



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D₂ (ΕΡΓΟΚΑΛΣΙΦΕΡΟΛΗ) ΣΕ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ PLEUROTUS. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ.

Μαρίνα Πλυτά

A.M. 21235

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο (επιβλέπων)

Ανδριάννα Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Διατροφής του Ανθρώπου και Τροφίμων,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γεώργιος Ζερβάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας, Γεωπονικό
Πανεπιστήμιο

ΑΘΗΝΑ 2016

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αναπληρωτή καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ακόμη, τον ευχαριστώ για την υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές του, καθώς και την τελική διόρθωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Οφείλω, επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Ανδριάννα Καλιώρα που με εμπιστεύθηκε για τη διεκπεραίωση της κλινικής δοκιμής, το αμείωτο ενδιαφέρον και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε γι' αυτόν τον σκοπό, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον κ. Γεώργιο Ζερβάκη για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Επιτροπή αξιολόγησης αυτής της ερευνητικής εργασίας και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Μαργαρίτα Χρηστέα, καθώς και στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Αριστέα Γκιοζάρη και στις υποψήφιες διδάκτορες κ. Χαραλαμπία Αμερικάνου και κ. Ευσταθία Παπαδά για τη συνδρομή τους στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας αυτής, τις γνώσεις που μου μετέδωσαν και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία παραγωγήςμανιταριών «Μανιτάρια Δίρφυς» για την παροχή των προϊόντων τους.

Ευχαριστίες από καρδιάς προς τις εθελόντριες που συμμετείχαν στη κλινική δοκιμή, για τη συνέπειά τους και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με υποστηρίζουν και με εμπιστεύονται σε κάθε μου επιλογή και βήμα.

Περίληψη

Ως έλλειψη βιταμίνης D ή υποβιταμίνωση D ορίζεται η συγκέντρωση της καλσιδιόλης στον ορό του αίματος $< 20 \text{ ng/mL}$, ενώ ως ανεπάρκεια βιταμίνης D ορίζεται η συγκέντρωση της καλσιδιόλης στον ορό του αίματος $21\text{-}29 \text{ ng/mL}$. Υπολογίζεται ότι ένα δις άνθρωποι παγκοσμίως έχουν έλλειψη ή ανεπάρκεια της βιταμίνης αυτής. Η καλσιτριόλη, η ενεργός μορφή της βιταμίνης D, λειτουργεί ως στεροειδής ορμόνη, με υποδοχείς σε πληθώρα κυττάρων και με αυτό τον τρόπο φαίνεται να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία αρκετών νοσημάτων.

Τα μανιτάρια αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διατροφής και χρησιμοποιούνται τόσο ως τρόφιμα όσο και ως φάρμακα εδώ και αιώνες. Τα μανιτάρια συνιστούν καλή πηγή βιταμίνης D, ιδιαίτερα για όσους ακολουθούν μια χορτοφαγικού τύπου δίαιτα. Το είδος *Pleurotus ostreatus* είναι το ευρύτερα καταναλισκόμενο παγκοσμίως λόγω της γεύσης, του αρώματος, της υψηλής διατροφικής αξίας και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της κατανάλωσης μανιταριών εμπλουτισμένων σε βιταμίνη D_2 στα επίπεδα της $25(\text{OH})D$, της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού υγιών εθελοντριών. Το πείραμα σχεδιάστηκε ως πιλοτική δοκιμή και πραγματοποιήθηκε σε 11 υγιείς ενήλικες γυναίκες με ανεπάρκεια βιταμίνης D που χωρίστηκαν τυχαιοποιημένα σε δυο ομάδες: α) ομάδα που κατανάλωνε καθημερινά 35 g συμβατικού αποξηραμένου μανιταριού και β) ομάδα που κατανάλωνε καθημερινά 35 g μη συμβατικού αποξηραμένου μανιταριού που είχε παραμείνει στον ήλιο επί τρεις ώρες. Η παρέμβαση διήρκεσε 6 εβδομάδες και αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα: α) ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και διατροφικές συνήθειες, β) επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος και βιοχημικοί δείκτες, γ) φλεγμονή: IL-6 του ορού και δ) οξειδωτικό στρες: ικανότητα οξειδωτικής τροποποίησης του ορού.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν μείωση των επιπέδων IL-6 στον ορό του αίματος για την ομάδα που κατανάλωνε τα μανιτάρια με αυξημένη συγκέντρωση βιταμίνης D έναντι των συμβατικών, όπως και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού των εθελοντριών. Και στις δύο ομάδες βρέθηκε παρόμοια αύξηση της $25(\text{OH})D$ ορού επειδή η αυξημένη ηλιοφάνεια κατά τη διάρκεια της παρέμβασης συγκάλυψε την όποια αύξηση από τη βιταμίνη D_2 που περιείχαν τα μανιτάρια.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως η κατανάλωση των μανιταριών με αυξημένη συγκέντρωση βιταμίνης D μπορεί να επιδρά ευεργετικά στη μείωση των επιπέδων φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες. Δεδομένου ότι δε διαπιστώθηκε διαφορά στη βιοδιαθεσιμότητα της περιεχόμενης βιταμίνης D μεταξύ των δυο προϊόντων, απαιτείται ο σχεδιασμός κλινικής δοκιμής με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών και κατά την περίοδο της ελάχιστης ηλιακής ακτινοβολίας.

Abstract

Vitamin D deficiency, or hypovitaminosis D is defined as calcidiol serum concentration < 20 ng/mL, while insufficiency is defined as calcidiol serum concentration 21-29 ng/mL. It is estimated that, on a global basis, one billion people have vitamin D deficiency or insufficiency. Calcitriol, vitamin D active metabolite, is considered to be a steroid hormone which interacts with its receptors in a plethora of cells, thus being involved in the pathophysiology of several diseases.

Mushrooms have been a component of human diet since antiquity, serving both as food and medicine. Mushrooms are a good source of vitamin D, especially for people who follow a vegetarian type of diet. Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) is among the most consumed mushroom species worldwide due to its taste, flavor, high nutritional value and medicinal properties, including the anti-inflammatory and antioxidant ones.

The present study aimed to monitor the effects of a dietary intervention with mushrooms containing different levels of vitamin D₂, on serum 25(OH)D, IL-6 and lipoprotein resistance to oxidation. The study was designed as a double-blind, two parallel arms, randomized controlled pilot clinical trial. The clinical trial was conducted in 11 healthy adult women with vitamin D insufficiency, randomly allocated into two groups: a) a group that consumed 35 g of conventional dried mushrooms daily and b) a group that consumed 35 g of sunlight exposed dried mushrooms daily, for a total of 6 weeks. Sunlight-treated mushrooms contained less ergosterol and more vitamin D₂ compared to the respective non-treated ones. At baseline in order to evaluate the results were assessed: a) anthropometric data and dietary history, b) serum 25(OH)D levels and biochemical analysis, c) inflammation: serum IL-6 levels and d) oxidative stress: susceptibility of LDL to *ex vivo* oxidation.

The findings of this study suggest a decrease in serum IL-6 levels for the group that consumed the sunlight-treated mushrooms unlike the conventional ones, as well as an increase of their serum antioxidant capacity. The rise of 25(OH)D levels was similar in both arms, as the vitamin D₃ production due to increased sunshine during the intervention period, masked the possible increase due to vitamin D₂ provided by the mushrooms.

In conclusion, it appears that the consumption of mushrooms enriched in vitamin D may exhibit beneficial effects towards the reduction of inflammation and oxidative stress. However, as no difference of vitamin D bioavailability between the two arms was established, the design of a clinical trial involving a greater number of subjects and, conducted during a period of minimum sunshine is required.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract	3
1. BITAMINΗ D.....	6
1.1 Ιστορία βιταμίνης D.....	6
1.2 Δομή της βιταμίνης D	8
1.3 Πηγές βιταμίνης D	8
1.3.1 Διαιτητικές πηγές βιταμίνης D.....	8
1.3.2 Ηλιακή ακτινοβολία ως πηγή σύνθεσης βιταμίνης D.....	11
1.4 Μηχανισμός σύνθεσης βιταμίνης D μέσω ηλιακής ακτινοβολίας σε ζωικούς οργανισμούς	12
1.5 Μηχανισμός σύνθεσης βιταμίνης D μέσω ηλιακής ακτινοβολίας σε φυτικούς οργανισμούς ..	13
1.6 Μεταβολισμός βιταμίνης D	14
1.7 Απέκκριση.....	19
1.8 Παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση βιταμίνης D.....	20
1.9 Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης	21
1.10 Επαρκείς προσλήψεις	24
1.11 Ορισμός υποβιταμίνωσης D	27
1.12 Επιπολασμός ανεπάρκειας βιταμίνης D	29
1.13 Πρόσληψη βιταμίνης	33
1.14 Βιταμίνη D και νόσος.....	34
2. ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ.....	47
2.1 Μύκητες.....	47
2.2 Μύκητες-Το τρίτο βασίλειο των τροφίμων.....	49
2.3 Διατροφική αξία μανιταριών	50
2.4 <i>Pleurotus ostreatus</i>	52
2.5 Διατροφική αξία <i>Pleurotus ostreatus</i>	53
2.6 Μανιτάρια και βιταμίνη D ₂	55
2.7 Βιοδιαθεσιμότητα βιταμίνης D ₂ από τα μανιτάρια.....	55
2.8 Συνολικά οφέλη υγείας από την κατανάλωση μανιταριών.....	58
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	61

3.1 Σκοπός της μελέτης	61
3.2 Σχεδιασμός Μελέτης	61
3.3 Στάδιο προετοιμασίας.....	62
3.4 Στάδιο Παρέμβασης	63
3.5 Προετοιμασία δειγμάτων διατροφικής παρέμβασης με μανιτάρια <i>Pleurotus ostreatus</i>	63
3.6 Εργαστηριακές αναλύσεις	68
Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων	68
Μέτρηση δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες.....	68
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	69
4.1 Προσδιορισμός των επιπέδων IL-6 ορού αίματος	69
4.2 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability).....	73
4.3 Προσδιορισμός 25(OH)D στα δείγματα μανιταριών	75
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	1

1. BITAMINH D

1.1 Ιστορία βιταμίνης D

Η βιταμίνη D είναι μια ορμόνη (Holick, 2008; Guillot et al., 2010; Holick et al., 2011; Wacker et al., 2013), πιθανότατα μια από τις παλαιότερες που εμφανίστηκαν στις πρώτες μορφές ζωής πάνω στη Γη, περισσότερα από 900 εκατομμύρια χρόνια πριν (Holick, 2008; Keegan et al., 2013). Πρώιμες μορφές ζωής που υφίσταντο έκθεση σε υπερβολική ηλιακή ακτινοβολία, αντιμετώπισαν καταστροφή του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών τους, που ήταν ευαίσθητες σε αυτή. Το φυτοπλαγκτόν, όμως, και το ζωοπλαγκτόν παρήγαγαν προβιταμίνη D₂, δηλαδή εργοστερόλη, και κατ' αυτόν τον τρόπο προστάτευσαν το DNA και το RNA τους από την υπεριώδη ακτινοβολία. Επομένως, η προβιταμίνη D₂ που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία σε μήκη κύματος μεταξύ 240 και 320 nm, λειτουργεί ως «αντηλιακό». Πιθανά οι οργανισμοί αυτοί μεταβίβασαν τα γονίδια για την παραγωγή εργοστερόλης στους απογόνους τους, ενώ πιστεύεται ότι οι ανώτεροι οργανισμοί λάμβαναν την απαιτούμενη βιταμίνη από τους κατώτερους (Holick, 2003; Keegan et al., 2013). Φυτοπλαγκτόν που ζει για περισσότερα από 750.000.000 χρόνια, στη θάλασσα των Σαργασσών, στον Βόρειο Ατλαντικό, ακόμη και σήμερα παράγει εργοστερόλη, η οποία δύναται να μετατραπεί σε βιταμίνη D₂ όταν εκτεθεί σε ηλιακό φως.

Τα πρώτα σπονδυλωτά που εγκατέλειψαν τον ωκεανό για τη στεριά πριν από 350 εκατομμύρια χρόνια, μετέφεραν μαζί τους τη φωτοσυνθετική ικανότητα να παράγουν βιταμίνη D₃ στο δέρμα τους (Holick, 2008). Τα ποικιλόθερμα αυτά ζώα χρειάζονταν την βιταμίνη D προκειμένου να διατηρήσουν ικανά ποσά κυκλοφορούντος ασβεστίου στον ορό του αίματος για υγιή οστικό μεταβολισμό. Όταν μελετήθηκαν διεξοδικότερα, διαπιστώθηκε πως διέθεταν πολλές μορφές προβιταμίνης D στο δέρμα τους, αλλά σε μεγαλύτερες ποσότητες έχει αναγνωριστεί η προβιταμίνη D₃. Η ικανότητα επιδερμικής σύνθεσης βιταμίνης D έχει διαδραματίσει μείζονα ρόλο στην εξελικτική τους πορεία (Keegan et al., 2013). Πιθανή εξήγηση είναι ότι τα ζώα χρειάζονταν τη βιταμίνη για να απορροφήσουν ασβέστιο, προκειμένου να καλύψουν τις ανάγκες τους στο μικροσυστατικό αυτό και να παράγουν τους γιγαντιαίους τους σκελετούς, εξήγηση που επιβεβαιώνει και όσα γνωρίζουμε σήμερα για τη σχέση βιταμίνης D και ασβεστίου (Holick, 2008).

Στον άνθρωπο, η ιστορία ανεπάρκειας της βιταμίνης D εντοπίζεται αρκετά παλιά, όταν διαπιστώνεται η εμπλοκή της σε πολλές παθολογικές καταστάσεις των οστών, με πρώτη τη ραχίτιδα. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, η ραχίτιδα θεωρούνταν επιδημική στην Ευρώπη και τις Η.Π.Α., ειδικά στις βόρειες βιομηχανοποιημένες περιοχές. Η καύση ορυκτών καυσίμων, που προκάλεσε σοβαρή μόλυνση του περιβάλλοντος, και η δημιουργία μεγαλουπόλεων συνετέλεσαν στο να μειωθεί η έκθεση των

ανθρώπων στην ηλιακή ακτινοβολία. Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα νεκροψιών σε αυτές τις περιοχές, 80-90% των παιδιών υπέφεραν από ραχίτιδα, μια ασθένεια που προκαλείται από τη στέρηση του ήλιου και είχε ως έκβαση την παραμόρφωση των οστών τους (Holick, 2008; Keegan et al., 2013).

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο Γερμανός παιδίατρος, Hudschinsky, εξέθεσε παιδιά με ραχίτιδα σε λυχνία ατμών υδραργύρου που εξέπεμπε UVB ακτινοβολία. Έπειτα από 6 εβδομάδες θεραπείας σημείωσαν βελτίωση στην κατάσταση των οστών τους. Ακολούθως, πρότεινε τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας ως μιας σίγουρης θεραπείας για την ραχίτιδα. Το 1921, σε νοσοκομείο της Νέας Υόρκης οι Hess και Unger παρατήρησαν πως παιδιά με ραχίτιδα που εκτίθονταν τρεις με τέσσερις φορές την εβδομάδα απευθείας στον ήλιο, είχαν σημαντικές βελτιώσεις στις οστικές αλλοιώσεις (Holick, 2006; Holick, 2008; Holick, 2010). Ως εκ τούτου, η Αμερικανική κυβέρνηση εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες προς στους γονείς για λελογισμένη έκθεση των παιδιών στον ήλιο, ως μέτρο πρόληψης της ραχίτιδας (Holick, 2006; Holick, 2008).

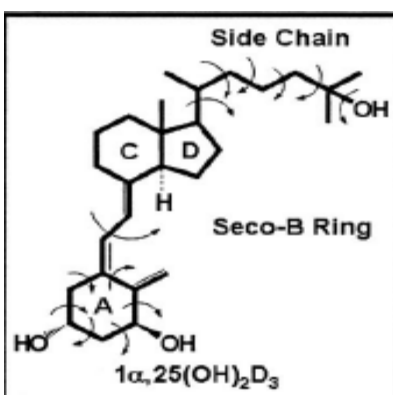
Στις Σκανδιναβικές χώρες και τα παράλια της Μεγάλης Βρετανίας ήταν γνωστό το μωρουνέλαιο ως αποτελεσματικό στην πρόληψη και στη θεραπεία της ραχίτιδας. Έρευνες που διεξήχθησαν σε τρωκτικά, τα οποία έπασχαν από ραχίτιδα, έδειξαν ότι τα αποτελέσματα από τη θεραπεία με απευθείας ακτινοβολήση σε λάμπα υπεριώδους και από την κατανάλωση μωρουνελαίου ήταν παρόμοια. Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας που δρούσε κατά της ασθένειας ήταν ταυτοχρόνως και θρεπτικό συστατικό και ορμόνη (Holick, 2010). Οι παρατηρήσεις αυτές ώθησαν τον Steenbock να εισάγει την έννοια της ακτινοβόλησης των ανθρώπων και των ζώων για καταπολέμηση της ασθένειας και στη συνέχεια να προτείνει ακόμη και την ακτινοβόληση των τροφίμων. Έτσι, αρχικά προέβη στην ακτινοβόληση αγελάδων και της τροφής τους με υπεριώδεις ακτίνες. Εν συνεχεία, περαιτέρω ενίσχυση του γάλακτος με βιταμίνη D (είτε D₂ είτε D₃) συνέβαλε στην εξάλειψη της ραχίτιδας από την Ευρώπη και τις Η.Π.Α. ως το 1930 (Holick, 2008; Holick, 2010). Η πρακτική του εμπλουτισμού καθιερώθηκε στις Η.Π.Α., τον Καναδά και την Ευρώπη ως μέσο πρόληψης. Η υπερκαλιαμία, όμως, που εμφανίσθηκε στη Μεγάλη Βρετανία τη δεκαετία του 1950, και θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στα μεγάλα ποσά της βιταμίνης D που προσλαμβάνονταν από το γάλα, οδήγησε στη νομοθετική απαγόρευση του εμπλουτισμού των γαλακτοκομικών αρχικά και στη συνέχεια των περισσότερων τροφίμων με βιταμίνη D, στην Αγγλία και ακολούθως στην Ευρώπη (Holick, 2008; Holick, 2010).

Ο εμπλουτισμός της μαργαρίνης ξεκίνησε στην Ευρώπη σαν εναλλακτικός τρόπος πρόληψης της ανεπάρκειας βιταμίνης D στα παιδιά, ενώ σήμερα πολλά δημητριακά είναι, επίσης, ενισχυμένα στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες. Η Φινλανδία και η Σουηδία προχώρησαν σε εμπλουτισμό του

γάλακτος τη δεκαετία του 1990, μια πρακτική ελάχιστα χρησιμοποιούμενη στην υπόλοιπη Ευρώπη (Holick, 2010).

1.2 Δομή της βιταμίνης D

Δομικά, η βιταμίνη D προέρχεται από ένα στεροειδές και θεωρείται ότι είναι σεκοστεροειδές (seco-steroid) (Εικόνα 1). Η βιταμίνη D απαρτίζεται από τρεις άθικτους δακτυλίους (A, C, D), με ένα άνοιγμα μεταξύ του 9^{ου} και του 10^{ου} άνθρακα στο δακτύλιο B. Η βιταμίνη και οι μεταβολίτες της παρουσιάζουν ασυνήθιστη ευκαμψία, γεγονός που τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με δεσμευτικές πρωτεΐνες (Groppe, 2008).



Εικόνα 1. Δομή βιταμίνης D (1,25 (OH)₂ D₃) (Norman, 2008).

1.3 Πηγές βιταμίνης D

1.3.1 Διαιτητικές πηγές βιταμίνης D

Η κύρια πηγή βιταμίνης D για τους περισσότερους ανθρώπους ήταν ανέκαθεν η έκθεση στο ηλιακό φως (Holick, 2006; Holick, 2008; Urbain et al., 2011). Παρόλα αυτά, η διαιτητική βιταμίνη προσλαμβάνεται κυρίως από τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ειδικότερα, λιπαρά ψάρια όπως ο σολομός, ο μπακαλιάρος, το σκουμπρί, ο τόνος και η σαρδέλα αλλά και έλαια από το ήπαρ αυτών, όπως το μωρουνέλαιο από το ήπαρ του βακαλάου, συνιστούν εξαιρετικές πηγές της βιταμίνης. Σημαντικά ποσά, ακόμη, περιέχουν ο κρόκος του αυγού, το μοσχάρι, τα γαλακτοκομικά, όπως το τυρί, το γάλα και το βούτυρο, ενώ τα φρέσκα και αποξηραμένα μανιτάρια αποτελούν μια πολύ καλή φυτική πηγή βιταμίνης D (Groppe, 2008; Holick et al., 2011; Urbain et al., 2011).

Η διαιτητική βιταμίνη D είναι μια σταθερή ουσία και δεν παρουσιάζει σημαντικές απώλειες κατά το μαγείρεμα, την αποθήκευση ή γενικότερα οποιαδήποτε επεξεργασία των τροφίμων (Groppe, 2008).

Στις Η.Π.Α. τρόφιμα εμπλουτισμένα σε βιταμίνη D αποτελούν το γάλα, ο χυμός πορτοκαλιού, ορισμένα είδη ψωμιού και δημητριακών πρωινού, κάποιες μαργαρίνες, βούτυρα, τυριά και γιαούρτια (Holick, 2008; Holick et al., 2011; Urbain et al., 2011). Στην Ευρώπη, οι χώρες που ακολουθούν πολιτική εμπλουτισμού γαλακτοκομικών προϊόντων είναι η Φινλανδία και η Σουηδία , ενώ κάποιες άλλες ευρωπαϊκές χώρες προσθέτουν βιταμίνη D σε ορισμένα προϊόντα μαργαρίνης, ψωμιού και δημητριακών (Holick, 2008; Holick et al., 2011).

Επιπροσθέτως, διαιτητική πηγή βιταμίνης D συνιστούν και τα διατροφικά συμπληρώματα και φαρμακευτικά σκευάσματα που κυκλοφορούν στην παγκόσμια αγορά (Holick, 2008; Holick et al., 2011).

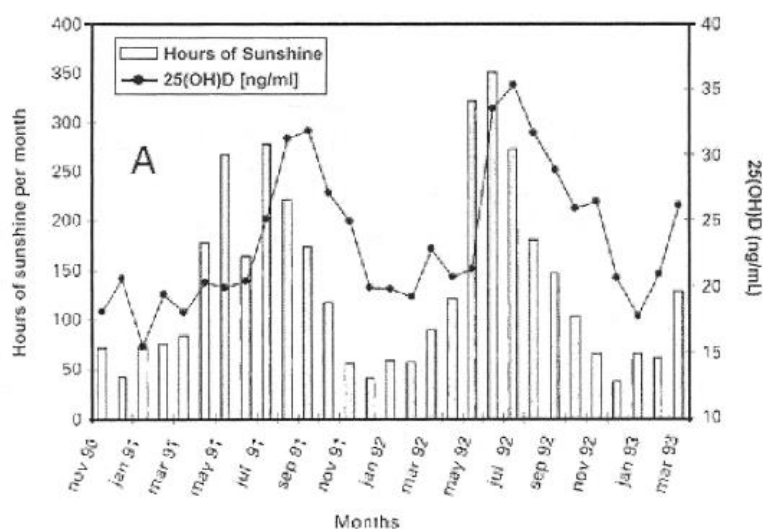
Πίνακας 1. Πηγές βιταμίνης D₂ και D₃.

Φυσικές πηγές	
Μουρουνέλαιο	400-1000 IU/κ.γλ. D ₃
Κρόκος αυγού	20 IU/κρόκο D ₂ ή D ₃
Σκουμπρί, κονσέρβα	250 IU/100 g D ₃
Σολομός, κονσέρβα	300-600 IU/100 g D ₃
Σολομός, φρέσκος	100-250 IU/100 g D ₃
Σαρδέλες, κονσέρβα	300 IU/100 g D ₃
Τόνος, κονσέρβα	236 IU/100 g D ₃
Μανιτάρια shiitake, φρέσκα	100 IU/100 g D ₂
Μανιτάρια shiitake, αποξηραμένα	1.600 IU/100 g D ₂
Ηλιακό φως/UVB ακτινοβολία	20.000 IU D ₃ ισοδυναμεί με έκθεση σε 1 MED με μαγιά/ 3.000 IU D ₃ με έκθεση χεριών και ποδιών σε 0,5 MED
Εμπλουτισμένα τρόφιμα	
Εμπλουτισμένα δημητριακά	100 IU/ μερίδα
Εμπλουτισμένο βούτυρο	56 IU/100 g D ₃
Εμπλουτισμένα τυριά	100 IU/85 g D ₃
Εμπλουτισμένη μαργαρίνη	429 IU/100 g D ₃
Εμπλουτισμένο γάλα	100 IU/237mL D ₃
Εμπλουτισμένος χυμός πορτοκάλι	100 IU/237 mL D ₃
Εμπλουτισμένα γιαούρτια	100 IU/237 mL D ₃
Παιδικές φόρμουλες	100 IU/237 mL D ₃
Φάρμακα στις Η.Π.Α.	
Drisdol (βιταμίνη D ₂) υγρό	8.000 IU/mL
Vitamin D ₂ (ergocalciferol)	50.000 IU/κάψουλα
Συμπληρώματα	
Πολυβιταμίνες	400,500 και 1000 IU D ₂ ή D ₃
Βιταμίνη D ₃	400, 800, 1.000, 2.000, 5.000, 10.000, 14.000 και 50.000 IU

Σημ.: MED=minimal erythematous dose, ελάχιστη ερυθματώδης δόση που προσδιορίζεται από έκθεση του δέρματος σε υπεριώδη ακτινοβολία και που 24 h αργότερα αξιολογείται από το ποια δόση προκάλεσε ελαφρύ ερεθισμό και όχι έγκαυμα στο δέρμα. (Wacker, 2013). 40 IU=1 μg βιταμίνης D

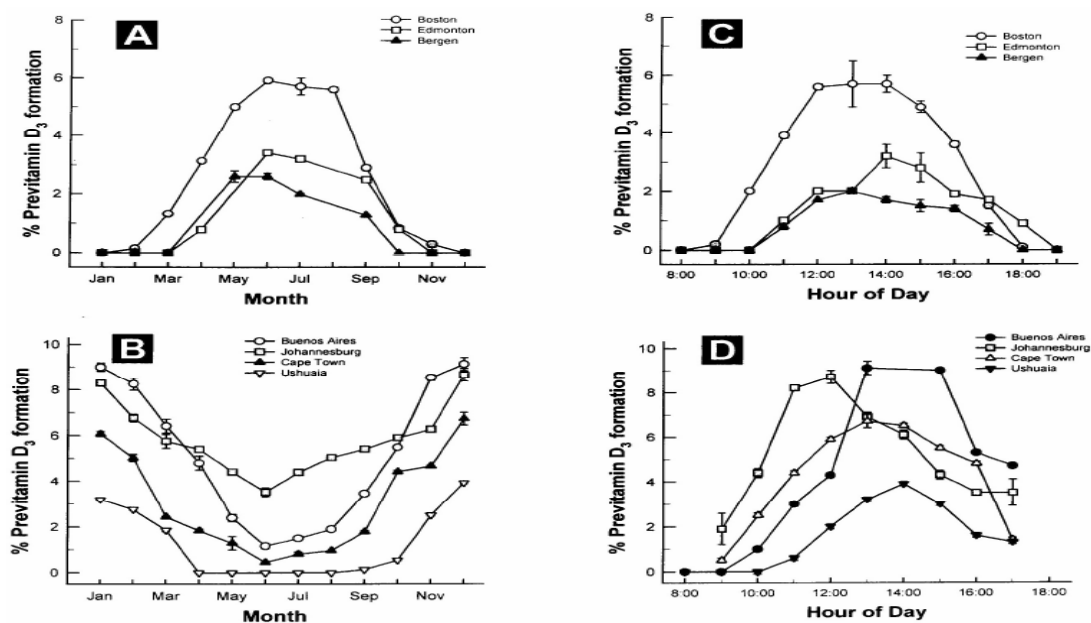
1.3.2 Ηλιακή ακτινοβολία ως πηγή σύνθεσης βιταμίνης D

Η κύρια πηγή βιταμίνης D για τον ανθρώπινο οργανισμό θεωρείται η επαγόμενη από την ηλιακή ακτινοβολία επιδερμική σύνθεσή της. Κατά τη διάρκεια της άνοιξης, του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, για ένα διάστημα από τις 10.00 π.μ. ως τις 15.00 μ.μ., φθάνουν σε όλη την επιφάνεια της Γης φωτόνια υπεριώδους ακτινοβολίας, αρκετά για να προκύψει η φωτοσύνθεση της βιταμίνης D₃. Ωστόσο, το χειμώνα, νωρίς το πρωί και μετά το μεσημέρι η ζενιθ γωνία του ηλίου μικραίνει και το μήκος της διαδρομής που πρέπει να διασχίσουν τα φωτόνια, αυξάνεται (Holick and Chen, 2008). Ως εκ τούτου, το όζον, που απορροφά αποτελεσματικά την υπεριώδη ακτινοβολία, απορροφά σημαντικό ποσοστό των φωτονίων πριν αυτά προλάβουν να φθάσουν στην επιφάνεια της Γης και κατ' αυτά τα διαστήματα υπάρχει από λίγη έως καθόλου επιδερμική σύνθεση βιταμίνης D (Holick, 2008; Holick and Chen, 2008). Αυτό εξηγεί το λόγο για τον οποίο η παραγωγή προβιταμίνης D₃ διαφέρει τόσο ανάμεσα στα διάφορα γεωγραφικά πλάτη, αλλά και ανάμεσα στις ώρες της ημέρας και τις εποχές του χρόνου (Εικόνα 2) (Holick, 2008; Holick et al., 2011).



Εικόνα 2. Επίπεδα βιταμίνης D στον ορό υγιών γυναικών στην εμμηνόπαυση και επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας στη διάρκεια του χρόνου (Brot et al., 2001).

Σε περιοχές που βρίσκονται πάνω και κάτω από τη 33° γεωγραφικού πλάτους, η επιδερμική σύνθεση βιταμίνης D είναι μηδαμινή κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Holick et al., 2011).



Εικόνα 3. Επιρροή της εποχής του χρόνου, της ώρας της ημέρας και του γεωγραφικού πλάτους στη σύνθεση βιταμίνης D σε περιοχές του βόρειου (Α και C) και του νότιου ημισφαιρίου (Β και D) (Wacker, 2013).

Η βιταμίνη που παράγεται στο δέρμα είναι διαθέσιμη για διπλάσιο χρόνο στο αίμα σε σχέση με τη βιταμίνη που προσλαμβάνεται μέσω της τροφής (Haddad et al., 1993). Πλήθος παραγόντων επηρεάζουν την επιδερμική σύνθεση της βιταμίνης, όπως η απόχρωση του δέρματος, το γήρας, η επιλογή ρουχισμού, αλλά και οι δραστηριότητες σε εξωτερικό περιβάλλον, η επιλογή έκθεσης στον ήλιο και η τοπική χρήση αντηλιακών προϊόντων. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να αποτρέψουν ή να ενισχύσουν την επιδερμική παραγωγή της βιταμίνης D και να επηρεάσουν την κατάστασή της στον οργανισμό (Holick et al., 2011; Spiro and Buttriss, 2014).

1.4 Μηχανισμός σύνθεσης βιταμίνης D μέσω ηλιακής ακτινοβολίας σε ζωικούς οργανισμούς

Πρόδρομη ένωση της χοληστερόλης είναι η 7-δεϋδροχοληστερόλη, η οποία απαντάται στα ζώα και τον άνθρωπο και η μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτής στον ανθρώπινο οργανισμό ανιχνεύεται στο δέρμα (Holick, 2008; Gropper, 2008). Ο πιο πιθανός λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό, είναι γιατί το δέρμα που εκτίθεται στον ήλιο είναι η κύρια πηγή σύνθεσης βιταμίνης D για τα περισσότερα χερσαία θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Holick, 2008). Η 7-δεϋδροχοληστερόλη συντίθεται στους σμηγματογόνους αδένες του δέρματος, εκκρίνεται στην επιφάνεια της επιδερμίδας και μπορεί να απορροφηθεί από τις διάφορες στιβάδες του δέρματος (Gropper, 2008).

Η υπεριώδης ακτινοβολία UVB δύναται να διεισδύσει μέσω της στιβάδας του όζοντος και να φθάσει στην επιφάνεια της Γης με μήκη κύματος μεταξύ 290 και 315 nm (Holick, 2008). Κατά την έκθεση, λοιπόν, στο ηλιακό φως μέρος από τα αποθέματα της 7-δεϋδροχοληστερόλης της επιδερμίδας μετατρέπονται σε προβιταμίνη D₃ (ή προκαλσιφερόλη), καθώς το συζευγμένο σύστημα δακτυλίων (5-7) της 7-δεϋδροχοληστερόλης επιτρέπει την απορρόφηση των συγκεκριμένων μηκών κύματος, οπότε ανοίγει ο B δακτύλιος αυτής και σχηματίζεται προβιταμίνη D₃. Η λουμιστερόλη παράγεται, επίσης, από την 7-δεϋδροχοληστερόλη υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, ενώ η ταχυστερόλη από περαιτέρω επίδραση της ακτινοβολίας επί της προβιταμίνης D₃ (Groppe, 2008). Η θέση της τελευταίας στην κυτταρική μεμβράνη βρίσκεται μεταξύ των άπολων ουρών και των πολικών κεφαλών των ελεύθερων λιπαρών οξέων και υφίσταται μια ισομερίωση για να σχηματιστεί η βιταμίνη D₃ (ή χοληκαλσιφερόλη, ή καλσιόλη) μέσα σε διάστημα 2-3 ημερών, μέσω μιας διαδικασίας που απαιτεί θερμότητα (Holick, 2008; Groppe, 2008).

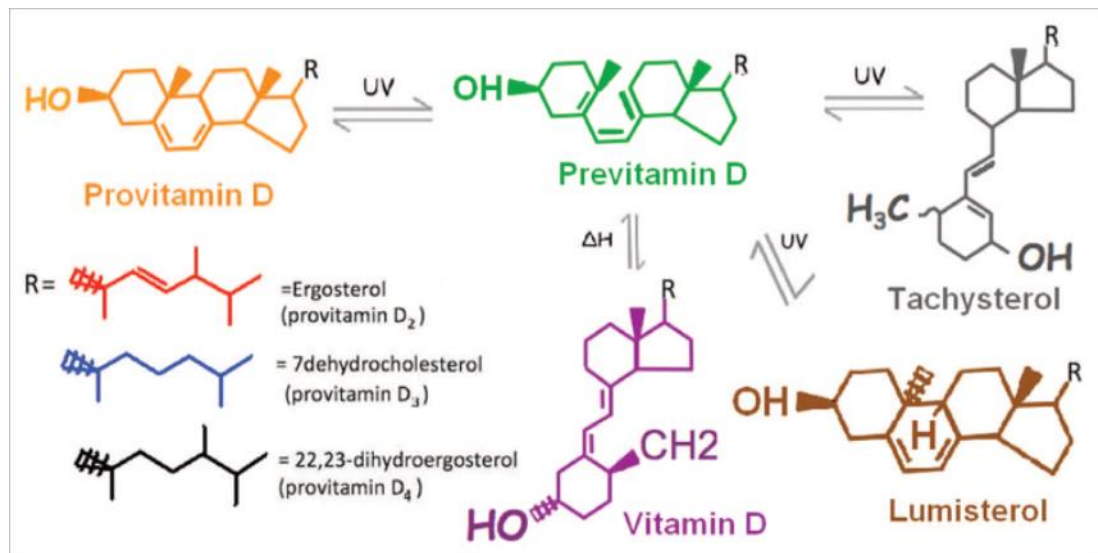
Μόλις σχηματιστεί, η βιταμίνη D₃ είναι στερεοχημικά ασύμβατη με την πλασματική μεμβράνη και ελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Η μεγαλύτερη παραγωγή της συμβαίνει στην επιδερμίδα, έναν αναίμακτο ιστό. Στη συνέχεια, διαχέεται από την επιδερμίδα στο αίμα με τη βοήθεια μιας μεταφορικής α-2 σφαιρίνης που προσδένει τη βιταμίνη D (D-Binding Protein, DBP ή τρανσκαλσιφερίνη) και συντίθεται από το ήπαρ και με αυτόν τον τρόπο η βιταμίνη D μεταφέρεται στο ήπαρ (Holick, 2008; Groppe, 2008). Εκτός από την DBP, η βιταμίνη D μεταφέρεται στο ήπαρ και προσδεμένη στην αλβουμίνη, με αποτέλεσμα το 99% της βιταμίνης να κυκλοφορεί δεσμευμένο σε κάποια πρωτεΐνη (Aw, 2013).

Η λουμιστερόλη, η ταχυστερόλη αλλά και η προβιταμίνη D₃ δεν έχουν μεγάλη συγγένεια με την DBP και έτσι δεν εισέρχονται στο αίμα, αλλά αποβάλλονται από τον οργανισμό με την ανανέωση του δέρματος (Groppe, 2008). Ακόμη και η καθημερινή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, είναι σχεδόν απίθανο να δημιουργήσει τοξικότητα λόγω της βιταμίνης D. Αφού σχηματιστούν η προβιταμίνη και η βιταμίνη D₃ στο δέρμα, συνεχίζουν να απορροφούν UVB και UVA ακτινοβολία και μετατρέπονται στα προαναφερθέντα και σε άλλα μεταβολικά προϊόντα. Τα τελευταία δεν εισέρχονται στην κυκλοφορία ούτε επηρεάζουν τον μεταβολισμό, συνεπώς δεν υπάρχει κάποια αναφορά τοξικότητας από την υπερβολική έκθεση σε ακτινοβολία, φυσική ή τεχνητή (Holick, 2008).

1.5 Μηχανισμός σύνθεσης βιταμίνης D μέσω ηλιακής ακτινοβολίας σε φυτικούς οργανισμούς

Ένα στεροειδές που απαντάται συχνά στα φυτά είναι η εργοστερόλη, η οποία ενεργοποιείται με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία προς σχηματισμό εργοκαλσιφερόλης, ή αλλιώς βιταμίνη D₂ ή ερκαλσιόλης (Groppe, 2008). Οι διαφορές μεταξύ των μορφών της βιταμίνης D ανάλογα την

προέλευσή τους φαίνονται στην εικόνα 4. Παράλληλα, σε φυτικούς οργανισμούς, και στα μανιτάρια, η μετατροπή της εργοστερόλης προς βιταμίνη D₂ μπορεί να λάβει χώρα και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε έρευνα μετά από ακτινοβόληση 5 min μανιταριών σε λάμπα UV, ανιχνεύθηκε η προ-εργοκαλσιφερόλη, ενώ μετά από ακτινοβόληση 10,6 min αναγνωρίστηκε η εργοκαλσιφερόλη ή βιταμίνη D₂. Έπειτα από 6 h ακτινοβόλησης το 24% της εργοστερόλης είχε μετατραπεί σε βιταμίνη D₂ και μετά από 11½ h, το 50% (Keegan, 2014).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της προβιταμίνης D (πορτοκαλί), που ανάλογα με την πλευρική ομάδα R μπορεί να είναι εργοστερόλη-προβιταμίνη D₂ (κόκκινο), 7-δεϋδροχοληστερόλης-προβιταμίνη D₃ (μπλε), 22,23-δεϋδροεργοστερόλη-προβιταμίνη D₄ (μαύρο). Με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας μετατρέπεται σε προκαλσιφερόλη (πράσινο) και με θέρμανση σε χοληκαλσιφερόλη (μωβ). Υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας η προβιταμίνη D μετατρέπεται σε ταχυστερόλη (γκρι) και λουμιστερόλη (καφέ) (Keegan, 2013).

1.6 Μεταβολισμός βιταμίνης D

Η προσληφθείσα μέσω διατροφής βιταμίνη D απορροφάται μαζί με το διατροφικό λίπος με τη βοήθεια των μικκυλίων, ενώ με τη βοήθεια των χολικών αλάτων και με παθητική διάχυση εισέρχεται στα εντεροκύτταρα. Υπολογίζεται ότι το 50% της βιταμίνης D που προέρχεται από τη διατροφή, απορροφάται. Παρόλο που έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός απορρόφησης είναι ταχύτερος στο δωδεκαδάκτυλο, το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης επιτυγχάνεται στα κατώτερα σημεία του λεπτού εντέρου (Groppe, 2008). Η διαιτητική βιταμίνη D απορροφάται εντός του εντεροκυττάρου, όπου ενσωματώνεται στα χυλομικρά, τα οποία στη συνέχεια θα εισέλθουν στην λεμφική κυκλοφορία

και κατόπιν στο αίμα (Holick, 2008; Gropper, 2008; Holick et al., 2011; Aw, 2013). Τα χυλομικρά μεταφέρουν περίπου το 40% της βιταμίνης D στο αίμα, αλλά ορισμένη ποσότητα μεταφέρεται από αυτά στην DBP, ώστε να απελευθερωθεί στους εξωηπατικούς ιστούς. Τα υπολείμματα των χυλομικρών μεταφέρουν τη χοληκαλσιφερόλη στο ήπαρ (Gropper, 2008).

Η χοληκαλσιφερόλη που παράγεται από την έκθεση της επιδερμίδας στην ηλιακή ακτινοβολία συνδέεται με την DBP και διαχέεται αργά από το δέρμα με κατεύθυνση προς το ήπαρ (Holick, 2008; Aw, 2013). Περίπου το 60% της χοληκαλσιφερόλης του πλάσματος είναι συνδεδεμένο με την DBP και μέσω αυτής φθάνει στο ήπαρ. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό της εναποτίθεται στους μύς και στον λιπώδη ιστό, προτού μεταφερθεί στο ήπαρ. Η διαφορά στο μηχανισμό μεταφοράς εντός του οργανισμού της βιταμίνης ανάλογα με την προέλευσή της επηρεάζει την κατανομή της στο σώμα (Gropper, 2008).

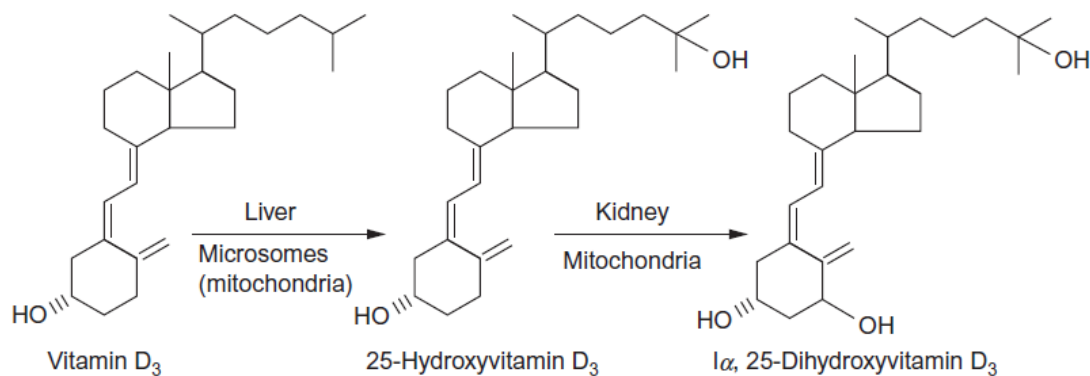
Η χοληκαλσιφερόλη που φθάνει στο ήπαρ είτε μέσω των υπολειμμάτων των χυλομικρών είτε μέσω της DBP είναι βιολογικά ανενεργή. Προκειμένου να παραχθεί στον οργανισμό η ενεργός μορφή της απαιτούνται δυο υδροξυλιώσεις, εκ των οποίων η πρώτη λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, υπό τη δράση της 25-υδροξυλάσης (25-OH) στον άνθρακα 25, προς παραγωγή καλσιδιόλης (25-OH-D₃). (Holick et al., 2011; Aw, 2013).

Η χοληκαλσιφερόλη μπορεί να μεταβολιστεί από μια πληθώρα μικροσωματικών υδροξυλασών του P450 κυτοχρώματος. Συνολικά, τα ένζυμα αυτά αναφέρονται ως πολυλειτουργικές οξειδάσες, αφού δρουν ανάγοντας ένα άτομο του μορίου του οξυγόνου σε νερό και ένα σε μια ομάδα υδροξυλίου. Η κύρια αντίδραση υδροξυλίωσης καταλύεται από το CYP2R1, αλλά και τα CYP27A1, CYP2J2, και CYP3A4 μπορούν επίσης να συνεισφέρουν (Gropper, 2008; Aw, 2013). Η ικανότητα της υδροξυλάσης να μετατρέπει στο ήπαρ τη χοληκαλσιφερόλη προς καλσιδιόλη, σχετίζεται άμεσα με την κατάσταση της βιταμίνης D στον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο 25-υδροξυλάση, που εξαρτάται από το NADPH, είναι περισσότερο ενεργό σε περιόδους στέρησης βιταμίνης D, σε σχέση με περιόδους κατά τις οποίες φυσιολογικές ποσότητες αυτής είναι διαθέσιμες (Gropper, 2008). Επομένως, η παραγωγή καλσιδιόλης δεν ελέγχεται από κάποιον άλλον μηχανισμό και εξαρτάται από την παροχή βιταμίνης D στον οργανισμό (Aw, 2013). Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί πως ενώ το ήπαρ είναι το κύριο όργανο παραγωγής του ενζύμου, αυτό εντοπίζεται και σε άλλα όργανα, όπως πνεύμονες, έντερο και νεφροί (Gropper, 2008).

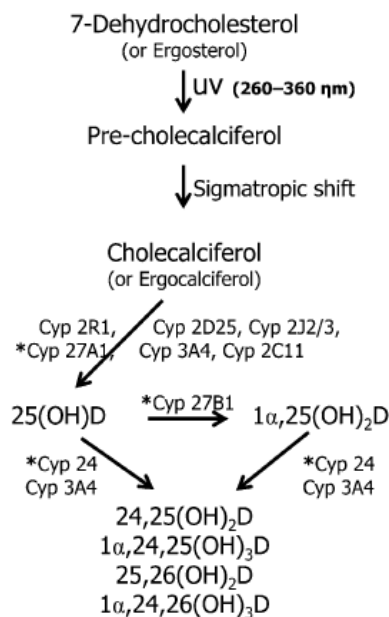
Αφού παραχθεί η 25-OH-D₃, απελευθερώνεται στο αίμα, και αποτελεί την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D (Holick, 2008; Gropper, 2008). Ο μεγάλος χρόνος ημιζωής της -μερικές εβδομάδες- την καθιστά καλό δείκτη για την αξιολόγηση των επιπέδων της βιταμίνης D στο σώμα και αντανακλά τόσο

την πρόσληψή της από τη διατροφή (D_2 και D_3) όσο και την λόγω έκθεσης στον ήλιο παραγωγής της (D_3) (Holick, 2008; Gropper, 2008; Aw, 2013). Αποθηκευτικοί χώροι για τη βιταμίνη D θεωρούνται το αίμα και οι μύς για την καλσιδιόλη και ο λιπώδης ιστός για την χοληκαλσιφερόλη (Gropper, 2008).

Έπειτα από την υδροξυλίωση στο ήπαρ, ακολουθεί μεταφορά της $25(OH)D_3$ στους νεφρούς μέσω σύνδεσής της με την DBP, όπου λαμβάνει χώρα και η δεύτερη υδροξυλίωση στη θέση 1. Τελικό προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι η ενεργός μορφή της βιταμίνης D, $1,25-(OH)_2-D_3$, καλούμενη επίσης και καλσιτριόλη (Holick, 2008). Η υδροξυλίωση προς παραγωγή καλσιτριόλης στα νεφρικά σωληνάκια επιτελείται από τη νεφρική 1-α-υδροξυλάση, ένα ένζυμο του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος P450 που εξαρτάται επίσης από το NADPH και καλείται και CYP27B1 (Holick et al., 2011; Aw, 2013). Η 1-α-υδροξυλάση εκφράζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους νεφρούς, εντοπίζεται όμως και στα μακροφάγα, στο αίμα, το λεπτό έντερο και τα οστά (Gropper, 2008).



Εικόνα 5. Διαδικασία παραγωγής ενεργού μορφής της βιταμίνης D (DeLuka, 2004)

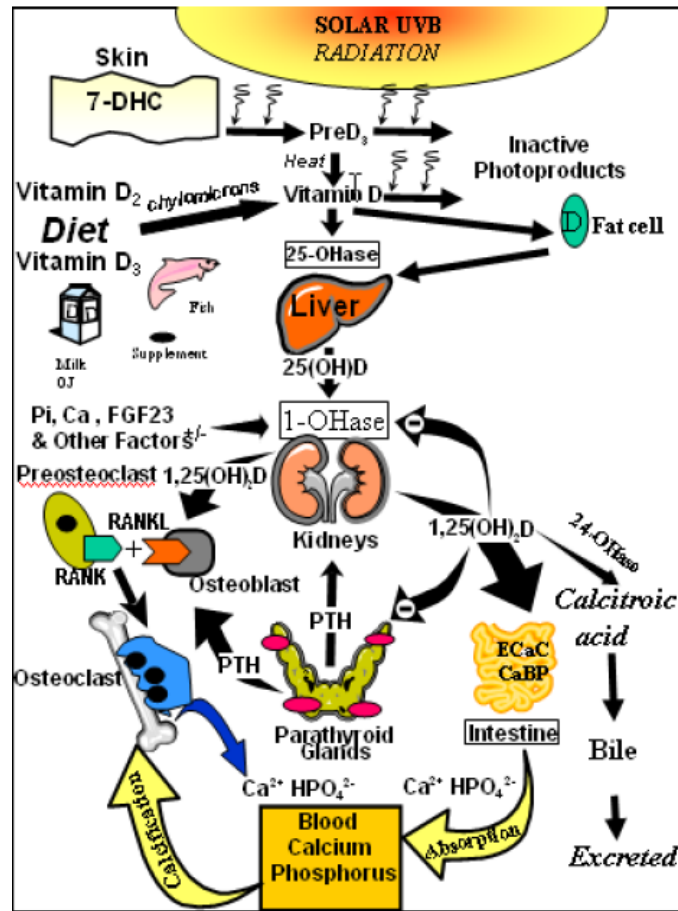


Εικόνα 6. Τα ένζυμα CYP που εμπλέκονται στη σύνθεση και αποικοδόμηση της βιταμίνης D (Pinto,2014).

Η παραγωγή της 1,25-(OH)₂-D₃ εξαρτάται από την ενεργότητα της 1-α-υδροξυλάσης, με την τελευταία να επηρεάζεται από ποικιλία παραγόντων. Αρχικά, η ίδια η καλσιτριόλη ρυθμίζει τη σύνθεσή της: υψηλές συγκεντρώσεις του τελικού προϊόντος μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου, ενώ αντίθετα χαμηλές συγκεντρώσεις διεγείρουν την ενεργότητά του (Groppe, 2008). Υψηλές συγκεντρώσεις καλσιτριόλης στον οργανισμό μειώνουν τη σύνθεση και έκκριση παραθυρεοειδούς ορμόνης μέσω αλληλεπίδρασης με τους VDR στους παραθυρεοειδείς αδένες (Holick, 2008; Aw, 2013). Η παραθυρεοειδής ορμόνη δρα ως υποκινητής οστικής απώλειας, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό του ασβεστίου και των οστών (Aw, 2013). Επομένως, τόσο η υψηλή συγκέντρωση παραθυρεοειδούς ορμόνης όσο και η χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα θα διεγείρουν την ενεργότητα της 1-α-υδροξυλάσης, αλλά η υψηλή πρόσληψη φωσφόρου θα την μειώσει, επομένως θα μειώσει και την παραγωγή 1,25-(OH)₂-D₃.

Επιπροσθέτως, η καλσιτριόλη διαθέτει έναν ακόμη τρόπο να αυτορυθμίζει την παραγωγή της. Όταν οι ποσότητές της στον οργανισμό επαρκούν, μειώνεται η δραστηριότητα της 1-α-υδροξυλάσης, αλλά αυξάνεται η ενεργότητα ενός άλλου ενζύμου, της 24-υδροξυλάσης ή CYP24A1. Αυτό το ένζυμο παράγεται επίσης στους νεφρούς και πιθανώς και σε άλλους ιστούς και δρα υδροξυλιώνοντας την χοληκαλσιφερόλη και την καλσιτριόλη προς λιγότερο ενεργά υδατοδιαλυτά παράγωγα (Aw, 2013), όπως η 24R,25-(OH)₂-D₃ και η 1,24,25-(OH)₂-D₃. Ως εκ τούτου, σε περιόδους επάρκειας της βιταμίνης και ισορροπίας της ομοιόστασης ασβεστίου αυξάνεται η παραγωγή 24R,25-(OH)₂-D₃, η οποία κυκλοφορεί

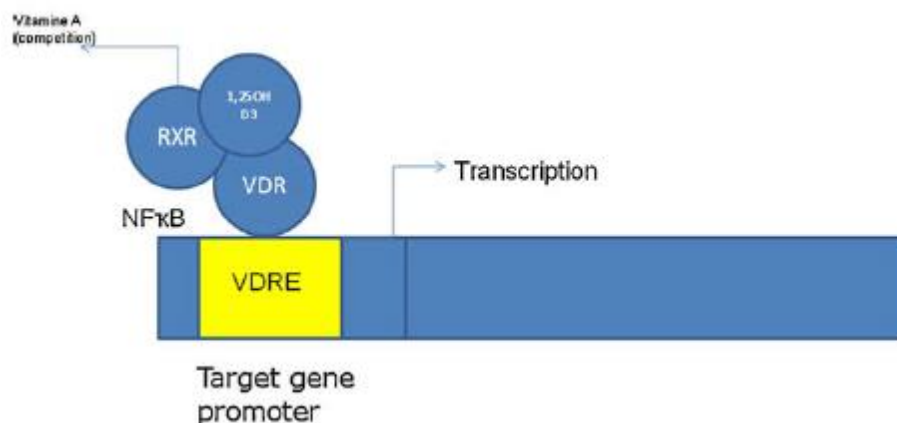
στο αίμα χαλαρά συνδεδεμένη με την DBP, επιτελώντας λειτουργίες σε διάφορους ιστούς (Groppe, 2008).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης και του μεταβολισμού της βιταμίνης D (Wacker, 2013)

Η καλσιτριόλη, απελευθερώνεται από τους νεφρούς και μεταφέρεται στο αίμα συνδεδεμένη με την DBP. Αυτή η μορφή της βιταμίνης D έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια με τη δεσμευτική πρωτεΐνη και χρόνο ημίσειας ζωής μόλις 4-6 ώρες (Groppe, 2008). Φθάνοντας στους ιστούς-στόχους, η βιταμίνη D ακολουθεί δυο οδούς: απελευθερώνεται από την DBP και είτε συνδέεται με τον κυτταρικό υποδοχέα της βιταμίνης D, που ονομάζεται Vitamin D Receptor (VDR) είτε ενώνεται με τον πυρηνικό υποδοχέα της. Ο κυτταρικός υποδοχέας βρίσκεται σε επιλεγμένα όργανα -το λεπτό έντερο, τα οστά, τον παραθυρεοειδή αδένα, το ήπαρ, και τα β-κύτταρα του παγκρέατος- (Holick et al., 2011; Aw, 2013) και η δράση της βιταμίνης σε αυτά τα κύτταρα μεσολαβείται από ενδοκυττάριας οδούς μεταγωγής σήματος. Από την άλλη, οι πυρηνικοί υποδοχείς της εντοπίζονται σε τουλάχιστον 30 ακόμη όργανα, όπως νεφρούς, πνεύμονες, μύς, δέρμα, εγκέφαλο, ιστούς του ανοσοποιητικού κ.ά. και οι δράσεις της βιταμίνης είναι γονιδιακές, επηρεάζοντας δηλαδή τη μεταγραφή γονιδίων (Groppe, 2008; Holick et al.,

2011). Ο πυρηνικός υποδοχέας της βιταμίνης D ανήκει στην υπερικογενεία των πυρηνικών υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος και ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα X του ρετινοϊκού οξέος (Groppe, 2008; Aw, 2013). Δομικά οι VDR αποτελούνται από ένα μικρό αμινοτελικό άκρο πριν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και δυο δακτυλίους ψευδαργύρου, εκ των οποίων ο ένας είναι εξειδικευμένος για να προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDRE) επί του DNA και ο δεύτερος για τον ετεροδιμερισμό του υποδοχέα. Το υπόλοιπο μόριο διαθέτει λιπόφιλες περιοχές για την πρόσδεση της ενεργού μορφής της βιταμίνης D και στο καρβοξυτελικό άκρο, μια περιοχή πρόσδεσης συνεργοποιητών (Norman, 2014). Όταν η $1,25-(OH)_2-D_3$ προσδένεται στους VDR, το σύμπλοκο αυτό θα φωσφορυλιωθεί και στη συνέχεια θα ενωθεί με το ρετινοειδές X ή με τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος (RAR, RXR) σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο (Groppe, 2008). Με τη βοήθεια των δακτυλίων ψευδαργύρου, το VDR μέρος του συμπλόκου θα προσδεθεί σε στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDRE). Αυτά βρίσκονται στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων και επηρεάζουν την μεταγραφή γονιδίων που παράγουν πρωτεΐνες. Το ετεροδιμερές σύμπλοκο θα αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες, που δρουν είτε ως συνεργοποιητές είτε ως συγκαταστολείς, και θα συντελέσουν στην επαγωγή ή την καταστολή των γονιδίων στόχων βιταμίνης D (Guillot, 2010; Aw, 2013). Η τοπική παραγωγή $1,25-(OH)_2-D_3$ φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση ως και 200 γονιδίων, γεγονός που αποδεικνύεται από τα πολλαπλά οφέλη για την υγεία που αποδίδονται σε αυτή (Nagpal et al., 2005; Holick et al., 2011).



Εικόνα 8. Μηχανισμός δράσης της βιταμίνης D και του υποδοχέα της στον πυρήνα των κυττάρων-στόχων (Guillot, 2010)

1.7 Απέκκριση

Με τη δράση της 24-υδροξυλάσης παράγεται η $1,24,25-(OH)_2-D_3$. Αυτή μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω προς $1,25-(OH)_2-24-oxo-D_3$ και στη συνέχεια με διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας παράγεται

καλσιτροϊκό οξύ, το οποίο είναι βιολογικά ανενεργό και απεκκρίνεται στη χολή. Ταυτοχρόνως, παράγονται και άλλοι μεταβολίτες μετά από υδροξυλίωση και οξείδωση, οι οποίοι ακολούθως μπορούν να συζευχθούν και να απεκκριθούν επίσης στη χολή. Το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταβολιτών της βιταμίνης D, άνω του 70%, απεκκρίνονται ως επί το πλείστον με τα κόπρανα, ενώ μικρότερο με τα ούρα (Groppe, 2008).

1.8 Παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση βιταμίνης D

Πηγές βιταμίνης D για τους ζωικούς οργανισμούς συνιστούν η ενδογενής σύνθεσή της από την ηλιακή ακτινοβολία και η πρόσληψή της μέσω διατροφής, με την πρώτη να συνιστά την κυριότερη καθώς τα περισσότερα τρόφιμα εμπεριέχουν λιγοστή βιταμίνη D (Chen et al., 2007; Holick and Chen, 2008; Holick et al., 2011). Η ποσότητα της ηλιακής UVB ακτινοβολίας που φθάνει στη βιόσφαιρα αποτελεί συνάρτηση του μήκους κύματος και της ποσότητας του όζοντος που αυτή συναντά κινούμενη μέσα στην ατμόσφαιρα, η οποία είναι συνάρτηση της ανώτερης ηλιακής γωνίας και εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος, την εποχή και την ώρα της ημέρας (Chen et al., 2007). Επομένως, οτιδήποτε μειώνει τη μετάδοση της ηλιακής UVB ακτινοβολίας στην επιφάνεια της γης ή οτιδήποτε παρεμβαίνει στη διείσδυση της UVB ακτινοβολίας στο δέρμα, θα επηρεάσει την δερματική σύνθεση της βιταμίνης D₃ (Holick and Chen, 2008). Εξαιτίας του φόβου ανάπτυξης μελανώματος, ενός τύπου καρκίνου του δέρματος, οι άνθρωποι αποφεύγουν την απευθείας έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία χρησιμοποιώντας διάφορες πρακτικές (Chen et al., 2007). Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι εκστρατείες υπέρ της χρήσης αντηλιακών, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους προκειμένου να προστατευθούν οι άνθρωποι από τις βλαβερές επιπτώσεις της ακτινοβολίας. Τελικά, όμως, αυτή η πρακτική οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση βιταμίνης D και αυξάνει τις πιθανότητες να προκληθεί ανεπάρκεια, αφού η σωστή εφαρμογή ενός αντηλιακού με δείκτη προστασίας 15 απορροφά το 99% των φωτονίων UVB ακτινοβολίας, συντελώντας στην κατά 99% μειωμένη παραγωγή της προβιταμίνης D₃ (Holick, 2008; Holick and Chen, 2008).

Ένα ενδιαφέρον εύρημα μιας μελέτης που διεξήχθη σε Αθηναϊκό πληθυσμό ήταν ότι αύξηση της έκθεσης στον ήλιο κατά μια ώρα μειώνει κατά 70% την πιθανότητα να έχει κάποιος ανεπάρκεια βιταμίνης D (δηλ. <20 ng/mL). Ακόμη, στη μελέτη φάνηκε ότι η λελογισμένη προστασία από τον ήλιο μπορεί να εξαλείψει και τους δύο κινδύνους. Εάν κάποιος χρειάζεται 2-8 λεπτά έκθεσης σε καλοκαιρινό ήλιο για να βελτιστοποιήσει την επιδερμική σύνθεση της βιταμίνης, το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί και με έκθεση της τάξης των 10-20 λεπτών έχοντας εφαρμόσει αντηλιακό με δείκτη SPF 15–

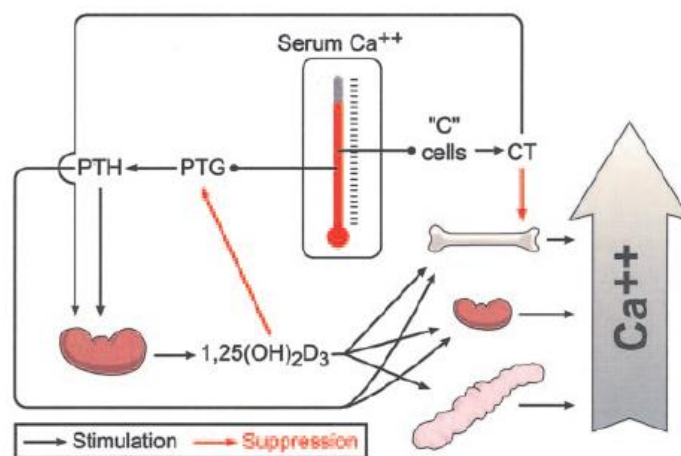
30. Συμπερασματικά, λελογισμένη έκθεση την άνοιξη, το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, ακόμα και για λίγη ώρα αλλά σε τακτική βάση, μπορεί να έχει όφελος για την υγεία (Vallianou et al., 2012).

Η απόχρωση του δέρματος δύναται επίσης να δράσει ως αντηλιακό (Holick, 2008), αφού η μελανίνη είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην απορρόφηση UVB ακτινοβολίας και έτσι, αυξημένη μελάγχρωση του δέρματος μειώνει σημαντικά τη σύνθεση της βιταμίνης D₃. Έρευνες δείχνουν ότι άνθρωποι με πιο σκούρα απόχρωση δέρματος έχουν φυσική προστασία από τον ήλιο και απαιτούν τουλάχιστον τρεις έως πέντε φορές μεγαλύτερη έκθεση σε αυτόν προκειμένου να συνθέσουν την ίδια ποσότητα βιταμίνης D, συγκριτικά με ένα άτομο που έχει λευκότερη επιδερμίδα (Holick et al., 2011). Επιπλέον, έγχρωμοι άνθρωποι που ζουν σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανεπάρκειας βιταμίνης D, διότι συχνά απαιτούν 5-10 φορές μεγαλύτερη έκθεση στο ηλιακό φως σε σύγκριση με τους Καυκάσιους, ώστε να συνθέσουν την ίδια ποσότητα βιταμίνης D₃ στο δέρμα τους (Holick, 2008).

Η γήρανση συνδέεται με μειωμένη συγκέντρωση της 7-δεϋδροχοληστερόλης στο δέρμα, δηλαδή του πρόδρομου μορίου της βιταμίνης D₃. Συνεπώς, ένας άνθρωπος 70 ετών διαθέτει το 25% της 7-δεϋδροχοληστερόλης ενός νεαρού ενήλικα, άρα κατά 75% μειωμένη ικανότητα δερματικής σύνθεσης βιταμίνης D₃ (Holick, 2008; Holick and Chen, 2008). Παρόλα αυτά, ηλικιωμένοι που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία UVB προερχόμενη είτε από το ηλιακό φως, είτε από σολάριουμ, είτε από άλλη πηγή UVB ακτινοβολίας, αύξησαν επιτυχώς το ποσό βιταμίνης D στον ορό του αίματος (Holick, 2008).

1.9 Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης

Η καλσιτριόλη, η ενεργός μορφή της βιταμίνης D, λειτουργεί ως στεροειδής ορμόνη, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο αίμα, μαζί με την παραθυρεοειδή ορμόνη (Mithal et al., 2009). Η υπασβεστιαμία, δηλαδή η χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα, διεγείρει την έκκριση της PTH από τους παραθυρεοειδείς αδένες και αυτή με τη σειρά της, την 1-α-υδροξυλάση στους νεφρούς, με αποτέλεσμα την μετατροπή της χολικαλσιφερόλης σε καλσιτριόλη. Η τελευταία θα δράσει με ποικίλους τρόπους ανάλογα τον ιστό-στόχο, μόνη της ή μαζί με την PTH, ως απάντηση στην υπασβεστιαμία, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ασβεστίου, επηρεάζοντας παράλληλα και τη συγκέντρωση του φωσφόρου (Groppe, 2008).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της δράσης της βιταμίνης D. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν καταστολή ενώ τα μαύρα επαγωγή. Οι συγκεντρώσεις ασβεστίου στον ορό του αίματος συμβολίζονται με το θερμόμετρο. Χαμηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύονται από τους παραθυρεοειδείς αδένες και επάγεται η σύνθεση και έκκριση παραθυρεοειδούς ορμόνης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύονται από τα κύτταρα C του θυρεοειδούς αδένος και επάγουν την έκκριση καλσιτονίνης, που αντισταθμίζει τις δράσεις της PTH και μειώνει τα επίπεδα ασβεστίου στον ορό.

Έντερο

Η καλσιτριόλη στο έντερο δρα αυξάνοντας την απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου (Holick, 2008; Damjanov, 2009; Aw, 2013). Η δράση της αυτή μεσολαβείται εξίσου από τους κυτταρικούς και τους πυρηνικούς υποδοχείς. Ως ορμόνη, η βιταμίνη D θα αλληλεπιδράσει με υποδοχείς υψηλής συγγένειας του εντεροκυττάρου και θα μεταφερθεί στον πυρήνα, όπου συνδέεται με ειδικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταφορά ασβεστίου (Groppe, 2008). Μεταξύ των πρωτεϊνών που θα παραχθούν, είναι και η καλβιδίνη 9K (Calcium Binding Protein-CaBP), η οποία δεσμεύει ασβέστιο στον εντερικό βλεννογόνο, με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του μικροσυστατικού από το εντεροκύτταρο (Holick, 2010). Ακόμη, ταχεία απορρόφηση ασβεστίου προκύπτει λόγω της μεταβολής στη σύσταση και τοπολογία της ψηκτροειδούς παρυφής των εντεροκυττάρων που προκαλείται από τη βιταμίνη D. Η διαδικασία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως *transcaltachia* και περιλαμβάνει την ενδοκύττωση του ασβεστίου κατά μήκος της ψηκτροειδούς παρυφής από λυσοσώματα και την τελική απελευθέρωσή του εντός του κυτταροπλάσματος. Έπειτα, το ασβέστιο απελευθερώνεται στο αίμα δια μέσου της βασικοπλευρικής μεμβράνης με ενδοκυττάρωση. Επιπροσθέτως, η καλσιτριόλη προκαλεί διάνοιξη των διαύλων ασβεστίου στο επιθήλιο του εντέρου (Epithelial calcium channel – EcaC ή Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6;

TRPV6) συντελώντας έτσι με ακόμη έναν τρόπο στην ταχεία απορρόφησή του (Holick, 2008; Holick, 2010).

Σχετικά με την αύξηση της απορρόφησης φωσφόρου που διαμεσολαβείται από τη βιταμίνη D στο εντερικό επιθήλιο, αυτό συμβαίνει με την επίδρασή της είτε στην ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης είτε στους διαμεμβρανικούς μεταφορείς. Η καλσιτριόλη αυξάνει την ενεργότητα του ενζύμου, το οποίο εντοπίζεται στην ψηκτροειδή παρυφή των εντεροκυττάρων και δρα υδrolύοντας τους δεσμούς των φωσφορικών εστέρων, διευκολύνοντας την απορρόφηση του φωσφόρου. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των διαθέσιμων μεταφορέων για την εξαρτώμενη από το νάτριο απορρόφηση του φωσφόρου (Groppe, 2008).

Έρευνες δείχνουν πως η καλσιτριόλη μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της απορρόφησης ασβεστίου από 10-15% σε 30-40% επιδρώντας στην έκφραση των επιθηλιακών διαύλων ασβεστίου και της καλβιδίνης. Επιπλέον, έρευνες σε τρωκτικά δείχνουν αντίστοιχα, πως η απορρόφηση του φωσφόρου αναμένεται να αυξηθεί από 50-60% στο 80% (Holick, 2010; Holick et al., 2011; Wacker and Holick, 2013).

Νεφροί

Σε περίπτωση υπασβεστιαιμίας, η υπερέκκριση PTH από τους παραθυρεοειδείς αδένες έχει ως συνέπεια την αύξηση ενεργότητας της 1-α-υδροξυλάσης. Επομένως, δρώντας στους νεφρούς, η ορμόνη επάγει την υδροξυλίωση της βιταμίνης D. Ακόμη, προκαλεί αύξηση της επαναρρόφησης ασβεστίου και της απέκκρισης φωσφόρου. Η επακόλουθη παραγωγή της ενεργούς μορφής της βιταμίνης D διευκολύνει περαιτέρω την επαναρρόφηση ασβεστίου στα εγγύς σωληνάκια των νεφρών (Damjanov, 2009; Aw, 2013, Wacker and Holick, 2013).

Οστά

Η παραθυρεοειδής ορμόνη δρα απευθείας στα οστά, κινητοποιώντας το ασβέστιο και το φώσφορο, προκειμένου να επιτευχθεί και να διατηρηθεί μια φυσιολογική συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα, όταν αυτή είναι μειωμένη. Η διαδικασία μεσολαβείται από την δράση της καλσιτριόλης επί των αιμοποιητικών κυττάρων, ώστε με κυτταρική διαφοροποίηση να παραχθούν οστεοκλάστες (Groppe, 2008). Η καλσιτριόλη αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα της στους οστεοβλάστες και η σύνδεση διεγείρει την έκφραση του ενεργοποιητή υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα συνδέτη NF κB (RANK-L). Ο υποδοχέας RANK-L στη συνέχεια δεσμεύει τους συνδέτες RANK στους προ-οστεοκλάστες και επάγει την παραγωγή ώριμων οστεοκλαστών από ανώριμα μονοκύτταρα (Holick, 2008; Holick et al., 2011; Aw,

2013). Με τη διαδικασία οστικής απορρόφησης που επιτελείται από τους οστεοκλάστες απελευθερώνει στο αίμα ασβέστιο και φωσφορικά άλατα, για να αποκατασταθεί η φυσιολογική συγκέντρωσή τους στο αίμα (Holick, 2008; Gropper, 2008).

Όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου αυξηθεί πέραν των φυσιολογικών συγκεντρώσεων, παράγεται μια πολυπεπτιδική ορμόνη που αντισταθμίζει τη δράση της παραθυρεοειδούς και μειώνει την παραγωγή της, η καλσιτονίνη. Αυτή αναστέλλει τους οστεοκλάστες, προωθεί την επιμετάλλωση των οστών με ασβέστιο και φώσφορο, ενώ αυξάνει και την απέκκρισή τους από τα ούρα (Gropper, 2008; Damjanov, 2009).

1.10 Επαρκείς προσλήψεις

Οι τιμές EARs, RDAs, και AIs για τη βιταμίνη D φαίνονται στον πίνακα 2 για κάθε στάδιο ζωής.

Κατά τον καθορισμό των τιμών αυτών, λαμβάνεται υπόψη η ικανότητα του οργανισμού να συνθέτει φυσιολογικά τη βιταμίνη μέσω έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, αλλά πρέπει να συνυπολογιστούν εξίσου πληθώρα άλλων παραγόντων, όπως οι συστάσεις δημόσιας υγείας περί της ανάγκης περιορισμού της έκθεσης στον ήλιο, προς αποφυγή καρκινογένεσης.

Οι τιμές DRI για τη βιταμίνη D έχουν καθιερωθεί ως οι τιμές EAR και RDA για όλα τα στάδια ζωής, εκτός από τα βρέφη έως 12 μηνών, για τα οποία καθορίστηκε μια τιμή AI. Αυτές οι τιμές αναφοράς υποθέτουν ελάχιστη έκθεση στον ήλιο. Οι μετρήσεις των επιπέδων 25(OH)D του ορού χρησιμεύουν ως μια αντανάκλαση της συνολικής έκθεσης του οργανισμού σε βιταμίνη D -από τα τρόφιμα, τα συμπληρώματα και την ενδογενή σύνθεση. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα 25(OH)D ορού δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα για να αξιολογηθούν με βάση αυτά εκβάσεις υγείας, επέτρεψαν τη σύγκριση της πρόσληψης ή της έκθεσης με αυτές.

Νεότερα δεδομένα επέτρεψαν την προσομοίωση της απαιτούμενης κατανομής με βάση τις συγκεντρώσεις 25(OH)D στον ορό. Η επιδιωκόμενη συγκέντρωση είναι 40 nmol/L (16 ng/mL) για τη μέση τιμή του πληθυσμού, δηλαδή ικανοποιεί τις ανάγκες περίπου του μισού πληθυσμού. Επιπλέον, όφελος για τους περισσότερους στον πληθυσμό σχετίζεται με επίπεδα βιταμίνης D στον ορό περίπου 50 nmol/L (20 ng/mL), καθιστώντας αυτό το επίπεδο μια τιμή που καλύπτει σχεδόν το σύνολο του πληθυσμού. Τα διαθέσιμα στοιχεία χρησιμοποιήθηκαν για να συνδεθούν συγκεκριμένα επίπεδα 25(OH)D στον ορό με τη συνολική πρόσληψη βιταμίνης D υπό ελάχιστη έκθεση στον ήλιο, με σκοπό την εκτίμηση του DRI. Για τα παιδιά και τους εφήβους 1 έως 18 ετών, οι τιμές EAR και RDA προσδιορίζονται βάσει των συγκεντρώσεων 25(OH)D στον ορό στα 40 και 50 nmol/L (16 και 20 ng/mL), αντίστοιχα.

Ομοίως, αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για τους νέους ενήλικες και τους ενήλικες από 19 έως 50 ετών και υποστηρίχθηκε από στοιχεία σχετικά με την παρουσία οστεομαλακίας. Η τιμή EAR για άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών είναι ίδια με εκείνη των νεότερων ενηλίκων, προτείνοντας πως δεν υπάρχει κάποια αλλαγή λόγω επίδρασης της ηλικίας. Ωστόσο, υπάρχει αξιοσημείωτη μεταβλητότητα γύρω από αυτές τις εκτιμήσεις στην περίπτωση των ατόμων μεγαλύτερης ηλικίας, λόγω της ευθραυστότητας των οστών τους. Αυτό υποδηλώνει ότι η διακύμανση που σχετίζεται με την κάλυψη του 97,5% του πληθυσμού θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη για αυτή την ομάδα. Ως εκ τούτου, η τιμή RDA για άτομα ηλικίας άνω των 70 ετών αυξήθηκε σε επίπεδο μεγαλύτερο από δύο τυπικές αποκλίσεις, όπως υπολογίζεται το RDA για τις άλλες ομάδες.

Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για τον υπολογισμό των τιμών αυτών περιλαμβάνουν αλλαγές στην οστική πυκνότητα και τον κίνδυνο κατάγματος. Για τα βρέφη, η τιμή AI καθορίστηκε με βάση την απόδειξη ότι η διατήρηση των επιπέδων 25(OH)D στον ορό μεταξύ 40 και 50 nmol/L (16 έως 20 ng/mL) ήταν επιθυμητή, σε συνδυασμό με δεδομένα από μελέτες παρατήρησης που υποδηλώνουν ότι 400 Διεθνείς Μονάδες (IU) βιταμίνης (10 μg) ανά ημέρα ήταν αρκετή ποσότητα για να διατηρηθεί αυτό το επίπεδο. Ο προσδιορισμός των τιμών UL για τη βιταμίνη D ήταν ιδιαίτερα δύσκολος, επειδή τα διαθέσιμα στοιχεία θέλουν τα πολύ υψηλά επίπεδα πρόσληψης να προκαλούν δηλητηρίαση, ενώ λίγα δεδομένα είναι γνωστά σχετικά με τις επιπτώσεις μιας χρόνιας υπερβολικής πρόσληψης σε χαμηλότερα επίπεδα. Η επιτροπή εξέτασε τα υπάρχοντα δεδομένα και ακολούθησε μια προσέγγιση που θα μεγιστοποιούσε την προστασία της δημόσιας υγείας. Η παρατήρηση ότι η λήψη ποσότητας 10.000 IU (250 μg) βιταμίνης D την ημέρα δεν συσχετίστηκε με την κλασική τοξικότητα, χρησίμευσε ως σημείο εκκίνησης για τον καθορισμό των τιμών UL των ενηλίκων, με κάποιες αλλαγές αφού έλαβαν υπόψη αναφορές για ανεπιθύμητες ενέργειες που προέκυψαν σε μικρότερες τιμές πρόσληψης. Η τιμή UL για τους ενήλικες χρησιμοποιείται και για την ηλικιακή ομάδα 9 έως 18 ετών, ενώ είναι μικρότερη για τα παιδιά 1 έως 8 ετών (Ross et al., 2011).

Πίνακας 2. Οι τιμές AI, EAR, RDA και UL για τη βιταμίνη D για κάθε στάδιο ζωής (Ross et al., 2011).

Στάδιο ζωής	Institute of Medicine				US Endocrine Society	
	AI	EAR	RDA	UL	RDA (IU/d)	UL (IU)
Βρέφη						
0-6 μηνών	400 IU (10 µg)	-	-	1.000 IU (25 µg)	400-1.000	2.000
6-12 μηνών	400 IU (10 µg)	-	-	1.500 IU (37,5 µg)	400-1.000	2.000
Παιδιά						
1-3 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	2.500 IU (62,5 µg)	600-1.000	4.000
4-8 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	3.000 IU (75 µg)	600-1.000	4.000
Άνδρες						
9-13 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	600-1.000	4.000
14-18 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	600-1.000	4.000
19-30 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
31-50 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
51-70 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
>70 ετών		400 IU (10 µg)	800 IU (20 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
Γυναίκες						
9-13 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	600-1.000	4.000
14-18 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	600-1.000	4.000
19-30 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
31-50 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
51-70 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
>70 ετών		400 IU (10 µg)	800 IU (20 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
Έγκυες						
14-18 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	600-1.000	4.000
19-30 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
31-50 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
Θηλάζουσες						
14-18 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	600-1.000	4.000
19-30 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000
31-50 ετών		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4.000 IU (100 µg)	1.500–2.000	10.000

Σημ.: AI= Adequate Intake, επαρκής πρόσληψη που καθορίζεται όταν δεν υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα για να υπολογιστεί EAR ή RDA; EAR= Estimated Average Requirement, μέση εκτιμώμενη απαίτηση που ικανοποιεί τις απαιτήσεις του 50% του υγιούς πληθυσμού για μια ηλικιακή ομάδα και φύλο; RDA= Recommended Dietary Allowance, συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη που συνιστά την μέση ημερήσια διαιτητική πρόσληψη που ικανοποιεί τις απαιτήσεις του 97,5% του υγιούς πληθυσμού για μια ηλικιακή ομάδα και φύλο; UL= Tolerable Upper Intake Level, ανώτερο επίπεδο ημερήσιας πρόσληψης μέχρι το οποίο είναι μάλλον απίθανο να δημιουργηθούν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του συνόλου των ατόμων του γενικότερου πληθυσμού.

1.11 Ορισμός υποβιταμίνωσης D

Ο καθορισμός των επιπέδων βιταμίνης D σε έναν πληθυσμό μπορεί να αποδειχθεί δύσκολο εγχείρημα. Ενώ η 1,25-(OH)₂-D₃ είναι η ενεργός μορφή με ορμονική δράση, πολλές δράσεις εκδηλώνονται λόγω των επιπέδων της χοληκαλσιφερόλης στην κυκλοφορία. Δεδομένα από έρευνες θέλουν αυτό να οφείλεται στην παρουσία του ενζύμου 1-α-υδροξυλάση σε πληθώρα ιστών, εκτός των νεφρών. Αυτό οδηγεί σε ενδοκυττάρια παραγωγή 1,25-(OH)₂-D₃, σε πολλούς ιστούς-στόχους, επομένως σε υψηλές ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις της και ποικίλες δράσεις σε κυτταρικό επίπεδο ή επίπεδο ιστών, πέραν της ομοιόστασης του ασβεστίου (Jones et al., 2007; Mithal et al., 2009).

Η 25(OH)D είναι η πλέον κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D, με χρόνο ημίσειας ζωής 2-3 εβδομάδες και αποτελεί τον καλύτερο δείκτη της κατάστασης της βιταμίνης στον οργανισμό (Holick et al., 2011; Aw, 2013). Ο αντίστοιχος χρόνος για την ενεργό μορφή της βιταμίνης, την 1,25-(OH)₂-D₃, είναι περίπου 4 ώρες. Κυκλοφορεί σε τουλάχιστον 1000 φορές μικρότερη συγκέντρωση από την χοληκαλσιφερόλη και η τιμή της στο αίμα ρυθμίζεται στενά από τα επίπεδα της PTH, του ασβεστίου και του φωσφόρου στον ορό αλλά όχι από τα επίπεδα πρόσληψης βιταμίνης D (Holick et al., 2011; Aw, 2013). Ακόμη, επηρεάζεται και από τη λήψη ορισμένων φαρμάκων, όπως διφωσφονικά, ηπαρίνη, κετοконаζόλη, και στεροειδή (Aw, 2013). Επομένως, δεν αντικατοπτρίζει τα επίπεδα αποθηκών της βιταμίνης στον οργανισμό και η μέτρηση αυτής δεν είναι κλινικά χρήσιμη, αφού τα επίπεδά της μπορεί να κυμαίνονται σε φυσιολογικές τιμές ή ακόμη να είναι και αυξημένα σε άτομα με υποβιταμίνωση D, λόγω του δευτερογενούς υπερπαραθυρεοειδισμού (Holick et al., 2011; Aw, 2013). Επίσης, σε περίπτωση ανεπάρκειας βιταμίνης D η μείωση της 1,25-(OH)₂-D₃ καθυστερεί να εκδηλωθεί στον ορό του αίματος, καθιστώντας δύσκολο τον άμεσο εντοπισμό της ανεπάρκειας (Aw, 2013).

Η Επιτροπή του Ινστιτούτου Ιατρικής, το 2011, κατέληξε πως η 25(OH)D είναι ο καλύτερος δείκτης που αντανakλά την κατάσταση της βιταμίνης D στον οργανισμό, που προέρχεται τόσο από την ενδογενή σύνθεση λόγω έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, δηλαδή την D₃ μορφή, όσο και τη διαιτητική πρόσληψη από τρόφιμα και εμπλουτισμένα προϊόντα, δηλαδή την D₂ και D₃ μορφή και άλλους παράγοντες (Ross, 2011; Aw, 2013).

Στην κλινική πράξη η μέτρηση της καλσιτριόλης χρησιμοποιείται μόνο όταν υπάρχουν γνωστές επίκτητες ή κληρονομικές διαταραχές στο μεταβολισμό της χοληκαλσιφερόλης και του φωσφόρου. Τέτοιες καταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν τη χρόνια νεφρική νόσο, κληρονομικές διαταραχές απώλειας φωσφόρου, ογκογόνο οστεομαλακία, ραχίτιδα από ψευδοϋποβιταμίνωση D, ραχίτιδα

ανθεκτική στην βιταμίνη D, χρόνιες παθήσεις που σχηματίζουν κοκκιώματα, όπως σαρκοείδωση και ορισμένα λεμφώματα (Holick et al., 2011).

Σε παλαιότερες μελέτες παρατήρησης μετρήθηκαν τα επίπεδα χοληκαλσιφερόλης στον ορό υγιών πληθυσμών, με σκοπό τον καθορισμό των τιμών αναφοράς για επαρκή επίπεδα βιταμίνης D. Αυτά όμως επηρεάζονται από τον τρόπο ζωής και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, συνεπώς ίσως να μην μπορεί να εφαρμοσθούν κλινικά ή σε παγκόσμιο επίπεδο. Ως εκ τούτου, προτιμάται να καθορίζονται τα επίπεδα επάρκειας της βιταμίνης στο αίμα με γνώμονα τις επιπτώσεις που έχει η ανεπάρκεια για την υγεία και όχι τις μέσες τιμές που ανευρίσκονται στον πληθυσμό. Κριτήρια, λοιπόν, συνιστούν τα επίπεδα που σχετίζονται με τη βέλτιστη καταστολή των κυκλοφορούντων επιπέδων PTH, τη βέλτιστη απορρόφηση ασβεστίου, την υψηλότερη οστική πυκνότητα (BMD), καθώς και τα χαμηλότερα ποσοστά οστικής απώλειας, πτώσεων, ή καταγμάτων (Mithal et al., 2009).

Ως υποβιταμίνωση D ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία ο προς εξέταση πληθυσμός έχει έλλειψη ή ανεπάρκεια βιταμίνης D, η οποία συνδέεται άμεσα με κλινικές εκδηλώσεις στα άτομα (Mithal et al., 2009).

Η Αμερικανική Ενδοκρινολογική Εταιρεία όρισε την έλλειψη βιταμίνης D ως την τιμή της 25(OH)D κάτω από 20 ng/mL (50 nmol/L) στον ορό του αίματος. Εφόσον η αποτελεσματικότητα της εντερικής απορρόφησης ασβεστίου αυξάνεται ως και 65% όταν γυναίκες με οστεοπόρωση αυξάνουν τα επίπεδα 25(OH)D άνω των 30 ng/mL (75 nmol/L), μαζί με το γεγονός ότι η παραθυρεοειδής ορμόνη οδεύει προς τα κατώτερα όρια όταν η τιμή της βιταμίνης D είναι μεταξύ 30 και 40 ng/mL, οι περισσότεροι ειδικοί συμφωνούν ότι τιμές άνω των 30ng/mL αντιπροσωπεύουν την επάρκεια. Επιπλέον, και τα λοιπά οφέλη για την σκελετική υγεία προκύπτουν σε επίπεδα αίματος άνω των 30 ng/mL (75 nmol/L), όπου ορίσθηκε η επάρκεια. Επομένως, η ανεπάρκεια ορίστηκε για τις τιμές 25(OH)D μεταξύ 21–29 ng/mL (52,5–72,5 nmol/L) (Holick, 2008 Holick et al., 2011; Wacker and Holick, 2013).

Από την άλλη, η Επιτροπή του Ινστιτούτου Ιατρικής θέσπισε τα όρια που αφορούν την επάρκεια της βιταμίνης D λαμβάνοντας υπόψη τις διαιτητικές τιμές πρόσληψης αναφοράς για τη βιταμίνη D. Έτσι, τιμές άνω των 20 ng/mL (50 nmol/L) καλύπτουν τις ανάγκες του 97,5% του πληθυσμού και ορίζονται ως επάρκεια, κάτω από 16 ng/mL χαρακτηρίζονται ως αυξημένος κίνδυνος ανεπάρκειας και κάτω από 12 ng/mL αυξημένος κίνδυνος έλλειψης (Aloia, 2011; Spiro and Buttriss, 2014).

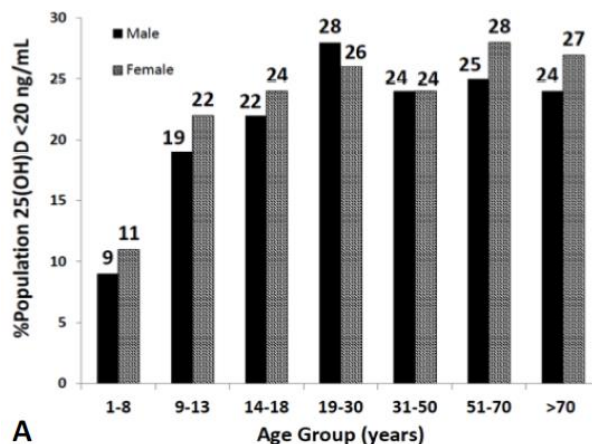
Πίνακας 3. Κατωφλικές τιμές επιπέδων 25(OH)D στον ορό του αίματος (Aloia, 2011; Aw, 2013).

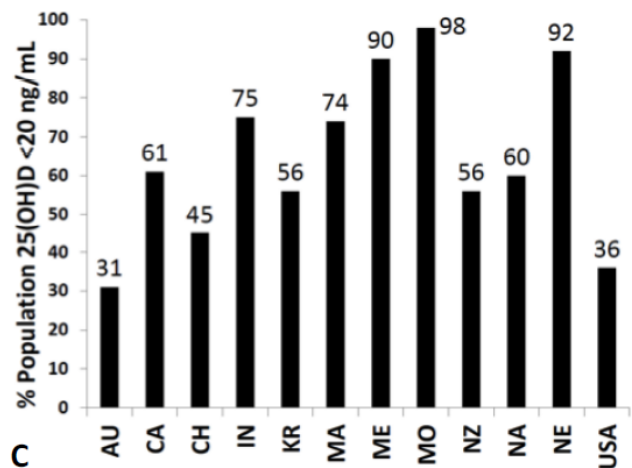
Κατάσταση	25 OH D ορού			
	Institute of Medicine		U.S. Endocrine Society	
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL
Έλλειψη	<30	<12	<50	<20
Ανεπάρκεια	<40	<16	51-74	21-29
Επάρκεια	>50	>20	>75	>30
Τοξικότητα	>125	>50	>250	>100

Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα συνηγορούν ότι τιμές άνω των 20 ng/mL (50 nmol/L) καλύπτουν τις ανάγκες του 97,5 % του πληθυσμού, οι μέσες ανάγκες υπολογίζονται στα 40 nmol/L, ενώ το κατώτερο όριο είναι τα 30 nmol/L, από όπου ξεκινούν τα συμπτώματα της ανεπάρκειας στα οστά ανάλογα και με λοιπούς παράγοντες κινδύνου (Ross, 2011). Τοξικότητα από βιταμίνη D συνήθως δεν προκαλείται μέχρι η τιμή της να ξεπεράσει τα 150 ng/mL στον ορό (Wacker and Holick, 2013).

1.12 Επιπολασμός ανεπάρκειας βιταμίνης D

Με βάση τους παραπάνω ορισμούς για την υποβιταμίνωση D υπολογίζεται ότι ένα δις άνθρωποι παγκοσμίως έχουν ανεπάρκεια ή έλλειψη αυτής (Holick, 2008; Wacker, 2013).





Εικόνα 10. Α. Επιπολασμός του κινδύνου έλλειψης βιταμίνης D (<12-20 ng/mL) κατά φύλο και ηλικία στις Η.Π.Α., 2001-2006. C. Επίπτωση της έλλειψης βιταμίνης D(<20 ng/mL) στις εξής χώρες: Αυστραλία, Καναδάς, Κίνα, Ινδία, Κορέα, Μαλαισία, Μέση Ανατολή, Μογγολία, Νέα Ζηλανδία, Βόρειος Αφρική, Βόρεια Ευρώπη, Η.Π.Α. (Wacker, 2013).

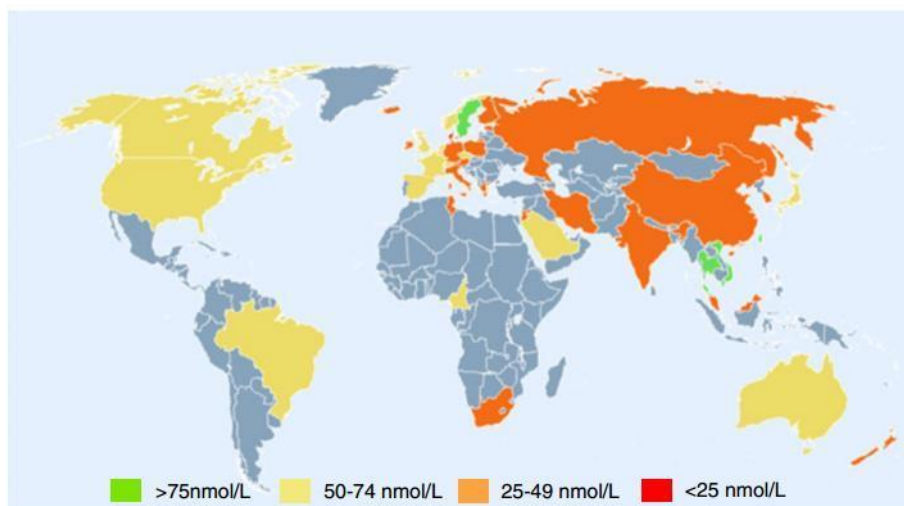


Fig. 2 Vitamin D status in adults (>18 years) around the world when available; winter values were used to calculate the mean 25(OH)D levels

Εικόνα 11. Επιπολασμός επιπέδων βιταμίνης D σε ενήλικες (>18 ετών) ανά τον κόσμο, κατά τους χειμερινούς μήνες.

Μια πολυκεντρική μελέτη που διεξήχθη σε 18 χώρες της Νότιας Αμερικής, της Ευρώπης, της Ασίας και της Αυστραλίας, έδειξε πως συνολικά 64% των γυναικών είχαν τιμές βιταμίνης D στον ορό <30ng/mL, έπασχαν δηλαδή από ανεπάρκεια (Lips, 2007).

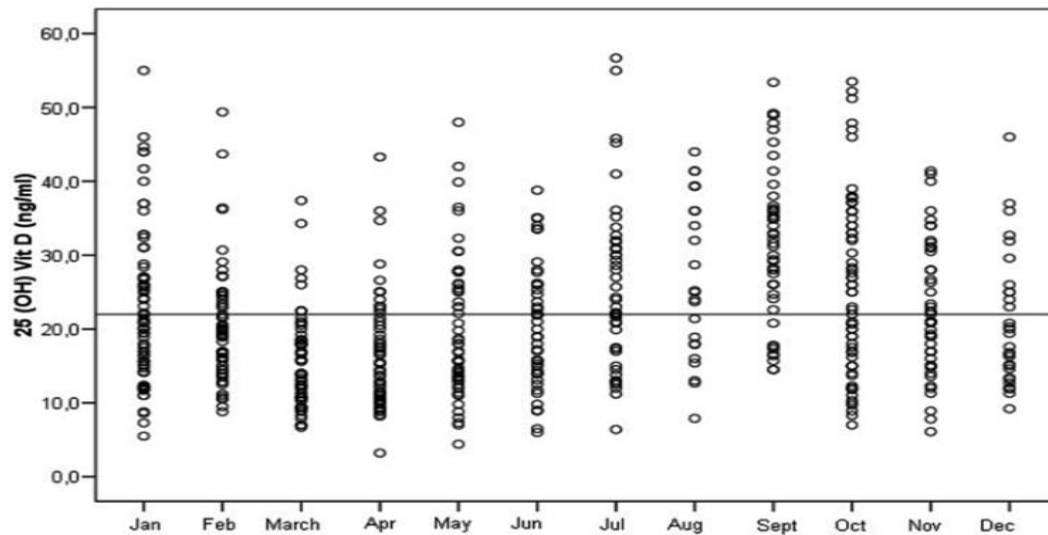
Σε άλλη μελέτη που διεξήχθη στη Βοστώνη, 36% φαινομενικά υγιών νέων ενηλίκων, ηλικίας 18 έως 29 ετών, είχαν επίπεδα ορού 25(OH)D κατώτερα από 20ng/mL στο τέλος του χειμώνα, παρά το γεγονός ότι λάμβαναν συχνά πολυβιταμινούχα σκευάσματα, και κατανάλωναν τουλάχιστον ένα ποτήρι γάλατος εμπλουτισμένο με βιταμίνη D την ημέρα και μια φορά την εβδομάδα ψάρι (Tangpricha et al., 2002).

Σε έρευνα με δείγμα υγιείς ενήλικες Ελβετούς, βρέθηκε υψηλός επιπολασμός της ανεπάρκειας ή έλλειψης βιταμίνης D εξαρτώμενος από την περίοδο του έτους, τις κατηγορίες ΔΜΣ, και τις 3 περιοχές της χώρας - γερμανόφωνη, γαλλόφωνη, ιταλόφωνη. Ο επιπολασμός της ανεπάρκειας ή έλλειψης της βιταμίνης D ήταν 74,7 % στον γενικό πληθυσμό και 76,0 % μεταξύ των συμμετεχόντων που δεν λάμβαναν συμπλήρωμα βιταμίνης D ή θεραπεία για την ανεπάρκεια. Το 39,5 % των συμμετεχόντων που δεν λάμβαναν συμπλήρωμα ή θεραπεία (95,9% του συνολικού δείγματος) βιταμίνης D παρουσίασε ένα επίπεδο βιταμίνης D < 20 ng/mL (50 nmol/L), δηλαδή έλλειψη βιταμίνης D. Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες του δείγματος είχαν ανεπάρκεια σε ποσοστό 34,6%, έλλειψη σε ποσοστό 35,4%, ενώ μόλις το 29,9% είχαν επάρκεια (Guessous et al., 2012).

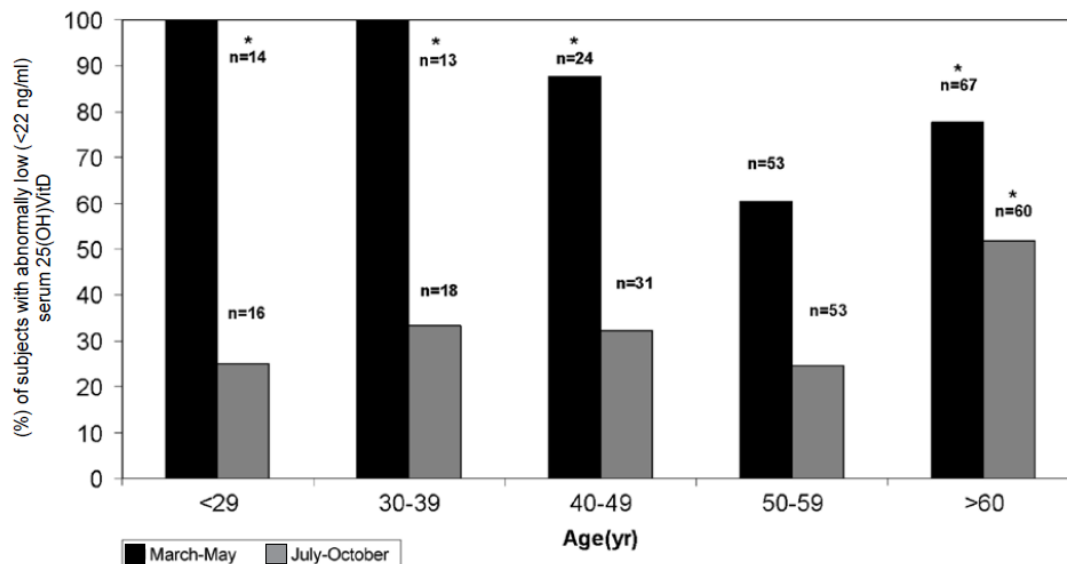
Από την άλλη, ενήλικες κάτοικοι του Λουξεμβούργου είχαν –ανεξαρτήτως φύλου- επάρκεια σε ποσοστό μόλις 17,1% (>30 ng/mL), ενώ 27,1%, 40,4% και 15,5% είχαν μη επαρκή (20-29,9 ng/mL), ανεπαρκή (10-19,9 ng/mL) και ελλιπή (<10 ng/mL) επίπεδα βιταμίνης D, αντίστοιχα (Alkerwi et al., 2015).

Σε πρόσφατη έρευνα, διαπιστώθηκε πως υγιείς Γερμανίδες ηλικίας 18-44 ετών είχαν σε ποσοστό 26,6% επίπεδα βιταμίνης μεταξύ 20 και 30 ng/mL ορού, δηλαδή ανεπάρκεια (Rabenberg et al., 2015).

Όσον αφορά την ελληνική πραγματικότητα, υπάρχουν λίγα δεδομένα για τον επιπολασμό της υποβιταμίνωσης D σε υγιείς γυναίκες. Ωστόσο, σε έρευνα που διεξήχθη στην Αθήνα με δείγμα 625 φαινομενικά υγιή άτομα, εκ των οποίων 553 ήταν γυναίκες φάνηκε ότι το 57,7% του πληθυσμού είχε τιμές <22ng/mL (55nmol/L), καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, ενώ οι χαμηλότερες τιμές βρέθηκαν σε όλες τις ηλικιακές ομάδες μετά το τέλος του χειμώνα από Μάρτιο έως Μάιο (εικόνες 12, 13) (Singhellakis et al., 2011).



Εικόνα 12. Επίπεδα βιταμίνης D σε υγιείς Αθηναίους ενήλικες, άνδρες και γυναίκες, για κάθε μήνα του έτους. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις τιμές ανάμεσα στους μήνες (χαμηλότερες Μάρτιο-Μάιο, υψηλότερες Ιούλιο-Οκτώβριο). Τιμές < 22ng/mL παρατηρήθηκαν σε 361/625 άτομα (57,7%) καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Singhellakis et al., 2011).



Εικόνα 13. Ποσοστό Αθηναίων με τιμές βιταμίνης D < 22ng/mL στις 5 ηλικιακές ομάδες κατά τις περιόδους χαμηλότερων (Μάρτιος-Μάιος) και υψηλότερων (Ιούλιος-Οκτώβριος) μετρήσεων (n=αριθμός ατόμων σε κάθε ηλικιακή ομάδα σε κάθε περίοδο, *=στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά ατόμων με χαμηλές τιμές βιταμίνης στον ορό του αίματος) (Singhellakis et al., 2011).

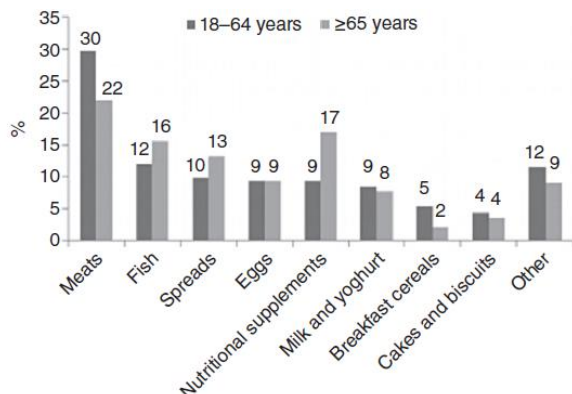
Περισσότερο έχει μελετηθεί η υποβιταμίνωση D σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όπου διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των γυναικών που είχαν ανεπάρκεια (δηλ $25(\text{OH})\text{D} < 20 \text{ ng/mL}$) άγγιζε το 60% κατά τους χειμερινούς μήνες, από Δεκέμβρη ως Μάρτη (Manios et al., 2011; Manios et al., 2014).

1.13 Πρόσληψη βιταμίνης

Οι μέσες προσλήψεις βιταμίνης D στις Ευρωπαϊκές χώρες ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και τις συνήθειες λήψης συμπληρωμάτων. Επιπλέον, η ακριβής σύγκριση της πρόσληψης βιταμίνης D ανάμεσα στις ευρωπαϊκές χώρες παρεμποδίζεται από διαφορές στις μεθοδολογίες των εκάστοτε μελετών, στις διατροφικές τεχνικές αξιολόγησης, στις ηλικιακές ομάδες αλλά και τους περιορισμούς των πινάκων σύνθεσης τροφίμων. Παρά το γεγονός ότι γίνονται προσπάθειες να εναρμονισθούν οι μεθοδολογίες της έρευνας στην Ευρώπη, οι τρέχουσες συγκρίσεις εξαρτώνται από τις υπάρχουσες πληροφορίες. Παρόλα αυτά, σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, και σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, υπάρχει μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ της μέσης πρόσληψης και των διατροφικών συστάσεων. Οι Ευρωπαϊκές χώρες χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές για την αύξηση της πρόσληψης βιταμίνης D, ιδιαίτερα σε ευπαθείς ομάδες. Στις Σκανδιναβικές χώρες μαζί με τη σχετικά υψηλή κατανάλωση λιπαρών ψαριών, έχουν καθιερωθεί τόσο πολιτικές εμπλουτισμού τροφίμων όσο και χορήγησης συμπληρωμάτων. Αντίθετα, στη Γερμανία η έμφαση δίνεται στην ενθάρρυνση περισσότερων υπαίθριων δραστηριοτήτων με σκοπό την έκθεση στον ήλιο. Στην Τουρκία υπάρχει ένα πρόγραμμα ενίσχυσης της πρόσληψης βιταμίνης D των βρεφών, όμως άλλες χώρες της Νότιας Ευρώπης, όπως η Ισπανία και η Ιταλία, δεν έχουν καμία επίσημη πολιτική για τον εμπλουτισμό ή τα συμπληρώματα (Spiri and Buttriss, 2014).

Οι προσλήψεις των Ευρωπαίων, εκτός των συμπληρωμάτων, εξετάσθηκαν στη μελέτη EPIC (Ευρωπαϊκή Προοπτική Μελέτη για τον Καρκίνο και τη Διατροφή), χρησιμοποιώντας μια ενιαία, τυποποιημένη 24ωρη διαιτητική ανάκληση και μια τυποποιημένη βάση δεδομένων για θρεπτικά συστατικά. Η μελέτη έγινε σε ενήλικες, 35-74 ετών, από 10 χώρες: Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία, Γερμανία, Ολλανδία, Ηνωμένο Βασίλειο, Δανία, Σουηδία και Νορβηγία. Για όλες τις χώρες μαζί, η μέση ημερήσια πρόσληψη βιταμίνης D βρέθηκε 4,8 $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ για τους άνδρες και 3,3 $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ για τις γυναίκες, με σημαντικές διαφορές μεταξύ των χωρών, ενώ για την Ελλάδα ήταν 96,3 $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ και 99,6 $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ αντίστοιχα. Για παράδειγμα στη Σουηδία, οι συμμετέχοντες αναφέρουν πρόσληψη περίπου 80% μεγαλύτερη από τη μέση (Freisling et al., 2010). Σε μια έκθεση της EFSA βρέθηκε, επίσης, σημαντική μεταβλητότητα στην μέση πρόσληψη 14 ευρωπαϊκών χωρών. Η μέση διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης D μόνο από την τροφή

κυμαινόταν από 1,1 μg/ημέρα (Ισπανία, γυναίκες 18-64 ετών) έως 8,2 μg/ημέρα (Φινλανδία, άνδρες 25-74 ετών) (Spiro and Buttriss, 2014).



Εικόνα 14. Συμβολή των διαιτητικών πηγών στην πρόσληψη βιταμίνης D σε Ιρλανδούς ενήλικες (Spiro and Buttriss, 2014).

Στο πλαίσιο του χρηματοδοτούμενου από την ΕΕ προγράμματος EURopean micronutrient RECommendations Aligned Network of Excellence (EURRECA), συγκεντρώθηκαν διατροφικά στοιχεία τόσο από την Ευρωπαϊκή Έκθεση για τη Διατροφή και την Υγεία II όσο και από το Διεθνές Ινστιτούτο Επιστημών ζωής (ILSI), όπου χρησιμοποιώντας ως σύσταση την αναμενόμενη μέση απαίτηση (EAR) για τη βιταμίνη D των 10 μg/ημέρα, όπως ορίστηκε από το IOM, εκτίμησαν τον επιπολασμό για την επαρκή πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών. Η μέση ημερήσια πρόσληψη της βιταμίνης D ήταν χαμηλή στην Ισπανία (<2 μg/ημέρα), μεταξύ 3 και 4 μg/ημέρα στις περισσότερες άλλες χώρες και υψηλότερη στη Σουηδία, τη Φινλανδία και τη Νορβηγία (Spiro and Buttriss, 2014).

Από μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό φάνηκε ότι και στα δύο φύλα και σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, το ποσοστό των συμμετεχόντων που συνήθιζαν να έχουν διαιτητική πρόσληψη κάτω του EAR άγγιζε το 100% (Manios et al., 2014).

1.14 Βιταμίνη D και νόσος

Τα νεότερα ερευνητικά δεδομένα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δείχνουν πως σχεδόν κάθε ιστός και κάθε κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού διαθέτει υποδοχέα για τη βιταμίνη D, τον VDR. Με τον τρόπο αυτό, άμεσα ή έμμεσα, η βιταμίνη ελέγχει την έκφραση περισσότερων από 200 γονιδίων. Επιπροσθέτως, πολλοί ιστοί και κύτταρα διαθέτουν το ένζυμο ενεργοποίησης της βιταμίνης D, την 1-α-υδροξυλάση ή CYP27B1, εκτός από τους νεφρούς. Έχει προταθεί ότι η αύξηση των επιπέδων στο αίμα της 25(OH)D άνω των 30ng/mL, παρέχει αρκετό υπόστρωμα στους περισσότερους ιστούς και κύτταρα στο σώμα, ώστε να επιτρέπει την τοπική παραγωγή της 1,25-(OH)₂-D₃. Η έκφραση του ενζύμου έχει τεκμηριωθεί καλά στο ανθρώπινο δέρμα, στο παχύ έντερο, στον προστάτη και τα ενεργοποιημένα

μακροφάγα, μεταξύ άλλων ιστών και κυττάρων. Έχει επίσης αποδειχθεί *in vitro* ότι καλλιεργημένα φυσιολογικά και κακοήγη κύτταρα μαστού, παχέος εντέρου και προστάτη, μεταβολίζουν την 25(OH)D₃ προς 1,25-(OH)₂-D₃. Έχει προταθεί ότι η τοπική παραγωγή της 1,25-(OH)₂-D₃, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά συνιστά και ανοσορρυθμιστή, είναι υπεύθυνη για πολλά από τα οφέλη υγείας που αποδίδονται στην κατάσταση επάρκειας της βιταμίνης στον οργανισμό.

Καρκίνος

Ήδη από το 1941 ο Apperly ισχυρίστηκε πως η διαβίωση σε περιοχές υψηλότερου γεωγραφικού πλάτους, όπου η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και επομένως η σύνθεση της βιταμίνης D είναι χαμηλότερη, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πολλών τύπων καρκίνου, αλλά και αυξημένη πιθανότητα θανάτου από αυτούς, σε σύγκριση με τη διαβίωση σε χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη (Apperly, 1941). Αργότερα, ακολούθησαν κι άλλες επιδημιολογικές μελέτες που οδηγούσαν στα ίδια συμπεράσματα (Hanchette, 1992; Wacker and Holick, 2013). Μια πρόσφατη ανασκόπηση οικολογικών μελετών διερεύνησε τη συσχέτιση της προερχόμενης από την έκθεση στην UVB ηλιακή ακτινοβολία βιταμίνης D με διάφορους τύπους καρκίνων, όπου διαπιστώθηκε ισχυρά αντίστροφη συσχέτισή τους για 15 τύπους καρκίνου: ουροδόχου κύστης, μαστού, τραχήλου της μήτρας, παχέος εντέρου, ενδομητρίου, οισοφάγου, στομάχου, πνεύμονα, ωοθηκών, παγκρέατος, ορθού, νεφρών, αιδοίου, μη-Hodgkin και Hodgkin λεμφώματος (Grant, 2012).

Αναφορικά με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, η μελέτη κοορτής Nurses' Health study (n = 32.826) έδειξε μια αντίστροφη συσχέτιση των σχετικών λόγων για τον καρκίνο του παχέος εντέρου με τις μέσες τιμές 25(OH)D στον ορό. Στα 16,2 ng/mL ο σχετικός λόγος ήταν 1 και 0,53 στα 39,9 ng/mL ($p \leq 0,01$), που σημαίνει ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα βιταμίνης στο αίμα δρουν προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου (Feskanich et al., 2004). Από την άλλη, σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη, την Women's Health Initiative, (n=36.282 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες), οι γυναίκες που λάμβαναν συμπληρωματικά 1000 mg ασβεστίου και 400 IU βιταμίνης D₃/ημέρα δεν είχαν σημαντική διαφορά στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, γεγονός όμως που αποδόθηκε εν μέρει στη μη συμμόρφωσή τους στο πρωτόκολλο (Cauley et al., 2013). Ωστόσο, μια διπλά- τυφλή, τυχαιοποιημένη δοκιμή σε περισσότερες από χίλιες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, με χορήγηση εικονικού και μη φαρμάκου, που είχε διάρκεια πέντε έτη και κύρια δευτερεύουσα έκβαση τον καρκίνο, κατέληξε ότι η συμπληρωματική λήψη ασβεστίου (1400-1500 mg/ημέρα) και βιταμίνης D₃ (1100 IU/ημέρα) μείωσε το σχετικό κίνδυνο (RR) ανάπτυξης καρκίνου κατά περίπου 60% ($p < 0,01$). Όταν εξαιρέσαν από τις

αναλύσεις έναν αριθμό γυναικών που είχαν ήδη αρχικά στάδια καρκίνου στην έναρξη της μελέτης, ο κίνδυνος μειώθηκε κατά 77% (Lappe et al., 2007). Ο μεθοδολογικός περιορισμός σε τέτοιες μελέτες που προσπαθούν να διατυπώσουν αιτιολογική σχέση μεταξύ της κατάστασης της βιταμίνης D και του μειωμένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, είναι ότι τα χαμηλά επίπεδά της στον ορό σχετίζονται και με άλλους παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας και της έλλειψης σωματικής δραστηριότητας (Wacker, 2013).

Υπάρχουν συσσωρευόμενα δεδομένα που υποστηρίζουν τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες που φαίνεται να έχει η βιταμίνη D. Η ενεργός μορφή της μπορεί να παραχθεί τοπικά από καρκινικά κύτταρα, μεταβολίζοντας την 25(OH)D και να αναστείλει την καρκινογένεση με πληθώρα μηχανισμών. Αρχικά, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενεργοποιώντας τη σύνθεση του αναστολέα της κυκλοεξαντρώμενης κινάσης CDK αλλά και διαφόρων παραγόντων αύξησης όπως του ινσουλινομιμητικού παράγοντα αύξησης (insulin-like growth factor 1, IGF-1) κ.ά. Ακόμη, πιθανώς επιδρά προωθώντας διάφορους προ-αποπτωτικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της προς τα κάτω ρύθμισης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 και της προς τα άνω ρύθμισης του προ-αποπτωτικού γονιδίου Bax. Η ενεργός μορφή της βιταμίνης διεγείρει την κυτταρική διαφοροποίηση, εν μέρει μέσω της μείωσης της έκφρασης του ογκογονιδίου c-myc. Επιπλέον, ρυθμίζει το μεταβολισμό και τη σηματοδότηση της προσταγλανδίνης (PG), μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την μεσολαβούμενη από αυτήν επαγωγή της καρκινογένεσης. Καταστέλλει παράλληλα την αγγειογένεση του όγκου, τόσο μέσω ρύθμισης της σύνθεσης PG όσο και με τη ρύθμιση της έκφρασης κρίσιμων παραγόντων που ελέγχουν την αγγειογένεση. Η ενεργός μορφή μπορεί ακόμη να καταστέλλει τις μεταστάσεις όγκων με ποικίλους μηχανισμούς, να επάγει την αυτοφαγία, προκαλώντας έτσι το θάνατο των καρκινικών κυττάρων και να εμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. Ειδικά όσον αφορά όγκους εξαρτώμενους από ορμόνες του φύλου, η 1,25-(OH)₂-D₃ ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων ανδρογόνων και οιστρογόνων, εμποδίζει την ανάπτυξη καρκίνων όπως του στήθους και του προστάτη (Wacker, 2013).

Καρδιαγγειακά CVD

Οι περισσότερες επιδημιολογικές και προοπτικές μελέτες, καθώς και μετα-αναλύσεις δείχνουν μια σημαντική αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό και του καρδιαγγειακού κινδύνου. Αποτελέσματα από μελέτη 1.739 συμμετεχόντων το επιβεβαιώνουν. Οι συμμετέχοντες της έρευνας Framingham Offspring δεν έπασχαν από κάποια καρδιαγγειακή πάθηση και μελετήθηκαν προοπτικά. Η μέση συγκέντρωση 25(OH)D του δείγματος ήταν 19,7 ng/mL. Ο επιπολασμός της 25(OH)D <15 ng/mL ήταν 28%, με το 9% να έχει 25(OH)D <10 ng/mL. Με ανώτατο όριο τα 7,6 χρόνια

παρακολούθησης (μέσος όρος 5,4 χρόνια), 120 συμμετέχοντες (57 γυναίκες) ανέπτυξαν ένα πρώτο καρδιαγγειακό συμβάν. Στα συμβάντα περιλαμβάνονται 65 θανατηφόρες ή μη εκβάσεις στεφανιαίας νόσου (έμφραγμα του μυοκαρδίου, στηθάγχη, ή στεφανιαία ανεπάρκεια), 28 θανατηφόρα ή μη αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (εγκεφαλικό επεισόδιο ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο), 8 περιστατικά χωλότητας και 19 περιστατικά καρδιακής ανεπάρκειας. Κανένα από τα εγκεφαλικά επεισόδια δεν ήταν αιμορραγικό. Η 5ετής επίπτωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων, προσαρμοσμένη για την ηλικία και το φύλο, ήταν περίπου διπλάσια σε εκείνους με $25(\text{OH})\text{D} < 15 \text{ ng/mL}$ σε σχέση με όσους είχαν τιμές $25(\text{OH})\text{D} > 15 \text{ ng/mL}$. Το υψηλότερο ποσοστό καρδιαγγειακών συμβαμάτων παρατηρήθηκε σε εκείνους που έπασχαν από υπέρταση και έλλειψη βιταμίνης D (Wang et al., 2008). Σε μετα-ανάλυση που εξεταζόταν η σχέση μεταξύ της κατάστασης της βιταμίνης D στον οργανισμό και ο κίνδυνος εγκεφαλικού επεισοδίου, αυτός ήταν κατά 52% υψηλότερος στα επίπεδα $25(\text{OH})\text{D} \leq 12.4 \text{ ng/mL}$ σε σχέση με τα επίπεδα $25(\text{OH})\text{D} > 18.8 \text{ ng/mL}$ (Sun et al., 2012). Από την άλλη, μελέτες σχετικά με την επίδραση της ανεπάρκειας βιταμίνης D στο λιπιδαιμικό προφίλ δεν έχουν καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα (Norman, 2014).

Γονίδια, των οποίων η έκφραση ελέγχεται από τον υποδοχέα της βιταμίνης D, εμπλέκονται σε ρυθμιστικές διαδικασίες με δυνητική σημασία για την ανάπτυξη CVD, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, της απόπτωσης, του οξειδωτικού στρες, της διαμεμβρανικής μεταφοράς, της ομοιόστασης της κυτταρικής μήτρας (matrix homeostasis), της μεταλλοποίησης των ιστών και της κυτταρικής προσκόλλησης (Bouillon, Carmeliet et al. 2008). Ο υποδοχέας της βιταμίνης D έχει βρεθεί σε όλους τους κύριους καρδιαγγειακούς κυτταρικούς τύπους, στα λεία μυϊκά κύτταρα (VSMC), τα ενδοθηλιακά (EC), τα καρδιομυοκύτταρα, στα περισσότερα ανοσοκύτταρα και στα αιμοπετάλια. Τα ανοσοκύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε όλες τις μορφές καρδιαγγειακών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένης και της αθηροσκλήρωσης. Ο VDR έχει ταυτοποιηθεί στα περισσότερα ανοσοκύτταρα, κυρίως σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, και ενεργοποιημένα T κύτταρα (Norman, 2014). Επομένως, ο VDR μπορεί να δράσει προστατευτικά στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης μέσω αναστολής της πρόσληψης χοληστερόλης από τα μακροφάγα και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων, της μείωσης του πολλαπλασιασμού των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και της μείωσης της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και μέσω της αναστολής της απελευθέρωσης κυτταροκίνης από λεμφοκύτταρα. Εν κατακλείδι, η ενεργός μορφή της βιταμίνης D ελέγχει φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις, κρατώντας τις εντός φυσιολογικών ορίων, δρώντας προστατευτικά για την υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος (Wacker, 2013).

Η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων σχετίζεται με προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές διαδικασίες, αυξημένη αρτηριακή δυσκαμψία και τελικά αθηροσκλήρωση. Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τον VDR και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες προκαλούν γρήγορη έκφραση του CYP27B1, επάγοντας την τοπική παραγωγή της ενεργού μορφής της βιταμίνης. Αυτές οι επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα καταδεικνύουν έναν αυτοκρινή ή παρακρινή ρόλο για την $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ και τη δυνατότητα να επηρεάσει την πρώιμη αθηρογένεση, παρεμποδίζοντας την προσκόλληση ενδοθηλιακών κυττάρων και επομένως τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό λείων καρδιακών μυϊκών κυττάρων στην εστία της φλεγμονής. Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου η $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ εμπλέκεται στις καρδιαγγειακές παθήσεις είναι η ρύθμιση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Πειραματικά η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης επιταχύνεται σε ζωικά πρότυπα, στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο του υποδοχέα της LDL-Chol και του VDR, μέσω απώλειας του μονοπατιού σηματοδότησης του VDR στα μακροφάγα, οδηγώντας στην προς τα πάνω ρύθμιση του τοπικού συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Τελικά, στο VDR KO ζωικό πρότυπο η παραγωγή αγγειοτενσίνης οδηγά σε υπέρταση και καρδιακή υπερτροφία (Ohsawa et al., 2000; Norman, 2014). Επομένως, η βιταμίνη D καταστέλλει τα επίπεδα της ρενίνης, επιδεικνύοντας έτσι αντι-υπερτασικές ιδιότητες. Έρευνες δείχνουν πως οι ιδιότητες αυτές προέρχονται από αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης στον ορό, είτε από συμπληρώματα είτε με έκθεση σε UVB ακτινοβολία (Wacker, 2013).

Οι σχέσεις αυτές έχουν διαπιστωθεί, μένει όμως να αποδειχθούν, αφού η συσχέτιση καρδιαγγειακών και υποβιταμίνωσης D μπορεί να διαμεσολαβείται από καταστάσεις όπως η παχυσαρκία ή η έλλειψη δραστηριοτήτων σε εξωτερικό περιβάλλον. Ακόμη, δεδομένα δείχνουν πως ίσως η σχέση τους να μην είναι γραμμική. Παρόλα αυτά το όριο στο οποίο ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά αρχίζει να αυξάνει δεν έχει διαπιστωθεί. Μπορεί τα επιθυμητά όρια για διατήρηση της σκελετικής υγείας και της ομοιόστασης της PTH να είναι άνω των 30 ng/mL, αλλά τα ιδανικά επίπεδα για καρδιαγγειακή προστασία ίσως διαφέρουν (Wang et al., 2008).

Σακχαρώδης διαβήτης

Η ανεπάρκεια βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη τύπου II, με την αντίσταση στην ινσουλίνη, και μειωμένη παραγωγή αυτής (Holick, 2008).

Μια μετα-ανάλυση που εξετάζει τη σχέση μεταξύ βιταμίνης D ή συμπληρωματικής χορήγησής της και εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 έδειξε ότι τα άτομα με $25(\text{OH})\text{D} > 25 \text{ ng/mL}$ σε σύγκριση με εκείνους με $25(\text{OH})\text{D} < 14 \text{ ng/mL}$ είχαν 43% χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης διαβήτη τύπου 2 και ότι η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης D άνω των 500 IU/ημέρα σε σύγκριση αυτή κάτω των 200

IU/ημέρα μείωσε τον κίνδυνο κατά 13%. Στη μελέτη Nurses' Health Study περισσότερες από 83.000 γυναίκες παρακολούθηθηκαν προοπτικά και δείχθηκε, ότι μια συνδυασμένη ημερήσια πρόσληψη > 1200 mg ασβεστίου και > 800 IU βιταμίνης D συσχετίστηκε με 33% χαμηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 με σχετικό κίνδυνο 0,67 (CI: 0,49-0,90) σε σύγκριση με την πρόσληψη < 600 mg ασβεστίου και 400 IU βιταμίνης D (Pittas et al., 2006). Μια προοπτική μελέτη με περισσότερους από 2000 συμμετέχοντες έδειξε, ότι ο κίνδυνος της εξέλιξης προδιαβήτη σε διαβήτη μειώθηκε κατά 62% όταν συνέκριναν το υψηλότερο τεταρτημόριο των επιπέδων 25(OH)D με το χαμηλότερο τεταρτημόριο (Deleskog et al., 2012). Σε άλλη έρευνα φαίνεται πως τα επίπεδα βιταμίνης D συσχετίζονται αρνητικά τόσο με τον δείκτη ινσουλινοαντίστασης HOMA IR όσο και με τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης HbA1c (Jain et al., 2014).

Αυτή η συσχέτιση θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο VDR εκφράζεται στα β-παγκρεατικά κύτταρα, ασκώντας απευθείας δράση σε αυτά και έτσι η ενεργός μορφή της βιταμίνης D διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης. Βελτίωση των επιπέδων της βιταμίνης D θα συμβάλλει επίσης στη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, ίσως δια μέσου της προς τα πάνω ρύθμισης των υποδοχέων της ινσουλίνης και των μεταφορέων της γλυκόζης, και μετριάξει τη φλεγμονή, ελέγχοντας την έκφραση κυτταροκινών, γεγονός που επιδρά στη βελτίωση της δράσης της ινσουλίνης σε περιφερικούς ιστούς (Wacker, 2013; Jain et al., 2014).

Μολυσματικές ασθένειες και πνευμονική λειτουργία

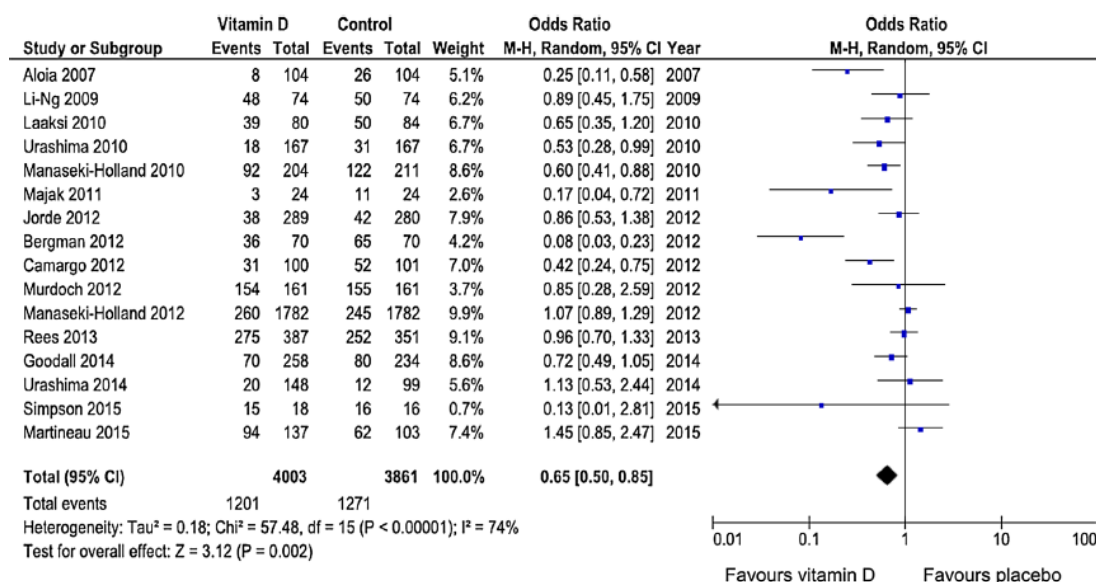
Η πληθώρα των επιδράσεων της βιταμίνης D στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των λοιμωδών νόσων, αφού ενισχύει την έμφυτη ανοσία ενάντια σε διάφορες λοιμώξεις. Έχει υποτεθεί πως η κατάσταση της βιταμίνης D στον οργανισμό μπορεί να επηρεάσει την έκβαση μολυσματικών ασθενειών, όπως η φυματίωση, η γρίπη και οι οξείες ιογενείς λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού (Wacker, 2013; Zittermann et al., 2016).

Το 19^ο και 20^ο αιώνα το μωρουνέλαιο χρησιμοποιούνταν ως θεραπευτικό μέσο της φυματίωσης, με δεδομένα από την πρώτη κλινική μελέτη να αποδεικνύουν πως ασθενείς που έπασχαν από φυματίωση και θεραπεύονταν με κατανάλωση μωρουνελαίου επιδεινώθηκαν ή απεβίωσαν μόνο κατά 19%, σε αντίθεση με την ομάδα που λάμβανε μόνο νοσηλευτική φροντίδα και τα ποσοστά επιδείνωσης και θανάτων άγγιζαν το 33%. Αργότερα, συστηματοποιήθηκε η χρήση “ηλιοθεραπείας” στη δυτική Ευρώπη, δηλαδή η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, για τη θεραπεία της δερματικής φυματίωσης (Lupus vulgaris). Στον απόηχο της εποχής των αντιβιοτικών οι δυο προηγούμενες θεραπευτικές μέθοδοι έπαψαν να υιοθετούνται στη κλινική πράξη. Παρόλα αυτά πρόσφατα δεδομένα καταλήγουν ότι η

βιταμίνη D μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο οξείας λοίμωξης του αναπνευστικού και συστήνουν ως και την προφυλακτική χορήγησή της.

Μια προοπτική, τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη που εξέτασε την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D σε 95 ασθενείς που λάμβαναν αντιμικροβιακή θεραπεία έδειξε ότι υπό τη λήψη της επήλθε ταχεία επίλυση της φλεγμονής (Coussens et al., 2012). Σε άλλη μελέτη ωστόσο, στην οποία τρεις δόσεις των 100.000 IU βιταμίνης D₃ δόθηκαν σε διάστημα 8 μηνών, δεν διαπιστώθηκε μείωση του σκορ κλινικής σοβαρότητας ή της θνησιμότητας, συγκριτικά με την ομάδα που λάμβανε εικονικό φάρμακο (Wejse et al., 2009). Τέλος, σε πρόσφατη κλινική δοκιμή που εξετάστηκε την επίδραση συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D σε 259 ασθενείς με πνευμονική φυματίωση, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν ώστε να λάβουν είτε 600.000 IU βιταμίνης D₃ ενδομυϊκά ή εικονικό φάρμακο σε 2 δόσεις, φάνηκε ότι με υψηλές δόσεις βιταμίνης D επιτεύχθηκε κλινική και ακτινολογική βελτίωση σε όλους τους ασθενείς, αλλά και αύξηση της ανοσολογικής ενεργοποίησης του ξενιστή σε ασθενείς με αρχική έλλειψη βιταμίνης D (Salahuddin et al., 2013).

Αναφορικά με τις λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού, ο Bergman et al το 2013 σε μετα-αναλύση 6 κλινικών δοκιμών συμπέρανε πως συνολικά η βιταμίνη D έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στις λοιμώξεις, αλλά υπήρχε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των μελετών που συμπεριέλαβε στην ανάλυση (Bergman et al., 2013). Μεταγενέστερες μετα-αναλύσεις, ωστόσο, που συμπεριέλαβαν και επόμενες κλινικές δοκιμές κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 15 (Zittermann et al., 2016).



Εικόνα 15.Μετα-ανάλυση για την αποτελεσματικότητα της βιταμίνης D ως θεραπεία για τις οξείες λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως σχετικοί λόγοι, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Ακόμη η RECORD study, μια προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη με 5300 συμμετέχοντες, οι οποίοι έλαβαν είτε 800 IU βιταμίνης D ή ένα εικονικό φάρμακο καθημερινά για δύο έως 5 χρόνια, παρατήρησε πως η ομάδα παρέμβασης ανέφερε λιγότερες λοιμώξεις (στοιχεία βασισμένα σε αυτό-αναφορά λοιμώξεων από οποιαδήποτε αιτία) και χρήση αντιβιοτικών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Avenell et al., 2007). Τα αποτελέσματα συνάδουν με εκείνα μιας ακόμη μελέτης από τον Bergman et al σχετικά με τις μολύνσεις της αναπνευστικής οδού, που αποδεικνύουν μείωση κατά 63,5% στη λήψη αντιβιοτικών στην ομάδα που λάμβανε βιταμίνη D (Bergman et al., 2012).

Υποδοχείς της βιταμίνης D βρίσκονται στα μονοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα υπό την επίδραση της 1,25-(OH)₂-D₃. Τα τελευταία εκφράζουν το δικό τους ισοένζυμο της 1α-υδροξυλάσης που καταλύει ενδοκυτταρικά τη σύνθεση της ενεργού μορφής της βιταμίνης D. Η ενεργότητα του ενζύμου είναι αυξημένη στα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, τα μακροφάγα ενσωματώνουν παθογόνα, όπως το μυκοβακτήριο της φυματίωσης (MTB), στα λεγόμενα φαγοσώματα και το εκθέτουν στην επιφάνειά τους μέσω υποδοχέων που ονομάζονται Toll-like receptors (TLRs). Τα μακροφάγα, τα οποία έχουν μολυνθεί με το MTB, εκφράζουν με εντονότερο ρυθμό τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα της βιταμίνης D και την 1α-υδροξυλάση. Η ενεργή βιταμίνη D ρυθμίζει άμεσα την έκφραση της καθελιδίνης και έμμεσα της διφενσίνης. Η καθελιδίνη, ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο, επάγει τη σύντηξη των ανενεργών φαγοσωμάτων με τα ενεργά αυτό-

φαγοσώματα, ενώ υπό την περαιτέρω επιρροή της, τα αυτό-φαγοσώματα συντήκονται με λυσοσώματα στο αυτο-λυσοσώματα. Ακόμη, η ενεργός μορφή της βιταμίνης, που παράγεται τοπικά, επάγει την έκφραση των λυσοσωμικών ενζύμων και των δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως το μονοξειδίο του αζώτου, με σκοπό την επίτευξη αυξημένης αντιμικροβιακής δράσης. Ο συνδυασμός της δράσης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων και των δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί ενδοκυτταρικά να καταστρέψει ιούς, μύκητες και βακτήρια στα αυτό-λυσοσώματα. Επιπλέον, η καθελσιδίνη διαθέτει αντικές δράσεις, ενισχύοντας την άμυνα του ξενιστή έναντι ιών, όπως ο ιός της κοινής γρίπης ή της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, η παραγωγή καθελσιδίνης από τα μονοκύτταρα είναι σημαντικά μειωμένη σε άτομα με ανεπάρκεια ή έλλειψη βιταμίνης D. Η διφενσίνη έχει, επίσης, αντικές ιδιότητες καθώς παρεμποδίζει τη σύντηξη μεμβρανών που μεσολαβείται από τις ιικές αιμοσυγκολλητίνες. Τέλος, η βιταμίνη D κατέχει σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία, δρώντας άμεσα επί των T κυττάρων, αφού περιορίζει τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων Th1/Th17 και ευνοεί αυτή των Th2. Τα υψηλά επίπεδα βιταμίνης D φαίνεται να συνδέονται με μειωμένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, ενώ αντιστρόφως χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D συνδέονται με ενεργοποίηση φλεγμονωδών διεργασιών (Zittermann et al., 2016).

Φλεγμονή

Η φλεγμονή συνυπάρχει σε πολλές χρόνιες ασθένειες και υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της ανεπάρκειας της βιταμίνης D στις φλεγμονώδεις διεργασίες (Mangin et al., 2014). Εκτός της ομοιόστασης του ασβεστίου, η βιταμίνη αυτή επηρεάζει και άλλα μεταβολικά μονοπάτια, με αυτό του ανοσοποιητικού συστήματος να έχει κεντρίσει τελευταίως το ενδιαφέρον (Guillot et al., 2010). Υπάρχουν δεδομένα που συνηγορούν ότι η βιταμίνη D ασκεί ευρεία επιρροή στα κύτταρα που απαρτίζουν τη φυσική και την επίκτητη ανοσία (Calton et al., 2015). Ως επί το πλείστον, συμβάλλει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης αλλά και της δράσης των ανοσοκυττάρων, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα. Μπορεί να συσσωρευθεί στο μικροπεριβάλλον των λεμφικών οργάνων και να επάγει αυτοκρινείς και παρακρινείς ορμονικές δράσεις. Τα ενεργοποιημένα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, ίσως και τα B, μπορούν να πραγματοποιήσουν μόνο την τελευταία αντίδραση ενεργοποίησης της βιταμίνης, δηλαδή από 25(OH)D₃ προς 1,25-(OH)₂-D₃, ενώ τα μακροφάγα και τα δένδριτικά κύτταρα διαθέτουν και τα δύο ένζυμα που απαιτούνται για τη μετατροπή της στην ενεργό μορφή της. Επομένως, μπορεί τοπικά να διεκπεραιωθεί η παραγωγή της βιταμίνης, οδηγώντας σε παρακρινείς δράσεις (Guillot et al., 2010).

Όταν ενεργοποιηθεί από την 1,25-(OH)₂-D₃, ο υποδοχέας της βιταμίνης D ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σε μια πληθώρα ιστών. Επιπλέον, εκφράζεται σε πολλούς τύπους ανοσοκυττάρων, ειδικά στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων και στα ενεργοποιημένα Τ-βοηθητικά κύτταρα (Mangin et al., 2014). Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα ρυθμίζονται στενά από την βιταμίνη, ως εκ τούτου αυτή διαδραματίζει καίριο ρόλο στις αποκρίσεις της φυσικής ανοσίας. Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση της ενεργού μορφής της βιταμίνης με τον υποδοχέα της, προκαλεί την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, τα διεγείρει ώστε να παράγουν την ανοσοκατασταλτική προσταγλανδίνη E2, ενώ ρυθμίζει προς τα κάτω και την έκφραση του παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Guillot et al., 2010). Παράλληλα, επάγει την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων από τα κύτταρα αυτά, όπως η καθελιδίνη και οι διφενσίνες, οι οποίες επιτίθενται στα παθογόνα (Mangin et al., 2014). Επιπροσθέτως, μειώνει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χυμοκινών από τα μακροφάγα. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης εμποδίζει την ωρίμανση των μακροφάγων και την παραγωγή των ειδικών αντιγόνων επιφανείας σε αυτά αλλά και των υπόλοιπων ουσιών, που τελικά είναι απαραίτητα για την αντιμικροβιακή τους δράση (Guillot et al., 2010). Προσθέτοντας σε καλλιέργειες κυττάρων βιταμίνη D, αυξάνει η έκφραση δεικτών της μεμβράνης, ενζύμων και ελεύθερων ριζών οξυγόνου και προάγεται η χημειοταξία και η φαγοκυττάρωση. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν ενεργή βιταμίνη σε απάντηση προς την IFN-γ και την ενεργοποίηση των TLRs από μικροβιακούς παράγοντες (Helming et al., 2005).

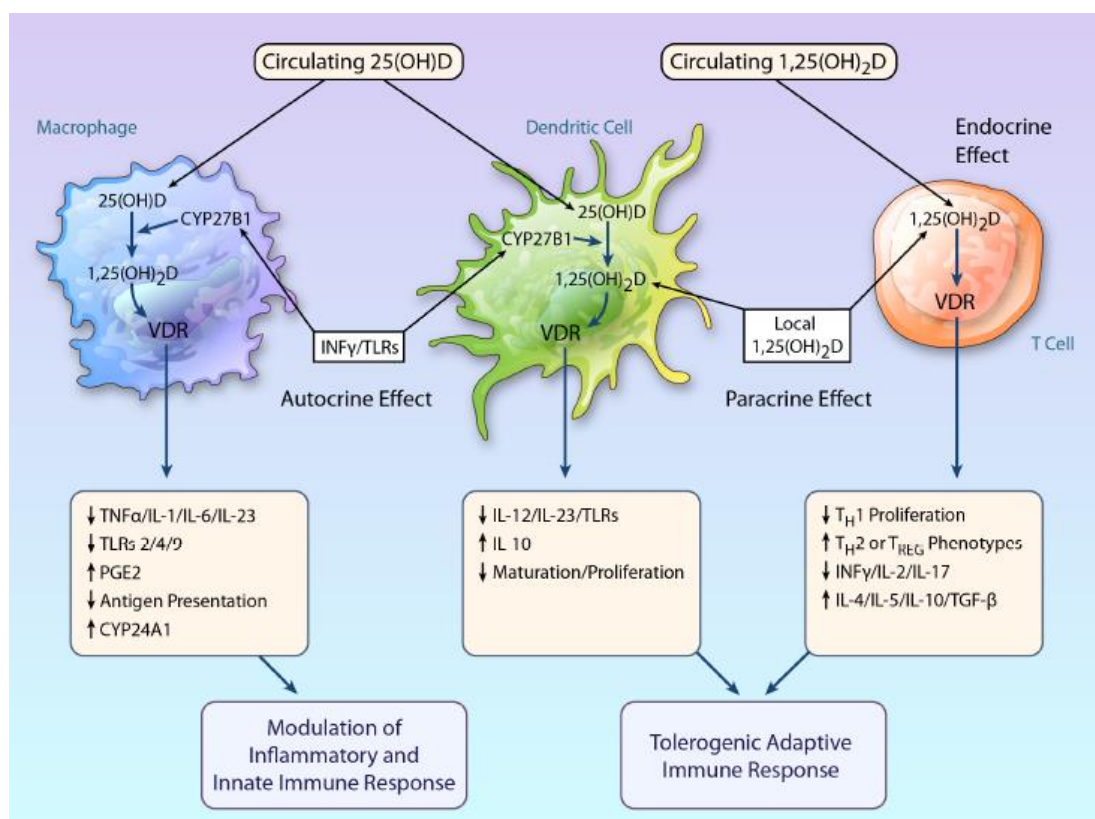
Ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων μειώνεται υπό την επίδραση της ενεργού μορφής της βιταμίνης D, η οποία επίσης αναστέλλει την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε δενδριτικά, και την διαφοροποίηση, ωρίμανση και επιβίωση των δενδριτικών, και μειώνει τη διέγερση των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων από αυτά. Ένα άλλο αποτέλεσμα της είναι έμμεση αναστολή της απόκρισης Th1 μέσω αναστολής της παραγωγής IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα. Επιπλέον της αναστολής IL-12, η 1,25-(OH)₂-D₃ αυξάνει την παραγωγή IL-10 από τα δενδριτικά κύτταρα (Wobke et al., 2014). Το συνολικό αποτέλεσμα είναι μια μείωση στην απόκριση Th1, που σχετίζεται με τη φλεγμονή και η επαγωγή των ρυθμιστικών κυττάρων τύπου 1 (Tr1) που παράγουν IL-10, η οποία συνιστά τη μόνη αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη. Τελικά, ενεργώντας επί ορισμένων μορίων συνδιέγερσης, η 1,25-(OH)₂-D₃ επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ Τ-βοηθητικών και δενδριτικών κυττάρων, μειώνοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Mangin et al., 2014).

Η βιταμίνη D ασκεί άμεσα επίδραση στα Τ και Β βοηθητικά κύτταρα και τροποποιεί την απόκρισή τους στην ενεργοποίηση, κατέχοντας έτσι σημαντική θέση στις απαντήσεις της ειδικής ανοσίας. Τα αδρανή

CD4+ T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα εκφράζουν ελάχιστα τον VDR, ενώ η ενεργοποίησή τους συνδέεται με πενταπλάσια αύξηση του επιπέδου έκφρασης του VDR. Η επίδραση της 1,25-(OH)₂-D₃ ασκείται στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα τόσο έμμεσα, μέσω ενεργοποίησής τους από τα δενδριτικά, όσο και άμεσα, μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού τους (Guillot et al., 2010).

Περαιτέρω, η 1,25-(OH)₂-D₃ επηρεάζει τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων, αναστέλλοντας την απόκριση Th1, η οποία χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν IFN-γ και IL-2 και έκφραση των πρωτεϊνών αυτών των γονιδίων από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και διεγείροντας την απόκριση Th2, η οποία με τη σειρά της χαρακτηρίζεται από την παραγωγή IL-4, IL-5 και IL-10. Η αύξηση της παραγωγή της IL-5 και IL-10, καθώς και η έμμεση μείωση της παραγωγής IFN-γ μπορεί να αποτελεί τον πιθανό μηχανισμό που εξηγεί τις θετικές επιδράσεις της βιταμίνης D σε αυτοάνοσα νοσήματα. Επιπλέον, η 1,25-(OH)₂-D₃ διακόπτει και την Th17 απόκριση, αναστέλλοντας την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και IL-23 (Guillot et al., 2010; Mangin et al., 2014).

Εν κατακλείδι, η ενεργός μορφή της βιταμίνης D δρα επί του ανοσοποιητικού συστήματος αναστέλλοντας τις Th1 και Th17 προφλεγμονώδεις αποκρίσεις και διεγείροντας την Th2 απόκριση και τα Tr1 ρυθμιστικά κύτταρα, με τελικό στόχο τη μείωση της διαμεσολαβούμενης από τα T λεμφοκύτταρα ανοσολογικής απόκρισης (Wobke et al., 2014).



Εικόνα 16. Μεταβολίτες της βιταμίνης D και ανοσοποιητικό σύστημα: ενδοκρινείς, παρακρινείς και αυτοκρινείς δράσεις (endocrine, paracrine and autocrine effect). IL-ιντερλευκίνη, INF-γ-ιντερφερόνη γάμμα, PGE-2-προσταγλανδίνη E2, TGF-β- μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β, TLR- υποδοχείς που μοιάζουν στους Toll, TNF-α-παράγοντας νέκρωσης όγκων-α, VDR-υποδοχέας βιταμίνης D, macrophage-μακροφάγο, dendritic cell-δενδριτικό κύτταρο, T cell-T κύτταρο, antigen presentation-αντιγονική παρουσίαση, maturation/proliferation-ωρίμανση/πολλαπλασιασμός, phenotypes-φαινότυποι, modulation of inflammatory and innate immune response-ρύθμιση της φλεγμονής και της φυσικής ανοσίας, tolerogenic adaptive immune response-απάντηση μέσω TLR επίκτητης ανοσίας (Norman and Powell, 2014).

Έρευνα που διεξήχθη σε υγιείς ενήλικες μελετώντας την επίδραση των επιπέδων της βιταμίνης D σε δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες κατέληξε ότι τα άτομα που είχαν βιταμίνη D <30 ng/mL είχαν αυξημένες τιμές IL-6 ($P < 0.001$) αλλά έπειτα από πλήρη προσαρμογή για άλλες συμμεταβλητές, η παρατηρούμενη σχέση εξασθένησε και ήταν πλέον μη στατιστικά σημαντική ($P = 0,11$) (Alvarez et al., 2014). In vitro, η καλσιτριόλη και άλλα ανάλογα της βιταμίνης D είναι γνωστό ότι μειώνουν την κυτταρική παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Ο πιθανός μηχανισμός είναι μέσω παρεμβολής της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης (p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase-1) ή του

παράγοντα μεταγραφής Nuclear Factor κ-B (Krishnan, 2011; Zhang et al., 2012). *In vivo* μελέτες ωστόσο (Shea et al., 2008), συμπεριλαμβανομένης της τρέχουσας μελέτης, δεν έχουν αποδείξει σταθερά μία αντιφλεγμονώδη δράση της βιταμίνης D (Alvarez et al., 2014). Ωστόσο, είναι πιθανό ότι οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της βιταμίνης D περιορίζονται σε κυτταρικό επίπεδο και γι' αυτό δεν έχουν εντοπιστεί από συστηματικές συγκεντρώσεις αυτών των κυτταροκινών ή παρατηρούνται σε πληθυσμούς με σοβαρότερη ανεπάρκεια βιταμίνης D ή χρονίως ενεργοποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως η κυστική ίνωση (Alvarez et al., 2014). Περαιτέρω ερευνητικά δεδομένα από ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές είναι απαραίτητα για τη διατύπωση μιας αιτιολογικής σχέσης μεταξύ των επιπέδων βιταμίνης D και δεικτών φλεγμονής.

Οξειδωτικό στρες

Ο όρος ελεύθερη ρίζα αντιπροσωπεύει ένα άτομο ή ένα μόριο το οποίο έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο βρίσκεται μόνο στο εξωτερικό του τροχιακό και η ανισορροπία των ηλεκτρονίων στα τροχιακά έχει ως αποτέλεσμα στις περισσότερες περιπτώσεις την υψηλή δραστικότητα των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο αναφέρονται ως ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Αυτές μπορούν να σχηματίζονται καθημερινά στο ανθρώπινο σώμα, είτε κατά τη διάρκεια έκθεσης του οργανισμού σε ουσίες όπως η αιθαλομίχλη, το όζον, χημικά, φάρμακα, ακτινοβολίες και υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, είτε κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών όπως η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού ή η διαδικασία της φλεγμονής. Το οξειδωτικό στρες αντικατοπτρίζει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος αντιοξειδωτικών να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών, και η επίθεσή τους έναντι στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα πιθανώς ενέχεται στην αιτιολογία πολλών και χρόνιων παθήσεων, όπως τα καρδιαγγειακά, νευροεκφυλιστικές, πνευμονικές και φλεγμονώδεις παθήσεις (Palmieri, 2007; Gropper, 2008).

Σε τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή κλινική δοκιμή, χορήγησαν σε 54 γυναίκες που διένυαν περίοδο εγκυμοσύνης είτε 50.000 IU βιταμίνης D₃, 2 φορές κατά τη διάρκεια της μελέτης, είτε εικονικό φάρμακο στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Έπειτα από 6 εβδομάδες παρέμβασης, δεν διαπίστωσαν αλλαγές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος μεταξύ των δυο ομάδων (Asemi et al., 2013). Σε άλλη μελέτη, με συμπληρωματική χορήγηση 5.000 IU βιταμίνης D₃ στην ομάδα ελέγχου, η οποία αποτελούταν από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, και εικονικού φαρμάκου στην ομάδα

ελέγχου, επίσης δεν διαπιστώθηκαν αλλαγές στους δείκτες οξειδωτικού στρες μεταξύ των δυο ομάδων (Yiu et al., 2013). Πρόσφατη δημοσίευση μελέτης σε γυναίκες με προεκλαμψία, διαπίστωσε ότι αυτές είχαν υψηλότερα επίπεδα μηλονικής διαλδεΰδης στον ορό του αίματος ($p = 0.001$) και χαμηλότερα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και 25(OH)D στον ορό ($p < 0.05$) σε σχέση με υγιείς εγκυμονούσες. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού συσχετιζόταν θετικά με τα επίπεδα 25(OH)D στην περίπτωση των γυναικών με προεκλαμψία (Gargari, 2015). Τέλος, ερευνητική εργασία σε ζωικά πρότυπα συμπέρανε ότι ενδοφλέβια χορήγηση βιταμίνης D₃ μετά από έντονη άσκηση δύναται να μειώσει την υπεροξείδωση των λιπών και να βελτιώσει την καταστροφή των ιστών, ειδικά των νεφρών και των πνευμόνων (Ke, 2016).

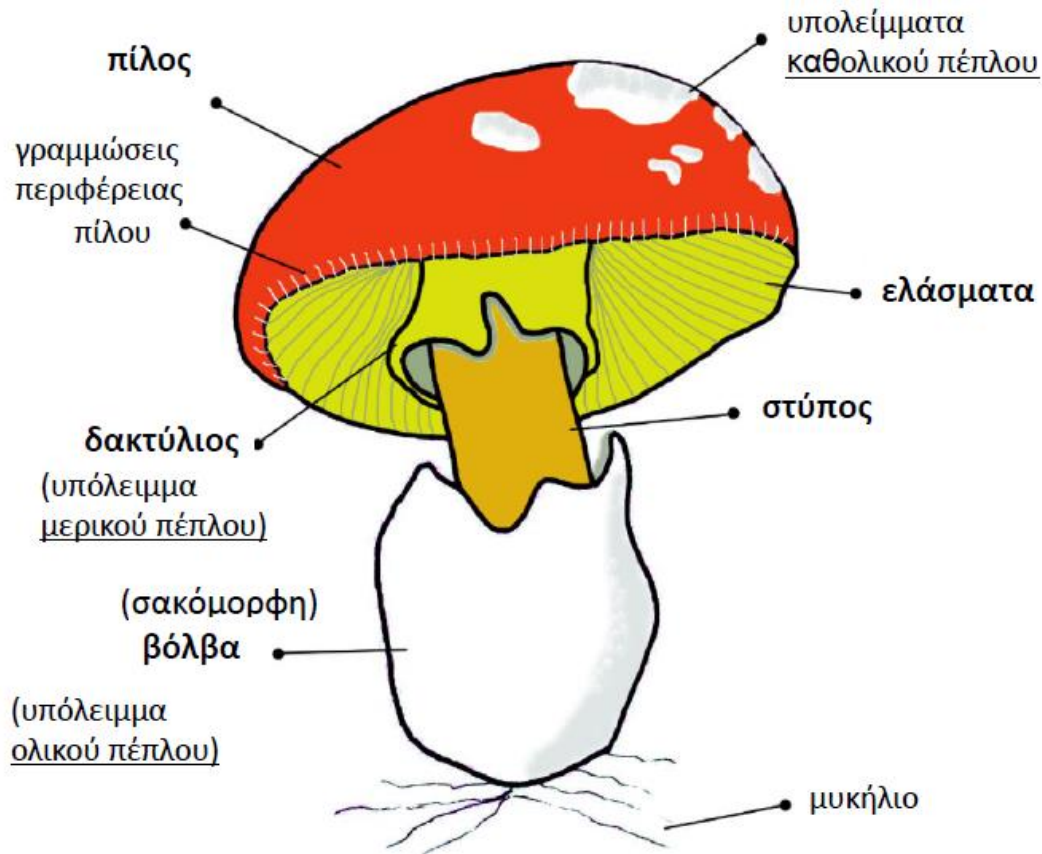
2. MANITAPIA

2.1 Μύκητες

Ο όρος “μύκητες” χρησιμοποιείται για τους οργανισμούς εκείνους που έχουν κύτταρα με πυρήνα, σχηματίζουν σπόρια, στερούνται χλωροφύλλης, αναπαράγονται εγγενώς και αγενώς και των οποίων τα συνήθως νηματοειδή, σωληνοειδή, διακλαδισμένα μικροσκοπικά νημάτια (υφές), περιβάλλονται από κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν χιτίνη ή κυτταρίνη ή και τα δυο. Είναι σαφώς ευκαρυωτικοί μη φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, που δεν είναι σε θέση να συνθέσουν μόνοι τους την τροφή τους, δηλαδή είναι ετερότροφοι.

Αναφορικά με τη συστηματική τους κατάταξη, οι μύκητες διακρίνονται σε Μυξομύκητες (Mycxomycota) και Ευμύκητες (Eumycota). Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οργανισμοί που παρουσιάζουν ομοιότητες τόσο με φυτά όσο και με ζώα, ενώ στη δεύτερη οι λεγόμενοι “γνήσιοι” μύκητες. Σε αυτή την τελευταία κατηγορία εμπίπτουν οι Βασιδιομύκητες, ανώτεροι μύκητες με πολύπλοκη δομή σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες μυκήτων. Το σύνολο των νηματίων που αποτελούν το σώμα των μυκήτων ονομάζονται υφές και η μάζα των υφών που συνιστά το βλαστικό σώμα ονομάζεται μυκήλιο. Στους βασιδιομύκητες ορισμένα μυκήλια σχηματίζουν μεγάλες συμπαγείς δομές με υψηλή οργάνωση, που ονομάζονται καρποσώματα ή καρποφόροι (fruiting bodies). Αυτά είναι τα βασικά όργανα παραγωγής εγγενών σπορίων. Τα καρποσώματα των βασιδιομυκήτων ονομάζονται βασιδιοκάρπια και είναι τα γνωστά μανιτάρια, ορατά πάνω από την επιφάνεια του εδάφους και αποτελούν το αναπαραγωγικό τμήμα του μύκητα, ενώ το κύριο βλαστικό του τμήμα βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια του εδάφους ή μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η πλέον κοινή μορφή βασιδιοκαρπίου παρατηρείται στον γνωστό βασιδιομύκητα *Agaricus*. Αυτό αποτελείται από ένα μικρό, ορθό στέλεχος που λέγεται στύπος και συνδέεται με τη βάση του με μια μάζα μυκηλίου, στην κορυφή του εκτείνεται σε ένα πλατύ κυκλικό

κάλυμμα που ονομάζεται πύλος. Στην κάτω επιφάνεια του πύλου σχηματίζονται λεπτά διαφράγματα με ακτινωτή διάταξη γύρω από τον στύπο (Κατσαρός, 1998).



Εικόνα 17. Μορφολογία μυκήτων (Denchev, 2013).

Η συστηματική κατάταξη των μανιταριών, *Pleurotus ostreatus*, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Φυλογενετική ταξινόμηση του είδους *Pleurotus ostreatus*

Βασίλειο	Μύκητες
Φύλο	Basidiomycota ή Βασιδιομύκητες
Κλάση	Agaricomycetes ή Αγαρικομύκητες
Τάξη	Agaricales ή Αγαρικώνη
Οικογένεια	Pleurotaceae ή Πλευρωτοειδή
Γένος	Pleurotus ή Πλευρώτους
Είδος	Pleurotus ostreatus -- Πλευρωτός ο οστρακόμορφος (σαν όστρακο)

2.2 Μύκητες-Το τρίτο βασίλειο των τροφίμων

Έως τα μέσα του 19ου αιώνα οι ζωντανοί οργανισμοί κατατάσσονταν σε δύο βασίλεια, των Φυτών και των Ζώων. Οι μύκητες είχαν συμπεριληφθεί στα φυτά, επειδή δεν έχουν ικανότητα κίνησης, είναι σταθερά προσκολλημένοι στο έδαφος, απορροφούν από αυτό την τροφή τους και πιστευόταν πως αναπαράγονται όπως τα φυτά. Αντίθετα, τα ζώα έχουν ικανότητα κίνησης και τρέφονται με φυτά ή/και με άλλα ζώα. Σήμερα πλέον είναι γνωστό ότι οι μύκητες δεν είναι ούτε φυτά ούτε ζώα, ενώ έχει επίσης αποδειχτεί πως είναι εξελικτικά πιο κοντά στα ζώα παρά στα φυτά (Denchev et al, 2013). Επομένως, κατατάσσονται σε ένα τρίτο βασίλειο, κυρίως λόγω των διαφορών τους σε κυτταρική δομή από τους άλλους οργανισμούς (Feeney et al, 2014).

Σημαντικές διαφορές που διακρίνουν τους μύκητες από τα βασίλεια των φυτών και των ζώων περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: 1) Τα φυτά διαθέτουν χλωροφύλλη και δημιουργούν την τροφή τους μέσω της φωτοσύνθεσης, 2) τα ζώα πέπτουν την τροφή τους, ενώ 3) οι μύκητες, που στερούνται χλωροφύλλης, αναπτύσσονται σε αποσυντιθέμενη ύλη στη φύση και σε υποστρώματα ποικίλης σύστασης, όταν καλλιεργούνται για εμπορικούς σκοπούς (Feeney, 2014).

Επιπλέον, οι μύκητες περιέχουν χιτίνη, έναν πολυσακχαρίτη της γλυκόζης, που απαντάται και στον εξωσκελετό των καρκινοειδών και των εντόμων, αλλά καθόλου κυτταρίνη, η οποία απαντάται στα φυτά. Ακόμη, περιέχουν εργοστερόλη αντί για χοληστερόλη, η οποία απαντάται στα κύτταρα των ανώτερων θηλαστικών.

Τα μανιτάρια αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διατροφής και χρησιμοποιούνται τόσο ως τρόφιμα όσο και ως φάρμακα εδώ και πολλούς αιώνες. (Feeney, 2014).

Παρόλο που περισσότερα από 2.000 είδη μανιταριών είναι βρώσιμα, τα πιο γνωστά στους καταναλωτές είναι αυτά του είδους *Agaricus bisporus*: τα λευκά μανιτάρια (white button mushroom-η πιο συχνά καταναλισκόμενη ποικιλία μανιταριών στον κόσμο), τα μανιτάρια crimini και τα portabella. Άλλα εμπορικά είδη είναι τα ακόλουθα: shiitake (*Lentinus edodes*), straw (*Volvariella volvacea*), oyster (*Pleurotus ostreatus*) και enoki (*Flammulina ostreatus*). Εποχιακά είδη συνιστούν τα μανιτάρια morel (*Morchella esculenta*) και τα chanterelles (*Cantharellus cibarius*) που συλλέγονται άγρια από την φύση και πωλούνται σε καταστήματα λιανικής πώλησης και αγροτικές αγορές. Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α. (USDA) η κατά κεφαλήν κατανάλωση φρέσκων λευκών μανιταριών είναι ελαφρώς μικρότερη από 3 λίβρες ή 1,36 κιλά ανά έτος (Feeney, 2014). Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας παραγωγής και επεξεργασίας των μανιταριών υπολογίζεται πως περίπου 24 εκατομμύρια τόνοι

μανιταριών καλλιεργούνται ετησίως σε όλο τον κόσμο, με αξία ύψους περίπου 60 δισεκατομμυρίων αμερικανικών δολαρίων (Balan, 2016).

Τα εδώδιμα μανιτάρια καταναλώνονται κυρίως για την πλούσια γεύση και τη θρεπτική τους αξία και λιγότερο για τα οφέλη υγείας που τους αποδίδονται. Στην τελευταία περίπτωση, πρόκειται για τα επονομαζόμενα “θεραπευτικά” μανιτάρια (Balan, 2016).

Στοιχεία από καταγραφές της αρχαίας λογοτεχνίας διάφορων πολιτισμών, όπως του ελληνικού, του αιγυπτιακού, του ρωμαϊκού, του κινεζικού και του μεξικανικού, αναφέρουν πως τα μανιτάρια χρησιμοποιούνταν για χιλιετίες ως τρόφιμο και ως φάρμακο. Πολλές γνωστές ποικιλίες μανιταριών, όπως *Auricularia auricula-judae*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea* και *Tremella fuciformis* καλλιεργήθηκαν επιτυχώς για πρώτη φορά στην Κίνα μεταξύ 600 και 1800 π. Χ., ενώ τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα μανιτάρια του είδους *Agaricus bisporus*, καλλιεργήθηκαν αρχικά στη Γαλλία το 1650 μ. Χ. (Balan, 2016).

Ο συνολικός αριθμός ειδών μυκήτων που υπάρχουν στη Γη εκτιμάται μεταξύ 1.500.000 και 5.400.000 ειδών, ενώ έως σήμερα έχουν περιγραφεί μόλις 100.000 είδη σε όλο τον κόσμο, ένα εξαιρετικά μικρό ποσοστό. Από αυτούς περίπου 18.000 αντιστοιχούν σε μανιτάρια (ή αλλιώς μακρομύκητες = ασκομύκητες και βασιδιομύκητες με μακροσκοπικά ορατά ασκώματα και βασιδιώματα). Στην Ελλάδα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα την ύπαρξη περίπου 2.400 ειδών μανιταριών (περίπου 400 ασκομύκητες και 2.000 βασιδιομύκητες). Ο εκτιμώμενος συνολικός αριθμός τους στην Ελλάδα υπερβαίνει τα 6.000 είδη, ενώ στην Ιταλία έχουν ήδη καταγραφεί 6.500 είδη βασιδιομυκήτων (Denchev et al, 2013).

2.3 Διατροφική αξία μανιταριών

Πολλά μανιτάρια θεωρούνται πλέον ως ολιστικά τρόφιμα, αφού είναι: 1) τρόφιμα με χαμηλή θερμιδική αξία, 2) πλούσια σε φυτικές ίνες, κυρίως χιτίνη, 3) πλούσια σε αλκαλοειδή πουρίνης, 4) χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και υψηλή σε μαννιτόλη, 5) χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο, 6) υψηλή σε κάλιο και φώσφορο, 7) πλούσια σε σελήνιο, 8) πλούσια σε διαλυτά σάκχαρα, πολυόλες, οργανικά οξέα, ελεύθερα αμινοξέα και ελεύθερα 5'-νουκλεοτίδια, 9) πλούσια σε πολυσακχαρίτες υψηλού μοριακού βάρους, όπως β-γλυκάνες, ετερογλυκάνες, χιτινικές ουσίες, πεπτιδογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες και χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ουσίες, όπως τερπενοειδή, στεροειδή και φαινόλες, 10) πλούσια

σε βιταμίνες, όπως θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, ασκορβικό οξύ και νιασίνη, 11) καλή πηγή πρωτεΐνης, με περιεκτικότητα περίπου 3,5%-4% σε νωπά και 19%-35% σε ξηράμανιτάρια και 12) χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (0,6 έως 3,1% σε ξηράμανιτάρια), εκ των οποίων πάνω από το 70% είναι ακόρεστα λιπαρά (Balan, 2016).

Υπάρχουν επίσης μελέτες για συγκεκριμένες ενώσεις που περιέχονται σταμανιτάρια, όπως τοθειούχο αμινοξύ εργοθειονίνη και το προφίλ των υδατανθράκων τους, όπως οι πολυσακχαρίτες χιτίνη και β-γλυκάνη (Dikeman et al., 2005). Η εργοθειονίνη δεν συντίθεται από τον ανθρώπινο οργανισμό και έχει ένα μοναδικό σύστημα μεταφοράς στα θηλαστικά, υποδεικνύοντας έτσι τη σημασία της για την υγεία. Βρίσκεται σε πολύ περιορισμένες διατροφικές πηγές, όπως μύκητες, νεφροί, ήπαρ, μαύρα και κόκκινα φασόλια, βρώμη και σε μερικά βακτήρια. Μια τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή απέδειξε τη βιοδιαθεσιμότητα της εργοθειονίνης από εδώδιμαμανιτάρια. Η επιτροπή Nutrition Facts εξετάζει τη θρεπτική συμβολή μιας μερίδας 84g φρέσκων λευκώνμανιταριών στην ημερήσια κατανάλωση, όπως αυτή αναγράφεται στις ετικέτες τροφίμων, δηλαδή μιας δίαιτας 2000 θερμίδων. Έτσι, ταμανιτάρια συνιστούν μια καλή πηγή νιασίνης, παντοθενικού οξέος, σεληνίου και χαλκού παρέχοντας 10-19% των ημερήσιων αναγκών από τα συστατικά αυτά και εξαιρετική πηγή ριβοφλαβίνης, παρέχοντας το 20% των αναγκών (Feeney, 2014).

Η συνεισφορά τους στην ημερήσια κατανάλωση ορισμένων θρεπτικών συστατικών μπορεί να είναι μικρή, όμως τακτική κατανάλωσημανιταριών συμβάλλει σε μια θρεπτική διατροφή, που σχετίζεται ως επί το πλείστον με υψηλότερη συνολική πρόσληψη λαχανικών και δημητριακών ολικής άλεσης. Ως εκ τούτου, αυξάνεται η πρόσληψη επιθυμητών θρεπτικών συστατικών και μειώνεται η πρόσληψη των επιζήμιων (Feeney, 2014).

Στον πίνακα 5 παρατίθενται στοιχεία από τη συμβολή της κατανάλωσης τωνμανιταριών στην πρόσληψη καλίου, φυτικών ινών, βιταμίνης D και ασβεστίου, θρεπτικών συστατικών που υποκαταναλώνονται όπως αναφέρεται από τις Διαιτητικές Οδηγίες του 2010 για τους Αμερικανούς (Feeney, 2014).

Πίνακας 5. Συμβολή της κατανάλωσης των μανιταριών στην πρόσληψη καλίου, φυτικών ινών, βιταμίνης D και ασβεστίου (Feeney, 2014).

Μανιτάρι (1 φλιτζάνι)	Κάλιο, mg	Φυτικές ίνες, g	Βιταμίνη D, IU	Ασβέστιο, mg
Λευκά, τηγανητά χωρίς λίπος	428	1,9	9	4
Portabella, ψητά, εκτεθειμένα σε UV	529	2,7	634	4

2.4 *Pleurotus ostreatus*

Το γένος *Pleurotus* καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια του Πρώτου Παγκοσμίου Πολέμου στη Γερμανία ως ένα τρόφιμο που μπορούσε να συντηρηθεί στις αποθήκες και η πρώτη τεκμηρίωση της καλλιέργειάς τους έγινε από τον Kaufer το 1936 (Kaufer et al., 1936). Σήμερα, διάφορα είδη *Pleurotus* καλλιεργούνται λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε μέταλλα και των φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων, του σύντομου κύκλου ζωής τους, της χρήσης τους στην ανακύκλωση ορισμένων γεωργικών και βιομηχανικών αποβλήτων και της περιορισμένης ανάγκης για πόρους και τεχνολογία για την καλλιέργειά τους (Sibel et al., 2002).

Επιπροσθέτως, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του *Pleurotus* είναι πολύτιμα λιπάσματα και βελτιωτικά εδάφους για την ανάπτυξη φυτών. Ακόμη, υπολείμματα αυτών που έχουν υποστεί ζύμωση θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή μετά την καλλιέργεια μανιταριών. Ως εκ τούτου, η διαδικασία της καλλιέργειας του *Pleurotus* μπορεί να λύσει ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα στον τρόπο διάθεσης των αποβλήτων στο έδαφος, αποφέροντας οικονομικό κέρδος και προστατεύοντας το περιβάλλον (Deepalakshmi et al, 2014).

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει περίπου 40 είδη που καλούνται συνολικά συνήθως “oyster mushroom” δηλαδή “μανιτάρια στρειδιών», αναπτύσσονται ευρέως στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, ενώ καλλιεργούνται εύκολα και τεχνητά.

Μεταξύ των πολλών ειδών αυτού του γένους, το *Pleurotus ostreatus* είναι το ευρύτερα καταναλισκόμενο παγκοσμίως λόγω της γεύσης, του αρώματος, της υψηλής διατροφικής αξίας και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του (Deepalakshmi et al., 2014).



Εικόνα 18. *Pleurotus ostreatus*

2.5 Διατροφική αξία *Pleurotus ostreatus*

Τα *Pleurotus ostreatus* είναι η δεύτερη πιο σημαντική καλλιέργεια εδώδιμωνμανιταριών σε όλο τον κόσμο. Διατροφικά, έχουν μοναδική γεύση και αρωματικές ιδιότητες και θεωρείται τρόφιμο υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, λειτουργικούς υδατάνθρακες, μέταλλα και βιταμίνες και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Kalmis et al., 2008; Deeralakshmi et al, 2014).

Γενικά, τα φρέσκαμανιτάρια του γένους αυτού περιέχουν 85-95% υγρασία (Khan, 2010). Επιπλέον, αναγνωρίζονται πλέον ως πηγή πρωτεϊνών. Η περιεκτικότητα, όμως, ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των μέσων ανάπτυξης, τη σύνθεση του υποστρώματος και του χρόνου της συγκομιδής (Akyuz et al., 2010). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη κυμαίνεται από 17 έως 42 g ανά 100 g αποξηραμένων καρποσωματίων, σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Khan et al., 2008; Akyuz et al., 2010).

Αναφορικά με τα λιπαρά, ταμανιτάρια αυτά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος, αλλά περιέχουν κάποια απαραίτητα λιπαρά οξέα. Ωστόσο, ταμανιτάρια δεν λογίζονται ως σημαντική πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων για την κάλυψη των απαιτήσεων του ανθρώπινου οργανισμού. Το ελαϊκό οξύ είναι το κύριο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ και το λινελαϊκό οξύ είναι το κύριο πολυακόρεστο λιπαρό

οξύ στο είδος αυτό. Σύμφωνα με την Hossain et al. τα *P. ostreatus* περιέχουν το μονοακόρεστο λιπαρό οξύ, ελαϊκό οξύ (363μg/g ξηρού μανιταριού) και το ω-6 απαραίτητο λιπαρό οξύ, λινελαϊκό (533 μg/g αποξηραμένου μανιταριού) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Το ω-3 απαραίτητο λιπαρό οξύ, λινολεϊκό οξύ (11,6 μg/g αποξηραμένου μανιταριού) και το αραχιδονικό οξύ (10,8μg/g αποξηραμένου μανιταριού) έχουν βρεθεί επίσης σε *P. ostreatus*. Συνολικά, η περιεκτικότητα σε λιπίδια κυμαίνεται από 0,2 έως 8g ανά 100g αποξηραμένων καρποσωματίων, σε διαφορετικά είδη *Pleurotus* (Hossain et al., 2007).

Οι υδατάνθρακες αποτελούν το κύριο συστατικό των ξηρών μανιταριών, συνήθως περίπου 50-60%, επομένως τα *P. ostreatus* θεωρούνται καλή πηγή υδατανθράκων και διαιτητικών ινών. Περιέχει κυρίως πολυσακχαρίτες, που εκπροσωπούνται από το γλυκογόνο, όπως και άπεπτες μορφές υδατανθράκων, όπως διαιτητικές ίνες, κυτταρίνη, χιτίνη, α- και β- γλυκάνες και άλλες ημικυτταρίνες όπως μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες (Hossain et al., 2007). Οι γλυκάνες μπορεί να είναι διακλαδισμένα μόρια [(1→3), (1→6)-β-γλυκάνες] ή γραμμικά [(1→3)-α-γλυκάνες]. Το *P. ostreatus* περιέχει μια β-γλυκάνη που ονομάζεται πλευράνη, στην οποία αποδίδονται βιβλιογραφικά και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πολυσακχαρίτες ποικίλλει ανάλογα με τα στελέχη, από 37 έως 48 g/100 g αποξηραμένου προϊόντος. Η περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες βρέθηκε σε μια έρευνα μεταξύ 27.4–39.2% στους πύλους και 35.5–50.0% στους στύπους των *P. ostreatus*, που είναι συστατικά αμφοτέρων των αδιάλυτων και διαλυτών διαιτητικών ινών (Synytsya et al., 2008).

Τα καρποσώματα των μανιταριών είναι πλούσια σε βιταμίνες, κυρίως βιταμίνη B1 και B2, βιταμίνη C και βιταμίνη D₂. Οι βιταμίνες του συμπλέγματος B είναι άφθονες και ιδιαίτερως η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη, η πυριδοξίνη, το παντοθενικό οξύ, το νικοτινικό και το φυλλικό οξύ και η κοβαλαμίνη, καθώς και άλλες βιταμίνες όπως η εργοστερόλη, η βιοτίνη, η φυτοκινόνη και τοκοφερόλες. Τα *P. ostreatus* περιέχουν περισσότερο φυλλικό οξύ, βιταμίνη B1 και βιταμίνη B3 αλλά λιγότερη βιταμίνης B12 από ό,τι άλλα είδη μανιταριών (Deeralakshmi et al., 2014).

Οι πύλοι των *P. ostreatus* έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χαλκό, σίδηρο, κάλιο, μαγνήσιο, φώσφορο και ψευδάργυρο και οι στύποι έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νάτριο. Ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητα αυτών των μετάλλων πρέπει να ελεγχθεί σε ζωικά πρότυπα και στον άνθρωπο (Deeralakshmi et al., 2014). Η γεωλογία του εδάφους σαφώς επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων αυτών στα μανιτάρια. Επιπλέον, οι συνθήκες pH, η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν την "κινητικότητα" των στοιχείων και τη διαθεσιμότητά τους σε ζώντες οργανισμούς (Kabata-Pendias, 2011). Παραδείγματος χάριν, οι συγκεντρώσεις Ni και Cr βρέθηκαν

αυξημένες σε μύκητες που αναπτύσσονται σε μεταμορφωσιγενή (σερπεντινωμένα) εδάφη στη Λέσβο, στην Ελλάδα (Alouri et al., 2011). Ανάμεσα στα επικίνδυνα μέταλλα που απαντώνται σε υποστρώματα που αποσυντίθεται από μύκητες και στα ίδια ταμανιτάρια είναι τα Hg, As, Cd, Pb, και Ag. Ταμανιτάρια που αποσυνθέτουν ξύλο περιέχουν μικρές ποσότητες Hg σε σχέση με τα καλλιεργούμενα του γένους πλευρώτους, ενώ αντίθετα εντοπίζονται πολύ μικρές ποσότητες As και Cd σε αυτά (Falandysz, 2013).

2.6 Μανιτάρια και βιταμίνη D₂

Τα οφέλη της κατανάλωσηςμανιταριών στην πρόσληψη βιταμίνης D είναι γνωστά από το 1994 όταν οι Mattila et al. ανίχνευσαν προβιταμίνη D₂ σε άγριαμανιτάρια (Mattila et al., 1994). Τα λευκάμανιτάρια καλλιεργούνται στο σκοτάδι και επομένως περιέχουν αμελητέες συγκεντρώσεις βιταμίνης D₂, 56,3 μg προβιταμίνης D₂/100 g νωπού προϊόντος, και 0,11 μg βιταμίνης D₂/100 g νωπού τροφίμου (Phillips et al., 2011). Παρόλο που φυσιολογικά η διαδικασία μετατροπής της εργοστερόλης σε βιταμίνη D₂ σταμανιτάρια περιλαμβάνει την έκθεσή τους στην ηλιακή ακτινοβολία, όταν εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ταμανιτάρια γίνονται μια άφθονη πηγή της βιταμίνης. Ως εκ τούτου, παραγωγοί έχουν αρχίσει να εκθέτουν ταμανιτάρια σε ακτινοβολία UV, ώστε να αυξήσουν την περιεκτικότητα των προϊόντων τους σε βιταμίνη D₂ (Jasinghe et al, 2005). Η διαδικασία δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, επομένως ήταν απαραίτητο να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός. Για τον σκοπό αυτό, λευκάμανιτάρια ακτινοβολήθηκαν στα πλαίσια μελέτης και τα αποτελέσματα είχαν ως εξής: χρησιμοποιώντας την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας αναγνωρίστηκε μετά από 5 min ακτινοβόλησης η προ-εργοκαλσιφερόλη, ενώ μετά από 10,6 min αναγνωρίστηκε η εργοκαλσιφερόλη ή βιταμίνη D₂. Έπειτα από 6 h ακτινοβόλησης το 24% της εργοστερόλης είχε μετατραπεί σε βιταμίνη D₂ και μετά από 11½ h, το 50% (Keegan, 2014).

2.7 Βιοδιαθεσιμότητα βιταμίνης D₂ από ταμανιτάρια

Πληθώρα τροφίμων και ποτών έχουν εμπλουτισθεί με βιταμίνη D στις Η.Π.Α. για περισσότερα από 70 χρόνια, καθώς φυσικά εμπεριέχεται σε λίγα προϊόντα. Γάλα, χυμός πορτοκαλιού, ψωμί, γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και δημητριακά έχουν κατά καιρούς ενισχυθεί σε βιταμίνη D₃. Ταμανιτάρια που έχουν εκτεθεί σε ηλιακή ή υπεριώδη ακτινοβολία συνιστούν καλή πηγή βιταμίνης D₂. Έκτοτε, έχουν διενεργηθεί κλινικές δοκιμές προκειμένου να μελετηθεί και να καθοριστεί η βιοδιαθεσιμότητα των δύο μορφών της βιταμίνης από τα εμπλουτισμένα αυτά τρόφιμα, καθώς και η αποτελεσματικότητα αυτού του εμπλουτισμού στην αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό του αίματος, αφού η

κατανάλωση εμπλουτισμένων τροφίμων θεωρείται ο πλέον ασφαλής και αποτελεσματικός τρόπος για την επίτευξη αυτού του σκοπού (Holick, 2008).

Οι Biancuzzo et al. δεν εντόπισαν διαφορά στα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό υγιών ενηλίκων που κατανάλωναν χυμό πορτοκάλι, εμπλουτισμένο με 1000 IU βιταμίνης D₂ ή 1000 IU βιταμίνης D₃, σε σύγκριση με όσους λάμβαναν αντίστοιχα συμπληρώματα D₂ και D₃. Ακόμη, δεν βρέθηκε διαφορά ανάμεσα στα άτομα που κατανάλωναν χυμό ενισχυμένο με D₂ ή D₃ (Biancuzzo, 2010). Σε άλλη έρευνα που διεξήχθη με εθελοντές που κατανάλωναν ψωμί, το προϊόν εμπλουτισμένο με βιταμίνη D₃ αύξησε τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό γυναικών τόσο αποτελεσματικά όσο και το συμπλήρωμα βιταμίνης D₃ (Natri et al, 2006). Με το ίδιο προϊόν εμπλουτισμένο με ζύμη που είχε ακτινοβοληθεί και ήταν ενισχυμένη D₂, το 2016 διεξήχθη μια τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή με υγιείς ενήλικες γυναίκες στο Ελσίνκι για 8 εβδομάδες κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Οι τέσσερις ομάδες λάμβαναν: α) εικονικό φάρμακο και συμβατικό ψωμί=0 μg D₂ or D₃/d, β) συμπλήρωμα D₂ και συμβατικό ψωμί=25μg D₂/d, γ) συμπλήρωμα D₃ και συμβατικό ψωμί=25μg D₃/d και δ) εικονικό φάρμακο και ψωμί εμπλουτισμένο με D₂=25μg D₂/d. Η D₂ λαμβανόμενη από το συμπλήρωμα ήταν πιο αποτελεσματική στην αύξηση των επιπέδων της 25(OH)D₂ του ορού από αυτή που λαμβανόταν μέσω του ψωμιού. Τα συμπληρώματα αύξησαν περισσότερο τα επίπεδα στον ορό σε σχέση με το εικονικό φάρμακο, ενώ η συμπληρωματική χορήγηση D₂ οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα 25(OH)D₃ στον ορό. Επομένως, το προϊόν δεν κατάφερε να αυξήσει τα επίπεδα της βιταμίνης στον ορό και η D₃ αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική από την D₂ (Itkonen, 2016).

Ως σήμερα, λίγες είναι οι μελέτες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D₂ προερχόμενης από ακτινοβολημένα μανιτάρια. Πρώτος ο Outila το 1999 μελέτησε την βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης που προερχόταν από άγρια εδώδιμα μανιτάρια σε άτομα με ανεπάρκεια βιταμίνης D (<25 ng/mL). Τυχαιοποίησε το δείγμα του σε τρεις ομάδες των εννέα ατόμων, οι οποίοι για διάστημα τριών εβδομάδων λάμβαναν είτε 14 mg εργοκαλσιφερόλης/d από μανιτάρια, είτε ίδια ποσότητα από συμπλήρωμα, ενώ η τρίτη ομάδα που συνιστούσε την ομάδα ελέγχου δεν λάμβανε κάποια συμπληρωματική ποσότητα. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ποσότητα προερχόμενη από τα μανιτάρια ήταν ικανή να απορροφηθεί και να αυξήσει τα επίπεδα της βιταμίνης στον ορό των εθελοντών το ίδιο αποτελεσματικά με το συμπλήρωμα, ενώ υπήρχε και σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες που λάμβαναν επιπλέον ποσότητα βιταμίνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Outila et al., 1999). Το 2011 ο Urbain ασχολήθηκε με το ίδιο θέμα, συγκρίνοντας τρεις ομάδες (συνολικά 26 Καυκάσιους ενήλικες με επίπεδα βιταμίνης <20 ng/mL), οι οποίες λάμβαναν κατά τη διάρκεια του χειμώνα τα εξής: 28,000 IU βιταμίνης D₂ από μανιτάρια που είχαν ακτινοβοληθεί με υπεριώδεις ακτίνες σε μορφή σούπας ή 28,000

IU βιταμίνης D₂ σε υγρό συμπλήρωμα, ή εικονικό φάρμακο, τέσσερις φορές την ημέρα για τέσσερις εβδομάδες. Με το πέρας της μελέτης διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα στον ορό του αίματος αυξήθηκαν σημαντικά με την κατανάλωση των μανιταριών και σε συγκρίσιμα επίπεδα με την αύξηση που προκάλεσε η λήψη του συμπληρώματος (Urbain, 2011). Το 2012 οι Stephensen et al διεξήγαγαν μια παρόμοιου σχεδιασμού έρευνα, στην οποία οι εθελοντές τυχαιοποιήθηκαν και λάμβαναν μια μερίδα μανιτάρια κάθε μέρα για έξι εβδομάδες. Οι 4 ομάδες λάμβαναν: α) μια μερίδα μη ακτινοβολημένων μανιταριών και συνιστούσαν την ομάδα ελέγχου, β) ένα γεύμα με μανιτάρια που παρείχε 352 IU βιταμίνης D₂, γ) ένα γεύμα με μανιτάρια που παρείχε 684 IU βιταμίνης D₂ ή δ) συμπλήρωμα που παρείχε 1,128 IU βιταμίνης D₂ με μη ακτινοβολημένα μανιτάρια. Στις έξι εβδομάδες, τα επίπεδα βιταμίνης D₂ είχαν αυξηθεί σε όλες τις ομάδες εκτός της ομάδας ελέγχου, αλλά παρατήρησαν σημαντική μείωση στα επίπεδα 25(OH)D₃. Το 2013 ο Keegan και συν. χρησιμοποίησαν εκχύλισμα από αποξηραμένα λευκά μανιτάρια για μελέτη παρόμοιου σχεδιασμού. Τριάντα υγιείς ενήλικες συμμετείχαν και λάμβαναν είτε 2000 IU βιταμίνης D₂ από κάψουλες, είτε 2000 IU βιταμίνης D₃ από κάψουλες, είτε 2000 IU βιταμίνης D₂ από το εκχύλισμα των μανιταριών, μια φορά την ημέρα για τρεις μήνες στη διάρκεια του χειμώνα. Εν τέλει, τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό των εθελοντών δεν διάφεραν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις τρεις ομάδες και η βιταμίνη προερχόμενη από τα μανιτάρια ήταν το ίδιο αποτελεσματική με αυτή από τα συμπληρώματα (Keegan et al., 2013).

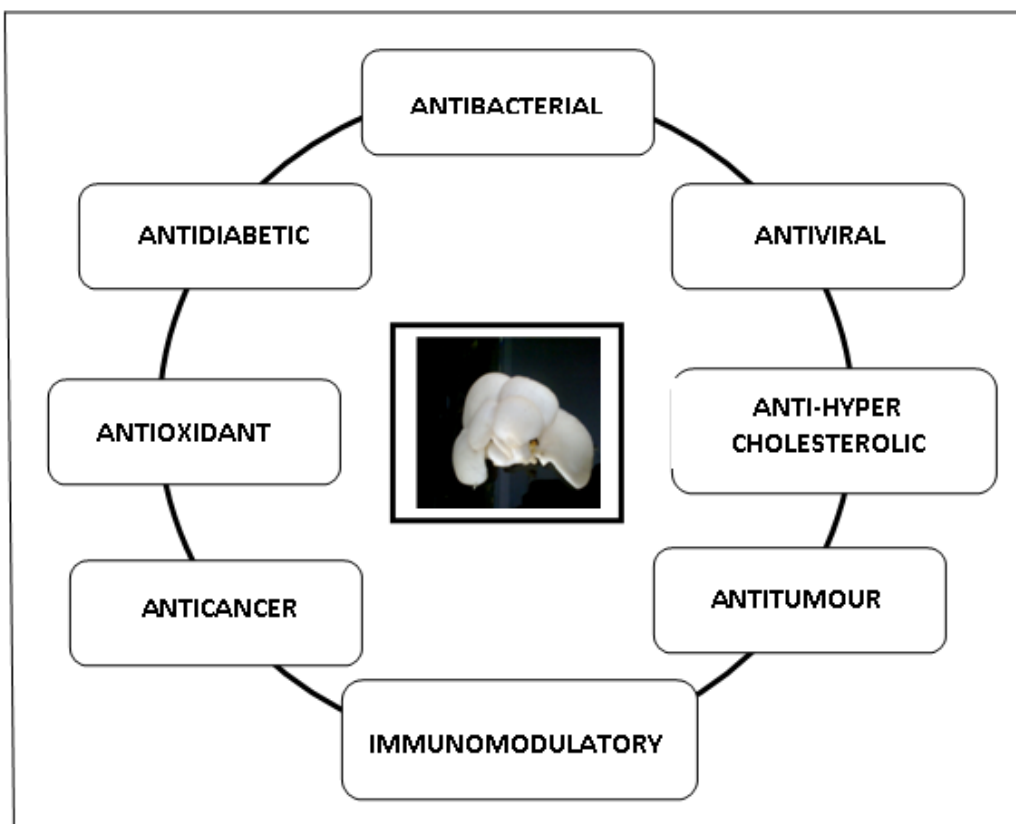
Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην συζήτηση γύρω από την αποτελεσματικότητα της χορήγησης συμπληρωματικών ποσοτήτων D₂ ή D₃ για την αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης στον ορό του αίματος. Άλλες έρευνες αναφέρουν πως η D₃ είναι πιο αποτελεσματική (Houghton et al., 2006; Heaney et al., 2011), ενώ άλλες καταλήγουν ότι η αποτελεσματικότητα των δυο μορφών είναι ίδια. Ο Holick και οι συνεργάτες διατύπωσαν το συμπέρασμα, ότι η συμπληρωματική χορήγηση 1000 IU βιταμίνης D₂ καθημερινά ήταν το ίδιο αποτελεσματική με τη χορήγηση ίδιας ποσότητας D₃ στην αύξηση και διατήρηση των επιπέδων της βιταμίνης στον ορό του αίματος. Όμοια, ο Demetriou ανέφερε ότι 50,000 IU βιταμίνης D₂ ως θεραπεία αναπλήρωσης και διατήρησης σε ασθενείς με έλλειψη βιταμίνης D αύξησε σημαντικά τα επίπεδα ορού 25(OH)D₂ και συνολικής 25(OH)D, παρόλο που διαπιστώθηκε μια μικρή μείωση στα επίπεδα ορού της 25(OH)D₃ (Demetriou, 2012).

Οι διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα των μορφών της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό πιθανά εντοπίζονται στο γεγονός ότι η μορφή D₃ και οι μεταβολίτες της έχουν μεγαλύτερη συγγένεια από τη μορφή D₂ για την ηπατική 25-υδροξυλάση, την DBP και τον VDR (Houghton, 2006).

Τα μανιτάρια όταν ακτινοβοληθούν με οποιοδήποτε τρόπο αυξάνουν το περιεχόμενό τους σε βιταμίνη D₂ και συνεπώς αποτελούν εξαιρετική εναλλακτική πηγή της βιταμίνης, ειδικά για τους χορτοφάγους. Υπάρχουν, ωστόσο, ενδοιασμοί σχετικά με το κατά πόσο είναι το ίδιο αποτελεσματική με την D₃ και για το κατά πόσο τελικά μειώνει τα επίπεδα της 25-OH D₃ στον ορό του αίματος. Ως εκ τούτου, απαιτείται περαιτέρω ερευνητική μελέτη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων (Keegan et al., 2013). Έρευνες δείχνουν πως οι καταναλωτές μπορούν να αυξήσουν την περιεκτικότητα των μανιταριών που προμηθεύονται στο εμπόριο, απλώς εκθέτοντάς τα στο ηλιακό φως πριν τα καταναλώσουν. Είναι δυνατόν να αυξηθεί η περιεκτικότητα τουλάχιστον κατά 25% με έκθεση στον ήλιο για 15 min από τις 9.30 π.μ. ως τις 15.30 μ.μ. (Feeney, 2014).

2.8 Συνολικά οφέλη υγείας από την κατανάλωση μανιταριών

Σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας από τον Solomon Wasser, πάνω από 130 φαρμακευτικές ιδιότητες αποδίδονται στα μανιτάρια, συμπεριλαμβανομένων των ακόλουθων: χημειοπροστατευτική, ανοσορυθμιστική, αντιοξειδωτική, αντι-υπερχοληστερολαιμική δράση, προστασία έναντι καρδιαγγειακών και σακχαρώδους διαβήτη, ηπατοπροστατευτική, αντι-ιική, αντιβακτηριακή, αντι-παρασιτική και αντιμυκητιακή δράση (Wasser, 2014). Παρόλο που ο αριθμός κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους είναι περιορισμένος, υπάρχει ένας ταχέως αυξανόμενος αριθμός ερευνών με ζωικά πρότυπα, οι οποίες περιγράφουν αυτά τα πιθανά οφέλη υγείας (Deeralakshmi, 2014).



Εικόνα 19. Ιδιότητες μανιταριών με οφέλη υγείας

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην εξέλιξη πολλών εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος και η ηπατοτοξικότητα. Ωστόσο, αντιοξειδωτικές ουσίες όπως οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή καθυστερούν και παρεμποδίζουν τις οξειδωτικές διεργασίες. Γενικά, τα μανιτάρια *Pleurotus* είναι πλούσια σε βιταμίνες και σελήνιο, τα οποία συνιστούν σημαντικά φυσικά αντιοξειδωτικά στα βιολογικά συστήματα. Οι Jayakumar et al., το 2010 ανέφεραν ότι, απόσταγμα μανιταριών ενίσχυσε την έκφραση του γονιδίου της καταλάσης και μείωσε την επίπτωση της οξείδωσης πρωτεϊνών που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες σε ηλικιωμένους αρουραίους, προστατεύοντας από την εμφάνιση διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία. Ακόμη, το αιθανολικό εκχύλισμα των μανιταριών εμφανίζει *in vitro* αντιοξειδωτική δράση, αναστέλλοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Jayakumar et al., 2010). Το γεγονός ότι τα *Pleurotus ostreatus* εμφανίζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, εν μέρει αποδίδεται στην υψηλή τους περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες (Mitra et al., 2013).

Ανοσορρυθμιστικές/αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Πολυάριθμες μελέτες περιγράφουν τις δράσεις των μανιταριών ή εκχυλισμάτων τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι δράσεις αυτές αποδίδονται κυρίως στις β-γλυκάνες, που εμπλέκονται στην δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα κύτταρα-φυσικοί φονείς (NK cells), τα μακροφάγα και τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα αλλά και οι κυτταροκίνες που αυτά παράγουν (Roupas, 2012). Σε έρευνα με 8 άτομα που κατανάλωναν καθημερινά εκχύλισμα μανιταριού για 12 ημέρες, διαπιστώθηκε μείωση στα επίπεδα IL-1-b (97%), TNF-a (84%), IL-17 (50%) και IL-2 (46%), ενώ οι υπόλοιπες 9 κυτταροκίνες που μελετήθηκαν, μεταξύ των οποίων η IL-6, δεν μεταβλήθηκαν. Το αποτέλεσμα αποδίδεται στην περιορισμένη απορρόφηση των β-γλυκανών κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου, στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και στο αίμα (Johnson et al., 2009).

Όταν ένα μόριο β-γλυκάνης συναντά μια ομάδα υποδοχέων, ενεργοποιείται και παράγει βακτηριοκτόνες ενώσεις, όπως λυσοζύμη και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Στη συνέχεια, τα κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες, οι οποίες ενεργοποιούν φαγοκύτταρα και λευκοκύτταρα, επάγοντας έτσι τους μηχανισμούς της ειδικής ανοσίας. Έτσι, οι γλυκάνες δρουν τόσο ως τοπικός ρυθμιστής της ανοσολογικής απόκρισης, όσο και συστηματικά, αφού οι κυτταροκίνες μεταναστεύουν στον υπόλοιπο οργανισμό από την περιοχή παραγωγής τους.

Ακόμη, οι γλυκάνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην δραστικότητα των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων, Th1 και Th2, που ρυθμίζουν ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα Th1 λεμφοκύτταρα ελέγχουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις κατά ενδοκυτταρικών παρασίτων, ενώ τα Th2 δρουν κατά εξωγενών παθογόνων. Μια διαταραχή της ισορροπίας και η επικράτηση του ενός από αυτούς τους δύο πληθυσμούς κυττάρων, δύναται να προκαλέσει μια αυτοάνοση απόκριση, όπως η υπεροχή των Th2 συνδέεται με την ανάπτυξη αλλεργικής αντίδρασης. Φαίνεται, όμως, πως οι β-γλυκάνες ενισχύουν την παραγωγή των Th1 λεμφοκυττάρων και κατ' επέκταση των αντίστοιχων κυτταροκινών που αυτά παράγουν (ιντερφερόνη γάμμα, INF-γ και ιντερλευκίνη-2, IL-2), σε βάρος των Th2 λεμφοκυττάρων και των κυτταροκινών IL-4, IL-5 και IL-13. Ωστόσο, η μελέτη του πλήρους μηχανισμού δράσης των γλυκανών επί του ανοσοποιητικού συστήματος θεωρείται ημιτελής και απαιτείται περαιτέρω έρευνα (Rop, 2009; Roupas, 2012). Μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους πιθανά ασκούν και τις χημειοπροστατευτικές δράσεις, αλλά αυτό συνιστά υπόθεση και είναι απαραίτητο να διερευνηθεί διεξοδικότερα (Roupas, 2012).

3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.1 Σκοπός της μελέτης

Για την παρούσα εργασία μανιτάρια του είδους *Pleurotus ostreatus* εκτέθηκαν σε ηλιακή ακτινοβολία προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση της περιεχόμενης βιταμίνης D₂. Ως υπόθεση εργασίας ορίσθηκε η πιθανότητα τα μανιτάρια με αυξημένη περιεκτικότητα βιταμίνης D₂ α) να αυξάνουν τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό του αίματος υγιών εθελοντών ή β) να ρυθμίζουν παράγοντες οξειδωτικού στρες ή φλεγμονής. Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της κατανάλωσης μανιταριών πλούσιων σε βιταμίνη D₂ στα επίπεδα της 25(OH)D, στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και στα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ιντερλευκίνης 6 (IL-6) στον ορό υγιών εθελοντριών.

Η παρούσα δοκιμή σχεδιάστηκε ως πιλοτική δοκιμή, προκειμένου να αξιολογηθούν: 1) η ασφάλεια στη χορήγηση του τροφίμου για το χρονικό διάστημα και την ποσότητα που ορίσθηκαν, 2) η σκοπιμότητα μιας τέτοιας δοκιμής αναφορικά με την αύξηση της βιταμίνης D στον ορό ή την επίδρασή της στο οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή, 3) οι μέθοδοι επιλογής για τη μέτρηση των παραμέτρων που τέθηκαν ως στόχοι, 4) οι μέθοδοι τυχαιοποίησης και τυφλοποίησης, 5) οι μέθοδοι για τον έλεγχο της συμμόρφωσης και τέλος 6) τα προβλήματα που αφορούν στη συμμόρφωση.

3.2 Σχεδιασμός Μελέτης

Πριν την έναρξη της παρέμβασης, το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (Πρακτικό Συνεδρίασης Επιτροπής 51/22.4.2016). Για την εξασφάλιση καλής κλινικής πρακτικής, η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές που ορίζονται από την 18^η Διακήρυξη του Ελσίνκι (Ελσίνκι, 1964) και όλες τις ισχύουσες έκτοτε τροποποιήσεις που προβλέπονται από τις παγκόσμιες ιατρικές συνελεύσεις και τις κατευθυντήριες γραμμές του ICH (the International Council for Harmonization):

- Guidance on General Considerations for Clinical Trials (CPMP/ICH/291/95)
- Directive 2001/83/EC, and all other pertinent elements outlined in current and future EU and ICH guidelines and regulations:

Οι εθελοντές που συμμετείχαν στην μελέτη αποζημιώθηκαν για τον χρόνο και τη συμμετοχή τους με δωρεάν διατροφικές συμβουλές, ανθρωπομετρήσεις και εξετάσεις αίματος. Δεν έλαβαν καμία χρηματική αποζημίωση για την συμμετοχή τους στη μελέτη.

3.3 Στάδιο προετοιμασίας

Στρατολόγηση

Για τη μελέτη στρατολογήθηκαν ενήλικες γυναίκες, που δεν έχουν φθάσει στην εμμηνόπαυση, ήταν φαινομενικά υγιείς, με ανεπάρκεια βιταμίνης D. Οι εθελόντριες ενημερώθηκαν για τη μελέτη από σχετικές ανακοινώσεις στο χώρο του Πανεπιστημίου. Οι ενδιαφερόμενες εθελόντριες επικοινωνήσαν με την επιστημονική ομάδα τηλεφωνικά ή δια ζώσης και έπειτα ορίσθηκε συνεδρία στη Μεταβολική Κουζίνα του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου για λεπτομερέστερη ενημέρωση. Η ενημέρωση πραγματοποιήθηκε από διαιτολόγο - μέλος της επιστημονικής ομάδας και περιλάμβανε αναλυτική περιγραφή του σκοπού της μελέτης, το είδος της (τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη, διπλά τυφλή), τη χρονική της διάρκεια, τα είδη των τροφίμων (Μανιτάρι συμβατικό και μη), τον τρόπο πρόσληψης του τροφίμου, τη λήψη βιολογικών δειγμάτων (αίμα), καθώς και τα κριτήρια ένταξης ή αποκλεισμού από τη μελέτη.

Τα κριτήρια που έπρεπε να πληρούν οι συμμετέχοντες για να ενταχθούν στη μελέτη είναι: α) ηλικία μεταξύ 18 και 45 ετών, β) δείκτης μάζας σώματος ΔΜΣ μεταξύ 18,5 και 26 Kg/m², γ) γυναικείο φύλο και δ) επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος από 9 έως 30 ng/mL. Κριτήρια αποκλεισμού για την ένταξη των ενδιαφερόμενων στη μελέτη αποτέλεσαν: α) διαγνωσμένη νεφρική νόσος, β) διαγνωσμένη αυτοάνοση νόσος, γ) προσκόλληση σε διατροφή χορτοφαγικού τύπου, δ) ύπαρξη ψυχιατρικής νόσου ή διανοητικών διαταραχών, ε) γυναίκες σε περίοδο εγκυμοσύνης ή γαλουχίας, στ) κατάχρηση αλκοόλ, ζ) λήψη φαρμάκων, ουσιών ή σκευασμάτων με επίδραση στην εν λόγω βιταμίνη.

Όσες από τις ενδιαφερόμενες πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης και επιθυμούσαν να συμμετέχουν υπέγραψαν το δελτίο συγκατάθεσης και ενσωματώθηκαν στη μελέτη (βλέπε παράρτημα σελ 90)

Στο πλαίσιο της μελέτης, οι εθελόντριες έπρεπε να λαμβάνουν καθημερινά 35 g αφυδατωμένων μανιταριών, συμβατικών ή μη, μαγειρεμένων κατά βούληση. Η παρέμβαση διήρκεσε και για τις δύο ομάδες 6 εβδομάδες.

Το δείγμα της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν 11 ενήλικες γυναίκες που ολοκλήρωσαν τις έξι εβδομάδες παρέμβασης. Στους Πίνακες 7 και 8 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των 11 εθελοντριών στο χρόνο 0.

Η πρώτη επίσκεψη, στο χρόνο 0, περιλάμβανε τέσσερα σκέλη: α) Λήψη πλήρους ιατρικού ιστορικού (βλ. παράρτημα σελ 91) το οποίο περιλαμβάνει λεπτομερή δημογραφικά στοιχεία και στοιχεία για κάπνισμα β) Λήψη διατροφικού ιστορικού από εκπαιδευμένους Διαιτολόγους-Διατροφολόγους με τη χρήση ενός προσαρμοσμένου ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (short FFQ), μιας

ανάκλησης εικοσιτετραώρου καθώς και του σκορ υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής (MedDietScore) (βλ παράρτημα, σελ 92-94), γ) Ακολούθησε λήψη 15mL αίματος, από το οποίο πραγματοποιήθηκε απομόνωση ορού και πλάσματος, γενική εξέταση αίματος, βιοχημικές αναλύσεις και αξιολόγηση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. δ) Τέλος, δόθηκαν λεπτομερείς οδηγίες για τη λήψη των μανιταριών (μισό σακουλάκι των 70 g κάθε ημέρα επί 6 εβδομάδες).

3.4 Στάδιο Παρέμβασης

Η κατανομή των εθελοντριών στην ομάδα που θα κατανάλωνε τα συμβατικά και στην ομάδα που θα κατανάλωνε τα μη συμβατικά μανιτάρια έγινε με τυχαίο τρόπο που εξασφάλιζε όμως ίσο αριθμό εθελοντριών σε κάθε σκέλος (1:1). Η κατάλληλη τυχαιοποίηση έγινε για να μειώσει το σφάλμα επιλογής κατά την είσοδο στη δοκιμή και ήταν κρίσιμη για την ποιότητα της τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής. Στην παρούσα οι συμμετέχοντες ταξινομήθηκαν τυχαιοποιημένα, ακολουθώντας απλή διαδικασία ένταξης σε μια από τις δύο ομάδες με τη μέθοδο των εσώκλειστων ταξινομήσεων σε διαδοχικά αριθμημένους αδιαφανείς φακέλους. Ο υπεύθυνος δεν είχε κλινική εμπλοκή στη δοκιμή και εξασφάλισε ότι οι φάκελοι ήταν αδιαφανείς, ενώ τους άνοιγε διαδοχικά και μόνο αφού το όνομα του συμμετέχοντος είχε καταγραφεί στο φάκελο. Η μελέτη ήταν διπλά τυφλή. Η τυφλοποίηση έγινε από «τρίτο φορέα» μετά από ανάθεση. Όλα τα σκεύασματά, συμβατικού και μη συμβατικού μανιταριού, είχαν παρασκευασθεί από την Εταιρεία «Μανιτάρια Δίρφυς», η οποία τα προμήθευσε στη μελέτη με κωδική ονομασία. Επρόκειτο για ατομική συσκευασία, η ποσότητα της οποίας αντιστοιχούσε σε 2 ημέρες κατανάλωσης. Τα δύο είδη μανιταριών ήταν πανομοιότητα -αφυδατωμένα και κονιοποιημένα μανιτάρια- με ίδια εμφάνιση, ίδιο μέγεθος κόκκων, ίδιο άρωμα, ίδια υφή και ίδια γεύση. Η ποσότητα μανιταριού που αντιστοιχούσε στο ένα σακουλάκι ήταν 70 g. Η κατανάλωση των μανιταριών γινόταν καθημερινά για χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων. Σε αυτό το διάστημα υπήρχε εβδομαδιαία τηλεφωνική επαφή με τις συμμετέχουσες, για να ελεγχθεί η καθημερινή κατανάλωση μανιταριών, οι πιθανές παρενέργειες, η γενική κατάσταση της υγείας τους, αλλαγές στις διατροφικές τους συνήθειες καθώς και για να απαντηθούν ερωτήματα, απορίες και προβληματισμοί των εθελοντριών. Στο χρόνο 1 (έξι εβδομάδες), οι εθελόντριες επισκέφθηκαν ξανά τις εγκαταστάσεις του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου για επανέλεγχο, όπου και επαναλήφθηκαν οι διαδικασίες του χρόνου 0.

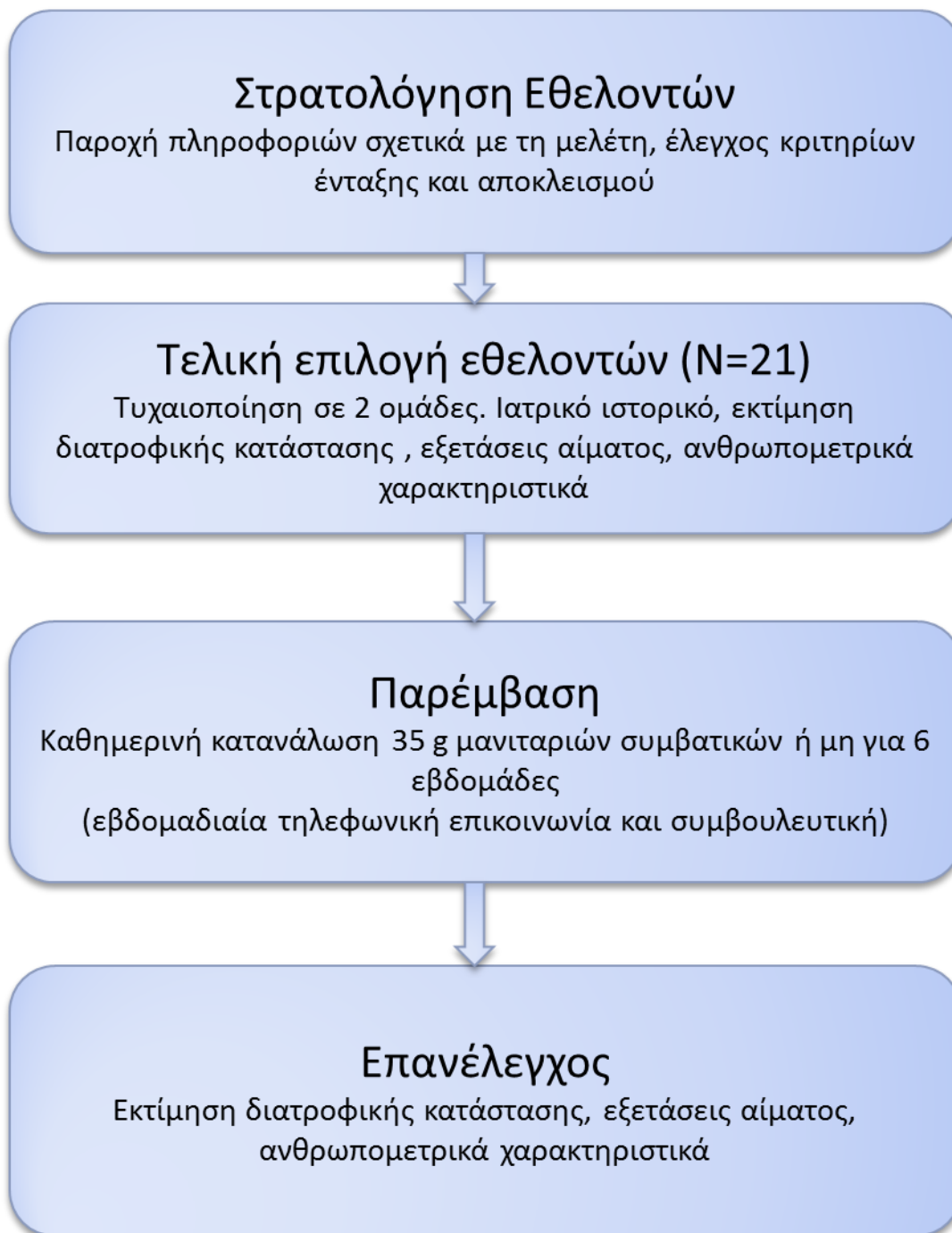
3.5 Προετοιμασία δειγμάτων διατροφικής παρέμβασης με μανιτάρια *Pleurotus ostreatus*

Σε συνεργασία με την εταιρεία παραγωγής μανιταριών «Μανιτάρια Δίρφυς», με έδρα τον Πισσώνα Ευβοίας, κατασκευάστηκε ειδική συσκευασία, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρέμβαση από τους εθελοντές. Επρόκειτο για ατομική, αεροστεγή συσκευασία που περιείχε 70g αφυδατωμένων

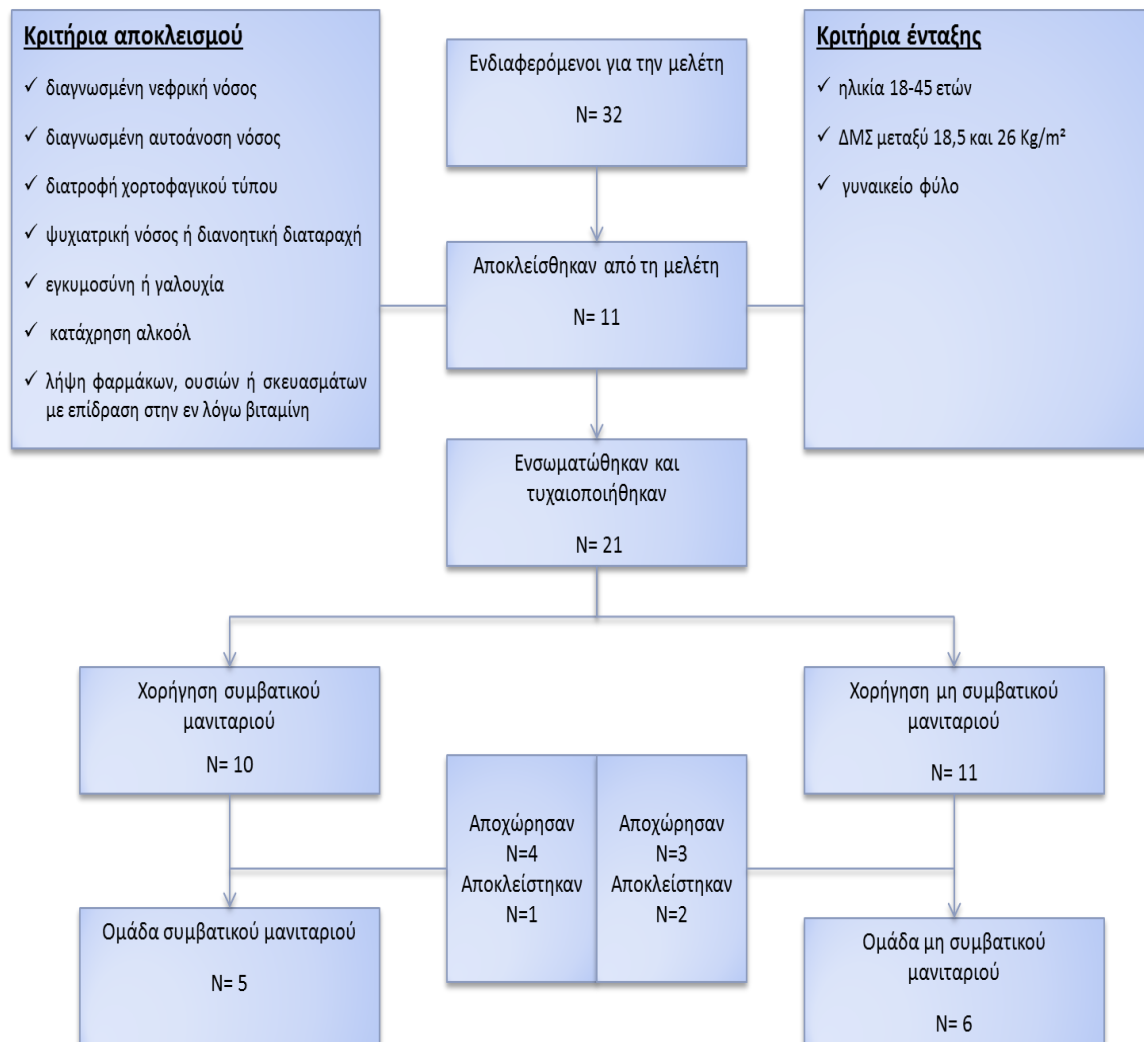
μανιταριών, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 700 g νωπού προϊόντος. Η συσκευασία αυτή ήταν πρακτική και διευκόλυνε τις εθελόντριες που συμμετείχαν στην παρέμβαση για την καλύτερη συμμόρφωση στο πρωτόκολλο.

Πίνακας 6. Πλάνο σχεδιασμού μελέτης

	Επίσκεψη 1	Επίσκεψη 2	Εβδομαδιαία τηλεφωνική επικοινωνία						Επίσκεψη 3
			1	2	3	4	5	6	
Ενημέρωση για τη μελέτη	•								
Υπογραφή συγκατάθεσης	•								
Δημογραφικά Χαρακτηριστικά		•							
Ιατρικό Ιστορικό		•							•
Φαρμακευτικό Ιστορικό		•							•
Κάπνισμα		•							•
Ανάκληση 24ώρου		•			•				•
FFQ		•							•
MedDietScore		•							
Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά		•							•
Διατροφικές συμβουλές		•	•	•	•	•	•	•	•
Αιματολογικός έλεγχος		•							•
Βιοχημικός έλεγχος		•							•
Σακουλάκια με μανιτάρια		•	•	•	•	•	•	•	
Παρενέργειες			•	•	•	•	•	•	•
Συμμόρφωση στο πρωτόκολλο			•	•	•	•	•	•	•



Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής της κλινικής παρέμβασης



Σχήμα 2. Διάγραμμα ροής της ένταξης των εθελοντών

3.6 Εργαστηριακές αναλύσεις

Απομόνωση πλάσματος και ορού: Τα δείγματα αίματος των εθελοντριών συλλέχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με πώματα (vacutainer tubes) με ή χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα, για την απομόνωση πλάσματος και ορού αντίστοιχα.

Γενική εξέταση αίματος και βιοχημικός έλεγχος: τα δείγματα πλάσματος των ασθενών αναλύθηκαν σε βιοχημικό αναλυτή (BS 200E, MINDRAY).

Μέτρηση επιπέδων IL-6 αίματος: Ο προφλεγμονώδης δείκτης IL-6 μετρήθηκε με τη μέθοδο ELISA.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού: Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των ασθενών μετρήθηκε με τη μέθοδο του θειικού χαλκού σε φωτόμετρο ELISA.

Διατροφική ανάλυση: Ανάλυση της διατροφής των εθελοντριών σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά έγινε με το πρόγραμμα Nutrient analysis.

Προσδιορισμός 25(OH)D στα δείγματα: Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης βιταμίνης D₂ στα δυο δείγματα μανιταριών έγινε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας (LC-MS/MS).

Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Μετά την αιμοληψία, το δείγμα που ελήφθη από κάθε εθελόντρια τοποθετήθηκε σε τέσσερις δοκιμαστικούς σωλήνες με πώματα (vacutainer tubes). Οι δυο από αυτούς περιείχαν αντιπηκτικό προκειμένου να παραληφθεί το πλάσμα, ενώ οι άλλοι δυο δεν περιείχαν αντιπηκτικό, απ' όπου παραλαμβάνεται ο ορός. Τα vacutainer για την απομόνωση του ορού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Το περιεχόμενο αίμα στους δοκιμαστικούς σωλήνες, φυγοκεντρήθηκε με φυγόκεντρο (20°C, 3000rpm, 10'), για το διαχωρισμό στα επιμέρους κλάσματά του και παραλήφθηκε στο υπερκείμενο ο ορός και στο υποκείμενο το πλάσμα. Μετά τη φυγοκέντρηση, το αίμα από τα vacutainer tubes που δεν περιείχαν αντιπηκτικό, μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (erpendorf) χωρητικότητας 2ml, και παραλήφθηκε το κλάσμα του ορού (7x erpendorfs). Με αντίστοιχο τρόπο, από τα vacutainer tubes που περιείχαν αντιπηκτικό, παραλήφθηκε μετά τη φυγοκέντρηση το κλάσμα του πλάσματος, το οποίο κατανεμήθηκε επίσης σε 7 erpendorfs. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους συμμετέχοντες της μελέτης. Όλα τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την εκτέλεση των απαραίτητων αναλύσεων.

Μέτρηση δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες

Για τη μέτρηση του δείκτη φλεγμονής ιντερλευκίνης 6 (IL-6) χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένο υψηλής ευαισθησίας sandwich Enzyme Linked-Immunoassay (ELISA) kit της R&D Systems Inc., Minneapolis, USA. Τα προαναφερθέντα σετ αντιδραστηρίων διατηρήθηκαν σε ψυγείο (4°C). Για την πραγματοποίηση των ανωτέρω μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από τους εθελοντές, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και ο οποίος είχε διατηρηθεί σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C).

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Προσδιορισμός των επιπέδων IL-6 ορού αίματος

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της sandwich ELISA χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων που δεσμεύονται μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων, ειδικών για το συγκεκριμένο αντιγόνο (π.χ. αντίσωμα πρόσδεσης και ανίχνευσης). Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο θέσεις σύνδεσης (αντιγονικά επιτόπια) στις οποίες μπορούν να προσδεθούν τα αντισώματα, εφόσον στην εν λόγω τεχνική χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα που δρουν ως “sandwich”. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση και την ανίχνευση των αντιγόνων μπορούν να είναι είτε μονοκλωνικά είτε πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως αντισώματα πρόσδεσης (capture antibody), με τα οποία είναι ήδη επιστρωμένες οι θέσεις των πλακών (coated plate wells). Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν μία θέση σύνδεσης με το αντιγόνο και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η επαρκής ανίχνευση (detection antibody) και ποσοτικοποίηση ακόμα και μικρών ποσοτήτων του αντιγόνου. Μετά από τη δέσμευση του αντιγόνου από τα δύο αντισώματα, που χρησιμοποιούνται ανάλογα με το προς μέτρηση αντιγόνο, ακολουθεί έκπλυση, ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δεν δεσμεύθηκε από αυτά. Ακολουθεί, συνήθως, η προσθήκη ενός ανιχνευτή (detector) για τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ αντισώματος-αντιγόνου και ανιχνευτή. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος και προστίθεται κατάλληλο υπόστρωμα με το οποίο λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Η ένταση του έγχρωμου προϊόντος που προκύπτει είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού μορίου που βρίσκεται στο δείγμα που μετρήθηκε και απορροφά, συνήθως, στα 450nm. Πλεονεκτήματα της ανάλυσης είναι ότι το προς ανάλυση δείγμα δεν απαιτείται να καθαριστεί προηγουμένως και ότι η τεχνική παρουσιάζει υψηλού βαθμού ευαισθησία.

Αναλυτική πορεία

Υλικά-Αντιδραστήρια:

- εξειδικευμένο ELISA kit για IL-6
- απιονισμένο νερό

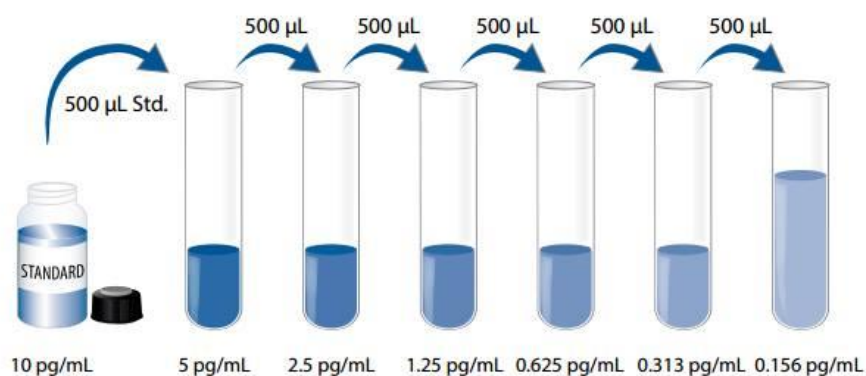
Όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA reader (Biotek PowerWave XS2)
- eppendorfs των 1,5 ml
- πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων
- αυτόματες πιπέτες και τα αντίστοιχα tips

Τα βήματα που ακολουθούνται για τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου της sandwich ELISA είναι τα εξής: Αρχικά, γίνεται προετοιμασία όλων των δειγμάτων, αντιδραστηρίων και προτύπων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Στη συνέχεια, προστίθενται 100 μ L από το διάλυμα Assay Diluent RD1-75 σε κάθε βοθρίο, αφού ανακινηθεί επαρκώς, ώστε να διαλυθεί τυχόν ίζημα που μπορεί να έχει σχηματιστεί. Έπειτα, τοποθετείται στις, ήδη επιστρωμένες με το αντίσωμα σύλληψης, θέσεις των πλακών κατάλληλη ποσότητα διαλύτη, δείγματος (αραιωμένου ή μη) ή προτύπου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, γίνεται αρχικά διάλυση του standard stock (μητρικού) διαλύματος Human IL-6 HS Standard σε 5,5 mL διαλύματος Calibrator Diluent RD6-11 Concentrate για την παρασκευή διαλύματος stock standard με συγκέντρωση 10 pg/mL. Το διάλυμα ανακινείται και αφήνεται για 15 λεπτά πριν προβούμε στις αραιώσεις. Ξεκινώντας από αυτό, πραγματοποιούνται 6 διαδοχικές αραιώσεις σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες με διαλύτη το Calibrator Diluent RD6-11 Concentrate (500 μ L). Αναμιγνύεται το περιεχόμενο κάθε σωλήνα πριν τη μεταφορά 500 μ L στον επόμενο σωλήνα.

Το ανασυσταθέν διάλυμα stock standard χρησιμεύει ως το πιο πυκνό (10 pg / mL), ενώ το μέσο αραιώσης χρησιμεύει ως τυφλό (0 pg / mL). Έτσι, προκύπτουν συγκεντρώσεις διαλύματος IL-6, 10 pg/mL 5 pg/mL 2.5 pg/mL 1.25 pg/mL 0.625 pg/mL 0.313 pg/mL 0.156 pg/mL και 0 pg/mL, οι οποίες δίνουν συγκεκριμένες τιμές απορρόφησης. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό διαγράμματος $y=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της IL-6 και y η απορρόφηση στα 490nm.

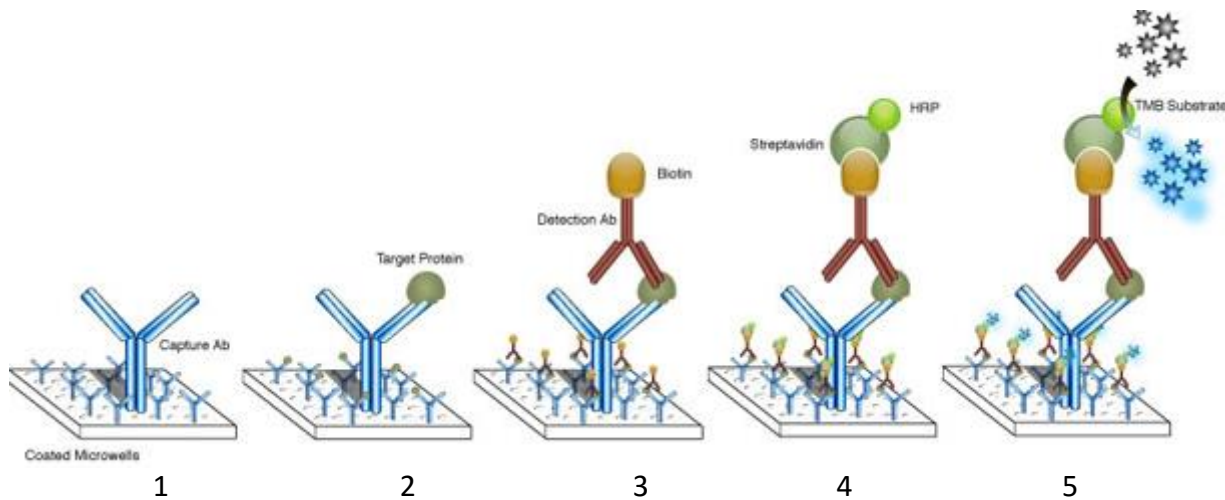


Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση των έξι διαδοχικών αραιώσεων, για τη δημιουργία διαλυμάτων IL-6 με συγκεντρώσεις 10 pg/mL 5 pg/mL 2.5 pg/mL 1.25 pg/mL 0.625 pg/mL 0.313 pg/mL 0.156 pg/mL.

Προστίθενται 100 µL από το κάθε πρότυπο ή τα δείγματα σε κάθε βοθρίο. Το πολυστυρενικό τρυβλίο (πίατο) καλύπτεται με την ειδική ταινία και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ανακινώντας σε οριζόντιο αναδευτήρα σε 500 ± 50 rpm.

Έπειτα, ακολουθεί πλύσιμο των βοθρίων του πιάτου. Αρχικά, αναποδογυρίζεται το πιάτο, ώστε να απομακρυνθούν τα υπάρχοντα υγρά. Γίνεται πλήρωση όλων των βοθρίων με 400 µL από το διάλυμα Wash Buffer, χρησιμοποιώντας μια πολυκάναλη πιπέτα, αναποδογυρίζονται ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα και ακολούθως επαναλαμβάνεται η διαδικασία έκπλυσης άλλες 5 φορές. Μετά την τελευταία έκπλυση, το πιάτο ανακινείται έντονα πάνω σε καθαρή πετσέτα επί 10 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του διαλύματος Wash Buffer. Προστίθενται 200 µL Human IL-6 HS Conjugate σε κάθε βοθρίο, καλύπτεται εκ νέου με την ειδική ταινία και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ανακινώντας σε οριζόντιο αναδευτήρα. Το διάλυμα αυτό είναι πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη IL-6, συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και περιέχει συντηρητικά. Μετά το πέρας των 2 h, επαναλαμβάνεται η διαδικασία του πλυσίματος όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Έπειτα, προστίθενται 50 µL Substrate Solution σε κάθε βοθρίο, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το προαναφερθέν ένζυμο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση πρόκειται για NADPH. Το πιάτο καλύπτεται με την ειδική ταινία και επωάζεται για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγκο εργασίας. Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε βοθρίο 50 µL Amplifier Solution, ώστε να ενισχυθεί η ανάπτυξη του χρώματος που παράγεται από την αντίδραση, καλύπτεται με την ειδική ταινία και επωάζεται στον πάγκο εργασίας για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστίθενται 50 µL Stop Solution σε κάθε βοθρίο, για να σταματήσει η αντίδραση, χωρίς να επηρεαστεί το χρώμα που έχει παραχθεί.

Η οπτική πυκνότητα του χρώματος των επιμέρους θέσεων της πλάκας προσδιορίζεται φωτομετρικά με τη συσκευή ELISA reader ρυθμισμένη στα 490nm, εντός 30 min. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων στις κατάλληλες μονάδες μέτρησης κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα δείγματα των ορών που ελήφθησαν πριν και μετά την ολοκλήρωση της παρέμβασης, ώστε να εντοπιστούν διαφορές μεταξύ των ομάδων μετά την κατανάλωση των μανιταριών.



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της sandwich ELISA. (1) Οι θέσεις της πλάκας καλύπτονται με το αντίσωμα σύλληψης. (2) Προστίθεται το δείγμα και το υπάρχον αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα σύλληψης. (3) Προστίθεται το αντίσωμα-ανιχνευτής και δεσμεύει το αντιγόνο. (4) Προστίθεται το δευτερογενές ενζυμικό αντίσωμα (ανιχνευτής) και δεσμεύεται στο αντίσωμα-ανιχνευτή. (5) Προστίθεται το υπόστρωμα και η χρωμοφόρος ομάδα του αντιδρά με τον ανιχνευτή δίνοντας χρωματομετρική αντίδραση.

4.2 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability)

Αρχή της μεθόδου

Με χρήση διαλύματος θειικού χαλκού (CuSO_4) προκαλείται οξείδωση της LDL χοληστερόλης του ορού, κατά την οποία παράγονται λιποειδικά υπεροξείδια. Η ανίχνευσή τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245 nm. Η οξείδωση της LDL χοληστερόλης αρχίζει αφού εξαντληθούν (οξειδωθούν) τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του ορού και τότε αρχίζει να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245 nm. Επομένως η μέθοδος καταγράφει τον χρόνο αντίστασης του ορού στην οξείδωση (LagTime). Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από τους εθελοντές, ο οποίος είχε διατηρηθεί σε βαθυκαταψύκτη (-80°C).

Αναλυτική πορεία

Υλικά-Αντιδραστήρια:

- απεσταγμένο νερό
- διάλυμα CuSO_4

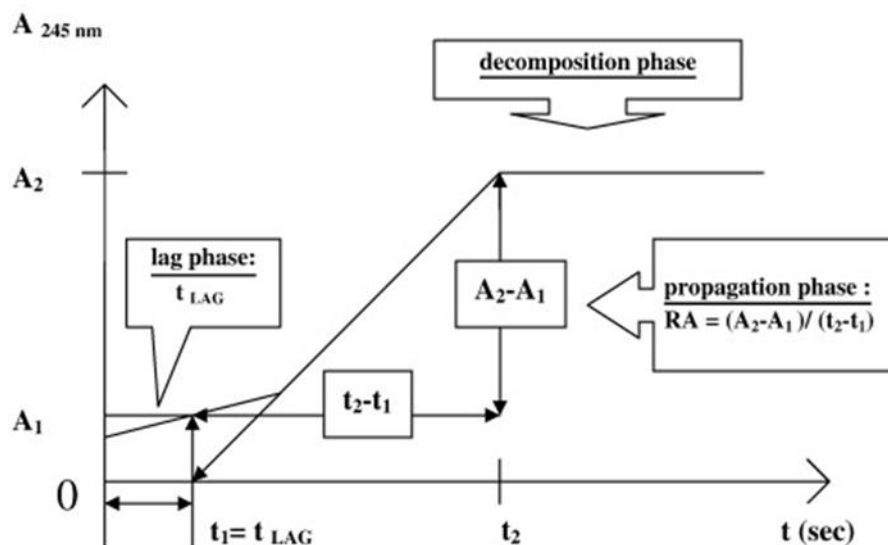
Όργανα:

- αυτόματες πιπέτες και αντίστοιχα tips
- αναλυτικός ζυγός
- vacutainer tubes
- ογκομετρική φιάλη
- συσκευή Vortex
- πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων
- φωτόμετρο ELISA reader (*Biotek PowerWave XS2*)

Παρασκευάζεται stock διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 20mM, για το οποίο ζυγίζονται 0,0125g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MW=249,68) και διαλύονται σε 2,5mL αποσταγμένου H_2O . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας CuSO_4 συγκέντρωσης 200μM, με αραιώση 1:100 του stock διαλύματος CuSO_4 με απεσταγμένο H_2O . (Δηλαδή, λαμβάνονται 20μL και αραιώνονται με απεσταγμένο H_2O έως όγκου 2000μL.) Στη συνέχεια, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα PBS, για το οποίο διαλύονται σε 1000mL απεσταγμένου νερού, 9g

NaCl, 0,9076g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2408g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και ρυθμίζεται το pH στο 7,4. Παρασκευάζεται διάλυμα ορού αραιωμένο 1:12 με PBS buffer. (Δηλαδή, λαμβάνονται 5μL ορού και αραιώνονται με PBS έως όγκου 60μL σε erpendorfs των 2mL.) Έπειτα, παρασκευάζεται μίγμα CuSO_4 και PBS, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 16μM. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν 23mL PBS και προστέθηκαν 2mL CuSO_4 . Η πολυστυρενική πλάκα που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε 96 θέσεις και είναι κατάλληλη για μετρήσεις στο υπεριώδες (ultraviolet, UV). Σε κάθε βοθρίο (well) της πλάκας τοποθετούνται 20μL αραιωμένου ορού. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230μL μίγματος PBS- CuSO_4 , η πλάκα εισάγεται στο ELISA reader που θερμοστατείται στους 37°C και γίνεται καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm ανά 2min επί 6h. Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού διεξήχθη για τα δείγματα ορού που ελήφθησαν τόσο στην αρχή της παρέμβασης όσο και κατά την ολοκλήρωση αυτής, ώστε να διερευνηθούν πιθανές διαφορές μετά την πρόσληψη των μανιταριών μεταξύ των δύο ομάδων.

Η καμπύλη που προκύπτει κατά την καταγραφή οξείδωσης ορού είναι της μορφής που φαίνεται στην Εικόνα 21. Η χρονική πορεία της οξείδωσης της LDL παρουσιάζει αρχικά μία φάση κατά την οποία δεν επέρχεται οξείδωση (lag-phase-time, χρονική υστέρηση) λόγω της παρουσίας των ενδογενών αντιοξειδωτικών του δείγματος, ακολουθούμενη από μία αύξηση της απορρόφησης, (propagation phase) λόγω του σχηματισμού συζυγών διενίων (conjugated dienes, CD) όταν εξαντληθούν τα αντιοξειδωτικά. Η αντίσταση της LDL χοληστερόλης στην οξείδωση υπολογίζεται σε αντιστοιχία με τη διάρκεια της lag phase και το ρυθμό παραγωγής CD κατά την propagation phase. Η χρονική υστέρηση καθορίζεται γραφικά ως το σημείο τομής των εφαπτομένων των τμημάτων της καμπύλης που αντιπροσωπεύουν την lag και την propagation phase (σημείο στο οποίο άρχισε να αυξάνεται η απορρόφηση). Η μέτρηση περιλαμβάνει την εύρεση του lag time σε δείγματα ορού πριν και μετά από την παρέμβαση. Εάν παρουσιασθεί αύξηση του χρόνου επαγωγής σε σχέση με αυτόν πριν από την παρέμβαση, ορίζουμε ύπαρξη αναστολής στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL, λόγω της αύξησης των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών.



Εικόνα 21. Κινητική της επαγόμενης από το χαλκό οξείδωσης των λιπιδίων του ορού *in vitro*. Η τιμή t_{LAG} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών του ορού. Η τιμή RA αντιπροσωπεύει τη μετατροπή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε υδροϋπεροξειδία (συζευγμένα διένια). A =απορρόφηση, t =χρόνος.

4.3 Προσδιορισμός 25(OH)D στα δείγματα μανιταριών

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας της βιταμίνης D_2 των δυο δειγμάτων μανιταριών έγινε στο Food Allergens Laboratory, με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας (LC-MS/MS). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Eclipse XDB C-18, μήκους 15cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και μεγέθους σωματιδίων 3,5μm και θερμοκρασία στήλης 40 °C. Ως εσωτερικό πρότυπο (I.S.) χρησιμοποιήθηκε η βιταμίνη D_3 . Η βιταμίνη D είναι φωτοευαίσθητη και για αυτό η ανάλυση διεξήχθη απουσία απ' ευθείας έκθεσης σε ηλιακό φως.

Το δείγμα ήταν σε μορφή αφυδατωμένης σκόνης. Σε σωλήνα falcon των 50mL ζυγίστηκε μάζα δείγματος περί τα 2 g. Προστέθηκαν 200 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου 250μg/mL σε μεθανόλη, 10mL ακετονιτριλίου και στη συνέχεια 4g $MgSO_4$ και 1g NaCl. Το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά με το χέρι επί 1min και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 1min. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές/min για 5 min. Τέλος, μικρή ποσότητα του υπερκείμενου υγρού διηθήθηκε από φίλτρο 0,45μm και εγχύθηκε στη συσκευή LC-MS/MS.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πριν την έναρξη της τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής, έγινε καταγραφή των ποσοτικών και των ποιοτικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού που στρατολογήθηκε. Τα χαρακτηριστικά των εθελοντριών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη (N=11) φαίνονται στους Πίνακες 7 και 8.

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά δείγματος κατά την έναρξη της παρέμβασης.

Παράμετρος	Πλήθος
Φύλο	Γυναίκες 11
Κάπνισμα	Ναι 3
	Όχι 8

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά δείγματος κατά την έναρξη και το πέρας της παρέμβασης.

Παράμετρος	Αρχή παρέμβασης		Τέλος παρέμβασης	
	Mean	S. D.	Mean	S. D.
Ηλικία (έτη)	24,27	6,15	24,27	6,15
Βάρος (kg)	58,70	8,76	58,05	9,32
Ύψος (m)	1,61	0,05	1,61	0,05
BMI (kg/m ²)	22,51	3,06	22,28	3,19
Βιταμίνη D (ng/mL)	17,55	5,29	27,54	4,80
MedDietScore	31,73	6,21	31,73	6,21
IL-6 (pg/mL)	1,85	2,91	1,46	2,83
Lag time (sec)	4169,1	465,9	4552,1	747,7

Πίνακας 9. Ανάλυση ανακλήσεων 24ώρου πριν από την παρέμβαση.

Παράμετρος	Mean	S. D.
Θερμίδες (kcal)	1618,00	764,52
Πρωτεΐνες (g)	67,53	29,30
Υδατάνθρακες (g)	214,78	102,43
Λίπος, συνολικό (g)	62,83	38,27
Κορεσμένα λιπαρά (g)	20,82	11,52
Μονοακόρεστα λιπαρά (g)	20,93	19,59
Πολυακόρεστα λιπαρά (g)	8,33	6,83
Χοληστερόλη (mg)	160,77	104,17
Διαιτητικές ίνες (g)	15,84	8,12
Βιταμίνη D (IU)	126,82	134,65

Πίνακας 10. Ανάλυση ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων πριν από την παρέμβαση.

Παράμετρος	Mean	S. D.
Θερμίδες (kcal)	1114,18	203,61
Πρωτεΐνες (g)	44,35	10,29
Υδατάνθρακες (g)	90,54	34,67
Λίπος, συνολικό (g)	64,46	18,02
Κορεσμένα λιπαρά (g)	15,79	5,08
Μονοακόρεστα λιπαρά (g)	37,51	12,26
Πολυακόρεστα λιπαρά (g)	7,18	2,04
Χοληστερόλη (mg)	114,67	32,97
Διαιτητικές ίνες (g)	17,12	9,12
Βιταμίνη D (IU)	105,43	44,44

Διατροφική κατάσταση. Ανακλήσεις 24ώρου

Στο χρόνο 0 αξιολογήθηκε η διατροφική κατάσταση των συμμετεχόντων μέσω συνέντευξης που περιλάμβανε ανάκληση 24ώρου, ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και MedDietScore. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 11. Συνολική ανάλυση ανακλήσεων 24ώρου στην αρχή, το μέσο και το τέλος της παρέμβασης.

Παράμετρος	Αρχή παρέμβασης		Μέσο παρέμβασης		Τέλος παρέμβασης	
	Mean	S. D.	Mean	S. D.	Mean	S. D.
Θερμίδες (kcal)	1618,00	764,52	1448,04	432,08	1367,37	419,00
Πρωτεΐνες (g)	67,53	29,30	55,08	19,01	57,94	27,36
Υδατάνθρακες (g)	214,78	102,43	177,66	43,17	173,46	43,56
Λίπος, συνολικό (g)	62,83	38,27	57,07	38,55	49,35	26,89
Κορεσμένα λιπαρά (g)	20,82	11,52	18,05	9,44	13,99	8,39
Μονοακόρεστα λιπαρά (g)	20,93	19,59	22,83	25,58	18,52	14,26
Πολυακόρεστα λιπαρά (g)	8,33	6,83	5,99	5,06	6,59	3,50
Χοληστερόλη (mg)	160,77	104,17	189,62	139,60	136,71	99,13
Διαιτητικές ίνες (g)	15,84	8,12	15,65	4,61	11,86	6,57
Βιταμίνη D (IU)	126,82	134,65	87,06	61,37	128,09	122,04

Πίνακας 12. Ανάλυση ανακλήσεων 24ώρου στην αρχή, το μέσο και το τέλος της παρέμβασης ανά ομάδα.

Ομάδες	Αρχή παρέμβασης		Μέσο παρέμβασης		Τέλος παρέμβασης	
	1	2	1	2	1	2
Παράμετροι						
Θερμίδες (kcal)	1431,25	1842,10	1525,77	1354,76	1365,84	1369,21
Πρωτεΐνες (g)	63,79	72,01	55,17	54,96	53,56	63,20
Υδατάνθρακες (g)	209,72	220,86	178,80	176,28	191,16	152,23
Λίπος, συνολικό (g)	51,79	76,08	62,94	50,03	42,80	57,21
Κορεσμένα λιπαρά (g)	20,00	21,80	19,47	16,35	15,15	12,60
Μονοακόρεστα λιπαρά (g)	15,47	27,49	26,25	18,74	13,83	24,15
Πολυακόρεστα λιπαρά (g)	9,95	6,39	6,63	5,23	5,89	7,43
Χοληστερόλη (mg)	132,35	194,88	179,79	201,41	115,14	162,60
Διαιτητικές ίνες (g)	16,39	15,17	13,87	17,78	13,42	9,99
Βιταμίνη D (IU)*	101,69	156,98	92,77	80,20	115,60	143,07

Σημ.: Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι. 1= ομάδα που κατανάλωνε μανιτάρια εμπλουτισμένα σε βιταμίνη D, 2= ομάδα που κατανάλωνε συμβατικά μανιτάρια. *: οι τιμές της βιταμίνης D από τις ανακλήσεις, δεν περιλαμβάνουν την βιταμίνη D από την κατανάλωση μανιταριών, αλλά μόνο από τη διατροφή

Η τεχνική της ανάκλησης 24ώρου χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Wiehl το 1942. Είναι ποσοτική μέθοδος κατά την οποία ο εξεταζόμενος καλείται να ανακαλέσει με ακρίβεια τα τρόφιμα και τα ποτά, που κατανάλωσε τις προηγούμενες 24 ώρες ή την προηγούμενη ημέρα. Στο πλαίσιο της ανάκλησης πραγματοποιήθηκε λεπτομερής περιγραφή των τροφίμων, των ποτών, ροφημάτων και αναψυκτικών που καταναλώθηκαν, οι μέθοδοι μαγειρέματος καθώς και οι εμπορικές ονομασίες των προϊόντων, όποτε αυτό ήταν δυνατό. Στην περίπτωση κατανάλωσης σύνθετων φαγητών οι ποσότητες των τροφών εκτιμώνται βάσει των επιμέρους ποσοτήτων των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή του τροφίμου και τον αριθμό των ατόμων για τα οποία προοριζόταν η συνταγή. Κατά τη πραγματοποίηση των ανακλήσεων χρησιμοποιήθηκαν και προπλάσματα τροφίμων για τη διευκόλυνση των εξεταζομένων. Η ανάκληση 24ώρου αποτελεί μια εύκολη, σύντομη και ανέξοδη διαδικασία, αλλά η εξάρτησή της από την ικανότητα των εξεταζομένων να ανακαλούν και να εκτιμούν το μέγεθος των μερίδων που έχουν καταναλώσει μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες εκτιμήσεις. Ως εκ τούτου, οι επαναλαμβανόμενες ανακλήσεις είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές από μια απλή ανάκληση, σε συνάρτηση και με το βαθμό ακριβείας που επιθυμούμε. Συμπερασματικά, μέσω επαναλαμβανομένων ανακλήσεων 24ώρου γίνεται μια εκτίμηση της συνήθους πρόσληψης σε θρεπτικά στοιχεία και λαμβάνονται ποιοτικές πληροφορίες για τη διατροφή του πληθυσμού που εξετάζεται (Μανιός, 2006).

Από τις 3 ανακλήσεις 24ώρου που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η συνολική πρόσληψη θερμίδων και μακροθρεπτικών συστατικών μειώθηκε στο μέσο και το τέλος της παρέμβασης σε σχέση με την αρχική αναφορά. Αυτό δικαιολογείται, καθώς οι συμμετέχουσες άρχισαν να καταναλώνουν τα ξηρά μανιτάρια, οπότε αναπόφευκτα περιόρισαν την πρόσληψη κάποιου γεύματος. Παράλληλα, προσδιορίστηκε το ενεργειακό περιεχόμενο των αποξηραμένων μανιταριών με θερμιδόμετρο οβίδας (Κολονίτσιου, 2016), και βρέθηκε ότι τα μανιτάρια αποδίδουν περίπου 423 kcal/100 g ξηρού βάρους, επομένως τα 35 g αποξηραμένα μανιτάρια, αποδίδουν 148 kcal.

Συνυπολογίζοντας το ποσό αυτών των θερμίδων με τον μέσο όρο της θερμιδικής πρόσληψης κατά το μέσο και το τέλος της παρέμβασης, διαπιστώνεται ότι στην πραγματικότητα οι διατροφικές συνήθειες των εθελοντριών πριν και μετά τη παρέμβαση δεν μεταβλήθηκαν. Συνεπώς, λόγω της συνέπειας μεταξύ των αποτελεσμάτων από τις τρεις ανακλήσεις 24ώρου, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από αυτές θεωρούνται αξιόπιστες.

Εκτός του θερμιδικού περιεχομένου, στα δείγματα της παρέμβασης έγινε προσδιορισμός των β-γλυκανών, που είναι γνωστό ότι βρίσκονται σε σημαντικά ποσά σεμανιτάρια του γένους *Pleurotus*. Βρέθηκε ότι τα αποξηραμέναμανιτάρια περιέχουν κατά μέσο όρο 33 g β-γλυκάνες/ 100 g δείγματος (Κολονίτσιου, 2016) δηλαδή, το 1/3 της ποσότηταςμανιταριών που κατανάλωναν κάθε ημέρα οι εθελόντριες αποτελούσαν από β-γλυκάνες. Οι β-γλυκάνες είναι υδατοδιαλυτές φυτικές ίνες με μεγάλο ιξώδες, που βρίσκονται κυρίως στη βρώμη και το κριθάρι. Βιβλιογραφικά οι ιξώδεις φυτικές ίνες φαίνεται ότι είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματικές στην προαγωγή του κορεσμού και τη βραχυπρόθεσμη μείωση της ενεργειακής κατανάλωσης σε σχέση με τις υπόλοιπες φυτικές ίνες (Ho et al., 2015). Φαίνεται ότι η κατανάλωση τωνμανιταριών επέφερε αίσθημα πληρότητας και κορεσμού και απέτρεπε την κατανάλωση άλλου γεύματος, οδηγώντας έτσι σε ρύθμιση της θερμιδικής πρόσληψης. Οι εθελόντριες, συνεπώς, δεν μετέβαλαν την συνολική ποσότητα θερμίδων που κατανάλωναν αλλά την ποιότητα αυτών, βελτιώνοντας το προφίλ της διατροφής τους.

Όταν τα δεδομένα από τις ανακλήσεις 24ώρου μελετήθηκαν ανά ομάδα, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε αντίστοιχη πτωτική τάση για τη συνολική θερμιδική κατανάλωση. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η κατανάλωση τωνμανιταριών κάλυπτε τις θερμίδες που υπολείπονται, όταν συγκριθεί η θερμιδική πρόσληψη στην αρχή και το τέλος της παρέμβασης. Πριν την έναρξη της παρέμβασης η ομάδα 1 είχε μέσο όρο κατανάλωσης 1431 kcal, ενώ η ομάδα 2 είχε 1842 kcal. Αυτή η διαφορά οφείλεται σε δυο ακραίες τιμές που εντοπίστηκαν σε κάθε μια από τις δυο ομάδες και μετέβαλαν αντίστοιχα τους μέσους όρους, καθώς οι ημέρες που ελήφθησαν οι ανακλήσεις δεν συνιστούσαν τυπικές ημέρες για τις εθελόντριες. Δεδομένου όμως του χρονικού περιορισμού, η κατανάλωση τωνμανιταριών έπρεπε να ξεκινήσει την επομένη της συνάντησης για την εκάστοτε εθελόντρια. Επιπλέον, για να θεωρηθεί η ανάκληση 24ώρου αντιπροσωπευτική και αξιόπιστη θα πρέπει να διεξαχθεί μια τυχαία ημέρα. Ως εκ τούτου, δεν ήταν δυνατή η επανάληψη της συνέντευξης προκειμένου να ληφθεί ανάκληση τυπικής ημέρας και χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα της αρχικής συνέντευξης. Θεωρούμε, επομένως, πως οι δυο ομάδες ήταν ομοιογενείς ως προς τις διατροφικές τους συνήθειες στην αρχή της παρέμβασης.

Διατροφική κατάσταση. Συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων

Τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων αποτυπώνουν τη συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων και ποτών για χρονικό διάστημα περίπου 6 μηνών πριν τη συνέντευξη και μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη συνήθη διαιτητική πρόσληψη του εξεταζόμενου και τις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού. Αποτελεί μια απλή διαδικασία, σύντομη και ανέξοδη, και πιο αντιπροσωπευτική αναφορικά με τη συνήθη πρόσληψη σε σχέση με την ανάκληση 24ώρου, καθώς παρέχονται πληροφορίες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η εξάρτησή τους, όμως, από τη μνήμη των εξεταζόμενων ή την τάση τους να υποεκτιμούν ή να υπερεκτιμούν την πρόσληψή τους μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες εκτιμήσεις. Προκειμένου να περιοριστεί το συγκεκριμένο σφάλμα, κατά την πραγματοποίηση των συνεντεύξεων χρησιμοποιήθηκαν και προπλάσματα τροφίμων για τη

διευκόλυνση των εξεταζόμενων. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα τα εκάστοτε ερωτηματολόγια να μην περιλαμβάνουν τρόφιμα που οι εξεταζόμενοι καταναλώνουν συστηματικά και λόγω της ομαδοποίησης των τροφίμων να μειώνεται η ακρίβεια των διαιτητικών πληροφοριών (Μανιός, 2006).

Ο μέσος όρος της θερμιδικής πρόσληψης και οι μέσοι όροι πρόσληψης μακροθρεπτικών συστατικών, όπως προκύπτουν από την ανάλυση των ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, αποκλίνουν σημαντικά από αυτούς των ανακλήσεων. Θεωρώντας το συνδυασμό των πληροφοριών που λήφθηκαν από τις τρεις ανακλήσεις περισσότερο αντιπροσωπευτικό της πραγματικής κατανάλωσης τροφίμων σε σχέση με αυτές του ερωτηματολογίου, η διαφορά που εντοπίζεται μεταξύ αυτών οφείλεται στις διαφορές των μεθόδων και στα σφάλματα που εμπεριέχουν, και πιο συγκεκριμένα στην υποεκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης εκ μέρους των εθελοντών.

Διατροφική κατάσταση. Συμμόρφωση με το πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής

Δεδομένου του ερευνητικού ενδιαφέροντος που έχει συγκεντρώσει το πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής αναφορικά με την πρόληψη και την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών, έχουν σχεδιαστεί ερωτηματολόγια που αποτιμούν το βαθμό τήρησης της Μεσογειακής διατροφής. Ένα τέτοιο είναι το MedDietScore, του οποίου η κλίμακα βαθμολόγησης κυμαίνεται από 0 έως 55, με τις μεγαλύτερες τιμές να υποδηλώνουν και μεγαλύτερη προσκόλληση στο πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής (Panagiotakos, 2006). Στα πλαίσια της πιλοτικής αυτής δοκιμής υπολογίστηκε το MedDietScore για κάθε εθελόντρια και ο μέσος όρος για το συνολικό δείγμα βρέθηκε ίσος με 32, που υποδεικνύει ότι υπάρχει ικανοποιητική προσκόλληση των εθελοντριών στο πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής. Δεδομένης της μικρής χρονικής διάρκειας της μελέτης, δεν είναι σφάλμα αν θεωρήσουμε ότι μέχρι το πέρας αυτής, οι διατροφικές συνήθειες δεν μεταβλήθηκαν ώστε να απαιτηθεί επαναξιολόγηση του βαθμού τήρησης της Μεσογειακής διατροφής.

Διατροφική αξία μανιταριών

Όπως αναφέρθηκε ήδη, παράλληλα με την κλινική δοκιμή πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διατροφικής αξίας των μανιταριών (Κολονίτσιου, 2016). Αρχικά, προσδιορίστηκε το ενεργειακό περιεχόμενο των αποξηραμένων μανιταριών με θερμιδόμετρο οβίδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, τα μανιτάρια αποδίδουν περίπου 423 kcal/100 g ξηρού βάρους, επομένως τα 35 g ξερά μανιτάρια, αποδίδουν 148 kcal. Εκτός του θερμιδικού περιεχομένου, στα δείγματα της παρέμβασης έγινε προσδιορισμός των β-γλυκανών και βρέθηκε ότι τα ξερά μανιτάρια περιέχουν κατά μέσο όρο 33 g β-γλυκάνες/ 100 g δείγματος δηλαδή, το 1/3 της ποσότητας μανιταριών που κατανάλωναν οι εθελόντριες κάθε ημέρα αποτελούνταν από β-γλυκάνες.

Προσδιορισμός των στερολών με GC-MS σε εκχυλίσματα των μανιταριών που κατανάλωναν οι εθελόντριες έδειξαν ότι η κύρια στερόλη σε όλα τα δείγματα ήταν η εργοστερόλη σε συγκεντρώσεις ίσες με 461 και 345 mg/100 g επί ξηρού στα δείγματα συμβατικών και μη συμβατικών μανιταριών, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε δηλαδή μείωση της εργοστερόλης κατά 25% στα δείγματα μη συμβατικών μανιταριών, που είχαν παραμείνει στον ήλιο επί 3 h, γεγονός αναμενόμενο αφού η ηλιακή ακτινοβολία επάγει τη μετατροπή της εργοστερόλης σε βιταμίνη D₂. Αντίστοιχα, τα δείγματα διέφεραν και στην περιεχόμενη βιταμίνη D₂, με τα μανιτάρια που είχαν παραμείνει στον ήλιο να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα (6,6 mg/Kg έναντι 1,5 mg/Kg των συμβατικών μανιταριών). Η ποσότητα των 35 g που

κατανάλωναν καθημερινά οι εθελόντριες αντιστοιχούσε σε 52,5 μg βιταμίνης D για την ομάδα που κατανάλωνε συμβατικά μανιτάρια και 231 μg βιταμίνης D για την ομάδα που κατανάλωνε μη συμβατικά μανιτάρια. Δεδομένα από τη μελέτη EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) που αξιολόγησε τη διατροφική πρόσληψη 25 θρεπτικών συστατικών σε κατοίκους 10 Ευρωπαϊκών χωρών, έδειξε πως στην Ελλάδα η μέση ημερήσια πρόσληψη βιταμίνης D για τις γυναίκες ήταν περίπου 100 μg (Freisling, 2010), επομένως η θεωρητικά προσλαμβανόμενη βιταμίνη D₂ από τα μη συμβατικά μανιτάρια υπερβαίνει τη μέση ημερήσια πρόσληψη που κατέγραψε η μελέτη EPIC για τις Ελληνίδες.

Αναλύσεις με GC-MS στα μεθανολικά εκχυλίσματα των μανιταριών που κατανάλωναν οι εθελόντριες κατέδειξαν την παρουσία συνολικά 13 απλών πολυφαινόλων και στα δυο είδη δειγμάτων, ενώ μερικές φαινόλες όπως το σιναπικό οξύ, το p-OH βενζοϊκό οξύ, η ρεσβερατρόλη, το p- κουμαρικό οξύ ήταν ελαφρά αυξημένες στα δείγματα των μη συμβατικών μανιταριών (Κολονίτσιου, 2016). Παρόλο που οι συγκεντρώσεις των συνολικών φαινολικών, που προσδιορίστηκαν φωτομετρικά, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των συμβατικών και μη συμβατικών μανιταριών (μέσος όρος ολικών φαινόλων 110 mg GAE/100 g dw), στα δείγματα των μη συμβατικών μανιταριών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH ($p=0,0077$) (Κολονίτσιου, 2016). Επομένως, και τα δυο είδη μανιταριών εμφάνισαν αντιοξειδωτική ικανότητα και πιθανά τα δείγματα των μη συμβατικών μανιταριών να εμφανίζουν πιο αυξημένη σε σχέση με τα συμβατικά και έτσι να επηρεάζουν την αντιοξειδωτική κατάσταση του ορού των εθελοντριών και στις δυο ομάδες της παρέμβασης.

Παράμετρος	Συμβατικά	Μη συμβατικά
Θερμίδες (kcal/100g ξηρού)	423	423
Εργοστερόλη (mg/100g ξηρού)	461	345
Βιταμίνη D (mg/kg)	1,5	6,6
β-γλυκάνες (g/100g ξηρού)	33	33
Ολικές φαινόλες (mg GAE/100g ξηρού)	110	110

Βιταμίνη D

Για την αξιολόγηση της βιοδιαθεσιμότητας της βιταμίνης D από τα μανιτάρια μετρήθηκαν τα επίπεδα 25OHD στον ορό των εθελοντριών. Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων πριν και μετά την παρέμβαση με συμβατικά και μη μανιτάρια.

Πίνακας 13. Επίπεδα 25OHD (ng/mL) στον ορό των εθελοντριών πριν και μετά την παρέμβαση με συμβατικά και μη μανιτάρια.

Μη συμβατικό						Συμβατικό					
Χρόνος 0		Χρόνος 1		Μεταβολή(%)		Χρόνος 0		Χρόνος 1		Μεταβολή(%)	
Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
18,70	6,39	28,79	5,57	35,03	14,83	16,16	3,82	26,04	3,72	37,95	2,71

Από τα δεδομένα που αποτυπώνονται στον πίνακα φαίνεται ότι παρόλο που υπήρχε αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης στον ορό των εθελοντριών, η αύξηση ήταν παρόμοια και για τις 2 ομάδες (μεταβολή της τάξης του 35%). Το εύρημα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο, αφού όπως προαναφέρθηκε τα δυο δείγματα μανιταριών διέφεραν σημαντικά ως προς την περιεχόμενη βιταμίνη D₂. Επομένως, η ηλιοφάνεια και η συνεπαγόμενη επιδερμική σύνθεση βιταμίνης D υπερκάλυψαν την όποια απορρόφηση της βιταμίνης D₂ από τα μανιτάρια. Ως εκ τούτου, η αύξηση της βιταμίνης στον ορό του αίματος των εθελοντριών δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην βιοδιαθεσιμότητά της από το προϊόν, λόγω της ύπαρξης αυτού του συγχυτικού παράγοντα.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε η ερευνητική εργασία των Stepien et al. (2013), στην οποία μελετήθηκαν υγιείς ενήλικες κάτοικοι του Δουβλίνου, οι οποίοι χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες που λάμβαναν είτε 15 µg βιταμίνης D₂ από σκόνη εμπλουτισμένων μανιταριών που είχαν ακτινοβοληθεί με υπεριώδεις ακτίνες είτε εικονική σκόνη μανιταριών, ενώ άλλες δυο ομάδες λάμβαναν είτε 15 µg βιταμίνης D₃ από συμπλήρωμα είτε εικονικό φάρμακο, καθημερινά επί 2 μήνες. Η βιταμίνη D₂ από τα μανιτάρια ήταν βιοδιαθέσιμη και αύξησε τα επίπεδα 25(OH)D₂ του αίματος, χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα της συνολικής βιταμίνης (Stepien, 2013). Αντίθετα, ο Urbain (2011) σε μελέτη παρόμοιου σχεδιασμού, συνέκρινε τρεις ομάδες (συνολικά 26 Καυκάσιους ενήλικες με επίπεδα βιταμίνης <20 ng/mL), οι οποίες λάμβαναν κατά τη διάρκεια του χειμώνα τα εξής: 28,000 IU βιταμίνης D₂ από μανιτάρια που είχαν ακτινοβοληθεί με υπεριώδεις ακτίνες σε μορφή σούπας ή 28,000 IU βιταμίνης D₂ σε υγρό συμπλήρωμα, ή εικονικό φάρμακο, τέσσερις φορές την ημέρα για τέσσερις εβδομάδες. Με το πέρας της μελέτης διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα στον ορό του αίματος αυξήθηκαν σημαντικά με την κατανάλωση των μανιταριών και σε συγκρίσιμα επίπεδα με την αύξηση που προκάλεσε η λήψη του συμπληρώματος (Urbain, 2011).

Φλεγμονή

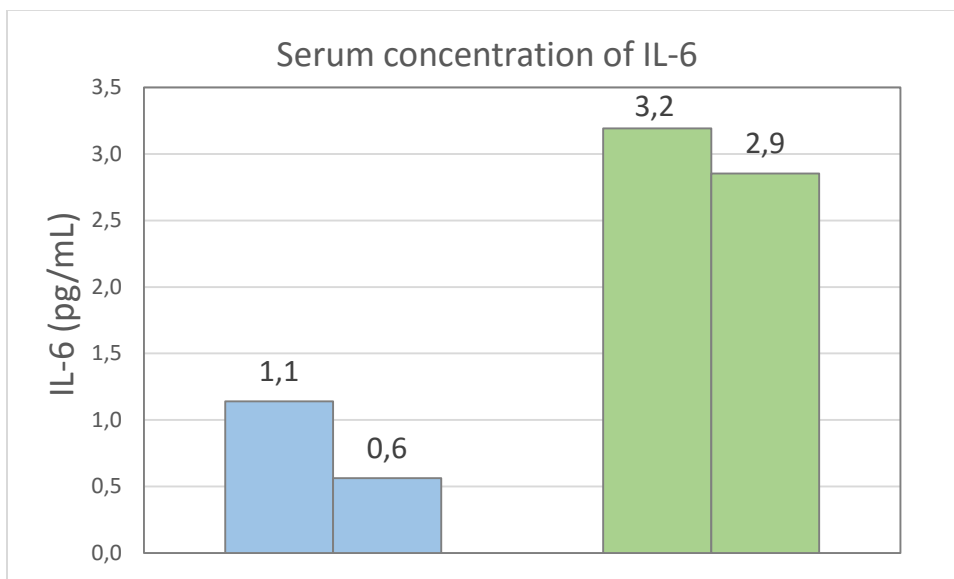
Για την αξιολόγηση των επιπέδων της φλεγμονής μετρήθηκαν τα επίπεδα ιντερλευκίνης -6 (IL-6) στον ορό των εθελοντριών. Στον Πίνακα 14, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων πριν και μετά την παρέμβαση με συμβατικά και μη μανιτάρια.

Πίνακας 14. Επίπεδα IL-6 (pg/mL) στον ορό των εθελοντριών πριν και μετά την παρέμβαση με συμβατικά και μη μανιτάρια.

Μη συμβατικό						Συμβατικό					
Χρόνος 0		Χρόνος 1		Μεταβολή(%)		Χρόνος 0		Χρόνος 1		Μεταβολή(%)	
Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
1,14	1,38	0,6	0,4	-50,72	70,84	3,19	4,31	2,85	4,40	-10,7	2,1

Από τα δεδομένα που αποτυπώνονται στον πίνακα φαίνεται ότι υπάρχει τάση μείωσης των επιπέδων της IL-6 στον ορό των εθελοντών τόσο στην ομάδα που κατανάλωνε τα συμβατικά μανιτάρια, όσο και στην ομάδα που κατανάλωνε τα μη συμβατικά μανιτάρια. Παρόλα αυτά, το ποσοστό μείωσης διαφέρει, καθώς στην ομάδα των μη συμβατικών μανιταριών η μείωση είναι της τάξης του 51%, ενώ στην ομάδα των συμβατικών μανιταριών η μείωση είναι της τάξης του 11%. Το σχήμα 3 αναπαριστά τη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ως μέσο όρο της % διαφοράς της IL-6 πριν και μετά την παρέμβαση.

Δεδομένα για την IL-6 από ερευνητικές εργασίες σε υγιείς πληθυσμούς αναφέρουν ποικίλες τιμές στον ορό του αίματος. Σε έρευνα που διεξήχθη το 1997 η μέση τιμή IL-6 για την ομάδα ελέγχου που αποτελούσαν από 20 υγιείς ενήλικες ήταν 1,6 pg/mL (εύρος τιμών 0,2-4,7) (D' Auria, 1997). Σε μελέτη του Gannagé-Yared (2003) τα επίπεδα IL-6 σε μετεμνηνοπαυσιακές υγιείς γυναίκες ήταν $2,19 \pm 1,16$ pg/mL. Σε Ιαπωνική μελέτη του 2014, τα επίπεδα IL-6 στον ορό αίματος 61 υγιών γυναικών ηλικίας 44 ± 13 ετών ήταν $0,49 \pm 0,58$ pg/mL (Sun, 2014). Την ίδια χρονιά, σε μελέτη σε υγιείς ενήλικες, οι οποίοι θα υπόκειντο σε συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης D, μετρήθηκαν τα επίπεδα IL-6 στον ορό του αίματος πριν την παρέμβαση και βρέθηκαν τιμές που κυμαίνονταν από $0,98 \pm 0,40$ pg/mL έως $1,56 \pm 0,27$ pg/mL (Barker, 2014). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα επίπεδα της συγκεκριμένης κυτταροκίνης επηρεάζονται από παράγοντες που υποβάλλουν τον οργανισμό σε στρες και αυξάνουν τα επίπεδα φλεγμονής, όπως η ηλικία, προϋούσης της οποίας τα επίπεδα IL-6 αυξάνονται, καθώς και το κάπνισμα, αφού στους καπνιστές ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης (Aldaham, 2015; Puzianowska-Kuznicka, 2016). Επομένως, τα επίπεδα IL-6 που ανιχνεύσαμε στο δείγμα της παρούσας ερευνητικής μελέτης κυμαίνονται εντός φυσιολογικών ορίων, δεδομένων και των παραγόντων που επηρεάζουν τα επίπεδά της.



Σχήμα 3. Με μπλε χρώμα παριστάνεται το δείγμα που κατανάλωνε μη συμβατικά μανιτάρια (1), με πράσινο το δείγμα που κατανάλωνε συμβατικά μανιτάρια (2). Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι. Για το δείγμα (1) η μείωση της συγκέντρωσης της IL-6 ήταν 51% (εύρος τιμών 0,3-3,6pg/mL στη baseline και

0,2-1,0pg/mL στο τελικό σημείο). Για το δείγμα (2) η μείωση της συγκέντρωσης της IL-6 ήταν 11% (εύρος τιμών 0,5-9,6pg/mL στη baseline και 0,3-9,4pg/mL στο τελικό σημείο).

Οι κυτταροκίνες αποτελούν σηματοδοτικά μόρια των κυττάρων, απαραίτητα για τη ρύθμιση όλων των ανοσολογικών αποκρίσεων. Κυκλοφορούν στον οργανισμό σε συγκεντρώσεις της τάξεως των pg/mL που μπορεί να αυξηθούν ως και 1.000 φορές ως απόκριση σε προκλήσεις του ανοσοποιητικού, όπως είναι η φλεγμονή. Μια ομάδα κυτταροκινών, που ονομάζονται προφλεγμονώδεις, διαμεσολαβεί στις καταστάσεις φλεγμονής (Azizieh,2016). Στην ομάδα αυτή ανήκει η IL-6, μια ομοδιμερής κυτταροκίνη η οποία παράγεται από μια ποικιλία κυττάρων, όπως μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου, ινοβλάστες, ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, ή από άλλες κυτταροκίνες (IL-1 και TNF), ως απόκριση σε μικροβιακή προσβολή, τραύμα ή ιστική βλάβη. Η IL-6 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσική όσο και στην ειδική ανοσία. Ως προς τις βιολογικές της δράσεις στη φυσική ανοσία, επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης από τα ηπατοκύτταρα, καθώς και την παραγωγή ουδετερόφιλων από πρόδρομες σειρές του μυελού των οστών. Στην ειδική ανοσία, η IL-6 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων που παράγουν αντισώματα, αλλά και την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων. (Damjanov, 2009). Η ενεργοποίηση της έκφρασής της εγείρεται από τραυματισμό ιστού ή από στρεσογόνες καταστάσεις, όπως η έκθεση σε ακτινοβολία, τα μικροβιακά προϊόντα, οι ιοί ή άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Dmitrieva et al., 2016). Ως εκ τούτου, το μόριο αυτό θεωρείται από τους βασικούς διαμεσολαβητές της φλεγμονής.

Πληθώρα μελετών αναφέρουν ότι η διατήρηση επαρκών επιπέδων βιταμίνης D στον οργανισμό είναι προϋπόθεση για την πρόληψη ασθενειών, εφόσον η βιταμίνη μετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων. Ο πιθανός ρόλος της βιταμίνης στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος υποστηρίζεται από την ταυτοποίηση υποδοχέων της στα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων, των δενδριτικών κυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων. Επομένως, επαρκή επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό συνδράμουν στην εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των κυτταροκινών (Azizieh,2016).

Ειδικότερα, *in vivo* και *in vitro* πειράματα αποδεικνύουν ότι η βιταμίνη επάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας TGF β-1 και IL-4) και καταστέλλει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, IFN-γ, IL-2 και TNF-α). Ακόμη, η βιταμίνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των μακροφάγων, καθώς η ανεπάρκειά της σχετίζεται με διαταραγμένη χημειοταξία και φαγοκυττάρωση και προς τα πάνω ρύθμιση των υποδοχέων TLR των μονοκυττάρων, γεγονός που επάγει τη φλεγμονή (Azizieh,2016).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει την IL-6 ως δείκτη φλεγμονής προκειμένου να αξιολογηθεί η σχέση της με τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό του αίματος, όμως τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Έρευνες *in vitro* έχουν δείξει ότι η ενεργός μορφή της βιταμίνης D καθώς και ανάλογά της είναι ικανά να αναστείλουν την παραγωγή της IL-6 σε διάφορους ανθρώπινους κυτταρικούς τύπους, όπως κερατινοκύτταρα, μονοκύτταρα κύτταρα, κύτταρα νησιδίων του παγκρέατος, ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς, κύτταρα ενδομητρίου και καλλιέργειες ινοβλαστών ρινικών πολυπόδων (Muller, 1991; Komine, 1999; Riachy,2001; Xue, 2002; Arroyo, 2003;

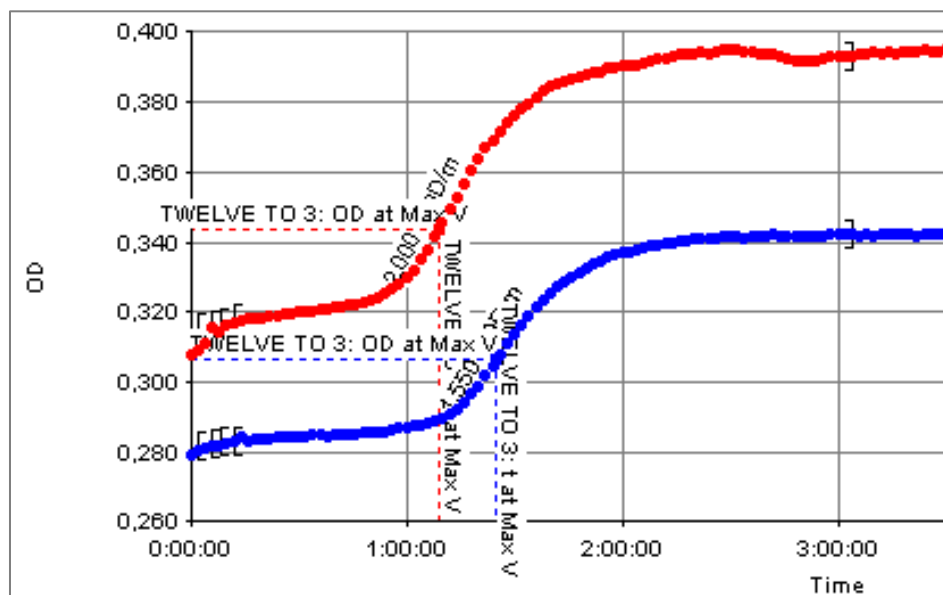
Equils, 2006; Evans, 2006; Rostkowska-Nadolska, 2010). Ταυτοχρόνως, μελέτες *in vivo* δεν έχουν επιτύχει να αποδείξουν παρόμοια δράση της βιταμίνης D στα επίπεδα κυκλοφορούσας IL-6.

Έρευνα με 118 υγιείς ενήλικες γυναίκες δεν κατάφερε να δείξει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων βιταμίνης D στον ορό του αίματος και κάποια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη, παρόλο που φάνηκε ότι στις γυναίκες με ανεπάρκεια βιταμίνης D και υψηλά επίπεδα CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, δείκτης φλεγμονής) υπήρχε εντονότερη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α and IL-8) σε σχέση με τις γυναίκες με χαμηλή CRP και επάρκεια βιταμίνης (Azizieh, 2016). Μελέτη παρατήρησης σε 69 υγιείς γυναίκες έδειξε ότι τα επίπεδα IL-6 δεν είχαν στατιστικά σημαντική σχέση με τα επίπεδα βιταμίνης D, όμως φαίνεται πως υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ τους ($p=0,0909$) (Peterson, 2008). Τέλος, παρόμοια αποτελέσματα έδειξε έρευνα σε 47 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες μετά από 12 εβδομάδες συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα κυκλοφορούσας IL-6 (Gannagé-Yared, 2003). Τέτοια ασαφή αποτελέσματα στη βιβλιογραφία δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω ερευνητική μελέτη, ώστε να αποσαφηνιστεί η πιθανή σχέση της βιταμίνης D και της φλεγμονής.

Πρόσφατες βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις για τις ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες των μανιταριών, παρέχουν πληθώρα δεδομένων που συνηγορούν στο ότι η κατεργασία καλλιεργειών ανθρώπινων κυτταρικών με β-γλυκάνες από μανιτάρια οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της IL-6 (Dalonso, 2015; Meng, 2016). Ωστόσο, έρευνα στην οποία εθελοντές κατανάλωναν 60 mL εκχυλίσματος μανιταριού πλούσιου σε β-γλυκάνες για 12 ημέρες έδειξε μια πτωτική τάση στα επίπεδα IL-6, γεγονός που σημαίνει ότι η πτωτική τάση που διαπιστώθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία μπορεί εν μέρει να οφείλεται στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των μανιταριών που καταναλώθηκαν από τους εθελοντές (Johnson, 2009). Λόγω των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή περισσότερων μελετών *in vivo*, προκειμένου να καταστεί σαφής η ανοσορρυθμιστική δράση των μανιταριών και των επιμέρους συστατικών τους.

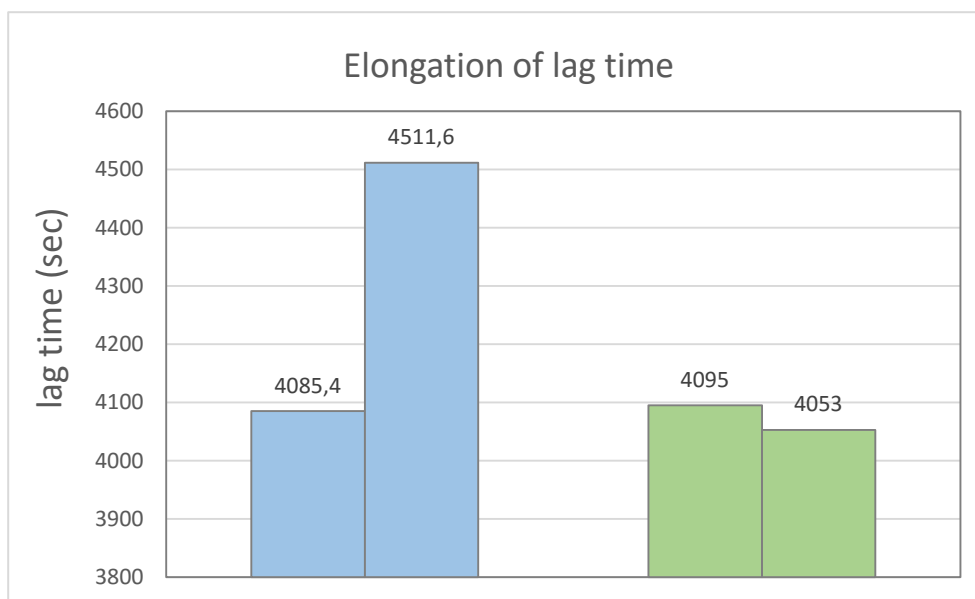
Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες των εθελοντών εκτιμήθηκε βάσει της ικανότητας οξειδωτικής τροποποίησης του ορού *ex vivo* χρησιμοποιώντας θειϊκό χαλκό. Για το σκοπό αυτό συγκρίθηκε ο λανθάνων χρόνος ή χρόνος επαγωγής (lag time), δηλαδή ο χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση σε sec, πριν και μετά την παρέμβαση στις δύο ομάδες (Kaliora et al., 2013). Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται η μορφή των γραφημάτων που προέκυψε για κάθε δείγμα.



Σχήμα 4. Κινητική μελέτη της επιδεκτικότητας της LDL χοληστερόλης σε οξείδωση από θειικό χαλκό, υπό παρακολούθηση της παραγωγής συζυγών διενίων μέσω λήψης μετρήσεων κάθε 2 min επί 6 h στους 37°C. Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί σε δείγμα ορού που λήφθηκε στο τέλος της παρέμβασης και η κόκκινη γραμμή σε δείγμα ορού από την έναρξη της παρέμβασης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο τέλος της παρέμβασης, το lag time του ορού των εθελοντών της ομάδας που κατανάλωνε τα μη συμβατικά μανιτάρια είναι σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνο στην αρχή της παρέμβασης, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται για την ομάδα που κατανάλωνε συμβατικά μανιτάρια. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται και γραφικά στο σχήμα 5.



Σχήμα 5. Επιμήκυνση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση. Μπλε χρώμα αντιστοιχεί στο δείγμα που κατανάλωνε μη συμβατικά μανιτάρια (1), και πράσινο στο δείγμα που κατανάλωνε συμβατικά μανιτάρια (2). Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι. Για το δείγμα (1) ο χρόνος επαγωγής αυξήθηκε κατά μέσο όρο 425, 6 sec (εύρος τιμών 3727-4454 sec στη baseline και 4161-4907sec στο τελικό σημείο). Για το δείγμα (2) δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του χρόνου επαγωγής (κατά μέσο όρο - 42 sec, εύρος τιμών 3313-4568 sec στη baseline και 3587-4391 sec στο τελικό σημείο).

Παρουσία θεικού χαλκού οι LDL-λιποπρωτεΐνες του ορού των εθελοντών οξειδώνονται με αποτέλεσμα την παραγωγή συζυγών διενίων που απορροφούν στα 245 nm. Για να συμβεί αυτό θα πρέπει να έχουν προηγουμένως εξαντληθεί (οξειδωθεί) τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του ορού. Έτσι, για τον υπολογισμό της αντίστασης του ορού στην οξείδωση υπολογίζεται ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να αρχίσει η παραγωγή των συζυγών διενίων, η καθυστέρηση δηλαδή στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού, μετρημένος σε sec (Kaliora et al., 2013). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων πριν και μετά την παρέμβαση με συμβατικά και μη μανιτάρια φαίνονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15. Επιμήκυνση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση πριν και μετά τη παρέμβαση με συμβατικό και μη μανιτάρι.

Μη συμβατικό						Συμβατικό					
Χρόνος 0		Χρόνος 1		Μεταβολή(%)		Χρόνος 0		Χρόνος 1		Μεταβολή(%)	
Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
4085	293	4512	346	10,4	18,1	4095	682,18	4053	417	-1,0	38,9

Τα δεδομένα σχετικά με τους δείκτες οξειδωτικού στρες σε υγιή πληθυσμό με ανεπάρκεια βιταμίνης D είναι περιορισμένα. Παρόλα αυτά η υποκατάσταση με συμπλήρωμα βιταμίνης D σε πολλές ασθένειες φαίνεται να έχει θετικές επιδράσεις στην οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού. Συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης D₃ σε ζωικά πρότυπα που έπασχαν από πολλαπλή σκλήρυνση είχε θετική επίδραση σε δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως αυτοί μετρήθηκαν με την μέτρηση των επιπέδων μηλονικής διαλδεΰδης (Tarbali, 2015). Από την άλλη πλευρά, γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, υπέρβαρες και με ανεπάρκεια βιταμίνης D, βελτίωσαν τους δείκτες οξειδωτικού στρες μετά από συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D διάρκειας 8 εβδομάδων, καθώς μειώθηκε η συγκέντρωση μηλονικής διαλδεΰδης στο πλάσμα και αυξήθηκε η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (Foroozanfard, 2015). Σε ασθενείς με NAFLD, η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης D οδήγησε σε βελτίωση των επιπέδων της στον ορό του αίματος και εν συνεχεία και σε μείωση των επιπέδων μηλονικής διαλδεΰδης στον ορό του αίματος (Sharifi, 2014).

Ταυτόχρονα, βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η συστηματική κατανάλωση κάποιων ειδών μανιταριών έχει επιδράσεις στους δείκτες οξειδωτικού στρες σε κύτταρα. Η χορήγηση εκχυλίσματος των θεραπευτικών μανιταριών *A. brasiliensis* και *G. Lucidum* σε λευκοκύτταρα ποντικών έδειξε αύξηση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων και μείωση των επιπέδων TBARS, που σηματοδοτούν τις αντιοξειδωτικές δράσεις των μανιταριών στα κύτταρα (Yurkin, 2015). Επομένως, τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες στις εθελόντριες της παρούσας εργασίας μπορεί να οφείλονται και στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μανιταριών που καταναλώθηκαν και να μην εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης D.

Η οξείδωση είναι μια διαδικασία που προκύπτει φυσιολογικά στο ανθρώπινο σώμα όταν το οξυγόνο αντιδρά σε μόρια, όπως οι υδατάνθρακες ή τα λιπαρά και παράγεται ενέργεια. Σε περίπτωση μειωμένης οξείδωσης ή μειωμένης παραγωγής ενέργειας, τα κύτταρα αδυνατούν πλέον να λειτουργήσουν επαρκώς και ο κυτταρικός θάνατος είναι φυσικό επακόλουθο. Αυτές οι καθ' όλα φυσιολογικές διαδικασίες, έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή βραχύβιων ενδιάμεσων προϊόντων, που καλούνται ελεύθερες ρίζες και μπορεί να είναι ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species,

ROS) ή αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), οι οποίες πολλές φορές επάγουν αλυσιδωτές αντιδράσεις, προξενώντας τελικά βλάβες στα μακρομόρια (Palmieri, 2010).

Τα βιολογικά συστήματα προκαλούνται συνεχώς από ενδογενείς ή εξωγενείς προ-οξειδωτικούς παράγοντες. Οι ιστοί του ανθρώπινου σώματος προστατεύονται με ενζυμικούς ή μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες, που αποτελούν τα φυσικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού και απομακρύνουν ή αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, αποτρέποντας την πρόκληση κυτταρικής βλάβης (Palmieri, 2010). Αντιοξειδωτικά που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και βρίσκονται φυσιολογικά στον οργανισμό είναι τα μεταλλοένζυμα (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση) και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (τοκοφερόλη, β-καροτένιο, ουβικινόνη, βιταμίνη C, γλουταθειόνη, λιποϊκό οξύ, ουρικό οξύ, μεταλλοθειονίνη) (Palmieri, 2007).

Οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν η ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών αλλάζει υπέρ των προοξειδωτικών παραγόντων. Τα κύτταρα καταπολεμούν το μέτριο βαθμού οξειδωτικό στρες, ρυθμίζοντας προς τα πάνω τη σύνθεση αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων. Ωστόσο, σε καταστάσεις σοβαρού οξειδωτικού στρες, αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου και σιδήρου, καταστρέφεται το γενετικό υλικό και οι βιολογικές μεμβράνες λόγω υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες θρυμματίζονται και καταστρέφονται. Ακόμη, τα κύτταρα τραυματίζονται και ίσως επέλθει και κυτταρικός θάνατος (Giammarioli, 1999; Palmieri, 2007).

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν ότι ορισμένες παθολογικές καταστάσεις μπορεί να προληφθούν ή να αποτραπούν με αλλαγές στη διατροφή, που περιλαμβάνουν κυρίως αύξηση της κατανάλωσης φρούτων, λαχανικών και δημητριακών ολικής άλεσης. Η προστατευτική δράση αυτών των τροφίμων αποδίδεται στα περιεχόμενα αντιοξειδωτικά τους, όπως οι βιταμίνες E και C, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες.

Το πρώτο πρόβλημα στη προσπάθεια αξιολόγησης της κατάστασης οξειδωτικού στρες είναι η εύρεση κατάλληλων δεικτών που μπορούν μονοσήμαντα να ποσοτικοποιήσουν το φαινόμενο. Ένας τρόπος είναι ο άμεσος υπολογισμός των ROS, υπό μορφή ελευθέρων ριζών, αλλά αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία με περιορισμένη εφαρμογή, κυρίως λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής τους και της υψηλής δραστηριότητάς τους. Η τεχνική ανίχνευσης ελευθέρων ριζών περιλαμβάνει τη χρήση φασματοσκοπίας συντονισμού ηλεκτρονικού spin (ESR φασματοσκοπία), διαδικασία ευαίσθητη, ακριβή και δύσκολη στην εφαρμογή. Λόγω της πολυπλοκότητας αυτών των αναλύσεων, γίνεται συνήθως ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων της αντίδρασης των ελευθέρων ριζών (Giammarioli, 1999; Palmieri, 2007).

Η έκταση της οξείδωσης των λιπαρών μπορεί να καθοριστεί είτε από την παραγωγή πρωτογενών προϊόντων αυτής της αντίδρασης, όπως των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων είτε δευτερογενών προϊόντων, όπως είναι η μηλονική διαλδεΰδη (MDA). Η μέθοδος του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) βασίζεται στην αντίδραση δυο μορίων TBA με ένα μόριο μηλονικής διαλδεΰδης, η οποία αποτελεί μια κεταλδεΰδη που παράγεται από την υπεροξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων ως παραπροϊόν του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ως αποτέλεσμα της αντίδρασης παράγεται χρωμοφόρο προϊόν που απορροφά στα 532 nm και ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά. Η μέθοδος αυτή έχει κατηγορηθεί ως μη ειδική και ευαίσθητη για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων μηλονικής διαλδεΰδης. Σε περίπτωση που το θειοβαρβιτουρικό οξύ χρησιμοποιείται για την ανίχνευση άλλων προϊόντων της οξείδωσης

λιπιδίων, όπως αλδεΐδες ή ισοπροστανίνα, η μέθοδος ονομάζεται TBARS (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances). Η ανίχνευση των τελικών προϊόντων γίνεται σε συσκευή GC-MS ή LC-MS, με τη μέθοδο όμως να εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία. Η οξειδωτική βλάβη του DNA συνήθως αξιολογείται με μέτρηση της συγκέντρωσης της 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνης, μιας οξειδωμένης μορφής της γουανίνης που αποτελεί προϊόν του κατεστραμμένου DNA και δύναται να προκαλέσει μεταλλάξεις (8-OHdG). Η επίδραση των ROS στις πρωτεΐνες οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων, όπως 3-νιτροτυροσίνη, 3-χλωροτυροσίνη και παρα-υδροξυ-φαινυλακεταλδεΐδη, αλλά οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες της βλάβης των πρωτεϊνών είναι οι καρβονυλικές ενώσεις (Palmieri, 2007).

Στην παρούσα ερευνητική εργασία επιλέχθηκε η μέθοδος ελέγχου του οξειδωτικού στρες των εθελοντών μέσω της ικανότητας οξειδωτικής τροποποίησης του ορού *ex vivo* χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό παράγοντα τον θειικό χαλκό. Η μέθοδος είναι τεχνικά απλή και τα αποτελέσματα επιτρέπουν τη συσχέτιση μιας παρέμβασης lifestyle, όπως η παρούσα, με την προστασία από την οξείδωση κυρίως της LDL και την επακόλουθη προστασία από χρόνιες νόσους. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες παρόμοιου σχεδιασμού όπως στην εργασία των Kanellios et al. (2013), στην οποία μελετήθηκε η επίδραση κατανάλωσης σταφίδων από υγιείς εθελοντές και διαπιστώθηκε επιμήκυνση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση μετά τη χορήγησή τους.

Δυνατά σημεία και περιορισμοί

Περιορισμό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε το μικρό δείγμα της, όπως και η μικρή διάρκεια παρέμβασης. Ακόμη, περιορισμό συνιστά και το χρονικό διάστημα κατά το οποίο αυτή έλαβε χώρα, δηλαδή τους μήνες Μάρτιο έως Μάιο. Η ηλιοφάνεια και η συνεπαγόμενη επιδερμική σύνθεση βιταμίνης D υπερκάλυψαν την όποια απορρόφηση της βιταμίνης D₂ από τα μανιτάρια. Ως εκ τούτου, η αύξηση της βιταμίνης στον ορό του αίματος των εθελοντριών δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην βιοδιαθεσιμότητά της από το προϊόν, λόγω της ύπαρξης αυτού του συγχυτικού παράγοντα. Από την άλλη μεριά, δεν διαπιστώθηκε τοξικότητα από την καθημερινή κατανάλωση 35 g ξηρών μανιταριών, που αντιστοιχούν σε ποσότητα 350 g νωπών μανιταριών. Δεδομένου ότι βιβλιογραφικά δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για την καθημερινή κατανάλωση αντίστοιχων ποσοτήτων μανιταριών, η συνεισφορά της μελέτης αυτής είναι σημαντική.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως η κατανάλωση μανιταριών με αυξημένη περιεκτικότητα σε βιταμίνη D έναντι των συμβατικών μπορεί να επιδρά ευεργετικά στη μείωση των επιπέδων φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Δεδομένου ότι δε διαπιστώθηκε διαφορά στη βιοδιαθεσιμότητα της περιεχόμενης βιταμίνης D μεταξύ των δυο προϊόντων, απαιτείται ο σχεδιασμός κλινικής δοκιμής με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών που να λάβει χώρα κατά την περίοδο της ελάχιστης ηλιακής ακτινοβολίας (Δεκέμβριος-Φεβρουάριος).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΜΕ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΕ D

Επώνυμο :

Όνομα :

Πατρώνυμο :

Διεύθυνση κατοικίας.....

Τηλέφωνο :

Δηλώνω ότι επιθυμώ να συμμετέχω στην κλινική μελέτη με τίτλο:

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΜΕ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΕ D». Έχω ενημερωθεί για

τον τρόπο διενέργειας της εξέτασης και διαβεβαιωθεί ότι δεν θα έχω οικονομική ή άλλη επιβάρυνση. Κατόπιν τούτων, συγκατατίθεται να συμμετέχω στη μελέτη.

Επ. Υπεύθυνος

Μάρτυρας

Εθελοντής

**Νικόλαος
Καλογερόπουλος**

Αθήνα,/...../.....

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Κωδικός ασθενούς

Όνομα: Επώνυμο:

Τηλέφωνο οικίας:

Κινητό:

Έτος γέννησης:

Οικογενειακή κατάσταση:

Παντρεμένος ανύπαντρος διαζευγμένος χήρος

Έτη εκπαίδευσης:

Ένα έως εννέα χρόνια (1-9) εκπαίδευσης

Δέκα έως δώδεκα (10-12) χρόνια εκπαίδευσης

Πάνω από δώδεκα (>12) χρόνια εκπαίδευσης

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ		
Καπνίζετε;	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Πόσα χρόνια είστε καπνιστής;		
Πόσα τσιγάρα ημερησίως;		
ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ		
Λήψη φαρμακευτικής αγωγής	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Φυσιολογική νεφρική λειτουργία	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Ιστορικό στεφανιαίας νόσου	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Ιστορικό ΑΕΕ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Περιφερική αγγειοπάθεια	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Χρόνια διάρροια, Νόσος του πεπτικού	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Οξεία λοίμωξη/Λήψη αντιμικροβιακής θεραπείας τους τελευταίους 3 μήνες	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Αυτοάνοσα νοσήματα/Ανοσοκαταστολή	ΝΑΙ	ΟΧΙ

ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	1 ^η Επίσκεψη	2 ^η Επίσκεψη
Ύψος (cm):		
Βάρος (Kg)		
Περιφέρεια μέσης (cm)		
Περιφέρεια ισχίων (cm)		
Ποσοστό λιπώδους μάζας (%)		
ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ		
Συστολική ΑΠ (mmHg)		
Διαστολική ΑΠ (mmHg)		
Σφίξεις (min ⁻¹)		

Τρόφιμα	Συχνότητα κατανάλωσης	Μέγεθος μερίδας
Λημητριακά ολικής αλέσεως Ψωμί Ζυμαρικά Ρύζι δημητριακά πρωινού Φρυγανιές		
Πατάτες Βραστές Ψητές Τηγανητές		
Φρούτα και χυμούς φρέσκα φρούτα αποξηραμένα φρούτα Χυμοί		
Λαχανικά και σαλάτες Ωμά Βρασμένα		
Οσπρια		
Ψάρι και σουπές Ψητό Βραστό Τηγανητό		
Κόκκινο κρέας και προϊόντα του Κρέας Αλλαντικά		
Πουλερικά Κρέας Αλλαντικά		
Γαλακτοκομικά πλήρη σε λιπαρά Γάλα Γιαούρτι λευκά τυριά κίτρινα τυριά		
Ελαιόλαδο στην καθημερινή Μαγειρική		
Αλκοολούχα ποτά Κρασί Μπύρα Άλλο		
Αναψυκτικά		Coca-cola ☐ NAI ☐ OXI Sprite ☐ NAI ☐ OXI Ανθρακούχοι χυμοί ☐ NAI ☐ OXI Χωρίς ζάχαρη ☐ NAI ☐ OXI
Καφέ καθημερινά τύπος καφέ φλιτζάνια/ημέρα		☐ NAI ☐ OXI ☐ Ελληνικός ☐ Νεζ / cappuccino ☐ Φίλτρου ☐ 0-1 (60 gr καφεΐνης) ☐ 1-2 ☐ 3-5 ☐ 5+
Τσάι καθημερινά Φλιτζάνια/ημέρα		☐ NAI ☐ OXI ☐ 0-1 (60 gr τεινής) ☐ 1-2 ☐ 3-5 ☐ 5+

Λημητριακά ολικής άλεσης: 1 slice bread (size of toast), 2 toast, 1 small nut, half nut large, half cup of rice or pasta, **Πατάτες:** ½ cup of boiled potatoes, ½ cup mashed potatoes, potato in half medium (100 grams), 1 cup (60 grams) fried potatoes, **Φρούτα & χυμοί:** 1 medium piece of fruit - similar sized tennis ball. Examples: 1 small apple (80 grams), 1 small banana (60 grams), 1 medium orange (100 grams), 2 small apricots, 1 medium peach, 1 and ¼ cup of strawberries, 12 cherries, 17 small grapes, 1 slice watermelon or cantaloupe (200 grams), **Λαχανικά & σαλάτες:** 1 cup of raw leafy vegetables, ½ cup of other vegetables or steamed vegetables (about 100 grams), **Οσπρια:** 1 cup, **Ψάρι, κρέας, κοτόπουλο:** 120 grams (approximately equivalent in size 4 matchboxes), **Γαλακτοκομικά πλήρη σε λιπαρά:** 1 cup milk, 1 cup of yogurt (180 grams), 30 grams of cheese, **Αλκοόλ:** 100 ml glass of wine = 1 or equivalent of 12% ethanol

ΑΝΑΚΛΗΣΗ 24 ΩΡΟΥ

ΓΕΥΜΑ	ΤΡΟΦΙΜΟ (...../...../.....)	ΤΡΟΦΙΜΟ (...../...../.....)	ΤΡΟΦΙΜΟ (...../...../.....)
ΠΡΩΙΝΟ			
ΔΕΚΑΤΙΑΝΟ			
ΜΕΣΗΜΕΡΙΑΝΟ			
ΑΠΟΓΕΥΜΑΤΙΝΟ			
ΒΡΑΔΙΝΟ			
ΠΡΟ ΥΠΝΟΥ			

Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ MedDietScore						
Πόσο συχνά καταναλώνετε τα παρακάτω τρόφιμα;	Συχνότητα Κατανάλωσης (μερίδες/εβδομάδα)					
1. Δημητριακά ολικής αλέσεως (π.χ. ψωμί, ζυμαρικά, ρύζι, κλπ)	Ποτέ	1-6	7-12	13-18	19-31	>32
	0	1	2	3	4	5
2. Πατάτες	Ποτέ	1-4	5-8	9-12	13-18	>18
	0	1	2	3	4	5
3. Φρούτα και χυμούς	Ποτέ	1-4	5-8	9-15	16-21	>22
	0	1	2	3	4	5
4. Λαχανικά και σαλάτες	Ποτέ	1-6	7-12	13-20	21-32	>33
	0	1	2	3	4	5
5. Όσπρια	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
6. Ψάρι και σουπές	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
7. Κόκκινο κρέας και προϊόντα του	≤1	2-3	4-5	6-7	8-10	>10
	5	4	3	2	1	0
8. Πουλερικά	≤3	4-5	5-6	7-8	9-10	>10
	5	4	3	2	1	0
9. Γαλακτοκομικά πλήρη σε λιπαρά	≤10	11-15	16-20	21-28	29-30	>30
	5	4	3	2	1	0
10. Ελαιόλαδο στην καθημερινή μαγειρική	Ποτέ	Σπάνια	<1	1-3	3-5	Καθημερινά
	0	1	2	3	4	5
11. Αλκοολούχα ποτά (mL/ημέρα, 100 mL = 1 ποτήρι 12%)	<300	300	400	500	600	>700 ή 0
g αιθανόλης	<36	36	48	60	72	84
mL αιθανόλης	<45,63	45,63	60,84	76,05	91,26	106,46
	5	4	3	2	1	0

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aldaham S, Foote JA, Chow HH, Hakim IA. Smoking Status Effect on Inflammatory Markers in a Randomized Trial of Current and Former Heavy Smokers. *Int J Inflam*. 2015;2015:4393-96
- Alkerwi A. et al. Prevalence and Correlates of Vitamin D Deficiency and Insufficiency in Luxembourg Adults: Evidence from the Observation of Cardiovascular Risk Factors (ORISCAV-LUX) Study. *Nutrients* .2015; **7**(8): 6780-6796.
- Aloia J. F. The 2011 Report on Dietary Reference Intake for Vitamin D: Where Do We Go From Here? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; **96**(10):2987–2996.
- Aloupi M, Koutrotsios G, Koulousaris M, Kalogeropoulos N Trace metal contents in wild edible mushrooms growing on serpentine and volcanic soils on the island of Lesbos, Greece. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011;**78**:184–194.
- Alvarez J. A. et al. Vitamin D status is independently associated with plasma glutathione and cysteine thiol/disulphide redox status in adults. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014; **81**(3): 458-466.
- Apperly F. L. The Relation of Solar Radiation to Cancer Mortality in North America. *American Association for Cancer Research*. 1941;**(1)**: 191-195.
- Arroyo CM, Kan RK, Burman DL, Kahler DW, 21. Nelson MR, Corun CM, Guzman JJ, Broomfield CA. Regulation of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6 and interleukin-8 induced by sulfur mustard (HD) on human skin cells. *Pharmacol Toxicol*. 2003 May;**92**(5):204-13
- Asemi Z. et al. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2013; **98**(6): 1425-1432.
- Avenell A. et al. Vitamin D supplementation to prevent infections: a sub-study of a randomised placebo-controlled trial in older people (RECORD trial, ISRCTN 51647438). *Age Ageing*. 2007; **36**(5): 574-577.
- Akyuz M, Kirbag S. Nutritive value of wild edible and cultured mushrooms. *Turk J Biol*. 2010; **34**: 97–102
- Aw T.C. Vitamin D Measurements — Facts and Fancies *Proceedings of Singapore Healthcare*. 2013; Volume 22(Number 3): 227-234.
- Azizieh F., Alyahya O.K., Raghupathy R. Association between levels of vitamin D and inflammatory markers in healthy women. *Journal of Inflammation Research*. 2016;**9** 51–57
- Barker T, Rogers EV, Levy M, Templeton J, Goldfine H, Schneider DE, Dixon MB, Henriksen TV, Weaver KL. Supplemental vitamin D increases serum cytokines in those with initially low 25-hydroxyvitamin D: A randomized, double blind, placebo-controlled study. *Cytokine*. 2015; (**71**):132–138

- Barker, T.; Martins, T.B.; Hill, H.R.; Kjeldsberg, C.R.; Dixon, B.M.; Schneider, E.D.; Henriksen, V.T.; Weaver, L.K. Circulating pro-inflammatory cytokines are elevated and peak power output correlates with 25-hydroxyvitamin D in vitamin D insufficient adults. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013;113, 1523–1534.
- Bergman P. et al. Vitamin D and Respiratory Tract Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One.* 2013; **8**(6): 65835.
- Bergman P. et al. Vitamin D3 supplementation in patients with frequent respiratory tract infections: a randomised and double-blind intervention study. *BMJ Open.* 2012; **2**(6).
- Biancuzzo RM, Young A, Bibuld D, Cai MH, Winter MR, Klein EK, et al. Fortification of orange juice with vitamin D(2) or vitamin D(3) is as effective as an oral supplement in maintaining vitamin D status in adults. *Am J Clin Nutr* 2010; 91:1621-6
- Bouillon R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008; **29**(6): 726-776.
- Brot C, Vestergaard P, Kolthoff N, Gram J, Hermann AP, Sorensen OH. Vitamin D status and its adequacy in healthy Danish perimenopausal women: relationships to dietary intake, sun exposure and serum parathyroid hormone. *Br J Nutr.* 2001;86:S97–103
- Calton E. K. et al. The Impact of Vitamin D Levels on Inflammatory Status: A Systematic Review of Immune Cell Studies. *PLoS One.* 2015; **10**(11): e0141770.
- Cauley J. A. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and health outcomes five years after active intervention ended: the Women's Health Initiative. *J Womens Health (Larchmt).* 2013; **22**(11): 915-929.
- Chen T. C. et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys.* 2007; **460**(2): 213-217.
- Coussen A. K. et al. Vitamin D accelerates resolution of inflammatory responses during tuberculosis treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; **109**(38): 15449-15454.
- Dalonso N, Goldman GH, Gern RMM. β -(1-3), (1-6)-Glucans: medical activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015.
- D'Auria L., Bonifati C., Mussi A., D'Agosto G., De Simone C., Ameglio F., Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw.* 1997;8(4): 383-7
- Damjanov, I. (2009). Παθοφυσιολογία, εκδ. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- Denchev C. M., Venturella G., Zervakis, G, (2013), MYCOTICON textbook: "Identification and sustainable exploitation of wild edible mushrooms in rural areas"
- Deleskog A. et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D level predicts progression to type 2 diabetes in individuals with prediabetes but not with normal glucose tolerance. *Diabetologia.* 2012; **55**(6): 1668-1678.

- Deepalakshmi et al Pleurotus ostreatus: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties J Biochem Tech. 2014; 5(2):718-726
- DeLuka F.H. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am J Clin Nutr. 2004; 80(suppl):1689–96
- Demetriou ET, Travison TG, Holick MF. Treatment with 50,000 IU vitamin D2 every other week and effect on serum 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3, and total 25-hydroxyvitamin D in a clinical setting. Endocr Pract 2012; 18:399-402
- Dikeman C. L. et al. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. J Agric Food Chem. 2005; **53**(4): 1130-1138.
- Dmitrieva OS, Shilovskiy IP, Khaitov MR, Grivennikov SI. Interleukins 1 and 6 as Main Mediators of Inflammation and Cancer. Biochemistry Biokhimiia. 2016;81(2):80-90.
- Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M: Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. Biol Reprod. 2006, 75: 816-822.
- Equils O, Naiki Y, Shapiro AM, Michelsen K, Lu D, Adams J, Jordan S: 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. Clin Exp Immunol. 2006, 143: 58-64.
- Falandysz J et al. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97: 477
- Feeney M. J. Mushrooms -Biologically Distinct and Nutritionally Unique Exploring a “Third Food Kingdom”. Nutrition Today. 2014; **49**(6).
- Feskanich D. et al. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004; **13**(9): 1502-1508.
- Freisling H. et al. Region-specific nutrient intake patterns exhibit a geographical gradient within and between European countries. J Nutr. 2010; **140**(7): 1280-1286.
- Foroozanfard F, Jamilian M, Bahmani F, Talaee R, Talaee N, Hashemi T, Nasri K, Asemi Z, Esmailzadeh A. Calcium plus vitamin D supplementation influences biomarkers of inflammation and oxidative stress in overweight and vitamin D-deficient women with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. Clinical Endocrinology. 2015; (83) 888–894
- Gannagé-Yared MH, Azoury M, Mansour I, Baddoura R, Halaby G, Naaman R: Effects of a short-term calcium and vitamin D treatment on serum cytokines, bone markers, insulin and lipid concentrations in healthy post-menopausal women. J Endocrinol Invest. 2003, 26: 748-753.
- Gargari P. B., Sadien B., Jafarabadi A, Farzadi L. Vitamin D Status Is Related to Oxidative Stress But Not High-Sensitive C-Reactive Protein in Women with Pre-Eclampsia. Gynecol Obstet Invest. 2015; **81**(4).
- Grant W. B. Ecological studies of the UVB-vitamin D-cancer hypothesis. Anticancer Res. 2012; **32**(1): 223-236.

- Gropper S.S., Smith L.J., Groff L.J. (2008). Διατροφή και Μεταβολισμός 2.
- Guessous I. et al. Vitamin D levels and associated factors: a population-based study in Switzerland. *Swiss Med Wkly*. 2012; **142**: 0.
- Guillot X. et al. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine*. 2010; **77**(6): 552-557.
- Haddad J. G. et al. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest*. 1993; **91**(6): 2552-2555.
- Hanchette CL. Geographic patterns of prostate cancer mortality. *Cancer*. 1992; **70**: 2861–2869.
- Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; **96**:E447-52
- Helming L. et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. *Blood*. 2005; **106**(13): 4351-4358.
- Ho HHI, Matia-Merino L, Huffman LM. Use of viscous fibre in beverages for appetite control: a review of studies. *Int J Food Sci Nutr*, Early Online 1-12.
- Holick M. F. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem*. 2003; **88**(2): 296-307.
- Holick M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 2006; **116**(8): 2062-2072.
- Holick M. F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev*. 2008; **66**(10) Suppl 2: S182-194.
- Holick M. F. The Vitamin D Deficiency Pandemic: a Forgotten Hormone Important for Health. *Public Health Reviews*. 2010; **Vol. 32**(No 1): 267-283.
- Holick M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; **96**(7): 1911-1930.
- Holick M. F. and Chen T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*. 2008; **87**(4): 1080S-1086S.
- Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, et al. Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**:677-81
- Hossain MS, Alam N, Amin SMR, Basunia MA, Rahman A. Essential fatty acids content of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Agaricus bisporus*. *Bangladesh J Mushroom*. 2007; **1**:1-7
- Houghton A.L., Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. *Am J Clin Nutr*. 2006; **84**:694–7
- Itkonen T.S., Skaffari E., Saaristo P., Saarnio M.E., Erkkola M., Jakobsen J., Cashman D.K. , Lamberg-Allardt C. Effects of vitamin D2-fortified bread v . supplementation with vitamin D2 or D3 on serum 25-hydroxyvitamin D metabolites: an 8-week

- randomised-controlled trial in young adult Finnish women. *British Journal of Nutrition*. 2016; 115, 1232–1239
- Jain S. K. et al. Vitamin D and L-cysteine levels correlate positively with GSH and negatively with insulin resistance levels in the blood of type 2 diabetic patients. *Eur J Clin Nutr*. 2014; **68**(10): 1148-1153.
- Jayakumar T, Thomas PA, Isai M, Geraldine P. An extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, increases catalase gene expression and reduces protein oxidation during aging in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2010; 8: 774–780
- Jasinghe VJ, Perera CO, Barlow PJ. Bioavailability of vitamin D2 from irradiated mushrooms: an in vivo study. *Br J Nutr* 2005; 93:951-5
- Johnson E., Forland, D. T., Saetre, L., Bernardshaw, S. V., Lyberg, T., Hetland, G. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei murill* on release of cytokines, chemokines and leukocyte growth factors in human blood ex vivo and in vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009; 69, 242–250.
- Jones G. et al. Contemporary diagnosis and treatment of vitamin D-related disorders. *J Bone Miner Res*. 2007; **22 Suppl 2**: V11-15.
- Κατσαρός Β.Γ., Αποστολάκος Π., (1998), Εισαγωγή στη Βοτανική, εκδ. Α. Σταμούλης
- Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in soils and plants, 4th edn. CRC, Boca Raton
- Kaliora AC, Artemiou A, Giogios I, Kalogeropoulos N. The impact of fruit maturation on bioactive microconstituents, inhibition of serum oxidation and inflammatory markers in stimulated PBMCs and sensory characteristics of Koroneiki virgin olive oils from Messenia, Greece. *Food Funct*. 2013; 4: 1185–1194
- Kalmis E, Nuri A, Hasan Y, Fatin K. Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* on wheat straw. *Bioresour Technol*. 2008; 99:164-169
- Kanellos P. T., Kaliora A. C., Gioxari A., Christopoulou G. O., Kalogeropoulos N., Karathanos V. T.. Absorption and Bioavailability of Antioxidant Phytochemicals and Increase of Serum Oxidation Resistance in Healthy Subjects Following Supplementation with Raisins. *Plant Foods Hum Nutr* (2013) 68:411–415
- Kaufer F. The biology of *Pleurotus corticatus* Fries. *Minnesota Agricultural Experiment Station Bulletin*. 1936; 114
- Ke CY, Yang FL, Wu WT, Chung CH, Lee RP, Yang WT, Subeq YM, Liao KW Vitamin D3 Reduces Tissue Damage and Oxidative Stress Caused by Exhaustive Exercise *Int. J. Med. Sci*. 2016; 13(2): 147-153
- Keegan R. J. et al. Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans. *Dermatoendocrinol*. 2013; **5**(1): 165-176.
- Khan MA. Nutritional composition and Hypocholesterolemic effect of mushroom: *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida*: LAP Lambert Academic publishing GmbH &co. KG: Saarbrücken, 2010; Germany 1-11

- Komine M, Watabe Y, Shimaoka S, Sato F, Kake K, Nishina H, Ohtsuki M, Nakagawa H, Tamaki K: The action of a novel vitamin D3 analogue, OCT, on immunomodulatory function of keratinocytes and lymphocytes. *Arch Dermatol Res.* 1999, 291: 500-506.
- Κολονίτσιου Χ. Επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας σε βιοδραστικά συστατικά και βιταμίνη D σε μανιτάρια του γένους *Pleurotus*-Διατροφική παρέμβαση. Μεταπτυχιακή εργασία, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2016.
- Krishnan A. V. and Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011; **51**: 311-336.
- Lappe J. M. et al. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2007; **85**(6): 1586-1591.
- Lips P. Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; **103**(3-5): 620-625.
- Μανιός Γ., 2006, Διατροφική Αξιολόγηση: Διαιτολογικό & ιατρικό ιστορικό, σωματομετρικοί, κλινικοί & βιοχημικοί δείκτες, εκδ Π.Χ. Πασχαλίδης
- Mangin M. et al. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res.* 2014; **63**(10): 803-819.
- Manios Y. et al. Seasonal variations of vitamin D status in Greek postmenopausal women receiving enriched dairy products for 30 months: the Postmenopausal Health Study. *Eur J Clin Nutr.* 2011; **65**(3): 412-414.
- Manios Y. et al. Micronutrient intakes among children and adults in Greece: the role of age, sex and socio-economic status. *Nutrients.* 2014; **6**(10): 4073-4092.
- Mattila PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ, Koivistoinen PE. Vitamin D contents in edible mushrooms. *J Agric Food Chem.* 1994; 42:2449-53
- Meng X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 2016.
- Mithal A. et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int.* 2009; **20**(11): 1807-1820.
- Mitra P, Khatua S, Acharya K. Free radical scavenging and NOS activation properties of water soluble crude polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013; 6(3): 67-70
- Müller K, Heilmann C, Poulsen LK, Barington T, Bendtzen K: The role of monocytes and T cells in 1,25-dihydroxyvitamin D3 mediated inhibition of B cell function in vitro. *Immunopharmacology.* 1991, 21: 121-128.
- Nagpal S. et al. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005; **26**(5): 662-687.
- Natri AM, Salo P, Vikstedt T, Palssa A, Huttunen M, Kärkkäinen MU, et al. Bread fortified with cholecalciferol increases the serum 25-hydroxyvitamin D concentration in women as effectively as a cholecalciferol supplement. *J Nutr.* 2006; 136:123-7

- Norman P. E. and Powell J. T. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2014; **114**(2): 379-393.
- Ohsawa M. et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) and its potent synthetic analogs downregulate tissue factor and upregulate thrombomodulin expression in monocytic cells, counteracting the effects of tumor necrosis factor and oxidized LDL. *Circulation.* 2000; **102**(23): 2867-2872.
- Outila A.T., Mattila H.P., Piironen I.V., Lamberg-Allardt JE. V. Bioavailability of vitamin D from wild edible mushrooms (*Cantharellus tubaeformis*) as measured with a human bioassay *Am J Clin Nutr.* 1999;69:95–8.
- Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur Rev for Med and Pharmacol Sci* 2007; **11**: 309-342
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: A Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular risk. *Nutr Met Cardiovasc Dis.* 2006; **16**: 559-568
- Peterson AC, Heffernan EM. Serum tumor necrosis factor- α concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *Journal of Inflammation.* 2008;5-10
- Phillips KM, Ruggio DM, Horst RL, Minor B, Simon RR, Feeney MJ, et al. Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *J Agric Food Chem.* 2011; **59**:7841-53
- Pinto T.J. and Cooper J.L.A. From Cholesterogenesis to Steroidogenesis: Role of Riboflavin and Flavoenzymes in the Biosynthesis of Vitamin D *Adv. Nutr.*2014; **5**: 144–163
- Pittas A. G. et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care.* 2006; **29**(3): 650-656.
- Puzianowska-Kuźnicka M, Owczarz M, Wieczorowska-Tobis K, Nadrowski P, Chudek J, Slusarczyk P, Skalska A, Jonas M, Franek E, Mossakowska M. Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. *Immun Ageing.* 2016; **13**-21.
- Rabenberg M. et al. Vitamin D status among adults in Germany--results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health.* 2015; **15**: 641.
- Riachy R, Vandewalle B, Belaich S, Kerr-Conte J, Gmyr V, Zerimech F, d'Herbomez M, Lefebvre J, Pattou F: Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. *J Endocrinol.* 2001, **169**: 161-168
- Rop O, Mlcek J, Jurikova T Beta-glucans in higher fungi and their health effects *Nutrition Reviews.* 2009; Vol. **67**(11):624–631
- Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence *J Of Funct Foods.* 2012; (4): 687–709
- Ross AC, Abrams AS, Aloia FJ, Brannon MP, Clinton KS, Durazo-Arvizu AR, Gallagher CJ, Gallo LR, Jones G, Kovacs SC, Mayne ST, Rosen CJ, and Shapses AS. The 2011 Report on

- Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: 53-58.
- Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, et al. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; editors: Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Salahuddin N. et al. Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2013; **13**: 22.
- Sharifi S, Amani R, Hajiani E, Cheraghian B. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine.* 2014; 47:70–80
- Shea M. K. et al. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol.* 2008; **167**(3): 313-320.
- Singhellakis P. N. et al. Vitamin D deficiency in white, apparently healthy, free-living adults in a temperate region. *Hormones (Athens).* 2011; **10**(2): 131-143.
- Spiro A. and Buttriss J. L. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull.* 2014; **39**(4): 322-350.
- Stephensen CB, Zerofsky M, Burnett DJ, Lin YP, Hammock BD, Hall LM, et al. Ergocalciferol from mushrooms or supplements consumed with a standard meal increases 25-hydroxyergocalciferol but decreases 25-hydroxycholecalciferol in the serum of healthy adults. *J Nutr.* 2012; 142:1246-52
- Stepien M, O' Mahony L, O'Sullivan A, Collier J, Fraser WD, Gibney MJ, Nugent AP, Brennan L. Effect of supplementation with vitamin D₂ enhanced mushrooms on vitamin D status in healthy adults. *J Nutr Sci.* 2013; 29(2):e29
- Sun Q. et al. 25-Hydroxyvitamin D levels and the risk of stroke: a prospective study and meta-analysis. *Stroke.* 2012; **43**(6): 1470-1477.
- Synytsya A, Mickova K, Jablonsky I, Slukoya M, Copikova J. Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements. *Czech J Food Sci.* 2008; 26: 441–446
- Tangpricha V. et al. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med.* 2002; **112**(8): 659-662.
- Urbain P. et al. Bioavailability of vitamin D(2) from UV-B-irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2011; **65**(8): 965-971.
- Vallianou N. et al. Vitamin D status and health correlates among apparently healthy participants in an urban, sunny region. *Cent Eur J Public Health.* 2012; **20**(4): 262-269.
- Balan V., Pattathil S., Merritt B.B., Venketachalam S. and Wing-On Ng. Protocols to Evaluate the Nutritional and Potential Health Benefits of Edible Mushrooms. *Current Biotechnology.* 2016; **5**.

- Wacker M. and Holick F.M. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*. 2013; **5**(1): 111-148.
- Wang T. J. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008; **117**(4): 503-511.
- Wasser SP Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J*. 2014; 37(6):345-56.
- Wejse C. et al. Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; **179**(9): 843-850.
- Wobke T. K. et al. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front Physiol*. 2014; **5**: 244.
- Xue ML, Zhu H, Thakur A, Willcox M. 1 alpha,25-24. Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Cell Biol*. 2002 Aug;80(4):340-5.
- Yildiz S., Yildiz UC, Gezer ED, Temiz A. Some lignocellulosic waste used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochem*. 2002; 301-306
- Yiu Y. F. et al. Randomized controlled trial of vitamin D supplement on endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2013; **227**(1): 140-146.
- Yurkiv B, Wasser SP, Nevo E, Sybirna NO. Antioxidant Effects of Medicinal Mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): Evidence from Animal Studies. *Int J Med Mushrooms*. 2015;17(10):943-55.
- Zhang Y. et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol*. 2012; **188**(5): 2127-2135.
- Zittermann A. et al. Vitamin D and airway infections: a European perspective. *Eur J Med Res*. 2016; **21**: 14.