



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**«Μεταγευματική επίδραση της κατανάλωσης σκευάσματος με
εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης σε δείκτες οξειδωτικού στρες»**

Διπλωματική Εργασία

Ματαλλιωτάκη Ελένη

A.M.: 4421816

Αθήνα, 2020



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ (επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα
Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νομικός Τζώρτζης

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-
Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Ελένη Ματαλλιωτάκη,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Ευχαριστίες

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, κα Φραγκοπούλου Ελισάβετ για την άριστη συνεργασία καθ' όλο αυτό το διάστημα. Ήταν πάντα διαθέσιμη να μου λύσει οποιαδήποτε απορία δημιουργούνταν και η συνεχής υποστήριξή της και εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν καθοριστικός παράγοντας για την ολοκλήρωση της διπλωματικής.

Ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτωρ Χολέβα Μαρία, για συνεργασία μας καθ' όλη τη πειραματική διαδικασία. Η συνεχής παρουσία της στο εργαστήριο, η βοήθειά της στις πειραματικές διαδικασίες και στην επίλυση οποιασδήποτε απορίας είχα, καθώς και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο, συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Πετσίνη Φιλιώ και Ντετοπούλου Μαρία, για τις οδηγίες και συμβουλές τους, όποτε τις χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια, τους φίλους μου και τον Μιχάλη, για την υπομονή, κατανόηση, καθώς και την υποστήριξη που μου έδειξε καθένας από αυτούς όλο αυτό το διάστημα.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη στα Ελληνικά	8
Abstract	9
Κατάλογος εικόνων	10
Κατάλογος Πινάκων	12
Κατάλογος Διαγραμμάτων	13
Συντομογραφίες	14
Κεφάλαιο 1: Οξειδωτικό στρες	18
1.1 Ελεύθερες Ρίζες, Ενεργές Μορφές Οξυγόνου και Αζώτου	18
1.1.1 Ορισμοί.....	18
1.1.2 Είδη Δραστικών Μορφών Οξυγόνου και Αζώτου	19
1.2 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών, ROS και RNS	26
1.2.1 Ενδογενείς πηγές.....	26
1.2.2. Εξωγενείς πηγές	33
1.3 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	36
1.3.1 Ενδογενή Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	36
1.3.2. Ενδογενή Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	41
1.3.3. Πρωτεΐνες δέσμησης μετάλλων	51
1.4. Οξειδωτικό στρες	53
1.4.1. Διττή φύση Οξειδωτικού στρες (eustress vs distress).....	53
1.4.2. Προσαρμοστική Απόκριση στο Οξειδωτικό Στρες	54
1.5. Εκτίμηση Οξειδωτικού Στρες.....	56
1.5.1. Απευθείας Μέτρηση RONS	57
1.5.2 Εκτίμηση οξειδωτική βλάβης σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA.....	57
1.5.3. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Λειτουργίας	60
1.6. Επιδράσεις του Οξειδωτικού Στρες.....	62
1.6.1. Στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	62
1.6.2. Σε νουκλεϊκά οξέα	63
1.6.3. Σε λιπίδια	65
Κεφάλαιο 2: Οξειδωτικό Στρες και Καρδιαγγειακά Νοσήματα	69
2.1. Διαταραχές Καρδιάς και Αγγείων	69
2.1.1 Ορισμοί.....	69
2.1.2 Κλινικές εκδηλώσεις.....	70
2.1.3 Επιδημιολογικά Στοιχεία	72

2.2. Παράγοντες Κινδύνου	74
2.2.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου	74
2.2.2. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου	76
2.3. Αθηροσκλήρωση – Παθοφυσιολογικοί Μηχανισμοί.....	82
2.3.1 Ορισμοί.....	82
2.3.2. Περιγραφή Αθηροσκλήρωσης στο επίπεδο του αγγείου	84
2.3.3. Εμπλοκή του Οξειδωτικού στρες στην αθηροσκλήρωση	91
Κεφάλαιο 3: Κρασί και Υποπροϊόντα οινοποίησης.....	94
3.1. Το «Γαλλικό παράδοξο»	95
3.2. Σύσταση Κρασιού	96
3.2.1. Μικροσυστατικά του κρασιού	97
3.2.2. Βιοδιαθεσιμότητα μικροσυστατικών του κρασιού.....	102
3.2.3. Βιολογικές δράσεις του κρασιού στον άνθρωπο	104
3.3 Αξιοποίηση Υποπροϊόντων Οινοποίησης.....	112
3.3.1. Στέμφυλα.....	113
3.3.2 Τσάμπουρα (κοτσάνια)	116
3.3.3. Φύλλα.....	117
3.3.4. Οινολάσπες.....	117
3.4 Διαδικασία Επεξεργασίας Υποπροϊόντων Οινοποίησης (Παραλαβή υποπροϊόντων – Εκχύλιση).....	119
3.4.1 Εκχύλιση Υγρού-Στερεού.....	119
3.4.2 Εκχύλιση Υπερκρίσιμων Ρευστών	120
3.4.3. Επιταχυνόμενη εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό.....	121
3.4.4. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (UAE)	122
3.4.5. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (MAE)	122
3.5. Αντιοξειδωτικές και Αντιφλεγμονώδεις δράσεις των.....	123
3.5.1. In vitro δεδομένα	123
3.5.2. In vivo δεδομένα (κλινικές δοκιμές).....	129
Κεφάλαιο 4: Σκοπός	134
Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία	135
5.1. Σχεδιασμός Μελέτης	135
5.1.1. Περιγραφή Σχεδιασμού.....	135
5.1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντών	136
5.1.3. Χαρακτηριστικά γεύματος.....	136
5.2. Πρωτόκολλο αιμοληψίας	137

5.3 Αξιολόγηση ικανότητας των συστατικών του εκχυλίσματος να αναστέλλει την οξείδωση του ορού	138
5.4 Στατιστική επεξεργασία.....	139
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα	141
6.1.: Εισαγωγή	141
6.2.: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών.....	141
6.3.: Βιοχημικές μετρήσεις στην αρχή των δυο παρεμβάσεων	142
6.4.: Επίδραση των παρεμβάσεων στην ικανότητα οξείδωσης του ορού	143
6.4.1: Εθελοντής 1	143
6.4.2: Εθελοντής 2	145
6.4.3: Εθελοντής 3	146
6.4.4. Συνολικά αποτελέσματα οξείδωσης ορού.....	147
Κεφάλαιο 7: Συζήτηση.....	150
7.1 Περιορισμοί.....	156
7.2 Συμπεράσματα	157
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	158

Περίληψη στα Ελληνικά

Εισαγωγή: Το οξειδωτικό στρες, ιδιαίτερα μεταγευματικά, θεωρείται ένας κύριος προδιαθεσικός παράγοντας στην αθηροσκλήρωση. Πέραν του κρασιού, τα παραπροϊόντα οινοποίησης θεωρούνται καλές πηγές αντιοξειδωτικών μορίων, γεγονός που υποστηρίζεται από *in vitro* δεδομένα. Ωστόσο, λίγες κλινικές δοκιμές έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα και ιδιαίτερα στη μεταγευματική κατάσταση.

Σκοπός: Να εξετάσει την ικανότητα ενός συμπληρώματος με εκχύλισμα στεμφύλων, να αναστέλλει την οξείδωση του ορού, μεταγευματικά.

Μεθοδολογία: Η μελέτη είναι μία διασταυρούμενη, διπλά τυφλή κλινική δοκιμή. Το δείγμα αποτελείται από υγιείς γυναίκες 25-45 ετών, στις οποίες δόθηκε να καταναλώσουν ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος και ταυτόχρονα έλαβαν το εκχύλισμα ή το Placebo. Δείγματα αίματος λήφθηκαν στην νηστεία και για 6h μετά την κατανάλωση του γεύματος. Η οξείδωση του ορού έγινε με προσθήκη ιόντων θειικού χαλκού και η ικανότητα αναστολής οξείδωσης του ορού αξιολογήθηκε με το lag time.

Αποτελέσματα: Τρεις εθελόντριες έχουν ολοκληρώσει μέχρι τώρα τις 2 παρεμβάσεις. Τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά δε διέφεραν μεταξύ των δύο παρεμβάσεων ($p>0,05$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα lag time, μεταξύ των δύο παρεμβάσεων, αλλά ούτε και μεταξύ της κατάστασης νηστείας και μεταγευματικά για 6 ώρες ($p>0,05$).

Συζήτηση: Το εκχύλισμα στεμφύλων σε νέες υγιείς γυναίκες δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την αντίσταση του ορού στην οξείδωση μετά την κατανάλωση γεύματος πλούσιο σε λίπος. Δεν παρατηρήθηκαν, όμως, ούτε σημαντικές μεταβολές στο lag time, πριν και μετά το γεύμα, υποδεικνύοντας ότι ίσως η σύσταση του γεύματος δεν ήταν ικανή να αυξήσει σημαντικά οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η παρούσα εργασία έχει πολύ μικρό δείγμα, ώστε να προκύψει κάποιο συμπέρασμα, μέχρι την ολοκλήρωσή της.

Λέξεις/Κλειδιά: μεταγευματικό οξειδωτικό στρες, στέμφυλα, αναστολή οξείδωσης ορού, lag time

Abstract

Introduction: Oxidative stress, especially postprandially, is supposed to be a risk factor in atherosclerosis. On the other hand, wine seems to have a wide range of microconstituents with antioxidant properties. Winery by-products have gained a lot of attention recently, due to their high concentration of such molecules. Although, the antioxidant activities of vinification by-products are supported by several in vitro studies, only a few clinical trials, especially in the postprandial state, are available.

Aim: The aim of this clinical trial is to evaluate the ability of a supplement, that contain grape pomace to inhibit serum oxidation, after the consumption of a high-fat meal.

Methods: This is a cross-over, double-blind clinical trial. Healthy women 25-45 years old, consumed a high fat meal along with the grape pomace supplement or the placebo. Blood samples obtained in the fasting state and after the meal consumption every 30' for 6 h. Ex vivo serum oxidation induced by incubation with copper ions, was and evaluated with lag time.

Results: 3 women have completed the trial, by this point. Anthropometric and biochemical characteristics of the subjects were similar at the baseline of the two interventions. No significant differences observed between the placebo and the supplement intervention. In addition, lag times didn't change significantly in the postprandial state compared to the fasting state.

Conclusion: The consumption of a supplement with grape pomace extract didn't seem to affect the resistance of the serum to oxidative modifications after a high-fat meal. However, the fact that the lag time of serum oxidation didn't change significantly, between the fasting state and for 6 hours after the meal consumption indicates that, maybe the composition of the meal was not able to increase postprandial oxidative stress, in healthy young women. Nonetheless, the data presented in the current paper are obtained from a quite small sample and therefore cannot lead to any safe conclusions until the completion of the study.

Keywords: grape pomace, winery by-products, oxidative stress, serum oxidation, postprandial oxidative stress, lag time

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Αντιδράσεις Αναγωγής Οξυγόνου σε νερό	19
Εικόνα 2:Αντιδράσεις Υποχλωριώδους οξέος,.....	24
Εικόνα 3:Δημιουργία ROS στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδα.	28
Εικόνα 4:Δημιουργία ROS από την NADPH-οξειδάση.	29
Εικόνα 5 : Επίδραση μακροθρεπτικών συστατικών στην παραγωγή ROS	33
Εικόνα 6: Επίδραση της βιοδιαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών στο σχηματισμό των ROS	34
Εικόνα 7: Αντιοξειδωτική Δράση SOD.....	37
Εικόνα 8: Αντιοξειδωτική Δράση CAT	37
Εικόνα 9:Αντιοξειδωτική Δράση GPx	38
Εικόνα 10: Αντιοξειδωτική δράση του συστήματος Γλουταθειόνης	41
Εικόνα 11: Δομή ασκορβικού οξέος.	42
Εικόνα 12: Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ασκορβικού οξέος	43
Εικόνα 13: Χημικές δομές τοκοφερόλης	45
Εικόνα 14: Χημική δομή καροτενοειδών.	46
Εικόνα 15: Μετατροπή β-καροτενίου σε βιταμίνη Α.....	47
Εικόνα 16:Αναγέννηση αντιοξειδωτικών μορίων, μέσω του λιποϊκού οξέος	48
Εικόνα 17: Χημικές δομές φλαβονοειδών	50
Εικόνα 18: Μηχανισμοί ρύθμισης των NF-kB και Nrf2	54
Εικόνα 19: Σύνοψη οξειδωτικού στρες	56
Εικόνα 20: Πορεία σχηματισμού f 8-oxodG και 8-oxoG..	64
Εικόνα 21: Πορεία Λιποειδικής Υπεροξειδωσης.....	66
Εικόνα 22: Οξειδωτική Τροποποίηση Πρωτεϊνών	68
Εικόνα 23: Θάνατοι ανδρών (αριστερά) και γυναικών (δεξιά) από στεφανιαία νόσο στην Ευρώπη	73
Εικόνα 24: Δομή του ενδοθηλίου	84
Εικόνα 25: Φυσιολογικές Λειτουργίες του ενδοθηλίου.	85
Εικόνα 26: Η παρατεταμένη φλεγμονή οδηγεί σε βλάβη του ενδοθηλίου (αριστερά). Τοπική επιδιόρθωση του ενδοθηλίου στο σημείο της βλάβης (δεξιά)	86
Εικόνα 27: Έναρξη και ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας	87
Εικόνα 28: Εξέλιξη αθηρωματικής πλάκας.	89
Εικόνα 29: Δομή φλαβονολών	98
Εικόνα 30: Φλαβανόλες	98

Εικόνα 31: Ανθοκυανίνες	99
Εικόνα 32: Υδρόξυ-κινναμωνικά οξέα	100
Εικόνα 33: Υδρόξυ-βενζοϊκά οξέα	101
Εικόνα 34: Στιλβένια	101
Εικόνα 35: Στέμφυλα	112
Εικόνα 36: Σπόσοι	114
Εικόνα 37: Φλούδες.	115
Εικόνα 38: Τσάμπουρα	116
Εικόνα 39: Αμπελόφυλλα.....	117
Εικόνα 40: Οινολάσπες.....	118

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου και Αζώτου	25
Πίνακας 2: Αντιοξειδωτικές δράσεις παραπροϊόντων οινοποίησης in vitro	125
Πίνακας 3: Κλινικές δοκιμές για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των παραπροϊόντων	131
Πίνακας 4: Διατροφική Ανάλυση τυποποιημένου γεύματος	136
Πίνακας 5: Οξείδωση Ορού.....	139
Πίνακας 6: Κύρια ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών	141
Πίνακας 7: Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν την παρέμβαση (χρόνος Π).....	142
Πίνακας 8: Lag time εθελοντή 1	144
Πίνακας 9: Lag time εθελοντή 2	145
Πίνακας 10: Lag time εθελοντή 3	146
Πίνακας 11: Μέσος όρος των lag time (min) και για τους τρεις εθελοντές.....	148
Πίνακας 12: Επί % Π μεταβολή των lag time (min) και για τους τρεις εθελοντές	149

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Αναστολή οξείδωσης ορού (lag phase) για τον εθελοντή 1	144
Διάγραμμα 2: Αναστολή οξείδωσης ορού (lag phase) για τον εθελοντή 2	146
Διάγραμμα 3: Αναστολή οξείδωσης ορού (lag phase) για τον εθελοντή 3	147
Διάγραμμα 4: Αναστολή οξείδωσης ορού και για τους τρεις εθελοντές.....	148
Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή των lag time σε σχέση με το χρόνο Π.....	150

Συντομογραφίες

4-HNE	4-hydroxynonenal, 4-υδροξυνονενάλη
8-iso-PGF2 α	8-iso-prostaglandin F2 α , 8-ισο-προσταγλαδίνη F2a
8OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-ύδροξυ-2-δεοξυ-γουανοσίνη
8OHGua	8-hydroguanine, 8-υδρόξυγουανίνη
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ALA	α - lipoic acid- λιποϊκό οξύ
ALDH	aldehyde dehydrogenases, αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης
AOPPs	advanced oxidation protein products, προχωρημένα προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών
Apo-I	apolipoprotein-I, απολιποπρωτεΐνη I
CAD	coronary artery disease, στεφανιαία νόσος
CAT	catalase, καταλάση
COX	cyclooxygenase, κυκλοοξυγονάση
cPLA ₂	cytosolic phospholipase A2, κυτταροπλασματική φωσφολιπάση A2
CRP	c reactive protein, c αντιδρώσα πρωτεΐνη
CUPRAC	cupric reducing antioxidant capacity, ικανότητα αναγωγής χαλκού
CuSO ₄	θειικός χαλκός
CVD	cardiovascular disease, Καρδιαγγειακά Νοσήματα
CYP	cytochrome p450, κυτόχρωμα p450
DBP	diastolic blood pressure, διαστολική πίεση
DHLA	dihydrolipoic acid, διϋδρολιποϊκό οξύ
ELISA	enzyme-linked Immunosorbent Assay, ενζυμική ανοσολογική δοκιμασία
ETEs	εποξυ- εικοσατετραενοϊκού οξέος
FAD	flavin adenine dinucleotide, φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο
FITC	fluorescein isothiocyanate, φθορίζουσα κυτταρομετρία ροής
FMD	flow-mediated dilation
FMN	flavin mononucleotide, φλαβινο-μονο-νουκλεοτίδιο
FRAP	ferric reducing antioxidant power, ικανότητα αναγωγής τριθενούς σιδήρου

GAE	gallic acid equivalents, ανάλογα γαλλικού οξέος
GC-MS	gas chromatography mass spectroscopy, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας
GPX	glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
Grx	glutaredoxin, σύστημα της γλουταρεδοξίνης
GSH	ανηγγμένη γλουταθειόνη
H ₂ O ₂	υπεροξείδιο του υδρογόνου
HDL-C	high-density-lipoprotein-cholesterol, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης
HETEs	υδρόξυ- εικοσατετραενοϊκό οξύ
HOCl	υποχλωριώδες οξύ
HORAC	hydroxyl radical antioxidant capacity, ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου
HOSC	hydroxyl radical scavenging capacity, ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου
HPETEs	υδροϋπερόξυ-εικοσατετραενοϊκού οξέος
HPLC	high pressure liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
IκB	NF-κB Inhibitors, αναστολείς του Nf-κB
IKK	κινάσες των IκB
IL-12	interleukin 12, Ιντερλευκίνη 12
IL-6	interleukin 6, Ιντερλευκίνη 6
INF-γ	interferon-γ,, ιντερφερόνη-γ
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein-1
lag time	λανθάνουσα φάση
LDL-C	low-density-lipoprotein-cholesterol, λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας
LOX	lipoxygenase, λιποξυγονάση
LPS	lipopolysaccharides, λιπολυσασχαρίτες
LTs	leukotrienes, λευκοτριένια

MAO	monoamino-oxidase, μονοάμινο-οξειδάση
MAPK	mitogen-activated protein kinase, ρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο ουσία
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1, μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη-1
MDA	malondialdehyde, μηλονυλοαλδεΐδη
MetS	metabolic syndrome, Μεταβολικό Σύνδρομο
MPO	myeloperoxidase, μυελοϋπεροξειδάση
NAD(P)H	Nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide, νικοτινάμιδο-αδένινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο
NF-κB	nuclear factor-κB, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας κB
NO [•]	nitric oxide radical, ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
NO ₂	nitrogen dioxide, διοξειδίου του αζώτου
NOS	συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
NOX	NADPH oxidase, NADPH οξειδάση
Nrf2	nuclear erythroid 2-related factor 2
O ₂	oxygen, μοριακό οξυγόνο
O ₂ ⁻	superoxide radical, ανιόν υπεροξειδίου
OGTT	oral glucose tolerance test, από του στόματος δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη
OH [•]	hydroxyl radical, ρίζα υδροξυλίου
ONOO ⁻	peroxinitrite, υπερόξυ -νιτρώδες ανιόν
ORAC	oxygen radical absorbance capacity, ικανότητα δέσμευσης ριζών οξυγόνου
oxLDL	oxidized LDL, οξειδωμένη LDL
PAF	platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PGs	prostaglandins, προσταγλαδίνες
PRDXs	peroxiredoxins, περοξυρεδοξίνες
PRP	platelet rich plasma, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PUFA	polyunsaturated fatty acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

RNS	Reactive Nitrogen Species, ενεργές μορφές αζώτου
RO [•]	alkoxy readicals, ρίζες αλκοξειδίου
ROO [•]	superoxide radicals, ρίζες υπεροξειδίου
ROS	reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου
SBP	systolic blood pressure, συστολική πίεση
SFA	saturated fatyy acids, κορεσμένα λιπαρά οξέα
SOD	superoxide dimutase, δισμουτάση του υπεροξειδίου
Srx	sulfiredoxin, σουλφιρεδοξίνη
TAC	total antioxidant capacity, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TAOS	total antioxidant status, ολική αντιοξειδωτική κατάσταση
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances, ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ
TNF-a	tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
TRAP	thrombin receptor-activating reptide, πεπτίδιο που ενεργοποιεί τον υποδοχέα θρομβίνης
TRXs	thioredoxins, θειορεδοξίνες
TXs	thromboxane, θρομβοξανία
UA	uric acid, ουρικό οξύ
WGPF	Wine Grape Pomace Flour
XDH	xanthine dehydrogonase, αφυδρογονάση της ξανθίνης
XO	xanthine oxidase, οξειδάση της ξανθίνης
ΔΜΣ	Δείκτης Μάζας Σώματος
ΣΔΙΙ	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου ΙΙ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Οξειδωτικό στρες

1.1 Ελεύθερες Ρίζες, Ενεργές Μορφές Οξυγόνου και Αζώτου

1.1.1 Ορισμοί

Ελεύθερες Ρίζες

Ο όρος ελεύθερη ρίζα αναφέρεται ουσιαστικά σε ένα μόριο ή άτομο, το οποίο διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα τροχιακό, συγκεκριμένα στην εξωτερική του στοιβάδα (1) και μπορεί να υφίσταται ως αυτόνομη μορφή (2) σε χημικά ή βιολογικά συστήματα. Κάποια παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου ($OH^\cdot$) και η ρίζα μονοξειδίου του αζώτου ($NO^\cdot$). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικές και ασταθείς ενώσεις και αντιδράνε εύκολα με γειτονικά μόρια αποσπώντας ηλεκτρόνια από αυτά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ριζών. Ταυτόχρονα, μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν άλλες ενώσεις, χωρίς μονήρη ηλεκτρόνια, οι οποίες ονομάζονται μη-ελεύθερες ρίζες, όπως για παράδειγμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υπερóξυ -νιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$). Οι ενώσεις αυτές είναι λιγότερο δραστικά και ασταθή μόρια, ωστόσο μπορούν εύκολα να μετατραπούν ξανά σε ελεύθερες ρίζες (3).

Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ROS) και Αζώτου (RNS)

Ο όρος ενεργές, ή αλλιώς δραστικές μορφές οξυγόνου (**Reactive Oxygen Species, ROS**) είναι πιο γενικός και περιλαμβάνει όλες τις ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο, καθώς και όλες τις μη- ρίζες, οι οποίες μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε αυτές, όπως για παράδειγμα το Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (H_2O_2). Αντίστοιχα, ως ενεργές μορφές αζώτου (**RNS**) χαρακτηρίζονται όλες οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο και άζωτο, καθώς και όλες οι μη ρίζες, οι οποίες μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε αυτές. Οι ROS και οι RNS αναφέρονται συνολικά και ως «Δραστικές Μορφές Οξυγόνου και Αζώτου», δηλαδή **RONS (Reactive Oxygen Nitrogen Species)**. Οι RONS, στην προσπάθεια τους να συμπληρώσουν τα δικά τους

τροχιακά, αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις, συνήθως υπό τη μορφή H^+ , με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ελεύθερων ριζών και κατ' επέκταση αρχίζουν καταρράκτες αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών (3).

1.1.2 Είδη Δραστικών Μορφών Οξυγόνου και Αζώτου

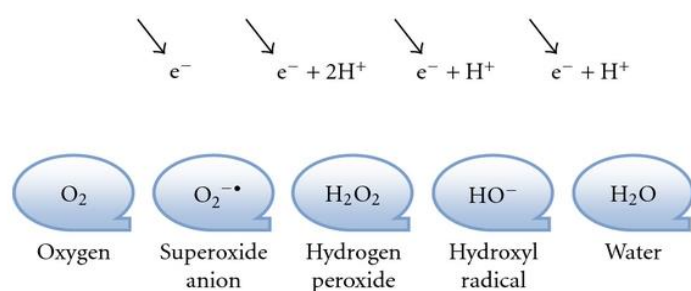
Παρακάτω αναφέρονται τα σημαντικότερα είδη των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου.

Μοριακό οξυγόνο

Το μοριακό οξυγόνο έχει ιδιαίτερη ηλεκτρονική διαμόρφωση. Χαρακτηρίζεται ως «biradical», δηλαδή διπλή ελεύθερη ρίζα, καθώς εμφανίζει δύο μονήρη ηλεκτρόνια σε διαφορετικά τροχιακά. Θερμοδυναμικά, είναι πολύ δραστικό μόριο, αλλά για να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ώστε να καλύψει τα τροχιακά του απαιτεί την παρουσία μετάλλων, που λειτουργούν ως καταλύτες. Μπορεί να δεχτεί έως 4 ηλεκτρόνια και σταδιακά ανάγεται σε νερό. Τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια έχουν ίδια στροφορμή, γεγονός που εξηγεί την περιορισμένη δραστικότητά του μοριακού οξυγόνου, καθώς μπορεί να αντιδράσει κάθε φορά με ένα ηλεκτρόνιο. Ωστόσο, υπάρχει περίπτωση ένα από τα μονήρη ηλεκτρόνια να διεγερθεί και να αλλάξει φορά (spin) και να μετατραπεί σε μονήρες οξυγόνο ή οξυγόνο απλής κατάστασης, το οποίο είναι ιδιαίτερα δραστικό (4,5).

Οξυγόνο απλής κατάστασης

Το οξυγόνο απλής κατάστασης ή μονήρες οξυγόνο αποτελεί μία διεγερμένη ηλεκτρονικά μορφή του μοριακού οξυγόνου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μοριακό οξυγόνο έχει δύο μονήρη ηλεκτρόνια σε διαφορετικά τροχιακά με ίδια όμως



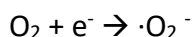
Εικόνα 1: Αντιδράσεις Αναγωγής Οξυγόνου σε νερό, (6)

στροφορμή. Αντίθετα, στο διεγερμένο μοριακό οξυγόνο τα δύο ηλεκτρόνια αποκτούν αντίστροφα spin και αυτόματα συνενώνονται στην ίδια στοιβάδα αφήνοντας τελικά ένα

τροχιακό κενό. Κατά συνέπεια, το οξυγόνο απλής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, είναι όμως πολύ δραστικό οξειδωτικό μέσο, καθώς το κενό τροχιακό μπορεί πολύ γρήγορα να δεχτεί ηλεκτρόνια. Συνήθως, είναι αποτέλεσμα αντιδράσεων φωτοενεργοποίησης, κατά τις οποίες φωτοευαίσθητα μόρια εκτίθενται σε ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και απορροφούν ενέργεια, την οποία στη συνέχεια αποδίδουν σε γειτονικά μόρια. Κύριος αποδέκτης αυτής της ενέργειας είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο μετατρέπεται σε οξυγόνο απλής κατάστασης, και στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με γειτονικά μόρια προκαλώντας τροποποιήσεις τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους. Πολλά φωτοευαίσθητα μόρια αποτελούν βιολογικά συστατικά και περιλαμβάνουν τη ριβοφλαβίνη, παράγωγα των FMN και FAD, χολερυθρίνη κ.α. (5,6)

Ανιόν Υπεροξειδίου

Η ελεύθερη ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου είναι αποτέλεσμα της προσθήκης ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο.

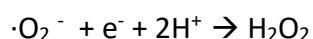


In vivo, παράγεται είτε ως προϊόν ενζυμικών αντιδράσεων, είτε μη ενζυμικά από την ατελή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως αυτό της αναπνευστικής αλυσίδας. Βασική κυτταρική πηγή της ρίζας του ανιόντος υπεροξειδίου αποτελούν τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα η παραγωγή του εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, στη θεμέλια ουσία και στις δύο πλευρές της εσωτερικής τους μεμβράνης. Θεωρείται κύρια ελεύθερη ρίζα του οξυγόνου κι έχει μεγάλη οξειδωτική ικανότητα, παρόλο που το αρνητικό του φορτίο περιορίζει την ικανότητα διάχυσής του από τις βιολογικές μεμβράνες. Ωστόσο, με ένα μέτριο χρόνο ημι-ζωής 10^{-9} με 10^{-11} s, μπορεί να οξειδώνει πλήθος κυττάρων, και να μετατρέπεται σε ακόμη πιο δραστικές και τοξικές μορφές οξυγόνου, όπως η ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο (7). Επιπλέον, σε συνθήκες στρες η περίσσεια $\cdot\text{O}_2^-$ λειτουργεί ως οξειδωτικό μέσο για μεταλλοπρωτεΐνες και απελευθερώνει ιόντα σιδήρου. Συμμετέχει στην αντίδραση Haber – Weiss, όπου αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς παραγωγή $\text{OH}\cdot$, με ταυτόχρονη αναγωγή τρισθενούς σιδήρου προς δισθενή. Ο παραγόμενος σίδηρος μπορεί, στη συνέχεια, να συμμετάσχει στην αντίδραση Fenton, κατά την οποία

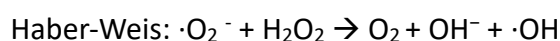
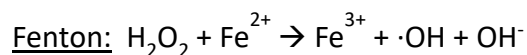
αντιδρά με υπεροξείδιο υδρογόνου προς περεταίρω παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (4).

Υπεροξείδιο του Υδρογόνου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί μία πιο σταθερή ενδιάμεση μορφή των αντιδράσεων για αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό. Είναι προϊόν αναγωγής και πρωτονίωσης του ανιόντος υπεροξειδίου, αλλά μπορεί να προκύψει και μέσω ενζυμικών αντιδράσεων.



Δεν είναι ελεύθερη ρίζα, καθώς δεν διαθέτει μονήρη ηλεκτρόνια και θεωρείται ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Ωστόσο, η απουσία ηλεκτρικού φορτίου, που του επιτρέπει να διαχέεται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και ο μεγάλος, σχετικά, χρόνος ημι-ζωής του, περίπου στο 1 ms (7), το καθιστά τοξικό για το κύτταρο (8). Αν και διαθέτει μικρή οξειδωτική ικανότητα μπορεί να οξειδώσει πλήθος βιολογικών μορίων, ιδιαίτερα αν αυτά περιλαμβάνουν θειολικές ομάδες, σύμπλοκα Fe-S, ομάδες αίμης κ.α. Ταυτόχρονα, μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου, καθώς συμμετέχει στις αντιδράσεις Haber – Weis και Fenton (5).



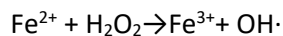
Ρίζα Υδροξυλίου

Οι ρίζες υδροξυλίου είναι οι πιο δραστικές από τις ελεύθερες ρίζες για τον οργανισμό. Έχουν πολύ υψηλή οξειδωτική ικανότητα, αν και έχουν σχετικά μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, περίπου $10^{-9} - 10^{-10}$ s (7). Έτσι, αντιδρούν κοντά στο σημείο σχηματισμού τους, μη εξειδικευμένα, και καταστρέφουν βασικά κυτταρικά συστατικά, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, οξειδώνοντάς τα. Είναι αποτέλεσμα της προσθήκης ενός ηλεκτρονίου στο υπεροξείδιο του υδρογόνου.

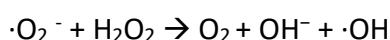


Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου είναι συνήθως αποτέλεσμα της αντίδρασης Heber-Weis. Πιο αναλυτικά, υπό συνθήκες στρες η περίσσεια $\cdot\text{O}_2^-$ δρα ως

οξειδωτικός παράγοντας και απομακρύνει ιόντα σιδήρου από μεταλλοπρωτεΐνες, τα οποία χρησιμοποιούνται από την αντίδραση Fenton και έτσι διευκολύνει την παραγωγή ριζών υδροξυλίου από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (4).



Ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου σχηματίζονται και από τη ρίζα ανιόντος υδροξυλίου, μέσω της αντίδρασης Heber-Weis, καθώς και από την ομολυτική διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).



Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι οι πιο καταστρεπτικές από το σύνολο των ελευθέρων ριζών για τα κύτταρα και έχουν πολύ μικρό χρόνο αντίδρασης με αποτέλεσμα στα βιολογικά συστήματα να μην μπορούν να ανιχνευθούν αυτές καθ' αυτές, αλλά εντοπίζονται μόνο μέσω των προϊόντων των αντιδράσεων τους (5).

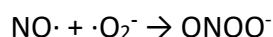
Μονοξειδίο του Αζώτου

Το μονοξειδίο του αζώτου είναι μία ελεύθερη ρίζα αζώτου, καθώς διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο άζωτο. Παρότι ελεύθερη ρίζα, το μονοξειδίο του αζώτου είναι σχετικά αδρανές μόριο, με μικρή οξειδωτική ικανότητα και λόγω αυτού πολλές φορές παραλείπεται η τελεία, που συμβολίζει τις ελεύθερες ρίζες. Είναι ένα άχρωμο αέριο με μεγάλη διαχυτική ικανότητα. Σχηματίζεται με το ένζυμο συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου από την οξείδωση της L-αργινίνης προς κιτρουλίνη, χρησιμοποιώντας NADPH. Υπάρχουν τρεις μορφές του ενζύμου, αυτή των νευρικών κυττάρων (nNOS, NOS1), η ενδοθηλιακή NOS (eNOS, NOS3) και η επαγόμενη (iNOS, NOS2), η οποία επάγεται σε καταστάσεις φλεγμονής (1,9). Σε μικρές συγκεντρώσεις το μονοξειδίο του αζώτου επιτελεί πολλές σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, όπως την διαστολή και χάλαση των αγγείων, τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, την ανοσία και την αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Σε μεγάλες όμως συγκεντρώσεις, όπως για παράδειγμα σε καταστάσεις φλεγμονής, γίνεται τοξικό για το κύτταρο, καθώς μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο ή με ανιόν υπεροξειδίου και να

οδηγήσει στο σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου, όπως το υπερόξυ-νιτρώδες ανιόν, το οποίο αν και δεν είναι ελεύθερη ρίζα έχει μεγάλη οξειδωτική ικανότητα (5).

Υπερόξυνιτρώδες ανιόν

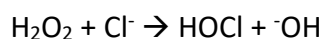
Το υπερόξυ- νιτρώδες ανιόν δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, αλλά είναι ιδιαίτερα οξειδωτικός παράγοντας και μάλιστα θεωρείται υπεύθυνο για την έκφραση τοξικότητας του μονοξειδίου του αζώτου. Το ONOO^- παράγεται από την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το ανιόν υπεροξειδίου.



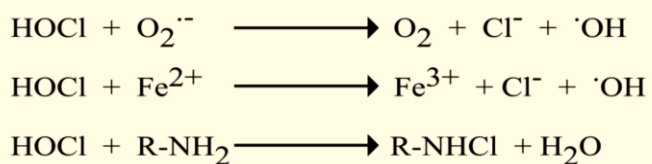
Η αντίδραση αυτή είναι τόσο γρήγορη, ώστε να καθορίζεται από την ταχύτητα διάχυσης του NO (diffusion controlled). Μάλιστα, είναι τρεις φορές πιο γρήγορη και από την μετατροπή του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο υδρογόνου και από τις αντιδράσεις του μονοξειδίου του αζώτου. Συνεπώς, ο σχηματισμός υπερόξυ-νιτρώδους είναι η κύρια αντίδραση όταν τα δύο αυτά μόρια βρεθούν μαζί. Το ONOO^- μπορεί να διαχέεται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και μαζί με την πρωτεονισμένη του μορφή (ONOOH) μπορούν να οδηγήσουν στην οξείδωση θειολών, στην καταστροφή του DNA και τη νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης σε πολλές πρωτεΐνες, με επακόλουθες επιπτώσεις στη δομή και τη δράση τους. Μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα διοξειδίου του αζώτου (NO_2), που συμμετέχει στην λιποξειδική υπεροξείδωση, σε ιόν νιτρονίου (NO_2^+) που συμμετέχει σε αντιδράσεις νίτρωσης αρωματικών δακτυλίων (πχ. νιτρο - γουανοσίνη), ενώ μετατρέπεται σε τριοξείδιο του αζώτου (N_2O_3) είναι παράγοντας νιτροσυλίσωσης, η οποία μπορεί να τροποποιήσει ή να οδηγήσει σε απώλεια της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών (3).

Υποχλωριώδες οξύ

Το υποχλωριώδες οξύ σχηματίζεται από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ιόντα χλωρίου και καταλύεται από το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση. Το ένζυμο αυτό εκκρίνεται από φαγοκύτταρα και ουδετερόφιλα μετά από κατάλληλη διέγερση.



Στη συνέχεια, το υποχλωριώδες οξύ μπορεί να αντιδράσει με ανιόντα σιδήρου προς παραγωγή ριζών υδροξυλίου. Σε φυσιολογικό pH, το HOCl βρίσκεται σε αναλογία περίπου 50:50 στις μορφές HOCl και OCl^- (5). Το υποχλωριώδες οξύ είναι ιδιαίτερα δραστικό μόριο και μπορεί να οξειδώνει κατάλοιπα κυστεΐνης προς σχηματισμό σουλφενικού οξέος, ή κατάλοιπα τυροσίνης σχηματίζοντας χλωροτυροσίνη (8).



Επιπλέον, χρησιμεύει στην άμυνα του οργανισμού κατά αντιγόνων, καθώς διαθέτει αντιμικροβιακή δράση (10).

Εικόνα 2: Αντιδράσεις Υποχλωριώδους οξέος, (5).

Ρίζες αλκοξειδίου ($\text{RO}^\cdot$) και υπεροξειδίου ($\text{ROO}^\cdot$)

Οι ελεύθερες αυτές ρίζες είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης ανιόντος υπεροξειδίου και ρίζας υδροξυλίου με οργανικά, κυρίως λιποειδικά, μόρια και θεωρούνται ότι έχουν υψηλή οξειδωτική ικανότητα (5).

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου και Αζώτου

Ελεύθερες Ρίζες		Μη- Ρίζες	
Δραστικές Μορφές Οξυγόνου			
Οξυγόνο	O ₂	Υπεροξειδίο του Υδρογόνου	H ₂ O ₂
Ανιόν Υπεροξειδίου	·O ₂ ⁻	Οργανικά υδροπεροξειδία	ROOH
Ρίζα Υδροξυλίου	HO·	Όζον	O ₃
Ρίζα Αλκοξειδίου	RO·	Οξυγόνο απλής κατάστασης	¹ O ₂
Ρίζα Υπεροξειδίου	ROO·	Ηλεκτρικά φορτισμένο καρβονύλιο	RCO
Δραστικές Μορφές Αζώτου			
Ρίζα Μονοξειδίου του Αζώτου	NO·	Περοξυνιτρικό	ONOO ⁻
Ρίζα Διοξειδίου του Αζώτου	NO ₂ ·	Υπερόξυ-νιτρώδες οξύ	HONO ₂
		Ιόν νιτρονίου	NO ₂ ⁺
		Νιτρώδες	NO ₂ ⁻
		Τριοξειδίο του Αζώτου	N ₂ O ₃
Δραστικές Μορφές Βρωμίου/Χλωρίου			
Άτομο Χλωρίου	Cl·	Υποχλωριώδες Οξύ	HOCl
Άτομο Βρωμίου	Br·	Χλωραμίνες	OCl ⁻
		Υποβρωμιώδες Οξύ	OBr ⁻

1.2 Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών, ROS και RNS

Οι βιοχημικές αντιδράσεις, που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό, σε φυσιολογικές συνθήκες, οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Μπορεί να προκύψουν ως τυχαία παραπροϊόντα ή φυσιολογικά προϊόντα ενζυμικών αντιδράσεων, ως τοξικές ουσίες για αντιμετώπιση μικροοργανισμών σε καταστάσεις φλεγμονής, είτε από εξωγενείς πηγές, όπως το κάπνισμα, η ακτινοβολία και η ατμοσφαιρική ρύπανση. Γενικά, η παραγωγή ROS συμβαίνει τόσο σε φυσιολογικές, όσο και παθολογικές καταστάσεις ενώ το 90% αυτών σχηματίζεται στα μιτοχόνδρια. Παρακάτω, θα αναλυθούν οι σημαντικότερες ενδογενείς και εξωγενείς πηγές RONS.

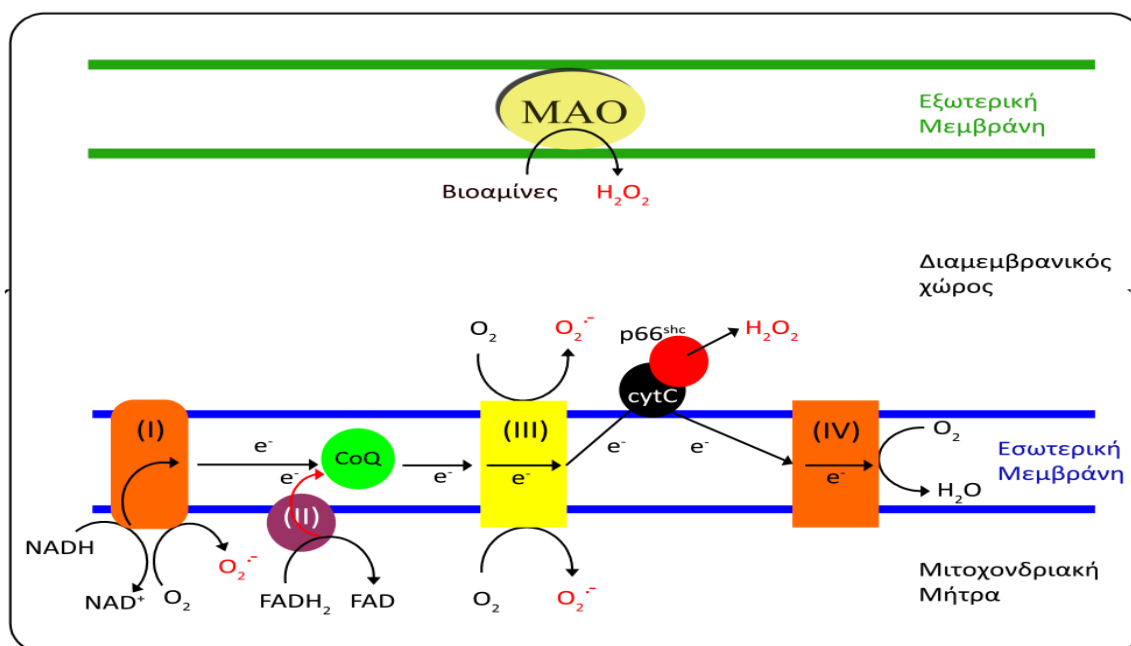
1.2.1 Ενδογενείς πηγές

Αναπνευστική αλυσίδα

Η αναπνευστική αλυσίδα ή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αναφέρεται σε μία σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων, κατά την οποία ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο μοριακό οξυγόνο. Η αναπνευστική αλυσίδα, καθώς αποτελεί ένα κλειστό κύκλωμα, συνήθως, δεν επιτρέπει την δημιουργία δραστικών ενδιάμεσων ενώσεων. Το 90-95% του καταναλισκόμενου οξυγόνου ανάγεται σε νερό με το συνένζυμο Q. Ωστόσο, το 1-5 % θα σχηματίσει ανιόν υπεροξειδίου, το οποίο στη συνέχεια θα οδηγήσει στο σχηματισμό περαιτέρω RONS (10). Δεδομένα από in vitro μελέτες σε σκελετικούς μύες από ποντίκια εντοπίζουν 11 διαφορετικά σημεία στα μιτοχόνδρια, όπου μπορούν να διαφύγουν ηλεκτρόνια. Οι μελέτες in vivo, αν και πιο περιορισμένες, δείχνουν ότι κύριο ρόλο στην παραγωγή RONS παίζει το σύμπλοκο I, δηλαδή το σύμπλοκο της οξειδοαναγωγής του NADH με την ουβικινόνη, και το σύμπλοκο III, δηλαδή το σύμπλοκο της ουβικινόνης με το οξειδοαναγωγής του κυτοχρώματος c (11). Η αφυδρογονάση του NADH αποτελεί το σύμπλοκο I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Καταλύει την μεταφορά ενός υδριδίου (H^-) από το NADH στο μόριο της ουβικινόνης και 4 H^+ από τη μήτρα στον ενδιάμεσο χώρο. Αποτελείται από 2 βασικούς βραχίονες: ο πρώτος είναι ενσωματωμένος στην εσωτερική μεμβράνη και ο δεύτερος προεξέχει από τη μήτρα του μιτοχονδρίου. Ο βραχίονας της εσωτερικής μεμβράνης περιλαμβάνει 7 υδρόφοβες υπομονάδες, ενώ ο βραχίονας, που βρίσκεται στο χώρο

της μήτρας περιλαμβάνει 7 υπομονάδες, μία από τις οποίες είναι μία FMN – φλαβινο – πρωτεΐνη την οποία ακολουθούν, καθώς και 7-9 κέντρα FeS, παρατεταγμένα πό το χαμηλότερο προς το υψηλότερο δυναμικό. Το κέντρο σύνδεσης της ουβικινόνης βρίσκεται στο σημείο, όπου συνδέονται οι δύο βραχίονες του ενζύμου και στο οποίο η ουβικινόνη μετατρέπεται σε ανηγμένη ουβικινόνη. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών εντοπίζεται κυρίως στο κέντρο σύνδεσης της FMN-φλαβινο-πρωτεΐνης και στο κέντρο σύνδεσης του συνενζύμου Q, κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q και οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες κατευθύνονται προς τη μήτρα του μιτοχονδρίου (12). Ένα σημαντικό μέρος των ROS, δημιουργούνται από την αντίστροφη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αφορά την μεταφορά ηλεκτρονίων από την ουβικινόνη, πίσω στο σύμπλοκο I, με ταυτόχρονη αναγωγή του NAD^+ σε NADH (11). Το σύμπλοκο III είναι μία αλυσίδα κυτοχρωμάτων (bc₁) ή εναλλακτικά αναφέρεται ως, οξειδοαναγωγή συνενζύμου Q – κυτοχρώματος c. Καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ανηγμένη ουβικινόνη στο κυτόχρωμα c. Είναι ένα συμμετρικό διμερές με 11 υπομονάδες σε κάθε μονομερές. Οι κύριες υπομονάδες είναι το κυτόχρωμα b, που βρίσκεται σε δύο μορφές, την b_L και b_H, χαμηλού και υψηλού δυναμικού, αντίστοιχα, το κυτόχρωμα c₁ και μία ομάδα υψηλού δυναμικού συνδεδεμένη με μία FeS πρωτεΐνη. Επιπλέον, περιλαμβάνει 2 σημεία σύνδεσης συνενζύμου Q στα δύο άκρα του κυτοχρώματος b, ενσωματωμένα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Το ένα είναι το σημείο οξείδωσης της ανηγμένης ουβικινόνης (Q_o), που είναι προσανατολισμένο στον ενδιάμεσο χώρο, ενώ το δεύτερο είναι το σημείο αναγωγής της Q⁻ (Q_i), που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη και είναι προσανατολισμένο προς την μήτρα. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων συνοδεύεται με τον **κύκλο της ουβικινόνης**, όπου η ανηγμένη ουβικινόνη (QH₂) αρχικά, οξειδώνεται σε ημικινόνη (QH⁻), αφού μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στο FeS, το οποίο ακολούθως μεταφέρεται στο κυτόχρωμα c₁ και από εκεί στο κυτόχρωμα c. Η ημικινόνη στο σημείο Q_o μεταφέρει το δεύτερο ηλεκτρόνιο στο κυτόχρωμα b_L και στη συνέχεια στο κυτόχρωμα b_H στο σημείο Q_i. Το ανηγμένο κυτόχρωμα b_H μεταφέρει στο ηλεκτρόνιο στο συνένζυμο Q στο σημείο Q_i, σχηματίζοντας ημικινόνη, ενώ ένα δεύτερο μόριο ανηγμένης ουβικινόνης οξειδώνεται στο Q_o όπως εξηγήθηκε παραπάνω, σχηματίζοντας τελικά δύο μόρια ανηγμένης ουβικινόνης. Συνολικά λοιπόν, η οξείδωση 2 μορίων ανηγμένης

ουβικινόνης οδηγεί στην μεταφορά δύο ηλεκτρονίων σε δύο μόρια κυτοχρώματος c1, στην αναγέννηση ενός μορίου ανηγμένης ουβικινόνης και στη μεταφορά 4 πρωτονίων στον ενδιάμεσο χώρο (3,12,13).



Εικόνα 3: Δημιουργία ROS στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδα(5).

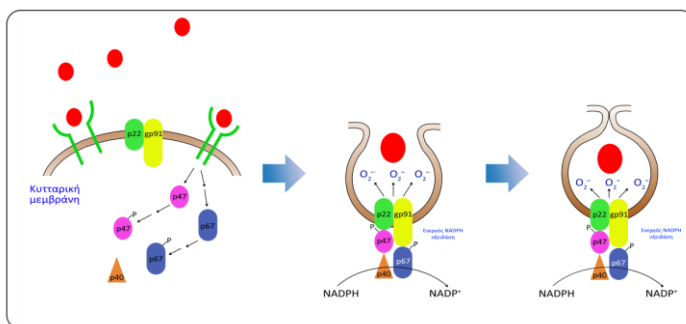
Η παραγωγή ROS φαίνεται να συμβαίνει σε μικρότερη κλίμακα στο σύμπλοκο III σε σχέση με το σύμπλοκο I. Εντοπίζεται κυρίως, στα δύο κέντρα Qo και Qi, δηλαδή τα σημεία οξειδωσης και αναγωγής της ουβικινόνης, κατά τον κύκλο Q. Συγκεκριμένα, η ημικινόνη στο σημείο Qo μπορεί να μετακινείται ελεύθερα στο σύμπλοκο III και να μεταφέρει το μονήρες ηλεκτρόνιο απευθείας στο O_2 , δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το σύμπλοκο I δημιουργεί ελεύθερες ρίζες αποκλειστικά στη μήτρα του μιτοχονδρίου, ενώ το σύμπλοκο III, δημιουργεί ROS είτε στην μήτρα είτε στον διαμεμβρανικό χώρο (11). Αξίζει να αναφερθεί ότι, από τα 8 σημεία σχηματισμού $\cdot O_2^-$, που έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια, τα 7 από αυτά απελευθερώνουν τα ROS στη μήτρα του μιτοχονδρίου, ενώ μόνο το σύμπλοκο III και η αφυδρογονάση της 3- φώσφο-γλυκερόλης, απελευθερώνουν ROS στον ενδιάμεσο χώρο. Οι ελεύθερες ρίζες του ενδιάμεσου χώρου, αφενός, έχουν ένα πλεονέκτημα ως μόρια σηματοδότησης σε σχέση με αυτά της μήτρας, καθώς είναι ευκολότερο να διαπεράσουν μόνο την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου για να βρεθούν στο κυτταρόπλασμα (14). Αφετέρου, στη μήτρα των μιτοχονδρίων οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να εξουδετερωθούν από αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα οποία όμως

απουσιάζουν από τον ενδιάμεσο χώρο, με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες εκεί να μην αντιμετωπίζονται. Ίσως λοιπόν, ανεξάρτητα από την κλίμακα σχηματισμού ελευθέρων ριζών, το σύμπλοκο III να είναι τελικά πιο σημαντικό στην παραγωγή ελευθέρων ριζών στην αναπνευστική αλυσίδα (13).

Φαγοκυττάρωση - NADPH οξειδάση

Τα φαγοκύτταρα και κυρίως τα ουδετερόφυλλα (που είναι ο κυριότερος φαγοκυτταρικός πληθυσμός στο ανθρώπινο αίμα) και τα μακροφάγα μπορούν να διεγείρονται και να παράγουν μεγάλες ποσότητες O_2^- . Η διαδικασία αυτή καταλύεται από ένα πολύπλοκο ενζυμικό σύμπλοκο, το οποίο βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και ονομάζεται NADPH οξειδάση. Έχουν εντοπιστεί 7 ισομορφές της NADPH οξειδάσης NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, and DUOX2, οι οποίες μαζί με την NADPH οξειδάση (NOX2/grp91(phox))

αναφέρονται ως οικογένεια NOX της NADPH οξειδάσης (15).



Εικόνα 4: Δημιουργία ROS από την NADPH-οξειδάση. Γαλάρης, 2015, Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Σε φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο αυτό είναι ανενεργό και ενεργοποιείται μετά από διέγερση των φαγοκυττάρων. Συγκεκριμένα, η διέγερση των φαγοκυττάρων και σταδιακά η ενεργοποίηση του ενζύμου, είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης διαμεμβρανικών υποδοχέων, που ονομάζονται TLR (Toll Like Receptors). Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και αναγνωρίζουν μεγάλο αριθμό αντιγόνων, όπως λιπολυσσακχαρίτες (LPS), λιποπεπτίδια και νουκλειικά οξέα, τα οποία προέρχονται κυρίως από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, παράσιτα και ιούς (5). Με τη σύνδεση των αντιγόνων στους υποδοχείς αυτούς ξεκινάει μέσω μεταγωγής σήματος ένας καταρράκτης αλυσιδωτών αντιδράσεων, μεταξύ των οποίων και την φωσφορυλίωση δύο κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, τις p47 και p67, οι οποίες μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου ενεργοποιούν την ανενεργή NADPH οξειδάση και συντελούν έτσι στην δημιουργία ενός κυστιδίου για τη καταστροφή του

παθογόνου. Η ενεργοποίηση του ενζύμου οδηγεί σε μία κατάσταση, που ονομάζεται αναπνευστική έκρηξη (respiratory burst), κατά την οποία πολλαπλασιάζεται η κατανάλωση οξυγόνου από τα φαγοκύτταρα. Τα ηλεκτρόνια, που ανάγουν το O_2 προέρχονται από το NADPH, σχηματίζοντας, τελικά ανιόν υπεροξειδίου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (10,16,17).



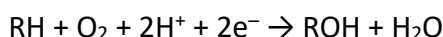
Η αντιμετώπιση των παθογόνων γίνεται με τη βοήθεια ενός άλλου ενζύμου, το οποίο ονομάζεται μυελουπεροξειδάση (MPO). Το ένζυμο αυτό είναι μία αιμοπρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιεί το παραγόμενο H_2O_2 ως υπόστρωμα και οξειδώνει ιόντα χλωρίου προς παραγωγή υποχλωριώδους οξέος (10).



Κυτόχρωμα P450

Μία άλλη πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου για τον οργανισμό εντοπίζεται στον ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου υπάρχει σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Κύριος εκπρόσωπος αυτού του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι το κυτόχρωμα p450 (CYP). Το κυτόχρωμα p450 είναι μία αιμοπρωτεΐνη (έχει σαν συμπαράγοντα μία ομάδα αίμης) και περιλαμβάνει μία μεγάλη ομάδα ενζύμων, η οποία συμμετέχει στον μεταβολισμό διαφόρων μορίων, όπως στεροειδών ορμονών, χοληστερόλης, χολικών οξέων κ.α., καθώς και στην αποικοδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών, όπως τα φάρμακα (18). Με το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα CYPs έχουν την ικανότητα να υδροξυλιώνουν ουσίες τοξικές που εισέρχονται στον οργανισμό και να τις κάνουν μη τοξικές ή να τις μετατρέπει σε με μορφές κατάλληλες για να αποβληθούν από τον οργανισμό (3). Τα CYPs εντοπίζονται, σε δύο σημεία στο κύτταρο και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (μικροσωμάτια). Τα ένζυμα των μιτοχονδρίων αφορούν κυρίως τον μεταβολισμό διαφόρων μορίων απαραίτητων για τον οργανισμό, ενώ τα CYPs στο ενδοπλασματικό δίκτυο σχετίζονται κυρίως με τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών (19). Τα CYPs καταλύουν, μεταξύ άλλων, την οξείδωση υδρόφοβων οργανικών μορίων. Η πιο κοινή αντίδραση σε θηλαστικά αποτελεί η αντίδραση του O_2 με οργανικά μόρια, μέσω ενός ενζύμου που ονομάζεται μονοοξυγονάση, κατά την οποία, το ένα άτομο του

οξυγόνου εισάγεται στο υπόστρωμα ως υδροξύλιο ενώ το δεύτερο ανάγεται προς σχηματισμό νερού (3).



Το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων των CYPs εξαρτάται από το NADPH και O_2 και περιλαμβάνει μία φλαβοπρωτεΐνη και μια NADPH CYP οξειδοαναγωγή (20). Τα δύο ηλεκτρόνια, που απαιτούνται για τον σχηματισμό ενός μορίου νερού, προέρχονται από το NADPH και εισέρχονται στο CYP μέσω δύο πορειών, που περιλαμβάνουν τόσο τα ένζυμα που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, όσο και τα ένζυμα στα μικροσωμάτια. Η πρώτη πορεία αφορά τη μικροσωματική CYP και είναι η αντίδραση της μονοοξυγονάσης. Τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στο CYP, μέσω της αναγωγής του κυτοχρώματος p450, η οποία διαθέτει ως συνένζυμα ένα FAD και ένα FMN. Η δεύτερη πορεία, αφορά τη μιτοχονδριακή CYP, όπου η μεταφορά των ηλεκτρονίων γίνεται μέσω του ενζύμου αναγωγή της αδρενοδοξίνης, που είναι μία φλαβοπρωτεΐνη με μία ομάδα FAD και της αδρενοδοξίνης, η οποία είναι μία φερρεδοξίνη FeS πρωτεΐνη. Κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων αυτών ένα σημαντικό ποσό ενεργού οξυγόνου απελευθερώνεται από τα ενδιάμεσα προϊόντα, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να σχηματίσει ανιόν υπεροξειδίου ή υπεροξείδιο υδρογόνου (16).

Μεταβολισμός Εικοσανοειδών

Ο όρος εικοσανοειδή αναφέρεται σε χημικές ενώσεις, οι οποίες βιοσυντίθενται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με είκοσι άτομα άνθρακα. Τέτοιες ενώσεις αποτελούν οι προσταγλαδίνες, τα λευκοτριένια, τα θρμοβοξάνια, οι προστακυκλίνες κ.α. Το σημαντικότερο λιπαρό οξύ, από το οποίο προέρχεται η πλειοψηφία των εικοσανοειδών είναι το αραχιδονικό οξύ (3). Το εν λόγω λιπαρό οξύ είναι βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και το μεγαλύτερο μέρος του βρίσκεται συνδεδεμένο με γλυκεροφωσfolιποειδή, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο και στη διαδικασία της φλεγμονώδους απόκρισης (21). Για τη βιοσύνθεση των εικοσανοειδών, το αραχιδονικό οξύ πρέπει αρχικά να αποσυνδεθεί από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, με τη βοήθεια του ενζύμου κυτταροπλασματική φωσfolιπάση A2 (cPLA₂). Το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια μπορεί να σχηματίσει εικοσανοειδή, μέσω τριών ενζυμικών μονοπατιών, το μονοπάτι της

κυκλοοξυγονάσης (COX), το μονοπάτι της λιποξυγονάσης (LOX), και μονοπάτι του κυτοχρώματος p450. Το μονοπάτι της κυκλοοξυγονάσης οδηγεί στο σχηματισμό προστανοειδών, δηλαδή προσταγλαδίνες (PGs) και θρομβοξανία (TXs), μέσω των αντίστοιχων συνθασών. Μέσω του μονοπατιού της λιποξυγονάσης παράγονται αρχικά μέσης αλύσου υδροξύλια (Υδρόξυ- εικοσατετραενοϊκό οξύ, HETEs), τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν τα λευκοτριένια (LTs). Τέλος, το μονοπάτι του κυτοχρώματος p450 οδηγεί στο σχηματισμό εποξυ- εικοσατετραενοϊκού οξέος (ETEs), υδρόξυ- εικοσατετραενοϊκού οξέος (HETEs) και υδροϋπερόξυ-εικοσατετραενοϊκού οξέος, HPETEs (21,22). Κατά την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος, από τις LOX και COX μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών, κυρίως ανιόντος υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και ρίζας υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι οι μεταβολίτες των LOX και COX μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της ενεργοποίησης των NOXs, αποκαλύπτοντας ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των εικοσανοειδών και της οικογένειας των NOX οξειδασών (17,23). Επιπλέον, το αραχιδονικό οξύ μπορεί να υποστεί και μη ενζυμική οξειδωτική τροποποίηση από κυκλοφορούσες ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα το σχηματισμό ισοπροστανίων (3).

Μονοάμινο-οξειδάση (MAO)

Το ένζυμο αυτό που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση ενώσεων, που περιέχουν αμινομάδες με ταυτόχρονο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (3).

Οξειδάση της ξανθίνης (XO)

Η αντίδραση της οξειδάσης της ξανθίνης είναι μία ακόμη πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών και αποτελεί ένα είδος πρωτεΐνης μεταφοράς ηλεκτρονίων. Είναι μία φλαβοπρωτεΐνη και περιέχει FAD, μολυβδένιο, σίδηρο και θείο. Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στη συνέχεια σε ουρικό οξύ, με ταυτόχρονη αναγωγή του O_2 σε $\cdot\text{O}_2^-$ και H_2O_2 (3). Φυσιολογικά, η αντίδραση αυτή γίνεται με το ένζυμο αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH), το οποίο χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων το ανάγει NADP^+ (σε NADPH) Αντίθετα, μετά από τραυματισμό, όπως για παράδειγμα

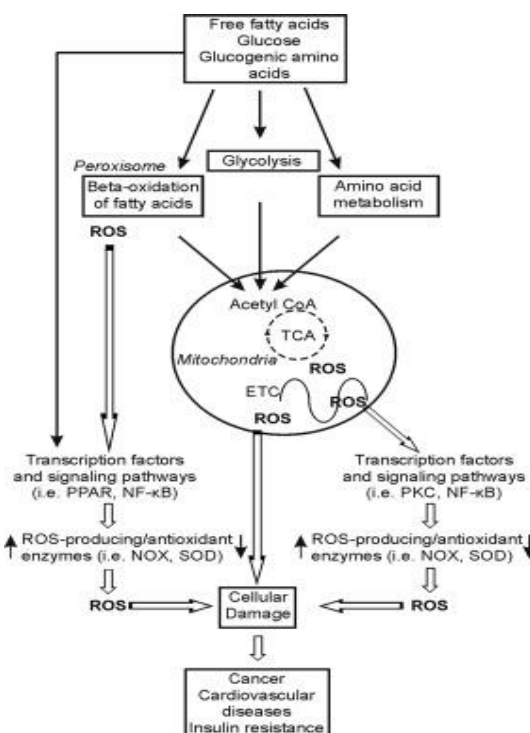
σε επαναιμάτωση μετά από ισχαιμία, η αφυδρογονάση μετατρέπεται σε οξειδάση και κατ' επέκταση να σχηματίσει $\cdot\text{O}_2^-$ και άλλες μορφές ROS (10,17).

1.2.2. Εξωγενείς πηγές

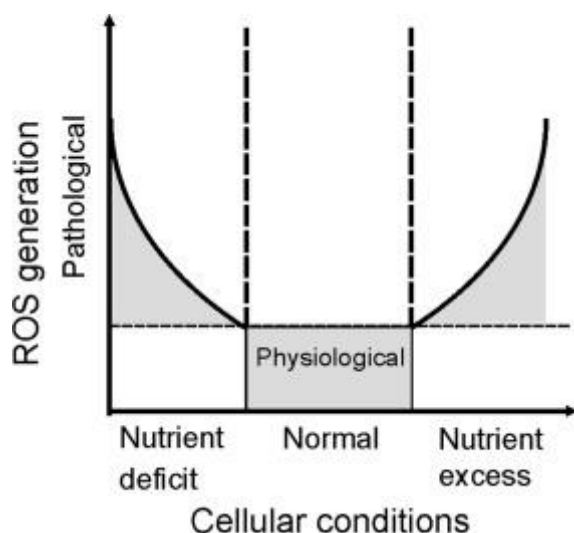
Διατροφή

Οι αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες, ιδιαίτερα του δυτικού κόσμου και σε συνδυασμό με τις αλλαγές του τρόπου ζωής των τελευταίων χρόνων, όπως η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη, η μειωμένη ενεργειακή δαπάνη, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση πολλών χρόνιων νοσημάτων, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς φαίνεται να προωθούν την υπέρμετρη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου.

Επιπλέον, η χρόνια κατανάλωση υπερθερμιδικής διαίτας, συμβάλλει στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής. Συγκεκριμένα, η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη οδηγεί σε μία παρατεταμένη μεταγευματική κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από υψηλή βιοδιαθεσιμότητα υποστρωμάτων στην κυκλοφορία, όπως γλυκόζη, λιπαρά οξέα και αμινοξέα, τα οποία σταδιακά θα οξειδωθούν. Η αυξημένη συγκέντρωση υποστρωμάτων στην κυκλοφορία οδηγεί σε αύξηση του 1δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και κατά συνέπεια σε μείωση της ταχύτητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Υπάρχει, λοιπόν, μεγαλύτερη πιθανότητα να διαφύγουν ηλεκτρόνια από την αναπνευστική αλυσίδα και να συνδεθούν απευθείας με μοριακό οξυγόνο, παράγοντας ROS. Εκτός, αυτού, τα μακροθρεπτικά συστατικά, επηρεάζουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών, μέσω καταρρακτών σηματοδότησης και ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία ρυθμίζουν την ισορροπία προ- και αντι- οξειδωτικών ενζύμων (24).



Εικόνα 5 : Επίδραση μακροθρεπτικών συστατικών στην παραγωγή ROS (24).



Εικόνα 6: Επίδραση της βιοδιαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών στο σχηματισμό των ROS (24).

Η υπεργλυκαιμία, οδηγεί σε αύξηση του σχηματισμού ROS της, μέσω της αύξησης της ενεργοποίησης προφλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο (NF)-kB, ο οποίος στη συνέχεια αυξάνει την έκφραση του TNF-α και άλλων χημειοκινών, τα οποία είναι άμεσα συνδεδεμένα με το οξειδωτικό στρες. Η υψηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών (SFA), έχει παρόμοιες επιπτώσεις.

Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι συμβάλλει στον σχηματισμό ROS, καθώς αυξάνει την έκφραση της φαγοκυτταρικής NADH-οξειδάσης, ενισχύει την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και την δέσμευση του NFκB στον πυρήνα, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει τη δράση του αναστολέα του, IκB (25). Ωστόσο, φαίνεται ότι οι επιδράσεις των SFA, είναι ανάλογες με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, με τα κορεσμένα μακριάς αλύσου να θεωρούνται τα πιο επιβλαβή, ενώ τα μικρής και μέσης αλύσου SFA ίσως να μην συμβάλλουν στην λιποτοξικότητα (26).

Ακόμη, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα των δεικτών λιποξειδικής υπεροξειδωσης, όπως η μηλονυλοαλδεϋδη (MDA) μετά από υπερθερμιδικό και πλούσιο σε λίπος γεύμα (25). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και συνήθως βρίσκονται συνδεδεμένα με φωσφολιποειδή, με αποτέλεσμα να μπορούν εύκολα να υποστούν υπεροξειδωση, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ω6 και ω3 λιπαρών οξέων. Τα ω3 λιπαρά οξέα, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν μία προστατευτική δράση, καθώς φαίνεται ότι λειτουργούν ως αναστολείς του σχηματισμού των ROS, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν την έκφραση γονιδίων, που σχετίζονται με ενδογενή αντιοξειδωτικά (1). Επαρκής πρόσληψη βιταμίνης E είναι απαραίτητη για την προστασία των PUFA από οξειδωτική βλάβη (26).

Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, επίσης, συμβάλλει στον σχηματισμό ROS. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης, περιλαμβάνει αρχικά την μετατροπή της σε ακεταλδεΐδη, η οποία πραγματοποιείται με τη δράση των ενζύμων CYPs του κυτοχρώματος P450, τα οποία είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στον σχηματισμό ROS. Η ακεταλδεΐδη, στη συνέχεια, μετατρέπεται σε οξικό οξύ με το ένζυμο αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης (ALDH). Το ένζυμο αυτό, αν και είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό της αιθανόλης, συμβάλλει στην αύξηση της συσσώρευσης NADH και η μείωση του λόγου NAD^+/NADH , με αποτέλεσμα την αύξηση των ριζών υπεροξειδίου (27).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στη δημιουργία RONS, εκτός από την αυξημένη κατανάλωση τροφής συμβάλλει και η ανεπάρκεια σε θρεπτικά συστατικά. Μειωμένη πρόσληψη πρωτεΐνης, οδηγεί σε διαταραγμένη ενδογενή σύνθεση αντιοξειδωτικών, ενώ συνολικά η μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη συνεπάγεται και μειωμένη απορρόφηση βιταμινών και ιχνοστοιχείων, με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (24).

Ακτινοβολία

Η ιονίζουσα ακτινοβολία, όπως η υπεριώδης και η γ ακτινοβολία μπορούν να προκαλέσουν την δημιουργία ελευθέρων ριζών, καθώς περιέχουν μεγάλα ποσά ενέργειας τα οποία είναι ικανά να διασπάσουν μόρια νερού σε υδροξυλικές ρίζες και ρίζες υδρογόνου ή να διασπάσει τις οργανικές ενώσεις σε οργανικές ρίζες. Οι ελεύθερες που δημιουργούνται από τέτοιου είδους ακτινοβολίες φαίνεται να αυξάνουν την δραστηριότητα ενζύμων, όπως της NADPH οξειδάσης, της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), της λιποξυγονάσης (LOX) και της κυκλοξυγονάσης (COX), τα οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω μπορούν να δημιουργήσουν ROS. Η έκθεση σε τέτοιου είδους ακτινοβολία μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη στα κύτταρα του δέρματος, μεταλλάξεις, καρκινογένεση και κυτταρικό θάνατο (28).

Κάπνισμα

Το κάπνισμα σχετίζεται με πλήθος παθολογικών καταστάσεων και θεωρείται παράγοντας κινδύνου για πολλά χρόνια νοσήματα, όπως τα καρδιαγγειακά και ο καρκίνος, κυρίως μέσω της αύξησης του οξειδωτικού στρες που προκαλεί. Η χρήση

καπνού έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλές τοξικές, καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες χημικές ουσίες και είναι πηγή τόσο σταθερών, όσο και ασταθών ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα και στο DNA. Έχει βρεθεί ότι, η πίσσα του τσιγάρου έχει υψηλή συγκέντρωση σε σταθερές ελεύθερες ρίζες και συγκεκριμένα ρίζες ημικινόνης και καρβονικές ρίζες. Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι ρίζες ημικινόνης, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών με μία σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, αρχικά ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε ανιόν υπεροξειδίου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το τελευταίο, μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγεί στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου, οι οποίες όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχουν μεγάλη οξειδωτική ικανότητα (29). Επιπλέον, τόσο η υψηλή περιεκτικότητα του καπνού σε ελεύθερες ρίζες, όσο και αύξηση στην παραγωγή νέων ριζών, φαίνεται να μειώνουν τη διαθεσιμότητα ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία μονοκυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων (30).

1.3 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

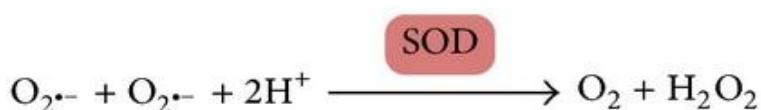
Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού είναι είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης κ.α., καθώς και βιομόρια, όπως η γλουταθειόνη, η αλβουμίνη και το λιποϊκό οξύ.

1.3.1 Ενδογενή Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική Δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD)

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες και περιλαμβάνει ομάδα ενζύμων, που καταλύουν την μετατροπή του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (31). Οι SODs εξουδετερώνουν $\cdot\text{O}_2^-$ με μεγάλη ταχύτητα, με ταυτόχρονη οξείδωση και αναγωγή του μετάλλου στο ενεργό κέντρο. Απαντάται σε 3 ισομορφές σε θηλαστικά (SOD1, SOD2 και SOD3), οι οποίες

διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου στο ενεργό κέντρο, τους απαραίτητους συμπράγοντες κ.α. Και για τις 3 ισομορφές, όμως είναι απαραίτητη η παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης για την επίτευξη της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Η SOD1 (CuZnSOD) απαιτεί στο ενεργό της κέντρο ιόντα Cu και Zn και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων. Η SOD2 (MnSOD) απαιτεί την παρουσία μαγγανίου στο ενεργό της κέντρο κάθε μίας από τις 4 υπομονάδες της. Απαντάται κυρίως στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων και εξουδετερώνει τα ανιόντα υπεροξειδίου, που σχηματίζονται εκεί και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η τρίτη ισομορφή του ενζύμου απαντάται στην εξωκυττάρια μήτρα, κυρίως σε περιοχές με υψηλή συγκέντρωση ινών κολλαγόνου τύπου I, κοντά σε πνευμονικά και συστηματικά αγγεία. Είναι μία τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη, η οποία φέρει ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου στο ενεργό της κέντρο (32,33). Γενικά θεωρείται ότι η SOD1 και SOD2 λειτουργούν ως καθαριστές ελευθέρων ριζών, ενώ η SOD3 ίσως σχετίζεται με την προστασία του πνευμονικού παρεγχύματος (34) και ρυθμίζεται από κυτταροκίνες και όχι από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του



κυττάρου (4).

Εικόνα 7: Αντιοξειδωτική Δράση SOD (35).

Καταλάση (Catalase, CAT)

Η καταλάση είναι ένα τετραμερές ένζυμο, το οποίο καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο, αποτρέποντας την δημιουργία των πολύ δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου. Είναι ένα τετραμερές

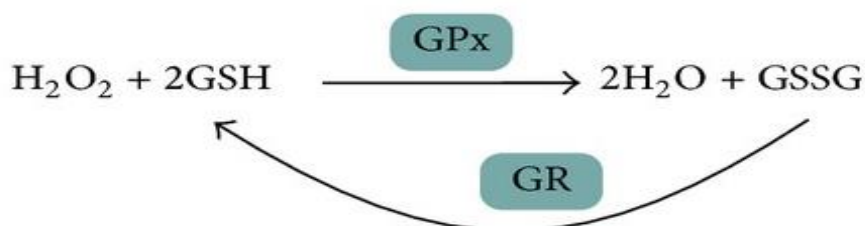


Εικόνα 8: Αντιοξειδωτική Δράση CAT (35).

ένζυμο και περιέχει μία ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας. Το ένζυμο αυτό είναι παρόν σε διάφορα κύτταρα, αλλά εντοπίζεται, κυρίως στα υπεροξεισωμάτια. Η αντίδραση που καταλύει η καταλάση γίνεται σε δύο φάσεις. Αρχικά, το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδώνει το Fe στην προσθετική ομάδα της αίμης, σχηματίζοντας μία ενδιάμεση ένωση, ενώ στη συνέχεια το υπεροξείδιο του υδρογόνου ανάγει την ενδιάμεση ένωση στην αρχική της κατάσταση. Επιπλέον δεσμεύεται με NADPH, το οποίο αποτρέπει την απενεργοποίηση του ενζύμου, μέσω οξείδωσης (10,32,34).

Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPX)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι μία οικογένεια ενζύμων, που καταλύουν αντιδράσεις αναγωγής, μετατρέποντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οργανικά υπεροξείδια σε νερό και αλκοόλες, αντίστοιχα. Είναι τετραμερή ένζυμο, που χρησιμοποιούν μικρού μοριακού βάρους θειόλες ως δότες ηλεκτρονίων, με πιο συχνό την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Στις αντιδράσεις αυτές, η ανηγμένη γλουταθειόνη μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή GSSG. Η αναγωγή της GSSG, ξανά προς GSH, ώστε να χρησιμοποιηθεί ξανά από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης πραγματοποιείται με το ένζυμο **αναγωγάση της γλουταθειόνης**, κατά την οποία δότης αναγωγικής δύναμης είναι το NADPH (17). Συναντάται σε 5 ισομορφές (GPX1-GPX5), οι οποίες έχουν αντιοξειδωτική δράση, αλλά διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση στο υπόστρωμα και την κυτταρική τοπολογία. Οι GPX1-GPX4 είναι σεληνοεξαρτώμενες, καθώς περιέχουν σεληνοκυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο, σε αντίθεση με την GPX5. Η GPX1 δρα στο κυττοσόλιο, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια και έχει ως υπόστρωμα υπεροξείδιο του υδρογόνου και λιποειδικά υπεροξείδια. Η GPX2 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα επιθηλιακών κυττάρων της γαστρεντερικής οδού και ανάγει υπεροξείδια που προέρχονται από τη



Εικόνα 9:Αντιοξειδωτική Δράση GPx (35).

διατροφή. Η GPX3 δρα στην εξωκυττάρια μήτρα, ενώ η GPX4 φαίνεται να συνδέεται με φωσφολιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών και έχει ως υπόστρωμα εστεροποιημένα λιποειδή (36,37). Τέλος, η GPX5 φαίνεται να σχετίζεται με το αναπαραγωγικό σύστημα του άνδρα και ρυθμίζεται μέσω των ανδρογόνων. Οι GPXs έχουν το ίδιο υπόστρωμα με την καταλάση, δηλαδή μετατρέπουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό. Ωστόσο, το εν λόγω ένζυμο έχει μεγαλύτερη δραστικότητα σε υψηλή συγκέντρωση ROS, σε σχέση με την καταλάση, η οποία έχει καλύτερη δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (10).

Περοξυρεδοξίνες (PRDXs)

Οι περοξυρεδοξίνες είναι μία οικογένεια 6 ισοενζύμων, βασική λειτουργία των οποίων είναι η προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να εξουδετερώνουν υπεροξυνιτρικό οξύ, οργανικά υδροξυπεροξειδία και υπεροξειδίο του υδρογόνου, μετατρέποντάς τα σε αλκοόλες και νερό, αντίστοιχα (38). Θεωρούνται από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά καθώς είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της ισορροπίας στη συγκέντρωση του H_2O_2 . Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες οι περοξυρεδοξίνες ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor 2), ο οποίος ενεργοποιείται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των ROS και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, που σχετίζονται με την προστασία του κυττάρου. Οι 6 ισομορφές των PRXs διαθέτουν μία θειολική ομάδα με ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, που ονομάζεται «υπεροξειδικό» (C_p) σημείο και είναι το σημείο οξείδωσης που βρίσκεται στο αμινοτελικό τους άκρο. Ανάλογα με την παρουσία ενός δεύτερου κατάλοιπου κυστεΐνης («resolved» (C_R)) χωρίζονται σε τρεις ομάδες, οι οποίες είναι οι 2Cys Prx (Prx1- Prx 4), η μη τυπική 1Cys Prx (Prx5) και η 1Cys Prx (Prx6). Οι Prx1-Prx4, οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα, έχουν δύο υπομονάδες και διαθέτουν άλλο ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο της κάθε υπομονάδας (C_R) (38). Συγκεκριμένα, η Prx3 βρίσκεται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια και παίζει βασικό ρόλο στην ομοιοστάση τους (16). Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου τα υπεροξειδία οξειδώνουν τα C_p-SH των Prx1-Prx4, προς σχηματισμό σουλφενικού οξέος (C_p-SOH). Τα οξειδωμένα σουλφενικά κατάλοιπα C_p-SOH αντιδρούν με τα αντίστοιχα C_R-SH και σχηματίζουν δισουλφίδια, τα οποία στη συνέχεια ανάγονται ξανά από έναν δότη ηλεκτρονίων, με το τέλος του

καταλυτικού κύκλου (38). Σε περίσσεια υπεροξειδίου του υδρογόνου, το σουλφενικό οξύ (ή θειενικό οξύ) μπορεί να μετατραπεί σε σουλφινικό οξύ (Cys-SO₂), το οποίο έχει χάσει την υπεροξειδική του δράση και είτε θα αναχθεί ξανά στην ενεργή μορφή του ενζύμου με την σουλφιρεδοξίνη (Srx), (16), είτε θα οξειδωθεί περαιτέρω σε σουλφονικό οξύ, το οποίο αποτελεί μη αντιστρεπτή τροποποίηση της πρωτεΐνης, οδηγώντας την, τελικά, σε ολική αποικοδόμηση (39).

Σύστημα Θειορεδοξίνης (TRXs)

Οι θειορεδοξίνες αποτελούν μία άλλη οικογένεια ενζύμων με δομή παρόμοια με τις περοξυρεδοξίνες. Το αντιοξειδωτικό σύστημα θειορεδοξίνης αποτελείται από θειορεδοξίνη, αναγωγή θειορεδοξίνης και NADPH και έχει προστατευτική δράση στο DNA, συμβάλλει στην επιδιόρθωση πρωτεϊνών, ενώ έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση (37). Η θειορεδοξίνη είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 12 kDa (39) και εντοπίζεται σε διάφορα μέρη του κυττάρου, όπως το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική διαδικασία δημιουργώντας ενδοπρωτεϊνικούς ή διαπρωτεϊνικούς δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως στην περίπτωση της περοξυρεδοξίνης, όπου λειτουργεί ως ένας δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή του αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O. Οι TRXs εντοπίζονται σε δύο μορφές, την Trx1 που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και την Trx2 που εκφράζεται στα μιτοχόνδρια (31). Η αναγωγή της θειορεδοξίνης είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο, μοριακού βάρους 50-60 kDa (39) και διαθέτει θέσεις σύνδεσης για την ομάδα FAD και το NADPH. Στην ανηγμένη της μορφή περιλαμβάνει 2 θειικές ομάδες -SH, οι οποίες όταν έρθουν σε επαφή με ένα οξειδωμένο υπόστρωμα, το ανάγουν και μετατρέπονται σε δισουλφίδιο (-S-S-). Στη συνέχεια η οξειδωμένη Trx αναγεννάται στην αρχική της μορφή χρησιμοποιώντας σαν αναγωγικό ισοδύναμο το NADPH (32,37).

Σύστημα Γλουταρεδοξίνης

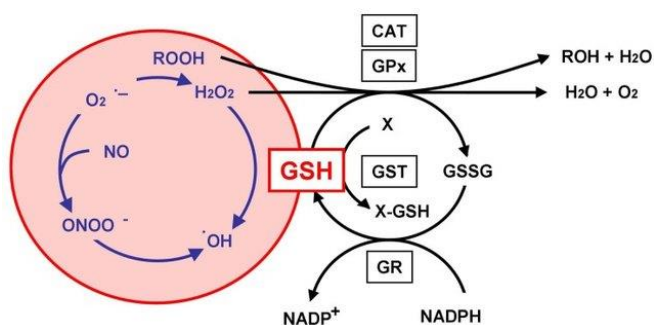
Το αντιοξειδωτικό σύστημα της γλουταρεδοξίνης έχει παρόμοια δράση με το σύστημα θειορεδοξίνης. Η γλουταρεδοξίνη, γνωστή και ως θειολοτρανσφεράση, είναι μία μικρή πρωτεΐνη, η οποία ανάγεται από την γλουταθειόνη. Η Grx έχει την ικανότητα να ανάγει πρωτεϊνικούς δισουλφιδικούς δεσμούς και ιδιαίτερα μεταξύ

γλουταθειόνης και άλλων πρωτεϊνών και να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH σε δισουλφιδικά υποστρώματα. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε συνδυασμό με τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης και της αναγωγής της γλουταθειόνης. Τα συστήματα της Trx και Grx, δρουν συνεργιστικά και έχει βρεθεί ότι επιτελούν πολύ σημαντικές λειτουργίες για τα κύτταρα, καθώς ρυθμίζουν τη σύνθεση του DNA μέσω της αναγωγής ριβονουκλεοτιδίων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, φαίνεται να ασκούν κυτταροπροστατευτική δράση, αναστέλλοντας την κυτταρική απόπτωση, καθώς τόσο η Trx1, όσο και η Grx1, παρεμποδίζουν την δράση της ASK1, μίας κινάσης που διεγείρει την κυτταρική απόπτωση (40,41). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς συμμετέχουν στην ρύθμιση μονοπατιών σηματοδότησης, ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, όπως του NF-κB και των κινασών MAP και JNK (34).

1.3.2. Ενδογενή Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι από τα πιο σημαντικά υδρόφιλα αντιοξειδωτικά βιομόρια του οργανισμού και είναι κύριος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας. Είναι ένα τριπεπτίδιο, που αποτελείται από L-γλουταμίνη, L-γλυκίνη και L-κυστεΐνη (31) και βρίσκεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις 5-10 mM, στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα, και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Βιοσυντίθεται στο κυτταρόπλασμα, κυρίως ηπατοκυττάρων (42), με 2 διαδοχικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση του γ-γλουτάμυλ-κυστεΐνης και συνθετάσης της γλουταθειόνης (3). Εντοπίζεται κυρίως είτε στην ανοιγμένη της μορφή GSH, είτε στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG)(42). Στην ανοιγμένη της μορφή, η -SH της κυστεΐνης μεταφέρει αναγωγική δύναμη και με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου μετατρέπεται σε

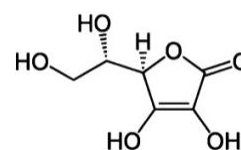


Εικόνα 10: Αντιοξειδωτική δράση του συστήματος Γλουταθειόνης (43).

δραστική μορφή γλουταθειόνης, η οποία αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο δραστικής γλουταθειόνης, για να μετατραπεί τελικά στην οξειδωμένη της μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από ένα δισουλφιδικό δεσμό (GS-SG). Η GSSG μπορεί να αναχθεί ξανά με τη δράση του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης, όπου ως δότης αναγωγικής δύναμης χρησιμοποιείται το NADPH (3,43). Σε φυσιολογικές συνθήκες, απουσία οξειδωτικού στρες, βρίσκεται στην ανηγμένη της μορφή σε ποσοστό 98%. Μάλιστα, ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί δείκτη της οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού (34). Πέραν από τον σημαντικό της ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, η γλουταθειόνη επιτελεί και πολλές σημαντικές λειτουργίες. Συμμετέχει στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών, προσταγλαδινών και λευκοτριενίων (42), αποτελεί μέσο μεταφοράς αμινοξέων μέσα στο κύτταρο, συμμετέχει στην βιοσύνθεση δεοξυριβονουκλεοτιδίων και συμβάλλει στην απορρόφηση ορισμένων μικροθρεπτικών συστατικών από το έντερο, κυρίως σιδήρου και σεληνίου. Ωστόσο, ο σημαντικότερος ρόλος της γλουταθειόνης είναι η δράση της ως αντιοξειδωτικό. Πιο αναλυτικά, προστατεύει τα κύτταρα από ελεύθερες ρίζες, όπως ρίζα υδροξυλίου και μονήρες οξυγόνο, τις οποίες εξουδετερώνει με μη-ενζυμική αναγωγή της GSH, συμμετέχει και στην απομάκρυνση υδροϋπεροξειδίων, υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπερόξυνιτρώδους ανιόντος (1). Επιπλέον, λειτουργεί ως συνένζυμο στη δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης GPx και στο αντιοξειδωτικό σύστημα γλουταρεδοξίνης και μπορεί να ανάγει και άλλα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως τις βιταμίνες C και E, μετατρέποντάς τες έτσι στην ενεργή τους μορφή (32,34). Τέλος, ασκεί προστατευτική δράση σχετικά με την κυτταρική απόπτωση και συμμετέχει στη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κΒ (34,42).

Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

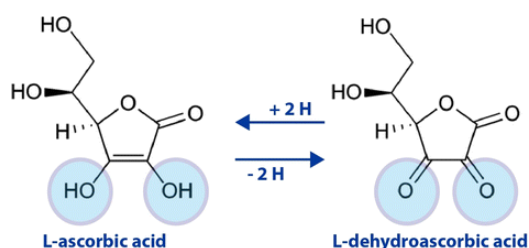
Το ασκορβικό οξύ είναι ένα μικρό υδατοδιαλυτό μόριο, και συγκεκριμένα μία λακτόνη με 6 άτομα άνθρακα. Μπορεί να βιοσυντίθεται ενδογενώς στα περισσότερα θηλαστικά με πρόδρομο μόριο τη γλυκόζη μέσω του ενζύμου οξειδάση της γουλονολακτόνης. Ωστόσο, το ένζυμο αυτό απουσιάζει στον άνθρωπο και έτσι καθίσταται απαραίτητη η πρόσληψή του ασκορβικού οξέος, ή βιταμίνης C εξωγενώς



Εικόνα 11: Δομή ασκορβικού οξέος. (34).

μέσω της τροφής (44). Η βιταμίνη C είναι ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο, προστατεύοντας από την οξείδωση λιποπρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες και συμβάλλει στην σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, των πνευμόνων και των ματιών (4). Ως αντιοξειδωτικό λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας, δηλαδή χρησιμεύει ως δότης ηλεκτρονίων και συγκεκριμένα 2 ηλεκτρονίων από το διπλό δεσμό μεταξύ του άνθρακα 2 και 3. Με τη μεταφορά των δύο ηλεκτρονίων μπορεί να ανάγει και να εξουδετερώνει, σε υδατική φάση, οξειδωτικά μόρια, όπως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου ($\cdot\text{O}_2^-$, $^1\text{O}_2$, $\text{HO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$) αλλά και άλλες RONS, όπως H_2O_2 , HOCl και νιτροζαμίνες και μετατρέπεται σε δεϋδροασκορβικό οξύ (37,44). Πριν ολοκληρωθεί η μεταφορά και των δύο ηλεκτρονίων σχηματίζει ελεύθερη ρίζα, το ημι-ϋδρο-ασκορβικό οξύ. Παρόλο, που στην διαδικασία εξουδετέρωσης RONS, το ίδιο το ασκορβικό οξύ μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα, το μόριο αυτό είναι σχετικά σταθερό και δεν συμμετέχει ιδιαίτερα σε αντιδράσεις, καθώς έχει σχετικά μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (10^{-5} s). Ένα μέρος του δεϋδροασκορβικού οξέος μπορεί να μετατραπεί ξανά σε βιταμίνη C, ενώ το υπόλοιπο υδρολύεται μη αντιστρεπτά προς 2,3-δικετογουλονικό οξύ και στη συνέχεια σχηματίζει ξυλόζη, οξαλοξικό οξύ κ.α (44). Αν και ως υδρόφιλο μόριο, δεν μπορεί να ανιχνεύει άμεσα λιπόφιλες RONS, μπορεί να δρα συνεργιστικά με την α -τοκοφερόλη ή βιταμίνη E, απομακρύνοντας έτσι τα μόρια αυτά. Επιπλέον, αντιδρά με την οξειδωμένη ελεύθερη ρίζα της α -τοκοφερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέποντάς την ξανά στην ενεργή της μορφή (40), ενώ προάγει και την αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη, καθώς επαναφέρει την GSSG στην GSH μορφή της (32,34).

Το ασκορβικό οξύ λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων σε 8 ένζυμα, μέσω των οποίων επιτελεί πολλές σημαντικές λειτουργίες για τον οργανισμό. Συμβάλλει στον σχηματισμό του κολλαγόνου, όπου προσθέτει έμμεσα ένα υδροξύλιο στην προλίνη



Εικόνα 12: Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ασκορβικού οξέος (32).

και στη λυσίνη του κολλαγόνου, αυξάνοντας έτσι την σταθερότητα του μορίου, καθώς και στον σχηματισμό της καρνιτίνης, μόριο απαραίτητο για την β -οξείδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, συμμετέχει στον

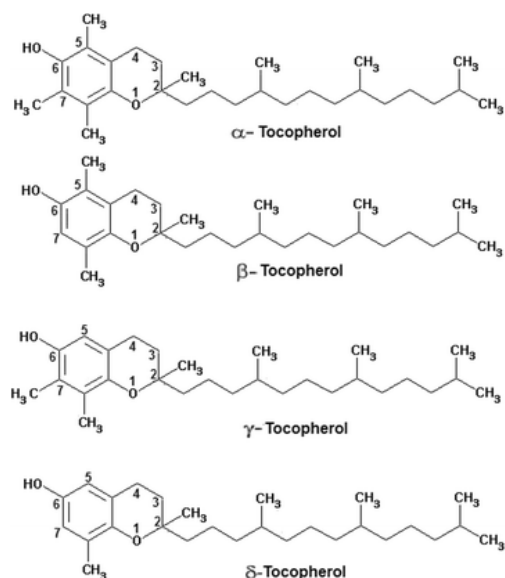
καταβολισμό της τυροσίνης και στο σχηματισμό νορεπινεφρίνης και στη σύνθεση κατεχολαμινών και χολικών οξέων, ενώ μπορεί να αναστέλλει την οξείδωση της LDL και συμμετέχει στην δράση της συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου στο ενδοθήλιο, συμβάλλοντας στην καλή λειτουργία των αγγείων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μπορεί να λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων σε μέταλλα μετάπτωσης, όπως τον χαλκό και το σίδηρο και συνεπώς μπορεί να ασκεί προ-οξειδωτική δράση και να συμβάλλει εν μέρει στο σχηματισμό RONS (44).

Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε ή αλλιώς τοκοφερόλη, είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, που λειτουργεί ως ισχυρό αντιοξειδωτικό του κυττάρου και κυρίως των κυτταρικών μεμβρανών. Εντοπίζεται κυρίως στο υδρόφοβο μέρος, εσωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης, όπου αποτελεί τον κύριο αντιοξειδωτικό μηχανισμό, προστατεύοντας τον τραυματισμό, λόγω του οξειδωτικού στρες (34).

Η βιταμίνη Ε έχει 8 ισομορφές, τις α-, β-, γ-, και δ- τοκοφερόλη, που περιέχουν μία κορεσμένη πλευρική αλυσίδα και τις α-, β-, γ- και δ- τοκοτριενόλη, με ακόρεστη πλευρική αλυσίδα. Παρόλο που και οι 8 ισομορφές της βιταμίνης προσλαμβάνονται από τη διατροφή και έχουν κάποια αντιοξειδωτική δράση, μόνο η α-τοκοφερόλη συσσωρεύεται στις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ οι υπόλοιπες ισομορφές αντιμετωπίζονται ως ξеноβιοτικά και αποβάλλονται από τον οργανισμό. Η γ-τοκοφερόλη είναι μία άλλη ισομορφή που εντοπίζεται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στην διατροφή του ανθρώπου, ωστόσο δεν φτάνει σε υψηλές συγκεντρώσεις στον οργανισμό, καθώς μεταβολίζεται αποτελεσματικά από τα ένζυμα του κυττοχρώματος P450 (μικρότερες του 10% της α- τοκοφερόλης στο πλάσμα και ακόμα λιγότερο σε ιστούς) (45).

Όσον αφορά στην αντιοξειδωτική της δράση, η βιταμίνη Ε προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τις λιπορωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών, κατά την λιποξειδική υπεροξείδωση, καθώς μπορεί να μεταφέρει το φαινολικό υδρογόνο σε ρίζες υπεροξειδίου αδρανοποιώντας τις και αναστέλλοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των RONS. Παρόμοια με την βιταμίνη C, η βιταμίνη Ε σχηματίζει μία ελεύθερη ρίζα τοκοφερόλης (tocopheroxyl radicals), η οποία όμως δεν έχει υψηλή



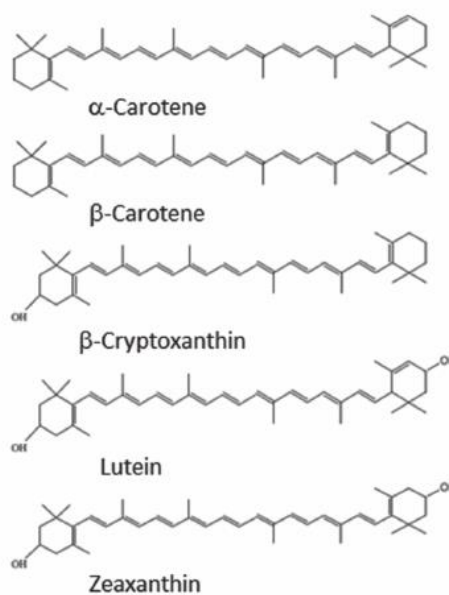
Εικόνα 13: Χημικές δομές τοκοφερόλης (32).

δραστικότητα και μπορεί να αναγεννάται μέσω του ασκορβικού οξέος, το οποίο λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων, όπως και από άλλα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, του ουρικού οξέος (32) και το συνένζυμο Q (37). Εναλλακτικά, δύο ρίζες τοκοφερόλης μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σταθερό διμερές, ή να υποστεί περαιτέρω οξείδωση προς σχηματισμό κινόνης τοκοφερόλης (32). Παρόλο που, η γ-τοκοφερόλη είναι λιγότερο αποτελεσματική στην ανίχνευση και εκκαθάριση ROS από την α-τοκοφερόλη, φαίνεται να ανιχνεύει αποτελεσματικά δραστικές μορφές αζώτου, λόγω της διαφορετικής δομής της. Εκτός από το ρόλο της στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από το οξειδωτικό στρες, φαίνεται ότι αυξάνει την σταθερότητά τους (45).

Επιπλέον, η βιταμίνη E μεσολαβεί στην μεταγωγή σήματος και στην έκφραση γονιδίων. Μπορεί να συνδέεται σε ένζυμα, που σχετίζονται με την μεταγωγή σήματος, αλλάζοντας την δραστηριότητά τους, να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου αλλά και να μεταβάλλει την ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Συνεπώς, η βιταμίνη E, εκτός από ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό, φαίνεται να εμπλέκεται, μέσω της ρύθμισης ενζύμων και σε πολλές άλλες λειτουργίες του οργανισμού, όπως την φλεγμονώδη απόκριση, την ανοσία, τον πολλαπλασιασμό κυττάρων και την κυτταρική διαφοροποίηση, επιβίωση και απόπτωση (46). Έχει βρεθεί ότι διεγείρει την απόπτωση κυτταρικών κυττάρων, καθιστώντας την ένα ευεργετικό ιχνοστοιχείο για τη θεραπεία του καρκίνου (34).

Καροτενοειδή – Βιταμίνη A

Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτές αντιοξειδωτικές ενώσεις και αποτελούν πρόδρομα μόρια για τον σχηματισμό της βιταμίνης A. Αποτελούνται από 8 μονάδες ισοπρενίου και περιλαμβάνουν διάφορες ενώσεις, από τις οποίες οι πιο σημαντικές για τον άνθρωπο είναι τα το α- και β- καροτένιο, το λυκοπένιο, η λουτεΐνη, η



Εικόνα 14: Χημική δομή καροτενοειδών (32).

κρυπτοξανθίνη και η ζεαξανθίνη. Αν και πάνω από 50 είδη καροτενοειδών μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομα μόρια για την βιταμίνη Α, τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη. Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτές ουσίες φυτικής προέλευσης και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς μπορούν να εξουδετερώνουν υπεροξειδιακές ρίζες ($\text{ROO}\cdot$), ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), με δράση παρόμοια με αυτήν της α-τοκοφερόλης (32).

Το β-καροτένιο, ένας από τους κύριους εκπροσώπους των καροτενοειδών στον άνθρωπο, είναι το σημαντικότερο πρόδρομο μόριο της βιταμίνης Α και θεωρείται το καλύτερο αντιοξειδωτικό για την απομάκρυνση του οξυγόνου απλής κατάστασης (47,48), προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από βλάβες μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία (40). Το α-καροτένιο είναι σημαντικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες (32). Ωστόσο και άλλα καροτενοειδή που δεν αποτελούν πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α, όπως το λυκοπένιο και η λουτεΐνη, έχουν αντίστοιχες, αν όχι και μεγαλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το λυκοπένιο φαίνεται να υπερτερεί σε σχέση στην απομάκρυνση υπεροξειδιακών ριζών σε σχέση και με το β-καροτένιο, αλλά και την α-τοκοφερόλη, ενώ η συγκέντρωσή του στο πλάσμα έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (40). Τα καροτενοειδή ασκούν αντιοξειδωτική δράση κυρίως σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, ενώ ίσως δρουν ως προ-οξειδωτικά σε υψηλότερες πιέσεις (34) και εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες με μεταφορά ηλεκτρονίων, με απόσπαση υδρογόνου είτε με προσθήκη ρίζας στο καροτενοειδές (40). Επιπλέον, πολλά καροτενοειδή αναστέλλουν την έκφραση της iNOS και της σύνθεση NO σε ενεργοποιημένα μακροφάγα με αποτέλεσμα να αποτρέπουν κυτταροτοξικότητα λόγω του αυξημένου οξειδωτικού στρες (1). Η βιταμίνη Α αναφέρεται σε μία ομάδα μορίων, τα ρετινοειδή, που περιλαμβάνουν μόρια όπως ρετινόλη, ρετινάλη,

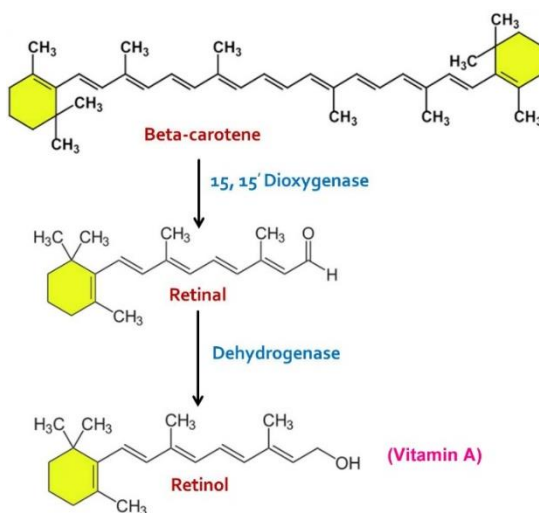
ρετινοϊκό οξύ, ρετινολικός εστέρας, κ.α.).

Η βιταμίνη Α μπορεί να αντιδρά με υπεροξειδιακές ρίζες, πριν προλάβουν να αντιδράσουν με λιποειδή (37). Η βιταμίνη αυτή είναι απαραίτητη για την όραση, όπως επίσης και για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Τα καροτενοειδή ή προβιταμίνη Α απορροφώνται από το εντερικό επιθήλιο και σχηματίζουν τα ρετινοειδή, τα οποία μαζί με τα

καροτενοειδή ενσωματώνονται, μέσω των χυλομικρών, στην κυκλοφορία. Τόσο τα καροτενοειδή, όσο και το ρετινοϊκό οξύ μπορούν να ρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως να αναστέλλουν την, λόγω οξειδωτικού στρες, ενεργοποίηση του NF-κΒ και την παραγωγή IL-6 και TNF-α. Επιπλέον, μεσολαβούν στην κυτταρική απόπτωση, μέσω των υποδοχέων ρετινοϊκού οξέος, που βρίσκεται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων (34). Τέλος, φαίνεται να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL.

Ουβικινόνη-Συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q, ή ουβικινόνη είναι μια λιπόφιλη βενζοκινόνη με μία ισοπρενοειδή πλευρική ομάδα. Βιοσυντίθεται ενδογενώς σε όλους τους ιστούς, από το μεβαλονικό οξύ με φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη. Αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια, αφού είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα σύμπλοκα I, II και III. Ως συνένζυμο Q ή ουβικινόλη αναφέρεται η ανηγμένη μορφή της ουβικίνης, η οποία συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις διαφόρων ενζύμων, όπως αφυδρογονάσεις, κυτοχρώματα και μη αιμικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, μπορεί να ανάγει την οξειδωμένη μορφή της α-τοκοφερόλης και της βιταμίνης C και να αντιδρά με ρίζες υπεροξειδίου (49). Έχει προστατευτική δράση στις κυτταρικές μεμβράνες και αναστέλλει την οξείδωση της LDL. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι ταυτόχρονα με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, το συνένζυμο Q αποτελεί και προ-οξειδωτικό μόριο. Συγκεκριμένα, κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, η ουβικινόνη

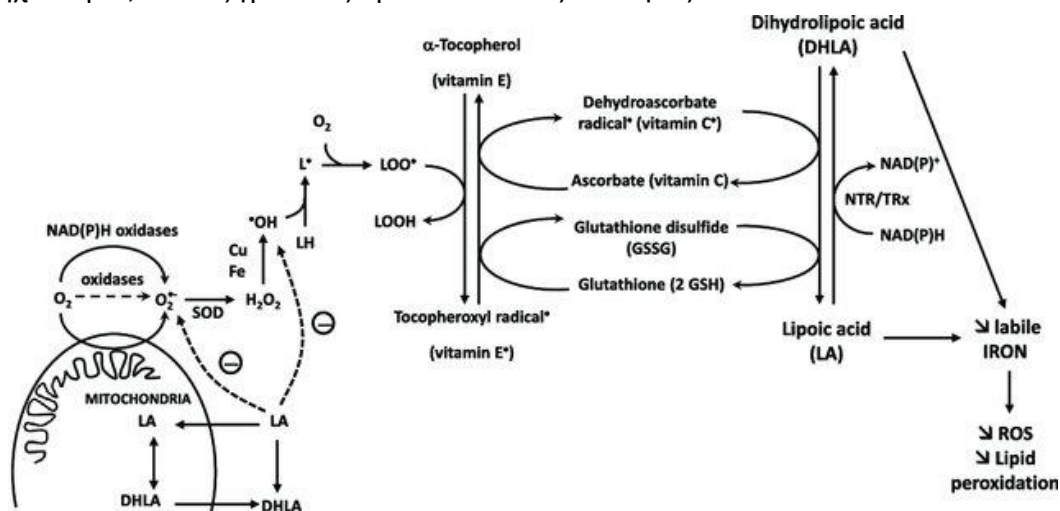


Εικόνα 15: Μετατροπή β-καροτενίου σε βιταμίνη Α (48).

μετατρέπεται η ίδια σε ελεύθερη ρίζα ημικινόνης, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται ηλεκτρόνια απευθείας στο μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας υπεροξειδία (50).

Α-Λιποϊκό Οξύ

Το α- λιποϊκό οξύ (ALA) (1,2-διθειολανο-3-πεντανοϊκό οξύ) αποτελεί μία θειολική ένωση, η οποία πιθανόν έχει άμεσες και έμμεσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τόσο η οξειδωμένη του μορφή (δισουλφίδιο), όσο και η ανηγμένη του μορφή, μία διθειόλη που ονομάζεται διϋδρολιποϊκό οξύ (DHLA), έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, με τη δεύτερη να υπερτερεί. Το ALA είναι και λιποδιαλυτό και υδατοδιαλυτό μόριο, σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα αντιοξειδωτικά και κατανέμεται στις κυτταρικές μεμβράνες, στο κυττοσόλιο και στην εξωκυττάρια μήτρα, ενώ μεταφέρεται μέσω διαφόρων ενζύμων, όπως τον μεταφορές λιπαρών οξέων μέσης αλύσου. Η αναγωγή του ALA προς DHLA, πραγματοποιείται μέσω ενζύμων εξαρτώμενων από το NADH ή το NADPH, όπως την αναγωγή της θειορεδοξίνης. Το LA έχει μεγάλη χημική δραστικότητα, η οποία έχει αποδοθεί κυρίως στον διθειολανικό δακτύλιο που διαθέτει. Τα ALA/DHLA μπορούν να ανιχνεύουν και να αντιδρούν εύκολα με RONS, όπως ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου, υποχλωριώδες οξύ και μονήρες οξυγόνο. Η πρόσληψη λιποϊκού οξέος, μέσω της τροφής είναι πολύ μικρή, καθώς υπάρχει σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε κάποιους ζωικούς ιστούς, όπως τους νεφρούς, την καρδιά και το ήπαρ και κάποια σε λαχανικά, όπως το σπανάκι, το μπρόκολο και οι τομάτες. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, που εξηγούν τις προστατευτικές ιδιότητες του ALA και DHLA.



Εικόνα 16:Αναγέννηση αντιοξειδωτικών μορίων, μέσω του λιποϊκού οξέος (51)

Αρχικά, το ALA έχει την ικανότητα να αποσπά ηλεκτρόνια από μέταλλα μετάπτωσης, όπως τον σίδηρο, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συμμετάσχει στην αντίδραση Fenton, βασική κυτταρική πηγή ROS. Μάλιστα, έχει προταθεί ότι η DHLA μπορεί να αναστέλλει την οξειδοαναγωγική ικανότητα των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης έναντι μικρών μορίων και βιολογικών συστημάτων, χωρίς όμως να επηρεάζει τη δραστικότητα ενζύμων, που εξαρτώνται από αυτά. Επιπλέον, συμμετέχει στην αναγέννηση της γλουταθειόνης και των βιταμινών C και E, αυξάνοντας έτσι την συγκέντρωσή τους στο κυτταρόπλασμα (32,51).

Ουρικό Οξύ (UA)

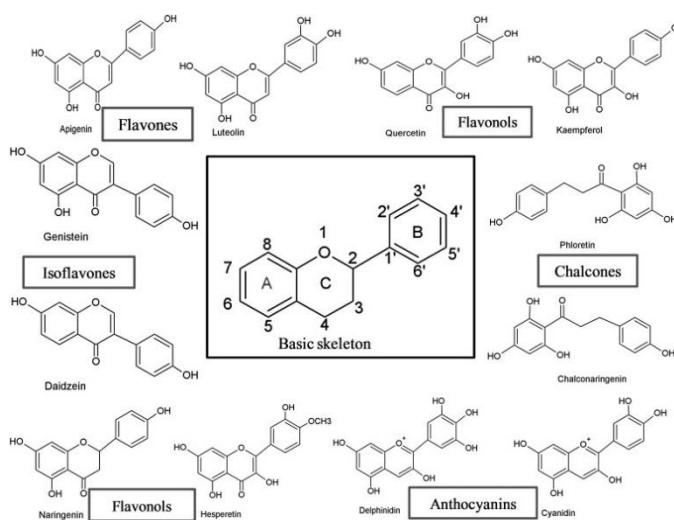
Το ουρικό οξύ (UA) αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών μέσω του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (3). Είναι ένα λιπόφιλο μόριο μικρού μοριακού βάρους, το οποίο στον άνθρωπο απεκκρίνεται με τα ούρα. Επιπλέον, θεωρείται και ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό στους μύες και στο πλάσμα, το οποίο ανιχνεύει τα 2/3 των RONS στον ορό του πλάσματος. Μπορεί να αντιδρά και να εξουδετερώνει διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, όπως $\text{ROO}^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, ONOO^- , NO_2 , HOCl και O_3 , ενώ το ίδιο μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα ουρικού ($^\bullet\text{UA}$). Η ρίζα αυτή, αν και δεν έχει μεγάλη δραστικότητα, δεν είναι απόλυτα ανενεργή και μπορεί να απενεργοποιεί πρωτεΐνες και ένζυμα. Ωστόσο, η δράση της αναστέλλεται από το ασκορβικό οξύ, το οποίο την μετατρέπει ξανά σε ουρικό οξύ (10,40,42). Ωστόσο, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αντιοξειδωτική του ικανότητα στην λιποειδική υπεροξείδωση υφίσταται μόνο παρουσία της βιταμίνης C (40). Το UA έχει, επίσης, την ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερα ιόντα σιδήρου αναστέλλοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss, ενώ σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου, αποτρέποντας την οξείδωση λιπιδίων (40) και βιταμίνης C, προστατεύοντας έτσι την βιταμίνη C και κατ' επέκταση την βιταμίνη E (10). Τέλος, προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και στο DNA, ενώ προστατεύει και τους μύες από το οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση (10). Τα επίπεδα του ουρικού οξέος έχουν συσχετιστεί με νευρολογικές διαταραχές, όπως τη νόσο Πάρκινσον και την άνοια και πιθανόν έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες C και στον εγκέφαλο, δρώντας συνεργιστικά με τη βιταμίνη C, έχοντας ευεργετικό ρόλο σε τέτοια νοσήματα (52). Ωστόσο, το

ουρικό οξύ πιθανόν δρα και ως προ-οξειδωτικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συσσώρευση ουρικού οξέος στο πλάσμα, μπορεί να οδηγήσει στην εναπόθεση κρυστάλλων σε αρθρώσεις και στα οστά, προκαλώντας πόνο και φλεγμονή (ουρική αρθρίτιδα) (5). Επιπλέον, η υπερουριχαιμία, δηλαδή η αυξημένη συγκέντρωση ουρικού στον πλάσμα έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, με μεταβολικό σύνδρομο και νεφρολογικά νοσήματα (53), ενώ αυξημένη συγκέντρωση στα ούρα, αποτελεί πιθανό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Αντίθετα, μελέτες υποστηρίζουν ότι η αντιοξειδωτική του δράση υπερισχύει αυτή της βιταμίνης C σε υγιή πληθυσμό (42).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικά συστατικά, που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά και χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Όσον αφορά στη χημική τους δομή, τα φλαβονοειδή αποτελούνται από ένα σκελετό 15 ατόμων άνθρακα, που σχηματίζει δύο βενζοϊκούς δακτυλίους, A και B, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου, C (54). Μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους και πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με τον άνθρακα που συνδέει τους δακτυλίους B και C και ανάλογα με τον βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του C δακτυλίου (55,56). Οι διάφορες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη), φλαβανόνες (π.χ. εσπεριδίνη), φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόλες(κατεχίνες), και ανθοκυανίνες.

Η χημική τους δομή εκτός από μέσο κατάταξης είναι αυτή που καθορίζει και τις βιολογικές ιδιότητες των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες καθορίζονται από την διαμόρφωση, την υποκατάσταση και τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου, οι



Εικόνα 17: Χημικές δομές φλαβονοειδών (56).

οποίοι θα γίνουν δότες υδρογόνου (57). Ο πιο καθοριστικός παράγοντας είναι η διαμόρφωση των υδροξυλίων στον δακτύλιο Β. Ο ρόλος τους ως αντιοξειδωτικά βασίζεται στην ικανότητά τους να ανιχνεύουν και να απομακρύνουν RONS και συγκεκριμένα, ρίζες υδροξυλίου, ανιόν υπεροξειδίου και υπερόξυνιτρώδες ανιόν (35). Επιπλέον, αναστέλλουν τη δραστικότητα ενζύμων, που συμμετέχουν στην δημιουργία ROS, όπως η μοκροσωμιακή μονοξυγονάση και η NADPH-οξειδάση (54), ενώ ταυτόχρονα μπορούν να δεσμεύουν ελεύθερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (37,54). Ωστόσο, υπό κάποιες συνθήκες μπορεί να λειτουργούν και ως προ-οξειδωτικά, κάτι το οποίο εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλομάδων και λαβούν μέρος στην κυτταρική σηματοδότηση (32).

1.3.3. Πρωτεΐνες δέσμησης μετάλλων

Μεταλλοθειονίνες

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ενδοκυττάριας, μικρού μοριακού βάρους, πρωτεΐνες δέσμησης μετάλλων. Αποτελούνται από 61-68 αμινοξέα, το 30% των οποίων είναι κυστεΐνη. Η παρουσία καταλοίπων κυστεΐνης τους δίνει τη δυνατότητα να συνδέονται με βαρέα μέταλλα, τοξικά για τον οργανισμό. Στα θηλαστικά συνδέονται με ψευδάργυρο, ο οποίος, όμως, μπορεί εύκολα να αντικατασταθεί από χαλκό ή κάδμιο, όταν αυτά βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, μπορούν να δεσμεύουν ROS, όπως ανιόν υπεροξειδίου και ρίζα υδροξυλίου. Τέλος, είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της ομοιοστασίας ψευδαργύρου, ο οποίος προστατεύει θειολικές ομάδες πρωτεϊνών, καθώς συνδέεται με αυτές, ενώ αναστέλλει έμμεσα την υπεροξειδωση των λιπιδίων, καθώς ανταγωνίζεται θέσεις σύνδεσης ιόντων μετάλλων μετάπτωσης, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την δημιουργία ROS (42,58).

Φερριτίνη

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της ζωής και επιτελεί πολύ σημαντικές λειτουργίες, όπως την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, είναι απαραίτητο συστατικό για τον σχηματισμό της αίμης, συμπαράγοντας σε πολλές

ενζυμικές αντιδράσεις, όπως οξειδασών και κυτοχρωμάτων και συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα. Ωστόσο, ο ελεύθερος σίδηρος είναι τοξικός για τα κύτταρα, καθώς μπορεί να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, μέσω της αντίδρασης Fenton και να είναι τοξικός για τα κύτταρα. Για το λόγο αυτό στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται συνδεδεμένος με πρωτεΐνες, κυρίως στα ερυθροκύτταρα με αιμοσφαιρίνη και στα ηπατοκύτταρα (42).

Η φερριτίνη είναι μία πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της ισορροπίας της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης σιδήρου. Ο ρόλος της ως αντιοξειδωτικό έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να δεσμεύει μέχρι και 4500 άτομα σιδήρου, όταν αυτά δεν χρειάζονται άμεσα από το κύτταρο (59).

Αποτελείται από 24 υπομονάδες δύο τύπων τις H (high) και τις L(light). Η αλυσίδα H θεωρείται υπεύθυνη για τη γρήγορη οξείδωση του σιδήρου προς τρισθενή και την εναπόθεση του στον πυρήνα, ενώ η L ενσωματώνει τον σίδηρο, όταν φτάσει σε υψηλά επίπεδα στο κύτταρο. Η αυξημένη έκφραση της H υπομονάδας στον άνθρωπο προσφέρει μεγάλη προστασία από το οξειδωτικό στρες, καθώς λειτουργεί κυτταροπροστατευτικά σε αυξημένες συγκεντρώσεις ROS. Βασιζόμενοι λοιπόν στην συντονισμένη ρύθμιση της οξείδωσης και της αποθήκευσης του σιδήρου, ο λόγος H:L, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στη ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου, ανάλογα με τον ιστό (60).

Τρανσφερίνη

Η τρανσφερίνη είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του σιδήρου, από το έντερο, όπου γίνεται η απορρόφηση, στον μυελό των οστών για την παραγωγή ερυθροκυττάρων. Μπορεί να μεταφέρει έως και 25 mg σιδήρου την ημέρα, δεσμεύοντας 2 Fe^{3+} , ανά μόριο. Η αντιοξειδωτική της δράση είναι αποτέλεσμα της ικανότητάς της να μειώνει την συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων σιδήρου και να τον μεταφέρει σε ιστούς μέσω της κυκλοφορίας, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό ROS (60). Επιπλέον, μαζί με την σερουλοπλασμίνη, είναι η κύρια αντιοξειδωτική πρωτεΐνη, που συντίθεται στον εγκέφαλο και έτσι πιθανόν παίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση νευρολογικών νοσημάτων (42).

Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη είναι μία ευρέως κυκλοφορούσα πρωτεΐνη με πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και αποτελεί το 60-65% της συνολικής πρωτεΐνης πλάσματος. Αποτελείται από 585 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων 35 κυστεϊνών, οι οποίες σχηματίζουν 17 δισουλφιδικούς δεσμούς. Συνεπώς, μία κυστεΐνη παραμένει ελεύθερη στο μόριο της αλβουμίνης και συγκεκριμένα η κυστεΐνη 34. Κύριος ρόλος της είναι η ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης και η κατανομή των υγρών στα διάφορα διαμερίσματα του οργανισμού. Ακόμη, αποτελεί δείκτη θρέψης και περιλαμβάνει θέσεις σύνδεσης για πολλά μόρια, όπως λιπαρά οξέα, φάρμακα, ορμόνες και μεταλλικά ιόντα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της αλβουμίνης αποδίδεται τόσο στη χημική δομή της, όσο και στα πολλά σημεία σύνδεσης που διαθέτει. Πιο αναλυτικά, μπορεί να δεσμεύει ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, όπως σίδηρο και χαλκό με αποτέλεσμα να περιορίζει την οξειδωτική τους δράση. Ακόμη, λειτουργεί ως παγίδα ελευθέρων ριζών. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το μεγαλύτερο μέρος της αλβουμίνης βρίσκεται στην ανηγμένης της μορφή με μία ελεύθερη θειόλη στο κατάλοιπο της Cys 34, που ονομάζεται μερκαπταλβουμίνη. Λόγω της μεγάλης της συγκέντρωσης, η αλβουμίνη αντιπροσωπεύει το 80% της θειόλης στο πλάσμα και μπορεί να αντιδρά και να εξουδετερώνει RONS, όπως H₂O₂, ONOO⁻, HOCl (61).

1.4. Οξειδωτικό στρες

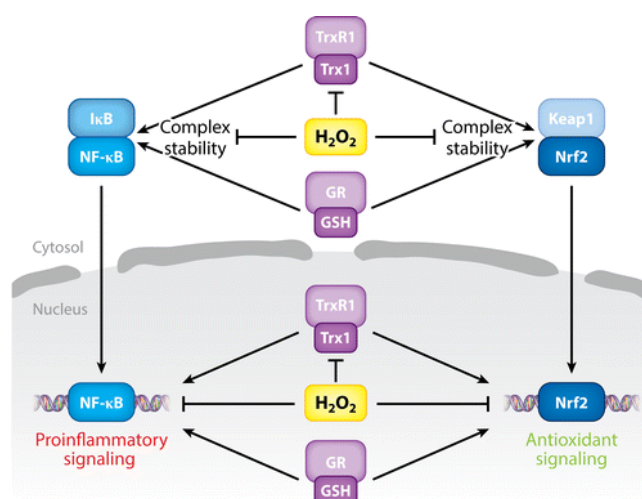
1.4.1. Διττή φύση Οξειδωτικού στρες (eustress vs distress)

Φυσιολογικά, σε έναν οργανισμό η παραγωγή προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών βρίσκεται σε ισορροπία. Ο οργανισμός διαθέτει διάφορους μηχανισμούς, ώστε να διασφαλίζει την ισορροπία αυτή, και πιο συγκεκριμένα διαθέτει μηχανισμούς ελέγχου και ρύθμισης, ώστε η παραγωγή ελευθέρων ριζών να μην υπερσχύει της απομάκρυνσης αυτών. Το οξειδωτικό στρες περιγράφει μία κατάσταση, όπου η ισορροπία αυτή έχει διαταραχτεί και έχει οδηγήσει στην αύξηση των προ-οξειδωτικών μορίων σε σχέση με τα αντιοξειδωτικά.

Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία (62), το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως «μία κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών, υπέρ των πρώτων, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την διατάραξη της

οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου και πιθανόν την πρόκληση μοριακών βλαβών».

Ο όρος οξειδωτικό στρες, που χρησιμοποιήθηκε πολύ νωρίς για να περιγράψει την κατάσταση αυτή, παραπέμπει σε μία δυσμενή κατάσταση για τον οργανισμό, γεγονός όμως που δεν αληθεύει απόλυτα. Το οξειδωτικό στρες έχει διττή φύση. Όταν υπάρχει σε ελεγχόμενα επίπεδα, αποτελεί μία φυσιολογική κατάσταση για τον οργανισμό και ονομάζεται οξειδωτικό **ευ-στρες (eustress)**. Το οξειδωτικό ευ στρες είναι απαραίτητο για την σωστή λειτουργία του οργανισμού, καθώς πολλά οξειδωτικά μόρια, RONS, οξειδώνοντας στοχευμένα μόρια, είναι υπεύθυνα για την οξειδοαναγωγική μεταγωγή σήματος (63). Αντίθετα, η υπερβολική έκθεση σε RONS, η οποία συνεπάγεται αυξημένο οξειδωτικό στρες (**distress**), το οποίο διαταράσσει την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση, καθώς οι RONS δρουν μη-στοχευμένα και μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη σε κύτταρα και βιομόρια συνεπάγοντας σε αρνητικές επιπτώσεις για τον οργανισμό (63).



Εικόνα 18: Μηχανισμοί ρύθμισης των NF-κB και Nrf2 (65).

1.4.2. Προσαρμοστική Απόκριση στο Οξειδωτικό Στρες

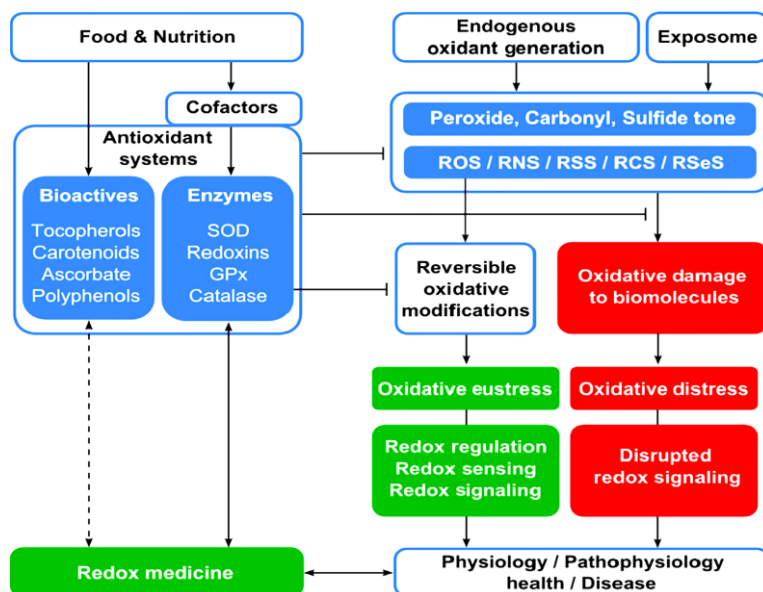
Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, λειτουργεί σαν ερέθισμα για τον οργανισμό, ο οποίος προσπαθεί να ανταστρέψει τις αλλαγές αυτές. Ο οργανισμός αποκρίνεται στο ερέθισμα του στρες, ανεξάρτητα από την έκτασή του (μικρή και ευεργετική ή μεγάλη και επιβλαβής). Οι προσαρμοστικές αποκρίσεις έχουν ως βασικό στόχο την επίτευξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και ρυθμίζονται από «οξειδοαναγωγικούς διακόπτες», οι οποίοι ελέγχουν και την έκφραση γονιδίων για την άμυνα του οργανισμού. Δύο είναι οι κύριοι «οξειδοαναγωγικοί διακόπτες» και ρυθμιστές της απόκρισης στο στρες και συγκεκριμένα τα συστήματα Nrf2/Keap1 και

NF-κB/IκB. Ο Nrf2 (Nuclear Factor-E2-related Factor 2), ανήκει σε μία μικρή οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, που σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων για την προστασία του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων συστατικών για τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα θειορεδοξίνης και γλουταθειόνης, καθώς και ένζυμα για την αναγέννηση του NADPH και τον μεταβολισμό της αίμης. Η δράση του υπόκειται σε στενή ρύθμιση σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο (64). Σε φυσιολογικές καταστάσεις απουσίας οξειδωτικού στρες η δράση του καταστέλλεται από την πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε οξειδοαναγωγικές αλλαγές και διατηρεί τον Nrf2 απενεργοποιημένο, καθώς τον υποβάλλει σε συνεχή αποικοδόμηση, μέσω συστήματος ουβικιτίνης- πρωτεοσώματος. Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, ειδικά κατάλοιπα κυστεΐνης στο μόριο της Keap1 οξειδώνονται με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται και συνεπώς να καταστέλλεται η αποικοδόμηση του Nrf2, ο οποίος είναι πλέον ελεύθερος να μετατοπιστεί στον πυρήνα για την έκφραση των γονιδίων-στόχων του. Η βιολογική λειτουργία του συστήματος αυτού, έχει καθαρά προστατευτική δράση, ωστόσο η υπερ - λειτουργία του μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες, όπως για παράδειγμα σε καταστάσεις καρκίνο και αντίσταση στην χημειοθεραπεία (65).

Ο δεύτερος κύριος ρυθμιστής της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ. Ο NF-κΒ είναι υπεύθυνος για την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονώδη απόκριση, την ανάπτυξη ανοσοποιητικών κυττάρων, τον κυτταρικό κύκλο, καθώς και τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η ρύθμισή του πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων από κινάσες. Σε φυσιολογικές καταστάσεις βρίσκεται απενεργοποιημένος στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με κάποια από τις IκΒ (NF-κΒ Inhibitors) πρωτεΐνες, όπως την IκΒα πρωτεΐνη. Με την έκθεση σε κάποιο ερέθισμα, ενεργοποιούνται οι IKK, κινάσες των IκΒ, οι οποίες φωσφορυλιώνουν 2 σερίνες στις IκΒ πρωτεΐνες, γεγονός που οδηγεί τους αναστολείς του NF-κΒ σε αποικοδόμηση, μέσω συστήματος ουβικιτίνης / πρωτεοσώματος. Στη συνέχεια, ο NF-κΒ είναι ελεύθερος να εισέλθει στον πυρήνα και να ξεκινήσει η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (66). Ο NF-κΒ διαθέτει όπως και ο Nrf2, κατάλοιπα κυστεΐνης στο σημείο

σύνδεσης με το DNA, τα οποία σε αυξημένη συγκέντρωση H₂O₂ στον πυρήνα, οξειδώνονται και αναστέλλουν τη δράση του, ενώ η ενεργοποίησή του μπορεί να διεγείρεται από την Trx1 (65). Άλλοι μηχανισμοί απόκρισης περιλαμβάνουν την απόκριση λόγω υποξίας,

θερμικού σοκ και η αναδίπλωση πρωτεϊνών. Επιπλέον όταν έχει προκληθεί μεγάλη οξειδωτική βλάβη ενεργοποιούνται μηχανισμοί απομάκρυνσης των κατεστραμμένων ιστών, όπως αυτοφαγία, απόπτωση κ.α. (67)



Εικόνα 19: Σύνοψη οξειδωτικού στρες (63).

Το μη φυσιολογικό οξειδωτικό στρες μπορεί να διαταράξει τη σωστή λειτουργία του οργανισμού και να οδηγήσει σε εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη σε κύτταρα και βιομόρια, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω. Ιδιαίτερα η παρατεταμένη έκθεση μορίων και κυττάρων σε αυτό, έχει σημαντικές επιπτώσεις και φαίνεται να σχετίζεται με πλήθος παθολογικών καταστάσεων. Πλέον, είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες κατέχει σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη, όσο και στην εξέλιξη διαφόρων χρόνιων νοσημάτων, όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II και τα Καρδιαγγειακά νοσήματα (1,25,68).

1.5. Εκτίμηση Οξειδωτικού Στρες

Τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες μπορούν να εκτιμηθούν στον οργανισμό μέσω τριών κατευθύνσεων. Αρχικά, μπορεί να γίνει με απευθείας μέτρηση των RONS, η οποία ίσως θα ήταν και η πιο αντιπροσωπευτική μέθοδος. Ωστόσο, πολλές RONS είναι ιδιαίτερα ασταθής και δύσκολο να εκτιμηθούν απευθείας, με αποτέλεσμα να επιλέγονται, κυρίως, μέθοδοι έμμεσου προσδιορισμού. Μία τέτοια μέθοδος είναι η εκτίμηση των επιπτώσεων του οξειδωτικού στρες, δηλαδή ο προσδιορισμός της

οξειδωτικής βλάβης σε βιομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA), καθώς και η μέτρηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και άλλων οξειδοαναγωγικών μορίων, οι οποίες θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια.

1.5.1. Απευθείας Μέτρηση RONS

Μέτρηση απευθείας RONS σε κύτταρα του ανοσοποιητικού, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, μέσω κυτταρομετρίας ροής και συγκεκριμένα, μέσω φθορισμού. Οι H_2O_2 , OH^- , ROO^- μπορούν να μετρηθούν μετά από χρήση της χρωστικής DCFDA, η οποία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και υδρολύεται από την εστεράση της DCFH. Το μόριο, που σχηματίζεται, εγκλωβίζεται στο κύτταρο και αντιδρά με H_2O_2 , δημιουργώντας μία φθορίζουσα ουσία, τη DCF, η οποία μπορεί να μετρηθεί με φωτομετρία. Τα ανιόντα υπεροξειδίου $O_2^{\cdot -}$ μπορούν να εκτιμηθούν με μία άλλη φθορίζουσα ουσία, την DHE, με αντίστοιχο τρόπο. Τέλος, άλλες ROS, όπως $ROOH$ και συγκεκριμένα στον ορό, μπορούν να προσδιοριστούν με ένα τεστ, όπου αξιολογούνται τα παράγωγα των ROS. Συγκεκριμένα, μέρος του ορού διαλύεται σε όξινο ρυθμιστικό διάλυμα (με οξικό οξύ), με αποτέλεσμα την αποσύνδεση ιόντων μετάπτωσης από πρωτεΐνες. Τα ελεύθερα ιόντα, στη συνέχεια αντιδρούν με ομάδες υδρουπεροξειδίων σχηματίζοντας ρίζες αλκοξειδίου και υπεροξειδίου, μέσω της αντίδρασης Fenton, οι οποίες αντιδρώντας χημικά με χρωστική (chromogen) σχηματίζουν ένα έγχρωμο κατιόν ρίζας, η συγκέντρωση του οποίου μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία και είναι ανάλογη της της συγκέντρωσης υπεροξειδίων στον ορό (69,70).

1.5.2 Εκτίμηση οξειδωτική βλάβης σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA

Στα λιπίδια

Η λιποειδική υπεροξείδωση αποτελεί ένα συνηθισμένο δείκτη του οξειδωτικού στρες. Η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, οδηγεί στο σχηματισμό σχετικά σταθερών ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων, και κυρίως α - και β - πολυακόρεστες αλδεΐδες, όπως η μηλονυλοαλδεΐδη (MDA) και η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (HNE), και τα ισοπροστάνια, όπως τα, F2-ισοπροστάνια. Τα παραπάνω προϊόντα μπορούν να μετρηθούν στο πλάσμα και τα ούρα και να λειτουργήσουν ως

έμμεσοι δείκτες του οξειδωτικού στρες (32). Μία από τις κύριες μεθόδους για τον προσδιορισμό της MDA βασίζεται στο θειοβαρβιτουρικού οξύ, με το οποίο αντιδρά και σχηματίζει ένα έγχρωμο προϊόν, TBAR (ροζ), το οποίο μπορεί να εκχυλιστεί με βουτανόλη και να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία (απορρόφηση στα 520-535 nm). Η παραπάνω μέθοδος, αν και ιδιαίτερα συνηθισμένη, καθώς είναι γρήγορη και εύκολη, δεν είναι απόλυτα ακριβής. Το TBA μπορεί να αντιδράσει και με άλλες αλδεΐδες, οι οποίες απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση που θα προκύψει να μην είναι αντιπροσωπευτική της λιποξειδικής υπεροξείδωσης. Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού του MDA είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), οι οποίες θεωρούνται πιο αξιόπιστες, αλλά ταυτόχρονα είναι και πιο ακριβές και χρονοβόρες. Η 4- HNE μπορεί να προσδιοριστεί σε πλάσμα και ούρα, άμεσα, μέσω HPLC ή έμμεσα μέσω GC-MS, μετρώντας ενδιάμεσους μεταβολίτες. Ωστόσο, με τη μέθοδο της GC-MS έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ υγιή πληθυσμού και ατόμων με αυτοάνοσα νοσήματα (70). Επιπλέον, μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας σε ιστούς, με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημεία (IHC). Σε βιολογικά δείγματα προτιμάται η ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών, με IHC ή με ELISA. Η υψηλή ειδικότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων για την 4-HNE, καθιστά τη μέθοδο αυτή ιδανική για προσδιορισμού του HNE σε ανθρώπινους ιστούς, μίγματα ομογενοποιημένων ιστών και δείγματα ορού και πλάσματος. Ωστόσο, η άμεση μέτρηση του 4- HNE και του MDA δεν έχει μεγάλη ευαισθησία, καθώς καθώς μέρος των δραστικών αυτών μορίων παραμένει συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια και συνεπώς δεν εντοπίζεται (71). Ένας ακόμη αρκετά αξιόπιστος δείκτης για την εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια *in vivo* είναι τα F2-ισοπροστάνια, τα οποία είναι ισομερή των προσταγλαδινών. Προκύπτουν από τη μη ενζυμική υπεροξείδωση του αραχιδονικού οξέος στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και στις λιποπρωτεΐνες. Σε αυτή την ομάδα μορίων ανήκει και η 8-ισο-προσταγλαδίνη F2a (8-iso-PGF2α), η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια με CG-MS και με LC-MS/MS HPLC/GCMS. Συνεπώς, ο προσδιορισμός της καθίσταται σχετικά δύσκολος και ακριβός (69).

Στο DNA

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικές βλάβες στο DNA και στο RNA και ειδικότερα στα τμήματα της γουανίνης. Πολλά μόρια έχουν ανιχνευτεί, τα οποία θα μπορούσαν να εκτιμήσουν στον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες στο DNA, αλλά πιο αντιπροσωπευτικά θεωρούνται η 8-υδροξύγουανίνη (8OHGua) και ο αντίστοιχος δεόξυ-νουκλεοζίτης, η 8-ύδροξυ-2-δεοξυ-γουανοσίνη (8OHdG). Η 8OHdG, η οποία προκύπτει από οξείδωση γουανίνης μετά από έκθεση σε ρίζα υδροξυλίου, μονήρες οξυγόνο (72), αποκόπτεται από το DNA με τη βοήθεια συστημάτων επισκευής, εισέρχεται στην κυκλοφορία και στη συνέχεια απεκκρίνεται με τα ούρα (69).

Η 8OHdG μπορεί να προσδιοριστεί σε βιολογικά δείγματα, αίματος και ούρων με τη μέθοδο HPLC-ECD (electrochemical detector), η οποία έχει μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια. Παρ' όλ' αυτά, δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική λόγω του μεγάλου κόστους και ιδιαίτερου εξοπλισμού. Μία εναλλακτική μέθοδος προσδιορισμού της 8OHdG είναι η ενζυμική ανοσολογική δοκιμασία (ELISA), καθώς και η ανοσοϊστοχημική ανάλυση, οι οποίες είναι απλές και πρακτικές και έχουν, γενικά, καλή ευαισθησία. Τέλος, ο προσδιορισμός της 8OHdG, μπορεί να πραγματοποιηθεί με μέθοδο αντίστοιχη της φθορίζουσας κυτταρομετρίας ροής (FITC, Fluorescein isothiocyanate). Η σύζευξη του μορίου αυτού με την 8OHdG, οδηγεί στο σχηματισμό ενός φθορίζον προϊόντος, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με φωτομέτρηση. Η γλυκόλη θυμιδίνης (Tg) είναι ακόμη ένας δείκτης προσδιορισμού της οξειδωτικής βλάβης στο DNA. Πιθανόν, μάλιστα η θυμιδίνη να είναι και πιο ειδική, καθώς σε αντίθεση με τη γουανοσίνη, δεν ενσωματώνεται στο RNA και διατηρείται στους ιστούς (ενώ η γουανοσίνη αποκόπτεται από το DNA). Συνεπώς, η Tg είναι κατάλληλος δείκτης για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε δείγματα ιστών και προσδιορίζεται με ανοσοϊστοχημική ανάλυση (69,73).

Σε πρωτεΐνες

Ο προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες, μέσω της πρωτεϊνικής υπεροξείδωσης, πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο βιοδεικτών. Αρχικά, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν ένα συνηθισμένο δείκτη οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών. Είναι προϊόν της οξείδωσης του σκελετού της πρωτεΐνης ή κατάλοιπων αμινοξέων, όπως προλίνη, αργινίνη, λυσίνη και θρεονίνη από RONS. Η

μέτρησή τους γίνεται με φασματοφωτομετρία, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο DNPΗ (2,4-dinitrophenylhydrazine). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αντιδρούν με το DNPΗ, σχηματίζουν μία βάση Schiff και τελικά προϊόντα δινιτροφαινυλδραζίνης, τα οποία απορροφούν στα 375 nm. Εναλλακτικά, μπορούν να μετρηθούν με 2D-ηλεκτροφόρηση ή με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (69). Τα AOPPs (προχωρημένα προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών ή Advanced Oxidation Protein Products), αποτελούν το δεύτερο δείκτη οξειδωτής τροποποίησης πρωτεϊνών και πιθανόν και πιο κατάλληλο. Τα μόρια αυτά είναι προϊόντα της οξείδωσης πρωτεϊνών, όπως η αλβουμίνη, από χλωριομένα οξειδωτικά, όπως χλωραμίνες και υποχλωρικό οξύ. Τα AOPP περιλαμβάνουν χλωριωμένα κατάλοιπα αμινοξέων, όπως 3- χλωρο-τυροσίνη και 3,5-διχλωρο-τυροσίνη (3-Cl-Tyr), σιδουλφιδικές γέφυρες και καρβονυλικές ομάδες. Ο προσδιορισμός τους σε δείγματα πλάσματος και ορού γίνεται με φασματοφωτομετρία στα 340 nm, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο χλωραμίνη-T αναμεμιγμένο με κάλλιο, ιώδιο και οξικό οξύ (69,74).

1.5.3. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Λειτουργίας

1.5.3.1. Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδίο της Δισμουτάσης SOD

Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο. Η αξιολόγηση της δραστηρότητάς της μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα είτε έμμεσα. Η μέθοδος για την άμεση μέτρησή του ενζύμου αυτού βασίζεται στην ικανότητά της SOD να αναστέλλει την αυτοοξείδωση μορίων, όπως η αδρεναλίνη ή πυρογαλλόλη, τα προϊόντα των οποίων μπορούν να μετρηθούν με φωτομέτρηση (απορρόφηση στα 480 και 420 nm, αντίστοιχα). Εναλλακτικά, η δραστηρότητα της SOD μπορεί να μετρηθεί έμμεσα. Η βασική αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στο γεγονός ότι οι ρίζες υπεροξειδίου, που δημιουργούνται για παράδειγμα, μέσα από το σύστημα ξανθίνης/οξειδάση της ξανθίνης, μπορούν να ανάγουν άλατα τετραζολίου, όπως το 2-(4-ιδιοφαίνυλ)-3(4-νιτροφαινολ)-5-φαινυλοτετραζολιο (INT), το -3-(νιτροφαίνυλ)-2-5-τετραζόλιο]-1,3-βενζολο δισουλφινικό (WST-1), ή (XTTs) προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος formazan, τα οποία μπορούν να μετρηθούν με φασματοφωτομετρία σε απορρόφηση

470-560 nm. Η δραστηριότητα SOD στα δείγματα ανταγωνίζεται τις παραγόμενες ρίζες και συνεπώς αναστέλλουν την αναγωγή των αλάτων τετραζολίου. Η δραστηριότητα της SOD υπολογίζεται ανάλογα με το μέγεθος αναστολής και τον ρυθμό αναγωγής των αλάτων τετραζολίου και συνεπώς μέσα από τη μέτρηση της μείωσης εμφάνισης χρώματος (69,70).

Δραστηριότητα Καταλάσης (CAT)

Η CAT καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Η δραστηριότητά της μπορεί να μετρηθεί μέσω φασματοφωτομετρικών και χρωματομετρικών αναλύσεων. Μία ποσοτική φασματοφωτομετρική μέθοδος, βασίζεται στην παρατήρηση της μείωσης της υπεριώδους απορρόφησης ενός διαλύματος H_2O_2 (απορρόφηση στα 240 nm) σε σχέση με το χρόνο. Μία άλλη απλή χρωματομετρική μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήριο διχρωμικού οξέος ($K_2Cr_2O_7$ με οξικό οξύ), το οποίο όταν θερμαίνεται, παρουσία H_2O_2 , έχει σαν αποτέλεσμα την αναγωγή του διχρωμικού οξέος σε οξικό χρώμιο, το οποίο μπορεί να μετρηθεί στα 610 nm. Άλλες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι αξιολογούν τη δραστηριότητα της CAT βασιζόμενοι στην απορρόφηση του σταθερού συμπλόκου, που σχηματίζει το H_2O_2 . Για παράδειγμα, το σταθερό σύμπλοκο που σχηματίζει το υπεροξείδιο του υδρογόνου με το μολυβδαινικό αμμώνιο απορροφά στα 405 nm (69), ενώ η σταθερή ένωση που σχηματίζει παρουσία ανθρακικού κοβαλτίου απορροφά σε μέγιστο μήκος κύματος 440 nm (75).

Δραστηριότητα Υπεροξειδάσης Γλουταθειόνης (GPx)

Οι GPx καταλύουν την αναγωγή του H_2O_2 ή οργανικών υδρουπεροξειδίων σε νερό και αλκοόλες, μέσω της οξειδωσης της GSH σε GSSG. Η GSSG μετατρέπεται ξανά σε GSH, μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), με αναγωγικό ισοδύναμο το NADPH. Η δραστηριότητα της GPx μπορεί να μετρηθεί με μία ανάλυση κατά την οποία τα δείγματα επωάζονται με H_2O_2 παρουσία γλουταθειόνης για συγκεκριμένο χρόνο. Στην συνέχεια υπολογίζεται το H_2O_2 που έχει καταναλωθεί, μέσω της περιεκτικότητας του μίγματος σε GSH, η οποία γίνεται με το αντιδραστήριο Ellman DTNB, το οποίο εντοπίζει θειολικές ομάδες και σχηματίζει ένα κίτρινο σύμπλοκο που φωτομετράται

(69). Ακόμη, η δραστηριότητα της GPx μπορεί να προσδιοριστεί και μέσω 2 αντιδράσεων. Αρχικά, 2 μόρια GSH αντιδρούν με H_2O_2 και σχηματίζουν GSSG, μέσω της GPx. Στη δεύτερη αντίδραση, η οξειδωμένη γλουταθειόνη ανάγεται ξανά σε GSH, με ταυτόχρονη οξείδωση του NADPH σε $NADP^+$, μεταβάλλοντας την απορρόφηση στα 340 nm. Μετρώντας το NADPH που καταναλώθηκε, μπορεί να γίνει έμμεση εκτίμηση των μορίων GSH που οξειδώθηκαν από την GPx (76).

1.5.3.2. Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού μπορεί να γίνει με απευθείας μέτρηση των επιμέρους αντιοξειδωτικών μορίων (ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, λυποϊκό οξύ) στο αίμα, στο πλάσμα ή στους ιστούς. Ωστόσο, η μέτρηση μεμονωμένων αντιοξειδωτικών εκτός του ότι είναι χρονοβόρα και έχει μεγάλο κόστος, δεν λαμβάνει υπόψιν συνεργιστικές δράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών μορίων. Η αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού μπορεί να μετρηθεί και έμμεσα, μέσω της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC). Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αξιολογεί την ικανότητα του οργανισμού να εξουδετερώνει RONS, υποβάλλοντας τα δείγματα σε ελεγχόμενο οξειδωτικό στρες. Μία μέθοδος για προσδιορισμό της TAC είναι η ανάλυση DPPH. Το DPPH είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα με έντονο μωβ χρώμα, που απορροφά στα 520 nm. Η εξουδετέρωση της ρίζας αυτή οδηγεί στο σχηματισμό άχρωμου προϊόντος. Συνεπώς, η TAC υπολογίζεται από τη μείωση της ένταξης του χρώματος στο διάλυμα (69).

1.6. Επιδράσεις του Οξειδωτικού Στρες

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το οξειδωτικό στρες έχει διττό ρόλο για τον οργανισμό. Όταν οι ελεύθερες ρίζες διατηρούνται σε χαμηλά έως μέτρια επίπεδα επιτελεί πολύ σημαντικές λειτουργίες για τον οργανισμό, που σχετίζονται με την μεταγωγή σήματος, την κυτταρική διαφοροποίηση.

1.6.1. Στο ανοσοποιητικό σύστημα

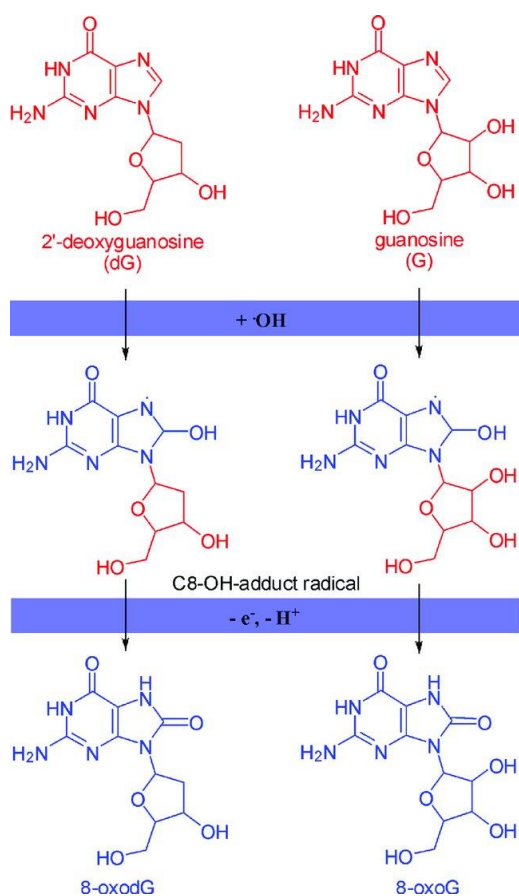
Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί την κύρια άμυνα του οργανισμού, προστατεύοντας τα κύτταρα απέναντι σε μικρόβια, ιούς, τοξικές ουσίες,

συμπεριλαμβανομένων της χρήσης καπνού και της κατανάλωσης αλκοόλ, σε έκθεση σε αλλεργιογόνα και ακτινοβολία. Μικρή αύξηση των επιπέδων των RONS οδηγούν σε αύξηση της κυτταρικής διαφοροποίησης, ενώ συμμετέχουν και στην άμυνα του οργανισμού. Συγκεκριμένα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα, που είναι οι κύριοι φαγοκυτταρικοί πληθυσμοί στο αίμα, μπορούν να συνθέτουν και να αποθηκεύουν ROS, τις οποίες ελευθερώνουν για την αντιμετώπισης παθογόνων, μέσω της NADPH-οξειδάσης. Αντίθετα, η αυξημένη παραγωγή RONS σε καταστάσεις φλεγμονής πιθανόν σχετίζεται με χρόνια νοσήματα. Σε καταστάσεις φλεγμονής, τα λευκοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στο σημείο της βλάβης, όπου για την αντιμετώπισή της αυξάνεται η κατανάλωση οξυγόνου από τα κύτταρα αυτά («αναπνευστική έκρηξη») και έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση στη συγκέντρωση των RONS. Τα κύτταρα που εμπλέκονται στη φλεγμονή, οδηγούν στην απελευθέρωση κυτοκινών και χημειοκινών, οι οποίες επιστρατεύουν περισσότερα κύτταρα στο σημείο της βλάβης με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση στις παραγόμενες RONS. Επιπλέον, τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κΒ. Η παρατεταμένη έκθεση σε RONS μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή και να συμβάλλει στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα και θυρεοειδοπάθεια Hashimoto (77).

1.6.2. Σε νουκλεϊκά οξέα

Η αυξημένη συγκέντρωσή RONS μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στο DNA και στο RNA. Οι οξειδωτικές αυτές βλάβες, σχετίζονται με διάφορα χρόνια νοσήματα, καθώς μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις στα νουκλεϊκά οξέα, μέσω υποκατάστασης, προσθήκης ή αφαίρεσης βάσεων. Ένας βασικός στόχος των ελευθέρων ριζών αποτελούν οι αζωτούχες βάσεις, οι οποίες μπορούν να υποστούν οξείδωση, ενώ η πιο ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες είναι η γουανίνη. Βασικότερα προϊόντα από την οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων θεωρούνται η 8-oxodG και η 8-oxoG, ενώ η πρώτη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελεί βασικό δείκτη της οξειδωτικής βλάβης, καθώς είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια και εύκολο να σχηματιστούν. Η 8-oxodG προκαλεί αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων, καθώς συνδέεται πιο εύκολα με βάση αδερίνης και όχι κυτοσίνης, το οποίο είναι ο βασικός τρόπος που το οξειδωτικό στρες προκαλεί μεταλλάξεις (65). Θεωρείται η πιο

μεταλλαξιγόνο βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα και φαίνεται ότι οδηγεί σε απώλεια επιγενετικής πληροφορίας (68). Το DNA διαθέτει κάποιους προστατευτικούς μηχανισμούς στο οξειδωτικό στρες, ένας εκ των οποίων είναι η επιδιόρθωση με απομάκρυνση βάσεων. Έτσι η 8-oxodG αποκόπτεται από την αλυσίδα του DNA και απεκκρίνεται με τα ούρα. Ωστόσο, το RNA είναι πιο ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες, καθώς διαθέτει ένα κλώνο με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προστατευτεί με δεσμούς υδρογόνου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του DNA. Βασικός στόχος του οξειδωτικού στρες αποτελούν και τα microRNA. Αν και δε κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα microRNA συνδέονται με mRNA, τα οποία είτε αποικοδομούνται είτε αναστέλλεται η μετάφραση πρωτεϊνών. Οι οξειδωτικές βλάβες επηρεάζουν τη λειτουργία του καθώς διαταράσσεται η ριβοσωμική λειτουργία και μειώνεται ο ρυθμός μετάφρασης και σύνθεσης πρωτεϊνών, τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την διαταραγμένη λειτουργία της γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, πιθανόν διαταράσσεται η έκφραση πρωτεϊνών, που εμπλέκονται σε νευρολογικά νοσήματα (78). Η 8-oxodG προκαλεί αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων, καθώς συνδέεται



Εικόνα 20: Πορεία σχηματισμού f 8-oxodG και 8-oxoG., (78).

πιο εύκολα με βάση αδεΐνης και όχι κυτοσίνης, το οποίο είναι ο βασικός τρόπος που το οξειδωτικό στρες προκαλεί μεταλλάξεις (65). Οι οξειδωτικές βλάβες σε νουκλεϊκά οξέα, έχουν συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνο στομάχου και καρκίνο μαστού. Επιπλέον, οι οξειδωτικές βλάβες, ιδιαίτερα στο RNA, έχουν άμεση σχέση με την εξέλιξη νευρολογικών νοσημάτων, όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson ή η επιληψία. Τα επίπεδα της 8-oxodG παρατηρούνται αυξημένα σε άτομα με προ-διαβήτη και σχετίζονται θετικά με τον ΔΜΣ, ενώ παρατηρείται και μία συσχέτιση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς τα επίπεδα της 8-oxodG σε

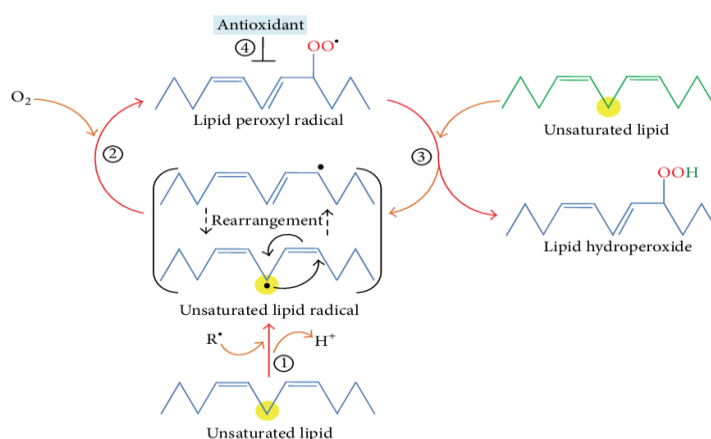
ορό και δείγμα ούρων, όχι μόνο είναι αυξημένα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και καρδιακή ανεπάρκεια, αλλά φαίνεται ότι σχετίζονται και με επιδείνωση αυτών των παθήσεων (78).

1.6.3. Σε λιπίδια

Μία από τις επιπτώσεις της αυξημένης συγκέντρωσης RONS είναι η άμεση πρόκληση οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια. Τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών αποτελούν κύριο στόχο των RONS. Η οξείδωσή τους έχει σαν αποτέλεσμα μεταβολές στη ρευστότητα των μεμβρανών, αναστολή διαμεμβρανικών υποδοχέων, αύξηση στη διαπερατότητα της μεμβράνης, τα οποία όλα συντελούν σε διαταραγμένη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών (32). Οι δύο πιο σημαντικές ROS που επηρεάζουν την οξείδωση των λιποειδών είναι η $\text{HO}\cdot$ και η $\text{HO}_2\cdot$. Η $\text{HO}\cdot$ όπως είναι γνωστό, είναι ιδιαίτερα δραστικό μόριο και προκαλεί βλάβες σε μακρομόρια κοντά στο σημείο σχηματισμού τους και σχετίζεται με διάφορες διαταραχές, όπως νευρολογικά και καρδιαγγειακά νοσήματα και κάποιους τύπους καρκίνου. Ένα κύτταρο μπορεί να παράγει 4 εκατομμύρια, περίπου ρίζες υδροξυλίου τη ημέρα, οι οποίες είτε θα εξουδετερωθούν από αντιοξειδωτικά μόρια ή ένζυμα, είτε θα επιτεθούν σε μακρομόρια. Η $\text{HO}_2\cdot$ αποτελεί την πρωτονιωμένη μορφή υπεροξειδίου και σχηματίζει υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο με τη σειρά του συμμετέχει σε οξειδωτικές αντιδράσεις, οδηγώντας στον περαιτέρω σχηματισμό $\text{HO}\cdot$. Η ρίζα αυτή θεωρείται πιο ισχυρό οξειδωτικό από την ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου και μπορεί να ξεκινήσει αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης σε πολυακόρεστα φωσφολιποειδή, οδηγώντας τελικά στην διαταραγμένη λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η λιποειδική υπεροξειδωση είναι μία διαδικασία, κατά την οποία RONS επιτίθενται σε λιπίδια που περιέχουν διπλό δεσμό μεταξύ δύο ατόμων άνθρακα, κυρίως στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) και περιλαμβάνει τρία στάδια, την έναρξη, την διάδοση και τον τερματισμό. Η φάση της έναρξης περιλαμβάνει στο σχηματισμό μίας λιποειδικής ελεύθερης ρίζας με επίκεντρο τον άνθρακα, η οποία προκύπτει από αφαίρεση υδρογόνου από μία ομάδα μεθυλενίου και αφήνοντας ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στον άνθρακα. Η ασταθής αυτή ρίζα άνθρακα, συνήθως υφίσταται ενδομοριακή αναδιάταξη, προς συζυγές διένιο ($\text{L}\cdot$). Στο στάδιο της διάδοσης, η $\text{L}\cdot$ αντιδρά άμεσα με οξυγόνο σχηματίζοντας ρίζα υπεροξειδίου $\text{LOO}\cdot$, η

οποία μπορεί να αφαιρέσει ένα υδρογόνο από κάποιο γειτονικό λιποειδές, δημιουργώντας εκ νέου λιποειδικές ρίζες ($L^\cdot$) και υδροϋπεροξειδίο ($LOOH$). Στο τελευταίο στάδιο, τη φάση τερματισμού, αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η βιταμίνη E δίνει άτομα υδρογόνου στις ρίζες λιποειδικού υπεροξειδίου ($LOO^\cdot$), σχηματίζοντας ρίζα βιταμίνης E, η οποία αντιδράει εκ νέου με $LOO^\cdot$, σχηματίζοντας τελικά μη ριζικά προϊόντα. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις που περιεγράφηκαν παραπάνω θα συνεχίσουν μέχρι τον σχηματισμό των προϊόντων τερματισμού (71,79).

Τα κυριότερα προϊόντα της λιποειδικής υπεροξειδωσης είναι α -, β - ακόρεστες αλδεΐδες, οι οποίες λειτουργούν ως δευτερεύοντες μεσολαβητές της σηματοδότησής του οξειδωτικού στρες. Τέτοιες αλδεΐδες είναι η μηλονυλο-αλδεΐδη (MDA), η 4 υδρόξυ-2-νονενάλη (HNE) και οι ισοπροστάνες (F_2 - IsoPs) και χρησιμεύουν ως έμμεσοι δείκτες της οξείδωσης των λιπιδίων (32). Η MDA, που θεωρείται η πιο μεταλλαξιογόνος, ενώ η HNE χαρακτηρίζεται ως η πιο τοξική (79). Συγκριτικά με τις ελεύθερες ρίζες, οι αλδεΐδες είναι σχετικά σταθερά μόρια και μπορούν να επιτίθενται σε μόρια εντός και εκτός του κυττάρου, ακόμα και μακριά από το σημείο σχηματισμού τους. Για το λόγο αυτό, δεν αποτελούν απλώς τελικά προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων, αλλά και δευτερογενή μόρια μεταγωγής σήματος του οξειδωτικού στρες. Έχει βρεθεί ότι μπορούν να αντιδρούν με διάφορα μακρομόρια, όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και φωσfolιποειδή, δημιουργώντας μεγάλου εύρους σταθερά προϊόντα, τα οποία φαίνεται να σχετίζονται με χρόνια νοσήματα, μεταξύ των οποίων ο καρκίνος, διαβήτης, καρδιαγγειακά νοσήματα, νευρολογικές διαταραχές και φλεγμονώδη νοσήματα(32). Οι δραστικές αυτές αλδεΐδες μετατρέπουν αμινοξέα κυρίως σε κατάλοιπα κυστεΐνης και λιγότερο σε λυσίνη ή ιστιδίνη. Επιπλέον, η MDA και η HNE απορροφώνται και μέσω της τροφής και συνεπώς τα επίπεδά τους στο πλάσμα ή στα



Εικόνα 21: Πορεία Λιποειδικής Υπεροξειδωσης.(79).

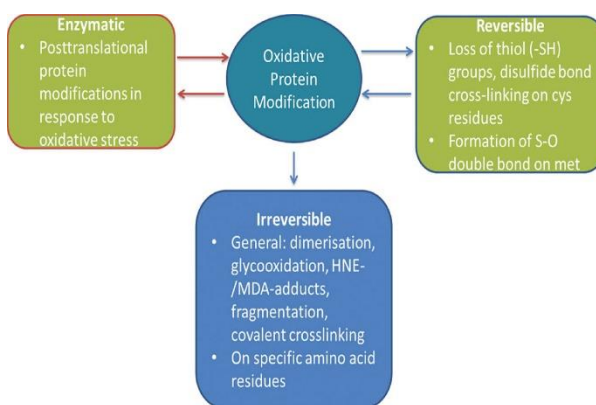
ούρα, δεν είναι ο πιο αντιπροσωπευτικός δείκτης της συνολικής οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού. Τα επίπεδα των ισοπροστανών στο αίμα και στα ούρα, από την άλλη, θεωρούνται πιο ακριβής και έγκυρος δείκτης οξειδωτικού στρες in vivo (32). Αυξημένα επίπεδα των MDA, HNE και F2IsoPs έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με νόσο Huntington, ενώ χρησιμοποιούνται και ως βιοδείκτες για την πορεία άλλων νευρολογικών διαταραχών όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson (80). Η HNE έχει βρεθεί ότι μεσολαβεί σε διάφορα αντι- και προ- φλεγμονώδη μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση του NRF2 για την έκφραση αντιοξειδωτικών μορίων και του NF-kB, για την έκφραση προ φλεγμονωδών χημειοκινών και κυττοκινών (81).

Στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν έναν ακόμα κύριο στόχο των προ οξειδωτικών του οργανισμού, καθώς είναι απαραίτητες στα περισσότερα βιολογικά συστήματα και αποτελούν το 70% της ξηρής μάζας κυττάρων και ιστών. Η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών γίνεται μέσω οξείδωσης από RONS ή από δευτερεύοντα προϊόντα των οξειδωτικών αντιδράσεων, τόσο στις πλάγιες αλυσίδες των αμινοξέων, όσο και στον πεπτιδικό σκελετό, ενώ η έκταση της βλάβης ποικίλλει πολύ και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η τοπολογία των παραγόμενων ριζών σε σχέση με τις πρωτεΐνες, ο φραγμός της κυτταρικής μεμβράνης, ενδομοριακές και διαμοριακές αντιδράσεις μεταφοράς, το σημείο σύνδεσης με την πρωτεΐνη, η εμφάνιση δευτερογενών- αλυσιδωτών αντιδράσεων κ.α. (82,83). Οι αντιδράσεις των RONS με πρωτεΐνες προκαλεί αλλαγές στις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης, της διαλυτότητας, της ευαισθησίας στην πρωτεόλυση και της ενζυμικής δραστηριότητας (84). Ωστόσο, η απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης είναι αποτέλεσμα οξειδωτικής τροποποίησης είτε σε απαραίτητα αμινοξέα, είτε σε προσθετικές ομάδες στο ενεργό τους κέντρο. Επιπλέον, μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα το σπάσιμο της πρωτεΐνης μεταξύ πεπτιδικού σκελετού και πλάγιων αλυσίδων και συσσωμάτωση των θραυσμάτων, μέσω ομοιοπολικών διασυνδέσεων (cross-linking). Γενικά, τα πιο δραστικά οξειδωτικά μόρια μπορεί να προκαλέσουν τροποποιήσεις και στον πεπτιδικό σκελετό και στις

πλευρικές αλυσίδες, ενώ λιγότερο δραστικά μόρια, συνεπάγουν πιο επιλεκτικές τροποποιήσεις (82).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες μέσω αντιδράσεων αφαίρεσης υδρογόνου από δεσμούς C-H, S-H, N-H και O-H, (83) μεταφοράς ηλεκτρονίων, διάσπασης και αναδιάταξης, υποκατάστασης και διμερισμού. Οι μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την καρβονυλίωση και τη νίτρωση τυροσίνης (85). Αρχικά, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι αποτέλεσμα της άμεσης οξείδωσης του πεπτιδικού σκελετού, της οξείδωσης σε αμινοξέα ιστιδίνης, κυστεΐνης, λυσίνης, προλίνης και θρεονίνης σε πλευρικές αλυσίδες, της αντίδρασης της ιστιδίνης, κυστεΐνης και λυσίνης με αλδεΐδες, όπως για παράδειγμα τα προϊόντα της λιποξειδικής υπεροξείδωσης, ή της μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης καταλοίπων λυσίνης προς σχηματισμό τελικών προϊόντων μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης, AGEs (86). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν κύριους δείκτες της πρωτεϊνικής υπεροξείδωσης. Η νίτρωση τυροσίνης είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης δραστικών μορφών αζώτου και τυροσίνης και είναι μία πολύ επιλεκτική διαδικασία και έχει συσχετιστεί με οξείες ή χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους (85). Στις αντιστρεπτές τροποποιήσεις περιλαμβάνονται ο σχηματισμός δισουλφιδίου, σουλφενικού οξέος, σύζευξη πρωτεΐνης με γλουταθειόνη και νιτροζυλίωση (85). Τα πιο ευαίσθητα αμινοξέα στο οξειδωτικό στρες είναι αυτά που περιέχουν θείο, δηλαδή η κυστεΐνη, η μεθειονίνη και η κυστίνη, και τα αρωματικά αμινοξέα, δηλαδή η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη και η ιστιδίνη (82,83). Παρ' όλ' αυτά, ανάλογα με το οξειδωτικό μόριο αλλάζουν και οι κύριοι στόχοι οξείδωσης. Για παράδειγμα, ενώ το HO· και το RO· στοχεύουν σχεδόν σε όλα τα αμινοξέα, το ROO· έχει σαν βασικό στόχο τα αμινοξέα Cys, Met, Tyr και Trp, το μονήρες οξυγόνο Cys, Met, Tyr, Trp και His, το υπερόξυ νιτρικό οξύ (ONOOH) στοχεύει στα αμινοξέα Cys, Met και cystine, ενώ το H₂O₂ κατάλοιπα Cys και σεληνοκυστεΐνη (82,83).



Εικόνα 22: Οξειδωτική Τροποποίηση Πρωτεϊνών (84).

Κεφάλαιο 2: Οξειδωτικό Στρες και Καρδιαγγειακά Νοσήματα

2.1. Διαταραχές Καρδιάς και Αγγείων

2.1.1 Ορισμοί

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν ακόμη και σήμερα μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Συνεπώς, τόσο η αντιμετώπιση, όσο και η πρόληψη τους, κρίνεται απαραίτητη.

Ο όρος καρδιαγγειακά νοσήματα αφορά το σύνολο των διαταραχών της καρδιάς και των αγγείων. Πιο αναλυτικά, στα καρδιαγγειακά νοσήματα περιλαμβάνονται:

- η στεφανιαία νόσος (νόσος των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τον καρδιακό μυ)
- η εγκεφαλική αγγειακή νόσος (νόσος των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τον εγκέφαλο)
- η περιφερική αρτηριοπάθεια (νόσος των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τα χέρια και τα πόδια)
- η ρευματική καρδιοπάθεια (βλάβη στον καρδιακό μυ και καρδιακών βαλβίδων από ρευματικό πυρετό, που προκαλείται από στρεπτοκοκκικά βακτήρια)
- η συγγενής καρδιοπάθεια (εκ γενετής δυσπλασίες στη δομή της καρδιάς)
- η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και πνευμονική εμβολή (θρόμβοι αίματος στις φλέβες των κάτω άκρων, οι οποίοι μπορεί να αποσπαστούν και να κινηθούν προς την καρδιά και τους πνεύμονες).

(WHO, 2017)

Η Στεφανιαία Νόσος ή ισχαιμική καρδιακή νόσος είναι το συχνότερο από τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ενώ αποτελεί και την κυριότερη αιτία για ανακοπή. Η Στεφανιαία Νόσος είναι αποτέλεσμα της στένωσης των στεφανιαίων αρτηριών, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται αθηρωμάτωση και θα αναλυθεί παρακάτω εκτενέστερα. Φυσιολογικά, οι αρτηρίες αυτές είναι υπεύθυνες για την αιμάτωση του

καρδιακού μυ και κατ' επέκταση για την τροφοδότηση του με τα απαραίτητα, για τη λειτουργία του, συστατικά. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις σταδιακά πραγματοποιείται συσσώρευση λιποειδών γραμμώσεων στο εσωτερικό των αρτηριών, με αποτέλεσμα τη μη επαρκή αιμάτωση του καρδιακού μυ και τελικά τη «μυοκαρδιακή ισχαιμία».

2.1.2 Κλινικές εκδηλώσεις

Οι κλινικές εκδηλώσεις της Στεφανιαίας Νόσου ποικίλλουν ανάλογα με το είδος και το βαθμό της αθηρωμάτωσης των στεφανιαίων αρτηριών και συνοπτικά περιλαμβάνουν την σταθερή και ασταθή στηθάγχη, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Μάλιστα, η στεφανιαία νόσος πιθανόν να μην έχει εμφανή συμπτώματα όταν βρίσκεται σε αρχικά στάδια, αφού η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης γίνεται προοδευτικά. Επιπλέον, σε μερικές περιπτώσεις όπου ένα αγγείο αποφράσσεται σταδιακά, τα γειτονικά αγγεία διατείνονται αυξάνοντας την αιματική ροή και παρακάμπτοντας τελικά την αποφραγμένη αρτηρία.

Η στηθάγχη αποτελεί το πιο συχνό σύμπτωμα της στεφανιαίας νόσου. Χαρακτηρίζεται από θωρακικό άλγος, το οποίο μπορεί να εκφραστεί ως σφίξιμο, αίσθημα πίεσης ή βάρους και συχνά αντανακλάται σε διάφορα μέρη του σώματος, συνήθως στο αριστερό άνω άκρο. Ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες εμφανίζεται η στηθάγχη μπορεί να χαρακτηριστεί σταθερή ή ασταθής. Όταν ο πόνος αυτός εμφανίζεται σε συνθήκες αυξημένων αναγκών οξυγόνου, όπως για παράδειγμα σε κρύο περιβάλλον, μετά από άσκηση ή σε καταστάσεις στρες και παραμένει σταθερός για μεγάλο χρονικό διάστημα (2-3 μήνες) γίνεται λόγος για σταθερή στηθάγχη. Συνήθως, διαρκεί κάτω από 20 λεπτά και βελτιώνεται με την ανάπαυση. Η σταθερή στηθάγχη εμφανίζεται όταν υπάρχει τουλάχιστον μία εγκατεστημένη στένωση στις στεφανιαίες αρτηρίες με αθηρωματικές πλάκες σκληρής υφής, ενώ η εμφάνιση των συμπτωμάτων προϋποθέτει στένωση >70%. Αντίθετα, ο όρος ασταθής στηθάγχη χρησιμοποιείται όταν ο στηθαγχικός πόνος εμφανίζεται σε καταστάσεις ηρεμίας με ταυτόχρονη αύξηση της διάρκειας, της έντασης και της συχνότητας των συμπτωμάτων. Αποτελεί μία πιο επικίνδυνη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου,

καθώς συναντάται σε καταστάσεις με τουλάχιστον μία στένωση >70% στις στεφανιαίες αρτηρίες από αθηρωματικές πλάκες μαλακής υφής, οι οποίες όμως είναι πιο εύκολο να σπάσουν και να προκαλέσουν θρόμβωση.

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί μία άλλη συχνή κλινική εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου και είναι επακόλουθο της οξείας απόφραξης των στεφανιαίων αρτηριών. Πιο συγκεκριμένα, αφορά την διακοπή της αιματικής ροής στα στεφανιαία αγγεία περιφερικά της απόφραξης, η οποία αν δεν αποκατασταθεί άμεσα οδηγεί τελικά σε ισχαιμική νέκρωση.

Η απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών παρατηρείται, κυρίως, σε άτομα με ήδη εγκατεστημένη αθηρωμάτωση. Συνήθως, κάποια αθηρωματική πλάκα προκαλεί την ανάπτυξη ενός τοπικού πηγματος αίματος, το οποίο ονομάζεται θρόμβος και συνήθως αρχίζει σε σημεία, όπου η αθηρωματική πλάκα έχει αυξηθεί τόσο πολύ ώστε να σπάσει τον έσω χιτώνα και να έρθει σε επαφή με το αίμα. Εκεί, λόγω της μη λείας επιφάνειας της πλάκας αρχίζουν να προσκολλώνται κύτταρα του αίματος, με αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση του θρόμβου και τελικά την απόφραξη της αρτηρίας. Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, γίνεται ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, ο θρόμβος αποκολλάται από αυτήν και μετατοπίζεται σε κάποιο περιφερικό αγγείο του στεφανιαίου δικτύου, φράζοντας τελικά την αρτηρία στο σημείο που θα σφηνωθεί (87).

Το Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εκδηλώνεται, συνήθως, με τυπική στηθάγχη, θωρακικό άλγος δηλαδή, παρατεταμένης όμως διάρκειας και έντασης, ενώ συχνά συνοδεύεται από αντανακλαστικό πόνο σε άλλα μέρη του σώματος, όπως τα άνω άκρα, το σαγόνι, ο λαιμός, η πλάτη, η κοιλιά κ.α., καθώς και ζάλη, εφίδρωση, ναυτία και δύσπνοια. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να είναι και ασυμπτωματικό, γνωστό ως «σιωπηλό έμφραγμα του μυοκαρδίου» το οποίο είναι πιο συχνό σε ηλικιωμένους ανθρώπους και σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη.

Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος, αποτελεί μία όχι και τόσο σπάνια επιπλοκή της στεφανιαίας νόσου. Σύμφωνα με την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρεία, η Στεφανιαία Νόσος και οι επιπλοκές της ευθύνονται για το 80% των αιφνίδιων

καρδιακών θανάτων, ενώ οι μισοί, περίπου, θάνατοι που οφείλονται σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εκδηλώνονται ως αιφνίδιοι θάνατοι. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στο ¼ περίπου των περιπτώσεων, ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος αποτελεί την πρώτη και μοναδική εκδήλωση της νόσου (88).

2.1.3 Επιδημιολογικά Στοιχεία

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα συνιστούν ακόμα και σήμερα ένα μείζον θέμα δημόσιας υγείας, καθώς αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν υπεύθυνα για το 1/3 περίπου των θανάτων για το 2016, το οποίο ισοδυναμεί με 17,9 εκατομμύρια θανάτους ανά τον κόσμο, με το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο να ευθύνονται για το 85 % αυτών (89).

Στις ΗΠΑ, σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) (90), 1 στις 5 γυναίκες και 1 στους 4 άντρες πέθαναν από καρδιακή νόσο το έτος 2017, ενώ το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Καρδιάς, δήλωσε ότι τα καρδιαγγειακά νοσήματα οδήγησαν σε 3,8 εκατομμύρια θανάτους, το οποίο αντανakλά στο 45% των θανάτων για το ίδιο έτος (91).

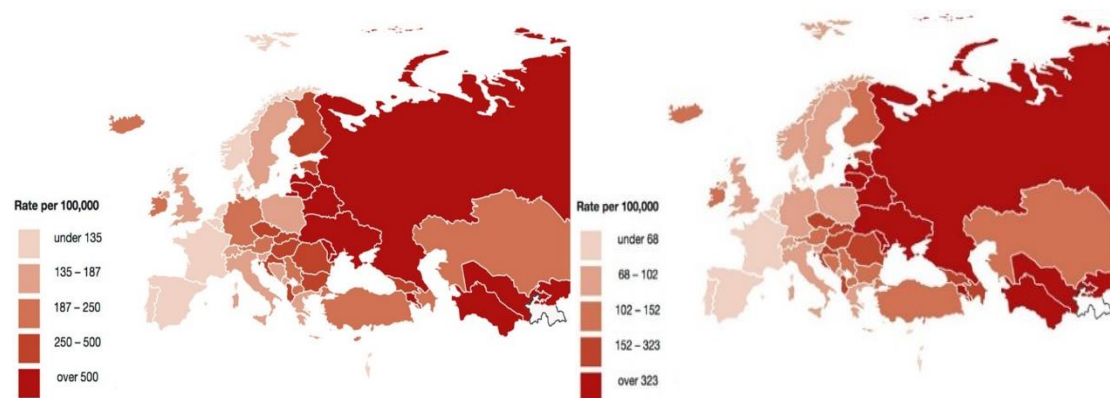
Παρόλο που σε χώρες υψηλού εισοδήματος της Δυτικής Ευρώπης παρατηρήθηκε μία μείωση των ετήσιων θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα από το 1990-2013, σε παγκόσμιο επίπεδο σημειώθηκε αύξηση κατά 41%, η οποία ήταν αποτέλεσμα κατά 55% της αύξησης του προσδόκιμου ζωής και κατά 25% της αύξησης του πληθυσμού. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα καρδιαγγειακά νοσήματα θα παραμένουν μία παγκόσμια απειλή, όσο αυξάνεται ο πληθυσμός και η ηλικία (92).

Τα τελευταία διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν ότι κάθε χρόνο πεθαίνουν από καρδιαγγειακά νοσήματα πάνω από 3,8 εκ. άνθρωποι στις 47 χώρες μέλη της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Καρδιολογίας (ESC). Από το μεγάλο φάσμα των καρδιαγγειακών νοσημάτων, η στεφανιαία νόσος ήταν η πρώτη αιτία θανάτου, υπεύθυνη για το 20% των θανάτων, ενώ ακολουθούσε το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (11% όλων των θανάτων). Η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα βρέθηκε υψηλότερη στο γυναικείο φύλο (49 % των συνολικών θανάτων) σε σχέση με

το ανδρικό (40 % των συνολικών θανάτων). Περισσότερες γυναίκες πέθαναν από εγκεφαλικό επεισόδιο (13% σε σχέση με άνδρες 9%), ενώ η ισχαιμική καρδιοπάθεια οδήγησε περίπου σε παρόμοιο αριθμό θανάτων και στα δύο φύλα. Επιπλέον, η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν υψηλότερη σε χώρες μεσαίου εισοδήματος σε σχέση με τις υψηλού εισοδήματος χώρες και για τα δύο φύλα. Παρόλο που το 65% των ετήσιων θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα συμβαίνει σε ηλικίες άνω των 75 ετών, περίπου 1,3 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο πριν την ηλικία των 75 και 653 χιλιάδες πριν την ηλικία των 65 ετών. Τα παραπάνω δεδομένα καθιστούν τα καρδιαγγειακά νοσήματα την κύρια αιτία πρόωρου θανάτου, ο οποίος είναι πιο συχνός στους άνδρες σχέση με τις γυναίκες με την ισχαιμική καρδιοπάθεια να είναι η πρώτη αιτία θανάτου και για τα δύο φύλα (92).

Το 2015, πάνω από 83 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με καρδιαγγειακά νοσήματα στην Ευρώπη, με το 43% περίπου να νοσεί από περιφερειακή αγγειακή νόσο και το 35% από ισχαιμική καρδιοπάθεια. Στο σύνολο τους τα καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν πιο συχνά στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Ωστόσο, οι γυναίκες εμφάνιζαν συχνότερα περιφερική αγγειακή νόσος, σε αντίθεση με τους άνδρες, στους οποίους ήταν συχνότερη η στεφανιαία νόσος. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ χωρών υψηλού και μεσαίου εισοδήματος, με τις τελευταίες να έχουν περισσότερα περιστατικά, συνολικά, καρδιαγγειακών νοσημάτων, αλλά και μεμονωμένα ισχαιμικής καρδιοπάθειας και εγκεφαλικού και στα δύο φύλα.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Καρδιολογίας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα παρουσίαζαν μία σταθερή αύξηση από το 1990 έως το 2015, με εξαίρεση



Εικόνα 23: Θάνατοι ανδρών (αριστερά) και γυναικών (δεξιά) από στεφανιαία νόσο στην Ευρώπη (91).

λίγες χώρες της Ευρώπης, όπως η Λετονία, όπου παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση στους άνδρες, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γεωργία, η Γερμανία και η Δανία. Το 2015 τα νέα περιστατικά καρδιαγγειακών νοσημάτων έφτασαν τα 11 εκατομμύρια, με βάση τα στοιχεία που ήταν διαθέσιμα από 47 χώρες, εκ των οποίων περίπου τα μισά ήταν περιστατικά στεφανιαίας νόσου και το 14% αφορούσε το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν περισσότερα νέα περιστατικά καρδιαγγειακών νοσημάτων στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, αλλά στο ανδρικό φύλο ήταν πιο συχνή η εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε σχέση με τις γυναίκες, οι οποίες εμφάνιζαν συχνότερα αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Όσον αφορά στο κατά κεφαλήν εισόδημα, παρατηρήθηκε αύξηση της εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων τόσο σε υψηλού, όσο και σε μεσαίου εισοδήματος χώρες, με τις τελευταίες όμως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη αύξηση. Συγκεκριμένα, τα νέα περιστατικά καρδιαγγειακών νοσημάτων στις γυναίκες αυξήθηκαν στις χώρες υψηλού και μεσαίου εισοδήματος κατά 11% και 22%, ενώ στους άνδρες κατά 17% και 26%, αντίστοιχα (92).

2.2. Παράγοντες Κινδύνου

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, παράγοντας κινδύνου ονομάζεται οποιοδήποτε ιδιότητα, χαρακτηριστικό ή κατάσταση στην οποία εκτίθεται ένα άτομο, το οποίο μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα εμφάνισης κάποιας ασθένειας ή τραυματισμού. Πιο συγκεκριμένα για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, πλήθος παραγόντων έχει βρεθεί μέχρι σήμερα να συμβάλλει στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου, όπως το φύλο και η ηλικία και σε τροποποιήσιμους παράγοντες, οι οποίοι περιλαμβάνουν τόσο κλινικούς δείκτες, όπως η υπέρταση και η δυσλιπιδαιμία, όσο και συμπεριφορές, όπως το κάπνισμα.

2.2.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα συμπεριλαμβάνονται το φύλο, η ηλικία, η φυλή/εθνικότητα και το οικογενειακό ιστορικό.

- **Φύλο:**

Το ανδρικό φύλο έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και μάλιστα σε μικρότερη ηλικία σε σχέση με τις γυναίκες. Ωστόσο, ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων στις γυναίκες, ίσως έχει υποτιμηθεί, καθώς τα ποσοστά καρδιαγγειακών νοσημάτων και στα δύο φύλα δεν παρουσιάζουν τόσο μεγάλες διαφορές. Ίσως, κάποιοι παράγοντες κινδύνου να έχουν άλλη βαρύτητα ανάλογα με το φύλο, όπως για παράδειγμα η παρουσία διαβήτη, όπου φαίνεται να αυξάνει περισσότερο τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (93). Η μικρότερη εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας αποδίδονται μάλλον στην προστατευτική δράση των οιστρογόνων, ενώ οι διαφορές ως προς το φύλο φαίνεται να εξομαλύνονται με την αύξηση της ηλικίας (94).

- **Ηλικία:**

Άτομα μεγαλύτερης ηλικίας έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων σε σχέση με πιο νέα άτομα. Οι περισσότεροι θάνατοι, που οφείλονται στη Στεφανιαία νόσο, συμβαίνουν σε ηλικία άνω των 65 ετών. Ωστόσο, παρατηρούνται κάποιες διαφορές ανάλογα με το φύλο, καθώς στους άνδρες ο κίνδυνος αυξάνεται σε ηλικία >45 ετών, ενώ στις γυναίκες >55. Επιπλέον, γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας έχουν υψηλότερη πιθανότητα να πεθάνουν από καρδιακή προσβολή σε σχέση με άνδρες αντίστοιχης ηλικίας.

- **Οικογενειακό ιστορικό:**

Υπάρχει γενετικό υπόβαθρο στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθιστώντας έτσι το οικογενειακό ιστορικό παράγοντα κινδύνου. Ένα άτομο το οποίο έχει συγγενή πρώτου βαθμού με κάποιον, ο οποίος ανέπτυξε καρδιαγγειακή νόσο σε σχετικά μικρή ηλικία (άνδρες < 55 και γυναίκες <65 ετών), έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσει το ίδιο καρδιαγγειακή νόσο. Επιπλέον, το οικογενειακό ιστορικό άλλων παραγόντων κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η αρτηριακή υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης, επίσης αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης

μεμονωμένα αυτών των νοσημάτων και κατ' επέκταση καρδιαγγειακής νόσου (93).

- **η φυλή/εθνικότητα:**

Άτομα με καταγωγή από την Νότια Ασία, την Αφρική ή την Καραϊβική παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθώς και Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II, ο οποίος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τη καρδιαγγειακή νόσο (93). Επιπλέον, άτομα Αφροαμερικανικής καταγωγής έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, καθώς παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα αρτηριακής πίεσης σε σχέση με την Καυκάσια φυλή (95).

2.2.2. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Οι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου έχει βρεθεί ότι εξηγούν πάνω από το 90% του κινδύνου για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και περιλαμβάνουν τόσο συμπεριφοριστικούς (πχ. Σωματική αδράνεια, χρήση καπνού, κακή διατροφή κ.α.), όσο και κλινικούς παράγοντες (πχ. Σακχαρώδης Διαβήτης, Υπέρταση, Δυσλιπιδαιμία κ.α.) (92).

Κλινικοί Παράγοντες κινδύνου

- **Δυσλιπιδαιμία:**

Ο όρος δυσλιπιδαιμία εκφράζει τα διαταραγμένα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα και περιλαμβάνει συνήθως αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low-density-lipoprotein-cholesterol, LDL-C) και τριακυλογλυκερολών, καθώς και μειωμένα επίπεδα υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (high-density-lipoprotein-cholesterol, HDL-C). Μεταξύ όλων των τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου για τα καρδιαγγειακά, τα διαταραγμένα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα, φαίνεται να σχετίζονται με τον υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου (96). Το 1/3 περίπου των περιστατικών στεφανιαίας νόσου παγκοσμίως αποδίδεται στα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Μείωση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης κατά 10% σε άνδρες μέσης ηλικίας μπορεί να οδηγήσει σε μείωση κατά 50% στα ποσοστά

καρδιαγγειακής νόσου μέσα σε 5 χρόνια. Ωστόσο, με την αύξηση της ηλικίας η επίδραση της μείωσης των επιπέδων ολικής χοληστερόλης στο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων περιορίζεται (97).

Η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας έχει πλέον αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό την ολική χοληστερόλη για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η αύξηση των επιπέδων της είναι συνήθως αποτέλεσμα ανθυγιεινής διατροφής, πλούσιας σε κορεσμένα και trans λιπαρά, απουσίας φυσικής δραστηριότητας, χρήσης καπνού και υψηλής κατανάλωσης αλκοόλ και έχει συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ανακοπής και ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (95). Τα μόρια της LDL χοληστερόλης στην κυκλοφορία έχουν αθηρογόνο δράση στον οργανισμό, καθώς μπορούν να διεισδύσουν στο ενδοθήλιο των αρτηριών, να οξειδωθούν και να προωθήσουν τη φλεγμονώδη απόκριση, προκαλώντας βλάβη στον αρτηριακό ενδοθήλιο και στα γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα. Παρατεταμένη αύξηση της LDL έχει άμεση σχέση με την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας, οδηγώντας έτσι σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (96). Η Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), είναι γνωστή για τις αντιοξειδωτικές και τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της, οι οποίες μπορούν να καταστείλουν την αθηροσκλήρωση, καθώς είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από την κυκλοφορία και την μεταφορά της στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς (98). Η αύξηση στα επίπεδα της HDL έχει φανεί να σχετίζονται με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, ενώ η προστατευτική δράση των οιστρογόνων σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της HDL (99).

- **Αυξημένη Αρτηριακή Πίεση:**

Η αυξημένη πίεση αίματος αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα κινδύνου στο φάσμα των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης παρουσιάζουν μία συνεχή γραμμική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου (92), αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (99), καρδιακής ανεπάρκειας και καρδιακής προσβολής

(93), ενώ αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο, οδηγώντας περίπου στα μισά περιστατικά ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (99). Η αυξημένη πίεση αίματος στα αιμοφόρα αγγεία, μπορεί να οδηγήσει σε σκλήρυνση των αρτηριακών τοιχωμάτων και στένωση των αρτηριών, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα φραγής κάποιας αρτηρίας είτε από θρόμβους αίματος, είτε από θραύσματα λιπώδους υλικού, τα οποία μπορεί να αποσπαστούν από τα τοιχώματα των αρτηριών. Επιπλέον, η αρτηριακή βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε εξασθένιση κάποιου τμήματος της αρτηρίας, καθιστώντας το πιο εύκολο να σπάσει ή σε διάταση κάποιου τμήματος στο αρτηριακό τοίχωμα, το οποίο προοδευτικά μπορεί να οδηγήσει σε ανεύρυσμα (99).

Η αρτηριακή υπέρταση, συνήθως σχετίζεται με αυξημένο βάρος σώματος, απουσία φυσικής δραστηριότητας, αυξημένη κατανάλωση αλατιού ή αλκοόλ, καθώς και με οικογενειακό ιστορικό της πάθησης, αλλά μπορεί να είναι και συνέπεια κάποιας άλλης παθολογικής κατάστασης, όπως μη φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας. Πιθανόν λοιπόν, αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, η μείωση κατανάλωσης αλατιού και αλκοόλ και η διακοπή του καπνίσματος, μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης (93). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (100) 1,13 δισεκατομύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν υπέρταση, ενώ αποτελεί την κύρια αιτία πρόωρου θανάτου. Σήμερα, η αυξημένη πίεση αίματος αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου και την εμφάνιση εγκεφαλικού επεισοδίου. Ωστόσο, όταν συνυπάρχει με παχυσαρκία, Σακχαρώδη Διαβήτη II, δυσλιπιδαιμία ή κάπνισμα ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται εκθετικά (95).

- **Σακχαρώδης Διαβήτης II:**

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη, η παρουσία ΣΔII αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων κατά 2 με 3 φορές (101), ενώ η ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου αποτελεί την πιο συχνή επιπλοκή του ΣΔ II και την κύρια

αιτία θανάτου σε διαβητικούς. Μάλιστα, η αύξηση του κινδύνου είναι υψηλότερη σε γυναίκες, καταστέλλοντας την καρδιοπροστατευτική δράση των οιστρογόνων πριν την εμμηνόπαυση. Η αρτηριακή υπέρταση, τα διαταραγμένα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα και η παχυσαρκία, που αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, εμφανίζονται πιο συχνά σε διαβητικούς ασθενείς, καθιστώντας τις δύο αυτές παθήσεις άμεσα συνδεδεμένες (99).

Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που χαρακτηρίζει τη διαβητική κατάσταση, φαίνεται ότι ενισχύει το σύστημα πήξης του αίματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος δημιουργίας θρόμβων, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί οξειδωτικό στρες, και κατ' επέκταση δυσλειτουργία στο ενδοθήλιο, που αποτελεί πρωταρχικό στάδιο στην πορεία της αθηροσκλήρωσης (102).

Η προσκόλληση σε μία ισορροπημένη διατροφή, η απώλεια βάρους, η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, η διακοπή του καπνίσματος και γενικά η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής μπορεί να ρυθμίσει τον διαβήτη ή να αναστρέψει μία προδιαβητική κατάσταση και συνεπώς, να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου (93). Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Καρδιάς, η διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα, μπορεί να μειώσει το κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο κατά 42 % και τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής προσβολής, εγκεφαλικού επεισοδίου ή θανάτου κατά 57 % (99).

- **Υπέρβαρο/Παχυσαρκία**

Το υπερβάλλον σωματικό βάρος και κυρίως η παχυσαρκία αποτελεί ακόμα έναν κύριο παράγοντα κινδύνου, τόσο για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όσο και για την πλειοψηφία των μη μεταδοτικών χρόνιων νοσημάτων, όπως Σακχαρώδης Διαβήτης II και η δυσλιπιδαιμία, ενώ αποτελεί πλέον, μετά το κάπνισμα, την δεύτερη αιτία πρόωρου θανάτου στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ (92).

Για την αξιολόγηση της, χρησιμοποιείται κυρίως ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), σύμφωνα με τον οποίο το υπέρβαρο ορίζεται με $\Delta\text{ΜΣ} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ και η παχυσαρκία $\Delta\text{ΜΣ} \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Τα περιστατικά της παχυσαρκίας παρουσιάζουν

μία εκθετική πορεία και μάλιστα έχουν σχεδόν τριπλασιαστεί από το 1975. Το 2017, περίπου 400 εκ. ενήλικες ήταν παχύσαρκοι και 1 δις εκ. ήταν υπέρβαροι, παγκοσμίως.

Σημαντική αύξηση παρουσιάζει και η παχυσαρκία σε παιδιά και εφήβους, η οποία φαίνεται να σχετίζεται και με αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρδιακής νόσου στην ενήλικη ζωή (103). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δήλωσε για το 2016, ότι 41 εκ. παιδιά κάτω από την ηλικία των 5 ετών και πάνω από 340 εκ. παιδιά και έφηβοι 5-19 ετών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (104).

Αυξημένο ΔΜΣ στην παιδική ηλικία έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου στην ενήλικη ζωή, ενώ στην εφηβική ηλικία ο κίνδυνος θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο φαίνεται να διπλασιάζεται (105).

Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η υπέρταση, ο Σακχαρώδης Διαβήτης II και η δυσλιπιδαιμία, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Η μείωση, λοιπόν, του σωματικού βάρους, ακόμα σε μικρά επίπεδα της τάξης 3-5% μπορεί να βελτιώσει σημαντικά πολλούς δείκτες καρδιαγγειακής υγείας (95).

Συμπεριφοριστικοί Παράγοντες κινδύνου

- **Κάπνισμα:** Η χρήση καπνού αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου γενικά για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά και για αιφνίδιο καρδιακό θάνατο σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Τα άτομα που κάνουν χρήση καπνού φαίνεται να έχουν 2-4 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, καθώς και 2-3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας από αυτή σε σχέση με μη καπνιστές. Ακόμα και το παθητικό κάπνισμα φαίνεται να οδηγεί ετησίως στο θάνατο από στεφανιαία νόσο περίπου 46 χιλιάδες μη καπνιστές στις ΗΠΑ (106). Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι ανάλογος με την ποσότητα και συχνότητα καπνίσματος. Ωστόσο, μία πρόσφατη μετανάλυση έδειξε ότι ακόμα και το κάπνισμα ενός μόνο τσιγάρου ημερησίως οδηγούσε σε αρκετά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης

καρδιαγγειακής νόσου, περίπου μάλιστα τον μισό από αυτόν που θα είχε ένα άτομο καπνίζοντας 20 τσιγάρα την ημέρα (107). Φαίνεται λοιπόν, ότι δεν υπάρχει κάποιο ασφαλές επίπεδο καπνίσματος σε σχέση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα και τα άτομα που καπνίζουν πρέπει να στοχεύουν στη διακοπή και όχι απλά στη μείωση του καπνίσματος, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης κάποιας καρδιαγγειακής νόσου. Μάλιστα, μία πρόσφατη μελέτη κοορτής έδειξε ότι η διακοπή του καπνίσματος μείωνε σημαντικά τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν κλινικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων που δεν κάπνισαν ποτέ, των ατόμων που έκοψαν πρόσφατα το κάπνισμα και των πρώην καπνιστών, υποδεικνύοντας ότι η διακοπή του καπνίσματος είναι πολύ σημαντική για την πρόληψη των νοσημάτων της καρδιάς και των αγγείων (108).

- **Απουσία Φυσικής Δραστηριότητας**

Η καθιστική ζωή αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς αυξάνει την πιθανότητα κάποιου να γίνει υπέρβαρος, να εμφανίσει υπέρταση και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Από την άλλη πλευρά, η συχνή μέτρια προς έντονη άσκηση συμβάλλει σημαντικά τόσο στη μείωση του βάρους και της πίεσης, στη βελτίωση των επιπέδων των λιπιδίων και της γλυκόζης στο αίμα, ενώ μπορεί να βελτιώσει την υγεία των αιμοφόρων αγγείων και να μειώσει τη φλεγμονή, η οποία είναι εναρκτήριοι παράγοντες στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου (93). Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Καρδιάς, 150 λεπτά την εβδομάδα άσκηση μέτριας έντασης, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο κατά 30 %. Ωστόσο, ακόμη και μικρή αύξηση της φυσικής δραστηριότητας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (99).

- **Διατροφή**

Η διατροφή κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη, όσο και στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η προσκόλληση σε μία διατροφή, η οποία είναι πλούσια σε κορεσμένα και trans λιπαρά, απλούς υδατάνθρακες και πρόσθετα σάκχαρα, και φτωχή σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και φυτικές ίνες φαίνεται να σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου

εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Μια ισορροπημένη διατροφή, τόσο σε επίπεδο ενέργειας, όσο και σε επίπεδο μακρο - και μικρο - θρεπτικών συστατικών, μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις σε άλλους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η παχυσαρκία, τα διαταραγμένα επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων στο αίμα και η αρτηριακή πίεση και κατ' επέκταση να μειώνει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Ένα τέτοιο πρότυπο είναι το Μεσογειακό, το οποίο βασίζεται σε τροφές όπως ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά, όσπρια και δημητριακά ολικής άλεσης, γαλακτοκομικά και ψάρια, ενώ η κατανάλωση κόκκινου κρέατος, απλών υδατανθράκων και πρόσθετων σακχάρων είναι περιορισμένη (95,99).

- **Αλκοόλ**

Η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ έχει φανεί ότι έχει αρνητικές επιδράσεις τόσο στη καρδιαγγειακή νόσο, αλλά και γενικά σε διάφορα νοσήματα και ευθύνεται για 1 στους 10 πρόωρους θανάτους στις ΗΠΑ μεταξύ ενηλίκων (92). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι αυξάνει την πίεση του αίματος και τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα, ενώ έχει συσχετιστεί με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικού επεισοδίου και αρρυθμίας. Ωστόσο, η μικρή προς μέτρια κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να έχει προστατευτική δράση και να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και θα αναλυθεί παρακάτω εκτενέστερα (109).

- **Στρες**

Το αυξημένο άγχος φαίνεται να σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Παρόλο που η μεταξύ τους σχέση δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη, έχει βρεθεί ότι μπορεί να επηρεάσει άλλους παράγοντες κινδύνου, που είναι γνωστό ότι αυξάνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, όπως η αρτηριακή πίεση. Επιπλέον, πολλοί άνθρωποι σε κατάσταση στρες τείνουν να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες φαγητού και να ακολουθούν μία πιο «ανθυγιεινή» διατροφή, να αυξάνουν την κατανάλωση αλκοόλ, να καπνίζουν περισσότερο και να μην αθλούνται (106).

2.3. Αθροισκλήρωση – Παθοφυσιολογικοί Μηχανισμοί

2.3.1 Ορισμοί

Η αθηροσκλήρωση είναι μία πολυπαραγοντική παθολογική διαδικασία, η οποία αποτελεί την αιτία πολλών καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ο όρος αυτός αφορά μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο των αρτηριακών τοιχωμάτων, κατά την οποία η συσσώρευση αθηρωματικού υλικού, δηλαδή εναπόθεση λιποειδών ή/ και ινωδών γραμμώσεων στο ενδοθήλιο (110), οδηγεί στην δημιουργία πλάκων, οι οποίες στενεύουν τον αυλό της αρτηρίας και μπορούν να οδηγήσουν σε οξείες κλινικές εκδηλώσεις, μέσω ρήξης της πλάκας κι θρόμβωσης (111). Οι αθηρωματικές πλάκες αποτελούνται από μεγάλο αριθμό παθολογικών κυττάρων, όπως λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα, από εναπόθεση χοληστερόλης και άλλων λιπαρών ουσιών, καθώς και πυκνά στρώματα συνδετικού ιστού στη θεμέλια ουσία των κυττάρων (112). Οι αθηρωματικές πλάκες εντοπίζονται κυρίως σε θέσεις αυξημένης τάσης, όπως σε σημεία που κάμπτεται ή διακλαδίζεται το αγγείο, ενώ παρατηρούνται σε όλα σχεδόν τα άτομα, άνω της ηλικίας των 20 ετών (111).

Έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί για την έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, ωστόσο σύμφωνα με τον επικρατέστερο σήμερα η αθηροσκλήρωση είναι αποτέλεσμα τριών βασικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών, οι οποίοι είναι η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η θρόμβωση.

Δύο σημεία κλειδιά, που φαίνεται να έχουν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη, αλλά και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης είναι τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή, καθώς και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (**Platelet Activating Factor, PAF**). Ο παράγοντας αυτός είναι ένας ισχυρός λιποειδικός μεσολαβητής της φλεγμονής, που έχει φανεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθ' όλη την πορεία της αθηροσκλήρωσης (113).

Η διαδικασία του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας θα μπορούσε να περιγραφεί σε 6 βασικά βήματα:

1. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
2. Διήθηση μορίων LDL και λευοκυττάρων εσωτερικά του ενδοθηλίου
3. Οξείδωση των μορίων LDL
4. Δημιουργία αφρωδών κυττάρων
5. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων στο υποενδοθήλιο

6. Βλάβη στη δομή του ενδοθηλίου, που οδηγεί σε συσσώρευση αιμοπεταλίων και δημιουργία θρόμβου.

2.3.2. Περιγραφή Αθηροσκλήρωσης στο επίπεδο του αγγείου

2.3.2.1 Ενδοθηλιακή Δυσλειτουργία

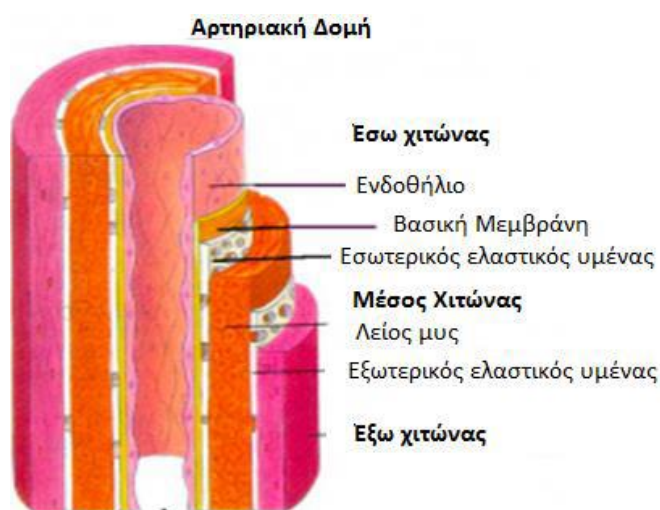
Φυσιολογικά, το τοίχωμα των αρτηριών αποτελείται από 3 στιβάδες, τον Έξω, τον Μέσο και τον Έσω χιτώνα, οι οποίοι χωρίζονται μεταξύ τους από έναν ελαστικό υμένα (Έσω και Έξω υμένας, αντίστοιχα).

Ο Έξω χιτώνας αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα και περιέχει νευρικές απολήξεις και μαστοκύτταρα. Ο Μέσος χιτώνας αποτελείται κυρίως από στοιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων και μία καλά οργανωμένη εξωκυττάρια μήτρα, η οποία περιλαμβάνει ελαστίνη, κολλαγόνο και άλλα μακρομόρια. Τέλος, ο Έσω χιτώνας, αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία εσωτερικά καλύπτονται από μία στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, που διαχωρίζουν τον αγγειακό αυλό με τη ροή του αίματος (87,111).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιτελούν πολλές σημαντικές λειτουργίες. Αρχικά, χρησιμεύουν ως φραγμός μεταξύ των συστατικών του αίματος της κυκλοφορίας και του υπόλοιπου αγγειακού συστήματος, ρυθμίζοντας την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, τελικών προϊόντων του μεταβολισμού και υγρών ανάμεσα στο πλάσμα

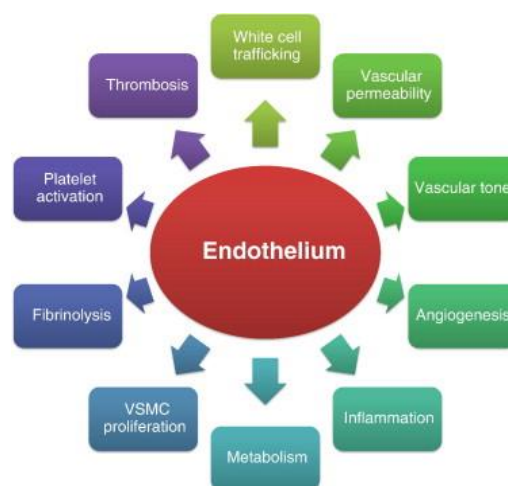
και στο μεσοκυττάριο υγρό.

Επιπλέον, το ενδοθήλιο αποτελεί έναν ανεξάρτητο ενδοκρινή αδέν, ο οποίος εκκρίνει πλήθος ουσιών, που δρουν τοπικά ή σε γειτονικά κύτταρα, στο τοίχωμα και στον αυλό του αγγείου. Πιο αναλυτικά, είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του αγγειακού



Εικόνα 24: Δομή του ενδοθηλίου (87).

τόνου, εκκρίνοντας αγγειοδιασταλτικές ουσίες, όπως προστακυκλίνη και μονοξείδιο του αζώτου και αγγειοσυσπαστικές ουσίες, όπως ενδοθηλίνη-1. Επιπλέον, ρυθμίζει τη ρευστότητα και πήξη του αίματος, μέσω της παραγωγής ουσιών, που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων (μεταξύ των οποίων και τον PAF), στους καταρράκτες πήξης και στο ινωδολυτικό σύστημα (πχ. t-Pa). Τέλος, ρυθμίζει την φλεγμονώδη απόκριση, μέσω έκκρισης κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης (114,115).

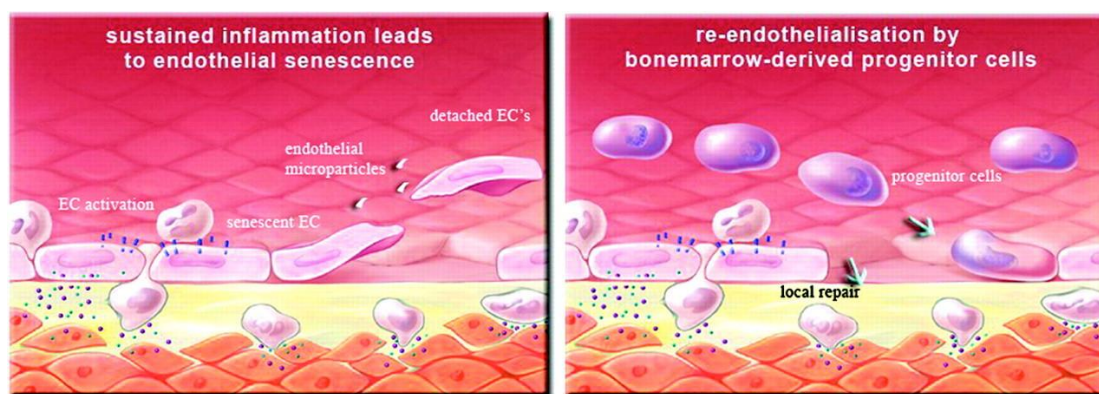


Εικόνα 25: Φυσιολογικές Λειτουργίες του ενδοθηλίου (14).

Ο όρος ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αφορά, ουσιαστικά, την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, η οποία υπό συνθήκες, μπορεί να συμβάλλει στην καρδιαγγειακή νόσο. Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου περιγράφει, ουσιαστικά, τη μετάβαση από μία κατάσταση ηρεμίας σε μία κατάσταση ενεργοποίησης, η οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα της απόκρισης του οργανισμού, είτε σε κάποιο ξενιστή είτε στην επίδραση διαφόρων παραγόντων κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μόριο κλειδί στην διαδικασία αυτή είναι η ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου. Σε κατάσταση ηρεμίας του ενδοθηλίου το ένζυμο αυτό συνθέτει μονοξείδιο του αζώτου το οποίο αντιδρά με ομάδες κυστεΐνης διαφόρων ρυθμιστικών μορίων, τα οποία οδηγούν σε καταστολή των κυτταρικών διεργασιών. Στη διαδικασία ενεργοποίησης του ενδοθηλίου, υπερισχύουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες δημιουργούνται είτε από οξειδάσες, είτε από τη μη συζευγμένη μορφή της e-NOS (BH₄, τετραυδροβιοπτερίνη). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως και το NO, μπορούν να διαχέονται γρήγορα μέσα από τα κύτταρα και αντιδρούν με ομάδες κυστεΐνης διαφόρων πρωτεϊνών, όπως του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και κάποιων φωσφατασών οδηγώντας στην ενεργοποίηση του ενδοθηλίου.

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών, συνήθως είναι σε ισορροπία με την δισμουτάση του υπεροξειδίου του Υδρογόνου (SOD), η οποία μετατρέπει τις ελεύθερες ρίζες σε μοριακό οξυγόνο (O₂) ή σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Ωστόσο, διάφορες μεταβολικές διαταραχές, που εντοπίζονται σε πολλούς

παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η υπεργλυκαιμία και αυξημένη κυκλοφορία ελεύθερων λιπαρών οξέων, η αυξημένη αρτηριακή πίεση και το κάπνισμα, μπορούν να διαταράξουν αυτήν την ισορροπία. Η χρόνια παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση των κυτταρικών αποθεμάτων σε αντιοξειδωτικά και κατ' επέκταση να συμβάλλει στην ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου, μέσω της παρατεταμένης ενεργοποίησης του ενδοθηλίου και της φλεγμονής, τα οποία τελικά να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Η παρατεταμένη φλεγμονή και το αυξημένο οξειδωτικό στρες μπορούν να οδηγήσουν όχι μόνο σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αλλά και σε απώλεια της ακεραιότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία μπορεί να οδηγηθούν σε απόπτωση και τελικά σε τραυματισμό του ενδοθηλίου (116).

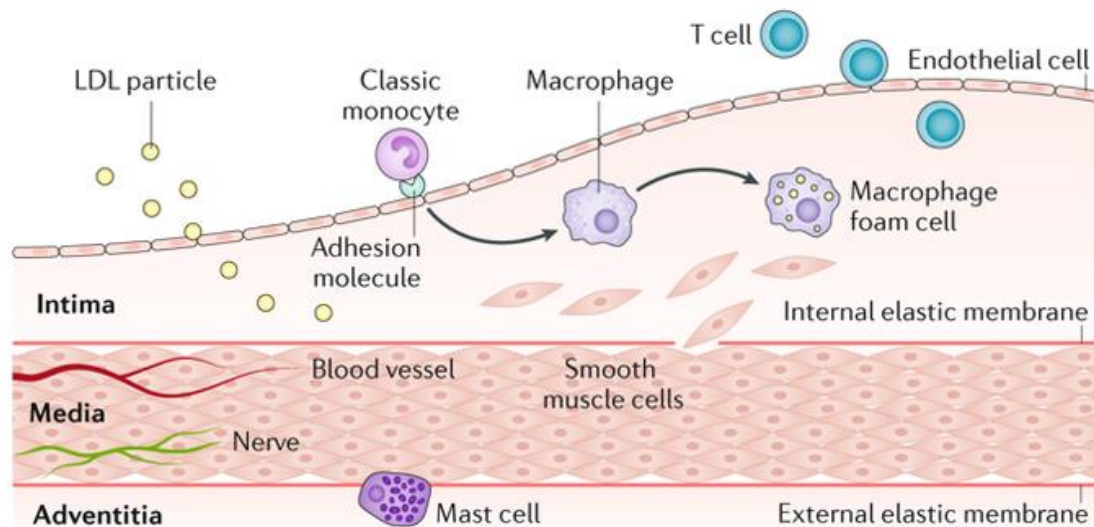


Εικόνα 26: Η παρατεταμένη φλεγμονή οδηγεί σε βλάβη του ενδοθηλίου (αριστερά). Τοπική επιδιόρθωση του ενδοθηλίου στο σημείο της βλάβης (δεξιά) (116).

2.3.2.2 Διήθηση μορίων LDL και λευκοκυττάρων

Το δυσλειτουργικό ή/και τραυματισμένο ενδοθήλιο χάνει πλέον το ρόλο του ως φραγμός και οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητάς του, επιτρέποντας την είσοδο ουσιών με αθηρογόνο δράση στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Η πιο κρίσιμη από αυτές είναι η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL.

Πολλά επιστημονικά δεδομένα τεκμηριώνουν το ρόλο της **LDL-C** στον μηχανισμό της αθηροσκλήρωσης. Όπως είναι γνωστό, η LDL χοληστερόλη είναι μία λιποπρωτεΐνη, η οποία μεταφέρει λιπίδια, κυρίως τριακυλογλυκερόλες και χοληστερόλη στα κύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η παρατεταμένη έκθεση των αρτηριών σε αυξημένα επίπεδα LDL, παραμένει ακόμα καθοριστικός



Εικόνα 27: Έναρξη και ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας (110).

παράγοντας στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Φυσιολογικά, τα μόρια της LDL εισέρχονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του υποδοχέα τους, ο οποίος εισχωρεί στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης, ενώ η συγκέντρωση της LDL ενδοκυττάρια και στο πλάσμα βρίσκονται σε ισορροπία. Η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, λόγω τραυματισμού ή δυσλειτουργίας, επιτρέπει την ανεξέλεγκτη είσοδο των μορίων LDL ή της οξειδωμένης LDL (oxLDL) εσωτερικά του ενδοθηλίου. Σε περίπτωση αυξημένου οξειδωτικού στρες και μειωμένης συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών, είτε λόγω μειωμένης ενδογενούς παραγωγής, είτε λόγω μειωμένης πρόσληψης μέσω της τροφής, η LDL μπορεί να υποστεί οξείδωση. Κατά την οξείδωση της LDL παράγεται PAF και οξειδωμένα φωσφολιπιδια που αποτελούν προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές και ευθύνονται για την προ-αθηρογόνο δράση της oxLDL (117).

Παράλληλα, λόγω της παρατεταμένης φλεγμονής παρατηρείται αύξηση της ροής του αίματος. Τα λευκοκύτταρα κινούνται πιο αργά μέσα στο αγγείο σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα και έρχονται σε συχνή επαφή με τα κύτταρα του ενδοθηλίου, πραγματοποιώντας μία ασθενή δέσμευση, μέσω μορίων προσκόλλησης που ονομάζονται σελεκτίνες και συγκεκριμένα πρόκειται για τις E-, P- και L- σελεκτίνες (118). Στην συνέχεια, η ασθενής πρόσδεση των λευκοκυττάρων οδηγεί σε αλλαγές στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε μία πιο ισχυρή προσκόλληση.

Στη συνέχεια ενεργοποιούνται λευκοκύτταρα του αίματος, και συγκεκριμένα μονοκύτταρα και T- λεμφοκύτταρα. Τα T- λεμφοκύτταρα εισέρχονται στον υπο-

ενδοθηλιακό χώρο και ρυθμίζουν λειτουργίες τόσο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όσο και των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων. Για την είσοδο τους απαιτείται η έκφραση μορίων προσκόλλησης, η οποία γίνεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ, που ενεργοποιείται με την πρόσδεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στον υποδοχέα τους, ο οποίος εντοπίζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι υποδοχείς των μορίων πρόσφυσης εκφράζονται στα ειδικά λευκοκύτταρα, σε λεία μυϊκά κύτταρα και σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα μόρια πρόσφυσης, έχουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και έκκριση χημειοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και μετανάστευση λευκοκυττάρων.

Ταυτόχρονα, μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα και συγκεκριμένα μονοκύτταρα με προφλεγμονώδη δράση, μπορούν να εισέλθουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, μέσω διαπίδυσης. Φυσιολογικά, τα λευκοκύτταρα του αίματος δεν μπορούν να προσκολληθούν στα κύτταρα του ενδοθηλίου. Ωστόσο, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν μόρια πρόσφυσης στην επιφάνειά τους, τα οποία δεσμεύουν τα λευκοκύτταρα της κυκλοφορίας. Χημειοτακτικές κυττοκίνες, που ονομάζονται χημειοκίνες, μπορούν να μεταφέρουν τα δεσμευμένα μονοκύτταρα εσωτερικά του ενδοθηλίου. Συγκεκριμένα, η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 (MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1) είναι μία από τις κύριες χημειοκίνες, που ρυθμίζουν τη μετανάστευση και τη διήθηση μονοκυττάρων/μακροφάγων (110,119).

2.3.2.3. Δημιουργία Αφρωδών κυττάρων

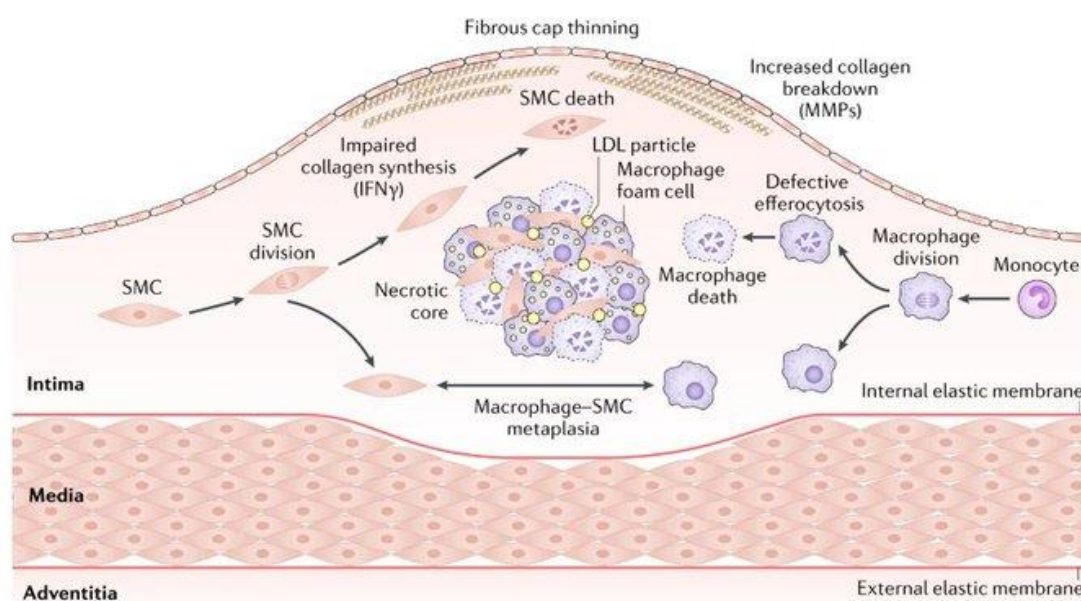
Τα μονοκύτταρα σταδιακά ωριμάζουν σε μακροφάγα, και εκκρίνουν υποδοχείς “εκκαθάρισης” (scavenger receptors), οι οποίοι δεσμεύουν τα οξειδωμένα μόρια της LDL και μετατρέπονται τελικά σε αφρώδη κύτταρα (foam cells). Η παραπάνω διαδικασία ρυθμίζεται με ένα σύστημα θετικής ανατροφοδότησης, καθώς τα μακροφάγα σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οξειδώνουν τα μόρια της LDL και σταδιακά περισσότερα μακροφάγα επιστρατεύονται για να δεσμεύσουν την οξειδωμένη LDL. Η εναπόθεση τέτοιων αφρωδών κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα οδηγεί στη δημιουργία λιποειδών ραβδώσεων, οι οποίες αποτελούν και το πρώτο στάδιο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας.

Τα μονοκύτταρα, εκτός από τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων, παράγουν και πλήθος ουσιών, όπως TNF- α , αυξητικούς παράγοντες, προθρομβωτικές ουσίες (π.χ. ιστικούς παράγοντες) και ελεύθερες ρίζες (110,119).

2.3.2.4. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων

Η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας είναι αποτέλεσμα της μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Πιο αναλυτικά, γειτονικά λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, και αυξητικούς παράγοντες, όπως ιντερλευκίνη-1 και παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- α), τα οποία οδηγούν στη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο χιτώνα στο ενδοθήλιο. Εκεί, παράγουν διάφορα μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, όπως κολλαγόνο, ελαστίνη, καθώς και πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες, τα οποία συμβάλλουν στην σκλήρυνση του ενδοθηλίου και τελικά σχηματίζουν μία ινώδη κάψα, της οποίας η σύσταση αποτελείται από κολλαγόνο, λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα (110).

Τα T-λεμφοκύτταρα παράγουν διάφορους μεσολαβητές, όπως TNF- α και ιντερφερόνη- γ (INF- γ), που αναστέλλουν την παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία αδυνατούν να επιδιορθώσουν την ινώδη κάψα και παράλληλα τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν διάφορες πρωτεϊνάσες από



Εικόνα 28: Εξέλιξη αθηρωματικής πλάκας (110).

την οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs), οι οποίες υποβαθμίζουν το ενδιάμεσο κολλαγόνο που τη στηρίζει. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της ινώδους κάψας, η οποία μπορεί να υποστεί ρήξη, αφήνοντας εκτεθειμένο το κολλαγόνο και τα λιποειδή, οδηγώντας στην εναπόθεση και συσσώρευση αιμοπεταλίων και στη δημιουργία θρόμβου (110). Καθ' όλη τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης, τα αφρώδη κύτταρα, τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν να υποστούν κυτταρικό θάνατο, μέσω απόπτωσης. Τα θραύσματα των νεκρών κυττάρων συσσωρεύονται σταδιακά, δημιουργώντας έναν νεκρωτικό, πλούσιο σε λιπίδια, πυρήνα, ο οποίος εντοπίζεται στο κέντρο της αθηρωματικής πλάκας. Ο νεκρωτικός αυτός πυρήνας έχει συσχετιστεί με την αθηρογένεση, καθώς συμβάλλει στην επέκταση της πλάκας προς τον αυλό της αρτηρίας και φαίνεται να κάνει την αθηρωματική πλάκα πιο ευάλωτη για ρήξη. Τα θραύσματα των νεκρών κυττάρων, φυσιολογικά, απομακρύνονται από φαγοκύτταρα (**efferoctytosis**), όπου η κυτταρική μεμβράνη του φαγοκυττάρου ενσωματώνει το κύτταρο που πεθαίνει, πριν αυτό προλάβει να απελευθερώσει το περιεχόμενό του. Η διαταραγμένη, λοιπόν, απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων, οδηγεί στη δημιουργία του νεκρωτικού αυτού πυρήνα, ο οποίος φαίνεται να επηρεάζει και άλλες λειτουργίες, πέραν της αύξησης της αθηρωματικής πλάκας. Αρχικά, φυσιολογικά η χοληστερόλη από τα νεκρωτικά κύτταρα απομακρύνεται με ένα σύστημα αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. Όταν το σύστημα απομάκρυνσης είναι διαταραγμένο, καταστέλλονται τα μονοπάτια μεταφοράς χοληστερόλης στα αγγειακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την δημιουργία αφρωδών κυττάρων, που όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, τα φαγοκύτταρα όταν απομακρύνουν ένα νεκρωτικό κύτταρο, εκκρίνουν ουσίες, όπως η IL-10, οι οποίες θεωρείται ότι σηματοδοτούν τη λήξη της φλεγμονώδους απόκρισης. Η διαταραγμένη απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, συνεπώς, οδηγεί σε περαιτέρω αγγειακή φλεγμονή. Τέλος, δυσλειτουργία του συστήματος απομάκρυνσης έχει σαν αποτέλεσμα την ταχύτατη θραύση της κυτταρικής μεμβράνης, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του νεκρού κυττάρου, το οποίο περιλαμβάνει πρωτεάσες, που αποσταθεροποιούν την αθηρωματική πλάκα, κυτταροκίνες, που προωθούν την αγγειογένεση, καθώς και παράγοντες θρόμβωσης, γεγονότα τα οποία επιταχύνουν την αθηροσκλήρωση (120,121).

Παράλληλα, μπορεί να συμβεί αβεστοποίησης της αθηρωματικής πλάκας, η οποία είναι αποτέλεσμα τόσο της απορρύθμισης στο σύστημα εναπόθεσης ασβεστίου, όσο και της διαταραγμένης απομάκρυνσής του. Όταν η αβεστοποίηση λαμβάνει χώρα σε μικρό βαθμό σχετίζεται με την αυξημένη πιθανότητα ρήξης της πλάκας, σε αντίθεση με την μεγαλύτερη εναπόθεση ασβεστίου, που φαίνεται να σταθεροποιεί την πλάκα, μειώνοντας την πιθανότητα για θρόμβωση (110,119,122).

2.3.3. Εμπλοκή του Οξειδωτικού στρες στην αθηροσκλήρωση

Το οξειδωτικό στρες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συμμετέχει σε διάφορα βασικά στάδια, τα οποία σηματοδοτούν την έναρξη αλλά και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Αρχικά, το αυξημένο οξειδωτικό στρες, οδηγεί στην ενεργοποίηση και σταδιακά στην δυσλειτουργία ή /και τραυματισμό του ενδοθηλίου και κατ' επέκταση σε διαταραγμένη διαπερατότητα, γεγονός που θεωρείται το εναρκτήριο στάδιο για την αθηροσκλήρωση. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση ROS, διευκολύνει την οξείδωση της LDL, και αποτελεί επίσης ένα στάδιο κλειδί για την εξέλιξη της νόσου. Ακόμη, οι ROS αλληλεπιδρούν με το μονοξείδιο του αζώτου, το οποίο αποτελεί μόριο κλειδί στην οξειδοαναγωγική ισορροπία, αλλά και στην σωστή λειτουργία των αγγείων και της καρδιάς, καθώς λειτουργεί ως αγγειοδιασταλτικό. Πιο αναλυτικά, το ανιόν υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με το NO, οδηγώντας στη παραγωγή υπερόξυ-νιτρώδους ανιόντος. Η παραπάνω αντίδραση, όμως, συνεπάγεται την μειωμένη βιοδιαθεσι-μότητα του μονο-ξειδίου του αζώτου, αφού παρόλο που, η παραγωγή του παραμένει σταθερή, η αποικοδόμηση του από τις ROS αυξάνεται (123). Οι βασικότερες πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου στα αγγεία είναι τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία υπό συνθήκες μπορούν να παράγουν και να απελευθερώνουν οξειδωτικά μόρια. Πιο συγκεκριμένα, διάφορες μεταβολικές καταστάσεις, οι οποίες προ-υπάρχουν ή συνυπάρχουν με την αθηροσκλήρωση οδηγούν σε αύξηση του οξειδωτικού στρες. Για παράδειγμα, η αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης στο αίμα οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου από λεία μυϊκά κύτταρα. Η ενδογενής παραγωγή των ROS στην αθηροσκλήρωση είναι κυρίως αποτέλεσμα της δραστηριότητας διαφόρων ενζυμικών συστημάτων, όπως η NADPH-οξειδάση, η οξειδάση της ξανθίνης, η

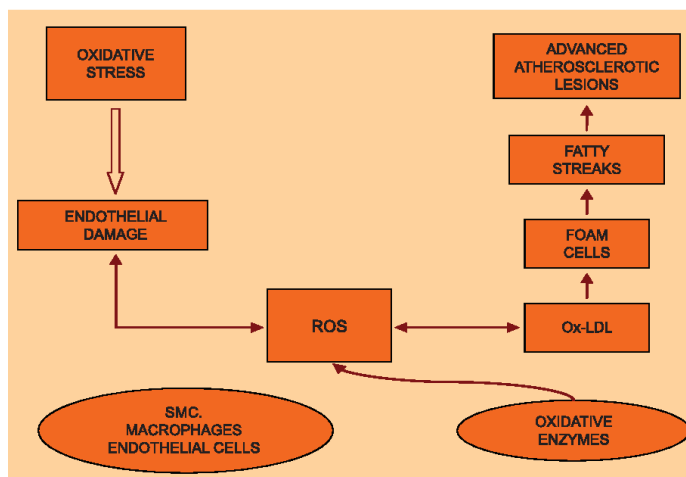
συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, η μυελοϋπεροξειδάση και η λιποξυγονάση (123,124).

Οι NADPH-οξειδάσες ή αλλιώς NOX, θεωρούνται ίσως η πιο σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών στο καρδιαγγειακό σύστημα. Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν σε διάφορες ισομορφές, και σε διάφορα μέρη του καρδιαγγειακού συστήματος. Για παράδειγμα, σε ποντίκια έχουν εντοπιστεί οι NOX1 και NOX4 σε λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ οι NOX2 και NOX4 σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι NOX5, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζονται θετικά σε καταστάσεις διαβήτη, υπέρτασης ή σε αθηροσκληρωτικές πλάκες σε ανθρώπους, ενώ πιθανά συμμετέχουν στην έκφραση μορίων πρόσφυσης, στην εισροή μονοκυττάρων, και στην διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων (124). Η ρύθμιση των NOX γίνεται από πλήθος μορίων, που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση, όπως η αγγιοτενσίνη II, η θρομβίνη και ο TNF-α (123).

Η οξειδάση της ξανθίνης εντοπίζεται στο πλάσμα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι σε λεία μυϊκά κύτταρα και μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υπεροξειδιακής ρίζας, μέσω του μεταβολισμού της ξανθίνης, της υποξανθίνης και NADH (123,124). Σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία, έχει παρατηρηθεί αγγειοδιαστολή, παρουσία αναστολέων του ενζύμου, όπως η άλλοπουρινόλη. Επιπλέον, φαίνεται ότι η συγκέντρωση του ενζύμου είναι αυξημένη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, όπως και σε νέους ασθενείς οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας πριν καν την εμφάνιση συμπτωμάτων (123). Ακόμη, η οξειδάση της ξανθίνης διεγείρει την έκφραση του ενζύμου λιποξυγονάση και CD-36 σε μακροφάγα, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS και τελικά την μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα (124).

Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, επίσης μπορεί να συμβάλλει στην δημιουργία

Εικόνα 28: Εμπλοκή Οξειδωτικού στρες στην διαδικασία της αθηροσκλήρωσης (123).



ROS, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην αθηροσκλήρωση, αλλά και σε μεταβολικές διαταραχές, όπως η υπερχοληστερολαιμία και η υπέρταση. Τέτοιες συνθήκες έχουν συσχετιστεί με την αποσύνδεση του ενζύμου, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, στη δημιουργία RONS και τελικά στην οξειδωτική τροποποίηση πρωτεϊνών και λιπιδίων (123).

Το ένζυμο λιποοξυγονάση συμβάλλει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, καθώς συμμετέχει στην οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, αλλά και στην παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων, όπως προσταγλαδίνες, θρομβοξανία και λευκοτριένια (123,124). Επιπλέον, διεγείρουν την ενεργοποίηση των NOX στα λεία μυϊκά κύτταρα, οδηγώντας σε περαιτέρω παραγωγή ROS (124).

Τέλος, η μυεολυπεροξειδάση εντοπίζεται κυρίως σε ουδετερόφιλα και σε ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα και οδηγεί στον σχηματισμό υποχλωριώδους οξέος. Θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αθηρωμάτωσης, καθώς φαίνεται ότι προκαλεί την οξειδωτική τροποποίηση της LDL και της HDL (123,124), αλλά και του μονοξειδίου του αζώτου (124).

Κεφάλαιο 3: Κρασί και Υποπροϊόντα οινοποίησης

Το κρασί, όπως είναι γνωστό, είναι ένα παραδοσιακό προϊόν, το οποίο προκύπτει από τη ζύμωση γλαύκων σταφυλιού (μούστος). Η ποιότητά του καθορίζεται από τη σύσταση και την ποικιλία του σταφυλιού, αλλά και από την γεωγραφική τοποθεσία του αμπελώνα, τις πρακτικές απόσταξης, οινοποίησης και παλαίωσης (125), καθώς και τις πρακτικές αποθήκευσης (126).

Η παραγωγή του κρασιού, γίνεται μέσα από τη διαδικασία της οινοποίησης, η οποία περιλαμβάνει μία σειρά ενζυμικών αντιδράσεων με τη συμμετοχή διαφόρων μικροοργανισμών, κυρίως ζυμών και βακτηρίων. Το βασικότερο μέρος της οινοποίησης είναι η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων, που πραγματοποιείται από τις αντιδράσεις των ζυμών. Στην αντίδραση αυτή, τα σάκχαρα των σταφυλιών, τα οποία είναι κυρίως εξόζες (γλυκόζη και φρουκτόζη), μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, καθώς και σε πλήθος άλλων υποπροϊόντων. Μερικές μέρες μετά την αλκοολική ζύμωση, ακολουθεί μία δευτερεύουσα αντίδραση, η οποία ονομάζεται μηλογαλακτική ζύμωση και πραγματοποιείται από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Η αντίδραση αυτή βελτιώνει την οργανοληπτική ποιότητα του κρασιού, καθώς, μειώνει την οξύτητα και αυξάνει το pH, σταθεροποιεί το κρασί και διασφαλίζει το άρωμα του. Βέβαια, καθ' όλη την πορεία παραγωγής του κρασιού πραγματοποιούνται πολλές αντιδράσεις και συμμετέχουν ένζυμα από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως μύκητες και βακτηρίδια, τα οποία βρίσκονται είτε στον καρπό των σταφυλιών είτε αναπτύσσονται κατά της διάρκεια της οινοποίησης (127).

Το κρασί μέχρι και σήμερα αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του πολιτισμού και της ιστορίας του σύγχρονου κόσμου. Οι αναφορές για την κατανάλωση κρασιού χρονολογούνται από την νεολιθική περίοδο, ενώ δεδομένα υποδεικνύουν την εξάπλωση του σε διάφορους αρχαίους πολιτισμούς όπως η Μεσοποταμία, η Αρχαία Αίγυπτος και η Αρχαία Ελλάδα και από εκεί, τη διάδοσή του στον δυτικό κόσμο. Εκτός από μέσο ψυχαγωγίας, το κρασί ήταν βασικό κομμάτι της ιατρικής. Στην αρχαία Αίγυπτο, έχει βρεθεί σε πάπυρους από το 2000 π.Χ., ότι το κρασί χρησιμοποιούνταν ως μέσο θεραπείας για τις αντισηπτικές του ιδιότητες. Στην Αρχαία Ελλάδα (460-377 π.Χ.), ο Ιπποκράτης, χρησιμοποιούσε το κρασί ως αγωγή, τόσο για την πρόληψη όσο

και για τη θεραπεία παθολογικών καταστάσεων, όπως για επάλειψη σε πληγές, ως αντιτυρετικό, ως καθαρτικό και διουρητικό (128). Ανάλογα με τον λόγο χορήγησης, διέφεραν το είδος, η πυκνότητα και η ποσότητα του κρασιού, που χορηγούνταν στον ασθενή (129). Η χρήση του κρασιού, λοιπόν, ως θεραπευτικό μέσο ήταν ευρέως διαδεδομένη και αναγνωρισμένη στην αρχαία ιατρική, γεγονός που, όμως άρχισε να φθίνει, με το πέρασ των αιώνων και την εξέλιξη της επιστήμης. Η πρώτη αναφορά για τις θετικές επιδράσεις του κρασιού στην πρόσφατη ιστορία έγινε το 1979 από τον St. Leger (130) και τους συνεργάτες του, οι οποίοι βασιζόμενοι σε δεδομένα από 18 χώρες, εντόπισαν μία ισχυρή αρνητική συσχέτιση των θανάτων από ισχαιμική καρδιοπάθεια με την κατανάλωση κρασιού.

3.1. Το «Γαλλικό παράδοξο»

Η εισαγωγή του όρου «Γαλλικό Παράδοξο» έγινε το 1992 από τον Dr. Renaud (131) για να περιγράψει την επιδημιολογική παρατήρηση ότι ο γαλλικός πληθυσμός είχε χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο, παρά την πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά διατροφή τους καθώς και την παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου. Η παρατήρηση αυτή έγινε βασιζόμενοι στα αποτελέσματα μίας παγκοσμίου κλίμακας επιδημιολογικής μελέτης, το πρόγραμμα “MONICA” (Monitoring Trends And Determinants In Cardiovascular Disease), το οποίο διήρκεσε 10 χρόνια και περιλάμβανε 21 χώρες (132). Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε ότι παρόλο που στη Γαλλία η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών, τα επίπεδα χοληστερόλης ορού, και η παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου όπως η αρτηριακή πίεση, το κάπνισμα και ο Δείκτης Μάζας Σώματος πλησίαζαν αυτά των ΗΠΑ ή του Ηνωμένου Βασιλείου, είχαν πολύ χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από τις χώρες αυτές, και μάλιστα παρόμοια με αυτά της Κίνας και της Ιαπωνίας. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στην κατανάλωση αλκοόλ και κυρίως κρασιού, η οποία είναι αρκετά υψηλότερη στη Γαλλία, σε σχέση με τις περισσότερες χώρες στην Δύση. Μάλιστα, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η κατανάλωση 20-30 γρ. αλκοόλ την ημέρα, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ κατά τουλάχιστον 40 %. Αν και υπήρχαν διάφορες υποθέσεις που εξηγούσαν την προστατευτική δράση του κρασιού, η επικρατούσα θεωρία υποστήριζε ότι το αλκοόλ περιόριζε την αθηροσκλήρωση, μέσω ευεργετικών δράσεων στην HDL. Ωστόσο, εφόσον τα επίπεδα της χοληστερόλης ορού

δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ της Γαλλίας και άλλων χωρών με υψηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, ο Renaud συμπέρανε ότι η προστατευτική επίδραση του αλκοόλ στα καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν μάλλον αποτέλεσμα κάποιου αιμοστατικού μηχανισμού και συγκεκριμένα της μειωμένης συσσώρευσης αιμοπεταλίων (131).

Μία μετανάλυση του 2011 (133), επιβεβαιώνει την σχέση του κρασιού με τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα, με δεδομένα από 16 προοπτικές μελέτες, βρέθηκε μία συσχέτιση της κατανάλωσης κρασιού και της θνησιμότητας, η οποία είχε μορφή καμπύλης J. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση 21 γρ. αλκοόλ την ημέρα οδηγούσε σε μείωση του κινδύνου κατά 31%. Παρόμοια, αλλά ασθενέστερη σχέση παρατηρήθηκε και για την κατανάλωση μπύρας, η οποία επιβεβαιώθηκε αργότερα από τον de Gaetano και τους συνεργάτες του το 2016 (134).

3.2. Σύσταση Κρασιού

Το κρασί αποτελείται κυρίως από νερό, που καλύπτει το 86% του όγκου του, και αιθανόλη κατά 12%. Ωστόσο, περιέχει και αρκετές άλλες ουσίες σε μικρότερες ποσότητες, όπως γλυκερόλη, σάκχαρα, οργανικά οξέα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, τανίνες και άλλα βιοενεργά συστατικά, πολυφαινολικές ενώσεις κ.α., οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για τις ευεργετικές του δράσεις στην υγεία (125,135). Τα κρασιά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με διάφορα χαρακτηριστικά, όπως η γλυκύτητα, η περιεκτικότητα σε αλκοόλ και διοξείδιο του άνθρακα, η ποικιλία των σταφυλιών, η διαδικασία της ζύμωσης και ωρίμανσης, και η γεωγραφική προέλευση (125). Επιπλέον, ανάλογα με το χρώμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε κόκκινο, λευκό και ροζέ, η βασική διαφορά των οποίων εντοπίζεται στα πρώτα στάδια της οινοποίησης, κατά την θραύση των σταφυλιών. Το χρώμα του κρασιού αποδίδεται από τις πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στο φλοιό και στους σπόρους του σταφυλιού και κυρίως από τις ανθοκυανίνες (136). Για την παραγωγή λευκού κρασιού, διαχωρίζονται τα στερεά συστατικά του σταφυλιού, δηλαδή ο φλοιός και ο καρπός από τον χυμό και ο μούστος ζυμώνεται χωρίς να έρχεται σε επαφή με αυτά. Αντίθετα, στο κόκκινο κρασί, τα συστατικά του σταφυλιού δε διαχωρίζονται και ο

μούστος έρχεται σε επαφή με αυτά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (90, 95). Το φαινολικό περιεχόμενο του κόκκινου κρασιού είναι 10 φορές υψηλότερο από το λευκό κρασί και κυμαίνεται από 2 έως 6 g/L.

3.2.1. Μικροσυστατικά του κρασιού

Η υπεροχή του κρασιού σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά αποδίδεται στα βιοενεργά μικρο-συστατικά που περιέχει, τα οποία, αν και σε αρκετά μικρές συγκεντρώσεις, είναι υπεύθυνα για ευεργετικές επιδράσεις του κρασιού. Η βασικότερη κατηγορία των μικρο-συστατικών αυτών είναι φαινολικές ενώσεις και τα κλασσικά φωσφο-και γλυκο- λιποειδή (113). Οι φαινολικές ενώσεις, αποτελούν μία κατηγορία χημικών ενώσεων, οι οποίες περιέχουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο και αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Αυτή η κατηγορία, περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος μορίων, από πιο απλές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα μέχρι και πιο σύνθετες, όπως οι τανίνες. Ανάλογα με το πλήθος των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, τις απλές φαινόλες, που περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα και τις πολυφαινόλες, οι οποίες περιλαμβάνουν στιλβένια, флаβονοειδή και ταννίνες (3).

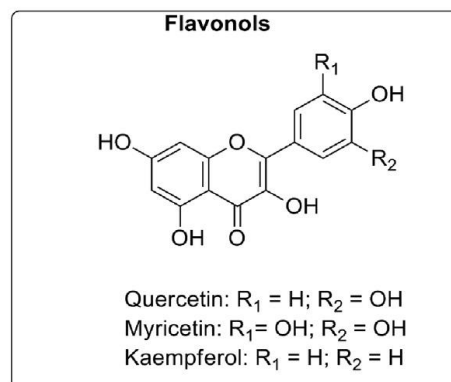
Το κόκκινο κρασί εμφανίζει 10 φορές υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε σχέση με το λευκό, καθώς αυτά εντοπίζονται κυρίως στα στερεά συστατικά του σταφυλιού, δηλαδή στην φλούδα και στους σπόρους, τα οποία δεν συμμετέχουν στη λευκή οινοποίηση (125). Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού, με βάση τον ανθρακικό σκελετό τους θα μπορούσαν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα флаβονοειδή και τα μη флаβονοειδή.

3.2.1.1. Φλαβονοειδή

Τα флаβονοειδή, όπως αναλύθηκαν και παραπάνω αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων, φυτικής προέλευσης, τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι βασικότερες κατηγορίες флаβονοειδών που εντοπίζονται στο κρασί είναι οι флаβονόλες, οι флаβανόλες και οι ανθοκυανίνες και αποτελούν περισσότερο από το 85% των φαινολικών συστατικών (125,137).

Φλαβονόλες

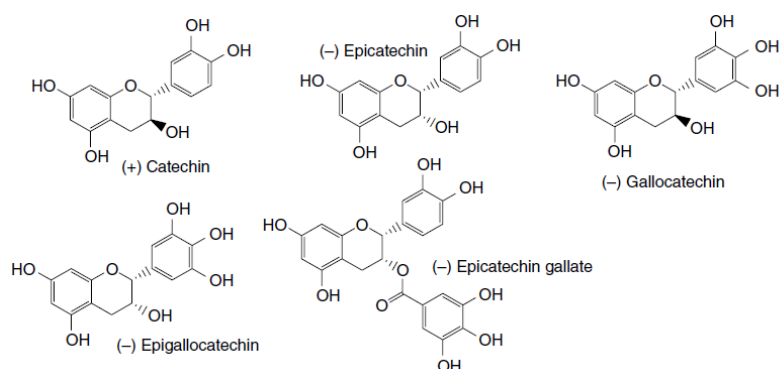
Οι φλαβονόλες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός διπλού δεσμού μεταξύ του άνθρακα 2 και 3 και μία ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα 3 (138). Η συγκέντρωση τους στο κόκκινο κρασί παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση και μπορεί να κυμαίνεται από 12,7 έως 130 mg/L, με πιο υψηλές συγκεντρώσεις στην ποικιλία Sangiovese, με μορφή κερκετίνης (125). Απαντώνται είτε ως ελεύθερες δομές, όπως η κερκετίνη και η μυρικετίνη, είτε συνδεδεμένες με σάκχαρα, σχηματίζοντας τους αντίστοιχους γλυκοζίτες, διγλυκοζίτες και γαλακτοζίτες (137). Οι ουσίες αυτές επηρεάζουν σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, όπως το χρώμα σε συνεργασία με τις ανθοκυανίνες και τη γεύση (πικρό) (125,139). Επιπλέον, δρουν ως φίλτρο υπεριώδους ακτινοβολίας (απορροφούν στα 360 nm), προστατεύοντας τις κυτταρικές δομές του φυτού. Για τον λόγο αυτό, εντοπίζονται κυρίως στο εξωτερικό μέρος του φυτού, κυρίως στη φλούδα του σταφυλιού και στα φύλλα των αμπελιών (139). Συνεπώς, εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση στα στέμφυλα, κυρίως με τη μορφή 3-O-γλυκουρονίδιο κερκετίνης (138).



Εικόνα 29: Δομή φλαβονολών (138).

Φλαβανόλες (Φλαβαν-3-όλες)

Οι φλαβανόλες ή φλαβαν-3-όλες είναι μία υποκατηγορία φαινολικών ενώσεων, που χαρακτηρίζονται από μία ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα 3 και μία ομάδα καρβονυλίου στην άνθρακα 4 (138). Εντοπίζονται, κυρίως, στον μίσχο του



Εικόνα 30: Φλαβανόλες (139).

σταφυλιού, αλλά και στη φλούδα και στον καρπό σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι πιο σημαντικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι οι κατεχίνες και τα εναντιομερή τους, οι

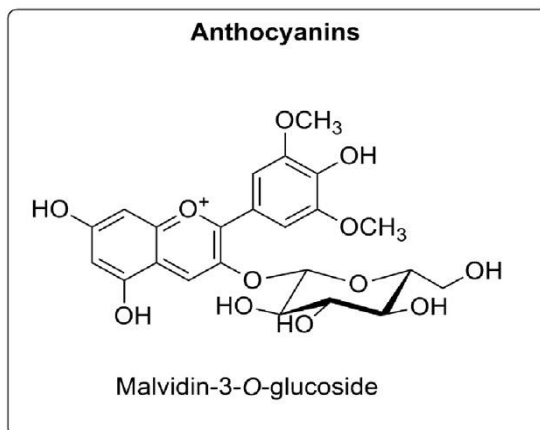
επικατεχίνες, τα οποία αποτελούν το 60% του φαινολικού περιεχομένου στον καρπό του σταφυλιού (125). Παρουσιάζουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις και σε λευκές και σε ερυθρές ποικιλίες, ωστόσο η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κατεχίνες έχει αναφερθεί στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon (37-80 mg/L) και

Refosco (125). Τέλος, οι φλαβανόλες αποτελούν πρόδρομα μόρια για τον σχηματισμό των ταννινών και επηρεάζουν σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, κυρίως τη γεύση και την στυπτικότητα του (125,137,138)

Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες, είναι πολυφαινολικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των ανθοκυανιδίων. Οι ανθοκυανιδίνες ως ελεύθερες ενώσεις είναι ιδιαίτερα ασταθείς, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται στο κρασί και στο σταφύλι σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Συνεπώς, απαντώνται κυρίως, στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, τις ανθοκυανίνες και συγκεκριμένα στη μορφή γλυκοζιτών. Οι βασικότερες μορφές των ανθοκυανινών είναι ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης και ακολουθούν οι 3-Ο-γλυκοζίτης της πεονιδίνης, της δελφινιδίνης και κυανιδίνης, αντίστοιχα (125,138).

Οι ανθοκυανίνες είναι άμεσα υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα των σταφυλιών και κατ' επέκταση του κρασιού, συνεπώς εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στη φλούδα του σταφυλιού. Ωστόσο, οι ιδιότητές τους καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους δομή και ιδιαίτερα από το βαθμό υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης και γλυκοζυλίωσης. Είναι αρκετά ευαίσθητα μόρια σε αλλαγές pH, θερμοκρασίας και ακτινοβολίας και μπορούν εύκολα να υποστούν οξείδωση, με άμεσες επιδράσεις στη σταθερότητα του χρώματος (138).



Εικόνα 31: Ανθοκυανίνες (138).

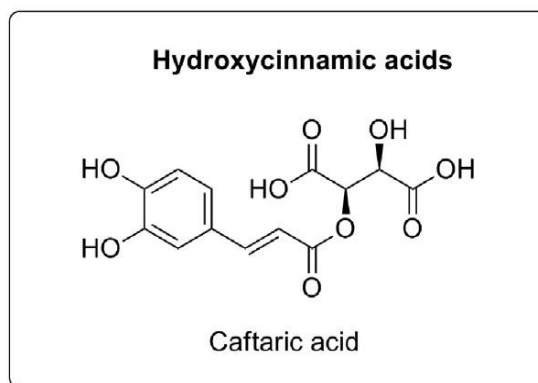
3.2.1.2. Μη Φλαβονοειδή

Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα διαθέτουν ένα φαινολικό δακτύλιο και ανήκουν στην κατηγορία των απλών φαινολών. Τα φαινολικά οξέα, περιλαμβάνουν παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέος, με τα υδροξυκινναμωνικά να εμφανίζουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο κρασί και στα υποπροϊόντα οινοποίησης. Συχνά, απαντώνται ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα ή ως εστέρες κιννικού, σικιμικού και τρυγικού οξέος (138).

Υδρόξυ-βενζοϊκά οξέα

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις των υδρόξυ-βενζοϊκών οξέων που συναντώνται στο κρασί και στα υποπροϊόντα οινοποίησης είναι το προκατεχικό, το γαλλικό και το συρινγικό οξύ (138). Ωστόσο, το γαλλικό οξύ δεν αποτελεί συστατικό των σταφυλιών, αλλά δημιουργείται στο κρασί ως προϊόν της υδρόλυσης



Εικόνα 32: Υδρόξυ-κινναμωνικά οξέα (140).

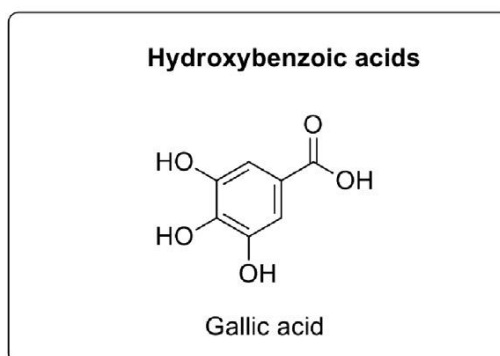
των εστέρων γαλλικού οξέος, που εντοπίζονται στις υδρολυμένες και συμπυκνωμένες ταννίνες. Η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος σε ένα τυπικό εμφιαλωμένο κόκκινο κρασί είναι περίπου 70 mg/dl, σε αντίθεση με τα λευκά που είναι περίπου 10 mg/dl (140). Επιπλέον, το γαλλικό οξύ εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους μίσχους, στην φλούδα και στους σπόρους του σταφυλιού, ενώ ακολουθούν το συρινγικό στους μίσχους και το προκατεχικό στους σπόρους και στη φλούδα του σταφυλιού (138).

Υδρόξυ-κινναμωνικά οξέα

Τα υδροξυκινναμωνικά οξέα χαρακτηρίζονται από ένα διπλό δεσμό μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου και της ομάδας καρβοξυλίου (140). Οι πιο σημαντικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας, που εντοπίζονται στα σταφύλια και στο κρασί είναι το

καφταρικό, το p-κουταρικό και το φερταρικό οξύ. Εντοπίζονται σε όλα τα μέρη του φρούτου, με υψηλότερη συγκέντρωση στους εξωτερικούς ιστούς των σταφυλιών, κυρίως στη φλούδα. Ωστόσο, παρατηρούνται διαφορές ανάλογα με τον τύπο του σταφυλιού (κόκκινο ή λευκό). Στις φλούδες των

Εικόνα 33: Υδροξυ-βενζοϊκά οξέα (140).

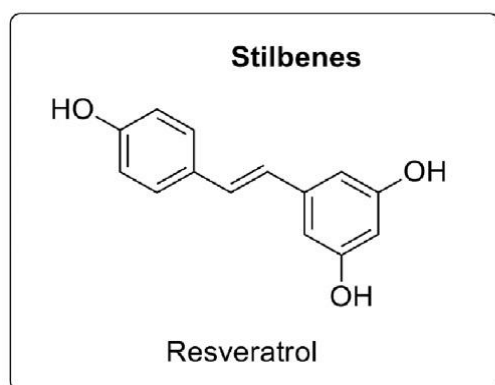


λευκών σταφυλιών απαντάται κυρίως το καφταρικό και το κουταρικό οξύ, ενώ στους σπόρους δεν έχει αναφερθεί η παρουσία υδροκινναμωνικών οξέων. Αντίθετα, στα ερυθρά σταφύλια επικρατεί και στις φλούδες και στους σπόρους το χλωρογενικό οξύ (138).

Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούν μία υποκατηγορία φαινολικών ενώσεων, που χαρακτηρίζονται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με μία γέφυρα αιθυλενίου (138). Οι ενώσεις αυτές υπάρχουν σε διάφορες οικογένειες φυτών, αλλά το κρασί και τα σταφύλια θεωρούνται οι καλύτερες διαιτητικές πηγές. Τα στιλβένια βιοσυντίθενται από ιστούς στα φύλλα των αμπελιών, ως απόκριση σε στρες και περνάνε στο μούστο κατά τη διαδικασία της οινοποίησης. Τα στιλβένια, λοιπόν, λειτουργούν ως μηχανισμός άμυνας για το αμπέλι και το προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία, από μικροβιακές λοιμώξεις και μυκητιάσεις (138,140,141). Η συγκέντρωση των στιλβενίων ποικίλλει σημαντικά από κρασί σε κρασί και

Εικόνα 34: Στιλβένια (140).



επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων, όπως το κλίμα, η ποικιλία των σταφυλιών και οι πρακτικές οινοποίησης (100, 101). Πιο σημαντικός εκπρόσωπος αυτής της υποκατηγορίας φαινολικών ενώσεων είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία εντοπίζεται στη φλούδα και στους σπόρους των σταφυλιών και κατ' επέκταση και στο κρασί. Για το λόγο

αυτό, η συγκέντρωση της είναι σημαντικά υψηλότερη στο κόκκινο κρασί (0.2–13 mg/L) σε σχέση με το λευκό (0.1 – 0.8 mg/L) (142).

Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι άλλη μία ομάδα πολυφαινόλων (περιέχουν τουλάχιστον 3 μονάδες φαινόλης), που είναι παρούσες στα σταφύλια και στο κρασί. Καθορίζουν σημαντικά την ποιότητα του κρασιού, καθώς συνεισφέρουν στο χρώμα, στη γεύση και στην στυπτικότητα του (125). Οι ταννίνες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες μορίων, τις συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες και τις υδρολυόμενες ταννίνες ή ελαγγιταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες, αποτελούνται από υπομονάδες μονομερών φλαβαν-3-ολών και η χημική τους δομή εξαρτάται από την υποκατάσταση των υπομονάδων, τον βαθμό πολυμερισμού και τη θέση σύνδεσης (125,138). Η συγκέντρωσή τους στα σταφύλια κυμαίνεται από 0,5-1,5 g/L, αλλά η περιεκτικότητά τους στο κρασί είναι λιγότερη από το 50% αυτής, καθώς ένα μεγάλο μέρος των προανθοκυανιδίων χάνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Το λευκό κρασί έχει σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το κόκκινο, οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 10-50 mg/L (143).

Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι σύνθετες πολυφαινολικές ενώσεις που προκύπτουν από τα υδρόξυ-βενζοϊκά φαινολικά οξέα. Πιο συγκεκριμένα, είναι προϊόν της σύζευξης γαλλικού οξέος και εστέρες ελαγγικού οξέος και γλυκόζης ή άλλων σακχάρων και περνάνε στο κρασί, μέσα από τα δρύινα βαρέλια κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (140,144). Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του κρασιού οι υδρολυόμενες ταννίνες αποικοδομούνται και απελευθερώνουν γαλλικό και ελαγγικό οξύ. Στο λευκό κρασί απαντώνται σε ποσότητα λίγων mg ανά λίτρο μετά από 6 μήνες σε νέο βαρέλι, ενώ στο κόκκινο κρασί κυμαίνονται μεταξύ 2-20 mg/L, μετά από παλαίωση για δύο χρόνια (143).

3.2.2. Βιοδιαθεσιμότητα μικροσυστατικών του κρασιού

Ένα μεγάλο ερώτημα που δημιουργείται από τη μελέτη των παραπάνω μικροσυστατικών αφορά τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Τα κλασικά λιποειδή φωσφο- και

γλύκο- λιποείδη περνάνε στον οργανισμό μέσω της λέμφου. Όσον αφορά στα φαινολικά συστατικά, αρχικά, η περιεκτικότητα του κρασιού σε φαινολικές ενώσεις παρουσιάζει πολύ μεγάλη διακύμανση, καθώς εξαρτάται από πολλές διαφορετικές συνιστώσες. Η παραγωγή κρασιού, ακόμη και από την ίδια ποικιλία σταφυλιού, όταν πραγματοποιείται σε διαφορετική τοποθεσία, σε διαφορετική χρονική στιγμή ή με διαφορετικές πρακτικές οινοποίησης μπορεί να μεταβάλει πολύ την σύσταση του οίνου (145). Επιπλέον, παρόλα τα επιστημονικά ευρήματα για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιαθηρογόνες ιδιότητες των πολυφαινολών από *in vitro* μελέτες, οι δράσεις τους *in vivo* δεν έχουν ακόμα διασαφηνιστεί (146). Μία άλλη παράμετρος που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών είναι η απορρόφηση και οι επερχόμενες αντιδράσεις μεταβολισμού τους. Αν και έχουν βρεθεί πάνω από 500 διαφορετικά μικροσυστατικά στο κρασί, η απορρόφησή τους γίνεται από μία κοινή οδό. Οι πολυφαινόλες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο, όταν βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους, δηλαδή ως αγλυκόνες. Ωστόσο, συνήθως βρίσκονται σε μορφή εστέρων και γλυκοζιτών, τα οποία μεταβολίζονται περαιτέρω από εντερικά ένζυμα και από την εντερική μικροχλωρίδα και μετατρέπονται κυρίως σε Ο-μεθυλιωμένα ή θειικά παράγωγα ή παράγωγα γλυκουρονιδίου (147). Αν και πολλοί από αυτούς τους μεταβολίτες φαίνεται να έχουν βιολογική δράση, ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο αν όλα τα παράγωγα του μεταβολισμού των φαινολικών ενώσεων είναι βιοενεργά και σε τι βαθμό, καθώς και αν η δράση τους αλλάζει ανάλογα με το τρόφιμο με το οποίο προσλαμβάνονται. Σύμφωνα με κάποια ευρήματα, φαίνεται ότι κάποιες φαινολικές ενώσεις δρουν συνεργιστικά, όπως η ρεσβερατρόλη, το καφεϊκό οξύ και οι κατεχίνες (148), ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η κερκετίνη παρεμβαίνει σε αντιδράσεις μεταβολισμού της ρεσβερατρόλης στο ήπαρ (145). Τέλος, το γεγονός ότι τα φαινολικά συστατικά, απαντώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο κρασί, όπως και σε άλλες φυτικές τροφές, εγείρει ερωτηματικά στο κατά πόσο αυτή η ποσότητα των φαινολικών επαρκεί, ώστε να επιφέρουν όφελος στον άνθρωπο. Η ρεσβερατρόλη, για παράδειγμα φαίνεται ότι ακόμα και σε πολύ μικρές δόσεις έχει βιολογικές δράσεις, καθώς η χρόνια και συστηματική πρόσληψη της οδηγεί στη συσσώρευσή της σε ιστούς, όπως η καρδιά και το ήπαρ (145,146).

3.2.3. Βιολογικές δράσεις του κρασιού στον άνθρωπο

3.2.3.1 Κρασί, καρδιαγγειακά νοσήματα και θνησιμότητα

Η παρατήρηση των ευεργετικών επιδράσεων του κρασιού από τα τέλη της δεκαετίας του 70, έδωσε το πρώτο έναυσμα για την διερεύνηση των πιθανών ευεργετικών δράσεων του κρασιού και του αλκοόλ γενικότερα, η οποία εντατικοποιήθηκε με την εισαγωγή του όρου «Γαλλικό Παράδοξο», το 1992. Πλήθος μεταγενέστερων μελετών υποδεικνύουν την ευεργετική επίδραση του κρασιού, και κυρίως του κόκκινου στην υγεία της καρδιάς και των αγγείων, η οποία αποδίδεται πλέον, κυρίως στην πλούσια σύστασή του σε φαινολικές ενώσεις (109,133,149–151).

Η κατανάλωση κρασιού έχει συσχετιστεί με μειωμένη θνησιμότητα. Η προοπτική μελέτη των Levantesi et. al. (149), έδειξε ότι η κατανάλωση κρασιού μείωνε τον κίνδυνο θνησιμότητας σε σχέση με την αποχή σε ασθενείς που είχαν περάσει έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ οι Klatsky et. al. (150) υποστήριξαν ότι η κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με την ολική θνησιμότητα με μία καμπύλη σχήματος J, η οποία αποδόθηκε κυρίως στη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου μέσω της επίδρασης του κρασιού. Πιο πρόσφατα δεδομένα από την μελέτη ΑΤΤΙΚΗ, δείχνουν ότι η κατανάλωση ενός ποτηριού, τόσο μύρας όσο και κρασιού, μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων κατά 57% και 60%, αντίστοιχα (109).

Όπως αναλύθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η αθηροσκλήρωση αποτελεί μία πολυπαραγοντική παθολογική κατάσταση, η οποία είναι αποτέλεσμα των συνεργιστικών δράσεων τριών βασικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών, του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής και της θρόμβωσης (113). Η κατανάλωση κρασιού φαίνεται να περιορίζει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και κατ' επέκταση να προστατεύει από την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων. Δεδομένα τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση κρασιού μπορεί μειώσει τα επίπεδα του ινωδογόνου (152–155), και κάποιων δεικτών φλεγμονής, όπως η CRP, η IL-6, η IL-8 και η IL-18 (151–153,156). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μπορεί να περιορίσει την έκφραση διαφόρων μορίων που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική διαδικασία, όπως μόρια πρόσφυσης, προφλεγμονώδεις

κυτταροκίνες και ιντεγκρίνες (151–153,156). Ενδεικτικά αναφέρετε ότι η κατανάλωση 250 ml κόκκινου κρασιού με το μεσημεριανό για 4 εβδομάδες, μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της CRP ορού, του ινωδογόνου και του λόγου LDL/HDL, να βελτιώσει τη λειτουργία του ινωδολυτικού μηχανισμού και να αυξήσει την συγκέντρωση της HDL και της απολιποπρωτεΐνης I (153). Οι παραπάνω επιδράσεις φαίνεται να αποδίδονται κυρίως στην περιεκτικότητα του κρασιού σε φαινολικές ενώσεις. Οι Estruch et. al. (152), σε μία διασταυρούμενη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή συνέκριναν τις επιδράσεις της κατανάλωσης 30 γρ. αιθανόλης σε μορφή κρασιού ή τζιν για 4 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κρασί σε σχέση με το τζιν οδηγούσε σε μεγαλύτερη μείωση του ινωδογόνου (9% vs 5%) και κάποιων κυτοκινών, ενώ ταυτόχρονα μείωνε και τα επίπεδα κάποιων ιντεγκρινών (LFA-α, VLA-4, Mac-1), της χημειοκίνης MCP-1 και μορίων πρόσφυσης, (VCAM-1 και ICAM-1), σε αντίθεση με το τζιν, με το οποίο δε βρέθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση. Το κόκκινο κρασί, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υπερέχει σε σχέση με το λευκό όσον αφορά την περιεκτικότητά του σε φαινολικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, η κατανάλωση τόσο λευκού όσο και κόκκινου κρασιού μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της HDL και μείωση της CRP και IL-6, καθώς και να περιορίσει την έκφραση μορίων πρόσφυσης, αν και η επίδραση του κόκκινου κρασιού φαίνεται να είναι μεγαλύτερη (156). Πιο πρόσφατα, οι Roth et. al. (151), οι οποίοι χορήγησαν σε μία διασταυρούμενη κλινική δοκιμή 30 γρ. αιθανόλης σε μορφή παλαιωμένου λευκού κρασιού και τζιν για 3 εβδομάδες, σε 38 αυξημένου κινδύνου άνδρες, έδειξαν ότι η κατανάλωση του λευκού κρασιού προωθούσε την αναγέννηση του ενδοθηλίου και των αγγείων μέσω αύξησης της δραστηριότητας των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων και ταυτόχρονα μείωνε την έκφραση των υποδοχέων CD31 και CD40 στα T-λεμφοκύτταρα και των CD36 και CCR2 στα μονοκύτταρα σε σχέση με το τζιν.

3.2.3.2 Κρασί και οξειδωτικό στρες

Η σχέση του κρασιού με το οξειδωτικό στρες και οι πιθανές αντιοξειδωτικές του δράσεις έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Από τη μία πλευρά, η κατανάλωση αλκοόλ έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου, μέσω της δράσης των ενζύμων CYP, του κυτοχρώματος P450. Από την άλλη πλευρά, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και κυρίως κρασιού έχει βρεθεί

ότι σχετίζεται αντίστροφα με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η ευεργετική επίδραση του κρασιού στην υγεία της καρδιάς και των αγγείων, θεωρείται αποτέλεσμα τόσο των αντιφλεγμονωδών όσο και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση κρασιού μπορεί να αυξήσει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, και να μειώσει δείκτες λιποειδικής υπεροξειδωσης και οξειδωτικής βλάβης του DNA (153,157–160).

Η ερευνητική ομάδα του Micallef και των συνεργατών του σε μία τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, έδειξε ότι η κατανάλωση 400 ml κόκκινου κρασιού για 2 εβδομάδες αύξησε την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και μείωσε τα επίπεδα της MDA, κύριος δείκτης της λιποειδικής υπεροξειδωσης και της γλουταθειόνης, σε σχέση με την αποχή από το αλκοόλ. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης βρέθηκαν μειωμένα μόνο μετά την κατανάλωση κρασιού, ενώ στην ομάδα που απείχε από το αλκοόλ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά. Το παραπάνω, σε συνδυασμό και με τα υπόλοιπα ευρήματα, υποδεικνύει ότι η μείωση της GSH, ήταν αποτέλεσμα της ενδογενούς ρύθμισης, μετά την μείωση του οξειδωτικού στρες (158). Επιπλέον, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού σε ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο οδηγούσε σε μεγαλύτερη μείωση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης του DNA, σε σχέση με την αποχή από το αλκοόλ, καθώς και σε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (159). Οι Schrieks et. al. (160), που πραγματοποίησαν μία διασταυρούμενη κλινική δοκιμή σε υπέρβαρους άνδρες βρήκαν ότι η κατανάλωση 450 ml κόκκινου κρασιού με 41,4 γρ. αιθανόλης μαζί με το δείπνο σε σχέση με την κατανάλωση 450 ml κρασιού χωρίς αιθανόλη οδηγούσε σε μεγαλύτερη αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και σε καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ μία ώρα μετά το δείπνο. Αντίθετα, το κρασί απουσία αιθανόλης φάνηκε να οδηγεί σε άμεση διέγερση του NF-κΒ. Ωστόσο, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η ημερήσια κατανάλωση 450 ml κρασιού μετά από 4 εβδομάδες προκαλούσε αύξηση σε δείκτες λιποειδικής υπεροξειδωσης. Το παραπάνω φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες κλινικές δοκιμές μετά από μακροχρόνια ημερήσια κατανάλωση 40 και 30 γρ. αιθανόλης, αλλά όχι όταν η ημερήσια δόση ήταν στα 15 γρ. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι επιδράσεις του αλκοόλ είναι ανάλογες με την ποσότητα αιθανόλης

που καταναλώνεται και πιθανόν μικρότερη κατανάλωση κρασιού να μην είχε αρνητικές επιδράσεις στο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί η βέλτιστη ποσότητα κρασιού, η οποία να μεγιστοποιεί τις ευεργετικές του δράσεις και ταυτόχρονα να ελαχιστοποιεί τις αρνητικές (161).

3.2.3.3. Υπεροχή κρασιού σε σχέση με άλλα ποτά

Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι σαφές ότι πλήθος ερευνητικών δεδομένων υποστηρίζουν την ευεργετική δράση του κρασιού στην υγεία. Πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία αποδίδουν τις θετικές αυτές επιδράσεις στο υψηλό φαινολικό περιεχόμενο του κρασιού, ενώ ένα μέρος της επιστημονικής κοινότητας υποστηρίζει ότι είναι αποτέλεσμα της περιεκτικότητάς του σε αιθανόλη.

Η επίδραση της κατανάλωσης αλκοόλ έχει διερευνηθεί από πολλούς ερευνητές. Παρόλο που η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ, έχει συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις και αποτελεί παράγοντα κινδύνου για πολλά χρόνια νοσήματα, η χαμηλή προς μέτρια κατανάλωση αλκοόλ έχει φανεί ότι έχει θετικές επιδράσεις στην υγεία (161). Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ είναι γνωστό ότι έχει θετική επίδραση σε λιποπρωτεΐνες πλάσματος, που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση, σε μεταβολές στη λειτουργία των αιμοπεταλίων, καθώς και στους μηχανισμούς πήξης και ινωδόλυσης (162). Βασιζόμενοι σε δεδομένα κλινικών μελετών, οι Brien et. al. (154), υποστήριξαν, ότι η κατανάλωση αλκοόλ, ανεξάρτητα από τον τύπο του ποτού, οδηγούσε σε αύξηση των συγκεντρώσεων HDL, Απολιποπρωτεΐνης I (Apo-I) και αδιπονεκτίνης και μείωση των επιπέδων ινωδογόνου. Μία μετανάλυση 2016 (163), με δεδομένα από προοπτικές μελέτες, έδειξε μία αρνητική συσχέτιση της κατανάλωσης αλκοόλ με τον κίνδυνο CAD, η οποία αποτυπώθηκε σε μία καμπύλη σχήματος U, και μάλιστα η μεγαλύτερη μείωση του κινδύνου, κατά 31% μετά από χορήγηση 30 γρ. αιθανόλης.

Ωστόσο, οι προστατευτικές δράσεις της αιθανόλης, μπορούν να εξηγήσουν μόνο ένα μέρος των ευεργετικών επιδράσεων, που έχουν παρατηρηθεί μετά την κατανάλωση κρασιού. Πολλές κλινικές δοκιμές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν συγκρίνει την επίδραση του κρασιού και άλλων ποτών, με τη μεγάλη πλειοψηφία

αυτών να υποδεικνύει μία υπεροχή του κρασιού σε σχέση με άλλα ποτά (151,152,157,164).

Οι Estruch et. al. (157) συνέκριναν την επίδραση της κατανάλωσης 30 γρ. αιθανόλης με τη μορφή κόκκινου κρασιού και τζιν. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία υπεροχή του κρασιού σε σχέση με το τζιν, καθώς παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση της MDA και της οξειδωμένης LDL στο πλάσμα, η οξείδωση της LDL καθυστερούσε περισσότερο, ενώ βρέθηκε και μειωμένη η SOD, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στους ενδογενείς μηχανισμούς ρύθμισης. Παρ' όλ' αυτά, τα δεδομένα αυτά παρέχουν πληροφορίες είτε για την δράση μόνο της αιθανόλης, είτε για τη συνεργιστική δράση της αιθανόλης με τα μικροσυστατικά του κρασιού (146).

Μία πρόσφατη κλινική δοκιμή έδειξε ότι η κατανάλωση κρασιού οδηγούσε σε μεταγευματική μείωση της ευαισθησίας των αιμοπεταλίων σε σχέση με το γεύμα αναφοράς ή το γεύμα αναφοράς παρουσία της αιθανόλης, υποδηλώνοντας ότι η δράση οφείλεται στα μικροσυστατικά του κρασιού (165). Οι Gemma Chiva-Blanch et. al. (164) συνέκριναν την επίδραση κόκκινου κρασιού, με και χωρίς αιθανόλη και τζιν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανάλωση κρασιού τόσο με όσο και χωρίς αιθανόλη οδηγούσε σε μείωση της αρτηριακής πίεσης και σε αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου, με παρόμοιο τρόπο. Αξίζει βέβαια να αναφερθεί ότι, η χρήση κρασιού χωρίς αλκοόλ ίσως δεν αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή, καθώς φαίνεται ότι η βιοδιαθεσιμότητα των μικροσυστατικών του κρασιού, μπορεί να μεταβάλλεται απουσία αιθανόλης (146).

Οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις των πολυφαινολικών συστατικών του κρασιού έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Σε μία τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, χορηγήθηκε σε 30 ασθενείς με στεφανιαία νόσο εκχύλισμα πολυφαινολών από κόκκινο σταφύλι, το οποίο συγκρίθηκε με την κατανάλωση νερού. Το εκχύλισμα, που ήταν πλούσιο σε φαινολικά συστατικά οδήγησε σε βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, καθώς αύξησε την αιματική ροή σημαντικά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (166). Επιπλέον, in vitro δεδομένα υποδεικνύουν ότι, η έκθεση ενδοθηλιακών κυττάρων σε εκχύλισμα πολυφαινολών από κόκκινο κρασί, απουσία αιθανόλης οδηγούσε σε αύξηση του NO, μάλλον λόγω της αύξησης της eNOS (167). Οι Pignatelli et. al. (148) έδειξαν ότι η κατανάλωση 300

ml λευκού και κόκκινου κρασιού για 2 εβδομάδες, επέφερε μείωση σε δείκτες οξειδωτικού στρες, με το κόκκινο κρασί να έχει μεγαλύτερη επίδραση. Ακόμη, υποστήριξαν με *in vitro* δεδομένα ότι μόνο το μίγμα των πολυφαινολών μπορούσε να αναστείλει την οξείδωση της LDL και την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης και μάλιστα χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στην κυκλοφορία μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού.

Μεγάλο ενδιαφέρον έχουν δημιουργήσει και μεμονωμένα τα μικροσυστατικά. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα αντιοξειδωτικά, και εντοπίζεται σε πολλές φυτικές τροφές, με καλύτερες πηγές σε φυστίκια, στα σταφύλια *Vitis vinifera* και στο κόκκινο κρασί, όπου η συγκέντρωση της ρεσβετατρόλης κυμαίνεται από 0,1 - 14,3 mg/ L (168). Μέχρι σήμερα, έχει βρεθεί ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί να επιφέρει μείωση σε δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, καθώς και να βελτιώσει σημαντικά την ενδοθηλιακή λειτουργία και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Δεδομένα από την βιβλιογραφία υποστηρίζουν ότι μπορεί να αυξήσει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, καθώς ρυθμίζει την έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO και διεγείρει την ενζυμική της δραστηριότητα. Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα πολύ σημαντικό μόριο για το αγγειακό σύστημα, καθώς προωθεί την αγγειοδιαστολή και συμβάλλει στην μείωση της αθηροσκλήρωσης. Συνεπώς, συμβάλλει στην καλή λειτουργία της καρδιάς (169). Επιπλέον, η χορήγηση ρεσβερατρόλης φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση μορίων προσκόλλησης. Σε μία τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη και διπλά τυφλή κλινική δοκιμή σε 44 υγιείς εθελοντές φάνηκε ότι η χορήγηση συμπληρώματος ρεσβερατρόλης για 1 μήνα μείωσε την έκφραση των mRNA του VCAM και ICAM και τα επίπεδα της IL-8. Επιπλέον, οδήγησε σε μείωση της ιντερφερόνης-γ και της ινσουλίνης νηστείας σε σχέση με το placebo (170). Επιπλέον, οδήγησε σε μείωση της CRP και των τριγλυκεριδίων και σε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε υγιείς καπνιστές (171). Μία πρόσφατη μετανάλυση τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών (172), έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση ρεσβερατρόλης, μπορεί να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα της CRP και του TNFα σε ασθενείς με μεταβολικά νοσήματα. Σε ασθενείς με ΣΔΙΙ, που αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η χορήγηση 2 x 5 mg ρεσβερατρόλης για 4 εβδομάδες

οδήγησε σε βελτίωση της ινσουλινοευαισθησίας, μείωση του οξειδωτικού στρες και σε αύξηση της ενεργοποίησης της κινάσης Akt (173), ενώ μία μετανάλυση του 2015 έδειξε ότι η χορήγηση μεγαλύτερη των 150 mg την ημέρα μπορούν να μειώσουν την συστολική αρτηριακή πίεση (174). Η συμπληρωματική χορήγηση ρεσβερατρόλης, παρουσιάζει ευεργετικές δράσεις και σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι Magyar et. al. (175) σε μία τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, χορήγησαν σε 40 ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο, μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, 10 mg ρεσβερατρόλης την ημέρα για 3 μήνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία σημαντική βελτίωση στην διαστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας και γενικότερα της ενδοθηλιακής λειτουργίας, καθώς και μείωση στα επίπεδα της LDL. Αντίθετα, η ομάδα placebo παρουσίασε αυξημένη παραμόρφωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και αυξημένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Ένα ακόμη πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό που εντοπίζεται σε υψηλές σχετικά συγκεντρώσεις στα σταφύλια και κατ' επέκταση στο κρασί είναι η κερκετίνη. Το μόριο αυτό είναι μία φλαβονόλη, το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς ως συμπλήρωμα και πιθανόν έχει ευεργετική δράση σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Η κερκετίνη έχει βρεθεί ότι μεσολαβεί στη φλεγμονώδη απόκριση και μπορεί να αναστέλλει την δράση των COXs και LOXs και συνεπώς να μειώνει μεσολαβητές της φλεγμονής όπως προσταγλαδίνες και λευκοτριένια (176), ενώ ταυτόχρονα δεδομένα από τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες, υποστηρίζουν ότι η συμπληρωματική χορήγηση κερκετίνης μπορεί να μειώσει τα επίπεδα σε δείκτες φλεγμονής όπως η CRP και η IL-12 (177). Η κερκετίνη και η επιγαλλοκατεχίνη φαίνεται να μεσολαβούν στην ρύθμιση του NF-kB, αναστέλλοντας τη δράση του και οδηγώντας κατ' επέκταση σε αναστολή της απελευθέρωσης προ φλεγμονωδών κυτοκινών, μορίων πρόσφυσης και αυξητικών παραγόντων σε επιθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα. Επιπλέον, τα δύο αυτά φλαβονοειδή φαίνεται να σχετίζονται με μειωμένη παραγωγή TNF-α και IL-12, μεσολαβώντας στο MAPK μονοπάτι σηματοδότησης σε ανοσοποιητικά και μη κύτταρα (178). In vitro δεδομένα υποδεικνύουν ότι η χορήγηση κερκετίνης σε ποντίκια μπορεί να αυξήσει την δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό και το λόγο GSH/GSSG, γεγονός το οποίο

έχει αποδοθεί στην διέγερση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ενώ παρατηρήθηκε και μείωση σε δείκτες λιποξειδικής υπεροξειδωσης (179). Οι Begum et. al. (180) παρατήρησαν ότι διάφορα μεταβολικά παράγωγα της κερκετίνης (το γλυκουρονίδιο κερκετίνης) και όχι μόνο η ελεύθερη μορφή της, μπορεί να προστατεύσει τις μεμβράνες ερυθροκυττάρων από οξειδωτικές βλάβες, ως συνέπεια του καπνίσματος.

Οι ανθοκυανίνες, κύριος εκπρόσωπος των οποίων είναι ο 3- γλυκοζίτης της μαλβιδίνης, αποτελούν ακόμη ένα σημαντικό συστατικό του σταφυλιού και κατ' επέκταση του κρασιού. Οι ελεύθερες ανθοκυανίνες αποτελούν κύρια αντιοξειδωτικά μόρια του κόκκινου κρασιού. Μπορούν να ανιχνεύουν ελεύθερες ρίζες, που παράγονται μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων, κυρίως ρίζες υδροξυλίου και ασκούν προστατευτική δράση στην λιποξειδική υπεροξειδωση. Τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους, θεωρείται ότι συμβάλλουν περισσότερο στην αντιοξειδωτική δράση του κρασιού (181). Δεδομένα από *in vitro* μελέτες υποδεικνύουν την αντιοξειδωτική και καρδιοπροστατευτική δράση της μαλβιδίνης. Οι Boghar et. al. (182) έδειξαν ότι η έκθεση ενεργοποιημένων μακροφάγων σε μαλβιδίνη, μπορεί να μειώσει την φλεγμονή, αφού περιορίζει την ενεργοποίηση του NF-kB, και της MAPK (mitogen-activated protein kinase), καθώς και την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι Quintieri et. al. (183) έδειξαν ότι ένα εκχύλισμα από φλούδες σταφυλιών πλούσιο σε μαλβιδίνη (3-O-γλυκοζίτης μαλβιδίνης), έχει θετική επίδραση στην καρδιακή λειτουργία και προστατεύει την καρδιά από βλάβη λόγω απότομης επαναιμάτωσης, σε απομονωμένους καρδιακούς ιστούς ποντικών.

Σύμφωνα, λοιπόν, με την πρόσφατη βιβλιογραφία, φαίνεται, ότι η υπεροχή του κρασιού είναι μάλλον αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης των μικροσυστατικών του κρασιού και της αιθανόλης που περιέχει. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν, ότι η αιθανόλη είναι, μάλλον, υπεύθυνη για τις θετικές επιδράσεις της κατανάλωσης κρασιού στο μεταβολισμό και τη συγκέντρωση των λιπιδίων. Αντίθετα, είναι πιο πιθανό τα μικροσυστατικά του κρασιού να ευθύνονται για την ενίσχυση του συστήματος αιμόστασης και φλεγμονής καθώς και την ενίσχυση της ενδοθηλιακής λειτουργίας (146). Ωστόσο, απαιτούνται καλά σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές, καθώς τα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα δεν επαρκούν για να διαπιστωθούν με σιγουριά οι ακριβείς επιδράσεις των φαινολικών συστατικών στην υγεία.

3.3 Αξιοποίηση Υποπροϊόντων Οινοποιίας



Εικόνα 35: Στέμφυλα (186).

Το σταφύλι αποτελεί ακόμα και σήμερα βασικό μέρος της αγροτικής οικονομίας και μάλιστα είναι το πιο ευρέως καλλιεργούμενο φρούτο σε παγκόσμια κλίμακα. Καταναλώνεται κυρίως είτε φρέσκο ως φρούτο ή χυμός είτε αποξηραμένο ως σταφίδα, ενώ από τους βασικότερους στόχους καλλιέργειάς του είναι η οινοποίηση. Η διαδικασία της οινοποίησης είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια και αποτελεί μέρος της

παράδοσης πολλών χωρών της νοτιοδυτικής Ευρώπης, ενώ το κρασί είναι από τα πιο διαδεδομένα αλκοολούχα ποτά παγκοσμίως (184).

Η καλλιέργεια του σταφυλιού το 2014 έφτασε σχεδόν 74 εκ. τόνους παγκοσμίως, από τα οποία σχεδόν τα μισά απευθύνονται στην παραγωγή κρασιού (185). Το μεγαλύτερο μέρος της καλλιέργειας, σχεδόν τα $\frac{3}{4}$, γίνεται από την Ευρώπη και την Ασία, ενώ μόνο η Ισπανία, η Κίνα, η Γαλλία, η Ιταλία και η Τουρκία αντιπροσωπεύουν το 50 % των αμπελώνων παγκοσμίως (186).

Η διαδικασία της οινοποίησης οδηγεί σε πολύ μεγάλο όγκο παραπροϊόντων, τα οποία περιλαμβάνουν οργανικά απόβλητα, εκπομπές αερίων και ανόργανα υπολείμματα. Τα οργανικά υποπροϊόντα, περιλαμβάνουν τα υπολείμματα του σταφυλιού από την έκθλιψη του φρούτου και το σχηματισμό του μούστου και συγκεκριμένα ένα μίγμα από σπόρους και φλούδες (στέμφυλα), κοτσάνια (τσάμπουρα), οινολάσπες και φύλλα, τα οποία συνήθως χρησιμοποιούνται για κομποστοποίηση ή απορρίπτονται σε ανοιχτούς χώρους, επιβαρύνοντας το περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψιν τα εκατομμύρια τόνους παραπροϊόντων, από τη βιομηχανία οινοποίησης, έχει δημιουργηθεί μεγάλη ανάγκη για την αναζήτηση τρόπων διαχείρισης των αποβλήτων αυτών τόσο από οικολογικής όσο και από

οικονομικής άποψης. Τα παραπροϊόντα οиноποίησης, όντας πλούσια πηγή φυτοχημικών και βιοενεργών συστατικών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων, όπως και σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα (138). Τα βασικότερα παραπροϊόντα οиноποίησης, καθώς και πιθανές χρήσεις τους θα αναλυθούν παρακάτω.

3.3.1. Στέμφυλα

Τα στέμφυλα είναι από τα βασικότερα υποπροϊόντα οиноποίησης, καθώς αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για οиноποίηση ετησίως, φτάνοντας σε εκατομμύρια τόνους παγκοσμίως. Έχει αναφερθεί ότι παράγεται 1 κιλό στέμφυλα για 6 λίτρα κρασί. Τα στέμφυλα αποτελούν ουσιαστικά ένα μίγμα με τα στερεά μέρη των σταφυλιών που επεξεργάζονται κατά τη δημιουργία του μούστου, από την έκθλιψη του φρούτου και αποτελείται κυρίως από τους σπόρους και τις φλούδες των σταφυλιών. Όσον αφορά στη σύστασή του, το ποσοστό υγρασίας κυμαίνεται, συνήθως μεταξύ 50% και 72%, αν και το ποσοστό υγρασίας μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού και την κατάσταση ωρίμανσης (138). Παρόλο που έχει μικρή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (<4%), αποτελεί πλούσια πηγή φυτικών ινών, οι οποίες καλύπτουν 30 με 40%, περίπου, του όγκου του, ενώ έχει αναφερθεί και η παρουσία σακχάρων μέχρι και 150 γρ./ κιλό (187). Επιπλέον, περιλαμβάνει σε ένα μεγάλο βαθμό πολυμερείς ενώσεις, που αποτελούν συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων του φυτού, όπως η λιγνίνη, η οποία εντοπίζεται σε ποσοστό 17-24% και η κυτταρίνη που κυμαίνεται μεταξύ 27% και 37% (138). Από χρηστικής άποψης, τα στέμφυλα αποτελούν ιδανικό υλικό με πολλές χρήσεις. Αρχικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή ελαίων από τους σπόρους των σταφυλιών και πολυφαινολών, (ανθοκυανίνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φαινολικά οξέα και ρεσβερατρόλη). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κιτρικού οξέος, μεθανόλης, ξανθάνης και αιθανόλης, μέσω ζύμωσης, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών βραχείας ζύμωσης και απόσταξης, καθώς και βιοκαυσίμων. Ακόμη, τα στέμφυλα χρησιμοποιούνται ως προσθετικό σε ζωοτροφές, και ως λίπασμα, ενώ μεγάλο ενδιαφέρον έχει παρουσιάσει και η βιομηχανία τροφίμων για τη χρήση τους ως συμπλήρωμα ή προσθετικά σε τρόφιμα, καθώς θεωρούνται πλούσια πηγή φυσικών

αντιοξειδωτικών. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ο εμπλουτισμός αλευριού με σπόρους σταφυλιών, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής αξίας του τροφίμου (187).

Όσον αφορά στα επιμέρους συστατικά των στεμφύλων, οι σπόροι καλύπτουν περίπου το 38 με 52% των στέμφυλων, αν και έχουν αναφερθεί και αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις, της τάξεως του 15 %.



Εικόνα 36: Σπόροι (186).

Οι σπόροι των σταφυλιών είναι πλούσιοι σε φυτικές ίνες (40%), ενώ περιέχουν και αιθέρια έλαια (16%), πρωτεΐνη (11%) και άλλες ουσίες όπως, σάκχαρα και ιχνοστοιχεία. Οι σπόροι του σταφυλιού εμφανίζουν το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο από τα μέρη του σταφυλιού και είναι πλούσιοι σε φλαβαν-3-όλες, προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες τανίνες) και υδρολυομένες τανίνες. Πιο συγκεκριμένα, υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν η (+) - κατεχίνη και η (-) – επικατεχίνη, όπως οι συζευγμένες τους μορφές με γαλλικό οξύ, και κυρίως η επικατεχίνη γαλλικού, η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη, ενώ έχουν παρατηρηθεί σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις οι προκυανιδίνες B1 -B4. Από τα υδρόξυβενζοϊκά οξέα τα σημαντικότερα που έχουν εντοπιστεί στους σπόρους είναι το γαλλικό και το πρωτοκατεχικό οξύ. Ωστόσο, φαίνεται ότι σε σπόρους από κόκκινες ποικιλίες υπερέχει το πρωτοκατεχικό οξύ, ενώ οι σπόροι λευκών σταφυλιών παρουσιάζουν αντίστοιχα υψηλές συγκεντρώσεις και στα δύο οξέα (138). Τα υδρόξυκιναμωνικά οξέα, παρουσιάζουν σχετικά μικρή συγκέντρωση στους σπόρους του σταφυλιού και μάλιστα, δεν έχει εντοπιστεί κανένα σε σπόρους λευκών σταφυλιών, ενώ σε σπόρους κόκκινων σταφυλιών φαίνεται να υπερέχει το χλωρογενικό οξύ (138,185). Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι, αν και η περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά μπορεί να φτάνει το 60 με 70%, μόνο ένα μικρό μέρος αυτών παραλαμβάνεται μετά την έκθλιψη των σταφυλιών, με αποτέλεσμα να έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον από βιομηχανίες φαρμάκων καλλυντικών και τροφίμων, ως ωφέλιμη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (138). Η παρασκευή ελαίου από την

έκθλιψη των σπόρων του σταφυλιού αποτελεί την βασικότερη χρήση αυτού του μέρους από τα σταφύλια. Τα έλαια αυτά, είναι πλούσια σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ιδίως λινολεϊκό οξύ, και έχει φανεί ότι μπορεί να αυξάνει την HDL και να μειώνει την LDL, δρώντας προστατευτικά για την καρδιά.



Εικόνα 37: Φλούδες (186).

Ακόμη, περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως βιταμίνη E, ασκορβικό οξύ και β-καροτένιο, ενισχύοντας έτσι την αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού (187). Επιπλέον, έχει προταθεί η προσθήκη σπόρων σταφυλιού σε κρασί, κατά το στάδιο της ζύμωσης, η οποία φαίνεται να οδηγεί στην αύξηση το φαινολικού περιεχομένου στο κρασί και ενίσχυση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας (188).

Οι φλούδες των σταφυλιών αποτελούν περίπου το 65% των στέμφυλων και αποτελούν πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών, τα οποία κυμαίνονται από 28 μέχρι 35% (185,189). Οι φλούδες των σταφυλιών αποτελούν βασική πηγή υδρόξυκιναμωνικών οξέων, τα οποία εντοπίζονται σε όλα τα μέρη του σταφυλιού αλλά βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στους εξωτερικούς ιστούς των ώριμων φρούτων, δηλαδή στις φλούδες. Αν και η συγκέντρωσή τους μειώνεται κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, η συνολική τους ποσότητα αυξάνεται αναλογικά με το μέγεθος του φρούτου. Από αυτά τα πιο άφθονο στη φλούδα είναι το χλωρογενικό οξύ, ενώ εντοπίζονται και το καφεϊκό και το καφταρικό οξύ σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Από την κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων αυτά που εντοπίζονται κυρίως στις φλούδες είναι το πρωκατεχικό και το γαλλικό οξύ (185), αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τους σπόρους. Επιπλέον, οι φλούδες των σταφυλιών είναι πλούσιες σε ανθοκυανίνες, με κύριο εκπρόσωπο τον 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, ενώ φαίνεται να εμφανίζουν και σημαντική συγκέντρωση σε στιλβένια, κυρίως ρεσβερατρόλη (140).

3.3.2 Τσάμπουρα (κοτσάνια)

Τα τσάμπουρα αποτελούν περίπου το 1,4 - 7 % των επεξεργασμένων σταφυλιών και είναι η βασική πηγή των στυπτικών ιδιοτήτων του κρασιού, τα οποία αντιπροσωπεύονται κυρίως από τις ανθοκυανιδίνες. Συνήθως λοιπόν αφαιρούνται από την οινοποιητική διαδικασία, ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική στυπτικότητα και γενικότερα αρνητικές επιδράσεις στις οργανοληπτικές του ιδιότητες (138). Όσον αφορά στη σύστασή τους, τα τσάμπουρα εμφανίζουν υψηλά ποσοστά υγρασίας που κυμαίνονται από 55-80%, είναι πλούσια πηγή φυτικών ινών, κυρίως κυτταρίνης και λιγνίνης, ενώ εμφανίζουν και υψηλά ποσοστά σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία (187). Η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά είναι περίπου το 6% του ξηρού τους βάρους και περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, φλαβονόλες και στυλβένια. Τα τσάμπουρα εμφανίζουν τον μικρότερο αριθμό υδρόξυ-βενζοϊκών οξέων, με πιο άφθονο το γαλλικό οξύ, ενώ ακολουθεί το συριγλικό οξύ. Ο κυριότερος εκπρόσωπος των υδρόξυκινναμωνικών οξέων είναι το trans-καφταρικό οξύ, το οποίο παρουσιάζει αντίστοιχα αυξημένες συγκεντρώσεις και σε λευκές και σε ερυθρές ποικιλίες. Επιπλέον, παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση στην προκυανιδίνη B3 από όλα τα υπόλοιπα μέρη του σταφυλιού (185). Σε κόκκινες ποικιλίες έχει παρατηρηθεί υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονόλες, οι οποίες αφορούν κυρίως παράγωγα της κερκετίνης και κυρίως το γλυκουρονίδιο της κερκετίνης. Ταυτόχρονα, τα τσάμπουρα από λευκές ποικιλίες εμφανίζουν αντίστοιχο προφίλ φλαβονολών, αλλά η συγκέντρωσή τους είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τις κόκκινες ποικιλίες. Ακόμη εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση σε κατεχίνες και μάλιστα υψηλότερες από αυτές στους σπόρους και τις φλούδες και σε λευκές και σε ερυθρές ποικιλίες (138). Τέλος, από την κατηγορία των στυλβενίων μεγαλύτερη συγκέντρωση σε κόκκινα σταφύλια παρουσιάζουν η trans - ρεσβερατρόλη και η ε-βινιφερίνη, ενώ οι λευκές ποικιλίες έχουν αρκετά μικρότερη περιεκτικότητα. Μέχρι σήμερα τσάμπουρα χρησιμοποιούνται κυρίως στην σίτιση ζώων, ενώ θεωρούνται υψηλής ποιότητα λίπασμα για τη βελτίωση του εδάφους, ιδιαίτερα σε



Εικόνα 38: Τσάμπουρα (186).

αμπελώνες, οι οποίοι έχουν πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ύλες (140, 142).

3.3.3. Φύλλα



Εικόνα 39: Αμπελόφυλλα (186).

Τα αμπελόφυλλα αποτελούν το λιγότερο μελετημένο από τα παραπροϊόντα της οινοποίησης και της αμπελουργίας. Από τα λιγοστά δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για τη σύστασή τους φαίνεται ότι Αν και δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία για την σύστασή τους, φαίνεται να περιέχουν διάφορα οργανικά οξέα, λιπίδια, σάκχαρα, ένζυμα, βιταμίνες και καροτενοειδή, καθώς και πλήθος φαινολικών ενώσεων (138). Το χρώμα τους μπορεί να έχει από κίτρινες μέχρι κόκκινες και καφέ αποχρώσεις, ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού, το οποίο υποδεικνύει την παρουσία φλαβονοειδών, και κυρίως, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες και ανθοκυανιδίνες (190). Συγκεκριμένα σε αμπελόφυλλα *Vitis vinifera* από 20 λευκές και ερυθρές ποικιλίες έχουν βρεθεί παράγωγα φαινολικών οξέων, κυρίως υδρόξυ-κινναμωνικών, καθώς και μεγάλη ποικιλία φλαβονολών, ιδιαίτερα γλυκοζίτες μυρικετίνης και κερκετίνης και ο γαλακτοζίτης καμπερολόλης, με τα δύο τελευταία να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (191). Τα αμπελόφυλλα, χρησιμοποιούνται από το παρελθόν στην μαγειρική και ο χυμός τους παρουσιάζει αντισηπτικές ιδιότητες (138). Επιπλέον, έχει προταθεί η χρήση τους για την παραγωγή φυσικών χρωστικών (190).

3.3.4. Οινολάσπες

Οινολάσπες είναι όλα τα υπολείμματα, που σχηματίζονται στον πυθμένα των δοχείων που περιέχουν το κρασί μετά την ζύμωση ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, καθώς και το υπόλειμμα που λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση ή διήθηση του προϊόντος (138,192). Ανάλογα με το στάδιο οινοποίησης που σχηματίζονται, θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν σε πρώτες και δεύτερες

οινολάσπες, μετά από την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση αντίστοιχα, και σε οινολάσπες παλιωμένου κρασιού, οι οποίες σχηματίζονται κατά την παλαίωση του κρασιού σε ξύλινα βαρέλια (192). Οι οινολάσπες αποτελούνται από μία υγρή φάση, η οποία περιλαμβάνει κυρίως αιθανόλη και οργανικά οξέα, όπως οξικό και γαλακτικό οξύ και από μία στερεή φάση, η οποία περιλαμβάνει ζύμες, οργανικά οξέα (κυρίως ταρταρικό οξύ), αδιάλυτους υδατάνθρακες, ανόργανα άλατα, πρωτεΐνες, και φαινολικά συστατικά, τα οποία φτάνουν μέχρι και 1000 mg/L. Πιο συγκεκριμένα, αν και έχει εντοπιστεί ένα μεγάλο εύρος φαινολικών ενώσεων, σύμφωνα με τα λιγοστά δεδομένα της βιβλιογραφίας, φαίνεται ότι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες. Από τις φλαβονόλες μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει η κερκετίνη και τα παράγωγά της (42 μg/g ξηρής μάζας), ενώ η μυρικετίνη



Εικόνα 40: Οινολάσπες (136).

και η καμφερόλη εντοπίζονται σε μικρότερη συγκέντρωση. Ακόμη, σε δείγματα από οινολάσπες έχουν βρεθεί πάνω από 26 ανθοκυανίνες (6-12 mg/g ξηρής μάζας (138)), αλλά ο γλυκοζίτης μαλβιδίνης και ο κουμαρυλο-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (192). Οι οινολάσπες χρησιμοποιούνται, κυρίως, σε λευκούς και αφρώδεις οίνους, στην παλαίωση του κρασιού. Συγκεκριμένα, η αυτόλυση των νεκρών ζυμών, οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτεϊνών, ενζύμων, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων και πολυσακχαριτών, τα οποία συντελούν στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού, καθώς περιορίζουν την στυπτικότητα και την πικρή γεύση και βελτιώνουν τη δομή και το χρώμα του κρασιού. Το παραπάνω γεγονός φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ζυμών με τα φαινολικά συστατικά (138,192).

3.4 Διαδικασία Επεξεργασίας Υποπροϊόντων Οινοποίησης (Παραλαβή υποπροϊόντων – Εκχύλιση)

Η δημιουργία εκχυλισμάτων πλούσιων σε φαινολικά συστατικά, είναι ένας από τους κύριους τρόπους αξιοποίησης των πλούσιων σε φυτοχημικά παραπροϊόντων οινοποίησης. Συνεπώς, η εξαγωγή των βιοενεργών μικρο-συστατικών αποτελεί το πρώτο σημαντικό βήμα προς αυτή την κατεύθυνση. Αν και υπάρχουν διάφορες μέθοδοι εξαγωγής, αυτές που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά εδώ και δεκαετίες είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού και η εκχύλιση Soxhlet. Ωστόσο, οι τεχνικές αυτές είναι αρκετά χρονοβόρες, έχουν μεγάλες απαιτήσεις σε αντιδραστήρια, και πιθανόν υπάρχει κάποια απώλεια μικροσυστατικών, καθώς η κοινή διαδικασία περιλαμβάνει βήματα όπως θέρμανση, βρασμό, κ.α., με αποτέλεσμα να διερευνώνται νέες πιο αποτελεσματικές και οικονομικές μέθοδοι.

3.4.1 Εκχύλιση Υγρού-Στερεού

Η στερεή-υγρή εκχύλιση, είναι η πιο κοινή μέθοδος εκχύλισης στα παραπροϊόντα οινοποίησης. Η μέθοδος αυτή ορίζεται ως ένα φαινόμενο μεταφοράς της μάζας από το στερεό δείγμα στην υγρή φάση του διαλύτη με τον οποίο έρχεται σε επαφή. Η αποτελεσματικότητα της στερεής υγρής εκχύλισης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως τον τύπο του διαλύτη, τη θερμοκρασία, το pH, το μέγεθος των σωματιδίων κ.α. Ο τύπος του διαλύτη είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες, που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Λόγω της πολικής φύσης των πολυφαινολών, διαλύονται εύκολα σε πολικά διαλύματα, και συγκεκριμένα αυτά που συνδυάζουν νερό και αλκοόλη. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποιος ιδανικός διαλύτης, που να οδηγεί στη βέλτιστη εκχύλιση. Πιθανόν, η αποτελεσματικότητα του κάθε διαλύτη μεταβάλλεται ανάλογα με την εκάστοτε πολυφαινόλη. Σε μία πρόσφατη μελέτη έγινε σύγκριση της αποτελεσματικότητας 6 διαφορετικών διαλυτών, (80% μεθανόλη, 80% αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, μεθανόλη με προσθήκη οξέος 50% και 80%) στην δημιουργία φαινολικών εκχυλισμάτων από στέμφυλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα ήταν το πιο αποτελεσματικό στην απομόνωση μεγάλου εύρους πολυφαινολών, όπως φαινολικά οξέα, φλαβόνες, φλαβανόνες,

φλαβανόλες και στυλβένια, αλλά το διάλυμα μεθανόλης οδηγούσε σε καλύτερη απομόνωση ανθοκυανίνων (193). Άλλα δεδομένα από τη βιβλιογραφία, υποδεικνύουν ότι σε δείγμα από σπόρους σταφυλιού ένα διάλυμα βασισμένο σε νερό και ακετόνη είχε καλύτερα αποτελέσματα στην απομόνωση προκυανιδίνων, ενώ ένα διάλυμα μεθανόλης απομόνωνε καλύτερα κατεχίνες, επικατεχίνες και επιγαλλοκατεχίνη. Από την άλλη πλευρά, η εκχύλιση ολικού περιεχομένου ήταν πιο αποτελεσματική με ένα διάλυμα αιθανόλης και νερού. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι η απομόνωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου επηρεάζεται από το είδος του παραπροϊόντος, την διάρκεια εκχύλισης, την ποικιλία του σταφυλιού, την θερμοκρασία και άλλους παράγοντες, καθιστώντας την εύρεση ενός ιδανικού διαλύτη ιδιαίτερα δύσκολη. Γενικά, η παρουσία νερού φαίνεται να οδηγεί σε καλύτερη απορρόφηση των φαινολικών συστατικών, καθώς αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικών ιστών ενισχύει την μεταφορά τους στον υγρό διαλύτη. Επιπλέον, υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν σε αύξηση της διαλυτότητας των μικροσυστατικών και καλύτερη διάχυση, αλλά σε θερμοκρασία >50 °C, μειώνεται η σταθερότητα των πολυφαινολών και πιθανόν ένα μέρος τους να χαθεί κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Το pH, είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Η μείωση του pH με προσθήκη υδροχλωρίου, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της απόδοσης, όσον αφορά στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Ωστόσο, η μέθοδος της εκχύλισης στερεού υγρού έχει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η αυξημένη διάρκεια της εκχύλισης, η χαμηλή επιλεκτική ικανότητα, το υψηλό κόστος αντιδραστηρίων, καθώς και η πιθανή απώλεια θερμοευαίσθητων ενώσεων, με αποτέλεσμα να αναζητούνται εναλλακτικές μέθοδοι απομόνωσης των μικροσυστατικών του κρασιού (184,186).

3.4.2 Εκχύλιση Υπερκρίσιμων Ρευστών

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι μία, πιο φιλική προς το περιβάλλον, εναλλακτική της συμβατικής βιομηχανικής εκχύλισης, η οποία έχει εφαρμοστεί στην ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από τα παραπροϊόντα οινοποίησης. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την χρήση υπερκρίσιμων ρευστών, τα οποία λόγω των ιδιαίτερων

ιδιοτήτων τους, μπορούν να συμβάλλουν στην εξαγωγή οργανικών ουσιών από στερεά δείγματα. Τα υπερκρίσιμα ρευστά παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα διάχυσης, χαμηλό ιξώδες και σχεδόν μηδενική επιφανειακή τάση. Οι παραπάνω ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών επιτρέπουν μία ταχεία μεταφορά μάζας στην υπερκρίσιμη φάση, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνουν την ικανότητα διείσδυσης στους πόρους της στερεής φάσης, συνεπάγοντας μία γρήγορη και αποτελεσματική εκχύλιση (184).

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Η ουσία αυτή εκτός από οικονομική και μη τοξική, επιτρέπει μία χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής πίεσης εκχύλιση, απουσία φωτός και αέρα, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο ευαίσθητες ενώσεις όπως οι φαινολικές. Επιπλέον, η προσθήκη τροποποιητών, όπως η μεθανόλη ή η αιθανόλη, μπορεί να ενισχύσει την απόδοση της μεθόδου, καθώς μεταβάλλει την πολικότητα και άλλα χαρακτηριστικά του διαλύτη, με αποτέλεσμα να γίνεται μία πιο επιλεκτική εκχύλιση. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση χρησιμοποιείται ήδη στην απομόνωση και παραλαβή αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων, από έλαιο σπόρων σταφυλιού, στέμφυλα, καθώς έχει προταθεί και η χρήση της στην παραγωγή υψηλής ποιότητας ελαίου από σπόρους σταφυλιού (184,186).

3.4.3. Επιταχυνόμενη εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό

Η μέθοδος αυτή, η οποία είναι γνωστή και ως εκχύλιση υγρού υπό πίεση, περιλαμβάνει την χρήση συμβατικών διαλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες (100–180 °C) και υψηλές πιέσεις (1500–2000 psi), για την εκχύλιση οργανικών ενώσεων από στερεά δείγματα. Η υψηλή θερμοκρασία αυξάνει την διαλυτότητα των μικροσυστατικών προς εκχύλιση, καθώς και την ταχύτητα της, ενώ η αυξημένη πίεση βοηθάει την ικανότητα διάχυσης του διαλύτη.

Στην προκειμένη μέθοδο έχει προταθεί η χρήση του υπερκρίσιμου νερού ως διαλύτη, ο οποίος σε θερμοκρασία 140 °C μπορεί να οδηγήσει στην ανάκτηση πολυφαινολών παρόμοια με την χρήση 'συμβατικών διαλυτών. Ένα από κύρια πλεονεκτήματα της εκχύλισης υπό πίεση με υπερκρίσιμο νερό είναι ότι επιτρέπει την εκλεκτική παραλαβή συστατικών, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία, καθώς τα πιο

πολικά μόρια εξάγονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ τα λιγότερο πολικά σε υψηλότερες. Η μέθοδος αυτή ήδη έχει χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή διαφόρων πολυφαινολών όπως κατεχίνες, ανθοκυανίνες και φλαβανόλες από στέμφυλα ερυθρής ποικιλίας, και για την ανάκτηση ρεσβερατρώλης από σπόρους σταφυλιού. Η εκχύλιση υπό πίεση με υπερκρίσιμο νερό φαίνεται να πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες συμβατικές μεθόδους, καθώς οδηγεί στην παραλαβή υψηλής ποιότητας εκχυλισμάτων, με μικρότερη διάρκεια και κόστος εκχύλισης. Παρ' όλ' αυτά, παραμένουν ακόμα ερωτηματικά ως προς την βέλτιστη θερμοκρασία και τη σταθερότητα και διαφύλαξη των πολυφαινολών, ενώ ως μία νέα σχετικά μέθοδος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση μέχρι να μπορεί να ανταγωνιστεί τις παραδοσιακές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους (184,186).

3.4.4. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (UAE)

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση υπερηχητικών κυμάτων, σε εύρος μερικών KiloHertz, τα οποία διευκολύνουν την διάλυση των μικροσυστατικών στον διαλύτη, ενισχυλοντας τη μεταφορά τους από την πρώτη ύλη. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα των υπερήχων να επιταχύνουν την ενυδάτωση και θραυσματοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών και διευκολύνουν έτσι την απελευθέρωση των μικροσυστατικών και την μεταφορά τους στον διαλύτη. Όπως και τα υπόλοιπα κύματα, οι υπέρηχοι δημιουργούν ταλαντώσεις στο στερεό μέσο και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του κύματος, τόσο αυξάνεται και η ποσότητα του διαλύτη, που μπορεί να εισχωρήσει στα κύτταρα, καθώς και η ποσότητα των συστατικών προς εκχύλιση, που μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και τα κυτταρικά τοιχώματα του φυτού. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φλούδες σταφυλιών, με υψηλή απόδοση και μικρή διάρκεια εκχύλισης. Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους έχει εγείρει το ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί μία νέα, ενεργειακά πιο οικονομική μέθοδο σε σχέση με τις συμβατικές, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί την διάρκεια της εκχύλισης και την επίδραση της θερμοκρασίας, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για θερμοευαίσθητες ενώσεις, όπως οι φαινολικές (186).

3.4.5. Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (MAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα είναι μία ακόμη νέα μέθοδο για την παραλαβή των μικροσυστατικών από υποπροϊόντα οινοποίησης. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην παραγωγή θερμότητας με μικροκύματα, τα οποία επιταχύνουν την μεταφορά ενέργειας και μειώνουν το θερμικό φορτίο ανέπαφα.

Το μικρό μέγεθος των μορίων στα στέμφυλα συνεπάγεται την αύξηση της επιφάνειας των μορίων, που έρχεται σε επαφή με το διαλύτη, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η απόδοση της εκχύλισης. Παρόμοια με την χρήση υπερήχων, κύριος στόχος και σε αυτή τη μέθοδο είναι η θραύση των κυτταρικών μεμβρανών. Συγκεκριμένα, η θερμότητα που παράγεται με τα μικροκύματα μπορεί να υδρολύσει τους δεσμούς της κυτταρίνης, που αποτελεί το κύριο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων, συντελώντας έτσι στην διάρρηξη τους και κατά συνέπεια στην απελευθέρωση των μικροσυστατικών που προορίζονται για εκχύλιση στον διαλύτη. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση προανθοκυανιδινών από σπόρους σταφυλιού. Ωστόσο, παραμένουν κάποιοι προβληματισμοί όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας στις φαινολικές ενώσεις, καθώς και στην μειωμένη απόδοση της μεθόδου στην εκχύλιση μη πολικών συστατικών (186).

3.5. Αντιοξειδωτικές και Αντιφλεγμονώδεις δράσεις των υποπροϊόντων οινοποίησης

3.5.1. In vitro δεδομένα

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των παρά -προϊόντων οινοποίησης in vitro έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια και αξιολογούν κυρίως την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες ή να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, τα οποία θα συμμετείχαν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν να παρουσιαστούν 16 μελέτες (194–209), οι οποίες εξετάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των παρά-προϊόντων οινοποίησης, τόσο από λευκές, όσο και από ερυθρές ποικιλίες. Πιο συγκεκριμένα, τα στέμφυλα (194,195,200–202,205,206,208,209) εξετάστηκαν σε 9 μελέτες, οι σπόροι σε 8 μελέτες (194,196–198,202,203,205,207), οι φλούδες (194,198,202,203,205) και τα τσάμπουρα σε 5 μελέτες (194,195,199,202,203) και οι οινολάσπες εξετάστηκαν σε 2 μελέτες (201,204). Επιπλέον, 9 μελέτες, εξέτασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα

μεμονωμένων υποπροϊόντων (πχ. μόνο στέμφυλα ή μόνο σπόροι) (196,197,199,200,204,206,208–210), ενώ οι υπόλοιπες 7 (194,195,198,201–203,205) χρησιμοποίησαν ως δείγμα παραπάνω υποπροϊόντα, επιτρέποντας την συγκριτική αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (πχ. τσάμπουρα και στέμφυλα, ή στέμφυλα, σπόροι, φλούδες).

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκαν διάφορες δοκιμασίες, μεταξύ των οποίων οι ABTS, DPPH, ORAC, FRAP, TBARS, η ικανότητα αναστολής της οξείδωσης του ορού, καθώς και η ικανότητα εκκαθάρισης διαφόρων δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως η ρίζα υδροξυλίου, το ανιόν υπεροξειδίου και το υποχλωριώδες οξύ. Πιο αναλυτικά, τα στέμφυλα αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με 13 δοκιμασίες, οι σπόροι και οι φλούδες με 8 δοκιμασίες, τα τσάμπουρα με 9 δοκιμασίες και οι οινολάσπες με 7 δοκιμασίες. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, όλα τα υποπροϊόντα οινοποιίας παρουσιάζουν καλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, οι μεθοδολογικές διαφορές που παρατηρούνται από μελέτη σε μελέτη, οι πολλές διαφορετικές αντιοξειδωτικές δοκιμασίες, καθώς και οι διαφορετικές μονάδες μέτρησης, που χρησιμοποιούνται, καθιστούν αδύνατη την ολοκληρωμένη σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παρα-προϊόντων, με αποτέλεσμα αυτή να μπορεί να γίνει μόνο ποιοτικά. Σύμφωνα με τις 15 μελέτες, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, παρατηρείται, μάλλον μία υπεροχή στους σπόρους σε σχέση με τα υπόλοιπα υποπροϊόντα. Συγκεκριμένα, οι σπόροι φάνηκε να υπερέχουν σε σχέση με τα στέμφυλα σε 5 δοκιμασίες (194,202), αν και σε 4 δοκιμασίες (205) παρατηρήθηκε το αντίθετο. Επιπλέον, οι σπόροι έδειξαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα τσάμπουρα σε 5 δοκιμασίες (194,195,202,203), καθώς και με τις φλούδες σε 8 δοκιμασίες (194,198,202,203), ωστόσο το αντίστροφο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε 4 δοκιμασίες (205).

Τα τσάμπουρα υπερείχαν σε σχέση με τα στέμφυλα σε 6 δοκιμασίες (194,195,199,200,202), αλλά το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε 5 δοκιμασίες (194,195,202). Αντίστοιχα, η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις φλούδες ήταν εμφανής σε 3 δοκιμασίες (202,203), ενώ σε 2 δοκιμασίες παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση (194). Τέλος, όσον αφορά τις οινολάσπες, φαίνεται ότι έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα στέμφυλα (201).

Πίνακας 2: Αντιοξειδωτικές δράσεις παραπροϊόντων οиноποίησης *in vitro*

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παρα- προϊόντος	Αντιοξειδωτική δοκιμασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα			
Gonzalez-Centeno et. al., 2012 (199)	Ερυθρές (C. Sauvignon, Callet, Merlot, Manto Negro, Syrah, Tempranillo) Λευκές (Chardonnay, Macabeu, Parellada, Prebsal blanc)	Τσάμπουρα	ABTS (mg TE/g DW)	99,7 - 253,2			
			CUPRAC (mg TE/g DW)	145,4 – 378,6			
			FRAP (mg TE/g DW)	65,4 – 170,1			
			ORAC (mg TE/g DW)	101,9 – 282,1			
Gonzalez-Centeno et. al., 2013 (200)	Λευκές Chardonnay, Macabeu, Parellada, and Premsal Blanc)	Στέμφυλα	ABTS (mg TE/g DW)	71,6 – 134			
			CUPRAC (mg TE/g DW)	106,3 – 209,1			
			FRAP (mg TE/g DW)	49 - 124,8			
			ORAC (mg TE/g DW)	58,1 - 122,2			
Reis et. al., 2017 (201)	Pinot Noir	Στέμφυλα, Οινολάσπες		Στέμφυλα		Οινολάσπες	
			Εκκαθάριση ·O ₂ %	80		41	
			Εκκαθάριση HO* %	61		59	
			Εκκαθάριση ROO* %	75		67	
Makris et. al., 2007 (202)	Ερυθρή Roditis Λευκή Agiorgitiko	Στέμφυλα, Φλούδες, Σπόροι, Τσάμπουρα		Στέμφυλα	Φλούδες	Σπόροι	Τσάμπουρα
			DPPH (mM TE/g DW)	2.22-2.3	1.74-3.06	5.94	3.17
			Αναγωγική ικανότητα (P _R)(mM AAE/g DW)	2.71-3.53	0.5-1.74	7.44-7.58	3.86
			Εκκαθάριση HO* (SA _{HFR})(mM QTE/g)	1.53-2.57	0.48-1.48	1.44-2.97	1.42

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παρα-προϊόντος	Αντιοξειδωτική δοκιμασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα		
Melo et. al. 2015 (195)	Chenin Blanc, Petit Verdot, and Syrah	Στέμφυλα Τσάμπουρα		Στέμφυλα	Τσάμπουρα	
			DPPH (μmol TE/g)	191 - 540	473 - 1086	
			ABTS (μmol TE/g)	218 - 653	805 - 2419	
			ORAC (μmol TE/g)	739 – 2796	2191 - 3718	
			Εκκαθάριση ·O2 - EC50 (mg/mL εκχ)	0,19 – 2,16	0,17 – 0,28	
			Εκκαθάριση HOCl EC50 (mg/mL εκχ)	0,017 – 0,128	0,021 – 0,042	
Aybastier et. al., 2018 (196)	Alphonse	Σπόροι	ABTS (mg TE/g DW)	7,48-9,13		
			Ικανότητα Αναστολής Οξείδωσης DNA (μέτρηση προϊόντων οξ. DNA ng/mg DNA με προσθήκη και χωρίς εκχυλίσματος)	Χωρίς εκχύλισμα 892,64 ng/mg DNA Με εκχύλισμα 382,2 - 417,1 ng/mg DNA		
Costa et. al., 2019 (197)	Ερυθρή Alicante Bouschet	Σπόροι, Σπόροι χωρίς λιπαρά, Εκχ. Πλούσιο σε φυτικές ίνες		Σπόροι	Σπόροι-χ λίπος	Εκχ πλούσιο σε ίνες
			DPPH (μmol TE/g)	160.9 ± 22.3	105.5 ± 2.0	382.7 ± 2.9
			ABTS (μmol TE/g)	237.5 ± 17.9	147.0 ± 4.6	823.7 ± 57.1
			ORAC (μmol TE/g)	339.4 ± 36.5	177.4 ± 17.2	1439.4 ± 47.4
Ky et. al., 2014 (198)	Grenache, Syrah, Carignan Noir, Mourvèdre, Counoise and Alicante Bouchet	Σπόροι, Φλούδες		Σπόροι	Φλούδες	
			ORAC (μmol TE/g DW)	11,8-536	14,5-290	
			FRAP (μmol TE/g DW)	19-232	13.7-266	
			ABTS (μmol TE/g DW)	531-603	25.3 - 464	
			DPPH (μmol TE/g DW)	42,4-561	37,4 - 531	

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παρα-προϊόντος	Αντιοξειδωτική δοκιμασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα		
Romero-Diez et. al., 2018 (204)	Tempranillo	Παλαιωμένες Οινολάσπες Διαφορετικών εκχυλίσων	ORAC (μmol TE/gDE)	217-2771		
			HORAC (μmol CAE/gDE)	348-4690		
			HOSC (μmol TE/gDE)	281-4527		
			FRAP (μmol TE/gDE)	362-2197		
Choleva et. al. 2019 (209)	Ερυθρές QSour Black, Syrah, Cabernet Franc	Στέμφυλα (φλούδες και σπόρους) διαφορετικών εκχυλίσων	DPPH - EC ₅₀ (μg εκχ/ mL)	15,8 – 1074,9		
			Ικανότητα Αναστολής Οξειδωσης ορού προκαλούμενη από Cu ²⁺ (% αύξηση lagtime/μg)	45,9 – 365,7		
Makris et. al., 2007 (203)	Roditis	Σπόροι, Φλούδες, Τσάμπουρα		Φλούδες	Σπόροι	Τσάμπουρα
			DPPH (mM TE/g DW)	0,22-0,33	4,57-8,55	1,98-3,58
Antonioli et. al., 2015 (206)	Malbec	Στέμφυλα	ORAC (μmol TE/g εκχ)	2756		

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παρα- προϊόντος	Αντιοξειδωτική δοκιμασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα			
Peixoto et. al., 2018 (205)	Δεν αναφέρεται	Στέμφυλα, Φλούδες, Σπόροι		Στέμφυλα	Σπόροι	Φλούδες	
			DPPH EC ₅₀ (μg/ml εκχ)	123	23	563	
			Αναγωγική ικανότητα EC ₅₀ (μg/ml εκχ)	262	110	488	
			Αναστολή αποχρωματισμός β-καροτενίου EC ₅₀ (μg/ml εκχ)	362	208	782	
			TBARS EC ₅₀ (μg/ml εκχ)	97	49,6	629	
Perez et. al., 2015 (207)	Δεν αναφέρεται	Έλαιο σπόρων	ABTS (% δέσμευση)	91,4 για C _{εκχ} = 100 μg/L		Αντιφλεγμονώδης δράση Αναστολή παραγωγή NO μετά από διέγερση Raw 264.7 μακροφάγων με LPS	
			DPPH % (% δέσμευση)	95.8 για C _{εκχ} = 200 μg/L]			
Jara-Palacios et. al., 2018 (194)	Λευκή Zalema,	Σπόροι, Φλούδες, Τσάμπουρα, Στέμφυλα		Σπόροι	Φλούδες	Τσάμπουρα	Στέμφυλα
			DPPH (μmol TE/g)	1500-3000	100-1200	300-900	400-1300
			ORAC (μmol TE/g)	2700-4000	1400-3500	1000-2400	1500-3000
De Sales et. al., 2018 (208)	Ερυθρή Pinot noir	Στέμφυλα	ORAC (μmol TE/g DW)	167,1			
			FRAP (μmol FeSE/g DW)	3220			
			ABTS (μmol TE/g DW)	1014			

3.5.2. In vivo δεδομένα (κλινικές δοκιμές)

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των υποπροϊόντων οινοποίησης in vivo, έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λαμβάνοντας υπόψιν τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από in vitro δεδομένα. Παρ' όλ' αυτά, λίγες κλινικές δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται 8 κλινικές δοκιμές, στις οποίες διερευνώνται οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις στέμφυλων και σπόρων σταφυλιού. Σε 3 μελέτες (211–213) χρησιμοποιήθηκαν υποπροϊόντα οινοποίησης, ως δωρεά από οινοποιία, σε 3 (214–216) εξετάστηκε η δράση εμπορικών σκευασμάτων, με εκχύλισμα από σπόρους σταφυλιού, ενώ σε δύο μελέτες (217,218) δεν αναφέρεται η προέλευση του συμπληρώματος. Οι εθελοντές, που συμμετείχαν στις 8 κλινικές δοκιμές, βρίσκονταν σε καταστάσεις, όπου αναμένεται αυξημένο οξειδωτικό στρες (πχ. ΣΔΙΙ (214), υπέρβαρο ή παχυσαρκία (213,218), καπνιστές (215), αυξημένο κίνδυνο για Καρδιαγγειακά νοσήματα (216) και για Μεταβολικό σύνδρομο (211,212)). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των παραπροϊόντων αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητα αύξησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, ή/και της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών μορίων ή/και ενζύμων, την μείωση δεικτών οξειδωτικής βλάβης, καθώς και την ικανότητα εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών.

Στις 6 κλινικές δοκιμές (211,212,214–216,218) εξετάστηκε η μακροπρόθεσμη επίδραση της κατανάλωσης συμπληρώματος, η οποία είχε διάρκεια 4 έως 10 εβδομάδες, ενώ 2 μελέτες (213,217) εξέτασαν την βραχυπρόθεσμη επίδρασή τους, μετά από 10 και 24 ώρες. Επιπλέον, σε δύο μελέτες εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση συμπληρώματος, το οποίο περιείχε εκτός από παραπροϊόντα οινοποίησης και άλλες ουσίες, όπως ρόδι ή omija fruit. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στις 6 από τις 8 κλινικές δοκιμές παρατηρήθηκε μία θετική επίδραση των παραπροϊόντων οινοποίησης, στο οξειδωτικό στρες. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε μείωση στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης (211,212,217,218), αύξηση σε αντιοξειδωτικά μόρια (211,212,214,215,218) και σε 2 μελέτες (215,217) παρατηρήθηκε αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, τα ευρήματα των Perez- Ramirez et. al. (213) και των Mellen et. al. (216), δεν έδειξαν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε δείκτες

οξειδωτικού στρες ή αντιοξειδωτικών μετά από βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη χορήγηση των παραπροϊόντων οινοποίησης, αντίστοιχα.

Παρ' όλ' αυτά, τα δεδομένα δεν επαρκούν ακόμη για να διαπιστώσουμε με βεβαιότητα, τις δυνητικές αντιοξειδωτικές επιδράσεις των παραπροϊόντων οινοποίησης, καθώς πολύ μικρός αριθμός κλινικών δοκιμών έχει διεξαχθεί μέχρι σήμερα, ενώ παρατηρείται και μεγάλη ανομοιογένεια μεταξύ τους, όσον αφορά τόσο στο είδος του παραπροϊόντος και στην ποικιλία του σταφυλιού, όσο και στον τρόπο χορήγησης του συμπληρώματος, στην ποσότητά του και στην συγκέντρωσή τους σε φαινολικά συστατικά.

Πίνακας 3: Κλινικές δοκιμές για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των παραπροϊόντων

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παραπροϊόντος	Πειραματική Διαδικασία	Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	Κύρια Ευρήματα
Kar, 2009 (214)	Καμία αναφορά	Εκχ. Σπόρων Εμπορικό σκεύασμα	<u>Σχεδιασμός</u> : Τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή <u>Δείγμα</u> : N=32 (Γ: 50%), 18-70 ετών, ΣΔ II & ↑ κίνδυνο CVD > 600 mg/d εμπορικό εκχ. σπόρων vs placebo, για 4 εβδ. 2 εβδ. Wash out	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAOS) [μm (AEAC)] GSH (μM) GSH/GSSG	<u>Εκχ. σπόρων</u> : ↑ GSH vs. αρχή και vs placebo Μη σημαντικά αποτελέσματα για TAOS & GSH/GSSG ↓ hsCRP (mg/l) vs. αρχή
Urquiaga, 2015 (211)	Ερυθρή Cabernet Sauvignon	Στέμφυλα (αλεύρι)	<u>Σχεδιασμός</u> : Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή <u>Δείγμα</u> : N=38 άνδρες (Ομάδα Ελέγχου: 13, Παρέμβαση: 25), 30-65 ετών, ≥ 1 παράγοντα MetS > <u>Παρέμβαση</u> : 20 g/d αλεύρι από στέμφυλα (WGPF, 10 g φυτικές ίνες, 822 mg πολυφαινόλων για 4 εβδ.	<u>Μετρήσεις στο πλάσμα</u> α-, β-, γ- και δ- τοκοφερόλη (mM) βιταμίνη C (mM) TRAP (μM Trolox Equivalent) DPPH (μM Trolox Equivalent) Ομάδες Καρβονυλίου (nmol/mg πρωτεΐνης)	<u>Ομάδα Παρέμβασης</u> Στατιστικά σημαντική: ↑ γ- και δ- τοκοφερόλης πλάσματος ↓ ομάδες καρβονυλίου πλάσματος ↓ Συστολικής και Διαστολικής ΑΠ ↓ Επιπέδων γλυκόζης νηστείας
Urquiaga, 2018 (212)	Ερυθρή Cabernet Sauvignon	Beef burgers prepared w Grape Στέμφυλα flour (WGPF)	<u>Σχεδιασμός</u> : Μελέτη Παρέμβασης <u>Δείγμα</u> : N=27 30-65 ετών, ≥ 1 παράγοντα MetS <u>Παρέμβαση</u> : > 100 γρ μοσχ. Μπιφτέκι με 7% προσθήκη WGPF/d (3,5% φ.ί. και 1.2 mg GE/g πολυφαινόλων) για 1 μήνα > Κανένα μπιφτέκι, για 1 μήνα > 100 γρ. μοσχ. Μπιφτέκι/d (ελέγχου), για 1 μήνα	<u>Αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος</u> DPPH, βιταμίνη E, βιταμίνη C <u>Δείκτες οξειδωτικής βλάβης</u> AOPPs, ox LDL, MDA	<u>Κατανάλωση WGPF-μπιφτέκι</u> : Σημαντική ↓ AOPP και Ox LDL και ↑ βιτ. C Σημαντική ↓ γλυκόζη νηστείας και HOMA-IR

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παραπροϊόντος	Πειραματική Διαδικασία	Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	Κύρια Ευρήματα
Han, 2016 (218)	Καμία αναφορά	Στέμφυλα + σχιζάνδρα (φρούτο omija)	<u>Σχεδιασμός</u>: Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή <u>Δείγμα</u>: N=76, 30-70 ετών, ΔΜΣ $\geq 23 \text{ kg/m}^2$ ➤ <u>Παρέμβαση</u>: 3 ομάδες για 10 εβδ - Placebo (N=24), 4 g/d άμυλο - Low GO (N=26), 342.5 mg/d εκχ. Στεμφύλων + 57.5 mg/d εκχ. Σχιζάνδρας - High GO (N= 26), 685 mg/d εκχ. Στεμφύλων + 115 mg/d εκχ. Σχιζάνδρας	<u>Αντιοξειδωτικά ένζυμα ερυθροκυττάρων</u> SOD (unit/mg Hb) CAT ($\mu\text{mol/min/mg Hb}$) GSH-Px (nmol/min/mg Hb) GR (nmol/min/mg Hb) TBARS ($\mu\text{mol/g Hb}$) H₂O₂ (mmol/mg Hb)	<u>High-GO</u>: ↑ SOD vs. αρχή, ↑ GSH-Px και GR vs. placebo & αρχή ↓ TBARS και H₂O₂ vs. placebo & αρχή ↓ IL-1β, Tnf-a vs. αρχή ↓ Tot chol, LDL, non-HDL & ↑ apo A-1 vs ctrl ↓ apo B, apoB/apo-A1 vs. ctrl και low-GO ↓ Lp(a) vs. Αρχή ↓ δείκτης αθηρωμάτωσης vs. ctrl <u>Low-GO</u>: ↑ SOD vs. αρχή ↓ plasma IL-1b vs. αρχή
Perez-Ramirez, 2020 (213)	Tempranillo	Στέμφυλα + ρόδι romace (1:1)	<u>Σχεδιασμός</u>: Διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, μη τυχαιοποιημένη <u>Δείγμα</u>: N=20, 40-60 ετών, κοιλιακή παχυσαρκία ➤ <u>Παρέμβαση</u>: A: OGTT χ. συμπλήρωμα B: OGTT + 10 g. συμπλ/τος C : 10 g. συμπλ/τος + OGTT σε 10 ώρες <u>Συμπλήρωμα</u>: περιείχε 1,4 g μη εκχυλίσμων (NEEP) & 0,4 g εκχυλίσμων πολυφαινόλων (EPP)	<u>Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ούρα και πλάσμα με τις δοκιμασίες</u>: - FRAP - ABTS	Μη σημαντικές διαφορές σε FRAP και ABTS με χορήγηση συμπληρώματος Μη σημαντικές διαφορές σε: - απόκριση σε γλυκόζη - αντίσταση σε ινσουλίνη - στα επίπεδα ουρικού οξέος σε πλάσμα /ούρα Τάση για ↑ ινσουλινοευαισθησίας στη C παρέμβαση

Ερευνητές	Χρώμα ή/και Ποικιλία	Είδος Παραπροϊόντος	Πειραματική Διαδικασία	Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	Κύρια Ευρήματα
Safaei, 2017 (217)	Καμία αναφορά	Εκχύλισμα από σπόρους	<u>Σχεδιασμός</u>: Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή <u>Δείγμα</u>: N=87, με προγραμματισμένο χειρουργείο bypass ➤ <u>Παρέμβαση</u>: 3 ομάδες (N= 3 * 29) - Ελέγχου (Ctrl) → καμία παρέμβαση - GSE → εκχ. Σπόρων (100 mg/6 h, 24h πριν την επέμβαση - Vit C → συμπλήρωμα βιταμίνης C (25 mg/kg) κατά τη διάρκεια της επέμβασης	<u>Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα</u>: TAC (mmol/L) <u>Δείκτης οξειδωσης λιποειδών</u> MDA (nmol/ml) <u>Αντιοξειδωτικά ένζυμα</u>: SOD και GPx (units/g Hgb) Δείγμα αίματος σε T1, T2, T3 T1: προ ισχαιμίας T2: ισχαιμία T3: 10' μετά την επαναιμάτωση	<u>TAC</u>: - Ctr ↓ σε T2 & T3 vs. T1 - GSE & Vit C ↑ vs. ctrl σε T2 & T3 <u>MDA</u>: - GSE & Vit C ↓ vs. ctrl - Vit C ↓ vs. ctrl σε T1 - GSE ↓ σε T3 vs. ctrl Μη σημαντικές διαφορές στα αντιοξειδωτικά ένζυμα <u>GSE and Vit C</u>: Καλύτερη λειτουργία κοιλίας vs. ctrl
Weseler, 2011 (215)	Καμία αναφορά	Εκχ. Σπόρων, εμπορικό σκεύασμα	<u>Σχεδιασμός</u>: Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή <u>Δείγμα</u>: N=28 άνδρες, 30-60 ετών, καπνιστές ➤ <u>Παρέμβαση</u>: 8 εβδομάδες - 200 mg MOF (Μονο- & Ολιγο- μερείς Φλαβονόλες από σπόρους) (N=15) - Placebo (N=13) Μετρήσεις στην αρχή, στις 4 και 8 εβδ.	<u>Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος</u> (TEAC) <u>Αντιοξειδωτικά ένζυμα</u> GSH/GSSG ερυθροκυττάρων <u>Δείκτης υπεροξειδωσης λιποειδών</u> 8-iso-PGF_{2α} πλάσματος Έκφραση γονιδίων για αντιοξειδωτικά ένζυμα (CAT, GPX1, GSR, HMOX1, SOD2)	<u>MOF</u>: - τάση για ↑ TEAC στις 8 εβδ. vs. Αρχή - GSH/GSSG ↑ 22% στις 8 εβδ. vs. Αρχή - μη σημαντικές διαφορές σε 8-iso-PGF_{2α} - Μη σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα - ↓ ολικής και LDL chol ορού vs. αρχή <u>Αντιφλεγμονώδεις δράσεις από την ex vivo έκθεση σε ενδοτοξίνη βακτηρίων</u> - ↓ έκφρασης φλεγμονωδών γονιδίων σε λευκ/ρα
Mellen, 2010 (216)	Muscadine	Εκχ. σπόρων, εμπορικό σκεύασμα	<u>Σχεδιασμός</u>: RCT διασταυρούμενη, διπλά τυφλή κλινική δοκιμή <u>Δείγμα</u>: N=50 (Γ: 50%), 18-65 ετών, ≥ 1 παράγοντες CVD ➤ <u>Παρέμβαση</u>: 4 εβδομάδες - 1300 mg/d σπόρους vs placebo (4 εβδ wash out)	<u>Δείκτες Οξειδωτικής Βλάβης</u> MDA (μM) 8-ισοπροσάνια (pg/mL) <u>Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα</u> TAC (mM UAE)	<u>Μη σημαντικές διαφορές σε</u>: - δείκτες φλεγμονής - δείκτες οξειδωτικού στρες vs placebo - % αλλαγή FMD <u>Σημαντική</u> ↑ διαμέτρου αρτηρίας βραχίονα (ηρεμία) vs placebo και αρχή

Κεφάλαιο 4: Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσει την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός συμπληρώματος που περιέχει εκχύλισμα από υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα). Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική εργασία, αξιολογήθηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος, το οποίο καταναλώθηκε παράλληλα με ένα τυποποιημένο γεύμα ,να επιδρά στην ικανότητα του ορού έναντι της οξείδωσης, σε φαινομενικά υγιείς εθελόντριες.

Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία

5.1. Σχεδιασμός Μελέτης

5.1.1. Περιγραφή Σχεδιασμού

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη και ελεγχόμενη με placebo κλινική δοκιμή. Επιλέχθηκαν φαινομενικά υγιείς γυναίκες να συμμετέχουν στην μελέτη. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, κάθε εθελόντρια προσήλθε 2 φορές στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο σε απόσταση τουλάχιστον 1 μήνα, όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα. Εκεί, οι εθελόντριες κατανάλωσαν συγκεκριμένο γεύμα και έλαβαν είτε το εκχύλισμα από τα στέμφυλα, είτε το placebo και στη συνέχεια παραλήφθηκαν τα δείγματα αίματος.

Πριν την ημέρα του πειράματος πραγματοποιήθηκε 3 ήμερη καταγραφή της διαιτητικής πρόσληψης του κάθε εθελοντή (2 τηλεφωνικές ανακλήσεις 24ώρου και 1 ανάκληση 24ώρου την ημέρα του πειράματος). Πριν την διεξαγωγή του πειράματος, οι εθελόντριες συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων για τον τελευταίο μήνα, καθώς και ερωτηματολόγιο καταγραφής της φυσικής τους δραστηριότητας. Επιπλέον, ζητήθηκε στις εθελόντριες να είναι νηστικές για τουλάχιστον 8 ώρες πριν από το πείραμα, καθώς και να προσκομίσουν δείγμα πρωινών ούρων σε ουροσυλλέκτη. Με την άφιξή τους στο χώρο της Μονάδας Μεταβολισμού του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές μετρήσεις και συγκεκριμένα βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης και ισχύων, αρτηριακή πίεση και πραγματοποιήθηκε λιπομέτρηση.

Μετά τις ανθρωπομετρικές μετρήσεις, τοποθετήθηκε φλεβοκαθετήρας στον εθελοντή και 10 λεπτά αργότερα λήφθηκε δείγμα αίματος νηστείας. Στη συνέχεια, οι εθελοντές κατανάλωναν ένα προκαθορισμένο γεύμα πλούσιο σε λίπος σε διάστημα 15 λεπτών, μαζί με 6 κάψουλες που περιείχαν το εκχύλισμα ή 6 κάψουλες με το placebo. Μετά την κατανάλωση του γεύματος ξεκινούσε η αιμοληψία, η οποία γινόταν ανά 30 λεπτά και είχε συνολική διάρκεια 6 ώρες.

5.1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντών

Το δείγμα, που χρησιμοποιήθηκε για την κλινική δοκιμή, ήταν γυναίκες, φαινομενικά υγιείς, ηλικίας 25 – 45 ετών, με Δείκτη Μάζας Σώματος 20-29 kg/m². Επιπλέον, έπρεπε να μην έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή για τουλάχιστον 2 εβδομάδες και να μην έχουν υπάρξει σε κατάσταση φλεγμονής για αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Οι εθελόντριες, οι οποίοι πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια, ενημερώθηκαν πλήρως για τις υποχρεώσεις και τα δικαιώματά τους και υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στη μελέτη. Ακολούθως, τους ζητήθηκε να μην καταναλώνουν τρόφιμα πλούσια σε φαινολικά συστατικά, όπως φρούτα, λαχανικά, τσάι, καφέ κ.α., όπως και οινοπνευματώδη και ενεργειακά ποτά για τρεις ημέρες, πριν την διεξαγωγή του πειράματος.

5.1.3. Χαρακτηριστικά γεύματος

Το γεύμα που κατανάλωναν οι εθελόντριες ήταν πλούσιο σε λίπος και αποτελούνταν από 2 τοστ, η διατροφική ανάλυση των οποίων παρουσιάζεται στους πίνακες 4 και 5. Συνολικά, οι εθελόντριες κατανάλωσαν 1131 kcal, εκ των οποίων το 19,7 % προερχόταν από υδατάνθρακες (222,4 kcal), το 11,2% από πρωτεΐνες (126,7 kcal) και το 66,7 % από λίπος (754 kcal). Οι 6 κάψουλες, που κατανάλωσαν οι εθελοντές μαζί με το γεύμα αποτελούνταν από εκχύλισμα στεμφύλων με αιθανόλη, από ερυθρές ποικιλίες, ως δωρεά από τα Κτήματα Χατζημιχάλη και περιείχαν 660 mg πολυφαινολικών συστατικών (110 mg πολυφαινολικών συστατικών/ κάψουλα), ενώ το placebo περιείχε διάλυμα μαλτοδεξτρίνης.

Πίνακας 4: Διατροφική Ανάλυση τυποποιημένου γεύματος

Τοστ 1	γρ.	Ποσότητα γεύματος	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γρ)	Πρωτεΐνη (γρ)	Λίπος (γρ)
Ψωμί σταρένιο ΔΕΚΑ Καραμολέγκος	27.5	55	170	26,8	4,6	4,6
Μανούρι Θεσσαλίας	28	28	153	0,39	2,07	13,38
Σαλάμι αέρος ΝΙΚΑΣ	9	18	76	0,2	3,6	6,8
Βούτυρο Όλυμπος Soft	10	20	146	0,1	0,2	16
Σύνολο			545	27	10	41
Θερμίδες/ομάδα				109,96	41,88	367,02

Τοστ 2	γρ.	Ποσότητα γεύματος	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γρ)	Πρωτεΐνη (γρ)	Λίπος (γρ)
Ψωμί σταρένιο ΔΕΚΑ Καραμολέγκος	27,5	55	170	26,8	4,6	4,6
Cheddar Ιρλανδίας	20	40	156	0,4	10,4	12,8
Μορταδέλα ΑΒ	20	40	114	0,8	6	9,6
Βούτυρο Όλυμπος Soft	10	20	146	0,1	0,2	16
Σύνολο			586	28	21	43
Θερμίδες/ομάδα				112,4	84,8	387
% ομάδας				19,2	14,5	66
% ομάδας				20,2	7,7	67,3

5.2. Πρωτόκολλο αιμοληψίας

Μετά την κατανάλωση του γεύματος πραγματοποιήθηκε η αιμοληψία στις εξής χρονικές στιγμές (min): 0, 30, 60, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360. Ο συνολικός όγκος αίματος, που λήφθηκε από τον εθελοντή έφτανε τα 232,5 mL. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 4 ml αίμα για την απομόνωση του ορού (S, serum) και του πλάσματος (P, plasma), 3 ml για την απομόνωση πλάσματος πλούσιο σε λευκοκύτταρα (LRP, (leukocyte-rich plasma) και 13,5 ml για την απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια PRP (platelet-rich plasma).

Η λήψη δείγματος ούρων πραγματοποιήθηκε, (εκτός των πρώτων πρωινών που φέρνει ο εθελοντής) στη 1, στις 2, στις 4 και στις 6 ώρες, ενώ στο τέλος μετρήθηκε η συνολική ποσότητα των ούρων.

Στη διάρκεια των 6h οι εθελοντές θα καταναλώνουν 1 ποτήρι νερό στις 3h.

Απομόνωση ορού (S)

Για την απομόνωση του ορού παραλαμβάνονταν 4 ml αίματος σε κόκκινο Vacutainer, το οποίο δεν περιείχε αντιπηκτικό διάλυμα και παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει για 1 ώρα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα

1500 g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο και αποθηκεύονταν υπό ψύξη στους -80 °C.

5.3 Αξιολόγηση ικανότητας των συστατικών του εκχυλίσματος να αναστέλλει την οξείδωση του ορού

Πρωτόκολλο Οξείδωσης Ορού

Αντιδραστήρια

- Stock Διάλυμα θειικού χαλκού (CuSO_4) 20mM: Ζυγίζονται 0,0125 gr θειικού χαλκού ($\text{MW}=249,68$) και διαλύονται σε 2,5 ml H_2O . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα PBS buffer: Σε 1000 mL απεσταγμένου νερού αναδιαλύονται 9 g χλωριούχου νατρίου (NaCl), 0,9076 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2408 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και ρυθμίζεται το pH στο 7,4.

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 υδροϋπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξειδίων, που παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντώνται 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 πλάσματος στην οξείδωση.

Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μια σιγμοειδή καμπύλη, η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) χρόνος της λανθάνουσας φάσης (lag time), 2) η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης ανά min, 3) ο χρόνος (t_{max}) κατά τον οποίο παρατηρείται η V_{max} και 4) η μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης.

Πειραματική Πορεία

Χρησιμοποιούνται UV plates (96-well UV plate flat bottom)

- Πραγματοποιείται αραιώση του δείγματος ορού για κάθε χρονική στιγμή με διάλυμα PBS, σε αναλογία 1:12.
- Πραγματοποιείται αραιώση του διαλύματος θειικού χαλκού με διάλυμα PBS (21 μ L θειικού χαλκού 20 mM σε 22,980 ml PBS).
- Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε κάθε well 20 μ L αραιωμένου ορού.
- Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230 μ L του αραιωμένου χαλκού, δηλαδή ένα μίγμα που περιέχει PBS και CuSO_4 , με τελική συγκέντρωση 16 μ M και τελικό όγκο στα 250 μ L.
- Τέλος, με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245 nm για 6,5 h ανά 2 min.

Πίνακας 5: Οξείδωση Ορού

Δείγμα ορού	π	0	30	60	90	120	150	180	210	240	300	360
Αραιωμένος ορός 1:12 (μ L)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
CuSO_4 (μ L)	230	230	230	230	230	230	230	230	230	230	230	230
Μέτρηση της απορρόφησης στα 245 nm για 6,5 h ανά 2 min.												

5.4 Στατιστική επεξεργασία

Ο έλεγχος της κανονικότητας των μελετώμενων παραμέτρων έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Οι συνεχείς μεταβλητές που κατανέμονται κανονικά

παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών στην αρχή των δυο παρεμβάσεων έγιναν με τη χρήση του κριτηρίου One Way ANOVA (συγκρίσεις μεταξύ δύο ομάδων). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές ελέγχθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measure ANOVA, RMANOVA) όταν οι μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%, και όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 21.0, SPSS 2012, Chicago, USA).

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

6.1.: Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συμπεριλαμβάνονται οι μετρήσεις από τις 3 εθελόντριες, οι οποίες έχουν ολοκληρώσει μέχρι στιγμής και τις δύο παρεμβάσεις. Πιο αναλυτικά, στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστούν, συνοπτικά, τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν από κάθε παρέμβαση και κάποιοι βασικοί βιοχημικοί δείκτες στην αρχή της κάθε παρέμβασης, δηλαδή πριν την κατανάλωση του γεύματος. Επιπλέον, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ικανότητας αναστολής της οξειδωσης του ορού (lag time), για την κάθε εθελόντρια ξεχωριστά μετά την λήψη του placebo και του εκχυλίσματος. Τέλος, θα παρουσιαστεί συνολικά το lag time, ως %Π για τις δύο παρεμβάσεις.

6.2.: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών

Τα βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την παρέμβαση παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά δεν φάνηκε να μεταβάλλονται μεταξύ των δύο παρεμβάσεων ($p > 0.05$). Η ηλικία των 3 εθελοντών ήταν μεταξύ 25 και 30 ετών ($26,67 \pm 2,89$ έτη). Το μέσο ύψος των τριών εθελοντών ήταν 1,61 μέτρα, ενώ το βάρος τους έφτανε τα 65, 6 kg ($65,57 \pm 14,59$ kg) στην παρέμβαση με το placebo και δε φάνηκε να διαφέρει σημαντικά στην παρέμβαση με το εκχύλισμα ($65,43 \pm 16$ kg).

Πίνακας 6: Κύρια ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών

(N=3)	Placebo	Εκχύλισμα	p
Ηλικία (έτη)	$26,67 \pm 2,89$	$26,67 \pm 2,89$	1
Βάρος (kg)	$65,57 \pm 14,59$	$65,43 \pm 16$	0,992
Ύψος (m)	$1,61 \pm 0,03$	$1,61 \pm 0,03$	1
ΔΜΣ (kg/m ²)	$25,32 \pm 4,94$	$25,25 \pm 5,48$	0,994
Π. μέσης (cm)	$74,67 \pm 8,96$	$73,67 \pm 9,87$	0,903
Π. ισχίου (cm)	$101,67 \pm 18,18$	$102,33 \pm 17,62$	0,966
Λίπος (%)	$28,27 \pm 12,44$	$27,1 \pm 13,81$	0,919

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο $\pm$ τυπική απόκλιση για τις δύο παρεμβάσεις. Σημαντική μεταβολή $p < 0,05$ pla vs. εκχ.

Ο Δείκτης μάζας Σώματος των εθελοντών βρέθηκε ελαφρώς άνω των φυσιολογικών ορίων ($18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$) και έμεινε σχετικά σταθερός μεταξύ των δύο παρεμβάσεων στα $25,3 \text{ kg/m}^2$ (placebo: $25,32 \pm 4,94$ και εκχύλισμα: $25,25 \pm 5,48 \text{ kg/m}^2$). Η περιφέρεια μέσης ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων ($< 88 \text{ cm}$) και χωρίς μεγάλες μεταβολές μεταξύ των δύο παρεμβάσεων (placebo: $74,67 \pm 8,96 \text{ cm}$ και εκχύλισμα: $73,67 \pm 9,87 \text{ cm}$), όπως και η περιφέρεια ισχίου (placebo: $101,67 \pm 18,18 \text{ cm}$ και εκχύλισμα: $102,33 \pm 17,62 \text{ cm}$). Τέλος, το ποσοστό λίπους βρέθηκε στο $28,3 \%$ ($28,27 \pm 12,44$) στην παρέμβαση με το placebo και στο $27,1 \%$ ($27,1 \pm 13,81$) στην παρέμβαση με το εκχύλισμα.

6.3.: Βιοχημικές μετρήσεις στην αρχή των δυο παρεμβάσεων

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται, συνοπτικά, τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών, πριν την λήψη του γεύματος (χρόνος Π). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο παρεμβάσεων πριν την κατανάλωση του γεύματος ($p > 0.05$). Πραγματοποιήθηκε μέτρηση γλυκόζης νηστείας, των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης HDL, καθώς και της αρτηριακής πίεσης. Πιο αναλυτικά, η γλυκόζη νηστείας των εθελοντών ήταν φυσιολογική και στις δύο παρεμβάσεις ($< 100 \text{ mg/dl}$) και συγκεκριμένα μετρήθηκε στα $80,99 \pm 7,72 \text{ mg/dl}$ και στα $82,69 \pm 4,42 \text{ mg/dl}$, για τις παρεμβάσεις με το placebo και το εκχύλισμα, αντίστοιχα.

Πίνακας 7: Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν την παρέμβαση (χρόνος Π)

(N=3)	Placebo	Εκχύλισμα	p
Γλυκόζη (mg/dL)	$80,99 \pm 7,72$	$82,69 \pm 4,42$	0,757
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	$41,67 \pm 43,92$	$47,76 \pm 20,12$	0,612
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	$140,99 \pm 22,19$	$143,85 \pm 9,39$	0,597
HDL- c (mg/dL)	$36,93 \pm 10,17$	$35,58 \pm 5,31$	0,602
LDL – c (mg/dl)	$100,86 \pm 11,04$	$97,97 \pm 10,78$	0,610
SBP (mmHg)	$115 \pm 8,49$	$99,5 \pm 7,78$	0,197
DBP (mmHg)	$74,5 \pm 16,26$	$61,5 \pm 0,71$	0,376

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο $\pm$ τυπική απόκλιση. SBP: Συστολική Πίεση, DBO: Διαστολική Πίεση, Σημαντική μεταβολή $p < 0,05$ pla vs. εκχ.

Όσον αφορά στην ολική χοληστερόλη, η συγκέντρωσή της βρέθηκε μικρότερη των 200 mg/dl και συνεπώς εντός των φυσιολογικών ορίων (placebo: $140,99 \pm 22,19$ και εκχυλίσμα: $143,85 \pm 9,39$). Από την άλλη πλευρά η HDL χοληστερόλη βρέθηκε χαμηλότερη από την επιθυμητή συγκέντρωση, πριν από την παρέμβαση τόσο του placebo, όσο και του εκχυλίσματος, και συγκεκριμένα μετρήθηκε στα $36,93 \pm 10,17$ και $35,58 \pm 5,31$ mg/dl, αντίστοιχα. Η μέση συγκέντρωση τριγλυκεριδίων ήταν φυσιολογική και στις δύο παρεμβάσεις και συγκεκριμένα, πριν τη χορήγηση του placebo βρέθηκε στα $41,67 \pm 43,92$ mg/dl, ενώ πριν την χορήγηση του συμπληρώματος βρέθηκε λίγο υψηλότερη στα $47,76 \pm 20,12$ mg/dl. Η LDL χοληστερόλη υπολογίστηκε με τον τύπο $LDL = TC - HDL - TG/5$, όπου TC η ολική χοληστερόλη και TGη συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών. Η συγκέντρωσή της βρέθηκε ελαφρώς αυξημένη (≥ 100 mg/dl) πριν τη χορήγηση του placebo στα $100,86 \pm 11,04$ mg/dl και κοντά στα ανώτερα φυσιολογικά όρια πριν τη χορήγηση του εκχυλίσματος στα $97,97 \pm 10,78$ mg/dl. Τέλος, όσον αφορά στην αρτηριακή πίεση, τόσο η συστολική όσο και η διαστολική ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων (συστολική ≤ 120 mmHg και διαστολική ≤ 80) και στις δύο παρεμβάσεις, αλλά βρέθηκε πιο αυξημένη πριν τη χορήγηση του placebo.

6.4.: Επίδραση των παρεμβάσεων στην ικανότητα οξείδωσης του ορού

Τα αποτελέσματα της ικανότητας αναστολής οξείδωσης ορού θα παρουσιαστούν ξεχωριστά για κάθε μία από τις εθελόντριες στις δύο παρεμβάσεις και στη συνέχεια θα παρουσιαστούν συνολικά τα αποτελέσματα.

6.4.1: Εθελοντής 1

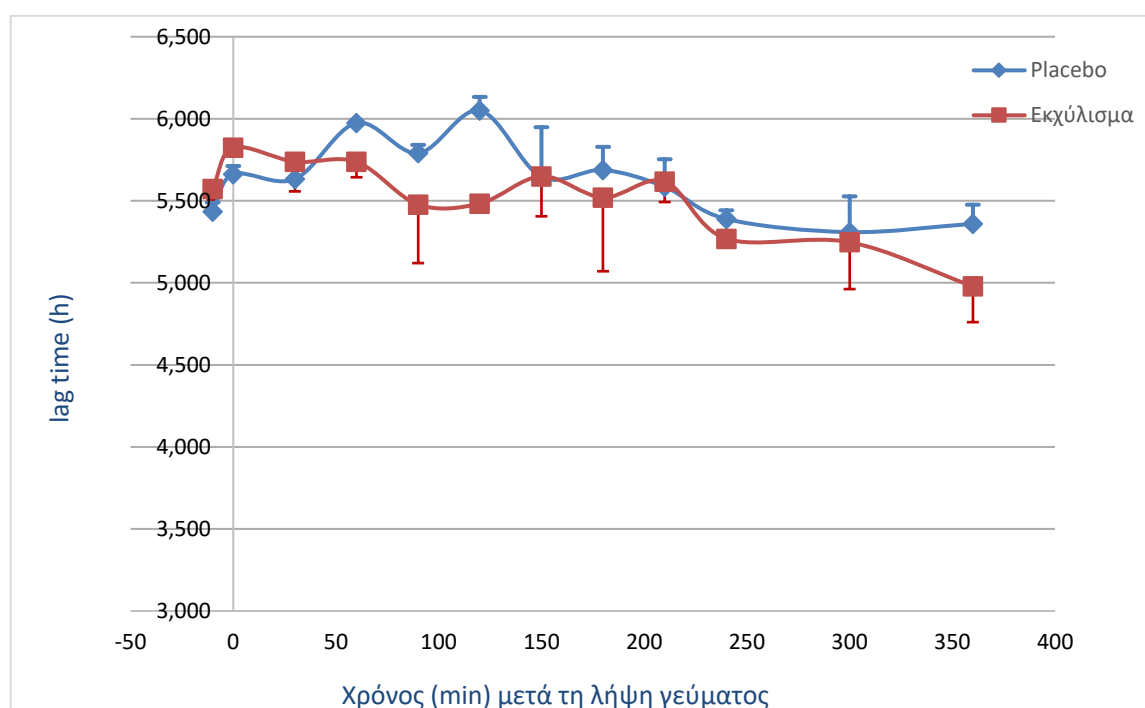
Τα lag time (min) του πρώτου εθελοντή φαίνονται στον Πίνακα 8, ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση, για την κάθε χρονική στιγμή που λήφθηκε δείγμα αίματος για τις δύο παρεμβάσεις. Τα δεδομένα του Πίνακα 8 απεικονίζονται στο Διάγραμμα 1. Σύμφωνα με το διάγραμμα 1, η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν φαίνεται να αναστέλλει ικανοποιητικά τον χρόνο οξείδωσης του ορού. Αντίθετα, παρατηρείται μία τάση για αύξηση του lag time μετά τη χορήγηση του placebo στα 60 και στα 120 λεπτά. Επιπλέον, παρατηρείται μία τάση για μείωση στο lag time με την λήψη το εκχυλίσματος στα 360 λεπτά, γεγονός το οποίο δε έλαβε χώρα με την λήψη placebo.

Πίνακας 8: Lag time εθελοντή 1

	Placebo		Εκχύλισμα	
	M.o. lag time (min)	St. Dev.	M.o. lag time (min)	St. Dev.
Π	326,07	3,35	334,40	3,91
0	339,73	3,01	349,44	2,42
30	337,94	5,74	344,32	10,87
60	358,47	0,66	344,24	5,62
90	347,43	3,03	328,64	21,41
120	363,01	4,99	329,00	1,41
150	338,74	18,18	338,95	14,61
180	341,26	8,47	331,20	26,96
210	335,13	10,08	337,05	7,50
240	323,36	3,17	316,13	
300	318,55	13,08	314,88	17,15
360	321,58	7,00	298,73	13,11

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο λεπτών οξείδωσης ορού $\pm$ τυπική απόκλιση.

Διάγραμμα 1: Αναστολή οξείδωσης ορού (lag phase) για τον εθελοντή 1



6.4.2: Εθελοντής 2

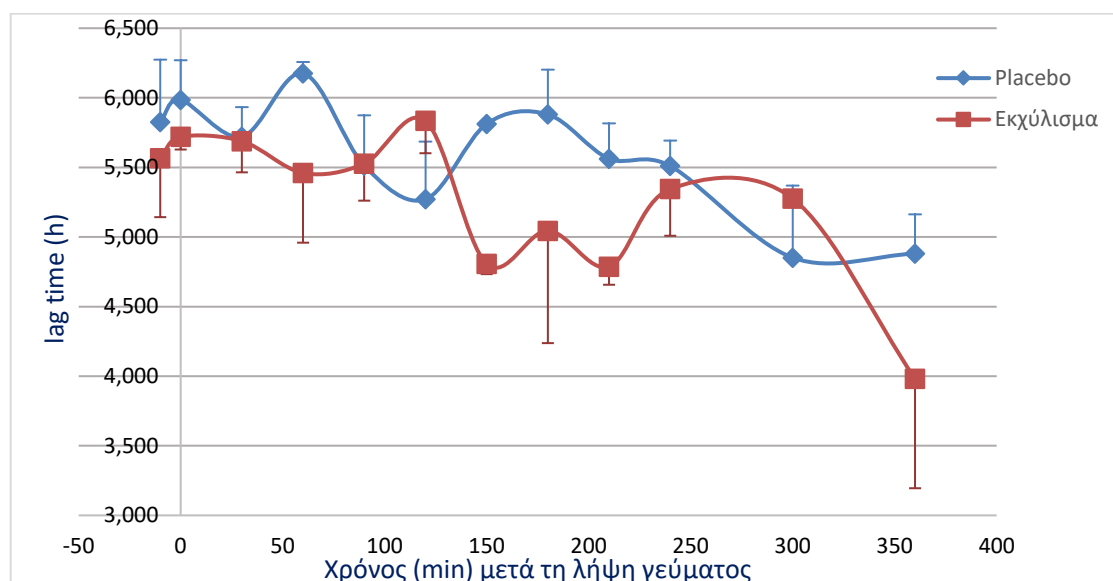
Αναλυτικά, τα lag time της οξείδωσης του ορού για τον δεύτερο εθελοντή παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και απεικονίζονται στο Διάγραμμα 2. Από τα δεδομένα αυτά παρατηρείται μία αναστολή της οξείδωσης του ορού μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος στα 120, στα 240 και στα 300 λεπτά. Ωστόσο, παρατηρείται μία αύξηση στο lag time με το Placebo στα 60 και στα 150 λεπτά, η οποία διατηρείται μέχρι τα 210 λεπτά. Επιπλέον, όμοια με το διάγραμμα 1, και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μία μείωση του χρόνου οξείδωσης στα 360 λεπτά, το οποίο δεν παρατηρήθηκε μετά τη λήψη του placebo.

Πίνακας 9: Lag time εθελοντή 2

	Placebo		Εκχύλισμα	
	M.o. lag time (min)	St. Dev.	M.o. lag time (min)	St. Dev.
Π	349,52	25,40	333,96	26,94
0	359,06	5,44	343,15	17,15
30	343,23	13,46	341,33	12,75
60	370,55	30,05	327,60	4,88
90	330,78	15,93	331,60	21,67
120	316,28	13,94	350,06	24,85
150	348,76	4,38	288,38	1,07
180	352,82	48,45	302,71	19,33
210	333,69	7,81	287,23	15,29
240	330,60	20,14	320,68	10,96
300	291,10	1,63	316,57	31,07
360	292,83	47,14	238,83	16,94

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο λεπτών οξείδωσης ορού $\pm$ τυπική απόκλιση.

Διάγραμμα 2: Αναστολή οξείδωσης ορού (lag phase) για τον εθελοντή 2



6.4.3: Εθελοντής 3

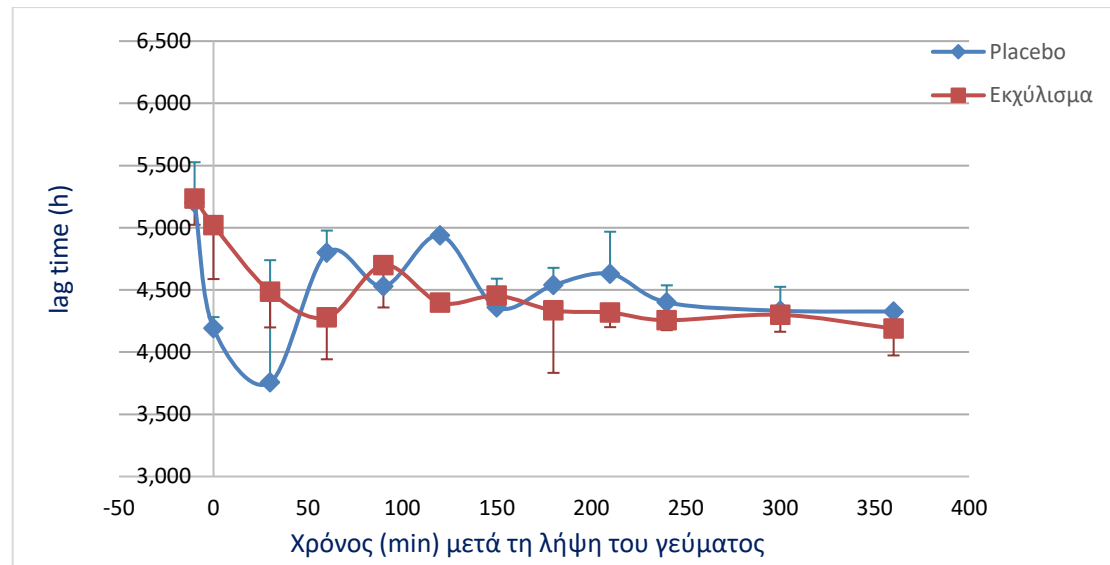
Αντίστοιχα, στον Πίνακα 11 φαίνονται αναλυτικά οι χρόνοι οξείδωσης του ορού για τον εθελοντή 3 που ολοκλήρωσε τις δύο παρεμβάσεις και απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.

Πίνακας 10: Lag time εθελοντή 3

	Placebo		Εκχύλισμα	
	M.o. lag time (min)	St. Dev.	M.o. lag time (min)	St. Dev.
Π	312,09	19,50	314,08	12,68
0	251,52	5,37	301,18	25,94
30	225,37	58,97	269,11	17,19
60	287,96	10,67	256,75	20,22
90	271,75	0,21	281,95	20,41
120	296,32	0,45	263,82	
150	261,58	13,85	267,21	2,30
180	272,33	8,32	260,10	30,10
210	277,73	20,35	259,09	7,06
240	263,99	8,21	255,38	4,78
300	259,97	11,53	257,99	8,17
360	259,58	1,12	251,37	12,96

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο λεπτών οξείδωσης ορού $\pm$ τυπική απόκλιση.

Διάγραμμα 3: Αναστολή οξείδωσης ορού (lag phase) για τον εθελοντή 3

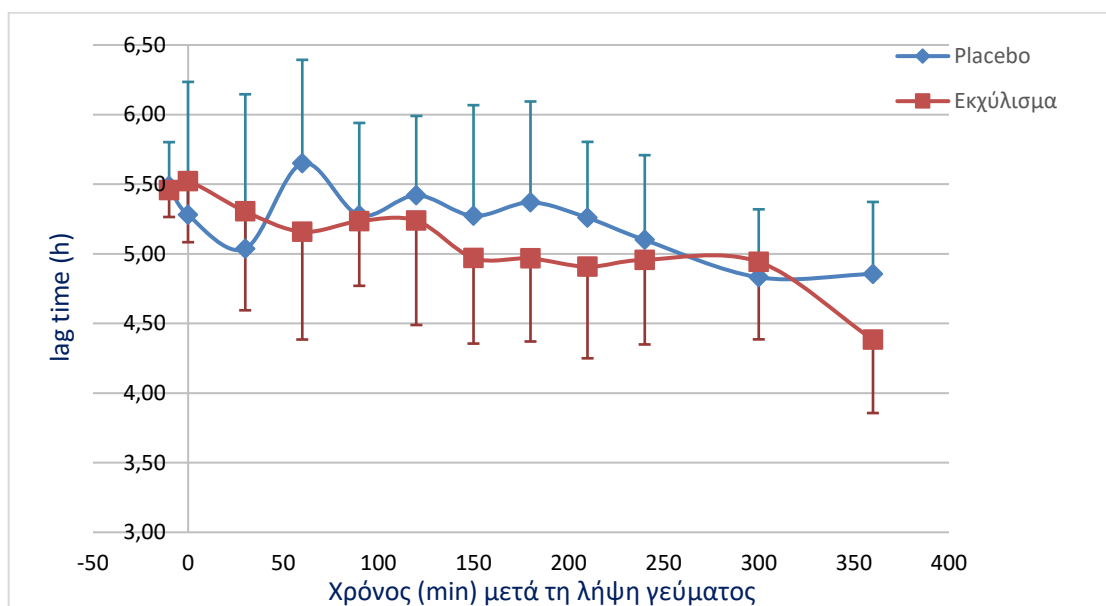


Σύμφωνα με αυτό, παρατηρείται μετά τη λήψη του placebo, μία απότομη μείωση του χρόνου οξείδωσης αμέσως μετά την κατανάλωση του γεύματος, στον χρόνο 0, η οποία συνεχίστηκε και στα 30 λεπτά, ενώ ακολούθησε μία απότομη αύξηση του χρόνου οξείδωσης στα 60 λεπτά. Η μείωση των lag time στα 0 και στα 30 λεπτά παρατηρήθηκε και με το εκχύλισμα στεμφύλων, ωστόσο ήταν αρκετά πιο περιορισμένη σε σχέση με το placebo. Συγκεκριμένα, στο χρόνο 0 το lag time ήταν μεγαλύτερο με το εκχύλισμα σχεδόν κατά 50 λεπτά, συγκριτικά με το placebo, ενώ στα 30 λεπτά η διαφορά αυτή ήταν περίπου 44 λεπτά. Από την άλλη πλευρά, το lag time στα 60 και στα 120 λεπτά, ήταν υψηλότερο κατά μισή περίπου ώρα με το placebo σε σχέση με το εκχύλισμα.

6.4.4. Συνολικά αποτελέσματα οξείδωσης ορού

Στον Πίνακα 11, παρουσιάζονται οι μέσοι χρόνοι των lag time σε λεπτά και για τους τρεις εθελοντές και απεικονίζονται διαγραμματικά στο Διάγραμμα 4 (h). Όπως φαίνεται από το p value, τα lag time μεταξύ των δύο παρεμβάσεων δεν διέφεραν σημαντικά ούτε πριν, αλλά ούτε και μετά την κατανάλωση γεύματος.

Διάγραμμα 4: Αναστολή οξείδωσης ορού και για τους τρεις εθελοντές



Πίνακας 11: Μέσος όρος των lag time (min) και για τους τρεις εθελοντές

	Placebo		Εκχύλισμα		P (pla vs. εκχ)
	M.o. lag time (min)	St. Dev.	M.o. lag time (min)	St. Dev.	
Π	329,23	18,91	327,48	11,60	0,898
0	316,77	57,33	331,26	26,24	0,711
30	302,18	66,58	318,25	42,59	0,742
60	338,99	44,61	309,53	46,46	0,473
90	316,65	39,77	314,06	27,85	0,931
120	325,20	34,23	314,29	44,96	0,755
150	316,36	47,71	298,18	36,86	0,629
180	322,14	43,52	298,00	35,78	0,499
210	315,51	32,73	294,46	39,48	0,516
240	305,98	36,55	297,40	36,46	0,788
300	289,87	29,31	296,48	33,34	0,809
360	291,33	31,03	262,98	31,59	0,33

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο λεπτών οξείδωσης ορού $\pm$ τυπική απόκλιση. P pla vs εκχ: σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο παρεμβάσεων

Τέλος, υπολογίστηκε η μέση ποσοστιαία μεταβολή των lag time σε σχέση με τον αντίστοιχο χρόνο Π για το σύνολο των εθελοντών, καθώς και η % αύξηση ή μείωση του χρόνου οξείδωσης από τον αρχικό χρόνο Π (Πίνακας 12).

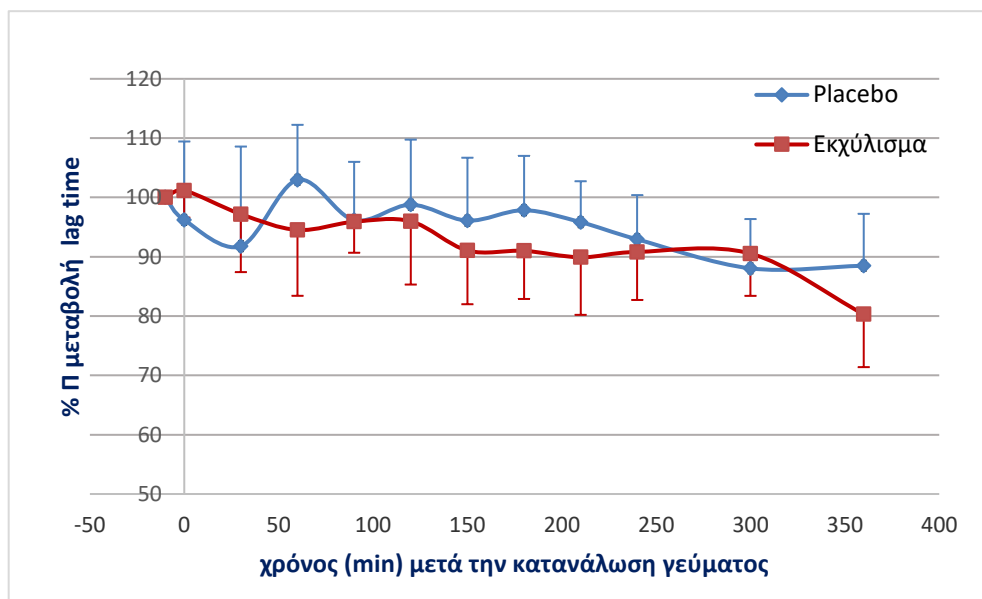
Πίνακας 12: Επί % Π μεταβολή των lag time (min) και για τους τρεις εθελοντές

Placebo					Εκχύλισμα				p (pla vs. εκχ)
	Μ.ο. % Π μεταβολή	St. Dev	% ↑ ή ↓	P vs χρόνο Π	Μ.ο. %Π μεταβολή	St. Dev	% ↑ ή ↓	p. vs χρόνο Π	
0	91,78	13,2	↓ 3,79	0,640	101,15	4,5	↑ 1,15	0,729	0,711
30	102,96	16,8	↓ 8,22	0,467	97,18	9,8	↓ 2,82	0,643	0,742
60	96,18	9,3	↑ 2,96	0,660	94,52	11,1	↓ 5,48	0,465	0,473
90	98,78	9,8	↓ 3,82	0,561	95,90	5,2	↓ 4,10	0,297	0,931
120	96,09	11,0	↓ 1,22	0,880	95,97	10,7	↓ 4,03	0,560	0,755
150	97,85	10,6	↓ 3,91	0,566	91,05	9,1	↓ 8,95	0,225	0,629
180	95,83	9,2	↓ 2,15	0,697	91,00	8,1	↓ 9,00	0,190	0,499
210	92,94	6,9	↓ 4,17	0,397	89,92	9,7	↓ 10,08	0,209	0,516
240	88,05	7,5	↓ 7,06	0,236	90,81	8,1	↓ 9,19	0,183	0,788
300	88,49	8,3	↓ 11,95	0,131	90,53	7,1	↓ 9,47	0,144	0,809
360	96,21	8,8	↓ 11,51	0,151	80,30	8,9	↓ 19,70	0,062	0,330

Οι τιμές αναφέρονται ως μέσο όρο της % μεταβολής των lag time σε σχέση με τον χρόνο οξείδωσης στο χρόνο Π ± τυπική απόκλιση. Επιπλέον, αναφέρεται η ποσοστιαία αύξηση ή μείωση των lag time. p.vs χρόνο Π: διαφορές στα lag time στην παρέμβαση σε σχέση με το χρόνο Π, p. pla vs. εκχ.: διαφορές στα lag time μεταξύ δύο παρεμβάσεων

Η ποσοστιαία μεταβολή των lag time του ορού από τον χρόνο Π απεικονίζεται στο Διάγραμμα 5. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, η ποσοστιαία μεταβολή του Π, επίσης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο παρεμβάσεων σε καμία χρονική στιγμή ($p_{\text{pla vs εκχ}} > 0,05$). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή στους χρόνους οξείδωσης του ορού σε σχέση με τον χρόνο Π, για καμία από τις δύο παρεμβάσεις ($p > 0,05$). Ωστόσο, στα 360' μετά την κατανάλωση του εκχυλίσματος υπήρχε μία τάση για σημαντική μείωση του lag time (19,7% p vs χρόνο Π= 0,062).

Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή των lag time σε σχέση με το χρόνο Π



Κεφάλαιο 7: Συζήτηση

Η παρούσα εργασία, αξιολόγησε την επίδραση ενός εκχυλίσματος από στέμφυλα στην ικανότητα του ορού να αναστέλλει την οξείδωση μεταγευματικά. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να αναστέλλει την οξειδωτική τροποποίηση, προκαλούμενη από ιόντα χαλκού, σε λιποπρωτεΐνες του ορού μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος. Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα της LDL αποτελεί στάδιο κλειδί για την έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (219,220). Επομένως, η ικανότητα αναστολής της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού, θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας δείκτης αντιαθηρογόνου δράσης. Οι λιποπρωτεΐνες περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών μορίων, τα οποία τις προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες. Η ικανότητα αναστολής της οξείδωσης του ορού αξιολογείται με την μεταβολή της λανθάνουσας φάσης (Lag time ή lag phase), η οποία εκφράζει τον χρόνο, κατά τον οποίο έχουν οξειδωθεί τα αντιοξειδωτικά αυτά μόρια και συνεπώς ξεκινάει η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών (221). Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης ενός οργανισμού, αλλά και για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συστατικών.

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία στατιστική σημαντική μεταβολή στο χρόνο οξείδωσης του ορού, μεταγευματικά, σε σχέση με την κατάσταση νηστείας, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο παρεμβάσεων.

Πρόσφατες μελέτες εξετάζουν την συμβολή του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιο σε λίπος ή και υδατάνθρακες, θεωρείται ότι μειώνει την αντίσταση του οργανισμού σε οξειδωτικές βλάβες (219) και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης (222). Το γεύμα που κατανάλωσαν οι εθελόντριες στην παρούσα μελέτη περιείχε 84 γρ. λίπους, που κάλυπταν το 66,7% της συνολικής ενέργειας (1131 θερμίδες) και αποτελούνταν ως επί το πλείστον από κορεσμένα λιπαρά οξέα (βούτυρο). Ωστόσο, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν έδειξε καμία σημαντική μεταβολή στο χρόνο οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού μεταγευματικά. Βέβαια, τα δεδομένα στην παρούσα εργασία είναι αρκετά πρώιμα, καθώς η κλινική δοκιμή δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα και συμπεριλαμβάνει μόνο 3

εθελόντριες, ενώ ταυτόχρονα δεν έχουν αξιολογηθεί και άλλοι δείκτες οξειδωτικού στρες εκτός του lag time. Παρ' όλ' αυτά, εγείρονται προβληματισμοί, ως προς το αν η σύσταση του γεύματος ήταν ικανή να προκαλέσει αύξηση του οξειδωτικού στρες σε νέους και υγιείς ενήλικες. Προηγούμενα δεδομένα της ερευνητικής μας ομάδας, υποδεικνύουν ότι ένα γεύμα 800 kcal περίπου, εκ των οποίων το 54% ήταν λίπος, αδυνατούσε να οδηγήσει σε αύξηση των δεικτών λιποειδικής υπεροξείδωσης σε νέους υγιείς εθελοντές 6 ώρες μετά. Στην παρούσα εργασία, παρότι το προσλαμβανόμενο λίπος ήταν ακόμη μεγαλύτερο, τα μέχρι τώρα ευρήματα δεν υποστηρίζουν κάποια αύξηση στο οξειδωτικό στρες μεταγευματικά.

Μέχρι σήμερα, τα δεδομένα στην βιβλιογραφία, ως προς την αξιολόγηση της μεταγευματικής επίδρασης ενός γεύματος πλούσιου σε λίπος σε σχέση με το lag time, είναι αρκετά περιορισμένα. Σε μία κλινική δοκιμή ο χρόνος οξείδωσης της LDL και της VLDL στη νηστεία δεν διέφερε σημαντικά με το lag time 5,5 ώρες μετά την κατανάλωση γεύματος με 41% λίπος, κυρίως κορεσμένου (223). Επιπλέον, άλλοι ερευνητές έχουν αξιολογήσει δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης μετά από ένα πλούσιο σε λίπος γεύμα και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Οι Bae et. al. (224), χορήγησαν σε 10 νέους υγιείς άνδρες τρία γεύματα 800 θερμίδων, από τα οποία το ένα ήταν πλούσιο σε λίπος (60%), το δεύτερο χαμηλό σε λίπος (3,4 % λίπος) και το τρίτο πλούσιο σε λίπος με ταυτόχρονη χορήγηση βιταμίνης E. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της MDA στη μεταγευματική κατάσταση, ανεξάρτητα από γεύμα που κατανάλωσαν.

Από την άλλη πλευρά, οι Tsai et. al. (222), παρατήρησαν μία σημαντική αύξηση στα επίπεδα της απεκκρινόμενης 8-iso-PGF2a, σε δείγμα ούρων σε νέους υγιείς άνδρες στις 4 ώρες μετά την κατανάλωση 50 γρ. λίπους, εκ των οποίων το 28% ήταν κορεσμένο. Αξίζει να σημειωθεί, βέβαια, ότι στην προκείμενη μελέτη δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου. Οι Anderson et. al. (225), εξέτασαν την επίδραση 80 γρ. κορεσμένου λίπους στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες σε διαβητικούς και υγιείς εθελοντές και έδειξαν μία αύξηση των TBARS και στις δύο ομάδες σε σχέση με την κατάσταση νηστείας. Ωστόσο, το δείγμα ελέγχου, αν και αποτελούνταν από υγιείς εθελοντές, ήταν μεγαλύτερης ηλικίας σε σχέση με τις εθελόντριες στην παρούσα μελέτη. Πιο πρόσφατα δεδομένα από τους di Renzo et. al. (226) και de Lorenzo et. al.

(227), φανερώνουν μία αύξηση στη συγκέντρωση της οξειδωμένης LDL, τρεις ώρες μετά την κατανάλωση ενός γεύματος 1144 kcal, 55% των οποίων ήταν λίπος (31% κορεσμένο) σε υγιείς, νέους σχετικά, εθελοντές.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, στην παρούσα φάση, κατά την οποία δεν έχει ολοκληρωθεί η μελέτη και δεν έχουν αξιολογηθεί περεταίρω δείκτες οξειδωτικού στρες, δεν μπορούμε με βεβαιότητα, να γνωρίζουμε αν το θερμιδικό και λιποειδικό περιεχόμενο του γεύματος, που χορηγήθηκε στις εθελόντριες, ήταν ικανό να μεταβάλλει την αντίσταση του ορού στην οξείδωση.

Όσον αφορά στην επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων, που κατανάλωσαν οι εθελόντριες, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, δεν έδειξαν κάποια σημαντική μεταβολή στον χρόνο οξείδωσης του ορού. Ωστόσο, το συγκεκριμένο εκχύλισμα στεμφύλων παρουσίαζε πολύ καλή αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro*, σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας. Πιο αναλυτικά, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών εκχυλίσεων από στέμφυλα και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα της υδατικής φάσης της Bligh-Dyer και της αιθανόλης παρουσίαζαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά, καθώς και την μέγιστη αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, το εκχύλισμα με αιθανόλη οδηγούσε σε μεγαλύτερη αύξηση του lag time/μg στεμφύλων κατά 365,7%, ενώ ακολουθούσε το εκχύλισμα υδατικής φάσης της Bligh-Dyer κατά 257% (209).

Η ικανότητα των παραπροϊόντων οινοποίησης να αναστέλλουν την οξείδωση λιποπρωτεϊνών *in vitro* υποστηρίζεται και από άλλους ερευνητές. Οι Murthy et. al. (228), έδειξαν ότι το εκχύλισμα στεμφύλων με μεθανόλη είχε την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και οδηγούσε σε αναστολή της οξείδωσης της LDL κατά 91,2 %. Σε μεταγενέστερη μελέτη, οι Anastasiadi et. al. (229), έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα με 90% οξινισμένη μεθανόλη, τόσο από φλούδες, όσο και από σπόρους ήταν ικανά να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL. Επιπρόσθετα, εκχύλισμα από φλούδες σταφυλιού τόσο με 50% αιθανόλη, όσο και συνδυασμού αιθανόλης – μεθανόλης, 1:1, οδηγούσε σε αύξηση του lag time κατά 410 και 407%, αντίστοιχα (230).

Παρόλο που τα *in vitro* δεδομένα είναι αρκετά ενθαρρυντικά, λίγες κλινικές δοκιμές έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα, που να αξιολογούν την ικανότητα παραπροϊόντων οиноποίησης να αναστέλλουν την οξείδωση του ορού. Η μελέτη των Vigna et. al. (231), εξέτασε την επίδραση που είχε η επί 4 εβδομάδες κατανάλωση τυποποιημένου εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού από 24 υγιείς, μεσήλικες καπνιστές στο οξειδωτικό στρες. Τα ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι το εκχύλισμα των σπόρων αύξησε το lag phase κατά 15, 4% σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης. Οι Kamiyama et. al. (232) εξέτασαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες μίας νέας ποικιλίας σταφυλιού χωρίς σπόρους και έδειξαν ότι τόσο η κατανάλωση 200 g από φλούδες, όσο και 50 γρ. του αποξηραμένου φρούτου οδηγούσαν σε αύξηση του lag time της LDL μία ώρα μετά την κατανάλωση.

Από την άλλη πλευρά, μόνο μία μεταγευματική μελέτη αξιολογεί την επίδραση παραπροϊόντων οиноποίησης στην αντίσταση του ορού στην οξείδωση. Οι Natella et. al. (233), μετά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από μία μεταγευματική παρέμβαση με κρασί, εξέτασε αν η χορήγηση εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού, σε 8 υγιείς εθελοντές θα είχε αντίστοιχη επίδραση σε δείκτες οξειδωτικού στρες και ειδικότερα στην αναστολή οξείδωσης της LDL. Οι εθελοντές κατανάλωσαν ένα γεύμα (18% πρωτεΐνη, 24% λίπος και 50% υδατάνθρακες) με ή χωρίς κάψουλες με εκχύλισμα σπόρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα σπόρων οδήγησε σε περιορισμό του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες, σε μεγαλύτερη αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, ενώ φάνηκε και μία τάση για μεγαλύτερη αναστολή της οξείδωσης της LDL σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 3 ώρες. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη δεν ήταν τυφλή, καθώς δε χρησιμοποιήθηκε placebo για την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, δεν αναφέρονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών, που πιθανόν να επηρέαζαν τα αποτελέσματα (π.χ. ο δείκτης μάζας σώματος).

Αν και τα μέχρι τώρα *in vivo* δεδομένα σε σχέση με τα παραπροϊόντα οиноποίησης είναι ακόμα ελλιπή, υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν την αναστολή της οξείδωσης λιποπρωτεϊνών μετά από κατανάλωση κρασιού. Οι Nigdikar et. al. (234), σε μία κλινική δοκιμή έδειξαν ότι η κατανάλωση κόκκινου και λευκού κρασιού για 2 εβδομάδες αύξησαν το lag time κατά 17,8 και 11,7 λεπτά, αντίστοιχα.

Σε μεταγενέστερη κλινική δοκιμή, βρέθηκε ότι μόνο το μίγμα πολυφαινολών ήταν ικανό να αναστείλει την οξείδωση της LDL (148). Οι Estruch et. al. (157) έδειξαν ότι η κατανάλωση κρασιού από υγιείς εθελοντές για 28 μέρες οδηγούσε σε αύξηση του χρόνου οξείδωσης της LDL ορού κατά 11 περίπου λεπτά, σε σχέση με την κατανάλωση τζιν. Τέλος, η ερευνητική ομάδα της Natella και των συνεργατών της, πραγματοποίησαν μία μεταγευματική κλινική δοκιμή, κατά την οποία αξιολογήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης κρασιού ή ενός διαλύματος 12% αιθανόλης μαζί με το γεύμα στην αντίσταση της LDL στο οξειδωτικό στρες. Η σύσταση του γεύματος σε πρωτεΐνη, λίπος, υδατάνθρακες και αλκοόλ, ήταν αντίστοιχα 14, 24, 32 και 24%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταγευματική LDL ήταν πιο ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες μετά το διάλυμα αιθανόλης σε σχέση με την κατάσταση νηστείας, ενώ παρατήρησαν ότι ο χρόνος οξείδωσης δε διέφερε σημαντικά μετά την κατανάλωση κρασιού, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το κρασί αντιστάθμιζε την επίδραση της αιθανόλης στο οξειδωτικό στρες (235).

Η παρούσα μελέτη, αποτελεί μία από τις λίγες κλινικές δοκιμές, που ελέγχουν την αντιοξειδωτική δράση παραπροϊόντων οινοποίησης μεταγευματικά. Είναι σαφές, ότι το δείγμα των εθελοντών που μελετήθηκε στη παρούσα φάση είναι πολύ μικρό για να προκύψει κάποιο συμπέρασμα. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν έδειξαν κάποια επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων στην αναστολή οξείδωσης του ορού σε σχέση με το placebo. Παρ' όλ' αυτά, δημιουργείται ένας προβληματισμός σχετικά με το κατά πόσο, το παραπάνω ήταν αποτέλεσμα της μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος *in vivo* ή του γεγονότος ότι η αύξηση του οξειδωτικού στρες δεν ήταν αρκετή ώστε να εκδηλωθεί η αντιοξειδωτική του δράση.

Εκτός, από τη σύσταση του γεύματος που συζητήθηκε παραπάνω, αξίζει να σημειωθεί ότι η περιορισμένη αύξηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να σχετίζεται και με τα επιμέρους χαρακτηριστικά του δείγματος, δηλαδή, νέες, υγιείς και φυσιολογικού ή μερικώς αυξημένου Δείκτη Μάζας Σώματος, γυναίκες. Σε προγενέστερες μελέτες έχει παρατηρηθεί σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση σε δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης και μείωση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταγευματικά, σε καταστάσεις που σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, οι Bloomer et. al. (236), έδειξαν σημαντικά υψηλότερη αύξηση σε

διάφορους δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως το MDA καθώς και σημαντικά μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα στους παχύσαρκους εθελοντές σε σχέση με τους μη παχύσαρκους. Αντίστοιχα αποτελέσματα έδειξε και μία προηγούμενη μελέτη, της ίδιας ερευνητικής ομάδας με νέους καπνιστές και μη-καπνιστές, με τους πρώτους να έχουν σημαντικά πιο υψηλό οξειδωτικό στρες και χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος (237). Είναι πιθανό, λοιπόν, η επίδραση του εκχυλίσματος, ακόμα και με το ίδιο γεύμα να ήταν διαφορετική σε καταστάσεις που σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες όπως η παχυσαρκία, το κάπνισμα ή χρόνια νοσήματα όπως τα καρδιαγγειακά και ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II.

7.1 Περιορισμοί

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία διπλά τυφλή, και ελεγχόμενη με placebo διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, η οποία όμως δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα μέχρι τώρα δεδομένα, που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, είναι σε αρκετά πρώιμο στάδιο, καθώς μόνο 3 εθελόντριες έχουν ολοκληρώσει και τις δύο παρεμβάσεις. Συνεπώς, δεν μπορούν να οδηγήσουν στην παρούσα φάση σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.

Ένας περιορισμός της παρούσας κλινικής δοκιμής είναι το δείγμα, το οποίο αποτελείται από νέες υγιείς γυναίκες. Συνεπώς, τα συμπεράσματα που μπορεί να προκύψουν και μετά την ολοκλήρωση της μελέτης αφορούν μόνο τον γυναικείο πληθυσμό και όχι και τα δύο φύλα. Επιπλέον, η μεταγευματική επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων στο οξειδωτικό στρες, πιθανόν να ήταν διαφορετική και ίσως πιο έντονη σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, με χρόνια νοσήματα ή παχύσαρκους εθελοντές, γενικότερα σε καταστάσεις που συνοδεύονται από υψηλότερο οξειδωτικό στρες.

Τέλος, στην μεταγευματική αυτή μελέτη αξιολογήθηκε μόνο μία δόση από το εκχύλισμα στεμφύλων και δεν εξετάστηκε αν διαφορετική δοσολογία θα οδηγούσε σε διαφορετικά αποτελέσματα. Ωστόσο, κάτι τέτοιο θα ήταν αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθεί, καθώς ο ίδιος εθελοντής θα έπρεπε να επαναλάβει πολλές φορές

το ίδιο πρωτόκολλο, που ήταν σίγουρα αρκετά απαιτητικό (αιμοληψίες ανά 30', για 6 ώρες, περιορισμός στην διατροφική πρόσληψη κ.α.).

7.2 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν υποστηρίζουν κάποια επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων στην αντίσταση του ορού σε οξειδωτικές τροποποιήσεις, έως και 6 ώρες μετά την κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιου σε λίπος. Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν σημαντικές μεταβολές στα lag time μεταγευματικά σε σχέση με την κατάσταση νηστείας σε καμία από τις δύο παρεμβάσεις, ίσως υποδεικνύει ότι το οξειδωτικού στρες δεν αυξήθηκε ποτέ αρκετά ώστε να εκδηλωθεί η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Σίγουρα, αναμένεται και η ολοκλήρωση της κλινικής δοκιμής με μεγαλύτερο δείγμα, ώστε να μπορέσουν να προκύψουν ασφαλέστερα συμπεράσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18:872–9.
2. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:368–370.
3. Κ. Δημόπουλος, Αντωνοπούλου Σ. Βασική Βιοχημεία. 2nd ed. Αθήνα; 2009. Παράρτημα 63-69 p.
4. Yannakopoulou E. Oxidative Stress – Antioxidant Mechanisms: Clinical implications. 2009;26:23–35.
5. Γαλάρης Δ. Ελεύθερες ίζες και οξειδωτικό στρες (Free Radicals And Oxidative Stress). Αθήνα: Αποθετήριο Κάλλιπος; 2015.
6. Mach WJ, Thimmesch AR, Pierce JT, Pierce JD. Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung. *Nurs Res Pract*. 2011;2011:1–7.
7. Taverne YJHJ, Bogers AJJC, Duncker DJ, Merkus D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013 [cited 2020 May 3];2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655680/>
8. dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol*. 2011;7:504–11.
9. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120:713–35.
10. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. *Sports Med*. 2006;36:327–58.
11. Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Front Physiol* [Internet]. Frontiers; 2017 [cited 2020 May 2];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00428/full>
12. Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2019 [cited 2020 May 3]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2019.4188>
13. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: CENTRAL ROLE OF COMPLEX III. *J Biol Chem*. 2003;278:36027–31.
14. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48:158–67.
15. Nauseef WM. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J Biol Chem*. 2008;283:16961–5.

16. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. *Mol Cells*. 2011;32:491–509.
17. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 2];2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960346/>
18. Stavropoulou E, Pircalabioru GG, Bezirtzoglou E. The Role of Cytochromes P450 in Infection. *Front Immunol*. 2018;9:89.
19. Lister Hill National Center for Biomedical Communications, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, Department of Health & Human Services. Cytochrome p450 [Internet]. Genetics Home Reference. 2020. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genefamily/cytochromep450>
20. Hryciay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Advances in Pharmacology* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2020 May 3]. p. 35–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054358915000290>
21. Huang Y-H, Sharifpanah F, Becker S, Wartenberg M, Sauer H. Impact of Arachidonic Acid and the Leukotriene Signaling Pathway on Vasculogenesis of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2016;201:319–32.
22. Liu X, Davis CM, Alkayed NJ. P450 Eicosanoids and Reactive Oxygen Species Interplay in Brain Injury and Neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28:987–1007.
23. Cho K-J, Seo J-M, Kim J-H. Bioactive Lipoxygenase Metabolites Stimulation of NADPH Oxidases and Reactive Oxygen Species. *Mol Cells*. 2011;32:1–5.
24. Görlach A, Dimova EY, Petry A, Martínez-Ruiz A, Hernansanz-Agustín P, Rolo AP, Palmeira CM, Kietzmann T. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol*. 2015;6:372–85.
25. Biobaku F, Ghanim H, Batra M, Dandona P. Macronutrient-Mediated Inflammation and Oxidative Stress: Relevance to Insulin Resistance, Obesity, and Atherogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104:6118–28.
26. Tan BL, Norhaizan ME, Liew W-P-P. Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1–24.
27. Hernández JA, López-Sánchez RC, Rendón-Ramírez A. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–15.
28. Wei J, Wang B, Wang H, Meng L, Zhao Q, Li X, Xin Y, Jiang X. Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1–11.
29. 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;6:445–62.

30. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30:11–26.
31. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis CD, Marinari UM, Pronzato MA, Traverso N, Domenicotti C. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–16.
32. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J [Internet].* 2016 [cited 2020 May 2];15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960740/>
33. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1583–606.
34. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5:9–19.
35. Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Liu Y, Lei L, Ma KY, et al. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1–13.
36. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview: Evolutionary overview of glutathione peroxidases. *FEBS J.* 2008;275:3959–70.
37. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44:532–53.
38. Rhee SG. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016;39:1–5.
39. Hanschmann E-M, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:1539–605.
40. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55–74.
41. Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR, Lee YJ. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. *J Biol Chem.* 2002;277:46566–75.
42. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 2018;63:68–78.
43. Aoyama K, Nakaki T. Inhibition of GTRAP3-18 May Increase Neuroprotective Glutathione (GSH) Synthesis. *Int J Mol Sci.* 2012;13:12017–35.
44. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003;22:18–35.
45. Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *Br J Nutr.* 2015;114:1113–22.

46. Zingg J-M. Vitamin E: A Role in Signal Transduction. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:135–73.
47. Sailaja Rao P, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radic Antioxid.* 2011;1:2–7.
48. Trono D. Carotenoids in Cereal Food Crops: Composition and Retention throughout Grain Storage and Food Processing. *Plants.* 2019;8:551.
49. Hernández-Camacho JD, Bernier M, López-Lluch G, Navas P. Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease. *Front Physiol.* 2018;9:44.
50. James AM, Smith RAJ, Murphy MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:47–56.
51. Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57:114–25.
52. Bowman GL, Shannon J, Frei B, Kaye JA, Quinn JF. Uric Acid as a CNS Antioxidant. *J Alzheimers Dis.* 2010;19:1331–6.
53. Roumeliotis S, Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A Review. *Nutrients.* 2019;11:1911.
54. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J.* 2013;2013:1–16.
55. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47.
56. de Oliveira NKS, Almeida MRS, Pontes FMM, Barcelos MP, de Paula da Silva CHT, Rosa JMC, Cruz RAS, da Silva Hage-Melim LI. Antioxidant Effect of Flavonoids Present in *Euterpe oleracea* Martius and Neurodegenerative Diseases: A Literature Review. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2019;19:75–99.
57. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* 2019;299:125124.
58. Ruttkay-Nedecký B, Nejdí L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2013;14:6044–66.
59. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J.* 2001;357:241.
60. Bresgen N, Eckl P. Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomolecules.* 2015;5:808–47.
61. Taverna M, Marie A-L, Mira J-P, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care.* 2013;3:4.

62. Sies H, Jones D. Oxidative Stress. Encyclopedia of Stress [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2020 May 3]. p. 45–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739476002853>
63. Sies H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. Oxidative Stress [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2020 May 4]. p. 3–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128186060000018>
64. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. Antioxid Redox Signal. 2018;29:1727–45.
65. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. Annu Rev Biochem. 2017;86:715–48.
66. Christian F, Smith E, Carmody R. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. Cells. 2016;5:12.
67. Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. Curr Opin Toxicol. 2018;7:122–6.
68. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:1–13.
69. Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:1–29.
70. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:1–32.
71. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. Antioxid Redox Signal. 2015;23:1144–70.
72. Lee SF, Pervaiz S. Assessment of Oxidative Stress-Induced DNA Damage by Immunofluorescent Analysis of 8-OxodG. Methods in Cell Biology [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2020 May 4]. p. 99–113. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012385493300005X>
73. Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat J-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. Front Chem [Internet]. 2015 [cited 2020 May 4];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fchem.2015.00035/abstract>
74. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. Anal Biochem. 2017;524:13–30.
75. Hadwan MH. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. BMC Biochem. 2018;19:7.
76. Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. Methods in Cell

- Biology [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2020 May 4]. p. 379–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X06800191>
77. Kruk J, Aboul-Enein HY, Kładna A, Bowser JE. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radic Res.* 2019;53:497–521.
 78. Guo C, Ding P, Xie C, Ye C, Ye M, Pan C, Cao X, Zhang S, Zheng S. Potential application of the oxidative nucleic acid damage biomarkers in detection of diseases. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2020 May 4];8. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/20801>
 79. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:1–31.
 80. Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2019. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1–2.
 81. Sonowal H, Ramana KV. 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal in the Regulation of Anti-Oxidative and Pro-Inflammatory Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1–17.
 82. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* 2016;473:805–25.
 83. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem.* 2019;294:19683–708.
 84. Samardzic K, Rodgers KJ. Oxidised protein metabolism: recent insights. *Biol Chem.* 2017;398:1165–75.
 85. Cai Z, Yan L-J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res.* 2013;1:15–26.
 86. Baraibar MA, Liu L, Ahmed EK, Friguet B. Protein Oxidative Damage at the Crossroads of Cellular Senescence, Aging, and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:1–8.
 87. Guyton CA. Φυσιολογία του Ανθρώπου. ΛΙΤΣΑΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ; 2009.
 88. Λεμπιδάκης Δ, Λουλακάκης Μ, Χαμηλός Μ. Στεφανιαία νόσος [Internet]. Ελληνική Καρδιολογική Εταιρεία. Available from: <https://www.hcs.gr/stefaniaia-nosos.aspx>
 89. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. World Health Organization. 2017. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
 90. CDC. Heart Disease [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/heartdisease/index.htm>
 91. Wilkins E, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics, 2017 Edition [Internet]. Brussels, Belgium: European Heart Network; 2017 Feb. Available from: www.ehnheart.org

92. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E, Wright L, Vos R, Bax J, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J*. 2018;39:508–79.
93. ADA. Cardiovascular Disease Risk Factors [Internet]. American Diabetes Association. 2018. Available from: <https://ada.com/cardiovascular-disease-risk-factors/>
94. The EUGenMed, Cardiovascular Clinical Study Group, Regitz-Zagrosek V. Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *Eur Heart J*. 2016;37:24–34.
95. AHA. Understand Your Risks to Prevent a Heart Attack [Internet]. American Heart Association. [cited 2020 Jul 30]. Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-attack/understand-your-risks-to-prevent-a-heart-attack>
96. Wadhera RK, Steen DL, Khan I, Giugliano RP, Foody JM. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *J Clin Lipidol*. 2016;10:472–89.
97. WHO. Global Health Observatory data (GHO) [Internet]. World Health Organization. 2017. Available from: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_prevalence/en/
98. Wengrofsky P, Lee J, N. Makaryus A. Dyslipidemia and Its Role in the Pathogenesis of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Implications for Evaluation and Targets for Treatment of Dyslipidemia Based on Recent Guidelines. In: I. McFarlane S, editor. *Dyslipidemia* [Internet]. IntechOpen; 2019 [cited 2020 Jul 30]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/dyslipidemia/dyslipidemia-and-its-role-in-the-pathogenesis-of-atherosclerotic-cardiovascular-disease-implications>
99. WHF. Risk factors, Fact Sheets [Internet]. World Heart Federation. 2017. Available from: <https://www.world-heart-federation.org/resources/risk-factors/>
100. WHO. Hypertension [Internet]. World Health Organization. 2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
101. IDF. Diabetes and cardiovascular disease [Internet]. International Diabetes Association. 2020. Available from: <https://idf.org/our-activities/care-prevention/cardiovascular-disease.html>
102. Wagner AM, Martínez-Rubio A, Ordonez-Llanos J, Pérez-Pérez A. Diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Eur J Intern Med*. 2002;13:15–30.
103. Umer A, Kelley GA, Cottrell LE, Giacobbi P, Innes KE, Lilly CL. Childhood obesity and adult cardiovascular disease risk factors: a systematic review with meta-analysis. *BMC Public Health*. 2017;17:683.
104. WHO. Obesity and overweight [Internet]. World Health Organization. 2020. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
105. Ayer J, Charakida M, Deanfield JE, Celermajer DS. Lifetime risk: childhood obesity and cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2015;36:1371–6.

106. AHA. What Are You Smoking? Smoking and Cardiovascular Disease (CVD). American Heart Association.
107. Hackshaw A, Morris JK, Boniface S, Tang J-L, Milenković D. Low cigarette consumption and risk of coronary heart disease and stroke: meta-analysis of 141 cohort studies in 55 study reports. *BMJ*. 2018;j5855.
108. Keto J, Ventola H, Jokelainen J, Linden K, Keinänen-Kiukaanniemi S, Timonen M, Ylisaukko-oja T, Auvinen J. Cardiovascular disease risk factors in relation to smoking behaviour and history: a population-based cohort study. *Open Heart*. 2016;3:e000358.
109. Panagiotakos DB, Kouli G-M, Magriplis E, Kyrou I, Georgousopoulou EN, Chrysoshoou C, Tsigos C, Tousoulis D, Pitsavos C. Beer, wine consumption, and 10-year CVD incidence: the ATTICA study. *Eur J Clin Nutr*. 2019;73:1015–23.
110. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primer*. 2019;5:56.
111. McPhee S, Μουτσόπουλος Χ, Δουράτσος Δ, Λιναρδάκη Γ. Παθολογική Φυσιολογία. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας; 2000. 848 p.
112. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, Geladas N, Tsakopoulos M. Φυσιολογία του Ανθρώπου- Μηχανισμοί Λειτουργίας του οργανισμού. 8η. Αθήνα: Πασχαλίδης; 2001.
113. Fragopoulou E, Demopoulos C, Antonopoulou S. Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox. *Int J Wine Res*. 2009;1:131–43.
114. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93:105–13.
115. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2013;1832:2216–31.
116. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation*. 2007;115:1285–95.
117. Demopoulos CA, Karantonis HC, Antonopoulou S. Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2003;105:705–716.
118. Galkina E, Ley K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2292–301.
119. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5:927–46.
120. Kojima Y, Weissman IL, Leeper NJ. The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. *Circulation*. 2017;135:476–89.
121. Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol*. 2015;27:184–93.
122. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29–38.

123. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hell J Cardiol HJC Hell Kardiologike Epitheorese*. 2009;50:402–9.
124. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19:42.
125. Markoski MM, Garavaglia J, Oliveira A, Olivaes J, Marcadenti A. Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. *Nutr Metab Insights*. 2016;9:NMI.S32909.
126. Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem*. 2010;121:1–16.
127. Moreno-Arribas MV, Polo MC. Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45:265–86.
128. Norrie P. The history of wine as a medicine: from its beginnings in China to the present day. 2019.
129. Ματάλα Α, Grivetti L. Διατροφή στην Ελλάδα. Διατροφή και Πολιτισμός [Internet]. Athens: Kallipos Publications; 2015. p. 108–35. Available from: <http://hdl.handle.net/11419/3806>
130. Leger ASS, Cochrane AL, Moore F. FACTORS ASSOCIATED WITH CARDIAC MORTALITY IN DEVELOPED COUNTRIES WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE CONSUMPTION OF WINE. *The Lancet*. 1979;313:1017–20.
131. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339:1523–6.
132. WHO MONICA Project Principal Invest. The world health organization monica project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): A major international collaboration. *J Clin Epidemiol*. 1988;41:105–14.
133. Costanzo S, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2011;26:833–50.
134. de Gaetano G, Costanzo S, Di Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi A, Chiva-Blanch G, Estruch R, La Vecchia C, Panico S, et al. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26:443–67.
135. Tarapatskyy M, Kapusta I, Gumienna A, Puchalski C. Assessment of the Bioactive Compounds in White and Red Wines Enriched with a *Primula veris* L. *Molecules*. 2019;24:4074.
136. Claus H, Mojsov K. Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications. *Fermentation*. 2018;4:52.
137. Castaldo, Narváez, Izzo, Graziani, Gaspari, Minno, Ritieni. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*. 2019;24:3626.

138. Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno D, Garcia-Viguera C. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int J Mol Sci.* 2014;15:15638–78.
139. Flavonols. *Understanding Wine Chemistry* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cited 2020 May 8]. p. 127–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118730720.ch15>
140. Non-flavonoid Phenolics. *Understanding Wine Chemistry* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cited 2020 May 11]. p. 112–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118730720.ch13>
141. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* 2012;130:797–813.
142. Rentzsch M, Wilkens A, Winterhalter P. Non-flavonoid Phenolic Compounds. In: Moreno-Arribas MV, Polo MC, editors. *Wine Chemistry and Biochemistry* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [cited 2020 May 12]. p. 509–27. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-74118-5_23
143. Flavan-3-ols and Condensed Tannin. *Understanding Wine Chemistry* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cited 2020 May 12]. p. 117–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118730720.ch14>
144. Snopek L, Mlcek J, Sochorova L, Baron M, Hlavacova I, Jurikova T, Kizek R, Sedlackova E, Sochor J. Contribution of Red Wine Consumption to Human Health Protection. *Molecules.* 2018;23:1684.
145. Bertelli AAE. Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use. *Atherosclerosis.* 2007;195:242–7.
146. Fragopoulou E, Choleva M, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. *Metabolism.* 2018;83:102–19.
147. Stockley C, Teissedre P-L, Boban M, Di Lorenzo C, Restani P. Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review. *Food Funct.* 2012;3:995.
148. Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germanò G, Fimognari F, Di Santo S, Lenti L, Violi F. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis.* 2006;188:77–83.
149. Levantesi G, Marfisi R, Mozaffarian D, Franzosi MG, Maggioni A, Nicolosi GL, Schweiger C, Silletta M, Tavazzi L, Tognoni G, et al. Wine consumption and risk of cardiovascular events after myocardial infarction: Results from the GISSI-Prevenzione trial. *Int J Cardiol.* 2013;163:282–7.
150. Klatsky AL. Wine, Liquor, Beer, and Mortality. *Am J Epidemiol.* 2003;158:585–95.
151. Roth I, Casas R, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Consumption of aged white wine modulates cardiovascular risk factors via circulating endothelial progenitor cells and inflammatory biomarkers. *Clin Nutr.* 2019;38:1036–44.

152. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Márquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. *Atherosclerosis*. 2004;175:117–23.
153. Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, De Simone R, Raneli G, Scaglione R, Licata G. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60:41–7.
154. Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ*. 2011;342:d636–d636.
155. Mukamal KJ, Jensen MK, Grønbaek M, Stampfer MJ, Manson JE, Pischon T, Rimm EB. Drinking Frequency, Mediating Biomarkers, and Risk of Myocardial Infarction in Women and Men. *Circulation*. 2005;112:1406–13.
156. Sacanella E, Vázquez-Agell M, Mena MP, Antúnez E, Fernández-Solá J, Nicolás JM, Lamuela-Raventós RM, Ros E, Estruch R. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:1463–9.
157. Estruch R, Sacanella E, Mota F, Chiva-Blanch G, Antúnez E, Casals E, Deulofeu R, Rotilio D, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: A randomised cross-over trial☆. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21:46–53.
158. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J*. 2007;6:27.
159. Guarda E, Godoy I, Foncea R, Pérez DD, Romero C, Venegas R, Leighton F. Red wine reduces oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol*. 2005;104:35–8.
160. Schrieks IC, van den Berg R, Sierksma A, Beulens JWJ, Vaes WHJ, Hendriks HFJ. Effect of Red Wine Consumption on Biomarkers of Oxidative Stress. *Alcohol Alcohol*. 2013;48:153–9.
161. Covas MI, Gambert P, Fitó M, de la Torre R. Wine and oxidative stress: Up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis*. 2010;208:297–304.
162. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*. 1999;319:1523–8.
163. Yang Y, Liu D-C, Wang Q-M, Long Q-Q, Zhao S, Zhang Z, Ma Y, Wang Z-M, Chen L-L, Wang L-S. Alcohol consumption and risk of coronary artery disease: A dose-response meta-analysis of prospective studies. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2016;32:637–44.
164. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Valderas-Martinez P, Casas R, Arranz S, Guillén M, Lamuela-Raventós RM, Llorach R, Andres-Lacueva C, et al. Effects of red wine

polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2013;32:200–6.

165. Xanthopoulou MN, Kalathara K, Melachroinou S, Arampatzi-Menenakou K, Antonopoulou S, Yannakoulia M, Fragopoulou E. Wine consumption reduced postprandial platelet sensitivity against platelet activating factor in healthy men. *Eur J Nutr.* 2017;56:1485–92.
166. Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, Skaltsounis A-L, Kremastinos DT. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease: *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12:596–600.
167. Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. *Circulation.* 2002;106:1614–7.
168. Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Npj Precis Oncol.* 2017;1:35.
169. Li, Xia, Hasselwander, Daiber. Resveratrol and Vascular Function. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2155.
170. Agarwal B, Campen MJ, Channell MM, Wherry SJ, Varamini B, Davis JG, Baur JA, Smoliga JM. Resveratrol for primary prevention of atherosclerosis: Clinical trial evidence for improved gene expression in vascular endothelium. *Int J Cardiol.* 2013;166:246–8.
171. Bo S, Ciccone G, Castiglione A, Gambino R, De Michieli F, Villosi P, Durazzo M, Cavallo-Perin P, Cassader M. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Resveratrol in Healthy Smokers A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial. *Curr Med Chem.* 2013;20:1323–31.
172. Tabrizi R, Tamtaji OR, Lankarani KB, Mirhosseini N, Akbari M, Dadgostar E, Peymani P, Asemi Z. The effects of resveratrol supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress among patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Funct.* 2018;9:6116–28.
173. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei Á, Halmai R, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr.* 2011;106:383–9.
174. Liu Y, Ma W, Zhang P, He S, Huang D. Effect of resveratrol on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2015;34:27–34.
175. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, Battyany I, Sumegi B, Toth K, Szabados E. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;50:179–87.
176. Anand David A, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev.* 2016;10:84.

177. Ou Q, Zheng Z, Zhao Y, Lin W. Impact of quercetin on systemic levels of inflammation: a meta-analysis of randomised controlled human trials. *Int J Food Sci Nutr*. 2020;71:152–63.
178. Magrone T, Magrone M, Russo MA, Jirillo E. Recent Advances on the Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Red Grape Polyphenols: In Vitro and In Vivo Studies. *Antioxidants*. 2019;9:35.
179. Kobori M, Takahashi Y, Akimoto Y, Sakurai M, Matsunaga I, Nishimuro H, Ippoushi K, Oike H, Ohnishi-Kameyama M. Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. *J Funct Foods*. 2015;15:551–60.
180. Begum AN, Terao J. Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability. *J Nutr Biochem*. 2002;13:265–72.
181. Rivero-Pérez MD, Muñiz P, González-Sanjosé ML. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:2815–22.
182. Bogнар E, Sarszegi Z, Szabo A, Debreceni B, Kalman N, Tucsek Z, Sumegi B, Gallyas F. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in RAW264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol. Das A, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e65355.
183. Quintieri AM, Baldino N, Filice E, Seta L, Vitetti A, Tota B, De Cindio B, Cerra MC, Angelone T. Malvidin, a red wine polyphenol, modulates mammalian myocardial and coronary performance and protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *J Nutr Biochem*. 2013;24:1221–31.
184. Fontana AR, Antonioli A, Bottini R. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J Agric Food Chem*. 2013;61:8987–9003.
185. Machado N, Domínguez-Perles R. Addressing Facts and Gaps in the Phenolics Chemistry of Winery By-Products. *Molecules*. 2017;22:286.
186. Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA, Skotti E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresour Bioprocess*. 2018;5:46.
187. Nerantzis ET, Tataridis P. Integrated Enology Utilization of Winery By-Products Into high Added Value Products. *E-J Sci Technol*. 2006;1–12.
188. Jara-Palacios M, Hernanz D, Escudero-Gilete M, Heredia F. The Use of Grape Seed Byproducts Rich in Flavonoids to Improve the Antioxidant Potential of Red Wines. *Molecules*. 2016;21:1526.
189. Ribeiro LF, Ribani RH, Francisco TMG, Soares AA, Pontarolo R, Haminiuk CWI. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *J Chromatogr B*. 2015;1007:72–80.
190. Bordiga M, editor. Valorization of wine making by-products. Boca Raton, FL: CRC Press; 2016. 365 p.

191. Fernandes F, Ramalhosa E, Pires P, Verdial J, Valentão P, Andrade P, Bento A, Pereira JA. *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Ind Crops Prod.* 2013;43:434–40.
192. Jara-Palacios MJ. Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants.* 2019;8:45.
193. Pintać D, Majkić T, Torović L, Orčić D, Beara I, Simin N, Mimica–Dukić N, Lesjak M. Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. *Ind Crops Prod.* 2018;111:379–90.
194. José Jara-Palacios M, Gonçalves S, Hernanz D, Heredia FJ, Romano A. Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. *Food Res Int.* 2018;109:433–9.
195. Melo PS, Massarioli AP, Denny C, dos Santos LF, Franchin M, Pereira GE, Vieira TMF de S, Rosalen PL, Alencar SM de. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chem.* 2015;181:160–9.
196. Aybastier Ö, Dawbaa S, Demir C. Investigation of antioxidant ability of grape seeds extract to prevent oxidatively induced DNA damage by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2018;1072:328–35.
197. Costa GN, Tonon RV, Mellinger-Silva C, Galdeano MC, Iacomini M, Santiago MC, Almeida EL, Freitas SP. Grape seed pomace as a valuable source of antioxidant fibers. *J Sci Food Agric.* 2019;99:4593–601.
198. Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre P-L. Wine by-Products: Phenolic Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Grapes and Grape Pomaces from Six Different French Grape Varieties. *Molecules.* 2014;19:482–506.
199. González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rosselló C, Teissedre P-L. Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem.* 2012;60:11850–8.
200. González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rosselló C, Teissedre P-L. Characterization of Polyphenols and Antioxidant Potential of White Grape Pomace Byproducts (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem.* 2013;61:11579–87.
201. Reis GM, Faccin H, Viana C, Rosa MB da, de Carvalho LM. *Vitis vinifera* L. cv Pinot noir pomace and lees as potential sources of bioactive compounds. *Int J Food Sci Nutr.* 2016;67:789–96.
202. Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Compos Anal.* 2007;20:125–32.
203. Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresour Technol.* 2007;98:2963–7.

204. Romero-Díez R, Rodríguez-Rojó S, Cocero MJ, Duarte CMM, Matias AA, Bronze MR. Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food Chem.* 2018;259:188–95.
205. Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhelha RC, Barros L, Pinho SP, Ferreira ICFR. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chem.* 2018;253:132–8.
206. Antonioli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem.* 2015;178:172–8.
207. Pérez C, Ruiz del Castillo ML, Gil C, Blanch GP, Flores G. Supercritical fluid extraction of grape seeds: extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Food Funct.* 2015;6:2607–13.
208. de Sales N, Silva da Costa L, Carneiro T, Minuzzo D, Oliveira F, Cabral L, Torres A, El-Bacha T. Anthocyanin-Rich Grape Pomace Extract (*Vitis vinifera* L.) from Wine Industry Affects Mitochondrial Bioenergetics and Glucose Metabolism in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Molecules.* 2018;23:611.
209. Choleva M, Boulougouri V, Panara A, Panagopoulou E, Chiou A, Thomaidis NS, Antonopoulou S, Fragopoulou E. Evaluation of anti-platelet activity of grape pomace extracts. *Food Funct.* 2019;10:8069–80.
210. Perez C, Ruiz del Castillo ML, Gil C, Blanch GP, Flores G. Supercritical fluid extraction of grape seeds: extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Food Funct.* 2015;6:2607–13.
211. Urquiaga I, D'Acuña S, Pérez D, Dicenta S, Echeverría G, Rigotti A, Leighton F. Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. *Biol Res.* 2015;48:49.
212. Urquiaga I, Troncoso D, Mackenna M, Urzúa C, Pérez D, Dicenta S, de la Cerda P, Amigo L, Carreño J, Echeverría G, et al. The Consumption of Beef Burgers Prepared with Wine Grape Pomace Flour Improves Fasting Glucose, Plasma Antioxidant Levels, and Oxidative Damage Markers in Humans: A Controlled Trial. *Nutrients.* 2018;10:1388.
213. Pérez-Ramírez IF, de Diego EH, Riomoros-Arranz M, Reynoso-Camacho R, Saura-Calixto F, Pérez-Jiménez J. Effects of acute intake of grape/pomegranate pomace dietary supplement on glucose metabolism and oxidative stress in adults with abdominal obesity. *Int J Food Sci Nutr.* 2020;71:94–105.
214. Kar P, Laight D, Rooprai HK, Shaw KM, Cummings M. Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet Med.* 2009;26:526–31.
215. Weseler AR, Ruijters EJB, Driessens-Reijnders M-J, Reesink KD, Haenen GRMM, Bast A. Pleiotropic benefit of monomeric and oligomeric flavanols on vascular health--a randomized controlled clinical pilot study. *PloS One.* 2011;6:e28460.

216. Mellen PB, Daniel KR, Brosnihan KB, Hansen KJ, Herrington DM. Effect of muscadine grape seed supplementation on vascular function in subjects with or at risk for cardiovascular disease: a randomized crossover trial. *J Am Coll Nutr.* 2010;29:469–75.
217. Safaei N, Babaei H, Azarfarin R, Jodati A-R, Yaghoubi A, Sheikhalizadeh M-A. Comparative effect of grape seed extract (*Vitis vinifera*) and ascorbic acid in oxidative stress induced by on-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Card Anaesth.* 2017;20:45.
218. Han HJ, Jung UJ, Kim H-J, Cho S-J, Kim AH, Han Y, Choi M-S. Combined Supplementation with Grape Pomace and Omija Fruit Ethanol Extracts Dose-Dependently Improves Body Composition, Plasma Lipid Profiles, Inflammatory Status, and Antioxidant Capacity in Overweight and Obese Subjects. *J Med Food.* 2016;19:170–80.
219. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. *J Nutr.* 2005;135:969–72.
220. Bowen PE, Borthakur G. Postprandial lipid oxidation and cardiovascular disease risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6:477–84.
221. Le N-A. Lipoprotein-Associated Oxidative Stress: A New Twist to the Postprandial Hypothesis. *Int J Mol Sci.* 2014;16:401–19.
222. Tsai W-C, Li Y-H, Lin C-C, Chao T-H, Chen J-H. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clin Sci.* 2004;106:315–9.
223. Nielsen NS, Marckmann P, Høy C-E. Effect of meal fat quality on oxidation resistance of postprandial VLDL and LDL particles and plasma triacylglycerol level. *Br J Nutr.* 2000;84:855–63.
224. Bae J-H, Schwemmer M, Lee I-K, Lee H-J, Park K-R, Kim K-Y, Bassenge E. Postprandial hypertriglyceridemia-induced endothelial dysfunction in healthy subjects is independent of lipid oxidation. *Int J Cardiol.* 2003;87:259–67.
225. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A, Frenneaux MP. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2001;154:475–83.
226. Di Renzo L, Marsella LT, Carraro A, Valente R, Gualtieri P, Gratteri S, Tomasi D, Gaiotti F, De Lorenzo A. Changes in LDL Oxidative Status and Oxidative and Inflammatory Gene Expression after Red Wine Intake in Healthy People: A Randomized Trial. *Mediat Inflamm.* 2015;2015:317348.
227. De Lorenzo A, Bernardini S, Gualtieri P, Cabibbo A, Perrone MA, Giambini I, Di Renzo L. Mediterranean meal versus Western meal effects on postprandial ox-LDL, oxidative and inflammatory gene expression in healthy subjects: a randomized controlled trial for nutrigenomic approach in cardiometabolic risk. *Acta Diabetol.* 2017;54:141–9.
228. Chidambara Murthy KN, Singh RP, Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem.* 2002;50:5909–14.

229. Anastasiadi M, Pratsinis H, Kletsas D, Skaltsounis A-L, Haroutounian SA. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Res Int.* 2010;43:805–13.
230. Shanmuganayagam D, Beahm MR, Kuhns MA, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. Differential Effects of Grape (*Vitis vinifera*) Skin Polyphenolics on Human Platelet Aggregation and Low-Density Lipoprotein Oxidation. *J Agric Food Chem.* 2012;60:5787–94.
231. Vigna GB, Costantini F, Aldini G, Carini M, Catapano A, Schena F, Tangerini A, Zanca R, Bombardelli E, Morazzoni P, et al. Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. *Metabolism.* 2003;52:1250–7.
232. Kamiyama M, Kishimoto Y, Tani M, Andoh K, Utsunomiya K, Kondo K. Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation by Nagano Purple Grape (*Vitis vinifera*×*Vitis labrusca*). *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2009;55:471–8.
233. Natella F, Belelli F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C. Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J Agric Food Chem.* 2002;50:7720–5.
234. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:258–65.
235. Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1036–44.
236. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Systemic Oxidative Stress Is Increased to a Greater Degree in Young, Obese Women Following Consumption of a High Fat Meal. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2:19–25.
237. Bloomer RJ, Solis AD, Fisher-Wellman KH, Smith WA. Postprandial oxidative stress is exacerbated in cigarette smokers. *Br J Nutr.* 2008;99:1055–60.