έγινε έλεγχος κανονικότητας των μεταβλητών (χαρακτηριστικών του δείγματος). Τα χαρακτηριστικά του

δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης (baseline) ανάμεσα στις δύο ομάδες (ελέγχου και παρέμβασης) συγκρίθηκαν μεταξύ τους με την χρήση του κριτηρίου Independent Samples T-test (για τις μεταβλητές που ακολουθούν κανονική κατανομή) και με το κριτήριο Mann-Whitney Test (για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή). Επίσης, έγινε σύγκριση των χαρακτηριστικών της κάθε ομάδας στην έναρξη και το πέρας της παρέμβασης. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Χαρακτηριστικά του δείγματος

Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και η αρτηριακή πίεση των συμμετεχόντων κατά την ένταξή τους στην παρέμβαση (baseline). Οι τιμές αναγράφονται στον πίνακα ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της μελέτης ανά ομάδα			
	Ομάδα Ελέγχου (n=12)	Ομάδα Παρέμβασης (n=20)	P-value
Σωματικό Βάρος (Kg)	75,1 $\pm$ 3,9	79,8 $\pm$ 2,9	0,339
ΔΜΣ (Kg/m²)	23,9 $\pm$ 0,9	24,7 $\pm$ 0,6	0,462
Λιπώδης Μάζα (%)	21,8 $\pm$ 0,8	22,3 $\pm$ 1,4	0,787
Περιφέρεια Μέσης (cm)	89,9 $\pm$ 3,8	93,3 $\pm$ 2,5	0,446
Περιφέρεια Ισχίων (cm)	99,1 $\pm$ 1,9	101,8 $\pm$ 1,3	0,229
Συστολική ΑΠ (mm Hg)	117,2 $\pm$ 2,8	117,2 $\pm$ 1,8	0,993
Διαστολική ΑΠ (mm Hg)	77,1 $\pm$ 2,2	74,7 $\pm$ 1,9	0,507
Καρδιακοί Σφυγμοί (min⁻¹)	68,1 $\pm$ 3,4	63,8 $\pm$ 2,2	0,275

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι οι εθελοντές στις δύο ομάδες δεν διαφέρουν σημαντικά ($p>0,05$) ως προς τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και την αρτηριακή πίεση κατά την έναρξη της μελέτης. Επομένως, οι δύο ομάδες παρουσιάζουν ομοιομορφία ως προς τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων κατά την ένταξή τους στην μελέτη, καθώς και η κοτινίνη ως δείκτης έκθεσης στο κάπνισμα. Οι τιμές αναγράφονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.2 Βιοχημικές παράμετροι και δείκτης έκθεσης στο κάπνισμα

	Ομάδα Ελέγχου (n=12)	Ομάδα Παρέμβασης (n=20)	P-value
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	90,8±2,6	89,7±2	0,662
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	186,7±7,9	183,2±7,9	0,773
HDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	52,8±3,6	58,2±2,1	0,174
LDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	110,8±7,5	105,1±7	0,601
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	115±20,1	99,8±10,9	0,667
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,96±0,03	0,88±0,02	0,060
Ουρία (mg/dL)	32±1,5	30,3±1,3	0,340
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5,1±0,5	5±0,2	0,869
Αλκαλική φωσφατάση (U/L)	68,1±5,2	67,3±3,9	0,898
γ-GT (U/L)	27,2±2,2	26,8±2	0,896
SGOT(U/L)	27,5±3,9	21,1±1,2	0,241
SGPT (U/L)	25,7±4,3	19,2±1,7	0,212
Αλβουμίνη (g/dL)	4,7±0,9	4,4±0,1	0,029
Ολικές πρωτεΐνες (g/dL)	7,3±0,1	7,4±0,1	0,799
Κοτινίνη (μM)	94,7±3,6	85,1±3,9	0,105

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως οι δύο ομάδες διαφέρουν σημαντικά μόνο στα επίπεδα αλβουμίνης (**p=0,029**) κατά την ένταξή τους στην μελέτη, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν ομοιομορφία.

Στον πίνακα 6.3 παρουσιάζονται οι δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής των συμμετεχόντων κατά την ένταξή τους στην μελέτη. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.3 Δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής			
	Ομάδα Ελέγχου (n=12)	Ομάδα Παρέμβασης (n=20)	P-value
CRP (μg/mL)	1,5±0,6	1,9±0,3	0,259
MDA (μM)	5,1±0,6	4,3±0,3	0,402
Λεπτίνη (pg/mL)	10,7±1,9	13,2±2,1	0,424
ΑΟΟΡ's (μM)	5,1±0,4	4,6±0,2	0,177
Οξείδωση ορού (sec)	3291,3±170,8	3.568±1509,9	0,726

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι οι εθελοντές στις δύο ομάδες δεν διαφέρουν σημαντικά ($p>0,05$) ως προς τους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής κατά την έναρξη της μελέτης. Επομένως, οι δύο ομάδες παρουσιάζουν ομοιομορφία ως προς τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Στον πίνακα 6.4 παρουσιάζονται οι δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας και αρτηριακής σκληρίας των συμμετεχόντων κατά την ένταξή τους στην μελέτη. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.4 Δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας και αρτηριακής σκληρίας			
	Ομάδα Ελέγχου (n=12)	Ομάδα Παρέμβασης (n=20)	P-value
ICAM (ng/mL)	387,6±38,1	353,9±15,8	0,627
PWV_RAD(m/sec)	6,2±0,3	6±0,2	0,680
PWV_FEM (m/sec)	6,6±0,3	6,4±0,2	0,481
FMD (%)	3,8±0,6	2,7±0,4	0,104

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι οι εθελοντές στις δύο ομάδες δεν διαφέρουν σημαντικά ($p>0,05$) ως προς τους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής κατά την έναρξη της μελέτης. Επομένως, οι δύο ομάδες παρουσιάζουν ομοιομορφία ως προς τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

6.2 Επίπεδα των υπό μελέτη μεταβλητών πριν και μετά την παρέμβαση

Στον πίνακα 6.5 παρουσιάζονται οι μεταβολές τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα παρέμβασης ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές (πριν και μετά την παρέμβαση) όσον αφορά τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά. Επίσης, φαίνονται οι διαφορές πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των δύο ομάδων. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.5 Διαφορές στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στις δύο ομάδες

	Ομάδα	Πριν (baseline)	Μετά (1 μήνας)	P-value	P-value
Σωματικό Βάρος (Kg)	Ελέγχου	75,1 $\pm$ 3,9	74,6 $\pm$ 3,8	0,425	0,371
	Παρέμβασης	79,8 $\pm$ 2,9	79,8 $\pm$ 2,8	1,000	
ΔΜΣ (Kg/m²)	Ελέγχου	23,9 $\pm$ 0,9	23,8 $\pm$ 0,8	0,398	0,294
	Παρέμβασης	24,7 $\pm$ 0,6	24,7 $\pm$ 0,6	0,769	
Λιπώδης Μάζα (%)	Ελέγχου	21,8 $\pm$ 0,8	21,1 $\pm$ 0,9	0,133	0,010
	Παρέμβασης	22,3 $\pm$ 1,4	23 $\pm$ 1,4	0,030	
Περιφέρεια Μέσης (cm)	Ελέγχου	89,9 $\pm$ 3,8	90,1 $\pm$ 3,5	0,357	0,210
	Παρέμβασης	93,3 $\pm$ 2,5	93,2 $\pm$ 2,5	0,658	
Περιφέρεια Ισχίου (cm)	Ελέγχου	99,1 $\pm$ 1,9	99,2 $\pm$ 1,8	0,894	0,875
	Παρέμβασης	101,8 $\pm$ 1,3	102 $\pm$ 1,2	0,509	
Συστολική ΑΠ (mm Hg)	Ελέγχου	117,2 $\pm$ 2,8	117,5 $\pm$ 2,9	0,799	0,582
	Παρέμβασης	117,2 $\pm$ 2,2	115,7 $\pm$ 2,4	0,543	
Διαστολική ΑΠ (mm Hg)	Ελέγχου	77,1 $\pm$ 2,2	75,4 $\pm$ 2,9	0,447	0,876
	Παρέμβασης	74,7 $\pm$ 1,9	73,3 $\pm$ 1,9	0,394	
Καρδιακοί Σφυγμοί (min⁻¹)	Ελέγχου	68,1 $\pm$ 3,4	69,5 $\pm$ 2,3	0,613	0,767
	Παρέμβασης	63,8 $\pm$ 2,2	64,3 $\pm$ 2,1	0,816	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως υπάρχει σημαντική διαφορά στο ποσοστό λιπώδους μάζας τόσο στην ομάδα παρέμβασης πριν και μετά την μελέτη (**p=0,030**), όσο και στη διαφορά πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των δύο ομάδων (**p=0,010**).

Στον πίνακα 6.6 παρουσιάζονται οι μεταβολές τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα παρέμβασης ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές (πριν και μετά την παρέμβαση) όσον αφορά τους βιοχημικούς δείκτες. Επίσης, φαίνονται οι διαφορές πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των δύο ομάδων. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.6 Διαφορές στις βιοχημικές παραμέτρους ανάμεσα στις δύο ομάδες

	Ομάδα	Πριν (baseline)	Μετά (1 μήνας)	P-value	P-value
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	Ελέγχου	90,8 $\pm$ 2,6	85,6 $\pm$ 2,7	0,094	0,128
	Παρέμβασης	89,7 $\pm$ 2	89,4 $\pm$ 2,1	0,888	
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	Ελέγχου	186,7 $\pm$ 7,9	178,8 $\pm$ 6,9	0,310	0,755
	Παρέμβασης	183,2 $\pm$ 7,9	177,9 $\pm$ 7,3	0,246	
HDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	Ελέγχου	52,8 $\pm$ 3,6	51,2 $\pm$ 3,7	0,182	0,128
	Παρέμβασης	58,2 $\pm$ 2,1	58 $\pm$ 2,1	0,297	
LDL-Χοληστερόλη (mg/dL)	Ελέγχου	110,8 $\pm$ 7,5	102,2 $\pm$ 4,8	0,256	0,714
	Παρέμβασης	105,1 $\pm$ 7	99,3 $\pm$ 7,1	0,179	
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	Ελέγχου	115 $\pm$ 20,6	121,2 $\pm$ 20	0,735	0,812
	Παρέμβασης	99,8 $\pm$ 10,9	102,2 $\pm$ 10,6	0,696	
Κρεατινίνη (mg/dL)	Ελέγχου	0,96 $\pm$ 0,03	1 $\pm$ 0,04	0,400	1,000
	Παρέμβασης	0,89 $\pm$ 0,2	0,93 $\pm$ 0,03	0,116	
Ουρία (mg/dL)	Ελέγχου	32 $\pm$ 1,5	35,1 $\pm$ 2	0,238	0,587
	Παρέμβασης	30,3 $\pm$ 1,3	32,1 $\pm$ 1,3	0,104	
Ουρικό οξύ (mg/dL)	Ελέγχου	5,1 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,4	0,584	0,560
	Παρέμβασης	5 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 1,9	0,968	
Αλκαλική φωσφατάση (U/L)	Ελέγχου	68,1 $\pm$ 5,2	73,7 $\pm$ 5,8	0,093	0,349
	Παρέμβασης	67,3 $\pm$ 3,9	68,6 $\pm$ 3,1	0,649	
γ-GT (U/L)	Ελέγχου	27,2 $\pm$ 2,2	24,9 $\pm$ 2,5	0,114	0,064
	Παρέμβασης	26,8 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	0,298	
SGOT(mg/dL)	Ελέγχου	27,5 $\pm$ 3,9	27 $\pm$ 3	0,902	0,841
	Παρέμβασης	21,1 $\pm$ 1,2	21,2 $\pm$ 1,1	0,849	

SGPT (mg/dL)	Ελέγχου	25,7±4,3	26,1±4,4	0,938	0,771
	Παρέμβασης	19,2±1,7	18,4±1,5	0,498	
Αλβουμίνη (g/dL)	Ελέγχου	4,7±0,1	4,5±0,1	0,014	0,019
	Παρέμβασης	4,4±0,1	4,4±0,1	0,522	
Ολικές πρωτεΐνες (g/dL)	Ελέγχου	7,3±0,1	7,3±0,1	0,896	0,441
	Παρέμβασης	7,4±0,1	7,3±0,1	0,306	
Κοτινίνη (μM)	Ελέγχου	94,7±3,6	93,9±3,6	0,764	0,843
	Παρέμβασης	85,1±3,9	83,4±5,2	0,597	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα αλβουμίνης τόσο στην ομάδα ελέγχου πριν και μετά την μελέτη (**p=0,014**), όσο και στη διαφορά πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των δύο ομάδων (**p=0,019**).

Στον πίνακα 6.7 παρουσιάζονται οι μεταβολές τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα παρέμβασης ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές (πριν και μετά την παρέμβαση) όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Επίσης, φαίνονται οι διαφορές πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των δύο ομάδων. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.7 Διαφορές στους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής ανάμεσα στις δύο ομάδες					
	Ομάδα	Πριν (baseline)	Μετά (1 μήνας)	P-value	P-value
CRP (μg/mL)	Ελέγχου	1,5±0,6	2±0,8	0,116	0,716
	Παρέμβασης	1,90,3	2,7±0,7	0,236	
MDA (μM)	Ελέγχου	5,1±0,6	4,4±0,3	0,77	0,113
	Παρέμβασης	4,3±0,3	4,5±0,4	0,724	
Λεπτίνη (pg/mL)	Ελέγχου	10,7±1,9	10,5±1,5	0,776	0,753
	Παρέμβασης	13,2±2,1	13,5±2	0,813	
ΑΟΟΡ's (μM)	Ελέγχου	5,1±0,4	4,6±0,2	0,066	0,276
	Παρέμβασης	4,6±0,2	4,5±0,2	0,631	
Οξείδωση ορού (sec)	Ελέγχου	3291,3±170,1	3644,9±132,1	0,010	0,035

	Παρέμβασης	3.568±259,3	3288,1±123,7	0,199	
--	------------	-------------	--------------	-------	--

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως υπάρχει σημαντική διαφορά στην αντίσταση του ορού στην οξειδωση τόσο στην ομάδα ελέγχου πριν και μετά την μελέτη (**p=0,010**), όσο και στη διαφορά πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των ομάδων (**p=0,035**).

Στον πίνακα 6.8 παρουσιάζονται οι μεταβολές τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα παρέμβασης ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές (πριν και μετά την παρέμβαση) όσον αφορά τους δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας και αρτηριακής σκληρίας. Επίσης, φαίνονται οι διαφορές πριν και μετά την παρέμβαση μεταξύ των δύο ομάδων. Οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 6.8 Διαφορές στους δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας και αρτηριακής σκληρίας ανάμεσα στις δύο ομάδες					
	Ομάδα	Πριν (baseline)	Μετά (1 μήνας)	P-value	P-value
PWV_RAD(m/sec)	Ελέγχου	6,2±0,3	5,8±0,3	0,072	0,051
	Παρέμβασης	6±0,2	6,1±0,2	0,444	
PWV_FEM (m/sec)	Ελέγχου	6,6±0,3	6,8±0,2	0,588	0,555
	Παρέμβασης	6,4±0,2	6,4±0,2	0,855	
FMD (%)	Ελέγχου	3,8±0,6	3,9±0,7	0,925	0,907
	Παρέμβασης	2,7±0,4	2,9±0,5	0,602	
ICAM (ng/mL)	Ελέγχου	387,6±38,1	414,3±44,1	0,334	0,117
	Παρέμβασης	353,915,8	324,5±12,9	0,201	

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές πριν και μετά την μελέτη μεταξύ των δύο ομάδων.

6.3 Συζήτηση

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της παρέμβασης που πραγματοποιήθηκε σε υγιείς καπνιστές, η κατανάλωση ποσότητας σταφίδας ίσης με 5 ισοδύναμα φρούτου, δεν έδειξε επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία και την αρτηριακή σκληρία, καθώς και στους

δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Πλήθος μελετών έχει αναδείξει τον ρόλο των πολυφαινολών έναντι της καρδιαγγειακής νόσου οι οποίες εξέτασαν την επίδραση των τροφίμων πλούσια σε αντιοξειδωτικά και πολυφαινόλες, όπως το κακάο, τα αμύγδαλα και η μπύρα. Για παράδειγμα, οι Vlachopoulos et al. (2005) μελέτησαν την επίδραση της μαύρης σοκολάτας πλούσιας σε φλαβονοειδή (100g) στην ενδοθηλιακή λειτουργία, την αρτηριακή σκληρία, τις ανακλάσεις σφυγμικών κυμάτων και την οξειδοαναγωγική κατάσταση. Τα αποτελέσματά τους, έδειξαν βελτίωση της τιμής της FMD, κατά τα πρώτα 60 λεπτά της μελέτης, μείωση των ανακλάσεων σφυγμικών κυμάτων κατά την διάρκεια όλης της μελέτης (3 ώρες), ενώ δεν παρατήρησαν διαφορά στην αρτηριακή σκληρία όπως προσδιορίστηκε από την PWV και την οξειδοαναγωγική κατάσταση που εκτιμήθηκε με προσδιορισμό της MDA πλάσματος και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Σε άλλη μελέτη, οι ίδιοι ερευνητές (Vlachopoulos et al., 2007) αξιολόγησαν την συνήθη πρόσληψη κακάο σε 198 υγιείς εθελοντές (58% καπνιστές) χρησιμοποιώντας ερωτηματολόγιο πρόσληψης κακάο. Φάνηκε ότι τόσο η χαμηλή όσο και η υψηλή κατανάλωση κακάο συσχετίζονταν με μικρότερη τιμή PWV συγκριτικά με αυτούς που δεν κατανάλωναν κακάο. Επίσης, η υψηλή κατανάλωση κακάο συσχετίστηκε με χαμηλότερη πίεση παλμού. Τα δύο αυτά ευρήματα παρουσίαζαν ανεξάρτητη συσχέτιση, αφού έγινε έλεγχος για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, όπως η κατανάλωση καφέ.

Οι Dohadwala et al. (2011) μελέτησαν την επίδραση του χυμού από κράνμπερι στην αγγειακή λειτουργία 44 ασθενών με στεφανιαία νόσο. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η χορήγηση 480 mL ημερησίως χυμού κράνμπερι που περιείχε 835mg πολυφαινολών (94 mg ανθοκυανίνες) για 4 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη τιμή στην PWV-FEM, ενώ η αρτηριακή πίεση, η FMD και η PWV-RAD δεν σημείωσαν μεταβολή.

Η επίδραση των αντιοξειδωτικών έχει μελετηθεί και στα αμύγδαλα. Οι Li et al. (2007) εξέτασαν την χορήγηση 84g αμυγδάλων για 4 εβδομάδες σε 60 υγιείς άντρες καπνιστές (που κάπνιζαν 15-20 τσιγάρα ημερησίως) και σε 30 μη-καπνιστές. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι καπνιστές παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα 8-OHdG κατά 185% και MDA κατά 24%, ενώ παράλληλα η SOD, η GPX και η καταλάση εμφανίζονταν μειωμένες κατά 15%, 10% και 9% αντίστοιχα. Μετά την παρέμβαση με αμύγδαλα στην ομάδα των καπνιστών παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων α-τοκοφερόλης στον ορό, SOD και GPX κατά 10%, 35% και 16% αντίστοιχα, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση της 8-OHdG κατά 28% και της MDA κατά 34%. Τα ευρήματα αυτά συστήνουν βελτίωση της αντιοξειδωτικής άμυνας και περιορισμό των δεικτών οξειδωτικής βλάβης στους καπνιστές.

Επιπλέον, οι Karatzi et al. (2013) σε μελέτη που διεξήγαγαν σε 17 υγιείς μη καπνιστές άντρες έδειξαν ότι η κατανάλωση 400 mL μύρας μειώνει την αρτηριακή σκληρία, όπως προσδιορίστηκε μέσω της PWV, συγκριτικά με την κατανάλωση ποσότητας βότκας (που περιείχε ίση ποσότητα αλκοόλ με τα 400 mL μύρας) και την κατανάλωση μύρας χωρίς αλκοόλ (σε ποσότητα που περιείχε την ίδια ποσότητα πολυφαινόλων). Επίσης, φάνηκε ότι οι ανακλάσεις σφυγμικών κυμάτων μειώθηκαν σημαντικά και στις 3 κατηγορίες: στην μύρα μειώθηκαν κατά 9,2%, στην μύρα χωρίς αλκοόλ μειώθηκαν 2,8% και στη βότκα 9,5%). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από τη συνεργιστική δράση του αλκοόλ με τα αντιοξειδωτικά της μύρας στην ενδοθηλιακή λειτουργία κατά την οξεία κατανάλωσή της.

Βασικό πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι το γεγονός ότι εξετάστηκε η επίδραση ενός φυσικού τροφίμου στην ενδοθηλιακή λειτουργία και τους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, σε αντίθεση με άλλες μελέτες που έχουν εξετάσει εκχυλίσματα φρούτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά ή ακόμα και εμπλουτισμένων τροφίμων. Παράλληλα, η ποσότητα σταφίδας που χορηγήθηκε στους εθελοντές ήταν σύμφωνη με τις συστάσεις για την καθημερινή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών στο πλαίσιο ενός υγιεινού και ισορροπημένου διαιτολογίου (5 μερίδες ημερησίως). Το γεγονός της χορήγησης ενός φυσικού τροφίμου αποτελεί παράλληλα και περιορισμό της παρούσας μελέτης, καθώς χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας του υπό εξέταση τροφίμου αποτελεί μη ρεαλιστικό στόχο. Άλλος πιθανός περιορισμός της μελέτης είναι ο μικρός χρόνος παρέμβασης, που διήρκησε 4 εβδομάδες. Επιπλέον, στην παρούσα παρέμβαση ήταν δύσκολο να ελεγχθεί η πραγματική συμμόρφωση των εθελοντών με το πρωτόκολλο, παρά τις αιφνιδιαστικές ανακλήσεις 24ώρου που πραγματοποιήθηκαν τηλεφωνικώς.

Εν κατακλείδι, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες αναφορικά με την *in vivo* καρδιοπροστατευτική δράση της σταφίδας, ενδείκνυται η προώθηση της κατανάλωσής της από τον πληθυσμό με σκοπό την επίτευξη των διατροφικών συστάσεων για φρούτα, δεδομένου ότι ο επιπολασμός της χαμηλής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών εμφανίζεται αυξημένος σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράλληλα, η καθημερινή κατανάλωση σταφίδας σε ποσότητα ίση με 1-2 ισοδύναμα φρούτου αποτελεί έναν καλό τρόπο με τον οποίο μπορεί κάποιος να καταναλώσει φρούτα, καθώς μπορούν να αποθηκευτούν και να μεταφερθούν εύκολα. Τέλος, οι σταφίδες μπορούν να αποτελέσουν αναπόσπαστο στοιχείο των διατροφικών συνηθειών στο πλαίσιο της υιοθέτησης της Μεσογειακής Διατροφής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amato M, Frigerio B, Castelnovo S, Ravani A, et al. Effects of smoking regular or light cigarettes on brachial artery flow-mediated dilation. *Atherosclerosis* 2013; 228:153-160

American Heart Association. About fruits and vegetables.

http://www.heart.org/HEARTORG/HealthyLiving/HealthyEating/Nutrition/About-Fruits-and-Vegetables_UCM_302057_Article.jsp#.V30Pg-t96Un

Ashor AW, Siervo M, Lara J, et al. Antioxidant vitamin supplementation reduces arterial stiffness in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Nutr.* 2014; 144:1594-1602

Ashor AW, Siervo M, Lara J, Oggioni C, Afshar S, Mathers JC. Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition.* 2015; 113:1182-1194

Aslani BA, Ghobadi S., Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences* 2016;146:163-173

Asma S, Song Y, Cohen J, Eriksen M, Pechacek T, Cohen N, Iskander J. CDC Grand Rounds: global tobacco control. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2014; 63:277-80.

Barua RS, Ambrose JA et al. Dysfunctional Endothelial Nitric Oxide Biosynthesis in Healthy Smokers With Impaired Endothelium-Dependent Vasodilatation. *Circulation.* 2001;104: 1905-1910

Barua RS, Ambrose JA. Mechanisms of Coronary Thrombosis in cigarette smoke exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33:1460-1467

Barua RS, Sharma M, Dileepan KN, Cigarette smoke amplifies inflammatory response and atherosclerosis progression through activation of H1R-TLR2/4-COX2 Axis, 2015

Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys.* 2009;55:1-23

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P., (2006). *Χημεία Τροφίμων*, 3 η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, 1358-1360

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention, *JAMA*. 2007; 297:842-857

Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992, 18:1-9.

Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, Nagai M et al. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2, and age-related macular degeneration. *Vision Res*. 2010; 50:652-664

Cantin AM, Cellular Response to Cigarette Smoke and Oxidants, *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7:368-375

Carughi A, et al. Health Benefits of Sun-Dried Raisins. Review of the Scientific Literature. Health Research & Studies Center, Sun-Maid Growers of California. 2012

Chiou A, Karathanos VT, Mylona A, et al. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chem* 2007, 102 (2):516-522

Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Portinaro NM, Aldini G, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Pathophysiology of tobacco smoke exposure: recent insights from comparative and redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2014; 33:183-218

Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Lonsonczy G et al. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci* 2009; 14:3128-3144

Csordas, A. & Bernhard, D. *Nat. Rev. Cardiol.* 10,219-230, The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke, 2013

Department of Health and Human Services and the U.S. Department of Agriculture. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 2015

Dohadwala MM, Holbrook M, Hamburg NM, Shenouda SM et al. Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 2011; 93:934-40.

Eleftheriadou I, Grigoropoulou P, Moyssakis I, Kokkinos A. et al. The effect of hyperhomocysteinemia on aortic distensibility in healthy individuals. *Nutrition* 2013; 29: 876-880

Gradinaru D, Claudia Borsaa, Cristina Ionescu, Gabriel Ioan Prada. Oxidized LDL and NO synthesis: Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 2015;151:101–113

Hall JN, Moore S, Harper SB, Lynch JW. Global Variability in Fruit and Vegetable Consumption. *Am J Prev Med* 2009; 36(5):402–409

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 2007; 35, part 5

Hu B. Vegetarian diets and risk of selected chronic diseases: Plant based foods and prevention of cardiovascular disease: An overview. *Am J Clin Nutr* 2003, 78:544-551.

Hung H, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Nat Cancer Inst*. 2004, 96(21):1577-1584.

Hwang J, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I. Redox regulation of SIRT-1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol. Med.* 2013; 0:95-110

International Agency for Research on Cancer IARC. Personal habits and indoor combustions. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France. 2012; 100E

Jaimes EA, DeMaster EG, Tial RX, Raig L. Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1031-6.

Kalliopi K, Rontoyanni VG, Protogerou AD, Georgoulia A. Acute effects of beer on endothelial function and hemodynamics: A single-blind, crossover study in healthy volunteers. *Nutrition.* 2013; 1-5

Kanellos PT, Kaliora AC, Liaskos C, Tentolouris NK, Perrea D, Karathanos VT. A Study of Glycemic Response to Corinthian Raisins in Healthy Subjects and in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Plant Foods for Human Nutrition* 2013, 68:145-148.

Kanellos PT, Kaliora AC, Tentolouris NK, Argiana V, Perrea D, Kalogeropoulos N, Kountouri AM, Karathanos VT. A pilot randomized controlled trial to examine the health outcomes of raisin consumption in diabetic subjects. *Nutrition* 2013, in press

Keast DR, O'Neil CE, Jones JM. Dried fruit consumption is associated with improved diet quality and reduced obesity in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *Nutrition Research* 2011; 31:460–467

Kim KS, Park HS, Lung IS, et al. Endothelial dysfunction in the smokers can be improved with oral cilostazol treatment. *J Cardiovasc Ultrasound* 2011;19:21-25

Kim M, Han C, Lee MY. NADPH oxidase and the Cardiovascular toxicity associated with smoking. *Toxicol Res.* 2014; 30:149-157 (13) Biochemistry of oxidative stress

Kim M, Han CH, Lee MY. NADPH oxidase and the cardiovascular toxicity associated with smoking. *Toxicol Res.* 2014;30:149-57

Knoops KTB, Groot LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D, Staveren WA. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *European Journ. of Clin. Nutrition* 2006; 60:746-755

Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D. Antioxidant Vitamin Supplements and Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2004; 110:637–641

Le NA. Lipoprotein-Associated Oxidative Stress: A New Twist to the Postprandial Hypothesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16:401-419

Lee SE, Park YS. Role of lipid peroxidation-derived α,β -unsaturated aldehydes in vascular dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular longevity.* 2013; 2013

Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G et al. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005

Li B, Li F, Wang L, Zhang D. Fruit and Vegetables Consumption and Risk of Hypertension: A Meta-Analysis. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2016; 18:468–476

Li N, Jia X, Chen O, Blumberg JB. Almond Consumption Reduces Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation in Male Smokers. *J. Nutr.* 2007; 137: 2717–2722.

Li Q, Yon JY, Cai H. Mechanisms and Consequences of eNOS Dysfunction in Hypertension. *J Hypertens*. 2015; 33:1128–1136

Lin H, Wang H, Wu W, Lang L et al. The effects of smoke-free legislation on acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2013; 13:529

Lipina C, Hundal HS. Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biol*. 2016; 6:150276

Loria CM, Klag MJ, Caulfield LE, Whelton PK. Vitamin C status and mortality in US adults. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:139-145

Maynard M, Cunnell D, Emmett P. Fruit, vegetables and antioxidants in childhood and risk of adult cancer. *J Epidemiol Comm Health* 2003, 57:218-225.

Messner B, Bernhard D. Smoking and Cardiovascular Disease. Mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34:509-515

Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85:895–909

Münzel T, Gorri T, Bruno Rm, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *European Heart Journal*. 2010; 31:2741-2749

Naiman A, Glazier RH, Moineddin R. Association of anti-smoking legislation with rates of hospital admission for cardiovascular and respiratory conditions. *CMAJ*. 2010; 182:761-7

Ness AR, Maynard M, Frankel S. Diet in childhood and adult cardiovascular and all cause mortality: The Boyd Orr cohort. *Heart* 2005, 91:894-898.

Ness AR, Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: A review. *Int J Epidemiol* 1997, 26(1):1-12.

Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European Heart Journal*. 2014; 35:2950-2959

Onyango AN. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2398573>

Orosz Z, Csiszar A, Labinskyy N, Smith K, et al. Cigarette **smoke**-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:130-9.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Kokkinos P, Chrysoshoou C, Vavuranakis M et al. Consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing acute coronary syndromes; the CARDIO2000 case-control study. *Nutrition Journal* 2003, 2:2

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas Y, Stefanidis C et al. The Association between Food Patterns and the Metabolic Syndrome Using Principal Components Analysis: The ATTICA Study. *J Am Diet Assoc*. 2007;107:979-987

Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Vascular Disease. *Current Diabetes Reports*. 2007; 7:257-264

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4:89-96

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets and their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* 2015; 30:11-26

Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysoshoou C et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:694 –9

Prasad K, Dhar I, Caspar-Bell G. Role of Advanced Glycation End Products and Its Receptors in the Pathogenesis of Cigarette Smoke-Induced Cardiovascular Disease. *Int J Angiol* 2015; 24:75–80

Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking induced lung diseases. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 21,5:669-681

Rainey CJ, Nyquist LA, Christensen RE, et al. Daily boron intake from the American diet. *J Am Diet Assoc* 1999, 99:335-40

Ravera A, Carubelli V, Sciatti E, Bonadei I, et al. Nutrition and Cardiovascular Disease: Finding the Perfect Recipe for Cardiovascular Health. *Nutrients* 2016; 8, 363

Riccioni G, Gammone MA, Tettamanti G, Bergante S et al. Resveratrol and anti-atherogenic effects. *Int J Food Sci Nutr*. 2015; 66:603-10

Rigotti NA, Clair C. Managing tobacco use: the neglected cardiovascular disease risk factor, *European Heart Journal*, 2013; 34:3259-3267

Salvayre R, Negre Salvayre A, Camaré C., Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*. 2016;125:281-296

Santilli F, D'Ardes D, Davi G. Oxidative stress in chronic cardiovascular disease: From prediction to prevention. *Vascular Pharmacology*. 2015; 74:23–37

Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH et al. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2010) 459:853–862

Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012; 527:81–89

Steinmetz KA and Potter JD. Vegetables, fruit and cancer prevention: A review. *J Am Diet Assoc* 1996, 10:1027-1039.

Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996;347:781-6

Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *The American Physiological Society*. 2004; 84:1381-1478

Talhout R, Schulz T, Florek E, Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *Int J Environ Res Public Health*. 2011; 8: 613–628.

Tousoulis D, Antoniadis C, Tentolouris C et al. Effects of combined administration of vitamins C and E on reactive hyperaemia and inflammatory process in chronic smokers. *Atherosclerosis*. 2003; 170:261-7

Tsao P. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2:1231-1246

Tziomalos K, Zampoulis Ch. Endothelial dysfunction in hypertension: assessment, prognostic value and the potential for intervention. *Arterial Hypertension* 2008; 17: 117-127

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco Smoke: Involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*. 2009; 6:445-462

Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 2007, 137:2043-8

Vlachopoulos C, Alexopoulos NA, Aznaouridis KA, Ioakeimidis NC et al. Relation of Habitual Cocoa Consumption to Aortic Stiffness and Wave Reflections, and to Central Hemodynamics in Healthy Individuals. *Am J Cardiol*. 2007; 99:1473-1475

Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, Stefanadis C. Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *Am J Hypertens*. 2005;18(6):785-91.

Wadhera RH, Steen DL, Khan I et al. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016; 10:472-489

Wightman JD, Heuberger RA. Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *J Sci Food Agric* 2015; 95:1584–1597

Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Brit J Nutr* 2010, 104(3):S48-66

World Health Organisation. 2016. Prevalence of tobacco smoking.
http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/tobacco/use/atlas.html

World Health Organization. Cancer preventive effects. In: *IARC Handbook of Cancer Prevention: Fruit and Vegetables*. IARC Press, Lyon, France. 2008, 8:53-62.

World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2009: implementing smoke-free environments.

Wright ME, Lawson KA, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Higher baseline serum concentrations of vitamin E are associated with lower total and cause-specific mortality in the Alpha- Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:1200-1207

Wu X, Beecher GR, Holden JM, et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 2004, 52:4026-37

Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC et al. Systemic Effects of Smoking. *Chest*. 2007; 131:1557-1566

Zuo L, He F, Sergakis GG, Koozehchian MS et al. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Mol Physiol*. 2014; 307:L205-L218

Χαλουλάκος Τ. Μελέτη μεγεθών και διεργασιών που επηρεάζουν την αποθήκευση και τη διακίνηση της Σουλτανίνας. Πτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικών Βιομηχανιών, Αθήνα 1993