ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

“Μεταγευματική επίδραση της χορήγησης εκχυλίσματος υπο-προϊόντων οινοποίησης στην δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων.”

Πτυχιακή εργασία

Ασημομύτη Ειρήνη

Αθήνα, 2022

HAROKOPIO UNIVERSITY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE AND EDUCATION
DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS

"Postprandial effect of the uptake of a wine by-product extract in the activity of antioxidant enzymes."

Bachelor thesis

Asimomyti Eirini

Athens, 2022

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ (Επιβλέπουσα)
Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αντωνοπούλου Σμαραγδή
Καθηγήτρια Βιοχημείας
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Νομικός Τζώρτζης
Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η Ασημομύτη Ειρήνη

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

3) Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

Στην Ειρήνη...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την υποστήριξη, τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε, καθώς και για τον χρόνο που αφιέρωσε τόσο στη διόρθωση όσο και στην εκλογή και επεξήγηση των αποτελεσμάτων της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Χολέβα καθώς ήταν δίπλα μου, πάντα πρόθυμη να επιλύσει οποιαδήποτε απορία και να με βοηθήσει σε κάθε δυνατό επίπεδο. Η συνεργασία μαζί της ήταν άριστη, τόσο ευχάριστη όσο και εποικοδομητική. Η υποστήριξή της και οι γνώσεις που μου μετέδωσε ήταν καταλυτικές για την υλοποίηση της εργασίας αυτής.

Παράλληλα, ευχαριστώ όλη την ερευνητική ομάδα για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο και για την προθυμία τους για βοήθεια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και την αιμολήπτρια του πανεπιστημίου Αντιγόνη Τσιαφίτσα καθώς είναι εξαιρετική σε ό,τι κάνει.

Ευχαριστώ πολύ όλους τους εθελοντές που, παρά της δυσκολίας των συνθηκών, έλαβαν μέρος στην παρούσα κλινική δοκιμή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την απεριόριστη στήριξη της όλα τα χρόνια των σπουδών μου, ειδικά την δύσκολη για μένα αυτή περίοδο, καθώς και τα πιο κοντινά μου πρόσωπα που ήταν δίπλα μου με υπομονή και κατανόηση.

Περιεχόμενα

Περίληψη στα Ελληνικά 9
Περίληψη στα Αγγλικά 10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ 11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ 12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ 13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ 14
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ 19
1.1: Ορισμός 19
1.2: Είδη οξειδωτικών παραγόντων 19
1.3: Μονοπάτια Παραγωγής 22
1.4: Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στα μακρομόρια 27
1.4.1: Επιπτώσεις στο DNA 27
1.4.2: Επιπτώσεις στις πρωτεΐνες 28
1.4.3: Επιπτώσεις στα λιποειδή 29
1.5: Αμυντικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί 29
1.5.1: Ενζυμικοί (Αντιοξειδωτικά ένζυμα) 30
1.5.2: Μη ενζυμικοί 34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΤΑΓΕΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ 41
2.1: Μεταγευματικός Μεταβολισμός 41
2.2: Μεταβολισμός Υδατανθράκων 41
2.3: Μεταβολισμός Λιπιδίων 43
2.4: Μεταγευματικό Οξειδωτικό στρες 46
2.4.1: Υπεργλυκαιμία και οξειδωτικό στρες 47
2.4.2: Υπερλιπιδαιμία και οξειδωτικό στρες 50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ 53
3.1: Σύσταση Σταφυλιού και Διαδικασία Οινοποίησης 53
3.2: Κρασί - Το Γαλλικό παράδοξο, η σύσταση και η αντιοξειδωτική του δράση 55
3.3: Υποπροϊόντα 62
3.3.1: Στέμφυλα/grape pomace 62
3.3.2: Τσάμπουρα (Κοτσάνια/μίσχοι σταφυλιών) 63
3.3.3: Οινολάσπες/wine lees 63
3.3.4: Φύλλα 64
3.4: Σύσταση στεμφύλων 64
3.5: Αξιοποίηση Υποπροϊόντων 67
3.5.1: Βιολογικά πλεονεκτήματα έναντι οίνου 67
3.5.2: Περιβαλλοντολογικά-Οικονομικά πλεονεκτήματα 68

3.6: Αντιοξειδωτική δράση 71
3.6.1: In vitro δεδομένα 71
3.6.2: Κλινικές μελέτες 73
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ 77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 78
5.1: Πρωτόκολλο μεταγευματικής μελέτης 78
5.1.1: Χαρακτηριστικά εθελοντών 78
5.1.2: Πειραματικό πρωτόκολλο 78
5.1.3: Χαρακτηριστικά γεύματος 79
5.1.4: Πρωτόκολλο αιμοληψίας 81
5.1.5: Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε λευκοκύτταρα 81
5.2: Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford 82
5.2.1: Αρχή μεθόδου 82
5.2.2: Αντιδραστήρια 82
5.2.3: Αναλυτική πορεία 83
5.2.4: Υπολογισμοί 84
5.3: Προσδιορισμός Δραστικότητας Υπεροξειδικής Δισμουτάσης 84
5.3.1: Αρχή μεθόδου-Αντίδραση 85
5.3.2: Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια 85
5.3.3: Αναλυτική Πορεία 86
5.3.4: Υπολογισμός δραστικότητας SOD 88
5.4: Στατιστική ανάλυση 89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 90
6.1: Βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά πριν την παρέμβαση 90
6.2: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες πριν την παρέμβαση 92
6.3: Δραστικότητα SOD 93
6.4: Επίδραση των παρεμβάσεων στην δραστικότητα της SOD 94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ 100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 105

Περίληψη στα Ελληνικά

Εισαγωγή: Το κρασί περιέχει μία πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, οι οποίες έχουν πολλαπλές ευεργετικές δράσεις στον άνθρωπο. Παράλληλα όμως, η αιθανόλη που περιέχει είναι μία ουσία η οποία έχει και αρνητικές επιδράσεις στον οργανισμό. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, ερευνάται η παραλαβή των βιοδραστικών αυτών συστατικών από τα υποπροϊόντα της οινοποίησης, αποφεύγοντας έτσι την ύπαρξη της αιθανόλης. Ωστόσο, λίγες κλινικές δοκιμές έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα και ακόμα λιγότερες εξ αυτών αφορούν τη μεταγευματική κατάσταση.

Σκοπός: Η μελέτη της μεταγευματικής επίδρασης ενός σκευάσματος εκχυλίσματος στεμφύλων στη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, και συγκεκριμένα, της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

Μεθοδολογία: Το δείγμα, που χρησιμοποιήθηκε για τη παρούσα διασταυρούμενη διπλά τυφλή μελέτη αποτελείται από φαινομενικά υγιείς γυναίκες 25 έως 32 ετών με Δείκτη Μάζας Σώματος 20 έως 32 kg/m^2. Έλαβαν μέρος σε δυο παρεμβάσεις, μία με λήψη εκχυλίσματος στεμφύλων και μία με εικονικό σκεύασμα, παράλληλα με την κατανάλωση ενός πλούσιου σε λίπος γεύματος. Βιολογικά δείγματα λήφθηκαν πριν και μετά την κατανάλωση του γεύματος και των σκευασμάτων, για διάρκεια 6 ωρών. Ακολούθησε απομόνωση πλούσιου σε λευκοκύτταρα πλάσματος και μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).

Αποτελέσματα: Δεκατέσσερις εθελόντριες έχουν ολοκληρώσει μέχρι στιγμής και τις δύο παρεμβάσεις. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στα βασικά βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντριών καθώς και στη δραστικότητα της SOD στην έναρξη των δυο παραμβάσεων. Δεν βρέθηκε σημαντική ποσοστιαία μεταβολή του ενζύμου από την επίδραση του γεύματος παρά μόνο στις 3.5 ώρες για τις νορμοβαρείς (p=0,069). Βρέθηκε τάση για μείωση της SOD στην παρέμβαση του εκχυλίσματος συγκριτικά με το εικονικό σκεύασμα στις 2 ώρες για το σύνολο των εθελοντριών (ptrial=0,077) αλλά και για τις υπέρβαρες γυναίκες (ptrial=0,093). Στην παρέμβαση με το εκχύλισμα βρέθηκε σημαντική μείωση της αρχικής δραστικότητας της SOD στις 2 και 3.5 ώρες στο σύνολο των εθελοντριών (p=0,035 και p=0,048), στις 2 και 5 ώρες στην κατηγορία των υπέρβαρων (p=0,028 και p=0,046) και στις 3.5 ώρες σε αυτή των νορμοβαρών (p=0,093).

Συμπέρασμα: Η κατανάλωση εκχυλίσματος στέμφυλων, παράλληλα με ένα πλούσιο σε λίπος γεύμα, έδειξε να επηρεάζει την δραστικότητα της SOD κάποιες χρονικές στιγμές, σε νορμοβαρείς και υπέρβαρες φαινομενικά υγιείς νέες γυναίκες. Δεν μπορούν ακόμα να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα καθώς η κλινική δοκιμή βρίσκεται υπο-εξέλιξη.

Λέξεις κλειδιά: μεταγευματική κατάσταση, οξειδωτικό στρες, υποπροϊόντα οινοποίησης, αντιοξειδωτική δράση, υπεροξειδική δισμουτάση

Περίληψη στα Αγγλικά

Introduction: Wine is a valuable source of bioactive ingredients offering multiple beneficial effects on humans. At the same time though, ethanol has negative effects on the human body. In recent years, the uptake of these bioactive ingredients from vinification by-products has been investigated, avoiding the presence of ethanol. However, only a few clinical trials have been performed to date and even fewer of them relate to the postprandial condition.

Aim: The aim of this study is to determine the post-prandial effect of a grape pomace extract, in the activity of antioxidant enzymes and more specifical, in superoxide dismutase (SOD) levels.

Methods: A cross-over, double-blind, placebo-controlled clinical trial was conducted. The sample consists of healthy women 25 to 32 years old, with Body Mass Index from 20 to 32 kg/m^2. They took part in two interventions consuming a high-fat meal along with the grape pomace supplement or the placebo. Blood was collected in a fasting state and after the meal consumption for a period of 6 hours. Consequently, leukocyte-rich plasma was isolated and used as a sample to measure superoxide dismutase SOD activity.

Results: Fourteen volunteers have completed the trial, by this point. No significant difference was observed on the basic biochemical characteristics of the volunteers neither on SOD activity at the beginning of the two interventions. The meal consumption caused no significant difference on SOD levels except the one at 3.5 hours in normal weight women group ($p = 0.069$). The grape pomace extract caused a significant decrease in SOD at 2 hours after the consumption, in the entire population ($p_{trial} = 0.077$) but also in overweight women group ($p_{trial} = 0.093$). In the same intervention, a significant reduction of the initial activity of SOD was found at 2 and 3.5 hours in the entire population ($p = 0.035$ and $p = 0.048$), at 2 and 5 hours in overweight group ($p = 0.028$ and $p = 0.046$) and at 3.5 hours in the group of normal weight women ($p = 0.093$).

Conclusion: The consumption of grape pomace extract, along with a high-fat meal, seemed to affect the activity of SOD, at some point in time, on both normal and overweight healthy young women. However, no safe conclusions can be drawn beacause the clinical trial is under development.

Keywords: postprandial oxidative stress, winery by-products, antioxidant activity, superoxide dismutase

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σημεία παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια ..……. 23

Εικόνα 2.1: Μεταβολική τύχη λιπιδίων. Α) Απορρόφηση Β) Διάχυση C) Αποθήκευση ή Οξείδωση D) Ανακύκλωση…… 45

Εικόνα 2.2: Μεταγευματικό οξειδωτικό στρες..…….. 47

Εικόνα 2.3: Πώς οδηγεί η μεταγευματική υπεργλυκαιμία και η λιπαιμία σε οξειδωτικό stress.. 51

Εικόνα 3.1: Βασικά επιμέρους συστατικά του κρασιού…….. 57

Εικόνα 3.2: Μηχανισμοί αντίδρασης αιθανόλης και πολυφαινολών του οίνου με ROS και οξειδωτική βλάβη……... 62

Εικόνα 3.3: Παράδειγμα σύστασης στεμφύλων 1000 kg…… 65

Εικόνα 5.1: Οι τρείς μορφές της χρωστικής και οι αντίστοιχες απορροφήσεις…….. 82

Εικόνα 5.2 : Αντίδραση ΧΟ και SOD……. 85

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Μεταγευματικές κλινικές μελέτες συσχέτισης υπεργλυκαιμίας και οξειδωτικού στρες……..... 49
Πίνακας 2.2: Μεταγευματικές κλινικές μελέτες συσχέτισης υπερλιπιδαιμίας και οξειδωτικού στρες……. 52
Πίνακας 3.1: In vitro μελέτες αντιοξειδωτικής ικανότητας υποπροϊόντων οινοποίησης…… 72
Πίνακας 3.2: Κλινικές μελέτες αντιοξειδωτικής ικανότητας υποπροϊόντων οινοποίησης…….. 74
Πίνακας 5.1: ΤΟΣΤ 1. Διατροφική ανάλυση…… 80
Πίνακας 5.2: ΤΟΣΤ 2. Διατροφική ανάλυση……... 80
Πίνακας 5.3: Συνολικό γεύμα……... 80
Πίνακας 5.4: Χρονική στιγμή αιμοληψίας, δείγμα και ποσότητα…… 81
Πίνακας 5.5: Ποσότητες πρότυπης καμπύλης αναφοράς Bradford……. 83
Πίνακας 5.6: Δοκιμασία Control ΧΟ…… 87
Πίνακας 5.7: Δοκιμασία για τα δείγματα λευκοκυττάρων…… 87
Πίνακας 5.8: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς SOD…… 88
Πίνακας 6.1.1: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση…….. 91
Πίνακας 6.1.2: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση ανά ΔΜΣ. 91
Πίνακας 6.2.1: Βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση……. 92
Πίνακας 6.2.2: Βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση ανά ΔΜΣ…… 93
Πίνακας 6.3: Απόλυτες τιμές συγκέντρωσης SOD (U/μg ολικής πρωτείνης)…….. 94
Πίνακας 6.4: Ποσοστιαία μεταβολή από την τιμή της στιγμής Π……... 95
Πίνακας 6.5: Ποσοστιαία μεταβολή από την τιμή της στιγμής Π για ΔΜΣ<25 kg/m^2…… 97
Πίνακας 6.6: Ποσοστιαία μεταβολή από την τιμή της στιγμής Π για ΔΜΣ>25 kg/m^2…… 98

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία μεταβολή SOD ανά τον χρόνο…… 96
Διάγραμμα 2: Ποσοστιαία μεταβολή SOD ανά τον χρόνο για ΔΜΣ<25 kg/m^2 …… 98
Διάγραμμα 3: Ποσοστιαία μεταβολή SOD ανά τον χρόνο για ΔΜΣ>25 kg/m^2 …….. 99

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

$^1O^2$	Solitary oxygen/ μονήρες οξυγόνο
4-HNA	4-Hydroxynonenal /4-υδροξυνονενάλη
8-OHdG	8-Oxo-2'-deoxyguanosine/8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη
8-oxoG	7,8-dihydro-8-oxoguanosine/7,8-διυδρο-8-οξο-γουανοσίνη
ABTS	3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
AGEs	Advanced glycation end products/τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης
ALA	Alpha lipoic acid/Α-λιποϊκό οξύ
ALB	Albumin /αλβουμίνη
AMP	Adenosine monophosphate/ μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Adenosine triphosphate /Τριφωσφορική αδενοσύνη
CAT	Catalase /καταλάση
CE	Cholesterol esters / εστέρες χοληστερόλης
CHOL	Cholesterol/ χοληστερόλη
CM	Chylomicra/ χυλομικρά
CMRs	Chylomicron remnants/ υπολείμματα χυλομικρών
Co	Cobaltum/ κοβάλτιο
CoA	Coenzyme A/υνένζυμο Α
CoQ(10)	Coenzyme Q ή ubiquinone / συνένζυμο Q ή ουβικινόνη
CoQ(10)H_2	Ubiquinol or reduced form of coenzyme Q10/ ουβικινόλη ή ανηγμένη μορφή συνενζύμου Q
CoQ10H	Ubisemiquinone radical/ ρίζα ουμπισεμικινόνης
COX	Cyclooxygenase/κυκλοοξυγενάση
CP	Ceruloplasmin /σερουλοπλασμίνη
CRP	C-reactive protein/ C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
Cu	Copper /χαλκός
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity/Ικανότητα αναγωγής χαλκού
CVD	Cardiovascular disease/καρδιαγγειακό νόσημα
CYPs	Cytochrome P450 enzymes/κυτοχρώματα P450
DHLA	Dihydrolipoic acid /διυδρολιποϊκό οξύ
DNA	Deoxyribonucleic acid/δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl/1,1 διφαίνυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο
DW	Dry weight/ ξηρό βάρος
e-	Electron/ηλεκτρόνιο
EC50	Half maximal effective concentration/μισή μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση
FADH2	Reduced form of flavin adenine dinucleotide/ανηγμένη μορφή δινουκλεοτιδίου αδενίνης φλαβίνης
Fe	Iron/ σίδηρος
FER	Ferritin /φεριτίνη

FRAP	Ferric reducing ability of plasma/ικανότητα αναγωγής τρισθενούς σιδήρου
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide/ινσουλινοτροπικό πεπτίδιο εξαρτώμενο από τη γλυκόζη
GLP1	Glucagon-like peptide-1/πεπτίδιο 1 που μοιάζει με γλυκαγόνο
Glu	Glucose/γλυκόζη
GLUT1-2-4	Glycose transporter/ μεταφορέας γλυκόζης
GMP	Guanosine monophosphate/μονοφωσφορική γουανίνη
GPDH	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase/ αφυδρογονάση 3-φωσφω-γλυκερόλης
GSE	Grape seed extract/ εκχύλισμα σπόρου σταφυλιού
GSH	Glutathione /γλουταθειόνη
GSH-Px ή GPx	Glutathione peroxidase/ υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSSG	Oxidized glutathione/Οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης
H^+	Hydron/ (πρωτόνιο)
H_2O	Water/ νερό
H_2O_2	Hydrogen peroxide/υπεροξείδιο του υδρογόνου
HDL	High density lipoprotein/ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτείνη
HNO_2	Nitrous acid/ Νιτρώδες οξύ
HNO_2	Nitrous acid/νιτρώδες οξύ
HOBr	Hypobromous acid/υποβρωμικό οξύ
HOCl	Hypochlorous acid /υποχλωριώδες οξύ
$HO_2^{\bullet}$	Superoxide Radical/υδροϋπεροξειδική ρίζα
HSL	Hormone Sensitive Lipase/ ορμονοευαίσθητη λιπάση
$L^{\bullet}$	Lipid radical/ λιποειδική ρίζα
LA	Lipoic Acid/ λιποϊκό οξύ
LDL	Low destiny lipoprotein/ λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LOX	Lipoxygenase/ λιποξυγενάση
LPL	Lipoprotein lipase/ λιποπρωτεϊνική λιπάση
LPO	Lipid peroxidation/ Υπεροξείδωση λιπιδίων
LRP	Leucocytes rich plasma/πλάσμα πλούσιο σε λευκοκύτταρα
LTF	Lactoferrin/ λακτοφερίνη
MAG	Monoacylglycerol/ μονοακυλογλυκερόλη
MB	Myoglobin /μυογλοβίνη
MBPs	Metalbinding proteins/ πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα
MDA	Malondialdehyde/μαλονδιαλδεΰδη
Mn	Manganese /μαγκάνιο
MTs	Metallothioneins /μεταλλοθειονίνες
N_2O_3	Dinitrogen trioxide/τριοξείδιο του αζώτου
N_2O_4	Dinitrogen tetroxide/τετραξείδιο του διαζώτου
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/ φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου αδενίνης
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease/ μη αλκοολική λιπώδης νόσος ήπατος
NEFA	Non-esterified fatty acids/Μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων

NO^-	Nitroxyl anion/ανιόν του μονοξειδίου του αζώτου
NO^+	Nitrosyl cation/κατιόν του μονοξειδίου του αζώτου
$NO^\bullet$	Nitric oxide/μονοξειδίου του αζώτου
$NO_2^\bullet$	Nitrogen dioxide/διοξείδιο του αζώτου
$NO_2^\bullet$	Radical Nitrogen Dioxide /ρίζα διοξειδίου του αζώτου
NOX	NADPH oxidase/ NADPH οξειδάση
NT	Nitrotyrosine/νιτροτυροσίνη
O_2	Oxygen/μόριο του οξυγόνου
$O_2^{\bullet-}$	Peroxide ion/ανιόν του υπεροξειδίου
O_3	Ozone/ όζον
OGDH	Oxoglutarate Dehydrogenase/ 2-οξογλουταρική αφυδρογονάση
OH	Hydroxyl/ υδροξύλιο
$OH^\bullet$	Peroxide radical/ ρίζα υδροξυλίου
$ONOO^-$	Peroxynitrite/υπεροξυνιτρώδες ανιόν
ONOOH	Peroxynitrous acid/Υπερόξυ-νιτρώδες οξύ
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity/ικανότητα δέσμευσης ρίζων οξυγόνου
oxLDL	Oxidized low-density lipoprotein/ οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
P	Plasma/ πλάσμα
PAF	Platelet activation factor / παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PCOS	Polycystic ovary syndrome/ σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών
PDH	Pyruvate dehydrogenase/ πυροσταφυλική αφυδρογονάση
PL	Phospholipids/ φωσφολιπίδια
PPG	Postprandial glucose/ Μεταγευματική γλυκόζη
PRP	Platelet-rich plasma /πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια
QTE	Quecertin Equivalents/ ισοδύναμο κερκετίνης
RNA	Ribonucleic acid/ριβονουκλεϊκό οξύ
RNS	Reactive nitrogen species /ενεργές μορφές αζώτου
$RO^\bullet$	Alkoxyl radical/ρίζα του αλκοξειδίου
$ROO^\bullet$	Peroxyl radical/ρίζα του υπεροξειδίου
ROOH	Alkyl peroxides/ οργανικά υπεροξείδια
ROS	Reactive oxygen species / ενεργές μορφές οξυγόνου
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species / ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου
S	Serum/ ορός
Se	Selenium /σελήνιο
SEC	Selenocysteine/ σελοενοκυστεΐνη
SOD	Superoxide dismutase/ δισμουτάση του υπεροξειδίου
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances/αντιδρώσες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ουσίες
TE	Trolox equivalent/ισοδύναμο της ουσίας trolox
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity/ αντιοξειδωτική ικανότητα ισοδυνάμου της ουσίας trolox

TF	Transferrin /τρανσφερίνη
TG	Triglycerides/ τριγλυκερίδια
TNF-a	Tumor necrosis factor/ Παράγοντας νέκρωσης όγκου
TRAP	Total antioxidant potential/ ολική δυνατότητα αντιοξειδωτικών
TRL	Triglyceride rich lipoproteins/ πλούσιες σε TG λιποπρωτεΐνες
UA	Uric acid/ουρικό οξύ
UV	Ultraviolet/ υπεριώδης
VLDL	Very-low-density lipoprotein/ λιποπρωτεΐνη πολύς χαμηλής πυκνότητας
WGPF	Wine grape pomace flour/ αλεύρι κατασκευασμένο από στέμφυλα
XO	Xanthine oxidase/ οξειδάση της ξανθίνης
Zn	Zinc /ψευδάργυρος
α-, β-, γ-, δ- Toc	A-, β-, γ-, δ- tocopherol/α-, β-, γ-, δ- τοκοφερόλη

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.1: Ορισμός

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία ανισορροπία μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών παραγόντων, υπέρ των οξειδωτικών. Στα βιολογικά συστήματα παρατηρείται όταν λαμβάνει χώρα υπερβολική παραγωγή προ-οξειδωτικών παραγόντων ή/και έλλειψη αντι-οξειδωτικών μηχανισμών, ενζυματικών ή μη ενζυματικών. Ως αποτέλεσμα αυτού, προκαλούνται ποικίλες επιβλαβείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Το οξειδωτικό στρες είναι μια πολύπλοκη κατάσταση. Οι επιπτώσεις του εξαρτώνται από τον τύπο του οξειδωτικού παράγοντα, από τη θέση και την ένταση της παραγωγής του, από τη σύνθεση και δραστικότητα διαφόρων αντιοξειδωτικών και από την ικανότητα των συστημάτων επιδιόρθωσης. Η χρόνια παρουσία του οδηγεί σε μια κοινή οδό για πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της υπέρτασης, της αθηροσκλήρωσης, της καρδιακής ανεπάρκειας και πολλών ακόμα. **(1,2)**

1.2: Είδη οξειδωτικών παραγόντων

Οι κυριότεροι προ-οξειδωτικοί παράγοντες είναι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS-Reactive Oxygen Species) καθώς και αζώτου (RNS-Reactive Oxygen Species) που συνοψίζονται και στον όρο RONS. Ο όρος ROS χρησιμοποιείται για την περιγραφή των χημικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την ατελή αναγωγή του οξυγόνου (O_2) ως ασταθείς μεταβολίτες αυτού. Από την άλλη πλευρά, οι RNS μπορεί να είναι προϊόντα συνθασών μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Οι RONS διαδραματίζουν διπλό ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Σε χαμηλές έως μέτριες ποσότητες φέρουν ευεργετικά αποτελέσματα και εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως σε αυτήν του ανοσοποιητικού συστήματος, σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, στην μιτογόνο απόκριση καθώς και στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Αντιθέτως, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δημιουργούν οξειδωτικό και νιτροδωτικό, αντιστοίχως, στρες προκαλώντας, εν δυνάμει, βλάβη σε βιομόρια. Και οι δύο κατηγορίες αναφέρονται σε μόρια υψηλής χημικής δραστικότητας, που παράγονται ως αποτέλεσμα ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ερεθισμάτων. Εξαιτίας της αστάθειας, καθώς και του μικρού χρόνου ημιζωής, η μέτρησή τους είναι δύσκολη και συνεπώς μετρώνται έμμεσα μέσω των μεταβολιτών τους. Τόσο οι ROS όσο και οι RNS μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες ενώσεων, τις ελεύθερες ρίζες και τις μη ελεύθερες ρίζες. **(1-3)**

Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες (free radicals) είναι προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Ελεύθερη ρίζα μπορεί να χαρακτηριστεί οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν το οποίο διαθέτει ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην στοιβάδα σθένους. Το ασύζευκτο αυτό ηλεκτρόνιο τείνει να δημιουργήσει δεσμούς ή να αποσπάσει ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια προκειμένου να μεταπέσει σε σταθερότερη δυναμικά στοιβάδα, γεγονός το οποίο θέτει τις ελεύθερες ρίζες ως ισχυρά ενεργές και ασταθείς ενώσεις. **(3-5)** Ωστόσο, αν αυτό συμβεί, το άτομο ή το μόριο δότης ηλεκτρονίων συνήθως μετατρέπεται και αυτό σε ελεύθερη ρίζα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να μετατρέψει και άλλα μόρια σε ελεύθερες ρίζες, δημιουργώντας έτσι μία αλυσίδα αλλεπάλληλων χημικών αντιδράσεων διαιωνισμού του ελλειμματικού αυτού φορτίου που είχε αρχικώς δημιουργηθεί και επιφέροντας θερμοδυναμική αστάθεια σε πολύ περισσότερα μόρια. Οι αντιδράσεις αυτές τερματίζονται είτε όταν οι ελεύθερες ρίζες γίνουν τόσες ώστε να αντιδρούν πλέον μεταξύ τους εξουδετερώνοντας η μία την άλλη, είτε όταν βρεθεί ένα μόριο σταθεροποιητής φορτίου που σταματά τον καταρράκτη παραγωγής ελευθέρων ριζών. Τέτοιο ρόλο διαδραματίζουν και τα αντιοξειδωτικά μόρια. **(6)** Η δραστικότητα των ελεύθερων ριζών ποικίλει, αλλά γενικά είναι μεγαλύτερη από αυτή των μη ελευθέρων ριζών. Ο συμβολισμός τους γίνεται με μία τελεία ή παύλα στο πάνω μέρος δεξιά του εκάστοτε στοιχείου. **(7)** Στην κατηγορία των ελευθέρων ριζών ανήκει το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), η ρίζα του υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$), η ρίζα του αλκοξειδίου ($RO^{\bullet}$), η ρίζα του υπεροξειδίου ($ROO^{\bullet}$) και η υδροϋπεροξειδική ρίζα ($HO_2^{\bullet}$) όσο και το μονοξείδιο του αζώτου ($NO^{\bullet}$) και το διοξείδιο του αζώτου ($NO_2^{\bullet}$). Επιπλέον, το μόριο του οξυγόνου (O_2) από μόνο του είναι μία ρίζα, και λόγω της παρουσίας δύο μη ζευγαρωμένων ηλεκτρονίων σε διαφορετικά τροχιακά αναφέρεται ως «biradical» δηλαδή διπλή ελεύθερη ρίζα. Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια μεταβολικών αντιδράσεων είναι ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο, στις οποίες και θα επικεντρωθούμε.

Μη ελεύθερες ρίζες

Στις μη ελεύθερες ρίζες ανήκουν ενώσεις όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3), το μονήρες οξυγόνο ($^1O_2$), οργανικά υπεροξείδια (ROOH), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το υποβρωμικό οξύ (HOBr) καθώς επίσης το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το υπερόξυ-νιτρώδες οξύ (ONOOH), το κατιόν του μονοξειδίου του αζώτου (NO^+), το ανιόν του μονοξειδίου του αζώτου (NO^-), το τριοξείδιο του αζώτου (N_2O_3), το τετραοξείδιο του αζώτου (N_2O_4) κ.α. Τα στοιχεία αυτά δεν είναι τόσο δραστικά όσο οι ελεύθερες ρίζες, αλλά μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών σε ζωντανούς οργανισμούς.

Ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

Το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) παράγεται από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου e^- στο μόριο του οξυγόνου. Αυτή αποτελεί και την αρχική αντίδραση για τον σχηματισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου.

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$$

Παράγεται κυρίως εντός των μιτοχονδρίων και η ικανότητα του να αντιδρά με τα βιομόρια είναι χαμηλή. Τα ένζυμα από τα οποία μπορεί να προκύψει το υπεροξείδιο είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η λιποοξυγονάση, η κυκλοοξυγονάση και η NADPH εξαρτημένη οξειδάση. Δρα ως οξειδωτικός παράγοντας για το ασκορβικό οξύ και την τοκοφερόλη, αλλά ως αναγωγικός για το κυτόχρωμα C και το σιδηρούχο το Fe^+ - EDTA όπου ανάγει το τρισθενή σίδηρο Fe^{+3} σε δισθενή Fe^{+2}. Η προσθήκη ενός πρωτονίου στο $O_2^{\bullet-}$ οδηγεί στο σχηματισμό της υδροϋπεροξειδικής ρίζας ($HO_2^{\bullet}$), η οποία είναι η πιο σημαντική του μορφή καθώς διεισδύει πολύ ευκολότερα στην φωσφολιπιδική μεμβράνη. Παρόλα αυτά, είναι πολύ λιγότερο σταθερή σε μη όξινο pH, οπότε σε συνθήκες φυσιολογικού pH, η μορφή του ανιόντος κυριαρχεί. Όταν δύο $O_2^{\bullet-}$ αντιδρούν μεταξύ τους (αντίδραση SOD), το ένα θα οξειδωθεί προς σχηματισμό O_2 και το άλλο θα αναχθεί στο λιγότερο δραστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

$$O_2 + O_2^{\bullet-} + 2H_2O \xrightarrow{Cu,Zn,Mn-SOD} H_2O_2 + O_2$$

Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Σχηματίζεται όπως φαίνεται παραπάνω με μια αντίδραση που καταλύεται από την δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα. Μπορεί εύκολα να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες και να προκαλέσει κυτταρική βλάβη όντας σε χαμηλή συγκέντρωση. Δεν έχει άμεση επίδραση στο DNA αλλά μπορεί να το βλάψει έμμεσα, παράγοντας την ισχυρότερη οξειδωτικά ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$) παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης (αντίδραση Fenton). Τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που μπορούν να το εξαλείψουν περιλαμβάνουν την καταλάση, την υπεροξειδάση γλουταθειόνης και τις υπεροξιρεδοξίνες.

Ρίζα του υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$)

Η ρίζα αυτή μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι μέσω της αντίδρασης Fenton κατά την οποία το H_2O_2 αντιδρά με μεταλλικά ιόντα (Fe^{+2} ή Cu^+), συχνά συνδεδεμένα σε σύμπλοκα με διαφορετικές πρωτεΐνες όπως η φερριτίνη και η σερουλοπλασμίνη ή άλλα μόρια. Κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, η περίσσεια ποσότητα $O_2^{\bullet-}$ αποδίδει ελεύθερο σίδηρο από την φερριτίνη ο οποίος χρησιμοποιείται ως αντιδρών της αντίδρασης αυτής. Ο δεύτερος τρόπος σχηματισμού του είναι από την αντίδραση Haber-Weiss στην οποία αντιδρά $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2.

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\bullet} + OH^{-} \text{(Fenton reaction)}$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^{-} \text{(Haber-Weiss reaction)}$$

Η ρίζα υδροξυλίου είναι η ουδέτερη μορφή του ιόντος υδροξειδίου (OH^-) και είναι εξαιρετικά δραστική. Μπορεί να αντιδράσει έντονα τόσο με οργανικά όσο και με ανόργανα μόρια συμπεριλαμβανομένου του DNA, των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων προκαλώντας την σοβαρότερη από κάθε άλλη ROS βλάβη.

Ρίζα του υπεροξειδίου ($ROO^{\bullet}$)

Η πιο διαδεδομένη εξ αυτών είναι η ρίζα του υδρουπεροξειδίου ($HOO^{\bullet}$) η οποία προκύπτει από πρωτονίωση της $O_2^{\bullet -}$. **(3)**

1.3: Μονοπάτια Παραγωγής

Οι ROS μπορούν να παραχθούν είτε ενδογενώς είτε εξωγενώς. Οι εξωγενείς πηγές αφορούν παράγοντες όπως το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική/υδάτινη ρύπανση, η υπεριώδης ακτινοβολία, η υψηλή θερμοκρασία, οι βιομηχανικοί διαλύτες, τα βαρέα μέταλλα, τα φυτοφάρμακα κ.α. Οι ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, εκείνα δηλαδή όπου η κατανάλωση οξυγόνου είναι υψηλή. Επιπλέον, παραγωγή ROS εντοπίζεται και στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στο κυτταρόπλασμα. **(3,8)**

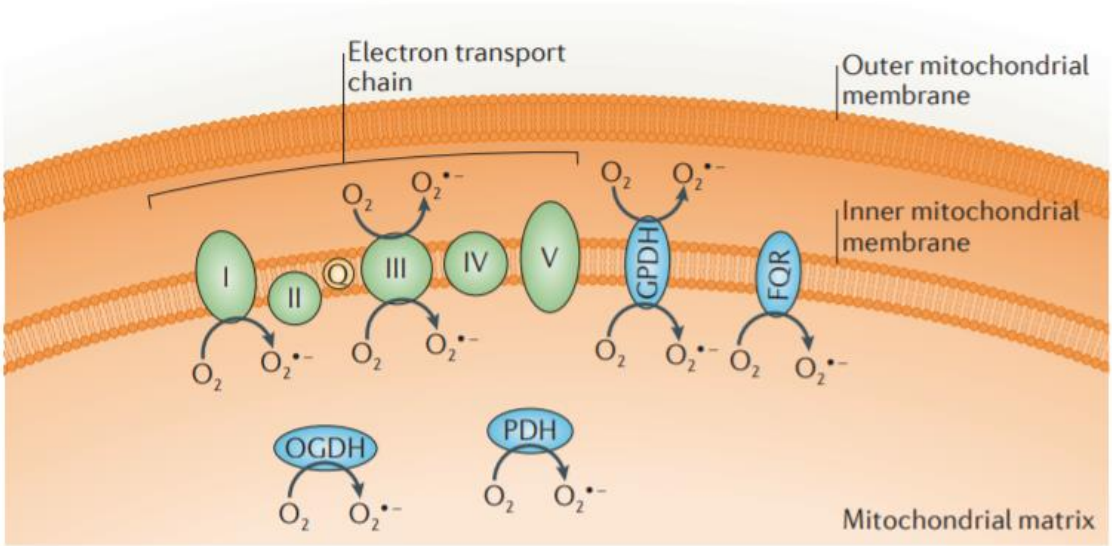
Μιτοχόνδρια

Η κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι να παρέχουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που απαιτείται για το κύτταρο με τη μορφή αδενοσίνης-5′-τριφωσφορικής (ATP) το οποίο συντίθεται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Καθώς χρησιμοποιούν περίπου το 95% του οξυγόνου που λαμβάνεται από τους αερόβιους οργανισμούς, τα οργανίδια αυτά αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή ελευθέρων ριζών του οργανισμού. **(8,9)**

Η αναπνευστική αλυσίδα είναι πρωτίστως υπεύθυνη για την μιτοχονδριακή παραγωγή ROS. Παρότι η μεταφορά των τεσσάρων ηλεκτρονίων κατά μήκος της έχει την ικανότητα να ανάγει το μοριακό οξυγόνο πλήρως και να οδηγεί στην δημιουργία δύο μορίων ύδατος, καθ' όλη την διαδικασία, το μοριακό οξυγόνο O_2 ενδέχεται να αναχθεί μερικώς, προς σχηματισμό είτε ανιόντος του υπεροξειδίου είτε υπεροξειδίου. Δύο είναι οι σημαντικότερες θέσεις παραγωγής, το σύμπλοκο

I, δηλαδή η αφυδρογονάση του NADH, και το σύμπλεγμα III, η ουβικινόνη / κυτοχρώματος c αναγωγάση. Λόγω του εντοπισμού του συμπλόκου I στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου, το παραγόμενο $O_2^{\bullet-}$ απελευθερώνεται προς τη μήτρα. Από την άλλη, το σύμπλοκο III των κυτοχρωμάτων διαθέτει δύο ενεργά κέντρα τα οποία αποτελούν σημεία παραγωγής ανιόντος υπεροξειδίου. Το ένα είναι το Qi, προσανατολισμένο προς τη μήτρα ενώ το δεύτερο, Qo, εντοπίζεται στην πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης που γειτονεύει με τον ενδιάμεσο χώρο. Έτσι, $O_2^{\bullet-}$ θα απελευθερωθεί και στην μήτρα και εντός του ενδιάμεσου χώρου. Η παραγωγή υπεροξειδίου είναι μη ενζυματική και επομένως όσο υψηλότερος ο μεταβολικός ρυθμός, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή του. **(9-11)**

Επιπλέον της αναπνευστικής αλυσίδας, υπάρχουν και άλλες πηγές που συνεισφέρουν στην μιτοχονδριακή παραγωγή ROS. Η οξειδωτική απαμίνωση βιογενών αμινών από μονοαμινοξειδάσες αποτελεί μία διαδικασία που δεν συνδέεται με την αναπνοή, όμως από την οποία προκύπτει άμεση αναγωγή του O_2 με δύο ηλεκτρόνια σε H_2O_2 . Η συγκεκριμένη οξειδάση είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που εκφράζεται παντού σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. **(12)** Από την εσωτερική τώρα μεμβράνη του μιτοχονδρίου, συμβάλει η αφυδρογονάση της 3-φωσφω-γλυκερόλης (GPDH) που είναι ένα φλαβο-ένζυμο που μεταφέρει e- από την 3-φωσφο-γλυκερόλη στην αναπνευστική αλυσίδα. **(13)** Στην εσωτερική πλευρά της ίδιας, συνεισφέρει σε O_2•– το σύστημα FQR **(14)** Στην μήτρα του μιτοχονδρίου εντοπίζεται επίσης συνεισφορά από τα ένζυμα 2-οξογλουταρική αφυδρογονάση (OGDH) και πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH).**(14)**



<u>Εικόνα 1.1:</u> Σημεία παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια ***(14)***

Υπεροξυσώματα

Σημαντικές λειτουργίες που εκτελούνται στα υπεροξισώματα οδηγούν σε σχηματισμό ROS κατά τη δραστηριότητά τους. Η αναπνευστική οδός τους περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες προς το οξυγόνο και οδηγεί στο σχηματισμό H_2O_2, χωρίς να συνδέεται με οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ATP, αντίθετα απελευθερώνεται ελεύθερη ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Επιπλέον αυτού, άλλες σημαντικές λειτουργίες των υπεροξυσωμάτων όπως η β- και α-οξείδωση λιπαρών οξέων, ο μεταβολισμός αμινοξέων, ο μεταβολισμός του γλυοξυλικού οξέος και η σύνθεση λιποειδικών ενώσεων συνεισφέρουν σημαντικά στην παραγωγή ROS μέσω των διαφορετικών οξειδασών που τις καταλύουν. Συγκεκριμένα, η οξειδάση του ακυλο συνενζύμου Α (ακυλο-CoA), η οξειδάση των D-αμινοξέων, η L-α-υδροξυοξειδάση, η ουρική οξειδάση και η οξειδάση του D-ασπαρτικού, παράγουν H_2O_2. Τέλος, ένα από τα χαρακτηριστικότερα παραδείγματα αποτελεί και η οξειδάση της ξανθίνης (XO), μία φλαβοπρωτεΐνη που παρέχει σίδηρο και μόλυβδο και η οποία παράγει τόσο H_2O_2 όσο και $O_2^{\bullet-}$ κατά την οξείδωση της ξανθίνης/υποξανθίνης σε ουρικό οξύ. Μεγάλο ποσοστό των παραγόμενων αυτών ROS μπορούν εύκολα να διασχίσουν την υπεροξυσωματική μεμβράνη και να απελευθερωθούν στο κυτταρόπλασμα, ικανότητα η οποία θέτει τα υπεροξυσώματα, κάτω από ορισμένες φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες, ως σημαντική πηγή ROS. **(3,8,15)**

Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο παρουσιάζει μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, που αποτελείται από δύο συστήματα ικανά να παράγουν ROS. Το πρώτο διεξάγει τον ξενοβιοτικό μεταβολισμό και το δεύτερο την εισαγωγή διπλών δεσμών σε λιπαρά οξέα. Ένα ακόμα μικροσωμικό σύστημα με αυτήν την ικανότητα πραγματοποιεί οξειδωτική αναδίπλωση πρωτεΐνης. Όσον αφορά την διαδικασία του ξενοβιοτικού μεταβολισμού, ρόλος της είναι να αποτοξινώνει τα ξενοβιοτικά μετατρέποντάς τα σε είδη που είναι πιο υδατοδιαλυτά και πιο εύκολο να απεκκριθούν στα ούρα ή μπορούν να συζευχθούν με ουσίες που κάνουν την απέκκρισή τους στα ούρα ή τη χολή ευκολότερη. Κύριος πρωταγωνιστής αποτελεί ένα σύστημα αποτελούμενο από μία φλαβοπρωτεΐνη, NADPH-κυτοχρώματος P450 αναγωγάση, και κυτοχρώματα γνωστά ως κυτοχρώματα P450 (CYPs). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι μία αντίδραση μονοοξυγονάσης κατά την οποία δεσμεύεται O_2, το ένα άτομο οξειδώνει το υπόστρωμα (RH) ενώ το άλλο ανάγεται σε H_2O μέσω του NADPH ως εξής:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O$$

Η εισαγωγή διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα, δηλαδή ο αποκορεσμός τους, είναι η δεύτερη προσφέρουσα ROS διαδικασία που λαμβάνει τόπο στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Πρωταγωνιστής

εδώ είναι το πολυενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος b5 το οποίο δίνει ηλεκτρόνια από την NADH αναγωγάση του κυτοχρώματος στα υπεύθυνα για τον αποκορεσμό ένζυμα. Από την NADH αναγωγάση όμως μπορεί να διαρρεύσουν ηλεκτρόνια προς το οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$. Πολλές φορές, τα ένζυμα που εισάγουν τον διπλό δεσμό στα λιπαρά οξέα αποτελούνται τα ίδια από μονάδες κυτοχρώματος b5 γεγονός που καθιστά την αναγωγάση ικανή να μεταφέρει απευθείας ηλεκτρόνια στην καταλυτική θέση χωρίς την απαίτηση ανεξάρτητου κυτοχρώματος b5. Αυτός είναι ένας δεύτερος τρόπος με τον οποίο το κυτόχρωμα b5 δρα ως μεταφορέας ηλεκτρονίων. Τα δύο παραπάνω συστήματα συνδέονται με την συμβολή του κυτοχρώματος b5 στην αντίδραση της μονοοξυγονάσης του κυτοχρώματος P450, αφού το πρώτο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά του δεύτερου εκ των δύο που ενεργοποιούν το μοριακού οξυγόνο. Αυτή η μεταφορά κάνει την αντίδραση ταχύτερη και μειώνει τον χρόνο σχηματισμού παραπροϊόντων, όπως H_2O_2 και $O_2^{\bullet-}$. Επιπλέον των δύο αυτών συστημάτων, ενεργές μορφές οξυγόνου στο ενδοπλασματικό δίκτυο παράγονται και κατά την αναδίπλωση και σταθεροποίηση των πρωτεϊνών μέσω του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Μάλιστα, έχει εκτιμηθεί πως η ποσότητα των ROS που παράγεται κατ' αυτό τον τρόπο αντιπροσωπεύει περίπου το 25% της συνολικής ποσότητας του κυττάρου. Κατά την αντίδραση αυτή, η οποία ευνοείται σε σχετικά οξειδωτικό περιβάλλον, πραγματοποιείται η οξείδωση της ελεύθερης σουλφυδρυλικής ομάδας και χρησιμοποιείται μοριακό οξυγόνο ως πηγή οξειδωτικών ισοδυνάμων. **(8, 16)**

Κυτταροπλασματική μεμβράνη

Η μεμβράνη εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες και αποτελεί και βασικό σημείο αντιδράσεων ελεύθερων ριζών αφού εκτίθεται συχνά σε οξειδωτικό περιβάλλον. Ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν από αντιδράσεις που σχετίζονται με τη μεμβράνη και καταλύονται από ένζυμα όπως η λιποοξυγονάση (LOX) και η κυκλοοξυγονάση (COX). Τέτοια ένζυμα μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια της διπλοστοιβάδας της πλασματικής μεμβράνης σε προϊόντα όπως προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια και λευκοτριένια, δημιουργώντας ROS ως παραπροϊόντα. Η κύρια πηγή ROS , παρόλα αυτά, προέρχεται από τις δεσμευμένες στην μεμβράνη NADPH οξειδάσες (NOX) οι οποίες παράγουν σημαντική ποσότητα $O_2^{\bullet-}$. Η πιο διεξοδικά μελετημένη από αυτές είναι η οξειδάση NADPH των λευκοκυττάρων (NOX_2), η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη σε μεμβράνες φαγοκυττάρων και Β λεμφοκυττάρων. Στο σημείο μίας λοίμωξης καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα οξυγόνου από τα φαγοκύτταρα, και αυτό ακριβώς το οξυγόνο χρησιμοποιεί η οξειδάση για την παραγωγή υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) με την αναγωγή του κατά ένα ηλεκτρόνιο. Ως δότης ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται το NADPH και η αντίδραση είναι η εξής:

$$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP+ + 2O_2^{\bullet-} + H+$$

Το $O_2^{\bullet-}$ που παράγεται χρησιμεύει για την παραγωγή μιας τεράστιας ποικιλίας οξειδωτικών τα οποία χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα για να σκοτώσουν τους εισβολείς μικροοργανισμούς, συμβάλλοντας στην άμυνα του οργανισμού. Παράλληλα βέβαια προκαλούν και πολλές βλάβες στους κοντινούς ιστούς, επομένως είναι σημαντικό η παραγωγή τους να ρυθμίζεται αυστηρά για να διασφαλιστεί ότι δημιουργούνται μόνο όταν και όπου απαιτείται. Τέλος, έχει επίσης αναφερθεί ότι το αραχιδονικό οξύ και οι μεταβολίτες του που παράγονται από τη λιποοξυγονάση και την κυκλοοξυγονάση διεγείρουν τη δημιουργία ROS από τις NOX, αποκαλύπτοντας έτσι την ύπαρξη ενός διασυνδεόμενου συστήματος σηματοδότησης. **(8, 17, 18)**

Κυτταρόπλασμα

Κύρια πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου στο κυτταρόπλασμα αποτελεί η οξειδάση της ξανθίνης, μια φλαβινοπρωτεϊνη που περιέχει μολυβδαίνιο και σίδηρο. Η οξειδοαναγωγάση της ξανθίνης (XOR) αναφέρεται σε δύο ισομορφές του ίδιου ενζύμου, την αφυδρογονάση (XDH) και την οξειδάση (XO). Η XOR υπάρχει κυρίως ως XDH ενδοκυτταρικά. Ωστόσο, όταν βρίσκεται στον εξωκυτταρικό χώρο και στην κυκλοφορία, η XO είναι η κυρίαρχη ισομορφή. Το ένζυμο αυτό απαιτείται για την παραγωγή ουρικού οξέος από τη διάσπαση των νουκλεοτιδίων πουρίνης. Μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, οι πουρίνες, η μονοφωσφορική γουανίνη (GMP) και η μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) μετατρέπονται είτε σε υποξανθίνη είτε σε ξανθίνη. Οι αντιδράσεις διάσπασης έπειτα της υποξανθίνης και της ξανθίνης καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης σχηματίζοντας ουρικό οξύ και έχουν ως οι εξής :

$$\text{υποξανθίνη} + H_2O + O_2 \leftrightarrow \text{ξανθίνη} + H_2O_2$$

$$\text{ξανθίνη} + H_2O + O_2 \leftrightarrow \text{ουρικό οξύ} + H_2O_2$$

Ο αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το NAD+ το οποίο ανάγεται προς NADH. Η αντίδραση που διεξάγεται από την XO ανάγει το οξυγόνο σε ένα $O_2^{\bullet-}$ το οποίο τελικά προάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, ένα δραστικό είδος οξυγόνου (ROS). Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο μορφών XO και XDH είναι η μειωμένη συγγένεια της XO για το NAD+ και η πάνω από 11 φορές αυξημένη συγγένεια της για το O_2. Ως εκ τούτου, τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από την οξείδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης, μέσω της αντίδρασης με την XO, γίνονται γρήγορα αποδεκτά από το O_2 για να δημιουργήσουν $O_2^{\bullet-}$και H_2O_2. **(19-21)**

1.4: Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στα μακρομόρια

Τα ενεργά είδη οξυγόνου και αζώτου in vitro προκαλούν χημικές τροποποιήσεις καθώς και καταστροφικές επιδράσεις στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες και τα νουκλεοτίδια. Αυτές με την σειρά τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη πληθώρας ασθενειών. Για να συμβούν τα παραπάνω θα πρέπει να υπάρξει μία ανισορροπία μεταξύ προ-οξειδωτικών παραγόντων και της αντι-οξειδωτικής άμυνας του οργανισμού υπέρ των πρώτων. Ανισορροπία μπορεί να προκύψει ακόμη και σε ένα φυσιολογικά λειτουργικό κύτταρο, αφού υπάρχει η τάση οι RONS να αποφεύγουν την άμυνα του οργανισμού. Η σειρά προτίμησης για τροποποίηση εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως η τοποθεσία παραγωγής των RONS, η σχετική ικανότητα οξείδωσης του κάθε βιομορίου και η διαθεσιμότητα μεταλλικών ιόντων. **(22)**
Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εντοπίζονται από την ανάλυση διακριτών βιοδεικτών που απομονώνονται από ιστούς και βιολογικά υγρά. Οι βιοδείκτες είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη με σκοπό τον έμμεσο προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών, αφού λόγω της υψηλής δραστικότητας και αστάθειάς τους έχουν ελάχιστο χρόνο ημιζωής, θέτοντας την απευθείας μέτρηση των ελευθέρων ριζών σε κλινικό περιβάλλον πρακτικά αδύνατη. Η μέτρηση αφορά σταθερά παράγωγα που σχηματίζουν οι ελεύθερες ρίζες και/ή συγκεντρώσεις των στόχων οξείδωσης. **(23)**

1.4.1: Επιπτώσεις στο DNA

Τόσο οι ROS όσο και οι RNS μπορούν να βλάψουν οξειδωτικά τα νουκλεϊκά οξέα. Το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο συγκριτικά με το πυρηνικό DNA, αφού βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από το σημείο παραγωγής τους. Οι ROS, με σημαντικότερη την ρίζα OH• , αντιδρούν άμεσα με όλα τα συστατικά του DNA όπως οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης, ο υδατανθρακικός σκελετός του σακχάρου της δεοξυριβόζης και προκαλεί έναν αριθμό αλλαγών, συμπεριλαμβανομένων μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων στο DNA. Η OH• αποσπά άτομα υδρογόνου με αποτέλεσμα να παράγεται ένας αριθμός τροποποιημένων παραπροϊόντων βάσεων πουρίνης (8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη, 8-υδροξυδεοξυαδενοσίνη, 2,6-διαμινο-4-υδροξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη) και πυριμιδίνης (5-υδροξυουριδίνη, 5-υδροξυκυτιδίνη), καθώς και σταυροειδείς συνδέσεις DNA-πρωτεϊνών. Τα προϊόντα που παράγονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών στη δεοξυριβόζη περιλαμβάνουν το γλυκολικό οξύ, την ερυθρόζη, 2-δεοξυτετροδιαλδόζη, το 2-δεοξυπεντονικό οξύ λακτόνη, και τη 2-δεοξυπεντόζη-4-ουλόζη. Εκ των παραπάνω, η 8-υδροξυ-2- δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) που δημιουργείται από την δράση της ρίζας OH• στην θέση C8 είναι η πιο πολυμελετημένη. Τα επίπεδα της είναι υψηλότερα στο

μιτοχονδριακό DNA από ότι στο πυρηνικό. Από την άλλη πλευρά, οι ενεργές μορφές αζώτου, και κυρίως το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($OONO^-$), αλληλεπιδρά με την γουανίνη για την παραγωγή οξειδωτικών για το DNA ενώσεων, όπως η 8-νιτρογουανίνη. Η εξαιρετικά ασταθής αυτή ένωση, μπορεί να απομακρυνθεί αυθόρμητα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας απουρινικής θέσης. Αντίθετα, η αδενίνη μπορεί να συζευχθεί με την 8-νιτρογουανίνη κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA με αποτέλεσμα μετατροπές G-T. Συνεπώς, η 8-νιτρογουανίνη είναι μια μεταλλαξιογόνος βλάβη του DNA που εμπλέκεται στην καρκινογένεση.

Οι ROS μπορούν επίσης να επιτεθούν σε διαφορετικά RNA που παράγονται στο σώμα. Το RNA είναι πιο επιρρεπές σε οξειδωτική βλάβη από το DNA, λόγω της μονόκλωνης φύσης του, της έλλειψης ενεργού μηχανισμού επιδιόρθωσης της οξειδωτικής βλάβης, της λιγότερης προστασίας από πρωτεΐνες και επιπλέον λόγω της κοντινής απόστασής του από τα μιτοχόνδρια, σημεία υψηλής παραγωγής ROS. Πράγματι, το RNA υποβάλλεται σε μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη από το DNA στους ανθρώπους. Η 7,8-διυδρο-8-οξο-γουανοσίνη (8-oxoG) είναι το πιο εκτενώς μελετημένο προϊόν βλάβης του RNA και τα επίπεδά του αυξάνονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον, η αθηροσκλήρωση, αιμοχρωμάτωση και μυοπάθειες. **(3)**

1.4.2: Επιπτώσεις στις πρωτεΐνες

Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκληθεί είτε από ελεύθερες ($O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$) είτε από μη ελεύθερες ρίζες όπως O_3, H_2O_2, το μονήρες οξυγόνο, $OONO^-$. Οι ROS οξειδώνουν διάφορα αμινοξέα των πρωτεϊνών, προκαλώντας σχηματισμό διασυνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη μετουσίωση και την απώλεια λειτουργίας τους, την απώλεια της ενζυμικής δραστικότητας, την αναστολή της δράσης των υποδοχέων και των πρωτεϊνών μεταφοράς. Πιο επιρρεπή σε οξείδωση είναι τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, τα οποία μετατρέπονται αντίστοιχα σε δισουλφίδια και σουλφοξείδια μεθειονίνης. Παρόλα αυτά, είναι και τα μόνα με την δυνατότητα μετατροπής στην αρχική τους, προ οξείδωσης, κατάσταση χάρη στην δράση δύο αντιστοίχων αναγωγασών. Από τη δράση των ROS στα διαφορετικά αμινοξέα σχηματίζονται και ανάλογα προϊόντα οξείδωσης: η τρυπτοφάνη σχηματίζει νιτροτρυπτοφάνη, κυνουρενίνη και φορμυλκυνουρινίνη, η φαινυλαλανίνη σχηματίζει 2,3-διυδροξυφαινυλαλανίνη, 2-, 3- και 4-υδροξυφαινυλαλανίνη, η τυροσίνη σχηματίζει 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη, διασυνδέσεις τυροσίνης-τυροσίνης και νιτροτυροσίνη, ενώ η ιστιδίνη σχηματίζει ασπαραγίνη και ασπαρτικό οξύ. Η αργινίνη σχηματίζει γλουταμική ημιαλδεΰδη, η λυσίνη σχηματίζει α-αμινοαδιπική ημιαλδεΰδη, η προλίνη σχηματίζει 2-πυρρολιδόνη, 4- και 5-υδροξυπρολινικό πυρογλουταμικό οξύ, γλουταμική ημιαλδεΰδη. Η θρεονίνη σχηματίζει το 2-

αμινο-3-κετοβουτυρικό οξύ και τα υπολείμματα λευκίνης και βαλίνης σχηματίζουν υπολείμματα υδροξυλίου. Η οξείδωση υπολειμμάτων αμινοξέων όπως η λυσίνη, η προλίνη, η θρεονίνη και η αργινίνη οδηγεί σε παραγωγή καρβονυλοπαραγώγων. Η παρουσία καρβονυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες έχει θεωρηθεί ως δείκτης οξείδωσης πρωτεϊνών με τη μεσολάβηση ROS. Αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρείται σε μια σειρά από παθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η μυϊκή δυστροφία, η καταρρακτογένεση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης, η προγηρία, η αθηροσκλήρωση, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, το σύνδρομο Werner και η γήρανση. **(3)**

1.4.3: Επιπτώσεις στα λιποειδή

Τα λιποειδή της μεμβράνης, ιδιαίτερα τα υπολείμματα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιποειδών, είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξείδωση των λιποειδών έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας της μεμβράνης, όπως για παράδειγμα, μειωμένη ρευστότητα και απενεργοποίηση των μεμβρανικών ενζύμων και υποδοχέων. Η υπεροξείδωση των λιποειδών αρχίζει, όταν οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα επιτίθεται και αφαιρεί ένα υδρογόνο από ομάδες μεθυλενίου (CH_2) σε ένα λιπαρό οξύ το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας λιποειδικής ρίζας με κεντρικό άνθρακα ($L^{\bullet}$). Η λιποειδική αυτή ρίζα μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο και να σχηματίσει μια λιποειδική ρίζα υπεροξυλίου ($LOO^{\bullet}$). Η προκύπτουσα ρίζα $LOO^{\bullet}$ υφίσταται αναδιάταξη μέσω μιας αντίδρασης κυκλοποίησης προς σχηματισμό ενδοϋπεροξειδίων, τα οποία τελικά σχηματίζουν μηλονυλοδιαλδεΰδη (MDA) και 4-υδροξυνονενάλη (4-HNA), τα τοξικά τελικά προϊόντα υπεροξείδωσης των λιποειδών που προκαλούν βλάβη στο DNA και τις πρωτεΐνες. Αυτές οι λιποειδικές ρίζες υπεροξυλίου μπορούν περαιτέρω να διαδώσουν τη διαδικασία της υπεροξείδωσης με την απόσπαση ατόμων υδρογόνου από άλλα μόρια λιποειδών. Τα ισοπροστάνια, ουσίες που μοιάζουν με τις προσταγλανδίνες και παράγονται από τον οργανισμό με την εστεροποίηση του αραχιδονικού οξέος, αποτελούν το βασικό προϊόν της λιποειδικής υπεροξείδωσης του αραχιδονικού οξέος και θεωρούνται ως παράγοντες της οξειδωτικής λιποειδικής βλάβης. **(3)**

1.5: Αμυντικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα αντι-οξειδωτικά, που απαρτίζουν το αντι-οξειδωτικό αμυντικό σύστημα του οργανισμού, δρουν σε διαφορετικά επίπεδα είτε με προληπτικό είτε με επιδιορθωτικό τρόπο. Μπορούν να

κατηγοριοποιηθούν ως αντι-οξειδωτικά πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γραμμής άμυνας.**(24)**

1.5.1: Ενζυμικοί (Αντιοξειδωτικά ένζυμα)

Τα αντι-οξειδωτικά πρώτης γραμμής αναφέρονται κυρίως σε τρία βασικά ένζυμα, την δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), την καταλάση (CAT) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), τα οποία δρουν γρήγορα για την άμεση εξουδετέρωση οποιοδήποτε μορίου που έχει τη δυνατότητα να εξελιχθεί σε ελεύθερη ρίζα ή οποιασδήποτε ελεύθερης ρίζας που μπορεί να προκαλεί την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών. **(24)**

Υπεροξειδική δισμουτάση

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι το πρώτο και πιο ισχυρό ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο του κυττάρου. Δρα κατά των ROS καταλύοντας την διάσπαση δύο μορίων ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μοριακό οξυγόνο (O_2), με ταυτόχρονη οξειδοαναγωγή του δραστικού μετάλλου μετάπτωσης που βρίσκεται στο ενεργό της κέντρο. Με αυτόν τον τρόπο καθιστά το δυνητικά επιβλαβές ανιόν υπεροξειδίου λιγότερο επικίνδυνο. Η αντίδραση έχει ως εξής:

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2H+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Η SOD αποτελεί μία ομάδα οξειδοαναγωγασών, μεταλλοενζύμων. Ως εκ τούτου, έχει τουλάχιστον ένα δραστικό μέταλλο μετάπτωσης στο ενεργό της κέντρο το οποίο καθορίζει και την ισομορφή του ενζύμου. Τα μεταλλικά ιόντα που δεσμεύονται από την SOD είναι ο σίδηρος (Fe-SOD ισομορφή), ο ψευδάργυρος (Zn-SOD ισομορφή), ο χαλκός (Cu-SOD ισομορφή) και το μαγκάνιο (Mn-SOD ισομορφή). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εντοπίζεται η Mn-SOD, στα μιτοχόνδρια συγκεκριμένα, και η Cu/Zn-SOD που είναι και η κυρίαρχη και πιο ευρέως κατανεμημένη ενδοκυτταρικά. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στα υπεροξυσώματα. Διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν την κάθε ισομορφή. Το γονίδιο SOD1 του χρωμοσώματος 21 κωδικοποιεί την Cu/Zn-SOD ενδοκυτταρική κυτταροπλασματική ισομορφή αλλά την εξωκυτταρική το γονίδιο SOD3 στο χρωμόσωμα 4. Η μιτοχονδριακή Mn-SOD κωδικοποιείται από το γονίδιο SOD2 του χρωμοσώματος 6.

Η ενδοκυτταρική CuZnSOD ή SOD1, αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες. Η ενζυμική δραστικότητα της SOD1 εξαρτάται από την παρουσία του χαλκού (Cu) και του ψευδαργύρου (Zn), συγκεκριμένα, είναι ανάλογη με την ποσότητα του Cu που δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο αφού

κατά το στάδιο της εξουδετέρωσης του $O_2^{\bullet -}$ από την SOD ο χαλκός ανάγεται και επανοξειδώνεται. Ο χαλκός δεν μπορεί να αντικατασταθεί με άλλο μέταλλο και κρίνεται απαραίτητος. Ο Zn συμμετέχει στην σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και τη σταθερότητα του μορίου και μπορεί να αντικατασταθεί με κοβάλτιο (Co) και Cu, και δεν είναι αναγκαίος για τη δραστικότητα του ενζύμου σε χαμηλό pH. **(24-26)**

Η εξωκυτταρική CuZnSOD ή SOD3 είναι η κύρια SOD του αγγειακού εξωκυττάριου χώρου με ενεργό κέντρο παρόμοιο με εκείνο της SOD1 και δραστικότητα επίσης εξαρτώμενη από τον διαθέσιμο χαλκό. Σημαντική ποσότητα της βρίσκεται ουσιαστικά σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς. Ένας αριθμός ιστών συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς έχει παρατηρηθεί ότι διαθέτουν δυνατότητα μεταγραφής του SOD3 mRNA. Αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς η SOD3 μορφή είναι η κύρια ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα έναντι αγγειακών και καρδιαγγειακών παθήσεων (νευρολογικές παθήσεις, πνευμονική νόσο, αθηροσκλήρωση, διαβήτης, υπέρταση, φλεγμονώδεις καταστάσεις και τραυματισμός ισχαιμίας-επαναιμάτωσης). Έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της ανεπάρκειας SOD και αριθμού παθολογιών. Ως εκ τούτου, το ένζυμο κρίνεται απαραίτητο για την κυτταρική υγεία, προστατεύοντας τα κύτταρα του σώματος από υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και άλλους επιβλαβείς παράγοντες. Τα επίπεδα των SOD μειώνονται με την ηλικία, ενώ ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών αυξάνεται. Αν και όλες οι ισομορφές των SOD διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η SOD3 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής της (20-24 ώρες) και του ότι είναι αποτελεσματική τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά.

Η MnSOD ή αλλιώς η SOD2 μορφή περιέχει μαγκάνιο (Mn) στη δραστική θέση του ενζύμου το οποίο κι αυτό συμμετέχει στην μετατροπή του $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2. Η κύρια πηγή ριζών οξυγόνου εδώ είναι η αναπνευστική αλυσίδα. **(24, 26-29)**

Επιπλέον της άμυνας ενάντια στα ανιόντα υπεροξειδίου, οι SODs ρυθμίζουν τη σηματοδότηση με τη μεσολάβηση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μέσω της οξειδωτικής αδρανοποίησης του NO στο ισχυρό οξειδωτικό υπεροξυνιτρώδες ($ONOO^-$) το οποίο συμβάλλει στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και κατ' επέκταση στη βλάβη της μεμβράνης. Η SOD1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των επιπέδων NO εντός του ενδοθηλίου, ενώ η SOD3 βρέθηκε ότι εμποδίζει την $O_2^{\bullet -}$ μεσολαβούμενη αδρανοποίηση του NO που εκλύεται από το ενδοθήλιο στην εξωκυτταρικά. Επιπλέον, το $ONOO^-$ έχει βρεθεί ότι αδρανοποιεί τη δραστηριότητα της SOD2 χωρίς ιδιαίτερη επίδραση στη δραστηριότητα της SOD1. **(28)**

Καταλάση

Η καταλάση είναι μία πρωτεϊνη η οποία αποτελείται από τέσσερις παρόμοιες πολυπεπτιδικές υπομονάδες, κάθε μία εξ' αυτών, περιέχει μία ομάδα αίμης με προσθετική ομάδα πρωτοπορφυρίνης. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *ctt1* του χρωμοσώματος 11. Είναι ένα κοινό αντιοξειδωτικό ένζυμο που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς ιστούς που χρησιμοποιούν οξυγόνο καθώς ολοκληρώνει την αντιοξειδωτική δράση της SOD καταλύοντας την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που έχει αυτή έχει παράξει σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Η αντίδραση φαίνεται παρακάτω και απαιτεί την ύπαρξη ενός συμπαράγοντα σιδήρου (Fe) είτε μαγγανίου (Mn). Η απόδοση της καταλάσης είναι ιδιαιτέρως υψηλή, διασπώντας εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου ανά δευτερόλεπτο. Είναι τόσο αποτελεσματικό ένζυμο που δεν μπορεί να κορεστεί από το υπόστρωμα H_2O_2 σε οποιαδήποτε συγκέντρωση.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Η δράση της καταλάσης πραγματοποιείται με μία αντίδραση δύο σταδίων. Στο πρώτο βήμα της αντίδρασης ένα μόριο H_2O_2 οξειδώνει την αίμη, αποσπώντας ένα ισοδύναμο από το σίδηρο και ένα από το δακτύλιο πορφυρίνης, με αποτέλεσμα να παραχθεί μια φασματοσκοπικά διακριτή ενδίαμεση ένωση, η κατιονική ρίζα πορφυρίνης. Στη συνέχεια, το ενδιάμεσο αυτό προϊόν ανάγεται με μεταφορά ηλεκτρονίων από το δεύτερο μόριο H_2O_2 το οποίο, δρώντας ως αναγωγικός παράγοντας, επαναφέρει το ένζυμο στην αρχική κατάσταση, παράγοντας ταυτοχρόνως ένα μόριο οξυγόνου και νερού. Το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως σε υπεροξισώματα και απουσιάζει από τα μιτοχόνδια όλων των θηλαστικών εκτός από αυτά της καρδίας του αρουραίου. Αυτό σημαίνει ότι η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που προκύπτει απ' την SOD στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του ανθρώπου πραγματοποιείται από διαφορετικό ένζυμο, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που θα αναφερθεί στην συνέχεια. Η καταλάση, με τον καταβολισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου που πραγματοποιεί, προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική επίθεση, υπογραμμίζοντας την σημασία της ως ένζυμο αντιοξειδωτικής άμυνας πρώτης γραμμής. Η ανεπάρκεια ή η δυσλειτουργία του ενζύμου έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις και ανωμαλίες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η λεύκη, οι καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η νόσος Wilson, η υπέρταση, η αναιμία, ορισμένες δερματολογικές διαταραχές, η νόσος του Αλτσχάιμερ, η διπολική διαταραχή και η σχιζοφρένεια. Έχει αναφερθεί ότι μια ανωμαλία της δραστικότητας της καταλάσης κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και ονομάζεται ακαταλασειμία, γνωστή και ως νόσος Takahara. Είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένο επίπεδο καταλάσης. **(24, 30)**

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό ένζυμο που καταλύει την αναγωγή των υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και των υδρουπεροξειδίων των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους. Δρα κυρίως στα μιτοχόνδρια και μερικές φορές και στο κυτταρόπλασμα. Δότης των ηλεκτρονίων είναι η γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή (GSH).

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Πρόκειται για μία οικογένεια τουλάχιστον οκτώ ενζύμων GPx1–GPx8, τα γονίδια των οποίων χαρτογραφούνται στα χρωμοσώματα 3, 14, 5, 19, 6, 6, 1 και 5 αντίστοιχα. Οι GPX1- 4 ισομορφές των είναι σεληνοπρωτεΐνες, δηλαδή η δράση τους εξαρτάται από το σελήνιο, διαθέτοντας μία συνδεδεμένη σελοενοκυστεΐνη (SEC) στο ενεργό τους κέντρο. Τα επίπεδα κάθε ισομορφής GPx ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο ιστού που εκφράζονται.

Μεταξύ των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης, η GPx1 είναι η πιο άφθονη και υπάρχει ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα, κυρίως όμως ερυθροκυττάρων, νεφρών και ήπατος. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων αυτών. Ως εκ τούτου, έχει την ικανότητα να καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 ή άλλων οργανικών υπεροξειδίων σε νερό ή στις αντίστοιχες αλκοόλες χρησιμοποιώντας την γλουταθειόνη (GSH) ως αναγωγικό μέσο. Αποτελείται από 4 πανομοιότυπες υπομονάδες.

Η GPx2 βρίσκεται πολύ περισσότερο στον γαστρεντερικό σωλήνα και κυρίως στο εντερικό επιθήλιο. Σε κυτταρικό επίπεδο εντοπίζεται και αυτή επίσης στο κυτταρόπλασμα. Η δομή της παρομοιάζει αυτή της GPx1 και η δράση της επίσης αφορά την αναγωγή του H_2O_2 και άλλων οργανικών υπεροξειδίων.

Η GPx3 ισομορφή αφορά κυρίως ιστούς νεφρού καθώς και επίσης εξωκυτταρικά υγρά όπως το πλάσμα, όπου δρα ως γλυκοπρωτεϊνη.

Η GPX4 (ή PHGPX) βρίσκεται στην πλειοψηφία των ιστών, όπως και η GPX1. Ωστόσο, εκφράζεται σε υψηλό βαθμό σε νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα και όρχεις. Ανιχνεύεται κυρίως στα μιτοχόνδρια. Σπουδαίο ρόλο παίζει στην προστασία των μεμβρανών από την οξειδωτική βλάβη όντας το μόνο ένζυμο GPx που διασπά τα υδροϋπεροξείδια των φωσφολιπιδίων. Διαφέρει στην δομή ως προς τις υπόλοιπες ισομορφές. Ενώ οι περισσότερες μορφές GPx έχουν τετραμερή δομή, το GPx4 θεωρείται μονομερές και διαφέρει ως προς την εξειδίκευση του υποστρώματος. Το

ένζυμο έχει επίσης μια μιτοχονδριακή ισομορφή που μεσολαβεί στην απόπτωση και διαδραματίζει ρόλο στη δομή και στην ωρίμανση του σπέρματος. **(24, 29, 31)**

1.5.2: Μη ενζυμικοί

Οι μη ενζυμικοί αντι-οξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι ενδογενής ή και να προέρχονται εξωγενώς. Όλα τα συστατικά του αντιοξειδωτικού μας συστήματος αλληλεπιδρούν για να διατηρήσουν ή να αποκαταστήσουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Τα βασικότερα ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, το α-λιποϊκό οξύ, η χολερυθρίνη, η μελατονίνη, κάποιες πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων και το συνένζυμο Q. Εξωγενή αντιοξειδωτικά θεωρούνται το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η τοκοφερόλη (βιταμίνη E), τα καροτενοειδή /Βιταμίνη A και οι φαινολικά ενώσεις (στιλβένια, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή κ.α.). **(32, 33)**

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς με ιδιαίτερη έμφαση τα ηπατοκύτταρα. Συναντάται κυρίως ενδοκυτταρικά με ιδιαίτερη έμφαση στα ερθυρά αιμοσφάιρια. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, τον πυρήνα και, λιγότερο, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συναντάται σε διάφορες οξειδοαναγωγικές μορφές, με την πιο σημαντική να είναι η οξειδωμένη (GSSG) και η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) η οποία είναι και η κυρίαρχη σε τυπικά κύτταρα, σε φυσιολογικές συνθήκες. Ο βασικός ρόλος της είναι αναμφίβολα αυτός του αντιοξειδωτικού, δρώντας κατά των ROS τόσο με ενζυματικές όσο και με μη ενζυματικές αντιδράσεις. Επί παρουσίας οξειδωτικού στρες, οξειδώνεται σε δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG) από την GPx και αντιστρόφως από την αναγωγάση της γλουταθειόνης. Εκτός από το ρόλο της αυτόν, η GSH απενεργοποιεί ρίζες όπως H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$. Αντιδρά με ξενοβιοτικές ενώσεις, εμπλέκεται σε διαδικασίες επιδιόρθωσης μορίων πρωτεΐνης, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων που καταστρέφονται στις διαδικασίες υπεροξείδωσης αλλά και στη συντήρηση των σουλφυδρυλικών ομάδων πρωτεΐνης σε ανηγμένη κατάσταση. Τέλος, συμβάλλει στην αναγέννηση των βιταμινών C και E πίσω στις ενεργές τους μορφές, αντιδρώντας με τις αντίστοιχες ρίζες. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται πρώτον στην παρουσία ενός ειδικού ψευδο-πεπτιδικού δεσμού που παρέχει εξαιρετική προστασία έναντι των αμινοπεπτιδασών και δεύτερον στην ομάδα θειόλης (-SH). Λόγω της παρουσίας της ομάδας αυτής, η GSH έχει την ικανότητα να προστατεύει ομάδες θειόλης άλλων πρωτεϊνών έναντι οξειδωτικής βλάβης. Αποτελούν ένα από τα πιο δραστικά χημικά είδη που απαντώνται στα κύτταρα με την συμμετοχή τους σε αντιδράσεις

οξείδωσης να είναι μία από τις σημαντικότερες τους λειτουργίες. Η εξάντληση της ολικής GSH και η μειωμένη αναλογία GSH:GSSG είναι δείκτες οξειδωτικού στρες. **(33-35)**

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ (UA) παράγεται κατά το μεταβολισμό των πουρινών. Στον άνθρωπο, τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο αίμα είναι πολύ υψηλότερα συγκριτικά με άλλα θηλαστικά λόγω της έλλειψης του ενζύμου της ουρικής οξειδάσης, γεγονός που φαίνεται να αποτελεί παράγοντα της εξελεγκτικής διαδικασίας καθώς το ουρικό είναι ισχυρό αναγωγικό μέσο και κατά συνέπεια ισχυρό αντιοξειδωτικό. Εξαλείφει αποτελεσματικά ρίζες όπως το μονήρες οξυγόνο, υπεροξυνιτρώδη, ρίζες υπεροξυλίου και υδροξυλίου και τα υπεροξείδια λιπιδίων των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών. Πιθανότατα μπορεί να αντιδράσει με το διοξείδιο του αζώτου και τα ανθρακικά ιόντα και να σχηματίσει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου και χαλκού, οδηγώντας σε αναστολή των αντιδράσεων ελεύθερων ριζών, όπως της Fenton και της Haber-Weiss. Επιπλέον, συμβάλλει στην προστασία αντιοξειδωτικών ένζυμων, της ενδοκυτταρικής δισμουτάσης του υπεροξειδίου-SOD1 και της εξωκυτταρικής δισμουτάσης του υπεροξειδίου-SOD3, αφού σε φυσιολογικά μόλις επίπεδα αναβάλλει την αδρανοποίηση τους από το H_2O_2. Οι ρίζες που σχηματίζονται στην αντίδραση του ουρικού και του H_2O_2 είναι λιγότερο δραστικές και μπορούν να αντιδράσουν με το ασκορβικό οξύ και να αναγεννήσουν το ουρικό οξύ. Έχει επομένως τονισθεί η σημασία της παρουσίας του ασκορβικού οξέος για την αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης του ουρικού οξέος. Από την άλλη πλευρά, κατέχει και προοξειδωτικές ιδιότητες καθώς τα ιόντα χαλκού και τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων είναι ικανά να ενισχύσουν το οξειδωτικό δυναμικό του, ακολουθώντας έναν μη πλήρως διευκρινισμένο μηχανισμό. **(34, 36)**

Α-Λιποϊκό Οξύ

Το α-λιποϊκό οξύ (ALA) είναι ένα προσφάτως αναγνωρισμένο αντιοξειδωτικό. Συντίθεται στα μιτοχόνδρια και αποτελείται από μια λειτουργική ομάδα διθειόλης που εξαλείφει ROS, ανάγοντας τις οξειδωμένες μορφές άλλων αντιοξειδωτικών. Η δραστικότητα του υπαγορεύεται από τον δακτύλιο διθειολάνης του. Υπάρχουν δύο μορφές, το οξειδωμένο λιποϊκό οξύ (LA) και το ανηγμένο διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA). Και τα δύο είναι ικανά να δράσουν έναντι ποικιλίας ROS όμως έρευνες έχουν δείξει ανώτερη αντιοξειδωτική δράση του DHLA σε σύγκριση με το LA. Το λιποϊκό οξύ αφομοιώνεται εύκολα, απορροφάται και μετατρέπεται γρήγορα σε διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA) από το NAD(P)H στους περισσότερους ιστούς. Στην ανηγμένη του μορφή, το DHLA αντιδρά και εξουδετερώνει ρίζες υπεροξειδίου, το μονήρες οξυγόνο και ρίζες υδροξυλίου. Μπορεί να τις εξουδετερώσει χωρίς να γίνει ρίζα το ίδιο κατά τη διαδικασία. Το LA αναγεννά ταυτόχρονα

άλλους αντιοξειδωτικούς παράγοντες προάγοντας έτσι την αντιοξειδωτική άμυνα. Συγκεκριμένα ανάγει τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E από τις οξειδωμένες μορφές τους. Ακόμα, επάγει ένζυμα δεύτερης φάσης, όπως η συνθετάση γλουταθειόνης, προς αύξηση της σύνθεσης της γλουταθειόνης GSH. Δρα άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες και με χηλικά ιόντα μετάλλων μετάπτωσης για την πρόληψη της δημιουργίας ελεύθερων ριζών, έτσι ώστε να μειωθούν οι οξειδωτικές επιθέσεις στα βιο-μακρομόρια. Κατέχει ουσιαστικό ρόλο ως βασικός συμπαράγοντας της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης, ένζυμα ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, βοηθώντας παράλληλα στην ενζυματική διάσπαση των θρεπτικών συστατικών. **(35, 37)**

Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη αποτελεί ένα δυνητικά κυτταροτοξικό προιόν της αποικοδόμησης της αίμης. Αν και σε υψηλές συγκεντρώσεις η ουσία αυτή συνδέεται με κυτταροτοξικές επιδράσεις που καταλήγουν σε εγκεφαλικές βλάβες, σε χαμηλές και μέτριες συγκεντρώσεις παρουσιάζει αποτελεσματική κυτταροπροστατευτική αντιοξειδωτική δράση. Έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει ROS και να αναστέλλει την δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης, η οποία είναι και η κύρια οξειδάση στα αγγεία. Παράλληλα, προστατεύει τη λευκωματίνη από την οξείδωση από $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$, HO_2 και $ONOO^-$. Τέλος, δρα συνεργιστικά αλληλεπιδρώντας με άλλα αντιοξειδωτικά για την αποτροπή της οξείδωσης των λιπιδίων της μεμβράνης. Εν κατακλείδι, η δράση της μπορεί να βελτιώσει την ενδοθηλιακή λειτουργία συνεπώς και να μειώσει την πιθανότητα αθηροσκλήρωσης.**(36, 38)**

Μελατονίνη

Η μελατονίνη είναι ένα κύριο εκκριτικό προϊόν της επίφυσης του εγκεφάλου. Σε πολυάριθμες έρευνες η μελατονίνη έχει χαρακτηρισθεί ως άμεσος απενεργοποιητής ελευθέρων ριζών και έμμεσο αντιοξειδωτικό. Πιστεύεται ότι η ικανότητα δέσμευσης ριζών της μελατονίνης προέρχεται από την προσφορά ηλεκτρονίων για την αφαίρεση μιας ποικιλίας τόσο ROS όσο και RNS, συμπεριλαμβανομένης της εξαιρετικά τοξικής ρίζας υδροξυλίου, του μονήρους οξυγόνου, του μονοξειδίου του αζώτου. Επιπροσθέτως, διεγείρει έναν αριθμό αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Η μελατονίνη αναστέλλει επίσης προοξειδωτικά ένζυμα όπως η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, η οξειδάση της ξανθίνης και η λιποξυγενάση. Τέλος, υπάρχουν στοιχεία ότι η μελατονίνη σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες, βοηθώντας τες πιθανώς να αντισταθούν στην οξειδωτική βλάβη. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η μελατονίνη αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων άρα, κατά συνέπεια, μειώνει τη διαρροή ηλεκτρονίων, επιδεικνύοντας εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού

στρες της μιτοχονδριακής δραστηριότητας. Μελέτες έδειξαν ότι η μελατονίνη είναι δύο φορές πιο αποτελεσματική από τη βιταμίνη Ε, η οποία είχε ταξινομηθεί ως το πιο ισχυρό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό. **(34,35)**

Πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων (MBPs)

Πολλές εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες όπως οι μεταλλοθειονίνες(MTs), η τρανσφερίνη (TF), η φερριτίνη(FER), η μυοσφαιρίνη (MB), η λακτοφερρίνη (LTF), η σερουλοπλασμίνη (CP), ακόμη και η αλβουμίνη (ALB), έχουν επιβεβαιωθεί ως μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά και δρουν απομονώνοντας ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (Cu^{2+} και Fe^{2+}) που ευθύνονται για την παραγωγή των περισσότερων ROS. Ήταν τα πρώτα περιγραφόμενα ενδογενή αντιοξειδωτικά. Η ικανότητά τους να καταλύουν την οξείδωση των ιόντων σιδήρου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της εξαρτώμενης από το σίδηρο υπεροξείδωσης των λιπιδίων ή της παραγωγής OH· από υπεροξείδιο του υδρογόνου και ιόντα υπεροξειδίου. Είναι οι κύριοι συνεισφέροντες στο αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος. **(34, 36)** Πιο συγκεκριμένα, η σερουλοπλασμίνη δρα ως αναστολέας ROS, απομακρύνοντας εύκολα τα ιόντα σιδήρου και ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε νερό, με μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων στην ενεργό πλευρά. Λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύει και ιόντα χαλκού, τα τελευταία απομονώνονται στο πλάσμα αναστέλλοντας αντιδράσεις που εξαρτώνται από αυτά. **(33, 36)** Η τρανσφερρίνη μειώνει την συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων σιδήρου. Αυτή και η σερουλοπλασμίνη θεωρούνται οι κύριες αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες που συντίθενται σε αρκετούς ιστούς συμπεριλαμβανομένων των εγκεφαλικών ιστών των οποίων τα κύτταρα είναι πολύ πιο ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες από άλλα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των κυτταρικών των μεμβρανών σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Η φερριτίνη έχει κύριο ρόλο την κυτταροπροστασία αφού έχει την δυνατότητα να ελαχιστοποιεί την παραγωγή ROS δεσμεύοντας τον ελεύθερο σίδηρο. Η μυοσφαιρίνη είναι αποτελεσματική κυρίως στην ρίζα NO. Οι μεταλλοθειονεΐνες χαρακτηρίζονται από παρουσία πολυάριθμων σουλφυδρυλικών ομάδων οι οποίες επιτρέπουν γρήγορη αντίδραση με μόρια ROS. Είναι ικανές να απενεργοποιούν το υπεροξείδιο ανιόντων και τις ρίζες υδροξυλίου, προστατεύοντας έτσι άλλες πιο ευαίσθητες πρωτεΐνες. **(34)** Η αλβουμίνη είναι ένα πολυλειτουργικό αντιοξειδωτικό. Είναι το κύριο εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό, δεσμεύοντας ισχυρά τα ιόντα χαλκού και την αίμη και ασθενώς τα ιόντα σιδήρου. Απενεργοποιεί το υποχλωριώδες οξύ και προστατεύει το ένζυμο α-αντιπρωτεϊνάση εναντίον του. **(33, 34)**

Συνένζυμο Q10 - CoQ10 (ουβικινόνη)

Υπό κανονικές συνθήκες ομοιόστασης, το συνένζυμο Q10 (CoQ10) συντίθεται σε όλους τους ιστούς του σώματος με σημαντικότερη λειτουργία τη συμβολή του για την παραγωγή ATP στην

αναπνευστική αλυσίδα του μιτοχονδρίου αλλά και στην ηλεκτρονιακή μεταφορά εκτός μιτοχονδρίων. Έχει αποδείξει, παράλληλα με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E, τον προστατευτικό του ρόλο προς τις κυτταρικές μεμβράνες και τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, έναντι βλάβης των ελευθέρων ριζών. Παρουσιάζει τη δραστηριότητά του σε λιπιδική φάση και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις αφυδρογονασών, κυτοχρωμάτων ή άλλων μη αιμικών πρωτεϊνών. Οι ιδιότητες αυτές αποδεικνύονται μόνο από την ανηγμένη μορφή, την ουβικινόνη ($CoQ10H_2$) και την ρίζα ουμπισεμικινόνης (CoQ10H). Παγιδεύει ρίζες όπως τη ρίζα υπεροξειδίου και καθώς μετατρέπεται σε ρίζα η ίδια, σχηματίζει υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια εξαντλείται από την καταλάση, την υπεροξειδάση ή την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η ρίζα που σχηματίζεται στην αντίδραση αυτή επιδεικνύει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς μπορεί να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο και άλλες ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, δρα κατά λιπιδικών ριζών με κέντρο τον άνθρακα και λιπιδικών υπεροξυλικών ριζών. Τέλος, αποδείχθηκε ότι ανάγει την α-τοκοφερόλη από την τοκοφεροξειλική ρίζα σε μορφή η οποία παρουσιάζει επίσης ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Μπορεί να ληφθεί και εξωγενώς από τρόφιμα (κρέατα, ψάρια, πουλερικά, έλαια) με την απορρόφηση του όμως να εκτιμάται ότι είναι μικρότερη από το 10% και μαγειρικές τεχνικές όπως το τηγάνισμα να οδηγούν σε αυξημένες απώλειες αυτού. **(34, 36)**

Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά κατέχοντας ενισχυμένη δράση, καθώς οξειδώνεται εύκολα σε ημιδεϋδροασκορβικό οξύ. Λόγω έλλειψης του απαραίτητου ενζύμου, οι άνθρωποι δεν είναι σε θέση να συνθέσουν ασκορβικό οξύ οπότε η πρόσληψή του από εξωγενής πηγές (εσπεριδοειδή, πατάτες, ντομάτες και πράσινα φυλλώδη λαχανικά) κρίνεται απαραίτητη. Λειτουργεί σε υδατικά περιβάλλοντα και ως αντιοξειδωτικό και ως προοξειδωτικό. Ως αναγωγικός παράγοντας, είναι ικανός δώσει ηλεκτρόνια σε μοριακό οξυγόνο, υπεροξείδιο, νιτρικά, ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, υδροϋπεροξείδια λιπιδίων και τα κυτοχρώματα α και c με ταυτόχρονη οξείδωση του σε ημιδεϋδροασκορβικό οξύ. Αποδείχθηκε ότι είναι ένας αποτελεσματικός καθαριστής ελεύθερων ριζών στον εγκέφαλο. Σε σύγκριση με άλλα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, παρέχει την πιο αποτελεσματική προστασία από την υπεροξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος και μετά ακολουθεί η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ, το συνένζυμο Q και η βιταμίνη E. Προστατεύει εξίσου και τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Επίσης αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης στο κύτταρο, επομένως παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία της θειόλης από την οξείδωση. Το ασκορβικό οξύ έχει επίσης μια συνεργιστική επίδραση με την τοκοφερόλη στην απομάκρυνση των ριζών του υπεροξειδίου των λιπιδίων. Αρχικά, η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης C αυξάνει τα επίπεδα βιταμίνης E στο πλάσμα και στους ιστούς.

Αναγεννά επίσης την ανηγμένη αντιοξειδωτική μορφή της βιταμίνης Ε αντιδρώντας με τη ρίζα α-τοκοφερόλης, με αποτέλεσμα την αναζωογόνηση της δραστικής α-τοκοφερόλης ικανής να επιτύχει τον αντιοξειδωτικό της ρόλο. Από την άλλη πλευρά, προ-οξειδωτική δράση εμφανίζεται κυρίως παρουσία κατιόντων μετάλλων μετάπτωσης. Το ασκορβικό ιόν, μπορεί να αναγάγει τον τρισθενή (Fe^{+3}) σε δισθενή (Fe^{+2}) δημιουργώντας αντιδραστικά είδη οξυγόνου όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και τις ισχυρές ριζών υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$) μέσω της αντίδρασης Fenton. **(33, 35, 36)**

Τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε)

Η λιποδιαλυτή βιταμίνη Ε υπάρχει σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή αντιοξειδωτικά, καθώς παραμένει εντοπισμένη βαθύτερα στη μεμβράνη από άλλα ισομερή. Είναι κυρίως συγκεντρωμένη στα φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και των πλασματικών μεμβρανών. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση είναι η προστασία από την λιπιδική υπεροξείδωση που επέρχεται ως αποτέλεσμα της αναστολής του σχηματισμού ελεύθερων ριζών και της ενεργοποίησης των ενδονουκλεασών. Η α-τοκοφερόλη μπορεί να τερματίσει μια αλυσιδωτή αντίδραση παγιδεύοντας τις ρίζες υπεροξυλίου μεταφέροντας τους άτομα υδρογόνου. Κατά αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ρίζα α-τοκοφερόλης, ένα παράγωγο χαμηλής δραστικότητας ανίκανο να επιτεθεί σε λιπιδικά υποστρώματα. Η ρίζα αυτή έχει την δυνατότητα και να αναγεννηθεί μέσω του ασκορβικού οξέος ή άλλο αντιοξειδωτικό όπως ανηγμένη γλουταθειόνη ή το ουρικό, το οποίο λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων. Εναλλακτικά, δύο ρίζες τοκοφερόλης μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σταθερό διμερές, ή η ρίζα μπορεί να οξειδωθεί πλήρως προς σχηματισμό κινόνης τοκοφερόλης. Εκτός από τον αντιοξειδωτικό, έχει ,κατ' επέκταση, και δομικό ρόλο, αφού προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τις λιπορωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, η βιταμίνη Ε επιτυγχάνει το ρόλο της στη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης έναντι της βλάβης από τις ελεύθερες ρίζες που προάγονται από λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας. Τέλος, μπορεί να δράσει και ως προ-οξειδωτικό, ανάγοντας το ιόν τρισθενούς σιδήρου. **(33, 35, 36)**

Καροτενοειδή – Βιταμίνη Α

Τα καροτενοειδή αποτελούν μια κατηγορία φυσικών χρωστικών ενώσεων. Οι πιο κοινές μορφές είναι το α-καροτένιο, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η κανθαξανθίνη, η φουκοξανθίνη και η κροκιτίνη. Μεταξύ αυτών, πιο σημαντικό θεωρείται το α-καροτένιο αλλά το β-καροτένιο είναι το πιο ευρέως μελετημένο για την αντιοξειδωτική του δράση. Το α- καροτένιο είναι βασικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες προστατεύοντας τα λιπίδια τους από

οξειδωτική αποικοδόμηση, ενώ το β- καροτένιο είναι το κυριότερο πρόδρομο μόριο της βιταμίνης Α με σημαντικές φωτοπροστατευτικές ιδιότητες. Η βιταμίνη Α έχει επίσης, με την σειρά της, αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα καροτενοειδή μπορούν να υποστούν αντίδραση με ελεύθερες ρίζες ριζών ($ROO^{\bullet}$, $R^{\bullet}$) ακολουθώντας τρεις πιθανούς μηχανισμούς, την μεταφορά ηλεκτρονίων, την αφαίρεση υδρογόνου και την προσθήκη ριζών. Η δραστηριότητά τους είναι δοσο-εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση οξυγόνου, ασκώντας δράση κυρίως σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου ενώ δρουν ως προ-οξειδωτικά σε υψηλότερες πιέσεις. Μελέτες έχουν επικεντρωθεί και στο λυκοπένιο καθώς έχει βρεθεί ότι η αντιοξειδωτική του δράση είναι ανώτερη από αυτή του β- καροτενείου και της α-τοκοφερόλης. Η δράση του λυκοπενίου βασίζεται στην ενισχυμένη του ικανότητα απόσβεσης μονήρους οξυγόνου, η οποία αποδείχθηκε καλύτερη από όλων των 600 φυσικών καροτενοειδών και οφείλεται επίσης στη δομή του. Ακόμα, θεωρήθηκε ότι το λυκοπένιο θα μπορούσε να βελτιώσει την αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου αναγεννώντας τόσο τη βιταμίνη Ε όσο και τη βιταμίνη C από τις αντίστοιχες ρίζες τους. **(33, 35, 36)**

Φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν χιλιάδες ενώσεις με διαφορετικές χημικές δομές και έχουν θεωρηθεί ισχυρά αντιοξειδωτικά in vitro με αποδεδειγμένα ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και από τις βιταμίνες Ε και C και τα καροτενοειδή. Η αντιοξειδωτική τους δράση έγκειται στην ικανότητά τους να δωρίζουν ένα υδρογόνο ή ηλεκτρόνιο και να μετατοπίζουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια εντός της αρωματικής δομής εξουδετερώνοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες. Παράλληλα, μπορούν να προβούν στην χηλίωση μετάλλων, αλληλεπιδρώντας με τον σίδηρο ή τον χαλκό, με αποτέλεσμα την καταστολή αντιδράσεων σχηματισμού ελεύθερων ριζών παρουσία μετάλλων. Μπορούν επίσης να προστατεύσουν βιολογικά μόρια από την οξείδωση. Παράλληλα, έχουν βρεθεί πολλές συσχετίσεις μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής δομής τους και πιο συγκεκριμένα, με τον αριθμό και την θέση των υποκαταστατών υδροξυλίου σε σχέση με την λειτουργική ομάδα καρβοξυλίου. Παρά την επιβεβαιωμένη ικανότητα των πολυφαινολών ως αναγνωρισμένων αντιοξειδωτικών λόγω της δέσμευσης των ROS, τα φαινολικά, είναι πιθανό να εμφανίσουν και προ-οξειδωτική δράση παρουσία μετάλλων μετάπτωσης όπως ο σίδηρος ή ο χαλκός, μετά από χηλίωση, αναγωγή και δίνοντάς τους τη δυνατότητα να σχηματίσουν ελεύθερες ρίζες από την αλληλεπίδραση με τα υπεροξείδια. Αναλυτικά θα αναφερθούν οι φαινολικές ενώσεις του κρασιού και των υποπροϊόντων του στο Κεφάλαιο 3. **(35, 36, 39)**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΤΑΓΕΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

2.1: Μεταγευματικός Μεταβολισμός

Οι τρεις μεγάλες κατηγορίες θρεπτικών συστατικών υδατάνθρακες, λίπη και πρωτεΐνες, καθώς πέπτονται στον γαστρεντερικό αυλό, απορροφώνται από αυτόν. Τα ενεργειακά υποστρώματα που έχουν προκύψει, γλυκόζη, λιποειδή και αμινοξέα, εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία, μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στα όργανα και στους ιστούς του σώματος και ακολουθούν την εκάστοτε μεταβολική τους πορεία. Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο σχεδόν όλα τα όργανα και οι ιστοί αντιδρούν στη βραχυπρόθεσμη διαταραχή που επιφέρει η πρόσληψη νέων θρεπτικών συστατικών ονομάζεται μεταγευματικό στάδιο. Στην ουσία, αφορά την περίοδο που ακολουθεί την κατανάλωση τροφής και αποτελεί μία δυναμική και ιδιαίτερα πολύπλοκη κατάσταση κατά την οποία διαδραματίζεται πληθώρα μεταβολικών αντιδράσεων. Ο μεταβολισμός καθενός εκ των μακροσυστατικών στο μεταγευματικό στάδιο περιγράφεται συλλογικά ως μεταγευματικός μεταβολισμός. Εναλλακτικά αυτού, ο οργανισμός βρίσκεται υπό συνθήκες νηστείας, κατάσταση η οποία αφορά κυρίως την διάρκεια του ύπνου σε μία τυπική μέρα ενός Δυτικού προτύπου ζωής και διατροφής. Το μεταγευματικό στάδιο διαρκεί περίπου 3 με 8 ώρες μετά την κατανάλωση τροφής οπότε θα μπορούσαμε να πούμε ότι σχεδόν κυριαρχεί σε ένα τυπικό 24ωρο. **(40—42)** Η μεταγευματική κατάσταση αποτελεί λοιπόν μια πλήρως φυσιολογική διαδικασία, πρωταρχικός στόχος της οποίας είναι η παροχή θρεπτικών συστατικών στους ιστούς. Πολλοί παράγοντες ρυθμίζουν την διαδικασία αυτή. Με μια αδρή αναφορά, ο ρυθμός κένωσης του στομάχου αποτελεί έναν πρώτο μηχανισμό ελέγχου της ροής των θρεπτικών συστατικών στην κυκλοφορία. Μετέπειτα, η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς τα απομακρύνει από την κυκλοφορία για να μην δημιουργείται αυξημένη συγκέντρωση τους. Επιπλέον, η νεφρική λειτουργία είναι ακόμα ένας τρόπος ρύθμισης του ισοζυγίου στην περίπτωση που η συγκέντρωση ενός θρεπτικού συστατικού υπερβεί τα φυσιολογικά όρια. **(43)**

2.2: Μεταβολισμός Υδατανθράκων

Οι μονοσακχαρίτες που έχουν προκύψει από την πέψη των υδατανθράκων απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο, περνάνε στην αιματική κυκλοφορία και κατευθύνονται μέσω της πυλαίας φλέβας στο κύριο μεταβολικό όργανο, το ήπαρ, όπου και μετατρέπονται σε γλυκόζη.**(135)** Μεταγευματική γλυκόζη (PPG) ονομάζουμε τη συγκέντρωση της γλυκόζης που ανιχνεύεται στο πλάσμα μετά από ένα γεύμα. Οι μεταγευματικές συγκεντρώσεις της γλυκόζης αρχίζουν να

αυξάνονται από τα πρώτα 10 μόλις λεπτά μετά την έναρξη ενός γεύματος ως αποτέλεσμα της απορρόφηση των διατροφικών υδατανθράκων. Σε μη διαβητικά άτομα, η γλυκόζη φτάνει μέγιστες συγκεντρώσεις στα 60 λεπτά και επιστρέφει στα προγευματικά επίπεδα εντός 2 με 3 ωρών. Η απορρόφηση, παρόλα αυτά, των υδατανθράκων συνεχίζεται περαιτέρω, έως τουλάχιστον 5 με 6 ώρες μετά την λήψη τροφής. **(44)** Η κυκλοφορούμενη στο αίμα γλυκόζη παραμένει στο αίμα σε υψηλά επίπεδα μέχρι να εκκριθεί η βασική ορμόνη που ρυθμίζει τον μεταβολισμό της, η ινσουλίνη. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β- κύτταρα του παγκρέατος ως απόκριση των υψηλών επιπέδων γλυκόζης. Στο ήπαρ η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφογλυκόζη μέσω του ενζύμου της γλυκοκινάσης και μπορεί είτε να αποθηκευτεί με τη μορφή γλυκογόνου για μετέπειτα χρήση είτε να μετασχηματιστεί σε γλυκερόλη προς σύνθεση τριακυλογλυκερολών. Η ινσουλίνη μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου της γλυκοκινάσης, δράση που απαιτεί μεγάλα χρονικά διαστήματα. Στις πιο άμεσες επιδράσεις της ινσουλίνης περιλαμβάνεται η αύξηση της οξείδωσης της γλυκόζης μέσω γλυκόλυσης με ταυτόχρονη αναστολή της γλυκονεογένεσης όπως επίσης διεγείρεται η γλυκογονοσύνθεση και αναστέλλεται η γλυκογονόλυση, όλα μέσω ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αντίστοιχων ενζύμων. Είναι προφανές ότι στο στάδιο αυτό υπερισχύει η αποθήκευση της γλυκόζης σε μορφή γλυκογόνου παρά η διάσπαση και η απελευθέρωση αυτού. Η απορρόφησή της όμως από το ήπαρ δεν είναι πλήρης, με ένα μεγάλο ποσοστό να διοχετεύεται στο υπόλοιπο σώμα, μέσω του αίματος, τροφοδοτώντας με ενέργεια ιστούς συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών, του λιπώδους ιστού, του εγκεφάλου και των ερυθρών αιμοσφαιρίων. **(40, 135)** Σε περίπτωση που υπάρχει ακόμα διαθέσιμη γλυκόζη, η ινσουλίνη ευνοεί την μετατροπή της σε λιπαρά οξέα. Οι σκελετικοί μύες μεταγευματικά χρησιμοποιούν την γλυκόζη αντί των λιπαρών οξέων προς παραγωγή ενέργειας και παράλληλα αποθηκεύουν την περίσσεια αυτής για να την αξιοποιήσουν σε στάδια νηστείας. Στα μυικά κύτταρα, η ινσουλίνη αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω προώθησης της μεταφοράς αυτής από τους GLUT4 υποδοχείς και ενισχύει την μετέπειτα φωσφορυλίωσή της. Επίσης, όπως και στο ήπαρ, έτσι κι εδώ αυξάνει την γλυκόλυση, την γλυκογονοσύνθεση και την παραγωγή ακετυλο-συνενζυμου Α ενώ αναστέλλει την γλυκογονόλυση. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού η ινσουλίνη ευνοεί μεταγευματικά την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω των μεταφορέων GLUT4. Επιπλέον, αυξάνει την οξείδωση της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης, η οποία αυξάνει την παραγωγή της 3-φωσφο-γλυκερόλης και του ακετυλο-συνενζύμου Α. Το τελευταίο, σε καταστάσεις περίσσειας ενέργειας, μετατρέπεται και εδώ σε λιπαρά οξέα. Συμπερασματικά, είναι προφανής η συνεισφορά της ορμόνης στην αυξηση της λιποειδικής αποθήκευσης στον λιπώδη ιστό. **(40)** Ως εκ τούτου, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα διαδοχικά μειώνονται, ενώ παράλληλα τα ενδοκυτταρικά επίπεδά της διαδοχικά αυξάνονται. Ενδοκυτταρικά, η γλυκόζη αξιοποιείται ως το βασικό ενεργειακό υπόστρωμα του μεταγευματικού σταδίου. **(135)** Ο μεταγευματικός μεταβολισμός της γλυκόζης

ρυθμίζεται συμπληρωματικά πέρα από την ινσουλίνη, από την δράση και άλλων ορμονών όπως η γλυκαγόνη, η αμυλίνη και οι ορμόνες ινκρετίνης, το πεπτίδιο 1 που μοιάζει με γλυκαγόνο (GLP1) και ινσουλινοτροπικό πεπτίδιο που εξαρτάται από τη γλυκόζη (GIP). **(45)**

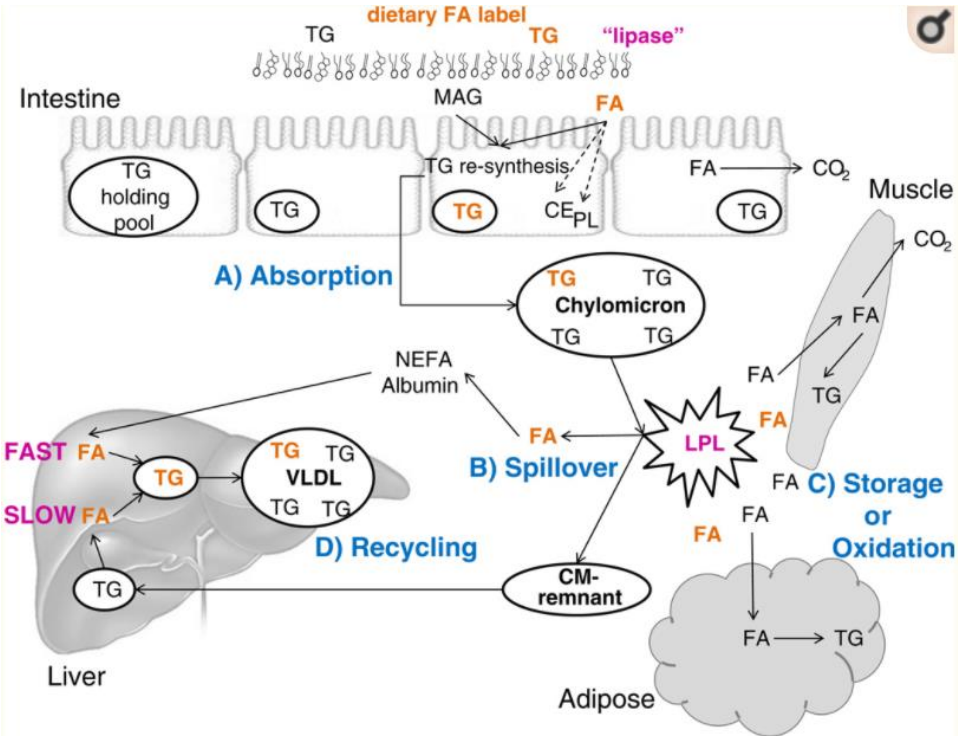
2.3: Μεταβολισμός Λιπιδίων

Δεδομένου ότι οι περισσότεροι άνθρωποι καταναλώνουν γεύματα που περιέχουν λίπος συχνά κατά τη διάρκεια της ημέρας, η συνηθισμένη μεταβολική κατάσταση των λιπιδίων είναι η μεταγευματική, αφού μετά από ένα τυπικό λιπαρό γεύμα, η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων ορού (TG) αυξάνεται μέσα σε μία μόλις ώρα και παραμένει ανυψωμένη για 5-8 ώρες. **(45)** Αναλυτικότερα, το διατροφικό λίπος με τη μορφή τριγλυκεριδίων υδρολύεται από τη λιπάση προς λιπαρά οξέα (FA) και μονοακυλογλυκερόλη (MAG) τα οποία στη συνέχεια απορροφώνται από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Εκεί, το λιπαρό οξύ μπορεί να ενσωματωθεί σε εστέρες χοληστερόλης (CE) ή φωσφολιπίδια (PL), να υποστεί οξείδωση ή επανεστεροποίηση ξανά σε TG για να ενσωματωθεί σε χυλομικρά (CM) προς διοχέτευση στην λεμφική και κατ' ακολούθηση στην αιματική κυκλοφορία. **(46)** Μέσω της τελευταίας, το ήπαρ παραλαμβάνει μεταγευματικά τα χυλομικρά (μορφή λιποπρωτεϊνών πλούσια σε TG) και τις VLDL (Very Low Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας). Εκεί, οι λιποπρωτεΐνες υδρολύονται και προκύπτουν έτσι ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Κατά το στάδιο αυτό, αυξάνεται η διαθεσιμότητα των ελευθέρων λιπαρών οξέων, τα οποία στη συνέχεια ακολουθούν δύο κυρίως μεταβολικές πορείες, είτε την β-οξείδωση είτε σχηματίζουν λιποειδή (τριακυλογλυκερόλες, φωσφωλιπίδια και εστέρες χοληστερόλης). Όταν το κύτταρο έχει καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες, η οξείδωση περιορίζεται και το ακετυλο-συνενζυμο Α συσσωρεύεται και χρησιμοποιείται για de novo λιπογένεση. Τα νεοσυντιθέμενα αυτά λιπαρά οξέα καθώς και εκείνα που δεν υπέστησαν β-οξείδωση εξ αρχής, διοχετευόνται κυρίως προς σχηματισμό τριακυλογλυκερολών, φωσφωλιπιδίων και εστέρων χοληστερόλης τα οποία αποθηκεύονται στα ηπατοκύτταρα ή εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος και διοχετεύονται και στους υπόλοιπους ιστούς του σώματος μέσω των λιποπρωτεϊνών VLDL. Ο ρυθμός παραγωγής και έκκρισης των VLDL από το ήπαρ εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των λιπαρών οξέων σε αυτό. Εφόσον, στο στάδιο αυτό η διαθεσιμότητα των χυλομικρών είναι αυξημένη, η ινσουλίνη προωθεί όπως θα δούμε την αποθήκευση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και όχι την έκκριση τους για διανομή μέσω των λιποπρωτεϊνών. Ταυτοχρόνως, καταστέλλει έμμεσα την β-οξείδωση και διεγείρει την μετατροπή σε λιπαρά οξέα της περίσσειας όλων των ενεργειακών υποστρωμάτων. Οι λιποπρωτεΐνες χρησιμεύουν ως μεταφορείς των λιπών στην κυκλοφορία ανατροφοδοτώντας τον οργανισμό με μεταγευματικό λίπος. Όσο η διαδικασία διανομής και απομάκρυνσης του μεταγευματικού λίπους

ολοκληρώνεται, μειώνεται σταδιακά ο αριθμός των ανιχνεύσιμων κυκλοφορουμένων στο αίμα VLDLs. Βέβαια, τα επίπεδα των LDL, στο αίμα, δεν εκμηδενίζονται, αλλά ελαττώνονται σταδιακά μέχρι να φτάσουν σε μία τιμή ισορροπίας νηστείας. Μεταγευματικά αυτό συμβαίνει σε μικρό μόνο βαθμό και μόνο για να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση των τριακυλογλυκερολών στην αιματική κυκλοφορία. Σε επίπεδο ιστού, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια του επιθηλίου των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων, δρα υδρολύοντας τις τριακυλογλυκερόλες των χυλομικρών και τις VLDL προς ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία προσλαμβάνονται από τους σκελετικούς μυς και τον λιπώδη ιστό, με την διαφορά ότι η δραστικότητα της LPL είναι μεγαλύτερη στον λιπώδη ιστό. **(40, 135)** Η δράση του ενζύμου αυτού κρίνεται απαραίτητη καθώς τα σύμπλοκα των VLDL και των χυλομικρών πρέπει να υδρολυθούν για να μπορέσουν να αποδώσουν TG τα οποία είναι ικανά να περάσουν από τα τοιχώματα των τριχοειδών. **(41)** Έτσι, οι δυο αυτοί ιστοί εφοδιάζονται με λιπαρά οξέα και ακολουθεί είτε αποθήκευση, είτε οξείδωση, ανάλογα με τις ανάγκες των ιστών. Συγκεκριμένα, εντός των μυικών κυττάρων, τα λιπαρά οξέα είτε θα υποστούν β-οξείδωση προς παραγωγή ενέργειας είτε θα αποθηκεύσουν λιποειδή προς μελλοντική χρήση παροχής ενέργειας στα μυικά, και μόνο, κύτταρα. Ο ρυθμός πρόσληψής των λιπαρών οξέων από τους μυς για την παραγωγή ενέργειας αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση τους στην κυκλοφορία. Ωστόσο, μεταγευματικά, η συγκέντρωση αυτή είναι αρκετά μειωμένη λόγω της καταστολής της λιπόλυσης και της παράλληλης προώθησης της πρόσληψης γλυκόζης ως βασικό ενεργειακό υπόστρωμα στο στάδιο αυτό. Αυτό προκύπτει λόγω της ινσουλίνης. Αρχικά, αυξάνει μεταγευματικά την δραστηριότητα της LPL και κατ' επέκταση και την πρόσληψη των λιπαρών οξέων. Εντός των κυττάρων, στρέφει τα λιπαρά οξέα προς τη σύνθεση λιποειδών αναστέλλοντας την οξείδωση τους έμμεσα (μέσω της αυξησης της οξειδωσης της γλυκόζης). Εντός των λιποκυττάρων, τα λιπαρά οξέα ενεργοποιούνται σε μορφή ακυλο-συνενζύμου Α είτε προς σύνθεση είτε προς β-οξείδωση παρομοίως. Οι τριακυλογλυκερόλες που σχηματίζονται στα λιποκύτταρα αποθηκεύονται σε αυτά, σε αντίθεση με αυτές που σχηματίζονται στο ήπαρ, και εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος προς διανομή. Επιπλέον, αποθηκεύονται στον λιπώδη ιστό με σκοπό να προμηθεύουν και όλους τους υπόλοιπους με λιπαρά οξέα για την κάλυψη των αναγκών τους σε ενέργεια κατά τα διαστήματα που δεν προσλαμβάνεται τροφή. Στον λιπώδη ιστό, η ινσουλίνη δρα επίσης αυξάνοντας την δραστηριότητα της LPL και κατ' επέκταση και την πρόσληψη των λιπαρών οξέων. Διεγείρει την de novo λιπογένεση όπως και στο ήπαρ, προωθώντας την σύνθεση λιποειδών ενώ ταυτοχρόνως αναστέλλει την λιπόλυση μέσω της δράσης της ορμονοευαίσθητης λιπάσης HSL**. (40, 135)** Εκτός από τη δράση της ινσουλίνης, στον μεταβολισμό των λιπιδίων, φαίνεται ότι τα πεπτίδια του εντέρου όπως το GLP1 και το GLP2 μπορεί επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην επίδραση της ομοιόστασης των λιπιδίων μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία. Έχει αναφερθεί ότι το GLP1

βελτιώνει τη μεταγευματική υπερλιπιδαιμία μέσω αρκετών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της λεμφικής ροής του εντέρου, της απορρόφησης TG, του ρυθμού γαστρικής κένωσης, της εντερικής κινητικότητας και τέλος της μειωμένης παραγωγής και έκκρισης εντερικών λιποπρωτεϊνών. Από την άλλη πλευρά, το GLP2 φαίνεται να σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις μεταγευματικών TG και ελεύθερων λιπαρών οξέων, πιθανώς μέσω της ενίσχυσης της εντερικής απορρόφησης λιπιδίων και απελευθέρωση σωματιδίων λιποπρωτεϊνών του εντέρου.**(45)**

Όσο ολοκληρώνεται η διαδικασία της υδρόλυσης από την LPL, τα χυλομικρά αδειάζουν σιγά σιγά το φορτίο τους και γίνονται ολοένα και μικρότερα, σχηματίζοντας υπολείμματα χυλομικρών (CM). Τα υπολείμματα αυτά καταλήγουν στο ήπαρ, μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, όπου και αποικοδομούνται. **(40, 135, 46)** Τριγλυκερίδια αυτών μπορούν να επανασυσκευαστούν σε VLDL ανακυκλώνοντας έτσι το διαιτητικό λιπαρό οξύ. Αυτή η οδός είναι σχετικά πιο αργή για ενσωμάτωση VLDL-TG σε σύγκριση με την ενσωμάτωση λιπαρών οξέων από τη δεξαμενή λιπαρών οξέων, η οποία συμβαίνει γρήγορα. Αυτή αφορά μερικά από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία δεν θα απορροφηθούν από τους ιστούς αλλά μάλλον θα διαχυθούν στη δεξαμενή μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων-Non-esterified fatty acids (NEFA) του πλάσματος και στη συνέχεια μπορούν να απορροφηθούν από το ήπαρ ή άλλους ιστούς. **(46)**

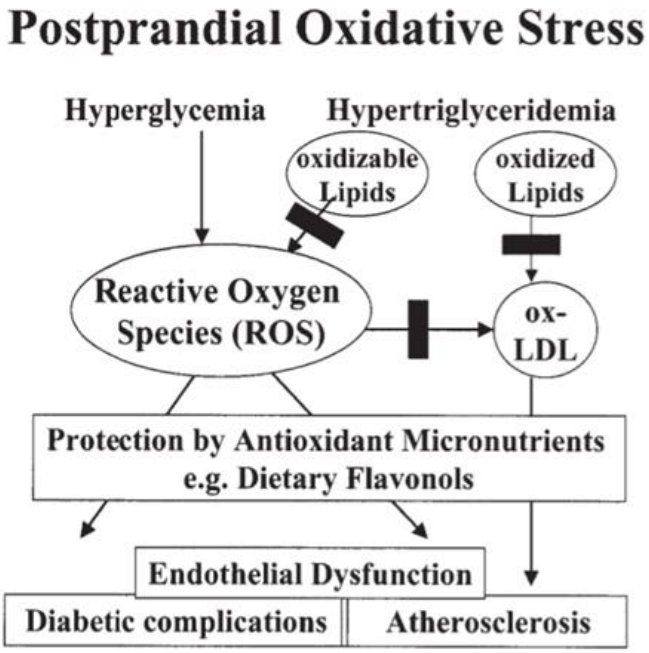


<u>Εικόνα 2.1</u>: Μεταβολική τύχη λιπιδίων.Α) Απορρόφηση Β) Διάχυση C) Αποθήκευση ή Οξείδωση D) Ανακύκλωση ***(46)***

2.4: Μεταγευματικό Οξειδωτικό στρες

Ο μεταγευματικός μεταβολισμός συνοδεύεται από οξειδωτικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις μεταβλητής έντασης. Μηχανισμοί που διαταράσσουν μεταγευματικά την ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων οδηγούν στην κατάσταση αυτή που ονομάζεται «μεταγευματικός δυσμεταβολισμός» (postprandial dysmetabolism), ο οποίος εμφανίζεται μετά από λήψη πλούσιων θερμιδικά γευμάτων και χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων μεταγευματικά. Ειδικότερα, η κατανάλωση ενός τυπικού δυτικού γεύματος που περιέχει μεγάλες ποσότητες τόσο λιπών όσο και άμεσα διαθέσιμων υδατανθράκων, οδηγεί σε σημαντική αύξηση της γλυκόζης στο αίμα και των κυκλοφορούντων-πλούσιων σε TG λιποπρωτεΐνων (TRL), δηλαδή των λιποπρωτεΐνων πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), των χυλομικρών (CMs) και των υπολειμμάτων τους (CMRs).**(47, 48)** Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο μεταγευματικός δυσμεταβολισμός, σχετίζεται με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και συγκεκριμένα, με αυξημένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα και νοσηρότητα λόγω μακρο- και μικρο-αγγειακών επιπλοκών. Επιπλέον, σχετίζεται με καταστάσεις όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) και τη μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD). Η υπεργλυκαιμία και η υπερτριγλυκεριδαιμία, συγκεκριμένα, αποτελούν και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για έναρξη των καρδιαγγειακών επεισοδίων. Η καρδιαγγειακή επίπτωση αυτή του δυσμεταβολισμού προκύπτει εν μέρη από την αύξηση του οξειδωτικού στρες, η οποία θεωρείται ευθέως ανάλογη με την αύξηση της γλυκόζης μετά από ένα γεύμα, εφόσον οι οξειδωτικές αντιδράσεις που αυτή συμμετέχει ως υπόστρωμα πληθαίνουν άμεσα, δημιουργώντας παράλληλα και οξειδωτικό φορτίο. Μεταγευματικές αυξήσεις των επιπέδων των λιπιδίων και των υδατανθράκων ακολουθώνται από αυξημένη οξειδωτική βλάβη, η οποία επηρεάζει τις λιποπρωτεΐνες και την αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται μεταγευματικό οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκλήρωση και σχετικές διαταραχές. **(45, 49, 50)** Ο τρόπος με τον οποίο τα μακροθρεπτικά συστατικά επιδρούν στην ισορροπία οξειδοαναγωγής του οργανισμού είναι μέσω του ενδιάμεσου μεταβολισμού τους. Αυτή η υπερπροσφορά τους ως ενεργειακά υποστρώματα έχει ως αποτέλεσμα την υπέρβαση πεπερασμένων μεταβολικών δυνατοτήτων των μιτοχονδρίων των μυών και του λιπώδους ιστού, καθώς αδυνατούν να μεταβολίσουν όλη αυτή την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Αυτό οδηγεί στην υπερπλήρωση του κύκλου του Krebs από τη γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα, διεγείροντας έτσι την υπερβολική παραγωγή μιτοχονδριακού NADH. Ωστόσο, λόγω ανεπάρκειας του μηχανισμού οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα παραγόμενα NADH αυξάνουν την μιτοχονδριακή κλίση πρωτονίων, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων στο μόριο O_2 και την παραγωγή ROS όπως του ανιόντος του

υπεροξειδίου. Τα κύτταρα, για να προστατευτούν από τις επιπτώσεις των ROS, τείνουν να μειώσουν την παραγωγή τους ή/και να αυξήσουν την απομάκρυνσή τους. Η πρόληψη του σχηματισμού ROS επιτυγχάνεται με την πρόληψη της συσσώρευσης μιτοχονδριακού NADH. Για να συμβεί αυτό, αναστέλεται η διεγειρόμενη από την ινσουλίνη πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και αποτρέπεται η είσοδος ενεργειακών υποστρωμάτων (πυροσταφυλικό, λιπαρά οξέα) εντός των μιτοχονδρίων. Επέρχεται δηλαδή, ινσουλινοαντίσταση οφειλόμενη στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες. **(47, 51, 52)**



Εικόνα 2.2: Μεταγευματικό οξειδωτικό στρες ***(50)***

2.4.1: Υπεργλυκαιμία και οξειδωτικό στρες

Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση γεύματος πλούσιου σε υδατάνθρακες η οποία ακολουθείται από υπερβολικά υψηλές μεταγευματικές τιμές γλυκόζης αίματος επιφέρει μεταγευματικό οξειδωτικό στρες. Τέτοιες τιμές συσχετίζονται μέχρι και με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων. **(53, 54)** Ο μεταγευματικός μεταβολισμός της γλυκόζης υφίσταται μια ολοκληρωμένη ορμονική ρύθμιση. **(45)** Η υπερπροσφορά όμως της γλυκόζης οδηγεί σε υπέρβαση των πεπερασμένων μεταβολικών δυνατοτήτων των μιτοχονδρίων και σε ανεπάρκεια του μηχανισμού οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα να παράγονται μόρια ελεύθερων ριζών οξυγόνου. **(52)** Αυτό το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από υπεργλυκαιμία οδηγεί τελικά σε τροποποίηση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών με την αποτέλεσμα αλλοιωμένη λειτουργία τους, βλάβη στο DNA, ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα πυρηνικού παράγοντα-kB που επάγει προφλεγμονώδεις καταστάσεις προκαλώντας μη φυσιολογικές αλλαγές στη γονιδιακή

έκφραση, μειωμένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και αυξημένη έκφραση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και προπηκτικών και προφλεγμονώδων μορίων.**(49)** Επομένως, ακολουθεί αύξηση της φλεγμονώδους διαδικασίας, συστολή των αγγείων, δημιουργία θρόμβων και αύξηση του ρυθμού οξείδωσης των LDL λιποπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η αύξηση της φλεγμονώδους διαδικασίας μπορεί να επαληθευτεί με αύξηση των επιπέδων κυτταροκινών, της CRP, των παραγόντων πήξης και της ενδοθηλίνης-1 που επίσης οδηγούν σε βλάβη του ενδοθηλίου. **(51, 52)** Όσον αφορά την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οξεία υπεργλυκαιμία καταστέλλει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, τόσο σε διαβητικά όσο και σε μη διαβητικά άτομα, μέσω της αυξημένης παραγωγής ROS. **(43)** Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται κυρίως μέσω του σχηματισμού υπεροξυνιτρικών, μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO), με αποτέλεσμα την ελαττωματική ενδοθηλιακή εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή, η οποία μακροπρόθεσμα οδηγεί σε καρδιαγγειακή νόσο. **(55)** Σημαντικό ρόλο εδώ φαίνεται να διαδραματίζει η ινσουλίνη, καθώς δείχνει να συντελεί στην μείωση της μεταγευματικής παραγωγής οξειδωτικών ριζών μέσω της καταστολής του μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα κβ και της οξειδάσης του NADPH. **(53)** Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αυξάνει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή μέσω της αύξησης της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου, δρώντας αντιρροπιστικά. Έρευνα στα μεταγευματικά γλυκαιμικά επίπεδα μη διαβητικών εθελοντών έδειξε πως η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εντείνεται περαιτέρω εάν η έκκριση ινσουλίνης ανασταλεί ταυτοχρόνως. Έτσι, όταν συνυπάρχει και ινσουλινοαντίσταση ή σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης στο μεταβολικό περιβάλλον, η επίδραση της υπεργλυκαιμίας γίνεται ακόμα πιο έντονη. Αυτή η επίπτωση μπορεί να έχει σημαντική σχέση με την ανάπτυξη χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη τύπου 2. **(43)** Θεωρείται πως η αυξημένη μεταγευματική τιμή της γλυκόζης μπορεί να έχει άμεση τοξική επίδραση στο αγγειακό ενδοθήλιο προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. **(49)** Παρόλα αυτά, αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η μεταγευματική γλυκόζη μπορεί να μην είναι ένας ανεξάρτητος καρδιαγγειακός παράγοντας κινδύνου αλλά μάλλον δείκτης κινδύνου, που υποδηλώνει υποκείμενες άλλες μεταβολικές διαταραχές, όπως η ινσουλινοαντίσταση και η δυσλιπιδαιμία, που μπορεί να έχουν ακόμη μεγαλύτερη επιπτώσεις στον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων. Επομένως, η συσχέτιση μεταξύ της υψηλής μεταγευματικής γλυκόζης με την καρδιαγγειακή νόσο εξηγείται τουλάχιστον εν μέρει από το παρουσία αντίστασης στην ινσουλίνη και σχετικών καρδιαγγειακών παράγοντες κινδύνου ασθένειας.**(50)** Μεταξύ άλλων, το οξειδωτικό στρες οφειλόμενο στην ενδοκυτταρική υπεργλυκαιμία προκαλεί την σύνθεση δραστικών δικαρβονυλίων, τα οποία αντιδρούν με αμινοξέα και σχηματίζουν AGEs (advanced glycation end products/προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης). **(56)** Ακόμα και σύντομες περίοδοι υπεργλυκαιμίας, όπως αυτές της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, μπορεί να είναι επαρκής για

την αύξηση των συγκεντρώσεων των προϊόντων αυτών. Τα συγκεκριμένα ανταποκρίνονται στις διακυμάνσεις της γλυκόζης του πλάσματος και μετά τη σύνδεσή τους με τους κατάλληλους υποδοχείς, προκαλούν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών σε μακροφάγα αλλά και προφλεγμονώδων μορίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη χημειοταξία, την αγγειογένεση, το οξειδωτικό στρες, πολλαπλασιασμός κυττάρων ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ανάλογα με τον ιστό. **(43, 55)** Τέλος, επέρχεται αύξηση του ρυθμού οξείδωσης των LDL λιποπρωτεϊνών η οποία θα αναφερθεί αναλυτικότερα στην συνέχεια.

Στον Πίνακα 2.1 αναγράφονται πέντε μεταγευματικές μελέτες **(136-140)** οι οποίες μελέτησαν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά από κατανάλωση είτε γεύματος υδατανθράκων είτε μικτού γεύματος υψηλού σε υδατάνθρακες. Στην συνέχεια έγιναν μετρήσεις γλυκόζης, ινσουλίνης ή/και δεικτών οξειδωτικού στρες με δοκιμασίες όπως TBARS, MDA, FRAP, ORAC, α-τοκοφερόλη, βιταμίνη C κ.α.. Οι μελέτες αυτές είναι από τις λίγες που έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγμα υγιών εθελοντών. Οι τέσσερις από αυτές **(136, 138-140)** πραγματοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) ή με χορήγηση 75γρ. φρουκτόζης ενώ η μία **(137)** χρησιμοποίησε δύο μικτά γεύματα διαφορετικής αναλογίας μακροθρεπτικών συστατικών, με το ένα να περιέχει 58 γρ. υδατανθράκων ενώ το άλλο να φτάνει τα 144 γρ. Στην τελευταία, δεν βρέθηκε καμία διαφορά στη συγκέντρωση γλυκόζης μετά από την κατανάλωση του αυξημένου σε υδατάνθρακες μικτού γεύματος. Στις υπόλοιπες, αντιθέτως, φάνηκε μια θετική συσχέτιση της μεταγευματικής γλυκόζης ή/και της παραγωγή ROS.

Πίνακας 2.1: Μεταγευματικές κλινικές μελέτες συσχέτισης υπεργλυκαιμίας και οξειδωτικού στρες

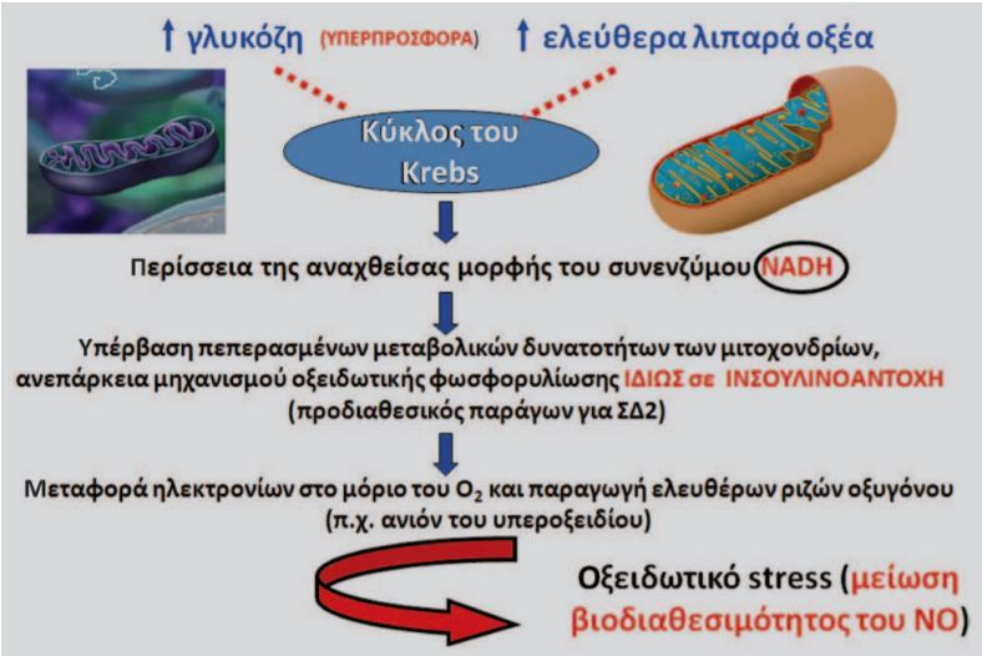
Παραπομπή	Είδος γεύματος	Δείγμα εθελοντών	Μετρήσεις γλυκαιμίας και οξειδωτικού στρες	Αποτελέσματα
136	Υδατάνθρακες OGTT 300 kcal	14 υγιείς εθελοντές, 25-42 ετών	- Γλυκόζη, ινσουλίνη - TBARS, α-τοκοφερόλη	- ↑ ενδογενούς παραγωγής *ROS* - μικρή ↓ α-τοκοφερόλης
137	2 τύποι γευμάτων: Μικτό γεύμα I Υδατάνθρακες: 58γρ.(28,5%) Λίπη: 50γρ. (59,2%) Πρωτεϊνες: 19,5γρ. (12,3%) Μικτό γεύμα II **Υδατάνθρακες: 144γρ. (72,9%)** Λίπη: 17γρ. (20,6%) *Πρωτεΐνες:* 12,35γρ. (6,5%)	20 υγιείς εθελοντές	- Γλυκόζη	**Καμία διαφορά από την πρόσληψη γεύματος υψηλών υδατανθράκων (II) στη γλυκόζη**
138	Υδατάνθρακες OGTT 300 kcal	20 υγιείς εθελοντές	- Γλυκόζη - Νιτροτυροσίνη	- ↑ Γλυκόζης, Νιτροτυροσίνης

139	Υδατάνθρακες OGTT 300 kcal	24 υγιείς εθελοντές, μ.ο: 68 ετών	- Γλυκόζη, Ινσουλίνη -Θειορεδοξίνη, 8-OHdG	-↑ Γλυκόζης, Ινσουλίνης - ↓ Θειορεδοξίνης, 8-OHdG
140	Υδατάνθρακες OGTT ή 75γρ. φρουκτόζης 300 kcal	16 υγιείς άνδρες, 18-35 ετών	- Γλυκόζη, Ινσουλίνη - *ORAC, MDA, FRAP,* Βιτ. *C*	↑ Γλυκόζης, Ινσουλίνης, Ουρικού οξέος, FRAP, MDA

2.4.2: Υπερλιπιδαιμία και οξειδωτικό στρες

Ο μεταγευματικός δυσμεταβολισμός χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (TG) και συγκεκριμένα χυλομικρών CM, υπολείμματων χυλομικρών και VLDL. **(45)** Σε μία συνεχή μεταγευματική κατάσταση, το επίπεδο υπολειμμάτων χυλομικρών στην κυκλοφορία μπορεί να παραμείνει αυξημένο επ' αόριστον. **(50)** Έχει δειχθεί ότι η αύξηση αυτή των μεταγευματικών επιπέδων των μεταφορικών λιποπρωτεϊνών οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού. **(47)** Η κατανάλωση γευμάτων υψηλής περιεκτικότητας σε οξειδωμένα λιπίδια, αλλά και λιπίδια, που δύναται να οξειδωθούν, προκαλεί την εμφάνιση υψηλών συγκεντρώσεων λιπιδικών υδρουπεροξειδίων στο πλάσμα, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία της LDL λιποπρωτείνης σε οξειδωτικές τροποποιήσεις αφού οι LDL αποτελούν εξέχοντες στόχους μεταγευματικής οξειδωτικής τροποποίησης. **(56)** Η αυξημένη οξείδωση των λιπαρών οξέων των LDL δημιουργεί υπερπαραγωγή δοτών ηλεκτρονίων (NADH και $FADH_2$), υπερφορτώνοντας έτσι την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μιτοχονδρίων, προκαλώντας συσσώρευση ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q, το οποίο δίνει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι ρίζες υπεροξειδίου. **(57)** Η αλυσιδωτή αυτή διαδικασία οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου όπως αναφέραμε και νωρίτερα. **(135)** Επιβαρυντικό παράγοντα αποτελούν και τα μειωμένα ποσοστά κάθαρσης των υπολειμμάτων χυλομικρών μεταγευματικά, παρατείνοντας την συσσώρευση πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνων. Η μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για πρώιμη αθηροσκλήρωση.**(50)** Ο μηχανισμός της αθηρογένεσης είναι περίπλοκος και εμπλέκει δύο κύρια συστατικά, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκύτταρα, μακροφάγα, Τ-λεμφοκύτταρα) και λιποειδή-λιποπρωτεΐνες με σημαντικότερες εξ αυτών της LDL. Όσον αφορά τον κεντρικό ρόλο της οξειδωμένης LDL, έχουν προταθεί τρεις τρόποι με τους οποίους αυτή επιβαρύνει την αθηρωματική διαδικασία. Ο πρώτος είναι η δράση της ως χημειοτακτικό μόριο για την εισβολή των μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο. Ο δεύτερος είναι μέσω της μετατροπής των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Τέλος, ο τρίτος είναι ότι παγιδεύει τα τελευταία στον υποενδοθηλιακό χώρο. Πιο αναλυτικά, το υψηλό μεταγευματικό επίπεδο της οξειδωμένης

LDL μπορεί να βλάψει το ενδοθήλιο το οποίο με τη σειρά του μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία της αθηρογένεσης. Ακολουθεί μία αυξημένη προσκόλληση μονοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων στην περιοχή με ταυτόχρονη διήθηση αιμοπεταλίων, γεγονότα που πιστεύεται ότι είναι αποτελέσματα της ταυτόχρονης διείσδυσης του ενδοθηλίου από την LDL. Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν αυθητικούς παράγοντες οι οποία διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και αυτά με την σειρά τους συσσωρεύουν λιποειδή που εισέρχονται σε αυτά, προφανώς με την μομφή της LDL, μετατρέποντάς τα σε πλούσια αφρώδη κύτταρα. Επιπλέον, τα μακροφάγα προσλαμβάνουν οξειδωμένη, κυρίως, LDL δημιουργώντας αφρώδη κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα τα λιποειδικά συστατικά τους (χοληστερόλη/εστέρες χοληστερόλης) να συσσωρεύονται με τη μορφή λιποειδικών γραμμώσεων. Αυτές τελικά, επεκτείνονται, κλείνουν τον αρτηριακό αυλό σε βαθμό που μπορεί να προκαλέσει στένωση. Η οξειδωμένη LDL πρόσλαμβάνεται ανεξέλεκτα από τα μακροφάγα, αλλά έχει και μεγαλύτερη δράση στον πολλαπλασιασμό των στα λείων μυϊκών κύτταρων, έναντι της LDL. Παράλληλα, είναι τοξικότερη για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, συγκριτικά με την φυσιολογική, μη οξειδωμένη της μορφή. **(135)**



Εικόνα 2.3: Πώς οδηγεί η μεταγευματική υπεργλυκαιμία και η λιπαιμία σε οξειδωτικό stress ***(51)***

Στον Πίνακα 2.2 παρατίθενται πέντε μεταγευματικές μελέτες **(141-145)** που πραγματοποιήθηκαν σε υγιείς εθελοντές με στόχο την διερεύνηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες μετά από κατανάλωση γεύματος πλούσιου σε λίπος. Στις τέσσερις από αυτές **(141, 143-145)** φάνηκε θετική συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την μεταγευματική υπερλιπιδαιμία. Επιπλέον, σε μία εξ αυτών **(144)** βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της M*DA* και της μεταγευματικής γλυκόζης.

Ακόμα, αξίζει να επισημανθεί η μελέτη **145** της οποίας η παρέμβαση αποτελούταν από τέσσερα διαφορετικά γεύματα. Τα γεύματα I και II περιείχαν μόνο υδατάνθρακες, 75γρ. ή 150γρ. δεξτρόζης αντίστοιχα, ενώ τα II και IV περιείχαν μόνο λιπίδια, 33γρ. ή 66γρ. λίπους αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα που σημειώθηκε ήταν ότι μόνο το πλούσιο σε λίπος γεύμα οδήγησε σε σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες (μέτρηση *MDA* και H_2O_2) και της λιπαιμίας (μέτρηση *TAG*) σε σύγκριση με το ισοθερμιδικό υδατανθρακικό γεύμα αλλά και με το λιπιδικό θποθερμιδικό γεύμα.

Πίνακας 2.2: Μεταγευματικές κλινικές μελέτες συσχέτισης υπερλιπιδαιμίας και οξειδωτικού στρες

Παραπομπή	Είδος γεύματος	Δείγμα εθελοντών	Μετρήσεις λιπαιμίας και οξειδωτικού στρες	Αποτελέσματα
141	Υδατάνθρακες: 50 γρ. **Λίπος: 53,4 γρ. (60%)** Πρωτεΐνες: 30,7 γρ. 805 kcal	20 υγιείς εθελοντές	- TAG, TC, HDL,LDL - Παραγόμενο O_2^- στα λευκοκύτταρα	- ↑ ενδογενούς παραγωγής *ROS* - μικρή ↓ α-τοκοφερόλης
142	3 γεύματα (υψηλό σε λίπος, χαμηλό σε λίπος, υψηλό σε λίπος + βιτ. Ε) Υδατάνθρακες: 50 γρ./178 γρ. (88%) **Λίπος: 53,4 γρ. (60%)/ 3γρ.** Πρωτεΐνες: 30,7 γρ./15,7 γρ.	10 υγιείς εθελοντές	- TAG, TC, HDL, LDL - MDA	**-Δεν βρέθηκαν διαφορές στο MDA μεταξύ των ομάδων** -↑ TAG στο υψηλό σε λίπος γεύμα
143	50γρ. (51%) (14γρ. κορεσμένων, 225mg χοληστερόλη)	16 υγιείς άνδρες	- TAG, TC, HD, LDL - GSH-Px, 8-PGF2a	- TAG και GSH-Px, TAG και 8-PGF2a - ↑ 8-PGF2a και ↓ GSH-Px
144	Υδατάνθρακες: 55γρ. **Λίπος: 50γρ. (50%)** Πρωτεΐνες: 30γρ. 900kcal	17 υγιείς άνδρες	- TAG, TC, HDL, LDL, Γλυκόζη - MDA,οξειδωμένη LDL	**- MDA με γλυκόζη** - oxLDL με TAG
145	4 διαφορετικά γεύματα: (I) 75γρ. υδατανθράκων (δεξτρόζη) (II) 150γρ. υδατανθράκων (δεξτρόζη) **(III) 33γρ. λιπιδίων** **(IV) 66 γρ. λιπιδίων** 300 kcal ή 600 kcal	9 υγιείς άνδρες	- TAG, Γλυκόζη - MDA, H_2O_2	- MDA με TAG H_2O_2 με TAG H_2O_2 με MDA **- (IV): ↑ TAG, MDA, H_2O_2**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

3.1: Σύσταση Σταφυλιού και Διαδικασία Οινοποίησης

Σύσταση Σταφυλιού

Ο καρπός της αμπέλου είναι οι ρώγες ή ράγες, που όλες μαζί αποτελούν το σταφύλι. Περικλείονται από την φλούδα ή φλοιό και μέσα τους έχουν το σάρκωμα ή σάρκα και τα γίγαρτα δηλαδή τα κουκούτσια. Ο φλοιός αποτελεί το 10-20% του βάρους του σταφυλιού και αποτελείται κυρίως από νερό καθώς και τερπένια, αλκοόλες, εστέρες καθώς και πτητικά παράγωγα φαινολών. Το σάρκωμα, το σαρκώδες εσωτερικό μέρος του σταφυλιού, αποτελείται από κύτταρα με λεπτή κυτταρική μεμβράνη που περιέχουν σάκχαρα, οργανικά οξέα, ανόργανα άλατα, τανίνες, αρωματικές ενώσεις ενώ ορισμένες ποικιλίες σταφυλιών διαθέτουν στο σάρκωμά τους και χρωστικές ουσίες. Τα γίγαρτα είναι συνήθως τέσσερα σε κάθε ράγα. Περιέχουν νερό, υδρογονάνθρακες, πρωτεΐνες, ελαιώδεις ουσίες και κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου και, αν διαρραγούν κατά την έκθλιψη του σταφυλιού, προσδίδουν στυφή γεύση. Όλες μαζί οι ρώγες είναι κολλημένες στο βόστρυχο/τσάμπουρο/κοτσάνι. Στο βόστρυχο διακρίνουμε τη ράχη, δηλαδή το κεντρικό κοτσάνι, και τις διακλαδώσεις (τσαμπάκια), ενώ κάθε ρώγα είναι κολλημένη με μικρό μίσχο, τον ποδίσκο που μπαίνει στο εσωτερικό της σάρκας της με ένα μικρό θύσανο (πινέλο). Αυτά αποτελούν τα ξυλώδη μέρη του φυτού και αποτελούν το 3-7% του βάρους του σταφυλιού. Αποτελούνται από νερό έως και 90%, ταννίνες, ρητίνες και ανόργανα συστατικά, κυρίως άλατα καλίου. Επιπλέον, περιέχουν ίχνη σακχάρων και οργανικών οξέων. **(58)**

Διαδικασία Οινοποίησης

Η οινοποίηση, δηλαδή η διαδικασία μετατροπής του σταφυλιού σε κρασί, επιτελείται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης του καρπού, ή του μούστου, από τους ζυμομύκητες του φλοιού των σταφυλιών που πολλαπλασιάζονται. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα με υπόστρωμα τα σάκχαρα του σταφυλιού, διαρκεί συνήθως 8-25 μέρες και οδηγεί στο σχηματισμό αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Συνεπάγεται την εφαρμογή μιας μεγάλης ποικιλίας τεχνικών ανάλογα με το επιθυμητό είδος του υπό παραγωγή οίνου. Παραδοσιακά, η οινοποίηση είναι δυνατόν να διαχωριστεί σε λευκή και ερυθρή. Το πρώτο στάδιο αμέσως μετά τη συγκομιδή των σταφυλιών είναι η αποβοστρύχωση τους στο εκραγιστήριο, δηλαδή ο μηχανικός διαχωρισμός των ραγών από τον κύριο κορμό των σταφυλιών. Εξαιτίας της χημικής τους σύστασης αποφεύγεται συστηματικά η διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης παρουσίας βοστρύχων και φύλλων ως προς αποφυγή της εκχύλισης των τανινών τους στο μούστο, καθώς αυτές προσδίδουν στυφή και πικρή γεύση που

είναι ανεπιθύμητη. Ακολουθεί η γλευκοποίηση ή αλλιώς σύνθλιψη, η οποία γίνεται με ήπιο τρόπο έτσι ώστε να παραμείνουν ανέπαφα τα γίγαρτα και να αποφευχθεί τυχόν εκχύλιση των ελαίων ή/και των τανινών τους που θα επηρέαζε αρνητικά την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου. Στη συνέχεια, ο χυμός και η σταφυλόμαζα συλλέγονται σε δεξαμενές και προστίθεται διοξειδίου του θείου (SO_2) το οποίο λειτουργεί προστατευτικά κατά της οξείδωσης και της δράσης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Έπειτα λαμβάνει χώρα η εκχύλιση, στάδιο στο οποίο διαφοροποιείται η λευκή από την ερυθρά οινοποίηση. Τα κόκκινα κρασιά παρασκευάζονται συνήθως σε επαφή με τον φλοιό των σταφυλιών, σε αντίθεση με τα λευκά κρασιά. Ως αποτέλεσμα αυτού, η ζύμωση ξεκινά παράλληλα με την εκχύλιση για αυτό το είδους οίνου, ενώ στην λευκή οινοποίηση επέρχεται αργότερα. **(59, 60)** Το κόκκινο χρώμα και άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά, αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στα φαινολικά συστατικά του φλοιού. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στα λευκά κρασιά είναι έως και 10 φορές χαμηλότερες από αυτές των ερυθρών. **(61)** Παράλληλα, η ένταση του ερυθρού χρώματος του κάθε οίνου εξαρτάται αποκλειστικά από το χρονικό διάστημα που διαρκεί το στάδιο αυτό, διαφοροποιώντας έτσι τους ροζέ από τους ερυθρούς οίνους. Ύστερα, ασκείται πίεση, συνήθως με τη χρήση αέρα, στάδιο το οποίο αποφεύγεται σε καλύτερης ποιότητας εμφιαλωμένους οίνους. Στα σύγχρονα οινοποιεία αποφεύγεται η «βάναυση» μεταχείριση της πρώτης ύλης που έχει ως συνέπεια τον εμπλουτισμό του γλεύκους με ανεπιθύμητα συστατικά των φλοιών και των γιγάρτων. Εάν από κακή έκθλιψη και πίεση των στεμφύλων σπάσει μέρος των γιγάρτων, τότε ελαιώδεις ουσίες, λιπαρά οξέα και τανίνες, περνούν στο γλεύκος και αλλοιώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του παραγόμενου οίνου. Η απολάσπωση, είναι απαραίτητο επόμενο στάδιο για να επιφέρει την επιθυμητή διαύγαση. Ακολουθεί η αλκοολική ζύμωση (ή συνεχίζεται για την ερυθρή οινοποίηση), και ίσως πραγματοποιηθεί και μία δεύτερη μηλογαλακτική ζύμωση όπου το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό, με αποτέλεσμα να γίνεται ηπιότερη η γεύση του παραγόμενου οίνου. Με το τέλος της ζύμωσης γίνεται μετάγγιση του οίνου σε δεξαμενές για καθίζηση στερεών υπολειμμάτων και επίτευξη ακόμα μεγαλύτερης διαύγειας. Στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθεί ωρίμανση-παλαίωση του οίνου από λίγες εβδομάδες έως αρκετά χρόνια. Κατά τη διαδικασία αυτή επέρχονται μεταβολές στο χρώμα, την οσμή και τη γεύση του οίνου. Μετά το πέρας και αυτού το σταδίου, ακολουθεί διαύγαση με μία σειρά διαδικασιών που αποσκοπούν στην απαλλαγή του οίνου από τα αιωρούμενα σωματίδια που προκαλούν θόλωση. Τέλος, πριν το τελευταίο στάδιο της εμφιάλωσης, προστίθεται μία τελευταία ποσότητα διοξειδίου του θείου. (**59,60)**

3.2: Κρασί - Το Γαλλικό παράδοξο, η σύσταση και η αντιοξειδωτική του δράση

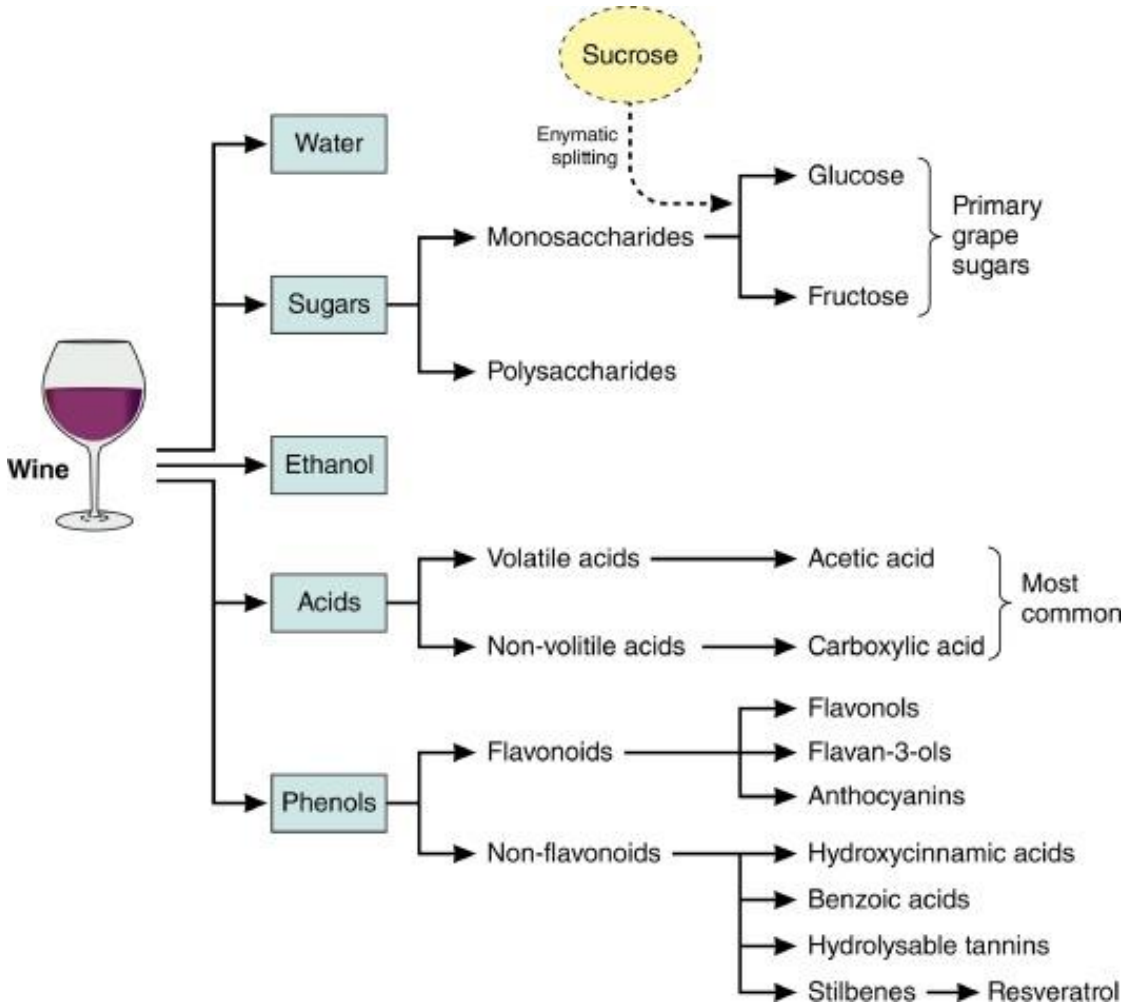
Γαλλικό Παράδοξο

Σε γνωστή επιδημιολογική μελέτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 1992, παρατηρήθηκε ότι οι Γάλλοι παρουσίαζαν ιδιαιτέρως μειωμένη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο σε σχέση με τους Αμερικανούς, παρά το γεγονός ότι σε μερικές περιοχές της Γαλλίας η κατανάλωση κορεσμένων λιπών ήταν πολύ υψηλότερη. Αυτό ήρθε σε αντίθεση με την γνωστή θετική συσχέτιση της υψηλής χοληστερόλης και πρόσληψης κορεσμένων λιπών με την αθηροσκλήρωση και τη στεφανιαία νόσο. Η προφανής αυτή αναντιστοιχία έγινε ευρέως γνωστή με τον όρο «Γαλλικό Παράδοξο» που εισήχθη από τους Renaud και De Lorgeril, ωστόσο, ο όρος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε χώρα, όπως η Ελλάδα, όπου οι άνθρωποι παραδοσιακά καταναλώνουν μια πλούσια σε κορεσμένο λίπος διατροφή, οι υπόλοιποι παράγοντες κινδύνου της στεφανιαίας νόσου υφίστανται επίσης και παρόλα αυτά, παρουσιάζουν χαμηλότερο από το αναμενόμενο ποσοστό θνησιμότητας από τη νόσο. Η κατανάλωση αλκοόλ και κυρίως κρασιού, ήταν αρκετά υψηλότερη στη Γαλλία, σε σχέση με τις περισσότερες χώρες στην Δύση. Ύστερα λοιπόν από λεπτομερή πολυπαραγοντική ανάλυση φάνηκε ότι το κρασί ήταν ο μόνος διατροφικός παράγοντας ο οποίος παρουσίαζε αρνητική συσχέτιση με τη στεφανιαία νόσο, ότι δηλαδή τα συστατικά του μειώνουν με κάποιον τρόπο τα περιστατικά θνησιμότητας από τη στεφανιαία νόσο. **(62, 63)** Συγκεκριμένα, επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση αλκοόλ στο επίπεδο πρόσληψης της Γαλλίας (20-30 g την ημέρα) μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων κατά τουλάχιστον 40%. Αναπτύχθηκαν διάφορες θεωρίες για την προστατευτική του δράση, με την επικρατούσα να υποστηρίζει ότι το αλκοόλ περιόριζε την αθηροσκλήρωση, μέσω ευεργετικών δράσεων στην HDL. Ωστόσο, τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης ορού δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ της Γαλλίας και άλλων χωρών με υψηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, οπότε ο Renaud συμπέρανε ότι η προστατευτική επίδραση του αλκοόλ ήταν μάλλον αποτέλεσμα κάποιου αιμοστατικού μηχανισμού και συγκεκριμένα της μειωμένης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. **(62)**

Σύσταση κρασιού

Το κρασί αποτελεί ένα περίπλοκο σύνολο ενώσεων που προέρχονται τόσο από τη σύσταση του καρπού του σταφυλιού όσο και από τη διαδικασία της ζύμωσης. **(63)** Η σύστασή του εξαρτάται από τα συστατικά του σταφυλιού, τα προϊόντα ζύμωσης και τις συντιθέμενες ενώσεις κατά τα στάδια της αποθήκευσης και ωρίμανσης του. **(64)** Αρχικά, αποτελείται κατά κύριο λόγο από νερό

με ποσοστό 80-85%. Λειτουργεί ως μέσο χημικών αντιδράσεων και είναι σημαντικό για την ανάδειξη πολλών εκ των αρωμάτων και γεύσεων εφόσον στην πλειοψηφία τους είναι υδατοδιαλυτές. Η αιθανόλη, η οποία περιέχεται στα περισσότερα κρασιά σε ποσοστό 10%-15%, αποτελεί το δεύτερο κυριότερο συστατικό του οίνου. Τα ανώτερα επίπεδα της επιτυγχάνονται μέσω ενίσχυσης του οίνου και όσο αυξάνεται η τιμή τους, αυξάνεται η αντίληψη τόσο της πικρής όσο και της γλυκιάς γεύσης ενώ μειώνεται η ένταση άλλων αρωμάτων. Μειώνει επίσης την εξάτμιση άλλων πτητικών ενώσεων όπως π.χ φαινόλες, και βελτιώνει τη συνολική σταθερότητα του κρασιού μέσω της παραγωγή εστέρων. Οι αλκοόλες αναφέρονται, πέρα της αιθανόλης, στην γλυκερόλη, ένωση που συμβάλλει επίσης στην γλυκύτητα. Το υπόλοιπο περίπου 3% (%w/w) το συγκροτούν ενώσεις όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, αλκοόλες, φαινολικά συστατικά, αρωματικές ενώσεις, βιταμίνες, αζωτούχες ενώσεις, ένζυμα και ανόργανα συστατικά. Η περιεκτικότητα του κρασιού σε σάκχαρα καθορίζει την γλυκύτητα του, με τα κυριότερα να είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, οι πηκτίνες, τα κόμμεα, αλλά και η γαλακτόζη και η δεξτράνη, Τα σάκχαρα αποτελούν το κύριο υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης στο κρασί κατά τη ζύμωση. Τα οργανικά οξέα είναι υπεύθυνα τόσο για την οξύτητα, όσο και για την διατήρηση του χρώματος του οίνου και την προστασία του μικροβιολογικά και χημικά. Απαντάται κυρίως κιτρικό οξύ, μηλικό οξύ, τρυγικό οξύ, οξικό οξύ αλλά ακόμα και γαλακτικό, σε περίπτωση που έχει προηγηθεί μηλογαλακτική ζύμωση κατά την οινοποίηση. Τα οξέα διαμορφώνουν το pH το οποίο με την σειρά του επηρεάζει το χρώμα, τη γεύση και την σταθερότητα του κρασιού. **(64, 65)** Οι αζωτούχες ενώσεις αφορούν αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες. Εκτός του δομικού τους ρόλου για το σταφύλι, αποτελούν και θρεπτικά συστατικά για τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση. Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν περισσότερες συγκριτικά με τους λευκούς εξαιτίας της ανεύρεσής τους στα στερεά μέρη του σταφυλιού τα οποία δεν χρησιμοποιούνται στην λευκή οινοποίηση. Όσον αφορά τις βιταμίνες, η πλειοψηφία είναι, όπως είναι επόμενο, υδατοδιαλυτές. Βρίσκουμε βιταμίνη B1 (θειαμίνη), B2 (ριβοφλαβίνη), B3 (νιασίνη) και βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ). **(65)** Επιπλέον, από το κόκκινο κρασί έχουν απομονωθεί ορισμένα λιποειδή, με κυρίαρχα αυτά με σκελετό γλυκερόλης. Στο γλεύκος τα λιποειδή είναι φωσφο-γλυκολιποειδή, ενώ στο κρασί είναι γλυκολιποειδή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα λιποειδή του οίνου προέρχονται από το σταφύλι αλλά υπόκεινται σε χημική τροποποίηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. **(66)**



Εικόνα 3.1: Βασικά επιμέρους συστατικά του κρασιού ***(64)***

Η φαινολική σύνθεση του οίνου ποικίλλει και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία των σταφυλιών που έχουν χρησιμοποιηθεί, το έδαφος, η γεωγραφική θέση, οι καιρικές συνθήκες καθώς και οι τεχνικές οινοποίησης που έχουν εφαρμοστεί. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές ποιοτικές παραμέτρους των οίνων, καθώς συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως χρώμα, άρωμα, στυπτικότητα, πικρία των ερυθρών αλλά και των λευκών κρασιών. Όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, συμμετέχουν ενεργά στην αντιοξειδωτική άμυνα και πρόληψη εξωγενών βλαβών των εκάστοτε φυτών από εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. χαμηλές θερμοκρασίες, έντομα, μύκητες, έκθεση σε τοξικές ουσίες, κ.λπ.). Η δράση τους αυτή οφείλεται στον όξινο χαρακτήρα της φαινολικής ομάδας. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και γι' αυτό αποτελούν χαρακτηριστικό συστατικό τους. Οφείλουν το όνομά τους στον αρωματικό δακτύλιο που φέρουν στο μόριό τους, ο οποίος περιέχει ένα η περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίων. Παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία μορίων από απλές φαινόλες, με έναν δακτύλιο, έως πολυφαινόλες. Οι απλές φαινόλες ή μη φλαβονοειδή είναι πιο απλές ενώσεις όπως τα φαινολικά οξέα και τα στιλβένια,

ενώ τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν πολλές κατηγορίες όπως οι ταννίνες και οι φλαβανόλες.**(67,68)**

Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών ανήκουν τα φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμωμικά οξέα) και φαινολικά παράγωγα όπως τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη και πολυδατίνη) τα οποία και κυριαρχούν. Απαντώνται στα κενοτόπια του φλοιού και στα κύτταρα του σαρκώματος των σταφυλιών. **(63)** Το σημαντικότερο υδροξυβενζοϊκό οξύ του κρασιού, που είναι και το μόνο που έχει αναγνωριστεί σε φυσική κατάσταση στα στερεά μέρη των σταφυλιών, είναι το γαλλικό οξύ. Εκτός από ελεύθερο, μπορεί να βρίσκεται και με τη μορφή φλαβανολικού εστέρα με τις κατεχίνες . Άλλα υδροξυβενζοϊκά οξέα και παράγωγά τους είναι το γεντισικό, το π-υδροξυβενζοϊκό, το συριγγικό, το πρωτοκατεχικό οξύ, το βανιλλικό και οι μεθυλικοί εστέρες των δύο τελευταίων. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία των μη-φλαβονοειδών που βρίσκονται στο κρασί. Τα κυριότερα είναι το καφεϊκό, το π-κουμαρικό, το φερουλικό και οι αντίστοιχοι εστέρες τους. **(68)** Τα στιλβένια συντίθενται από τα φυτά για προστατευτικούς λόγους. Η ρεσβερατρόλη, χαρακτηριστικό στιλβένιο, θεωρείται η σημαντικότερη πολυφαινόλη και βιοσυντίθεται στον καρπό του σταφυλιού ως απάντηση σε τραυματισμό, μηχανικό τραύμα, μυκητιασική λοίμωξη ή υπεριώδη ακτινοβολία. **(64)**

Τα φλαβονοειδή είναι, όπως αναφέρθηκε ήδη, πολυφαινολικές ενώσεις με πολλαπλούς αρωματικούς δακτυλίους που διαθέτουν υδροξυλικές ομάδες. **(63)** Αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος του πολυφαινολικού περιεχομένου το κόκκινου κρασού (> 85%, ≥ 1 g/L) καθώς εξάγονται από τη φλούδα, τους σπόρους και το στέλεχος του σταφυλιού. Οι επιμέρους κατηγορίες τους είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες και οι ανθοκυανιδίνες. **(64)** Οι φλαβόνες απαντώνται στα φύλλα της αμπέλου με χαρακτηριστικότερες τη απιγενίνη και τη λουτεολίνη ως γλυκοζίτες. Οι φλαβονόλες απαντώνται στο φλοιό των σταφυλιών. Στην κατηγορία αυτή απαντάται η κερκετίνη, η μυρικετίνη, η καμφερόλη και η ισοραμνετίνη. Το προφίλ των φλαβονολών του κρασιού διαφέρει όμως από εκείνο των σταφυλιών επειδή περιέχει και μη γλυκοζυλιωμένες μορφές. Οι ουσίες αυτές έχουν κίτρινο χρώμα δρώντας ως χρωστικές αλλά και ως προστατευτικές ουσίες απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, προστατεύοντας το φλοιό των σταφυλιών. Μάλιστα έχει φανεί ότι σε κρασί προερχόμενο από ποικιλίες σταφυλιών με αυξημένη ηλιακή έκθεση το ποσοστό των φλαβονολών ήταν υψηλό. **(68)** Οι φλαβαν-3-όλες, ή φλαβανόλες, απαντώνται στα στερεά μέρη (φλοιός, σπόρος) και οι μονομερείς μορφές τους κοινώς καλούνται κατεχίνες. Το ισομερές με την trans διαμόρφωση είναι η κατεχίνη, ενώ αυτό με τη cis διαμόρφωση η επικατεχίνη. Σχηματίζουν εστέρες με το γαλλικό οξύ, τις γαλλοκατεχίνες, ενώ ο πολυμερισμός τους δημιουργεί τις προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες. **(63, 69)** Οι ανθοκυανιδίνες αποτελούν κύρια συστατικά των φυτικών χρωστικών, βρίσκονται στον φλοιό του σταφυλιού και

είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό χρώμα του κόκκινου κρασιού. Η δράση τους κατά την οινοποίηση είναι καθοριστική και είναι υπεύθυνη για τις χρωματικές αλλαγές του κρασιού. **(68)** Το χρώμα των ανθοκυανιδινών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH, και εμφανίζεται ερυθρό σε τιμές pH< 7 (όξινες συνθήκες) και μπλε σε τιμές pH > 7 (βασικές συνθήκες).**(69)** Τέλος, οι ολιγομερείς και πολυμερείς φλαβανόλες σχηματίζουν τις τανίνες. Οι τανίνες είναι σύνθετες φαινολικές ενώσεις που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες, στις συμπυκνωμένες τανίνες (κατεχίνες ή προανθοκυανιδίνες) οι οποίες αποτελούνται από υπομονάδες μονομερών φλαβανολών και στις υδρολύσιμες τανίνες. **(67)** Επιπλέον, τανίνες μπορούν να εμφανιστούν στο κρασί κατά την αποθήκευση του σε δρύινα βαρέλια, προσθέτοντας στη στυφότητα του κρασιού.**(64)**

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις που συναντώνται στο κρασί υπάρχουν και σε άλλα τρόφιμα. Εξαίρεση αποτελεί η ρεσβερατρόλη οπότε και θεωρείται διαιτητικός βιοδείκτης της κατανάλωσης του. **(63)**

Αντιοξειδωτική δράση κρασιού

Η δύναμη των ευρημάτων του Renaud και του de Lorgeril για το γαλλικό παράδοξο έχει προωθήσει πολλές έρευνες για το αντιοξειδωτικό δυναμικό του κρασιού, δηλαδή την ικανότητά του να εκκαθαρίζει τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) ή να παρεμβαίνει στην παραγωγή τους μέσω της ελάττωσης της δραστικότητας των οξειδωτικών ενζύμων και της ενίσχυσης της δράσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων. Τα ROS οξειδώνουν λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA. Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών LDL είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της αθηροσκλήρωσης και της ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Παράλληλα, η μεταλλαξιογένεση εξαιτίας της οξειδωτικής βλάβης του DNA θεωρείται κρίσιμο βήμα στην ανθρώπινη καρκινογένεση. Μεταλλάξεις του DNA οι οποίες προωθούνται από την οξείδωσή του, θεωρείται ότι εμπλέκονται και στις αθηροσκληρωτικές διεργασίες. **(71)** Οι αντιξειδωτικές ιδιότητες του κρασιού κατά των παραπάνω διαδικασιών έχουν αποδοθεί στα μοριακά συστατικά του, συγκεκριμένα την αιθανόλη και τις πολυφαινόλες.

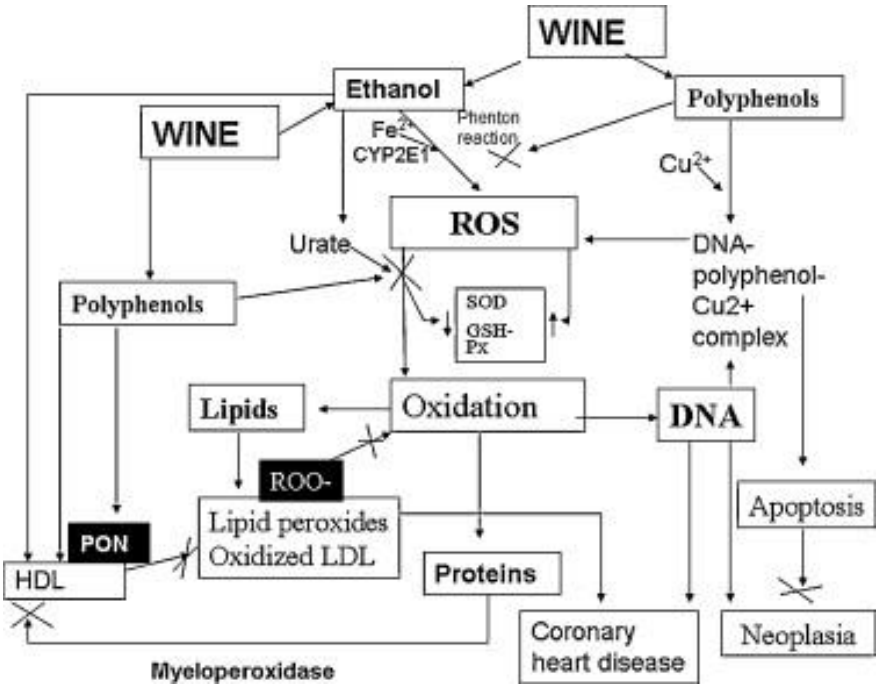
Στρέφοντας τον ενδιαφέρον στην υψηλή περιεκτικότητα του οίνου σε αλκοόλ, μελέτες έχουν δείξει ότι η ελαφριά έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα για τον οργανισμό. Αρχικά, σχετίζεται και με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη και με ευεργετική επίδραση στην ινσουλίνη και στον μεταβολισμό της γλυκόζης. **(72)** Βρέθηκε πως η αιθανόλη προσφέρει καρδιαγγειακή προστασία κυρίως μέσω των βελτιώσεων της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και των ποιοτικοποσοτικών αλλαγών στα κλάσματα της HDL. **(73)** Η θετική επίδραση

της αιθανόλης στην HDL φαίνεται ότι μπορεί να ερμηνεύσει κατά 50% την επίδραση της κατανάλωσης αλκοόλ στην πρόληψη της αθηρωματικής νόσου, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό πιστεύεται ότι μπορεί να οφείλεται σε αντιθρομβωτικές τροποποιήσεις της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και της ισορροπίας του μηχανισμού πήξης και ινωδόλυσης οι οποίες μειώνουν την υπερπηκτικότητα του αίματος και επομένως τον κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακού περιστατικού. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη είναι ικανή να ελαττώσει τα επίπεδα ινωδογόνου, των παραγόντων πήξης, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, το ιξώδες του αίματος και να αυξήσει τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού. **(74, 75)** Από την άλλη πλευρά, πρέπει να σημειωθεί ότι σε υπερβολική κατανάλωση, τα πλεονεκτήματα αυτά αποδεδειγμένα χάνονται και παρατηρείται μεταγευματική αύξηση των TG και της VLDL και αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος. Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να εξηγήσει εν μέρει μόνο τον προστατευτικό ρόλο του κρασιού, οπότε και η έρευνα επεκτάθηκε στα περαιτέρω μικροσυστατικά του. Επιπλέον, σε μερικές περιπτώσεις, η κατανάλωση κρασιού εμφάνισε χαμηλότερα επίπεδα TG σε σχέση με την κατανάλωση αλκοόλης, τονίζοντας την σημασία της συμβολής των μικροσυστατικών αυτών. **(72)**

Τα βιοενεργά μικροσυστατικά του κρασιού είναι με βεβαιότητα αυτά που το κάνουν να ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα αλκοολούχα ποτά. Οι προστατευτικές επιδράσεις τους αρχικά αποδόθηκαν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. **(63)** Οι φαινολικές ενώσεις συγκεκριμένα κρίθηκαν υπεύθυνες για αυτές και παρά της φανερά πολύ χαμηλής συγκέντρωσης τους στο κρασί, τους αποδόθηκε το πλεονέκτημα του. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά και είναι βιοδιαθέσιμες μετά από οξεία ή/και χρόνια κατανάλωση κόκκινου κρασιού έτσι ώστε να ασκούν βιολογικές επιδράσεις in vivo. Οι πιο σημαντικές πολυφαινόλες αφορούν τα φλαβονοειδή κερκετίνη, κατεχίνη, τις ανθοκυανίνες και την μη φλαβονοειδή ρεσβερατρόλη. **(64)** Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό ότι ασκούν ισχυρή αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. **(63)** Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι το υψηλό συνολικό φαινολικό περιεχόμενο ενός κρασιού δεν σημαίνει πάντα και υψηλή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώση δράση. Η ιδιότητα αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί ούτε κατ' αποκλειστικότητα σε συγκεκριμένες κατηγορίες φαινολικών, αλλά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και οι εκάστοτε μοριακές δομές των επιμέρους ενώσεων. (**146)** Παρομοίως, περί σύγκρισης λευκού και ερυθρού οίνου, και τα δύο είδη περιέχουν ισχυρά βιολογικά μικροσυστατικά κατά του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής και της θρόμβωσης, επομένως, η προστατευτική δράση ενός κρασιού είναι ανεξάρτητη και από το χρώμα του, αλλά συνδέεται έντονα με το προφίλ των μικροσυστατικών του. **(70)** Οι (πολύ)φαινόλες περιορίζουν την οξείδωση της LDL μέσω της δέσμευσης των ριζών, μια επίδραση που αποδίδεται στον δακτύλιο της φαινόλης. **(64)** Επιπλέον δράσεις τους είναι η μείωση σχηματισμού του υδροϋπεροξειδίου και η απόσβεση ηλεκτρονιακά διεγερμένων ενώσεων.

Εξίσου σημαντική είναι η ικανότητα τους να τροποποιούν την δράση ενζύμων και να επιδρούν στις οδούς σηματοδότησης των κυττάρων και στη γονιδιακή έκφραση.**(73)** Αρκετές in vitro μελέτες υποδεικνύουν την συμμετοχή των μικροσυστατικών του οίνου σε φλεγμονώδεις οδούς μέσω της ρύθμισης της ενζυμικής δραστηριότητας ή/και της αναστολής της έκκρισης και της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών μέσω τροποποίησης των μεταγραφικών παραγόντων.Τα εκχυλίσματα κρασιού και η ρεσβερατρόλη έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν τα προφλεγμονώδη ένζυμα κυκλοοξυγενάση-1 και λιποοξυγενάση όπως επίσης και τα ένζυμα της βιοσύνθεσης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF. **(146, 70)** ‘Ετσι, μειώνουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Παράλληλα, προάγουν την ινωδόλυση και αποτρέπουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω της αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας του NO.**(64)** Πρόσθετα οφέλη προσφέρει η ιδιότητα χηλίωσης μετάλλων μέσω της οποίας οι πολυφαινόλες μπορεί να αναστείλουν το σχηματισμό ROS μέσω των αντιδράσεων Haber–Weiss/Fenton, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με την κερκετίνη και τον ενδοκυτταρικό σίδηρο. Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι υπεροξείδωσης που προκαλείται από ιόντα μετάλλου παρά αυτής που προκαλείται από ρίζες υπεροξυλίου. Ο μηχανισμός εικάζεται κυρίως ότι σχετίζεται με τη δημιουργία ριζών φαινοξυλίου. Ο αριθμός και η θέση της υδροξυλικής ομάδας στον δακτύλιο καθορίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονολών. Μια άλλη πτυχή της αύξησης της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος που σχετίζεται με το κρασί είναι η επίδραση των μη απορροφημένων πολυφαινολών που παραμένουν στο γαστρεντερικό σύστημα μετά την κατανάλωση κρασιού. Σε αυτή τη θέση, μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες, αποτρέποντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων και, ταυτόχρονα, εξοικονομώντας άλλα αντιοξειδωτικά αποτρέποντάς τα από την οξείδωση. **(73)** Υπό μελέτη βρίσκεται το αν τα οφέλη της κατανάλωσης κρασιού προκύπτουν από την αιθανόλη, τα μικροσυστατικά ή το άθροισμα των επιδράσεών τους. **(72)** Αρχικά, η αιθανόλη αυξάνει την δημιουργία ROS με έναν μηχανισμό που σχετίζεται με τον σίδηρο και την πρωτεΐνη CYP2E1 η οποία παράγει ROS κατά τη διάρκεια του καταλυτικού της κύκλου. Οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν ως εκκαθεριστές των ROS και ως αντιοξειδωτικά που διασπούν τις λιπιδικές αλυσίδες, δεσμεύοντας τις ακυλικές ρίζες (ROO) και χηλικά ιόντα μετάλλων. Η αιθανόλη δρα και προστατευτικά, αυξάνοντας την απόκριση των ουρικών στο πλάσμα. Τόσο η αιθανόλη όσο και οι πολυφαινόλες μπορούν να αυξήσουν τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), προστατεύοντας έτσι τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) από οξειδωτική βλάβη. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες μειώνουν την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GSH-Px). Αν και οι ανηγμένες μορφές των πολύφαινολών δρουν ως αντιοξειδωτικά, σε οξειδωμένη μορφή (ρίζες φαινοξυλίου) μπορούν παρουσιάζουν προοξειδωτικές ιδιότητες. Τέλος, το DNA και οι πολυφαινόλες μπορούν να

σχηματίσουν το τριαδικό σύμπλοκο DNA-πολυφαινόλη-Cu2+. Εκεί, μία αντίδραση οξειδοαναγωγής μπορεί να συμβεί, ανάγοντας τον χαλκό σε Cu+ , η επαναοξείδωση του οποίου δημιουργεί μία ποικιλία ROS. Ο τελευταίος έχει προταθεί ως αντικαρκινικός και αποπτωτικός μηχανισμός. **(71)**



Εικόνα 3.2: Μηχανισμοί αντίδρασης αιθανόλης και πολυφαινολών του οίνου με ROS και οξειδωτική βλάβη ***(71)***

3.3: Υποπροϊόντα

Η οινοποιητική διαδικασία καταλήγει στην δημιουργία μίας ποικιλίας υποπροϊόντων παράλληλα με την παραγωγής του κρασιού. Το είδος και η σύσταση τους εξαρτάται από τις εκάστοτε διαδικασίες οινοποίησης που έχουν χρησιμοποιηθεί. Τα κυριότερα υπο-προιόντα είναι τα στέμφυλα (grape pomace), τα τσάμπουρα των σταφυλιών, τα φύλλα της αμπέλου και τέλος οι οινολάσπες (wine lees). **(67)**

3.3.1: Στέμφυλα/grape pomace

Στέμφυλα ονομάζονται τα στερεά υπολείμματα, δηλαδή το μίγμα από τους φλοιούς και τα γίγαρτα, , που απομένουν μετά την έκθλιψη και πίεση των σταφυλιών προς παραλαβή του γλεύκους κατά την οινοποίηση. Αντιπροσωπεύουν περίπου το 20–30% του αρχικού βάρους των

σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για οινοποίηση ετησίως γεγονός που τα θέτει ως το βασικότερο υποπροϊόν της οινοποίησης. Έχει αναφερθεί ότι παράγεται 1 κιλό στέμφυλα για 6 λίτρα κρασί. Κατά την ερυθρά οινοποίηση τα στέμφυλα, εξαιρουμένων των βοστρύχων που διαχωρίζονται πριν την πίεση των σταφυλιών, συμμετέχουν στην ζύμωση του γλεύκους σε οίνο προκειμένου να εκχυλιστούν οι χρωστικές και άλλες ουσίες που επηρεάζουν θετικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου. **(67)** Έχει βρεθεί πως οι περισσότερες αρωματικές και φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στην φλούδα και τους σπόρους των σταφυλιών και όχι στον πολτό που δημιουργείται. **(76)** Με βάση το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, αρκετές μελέτες ανέφεραν υψηλή αντιοξειδωτική δράση αυτού του υποπροϊόντος, υποδηλώνοντας ότι το σταφύλι που προέρχεται από το οινοποιείο είναι μια ενδιαφέρουσα πηγή για φυσικά αντιοξειδωτικά. Το είδος των φαινολικών ουσιών τους ποικίλλει και θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω. **(67)**

3.3.2: Τσάμπουρα (Κοτσάνια/μίσχοι σταφυλιών)

Χαρακτηρίζονται από την στυφή γεύση που προσδίδουν και επομένως αντιμετωπίζονται ως πηγή στυπτικών ενώσεων. Ως αποτέλεσμα αυτού, συνήθως αφαιρούνται πριν από τα στάδια της οινοποίησης για να αποφευχθεί η υπερβολική στυπτικότητα ή αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Παρόλα αυτά, σε ορισμένα κρασιά αυτή η χαρακτηριστική στυφή γεύση που προσδίδουν είναι επιθυμητή, έως και απαραίτητη, στα οποία και προστίθενται. Η πλειονότητα των ενώσεων αυτών αντιπροσωπεύεται κυρίως από προανθοκυανιδίνες. Το φαινολικό τους περιεχόμενο αποτελεί το 5,8% του ξηρού τους βάρους και απαρτίζεται από φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες, υδροξυκινναμωμικά οξέα και στιλβένια. Η υπόλοιπη σύστασή τους αφορά κυρίως νερό (έως και 80%), φυτικές ίνες, κυρίως κυτταρίνης και λιγνίνης, αλλά και αξιοσημείωτες ποσότητες μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Τιμολογούνται αρκετά χαμηλά και αξιοποιούνται ως τροφή για ζώα ή για τροποποιήσεις του εδάφους. **(67, 77)**

3.3.3: Οινολάσπες/wine lees

Οινολάσπες ονομάζουμε κάθε είδος υπολείμματος που σχηματίζεται στον πυθμένα των δοχείων, δεξαμενών και βαρελιών, που τοποθετείται το κρασί τόσο μετά τη ζύμωση, όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης όπως επίσης και το υπόλειμμα που λαμβάνεται μετά τη διήθηση ή τη φυγοκέντρηση αυτού του προϊόντος. Οι οινολάσπες κατηγοριοποιούνται ανάλογα του μεγέθους τους και του σταδίου δημιουργίας τους. Αποτελούνται κυρίως από μικροοργανισμούς που προφανώς συμμετέχουν στην οινοποίηση, ζύμες κατά βάση. Τα υπόλοιπα συστατικά τους είναι

το τρυγικό οξύ, ανόργανες ύλες και φαινολικές ενώσεις. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του κρασιού καθώς προάγουν φαινολικές ενώσεις που σχετίζονται άμεσα με το χρώμα και άλλες οργανοληπτικές ιδιότητες. Έχουν συγκεκριμένη εφαρμογή πάνω στην παλαίωση του κρασιού καθώς το αναβαθμίζουν ποιοτικά, ελαττώνοντας την στυπτικότητα και την πικρία και βελτιώνοντας παράλληλα τη δομή και τη σταθερότητα του χρώματος του. Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση του υποπροϊόντος αυτού αποδίδεται κυρίως στο φαινολικό περιεχόμενό του. Οι φλαβονόλες βρίσκονται σε αφθονία αλλά και οι ανθοκυανίδες στις οινολάσπες του κόκκινου κρασιού. Επί προσθέτως, οι οινολάσπες έχουν την δυνατότητα να ελευθερώνουν ένζυμα τα οποία ευνοούν την υδρόλυση και τον μετασχηματισμό φαινολικών υποστρωμάτων σε φαινολικά με υψηλή προστιθέμενη αξία και ενδιαφέρον όπως για παράδειγμα το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ. **(67, 76, 78, 79)**

3.3.4: Φύλλα

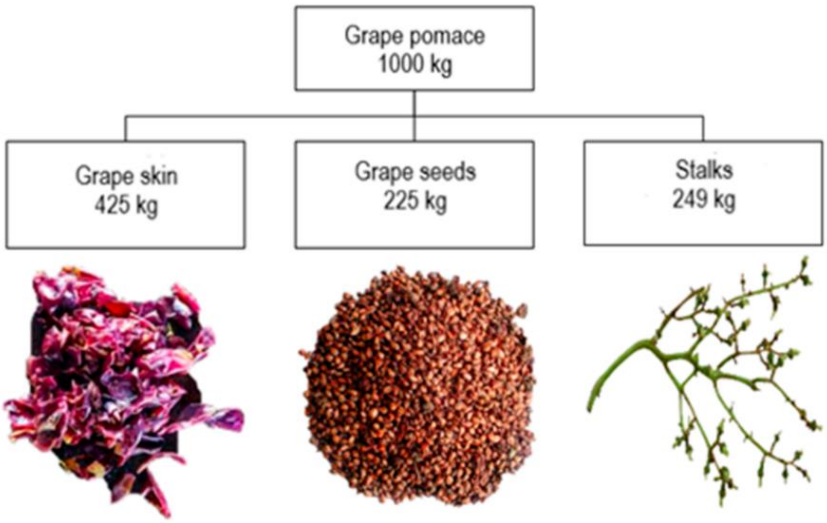
Αποτελούν το λιγότερο πολύτιμο και κατ' επέκταση ελάχιστα μελετημένο υποπροϊόν της οινοποιίας. Η χημική τους σύνθεση είναι πλούσια και ποικίλει, γεγονός που τα καθιστά μία πολλά υποσχόμενη πηγή ενώσεων με θρεπτικές ιδιότητες και βιολογικό δυναμικό. Εμπεριέχουν πληθώρα φαινολικών συστατικών, γεγονός που εν μέρει είναι εμφανές και από το χρώμα τους. Είναι η κύρια πηγή φλαβονών (κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών), αλλά μπορεί να περιέχουν και φαινολικά οξέα, προκυανιδίνες, ανθοκυανίνες και στιλβένια. Άλλα συστατικά τους είναι λιπίδια, σάκχαρα, ένζυμα, βιταμίνες, καροτενοειδή και τερπένια. Προς το παρόν, τα φύλλα της αμπέλου χρησιμοποιούνται στην παραγωγή συστατικών τροφίμων και ο χυμός τους έχει επίσης προταθεί προς χρήση ως αντισηπτικό για το πλύσιμο των ματιών. **(67, 76)**

3.4: Σύσταση στεμφύλων

Όπως προαναφέρθηκε, τα στέμφυλα συμπεριλαμβάνουν ένα μίγμα από τα γίγαρτα, τους φλοιούς, και τους βόστρυχους του σταφυλιού, των στερεών δηλαδή μερών του σταφυλιού. Το ποσοστό υγρασίας των στεμφύλων κυμαίνεται από 50% έως 72%, ανάλογα με την ποικιλία σταφυλιών και την κατάσταση ωρίμανσης. Οι κυριότερες ενώσεις που απαντώνται στα στέμφυλα είναι πεπτικές πολυμερείς ενώσεις των κυτταρικών τοιχωμάτων και αποτελούν το έως 54% των πολυσακχαριτών. Αμέσως μετά ακολουθεί η κυτταρίνη με ποσοστό από 27% έως 37% και η λιγνίνη με 17 έως 24%. Ακόμη, εμπεριέχονται σάκχαρα, πηκτίνες, οργανικά οξέα (όπως το τρυγικό), μέταλλα (όπως κάλιο), ένα μικρό ποσοστό πρωτεϊνών κάτω του 4% και φυσικά

απαντάται πληθώρα φαινολικών συστατικών που αποτελούν το 10-11% του ξηρού τους βάρους. Η σύσταση τους σε αυτές τις ενώσεις φαίνεται να εξαρτάται σημαντικά από την ποικιλία των σταφυλιών και το εκάστοτε μέρος των στέμφυλων (φλοίος, γίγαρτα). Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας είδαμε ότι η σύσταση στεμφύλων που προέρχονται από ερυθρές ποικιλίες κυμαίνεται ως εξής: Οι διαιτητικές ίνες βρέθηκαν σε συγκέντρωση 985,29 *mg/g* εκχυλίσματος και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο στα 981.10 *mg/g* εκχυλίσματος. Στην κατηγορία των λιπαρών οξέων σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύθηκε το λινελαϊκό (C18: 2n6) με 32,5 ± 0.075 g/100g λίπους, το λινολενικό (C18: 3n3) με 12.7 ± 0.005 g/100g λίπους και το παλμιτικό οξύ (C16: 0) με 28.7 ± 0.140 g/100g λίπους. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά ήταν 8,7*mg* γαλλικού οξέος/*g* υποπροϊόντος. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύθηκε η κατεχίνη με μέση τιμή 202.99 ± 6.96 μg/g στεμφύλων, η επικατεχίνη (84.81 ± 1.53 μg/g στεμφύλων) και η κερκετίνη (83.77 ± 3.54 μg/g στεμφύλων) ακολουθούμενες από το συριγγικό οξύ (15.25 ± 1.22 μg/g στεμφύλων), το βανιλικό οξύ (11.25 ± 0.42 μg/g στεμφύλων) και την τυροσόλη (14.70 ± 1.22 μg/g στεμφύλων).**(112)**

Ενώ τα επίπεδα των (πολυ)φαινολών στο σταφύλι είναι ιδιαιτέρως υψηλά, εκτιμάται ότι κατά την οινοποίηση εκχυλίζεται μόνο το 30–40% των ενώσεων αυτών, γεγονός που σημαίνει ότι πάνω από το μισό ποσοστό παραμένει στο υποπροϊόν αυτό. Οι κυριότερες είναι οι ανθοκυανίνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβονόλες, τα υδροξυκινναμωνικά οξέα, και οι ταννίνες. **(67, 80)**



Εικόνα 3.3: Παράδειγμα σύστασης στεμφύλων 1000 kg ***(77)***

Όσον αφορά τα επιμέρους συστατικά των στεμφύλων, έμφαση δίνεται στα γίγαρτα. Τα γίγαρτα αντιπροσωπεύουν το 8-20% του βάρους των σταφυλιών που συμμετέχουν στην διαδικασία της οινοποίησης καλύπτοντας από το 15% έως και το 52% του επί ξηρού βάρους των στεμφύλων. Η σύστασή τους είναι 40% φυτικές ίνες, 16% έλαια, 11% σε πρωτεΐνες, 7% αντιοξειδωτικά

φαινολικά συστατικά καθώς επίσης περιέχουν και άλλες ουσίες όπως σάκχαρα και ανόργανα άλατα. **(67, 81)** Η κυτταρίνη και οι πηκτίνες είναι τα κύρια συστατικά των σπόρων του σταφυλιού. Το έλαιο των σπόρων του σταφυλιού φημίζεται ότι περιέχει άφθονα αντιοξειδωτικά, καθώς και ουσίες που αυξάνουν την HDL και μειώνουν την LDL. Είναι πλούσιο σε πολύ- και μόνο-ακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως λινολεϊκό οξύ και ελαϊκό οξύ, καθώς επίσης περιέχει και ένα 10% κορεσμένων. Ακόμα, περιέχει βιταμίνη Ε, βιταμίνη C και β-καροτίνη. Υπάρχει μια πληροφορία ότι περιέχει ίσως και βιταμίνη D, χωρίς αυτό να έχει ακόμα επιβεβαιωθεί. Αποτελεί ένα προτιμώμενο καλλυντικό συστατικό για κατεστραμμένους και στρεσαρισμένους ιστούς, επειδή διαθέτει αναπλαστικές και αναδομητικές ιδιότητες που επιτρέπουν καλύτερο έλεγχο της ενυδάτωσης και προστασίας του δέρματος. **(77, 82)** Ιδιαίτερη προσοχή στην παγκόσμια βιβλιογραφία έχει δοθεί στο υψηλό φαινολικό περιεχόμενο των γιγάρτων. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, διότι ενώ αυτή φτάνει το 60 με 70%, κατά την έκθλιψη των σταφυλιών εξάγεται μόνο ένα μικρό μέρος αυτών των ενώσεων. Έχει συνδεθεί κατά καιρούς με αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, αντιλιπιδικές και αντιγηραντικές ιδιότητες, γεγονός το οποίο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών και τροφίμων ως κερδοφόρα πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα των σπόρων έχουν χρησιμοποιηθεί στον εμπλουτισμό κρεάτων, ώστε να προσθέσουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε αυτά, ενώ σε χώρες όπως η Ιαπωνία η χρήση τους βρίσκει εφαρμογή στην συντήρηση των τροφίμων. Ακόμα, έχουν αξιοποιηθεί και για την παρασκευή κρεμών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. **(83)** Η συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητα των γιγάρτων μπορεί να φτάσει μέχρι και το 14% επί ξηρού βάρους. Οι φαινόλες αυτές αφορούν κυρίως προανθοκυανιδίνες, φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη), παράγωγα υδροξυβενζοικών οξέων όπως το γαλλικό και το πρωτοκατεχικό οξύ και τα υδροξυκινναιμικά οξέα.

Έως και το 65% των στέμφυλων αποτελείται από τις φλούδες των σταφυλιών, οι οποίες είναι μία πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών, με τις ολικές εκχυλίσιμες πολυφαινόλες τους να κυμαίνονται από 28 μέχρι 35%. **(85)** Τα κύρια φαινολικά συστατικά που απαντώνται στις φλούδες είναι τα στιλβένια, κυρίως η ρεσβερατρόλη, οι ανθοκυανίνες με κύριο εκπρόσωπο τον 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης,, οι φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη), οι προκυανιδίνες, η κερκετίνη και τα φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κατά κόρων στις φλούδες των σταφυλιών ένω οι φλαβανόλες εντοπίζονται τόσο σε αυτές όσο και στα γίγαρτα σε παρόμοιες ποσότητες. Όσον αφορά τα φαινολικά οξέα, οι φλούδες αποτελούν βασική πηγή υδρόξυκινναμωνικών οξέων, με κύριους αντιπροσώπους το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και καφταρικό οξύ, των οποίων η πλειονότητα βρίσκεται εκεί. Η συνολική τους ποσότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται και το μέγεθος του σταφυλιού αλλά η συγκέντρωσή τους μειώνεται όσο το φρούτο ωριμάζει. Βρίσκονται εξίσου

και υδροξυβενζοϊκά οξέα όπως το πρωκατεχικό και το γαλλικό οξύ σε χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις από αυτές των σπόρων. **(86-88, 90)** Τα φαινολικά αυτά συστατικά εντοπίζονται στο εσωτερικό στρώμα της φλούδας και αποτελούν ουσίες είτε του κυτταρικού τοιχώματος, είτε ανιχνεύονται στα χυμοτόπια, είτε σχετίζονται με τον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. **(89)**

3.5: Αξιοποίηση Υποπροϊόντων

3.5.1: Βιολογικά πλεονεκτήματα έναντι οίνου

Η στροφή του ενδιαφέροντος στην αξιοποίηση των αντιοξειδωτικών δυνατοτήτων των υποπροϊόντων οινοποίησης αντί του κρασιού αυτού καθ' αυτού, οφείλεται αρχικά στην περιεκτικότητα του σε αλκοόλ. Η ύπαρξη της αιθανόλης ως το δεύτερο υψηλότερο σε συγκέντρωση συστατικό του κρασιού, αποτελεί ένα βασικό μειονέκτημά του το οποίο δεν μπορεί να μην συνυπολογισθεί. Οι επιπτώσεις του στην υγεία είναι ποικίλες και πολύπλοκες, πολλές φορές δε έρχονται σε αντίφαση με τις ευεργετικές του δράσεις. Ευρέως γνωστή είναι η νοσηρότητα και θνησιμότητα που επέρχεται από την υπερβολική χρήση αλκοόλ. Αντιθέτως, γεγονός αποτελεί πλέον η θετική επίδραση της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ με κυριότερη αυτή της επίτευξης χαμηλότερου κινδύνου στεφανιαίας νόσου. Ωστόσο, ακόμα και αυτού του βαθμού η κατανάλωση συνδέεται με την εμφάνιση κάποιων άλλων επιπτώσεων στην υγεία, γεγονός που θέτει τα συνιστώμενα όρια κατανάλωσης (1 ποτήρι για τις γυναίκες και 2 για τους άντρες, ημερησίως) ως τα πιο επιστημονικά ενδιαφέροντα και αμφιλεγόμενα. Παράλληλα, απαραίτητη τίθεται η εξατομίκευση των συστάσεων σχετικά με τη μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, έτσι ώστε αυτές να αντικατοπτρίζουν τις δυνητικά ανταγωνιστικές επιδράσεις του αλκοόλ σε πολλές χρόνιες ασθένειες. Συγκεκριμένα, η μέτρια κατανάλωση σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου καθώς επίσης είναι ικανή για αύξηση των επίπεδων στεροειδών ορμονών και πιθανή επιρροή του μεταβολισμό του φυλλικού οξέος, δύο μηχανισμοί που την συσχετίζουν με διάφορες μορφές καρκίνου, ιδιαίτερα του μαστού και του παχέος εντέρου. **(91)**

Επιπλέον, το φαινολικό περιεχόμενο του οίνου προέρχεται κυρίως από τη φλούδα και τα γίγαρτα του αμπελιού. Εκτιμάται, ωστόσο, ότι κατά την οινοποίηση εκχυλίζεται μόνο το 30–40% των φαινολικών ενώσεων του σταφυλιού. Αυτό αυτόματα αποδεικνύει ότι η ποσότητα των φαινολών που παραμένει στα εναπομείναντα υποπροϊόντα (στέμφυλα/τσάμπουρα/φύλλα) είναι μεγαλύτερη από αυτήν που περνάει στο κρασί. Όσον αφορά τις δημιουργούμενες οινολάσπες, ακόμα κι εκεί τα φαινολικά συστατικά φτάνουν την συγκέντρωση του 1g/L, σκορ που ξεπερνάει σίγουρα αυτή

του λευκού (0,19-0,29g/L) και στέκεται δίπλα στην υψηλότερη τιμή του κόκκινου κρασιού (0,9-2,5g/L). **(67, 92)**

3.5.2: Περιβαλλοντολογικά-Οικονομικά πλεονεκτήματα

Τα οινοποιεία αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες αγροτοβιομηχανικές δραστηριότητες παγκοσμίως, καθώς επίσης και έναν από τους κύριους τομείς που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή βιομηχανικών υποπροϊόντων και απορριμμάτων. **(93)** Περισσότεροι από 60 εκατομμύρια τόνοι σταφυλιού παράγονται ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα με το 75% περίπου της παραγωγής να προορίζεται για οινοποίηση θέτοντάς την μία δραστηριότητα υψηλού παγκόσμιου οικονομικού αντίκτυπου. **(67, 95)** Σύμφωνα με τη στατιστική έκθεση του 2019 για τον Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου, το κρασί που παρήχθη παγκοσμίως το 2018 ήταν 292 εκατομμύρια εκατόλιτρα, η υψηλότερη ποσότητα από το 2000. Η Ελλάδα κατέχει την 17^{η} θέση παγκοσμίως. **(94)** Ταυτοχρόνως, η διαδικασία της οινοποίησης οδηγεί σε πολύ μεγάλο όγκο υποπροϊόντων και κατ' επέκταση αποβλήτων, οπότε και το ενδιαφέρον για περαιτέρω διαχείριση και εκμετάλλευση αυτών με έναν τρόπο αποδοτικό αλλά ταυτοχρόνως και φιλικό προς το περιβάλλον αυξάνεται. **(96)** Τα υποπροϊόντα αυτά αφορούν οργανικά απόβλητα, εκπομπές αερίων και ανόργανα υπολείμματα. Τα οργανικά μέρη αποτελούνται από τα στέμφυλα, τα τσάμπουρα, τις οινολάσπες και τα φύλλα. Η παραγωγή των στεμφύλων παγκοσμίως φτάνει τους 10,5-13,1 εκατομμύρια τόνους ετησίως. **(97)** Επί του παρόντος, τα υποπροϊόντα της οινοποίησης είτε απορρίπτονται σε ανοιχτούς χώρους, προκαλώντας ενός βαθμού περιβαλλοντολογική επιβάρυνση, είτε οδηγούνται προς κομποστοποίηση. Παραδοσιακά, η κομποστοποίηση αποτελεί την πιο κοινή λύση διαχείρισης του παραγόμενου όγκου των στεμφύλων, με επακόλουθη την χρήση τους ως λιπάσματα στις αμπελοκαλλιέργειες. Βασίζεται στην διάσπαση οργανικών ενώσεων σε στοιχεία όπως ο άνθρακας και το άζωτο μέσω της αποικοδόμησης που επιφέρει το αερόβιο μικροβιακό φορτίο. Τα στέμφυλα και τα τσάμπουρα μπορούν να δημιουργήσουν υψηλής ποιότητας λίπασμα και αυτή αποτελεί και την πιο διαδεδομένη πορεία των συγκεκριμένων υποπροϊόντων σήμερα. Η χρήση λιπασμάτων που έχουν προέλθει από τέτοια συστατικά πλεονεκτεί συγκριτικά με το κοινό λίπασμα αυξάνοντας τα ποσοστά της οργανικής ύλης, τα επίπεδα των θρεπτικών ουσιών, τη μικροβιακή βιομάζα και βελτιώνοντας τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους. Παρόλα αυτά, έχει συσχετιστεί και με διάφορα περιβαλλοντολογικά προβλήματα που αφορούν την φυτοτοξικότητα του σε κάποιες καλλιέργειες, την εξάντληση του εδαφικού οξυγόνου, την ρύπανση των υπογείων υδάτινων πόρων και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. **(98-102)** Επί προσθέτως, χρήση στέμφυλων και ελαφρώς τροποποιημένων τσάμπουρων πραγματοποιείται και για την παρασκευή ζωοτροφών, εφαρμογή που μειονεκτεί ως προς την πέψη

τους από ορισμένα ζώα αλλά και οικονομικά, καθώς η εμπορεύσιμη αξία τους είναι πολύ μικρή. Με το πέρας της χώνευσης μπορούν και τότε ακόμα να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα ή/και βελτιωτικό εδάφους ή να υποστούν ξήρανση και καύση σε ειδικούς καυστήρες προς παραγωγή ενέργειας. Τα στέμφυλα συγκεκριμένα, ύστερα από θερμική επεξεργασία μπορούν να μετατραπούν σε προϊόντα υψηλής αξίας με δυνατότητα παραγωγής βιο-αιθανόλης. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αντικαταστήσουν τα ορυκτά καύσιμα αποφέροντας σημαντικά περιβαλλοντολογικά και οικονομικά οφέλη. **(77, 102-104)** Τέλος, αξιοποίηση των υποπροϊόντων του κρασιού επεκτείνεται και στην χρήση τους ως υποστρώματα για αντιδράσεις ζυμώσεων με τις οποίες μπορούν να παραχθούν ενώσεις όπως κιτρικό οξύ, αιθανόλη, μεθανόλη και ξανθίνη. **(84)**

Σε καθέναν εκ των παραπάνω τρόπων, πλήθος δυνητικά αξιοποιήσιμων συστατικών μεγάλης εμπορικής αξίας καταστρέφεται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγκαστική απομάκρυνση των πολυφαινολών πριν λάβει χώρα η διαδικασία της κομποστοποίησης λόγω των φυτοτοξικών και αντιμικροβιακών τους επιδράσεων. **(105)** Τα απόβλητα οινοποιίας μπορούν να δώσουν μεγάλες ευκαιρίες αξιοποίησης δεδομένης της χημικής δομής και των βιολογικών ιδιοτήτων τους. Η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα που χαρακτηρίζει τα υποπροϊόντα αυτά κρίνεται ιδιαιτέρως πολύτιμη και θέτει δυνατή την αξιοποίησή τους ως πηγή βιοενεργών φυτοχημικών συστατικών σε όχι μόνο αγροτικές χρήσεις, αλλά και σε βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. **(99, 100)** Υπάρχουν μεγάλα περιθώρια ανάπτυξης στον τομέα της αξιοποίησης από τις βιομηχανίες αυτές, με την οποία θα αναβαθμιστεί η συναλλαγματική αξία των υποπροϊόντων αυτών δημιουργώντας παράλληλα και έναν μικρότερο περιβαλλοντολογικό αντίκτυπο. **(107)** Στο πλαίσιο μίας πιο υπεύθυνης αντιμετώπισης ως προς την διαχείριση των εκπομπών ρύπων, της κατανάλωσης πόρων αλλά και ενέργειας, η επεξεργασία των υποπροϊόντων-απορριμμάτων ουσιαστικά της οινοποίησης κρίνεται επωφελής. Από οικονομικής άποψης, τα πλεονεκτήματα είναι πολλαπλά. Καθώς πρώτες ύλες υψηλής ποιότητας, όπως οι σπόροι και οι φλούδες σταφυλιού, εισάγονται στην αγορά, συμβάλλουν στην αύξηση των εισοδημάτων των οινοπαραγωγών. Η ορθολογική αξιοποίηση των υποπροϊόντων παρέχει τη δυνατότητα απόκτησης άλλων με αξιόλογη τιμή για έναν αριθμό βιομηχανιών. Αυτό με την σειρά του επιφέρει διατήρηση και αύξηση της βιωσιμότητας των χώρων εργασίας στον κλάδο αυτό. Επιπλέον, μειώνεται το κόστος διαχείρισης της οινοποίησης και της αμπελοκαλλιέργειας. Ακόμα, η σωστή διαχείριση των απορριμμάτων της οινοπαραγωγής δεν θα επέφερε μόνο προστασία του περιβάλλοντος και οικονομικά κέρδη, αλλά και μερική επίλυση του κοινωνικού προβλήματος της ανεργίας δημιουργώντας επιπλέον θέσεις εργασίας καθώς επέρχεται η ζήτηση απασχόλησης ειδικών στην αξιοποίηση αποβλήτων. **(105)** Στη συνέχεια θα αναφερθούν μερικές από τις δυνατές εφαρμογές.

Στην βιομηχανία των φαρμάκων και των καλλυντικών τα υποπροϊόντα της οινοποίησης χρησιμοποιούνται για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής και προϊόντων για το δέρμα και τα μαλλιά. Καλλυντικά τέτοιου είδους μπορούν να καταπολεμήσουν από έναν απλό ερεθισμό του δέρματος, μέχρι και αλλεργικές αντιδράσεις και δερματίτιδα, χάρη στην περιεκτικότητά τους σε φαινόλες. Έμφαση δίνεται στον τομέα της φωτοπροστασίας και της φωτογήρανσης, εφόσον οι φαινολικές ενώσεις εξουδετερώνουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου που παράγονται από της υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία. Η χρήση ενώσεων όπως οι προανθοκυανιδίνες, η κερκετίνη ή η ρεσβερατρόλη και μελατονίνη, προερχόμενες από το σταφύλι, είναι αρκετά διαδεδομένη. **(106)** Οι ανθοκυανίνες συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται ακόμα και για την παραγωγή φαρμάκων πρόληψης του καρκίνου, της εξασθένησης της μνήμης και των επιπλοκών που σχετίζονται με την ηλικία.**(105)** Επιπλέον, το έλαιο από τους σπόρους των σταφυλιών προωθεί την ενυδάτωση του δέρματος, την επούλωση των ηλιακών εγκαυμάτων και την αντιμετώπιση της ακμής κυρίως μέσω του λινολεϊκού οξέος που περιέχει. **(106)**

Στην βιομηχανία τροφίμων, τα υποπροϊόντα βρίσκουν εφαρμογή σε αρκετές διαφορετικές διαδικασίες. Αρχικά, να αναφερθεί ότι συνηθίζεται η απόσταξη των στεμφύλων προς παραλαβή αιθυλικής αλκοόλης με παραγόμενο προϊόν είτε το ελληνικό τσίπουρο (ή τσικουδία, ή ρακή) είτε την ιταλική grappa και άλλων αντίστοιχων προϊόντων σε όλες τις οινοπαραγωγικές χώρες.**(107)** Διαδεδομένη επίσης είναι η χρήση τους ως φυσικές χρωστικές σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων από λικέρ και αναψυκτικά έως παγωτά και επιδόρπια. Κύριες εκπρόσωποι είναι οι ανθοκυανιδίνες του κρασιού διότι χαρακτηρίζονται από την σταθερότητα και την ένταση της χρωστικής τους. **(96)** Αποτελούν μια φθηνή και προσιτή εναλλακτική λύση για την υποκατάσταση των συνθετικών χρωστικών τροφίμων. **(105)** Παράλληλα, οι πολύ χρήσιμοι σπόροι των στεμφύλων παράγουν ένα εξαιρετικά ευεργετικό έλαιο, το γιγαρτέλαιο, με εφαρμογές στην μαγειρική αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και αυτούσιοι ως συμπλήρωμα διατροφής ή πρόσθετο, λόγω της υψηλής τους φαινολικής σύστασης. Αντιστοίχως, τα φαινολικά συστατικά, όχι μόνο των γιγάρτων, αλλά γενικά των στεμφύλων, μπορούν να εμπλουτίζουν πληθώρα τρόφιμων όπως ψωμί, μπισκότα αλλά και γαλακτοκομικά προϊόντα. Τέλος, τα υποπροϊόντα της οινοποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά των συνθετικών αντιοξειδωτικών, και μάλιστα με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με αυτήν των απομονωμένων φαινολικών ενώσεων, πιθανόν εξαιτίας μίας συνεργιστικής δράσης των φαινολικών ενώσεων του σταφυλιού. Έτσι, μπορούν να λειτουργήσουν ως προστασία από τυχόν μη επιθυμητές οξειδωτικές διαδικασίες που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση των τροφίμων. Αυτή αποτελεί προτιμώμενη μέθοδο συντήρησης του κρέατος και των προϊόντων του. **(96, 106)**

3.6: Αντιοξειδωτική δράση

3.6.1: In vitro δεδομένα

Εκτενείς μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την αξιολόγηση των in vitro αντιοξειδωτικών δράσεων των υποπροϊόντων οινοποίησης. Οι ιδιότητες αυτές εξετάζονται κυρίως ως προς την ικανότητα των υποπροϊόντων να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες ή να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, τα οποία υπό άλλες συνθήκες θα συμμετείχαν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Οι μελέτες που επιλέχθηκαν να αναφερθούν εξετάζουν το σύνολο των υποπροϊόντων της οινοποίησης, μεμονωμένα και μη, τόσο λευκών όσο και ερυθρών ποικιλιών. Οι δοκιμασίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι : ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2 διφαίνυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο), FRAP (Ικανότητα αναγωγής τρισθενούς σιδήρου), CUPRAC (Ικανότητα αναγωγής χαλκού), ORAC (Ικανότητα απορρόφησης ριζών υδροξυλίου), TBARS (Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ), TEAC (Ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox) κ.α.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει 16 μελέτες **(108-123)**. Πέντε εκ των μελετών **(108-112)** αφορούν τα στέμφυλα μεμονωμένα, εφόσον σε αυτά επικεντρώνεται και η παρούσα μελέτη. Ακολουθεί μία μελέτη για τα γίγαρτα **(113)**, μία για τα τσάμπουρα **(114),** μία για τις οινολάσπες **(115)** και μία με τον συνδυασμό του καθενός εκ των παραπάνω με στέμφυλα **(116-118)**. Μία μελέτη αφορά μόνο φλοιούς και γίγαρτα, τα στερεά δηλαδή μέρη των στεμφύλων **(119)**. Τέλος, αναφέρονται δύο μελέτες που εξετάζουν το τρίπτυχο στέμφυλα/φλοιός/γίγαρτα **(120-121)** και ακόμα δύο που με την συνεργεστική δράση στέμφυλων, φλοιού, γιγάρτων και τσάμπουρων **(122-123).** Συγκεντρωτικά, τα στέμφυλα εξετάστηκαν στην πλειονότητα (12 μελέτες), τα γίγαρτα σε 7, ο φλοιός σε 5, τα τσάμπουρα σε 4 ενώ οι οινολάσπες σε 2 εκ των αναφερομένων μελετών. Οι μελέτες όπως φαίνεται ερευνούν μεμονωμένα αλλά και συνδυαστικά τα υποπροϊόντα, ενώ η αντιοξειδωτική τους δράση μπορεί να συγκριθεί μόνο στις μελέτες που είναι συνδυαστικές.

Όπως είναι εμφανές, όλα τα υποπροϊόντα παρουσιάζουν κάποια αντιοξειδωτική ικανότητα, ωστόσο η σύγκριση μεταξύ των μελετών μπορεί να είναι μόνο ποιοτική εξαιτίας της μεγάλης ανομοιογένειας τους σε επίπεδο μονάδων μέτρησης, πρωτοκόλλων, ακόμα και μεθόδων προσδιορισμού.

Εστιάζοντας στα **στέμφυλα**, φαίνεται πως παρουσιάζουν καλή αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών, δέσμευσης χηλικών ιόντων μετάλλων αλλά και μείωσης του χρόνου οξείδωσης των λιποειδών. Επιπλέον, στις δύο μελέτες που αξιολογούνται στέμφυλα, φλοιός , γίγαρτα και τσάμπουρα μαζί **(122, 123)** εφόσον έχουμε να κάνουμε με ίδιες παραμέτρους

και η σύγκριση είναι εφικτή, διακρίνουμε μία υπεροχή στο αντιοξειδωτικό δυναμικό των γιγάρτων γεγονός το οποίο όμως δεν επιβεβαιώνεται σε κάθε μελέτη και με οποιοδήποτε μέθοδο. Από την άλλη πλευρά, στις έρευνες **120** και **121** με στέμφυλα, φλοιό και γίγαρτα υπό μελέτη, ο φλοιός φαίνεται να δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τα άλλα δύο υποπροϊόντα.

Πίνακας 3.1: In vitro μελέτες αντιοξειδωτικής ικανότητας υποπροϊόντων οινοποίησης

Παραπομπή	Είδος υποπροϊόντος	Δοκιμασία μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας	Αποτελέσματα		
108	Στέμφυλα	DPPH - EC50 (mg/ml εκχ.) ABTS - EC50 (mg/ml εκχ.) Ικανότητα δέσμευσης χηλικών ιόντων σιδήρου (mg/ml εκχ.)	5,05-6,54 0,71-1,34 44,84-72,98		
109	Στέμφυλα	DPPH - IC50 (ng/ml εκχ.) TEAC (mM TE/g DW)	372 6,79		
110	Στέμφυλα	ORAC (μmol TE/g DW) FRAP (μmol FeSE/g DW) ABTS (μmol TE/g DW)	167,1 3220 1014		
111	Στέμφυλα		Στέμφυλα (σε αιθανόλη)	Στέμφυλα (σε μεθανόλη)	
		FRAP (μm TE/100ml) DPPH (IC50) (μg/ml)	<1688,51 20.39-44,04	<1164,22 91,142-115,78	
112	Στέμφυλα	DPPH - EC50 (μg εκχ/ ml) Ικανότητα Αναστολής Οξείδωσης ορού από Cu2+ (% αύξηση lagtime/μg)	15,8 – 1074,9 45,9 – 365,7		
113	Γίγαρτα	FRAP (μM TEAC/g) DPPH (μg/ml) ABTS (μg/ml)	534 56 121		
114	Τσάμπουρα	ABTS (mg TE/g DW) CUPRAC (mg TE/g DW) FRAP (mg TE/g DW) ORAC (mg TE/g DW)	99,7-253,2 145,4-378,6 65,4-170,1 101,9-282,1		
115	Οινολάσπες	ORAC (μmol TE/g DE) HORAC (μmol CAE/g DE) HOSC (μmol TE/g DE) FRAP (μmol TE/g DE)	217-2771 348-4690 281-4527 362-2197		
116	Στέμφυλα /Γίγαρτα		Στέμφυλα	Γίγαρτα	
		TEAC TBARS [IW50 (μg)]	10-42 232-751	45-140 71-430	
117	Στέμφυλα /Τσάμπουρα		Στέμφυλα	Τσάμπουρα	
		TEAC DPPH (μmol TE/g DW) ABTS (μmol TE/g DW) ORAC (μmol TE/g DW) O_2^- (EC50, mg/ml) HOCl (EC50, mg/ml)	68-666 191-540 218-653 739-2796 0,19-2,16 0,017-0,128	179-1528 473-1086 805-2419 2191-3718 0,17-0,28 0,021-0,042	
118	Στέμφυλα /Οινολάσπες		Στέμφυλα	Οινολάσπες	
		Εκκαθάριση OH-(%) Εκκαθάριση O2- (%) Εκκαθάριση ROO• (%)	61 80 75	59 41 67	
119	Φλοιός/Γίγαρτα		Φλοιός	Γίγαρτα	
		FRAP (mM FeSO4) DPPH - IC50 (μg/g εκχ.) LDL - IC50 (μg/g εκχ.) Ενδογενείς ROS - IC75 (μg/g εκχ.)	32,3-144,3 55,7-274,2 31,6-55,7 50- >100	111,4-150 6,7-18,1 2,11-6 4,6-11,3	
120	Στέμφυλα/Φλοιός /Γίγαρτα		Στέμφυλα	Φλοιός	Γίγαρτα
		Rancimat (χρόνος οξείδωσης λίπους και εκχυλίσματος/χρόνος οξείδωσης λίπους)	1,06-1,08	1,08-1,14	1,02-1,05

121	Στέμφυλα/Φλοιός /Γίγαρτα	DPPH - EC50 (μg/ml εκχ.) Αναγωγική δύναμη PR - EC50(μg/ml εκχ.) Αναστολή αποχρωματισμού β-καροτενίου EC50 (μg/ml εκχ.) TBARS - EC50 (μg/ml εκχ.)	123 262 362 97	563 488 782 629		23 110 208 49,6
			Στέμφυλα	Φλοιός	Γίγαρτα	Τσάμπουρα
122	Στέμφυλα/Φλοιός /Γίγαρτα/Τσάμπουρα	DPPH (mM TE/g DW) Αναγωγική δύναμη PR (mM AAE/g DW) Εκκαθάριση ελεύθερου H (mM QTE/g DW)	2,22-2,30 2,71-3,53 1,53-2,57	1,74-3,06 0,5-1,74 0,48-1,48	5,94 7,44-7,58 1,44-2,97	3,17 3,86 1,42
123	Στέμφυλα/Φλοιός /Γίγαρτα/Τσάμπουρα	DPPH (μmol TE/g εκχ.) ORAC (μmol TE/g εκχ.)	400-1300 1600-3022	100-1250 1400-3384	1400-3000 2715-4048	250-900 1052-2311

3.6.2: Κλινικές μελέτες

Εν αντιθέσει με τα in Vitro, οι κλινικές μελέτες νο δεδομένα περί της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υποπροϊόντων οινοποίησης είναι περιορισμένες. Μέχρι σήμερα, λίγες μόνο κλινικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί. Στον Πίνακα παρουσιάζονται έντεκα κλινικές δοκιμές **(124-134)**. Οι επτά από αυτές χρησιμοποίησαν γίγαρτα **(124-129, 132)** και οι υπόλοιπες **τέσσερις στέμφυλα (130, 131, 133, 134)** ως υπό μελέτη υποπροϊόν. Η αντιοξειδωτική ικανότητα αξιολογήθηκε με μεθόδους όπως η ικανότητα αύξησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TRAP), η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μορίων ή/και ενζύμων (SOD, GSH-Px, GR, α-, γ- τοκοφερόλη, Βιταμίνης C κ.α), η μείωση δεικτών οξειδωτικής βλάβης (TBARS, DPPH, AOPP, MDA κ.α.) καθώς και την ικανότητα εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών. Σημαντικό είναι να αναφερθεί το μέγεθος της ανομοιογένειας μεταξύ των παρεμβάσεων η οποία καθιστά μη δυνατή τη σύγκριση τους. Κάθε ερευνητική ομάδα χρησιμοποιεί σκευάσματα διαφορετικού είδους ή/και προέλευσης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυφαινολικών συστατικών, με διαφορετικούς πληθυσμούς αναφοράς για διαφορετικά χρονικά διαστήματα παρέμβασης.

Δύο μόνο εκ των έντεκα μελετών είναι **μεταγευματικές (124, 134)**, κατά τις οποίες δόθηκε το συμπλήρωμα μαζί με κάποιο γεύμα. Στη μελέτη **132** εξετάστηκε η επίδρασή μετά το διάστημα των 24 ωρών. Οι υπόλοιπες οκτώ αφορούν μακροπρόθεσμες παρεμβάσεις. Εστιάζοντας στις δύο μεταγευματικές μελέτες, στη μία **(124)** ενώ έχει αυξηθεί το οξειδωτικό στρες στην ομάδα αναφοράς (↑ LPO και ↓ GSH), βρέθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (↑ TRAP, Ασκορβικό οξύ, σουλφυδρυλομάδες) και μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων(↓ LPO) στην ομάδα παρέμβασης. Το δείγμα αφορούσε οκτώ υγιείς άνδρες που τους χορηγήθηκε συμπλήρωμα εκχυλίσματος γιγάρτων 300mg πολυφαινολών σε συνδυασμό με πλούσιο ενεργειακά γεύμα. Αντιθέτως, στη μελέτη **134**, όπου συμμετείχαν 20 εθελοντές ηλικίας 40-60 ετών με κεντρική παχυσαρκία στους οποίους δόθηκε συμπλήρωμα από στέμφυλα σταφυλιών αλλά και ροδιού (10γρ. συμπληρώματος - 1,8γρ. πολυφαινολών) δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά σε δείκτες οξειδωτικού στρες ή αντιοξειδωτικής ικανότητας. Το σύνολο των υπολοίπων μελετών έδειξαν είτε

μία αύξηση της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών μορίων/ενζύμων είτε μία μείωση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης χωρίς όμως να είναι πάντα σημαντικές. Αναφορικά του ενζύμου **δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD),** η μελέτη **131** έδειξε μία αύξηση της δραστηριότητάς της τόσο με τα 685 mg όσο και με τα 342,5 mg εκχυλίσματος στεμφύλων την ημέρα.

Συμπερασματικά, τα υπάρχοντα δεδομένα δεν επαρκούν για να διαπιστώσουμε με βεβαιότητα τις δυνητικές αντιοξειδωτικές επιδράσεις των υποπροϊόντων οινοποίησης, καθώς πολύ μικρός αριθμός κλινικών δοκιμών έχει διεξαχθεί με μόλις δύο να από αυτές να είναι μεταγευματικές.

Πίνακας 3.2: Κλινικές μελέτες αντιοξειδωτικής ικανότητας υποπροϊόντων οινοποίησης

Παραπομπή	Είδος υποπροϊόντος	Πειραματική διαδικασία	Αντιοξειδωτική διαδικασία	Αποτελέσματα
124	Εκχύλισμα από γίγαρτα	- Διασταυρούμενη, ελεγχόμενη - 8 υγιείς άνδρες 25-40 ετών - Γεύμα με Placebo ή συμπλήρωμα 300mg πολυφαινολών - Washout 2 εβδομάδων	- LPO, TRAP - Τοκοφερόλη, Ασκορβικό οξύ - Ουρικό οξύ - GSH, Σουλφυδρυλομάδες	Control: ↑ LPO (1 ώρα) ↓ GSH Παρέμβαση: ↓ LPO (1 ώρα) ↑ TRAP, Ασκορβικό οξύ (στη 1 ώρα), σουλφυδρυλομάδες
125	Εκχύλισμα από γίγαρτα	- Τυχαιοποιημενή, διπλά-τυφλή, διασταυρούμενη, ελεγχόμενη - 24 υγιείς άνδρες καπνιστές, 50-63 ετών - Placebo vs εκχύλισμα - Παρέμβαση 4 εβδομάδων, 2 κάψουλες/ ημέρα προκυανιδίνης - Washout 3 εβδομάδων	- Μέτρηση λιπιδαιμικού προφίλ - Τοκοφερόλης - HPLC - FRAP (μmol Fe2+) - FPLP - TBARS	- ↓TBARS - Όχι σημαντικές διαφορές σε FRAP - Όχι σημαντική αλλαγή σε λιπιδαιμικό προφίλ και τοκοφερόλη
126	Εκχύλισμα από γίγαρτα	- Τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη, μονά τυφλή με σύγκριση παράλληλων ομάδων - 61 ενήλικες 30-70ετών με LDL:100-180mg/dL, - Παρέμβαση 12 εβδομάδων - 3 ομάδες: placebo ή 200mg ή 400mg προανθοκυανιδίνης καθημερινά	- Μέθοδος EIA (MDA-LDL)	↓ στην MDA-LDL
127	Εκχύλισμα από γίγαρτα	- Τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη, διπλά τυφλή - 32 εθελοντές 18-70 ετών με Σ.Δ. ΙΙ και αυξημένο κίνδυνο για CVD - Παρέμβαση 4 εβδομάδων, 600 mg/ημέρα εμπορικού σκευάσματος σπόρων vs placebo - Washout 2 εβδομάδων	- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAOS) [μm AEAC)] - GSH/GSSG	Μη σημαντικά αποτελέσματα για TAOS και GSH/GSSG
128	Εκχύλισμα από γίγαρτα	- Τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, διασταυρούμενη, ελεγχόμενη - 50 ενήλικες 18-65 ετών με ≥1 παράγοντα κινδύνου για CVD - Παρέμβαση 4 εβδομάδων - Εμπορικό σκεύασμα 1300 mg/ημέρα (σε 2 κάωουλες) vs placebo - Washout 4 εβδομάδων	- Δείκτες Οξειδωτικής Βλάβης MDA (μM) - Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα TAC (mM UAE)	Καμία σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην λιποειδική υπεροξείδωση

129	Εκχύλισμα από γίγαρτα	- Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, παράλληλα, ελεγχόμενη - 28 άνδρες 30-60 ετών, καπνιστές - Παρέμβαση 8 εβδομάδων, 200 mg ημερησίως εμπορικού σκευάσματος Μονο- & Ολιγο- μερείς φλαβονόλες ή Placebo - Μετρήσεις στην αρχή, στις 4 και 8 εβδομάδες	-Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TEAC) -Αντιοξειδωτικά ένζυμα, GSH/GSSG ερυθροκυττάρων -Δείκτης υπεροξείδωσης λιποειδών 8-iso-PGF2α πλάσματος - Έκφραση γονιδίων για αντιοξειδωτικά ένζυμα	- Μη στατιστικά σημαντική διαφορά σε 8-iso-PGF2a και TEAC - Μη σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα - Αύξηση GSH/GSSG σε ερυθροκύτταρα 8 εβδομάδες μετά
130	Στέμφυλα (αλεύρι)	- Τυχαιοποιημένη, παράλληλη, ελεγχόμενη - 38 άνδρες 30-65 ετών με ≥ 1 παράγοντα Μεταβολικού Συνδρόμου - Παρέμβαση 16 εβδομάδων, 20γρ. αλευριού από στέμφυλα (822mg πολυφαινολών)	- α-, β-, γ- και δ- τοκοφερόλη (mM) - Μέτρηση βιταμίνης C - TRAP (μM Trolox Equivalent) - DPPH (μM Trolox Equivalent) - Μέτρηση ομάδων καρβονυλίου	- ↑ γ- και δ- τοκοφερόλης πλάσματος - ↓ ομάδων καρβονυλίου πλάσματος
131	Στέμφυλα (+ φρούτο omija)	- Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, παράλληλη, ελεγχόμενη - 76 εθελοντές 30-70 ετών με ΔΜΣ ≥ 23 kg/m2 - Παρέμβαση 10 εβδομάδων I. Placebo II. Συμπλήρωμα εκχυλίσματος στεμφύλων 342,5 mg και 57,5 mg από το φρούτο omija ανά ημέρα III. 685 mg και 115 mg ανά ημέρα αντίστοιχα	- SOD (unit/mg Hb) - CAT (μmol/min/mg Hb) - GSH-Px (nmol/min/mg Hb) - GR (nmol/min/mg Hb) - TBARS (μmol/g Hb) - H_2O_2 (mmol/mg Hb)	Στα 342,5 mg/ημέρα (II) : - ↑**SOD**, GR - ↓ TBARS Στα 685 mg/ημέρα (III) : - ↑ **SOD**, GR, GSH-Px - ↓ Ολική χοληστερόλη, LDL, μη-HDL, Lp(a), IL1, TNF-α, TBARS, H_2O_2
132	Εκχύλισμα από γίγαρτα (σε σχέση με Vit.C)	- Τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη - 87ασθενείς με προγραμματισμένο bypass I. Control II. Εκχύλισμα GSE (100 mg/6 ώρες) 24 ώρες πριν το χειρουργείο III. Συμπλήρωμα βιταμίνης C (25 mg/kg) κατά τη διάρκεια της επέμβασης μέσω αντλίας κυκλοφορίας - Τα δείγματα λήφθηκαν σε 3 χρόνους: T1: Προ ισχαιμίας, T2: Ισχαιμία T3: 10 λεπτά μετά την επανέγχυση	- Αντιοξειδωτικά ένζυμα: SOD και GPx (units/g Hgb) - Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα TAC (mmol/L) - Δείκτης οξειδωσης λιποειδών MDA (nmol/ml)	-SOD, GPX: Μη στατιστικά σημαντικές μεταβολές -TAC: ↑ στις ομάδες II και III σε T2 και T3 ↓στο Control σε σχέση με T1 -MDA: ↓ στην II σε σχέση με control σε T3 ↓ στην III σε σχέση με control σε T1
133	Στέμφυλα (τρόφιμο με αλεύρι στεμφύλων)	- Διασταυρούμενη, ελεγχόμενη - 27 άντρες 25-65 ετών με ≥ 1 παράγοντα Μεταβολικού Συνδρόμου - Παρέμβαση 4 εβδομάδων, κατανάλωση 100 γρ μοσχ. μπιφτεκιού με 7% προσθήκη WGPF/ημέρα (1.2 mg GE/g πολυφαινολών) και Placebo (μη-ενισχυμένο μπιφτέκι) - Washout 4 εβδομάδων	-DPPH -βιταμίνη E, βιταμίνη C -Δείκτες οξειδωτικής βλάβης AOPPs, oxLDL, MDA	- Σημαντική ↓ AOPP και OxLDL - ↓ Ουρικού οξέος, DPPH - ↑ βιτ. C
134	Στέμφυλα (σταφύλι + Ρόδι)	- Μη τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη, ελεγχόμενη - 20 άτομα 40-60 ετών με κεντρική παχυσαρκία I. OGTT Control II. OGTT + 10 g. συμπλ/τος III. 10 g. συμπλ/τος + OGTT σε 10 ώρες Συμπλήρωμα 1,8γρ. πολυφαινολών (1,4g μη εκχυλίσιμων (NEEP) & 0,4 g εκχυλίσιμων (EPP))	Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ούρα και πλάσμα με - FRAP - ABTS	Μη σημαντικές διαφορές σε FRAP, ABTS και στα επίπεδα ουρικού οξέος σε πλάσμα /ούρα

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ

Τα υποπροϊόντα οινοποίησης αποτελούν μια εναλλακτική για την πρόσληψη των ευεργετικών βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στο κρασί χωρίς την επιβλαβή δράση της αιθανόλης. Σκοπός της κλινικής μελέτης αυτής είναι να διερευνήσει την in vivo δράση εκχυλίσματος στεμφύλων σε φαινομενικά υγιείς γυναίκες. Στην παρούσα πτυχιακή θα παρουσιαστεί η μεταγευματική επίδρασή του στην δραστικότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1: Πρωτόκολλο μεταγευματικής μελέτης

5.1.1: Χαρακτηριστικά εθελοντών

Οι εθελοντές της μελέτης αυτής είναι φαινομενικά υγιείς γυναίκες ηλικίας 25 έως 32 ετών, με Δείκτη Μάζας Σώματος 20 έως 32 kg/m^2. Οι εθελόντριες έπρεπε να μην έχουν λάβει κάποια φαρμακευτική αγωγή για τουλάχιστον 2 εβδομάδες προ της αιμοληψίας, ενώ για 3 ημέρες πριν, έπρεπε να περιορίσουν την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φαινολικά συστατικά όπως φρούτα, λαχανικά, τσάι, καφέ, κόκκινο κρασί, ενεργειακά ποτά κ.α. Παράλληλα, πραγματοποίησαν 3ήμερη καταγραφή διαιτητικής πρόσληψης για αυτές τις 3 ημέρες πριν την αιμοληψία.

5.1.2: Πειραματικό πρωτόκολλο

Την ημέρα της αιμοληψίας η άφιξη των εθελοντών γίνεται στο χώρο της Μονάδας Μεταβολισμού του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να είναι νηστικές για τουλάχιστον 8 ώρες πριν την αιμοληψία και να προσκομίσουν δείγμα πρωινών ούρων σε ουροσυλλέκτη. Αρχικά, λαμβάνει χώρα μέτρηση και καταγραφή των ανθρωπομετρικών τους χαρακτηριστικών τα οποία είναι:

- Βάρος:
  Η ζύγιση γίνεται χωρίς παπούτσια, καταγραφή στο πλησιέστερο 0,1Kg
- Ύψος:
  Η μέτρηση πραγματοποιείται στο αναστημόμετρο χωρίς παπούτσια επίσης, με καταγραφή στο πλησιέστερο 0,1cm. Το άτομο στέκεται ίσια με το κεφάλι να τοποθετείται παράλληλα με το έδαφος. Οι πτέρνες πρέπει να είναι ενωμένες, τα γόνατα ευθεία, οι ώμοι χαλαροί, οι παλάμες να "βλέπουν" προς τους μηρούς και το κεφάλι, οι γλουτοί και η ωμοπλάτη να εφάπτονται με την κάθετη επιφάνεια του αναστημόμετρου (ή του τοίχου).
- Περιφέρεια μέσης:
  Η μέτρηση έγινε με μεζούρα στο σημείο της μικρότερης δυνατής περιφέρειας
- Περιφέρεια ισχύων:
  Η μέτρηση έγινε με μεζούρα, καταγραφή μεγαλύτερης δυνατής περιφέρειας
- Αρτηριακή Πίεση:
  Η μέτρηση έγινε με ψηφιακό πιεσόμετρο μπράτσου

Στη συνέχεια τοποθετείται στις εθελόντριες ο φλεβοκαθετήρας και 10min αργότερα, λαμβάνεται το πρώτο δείγμα αίματος, το αίμα νηστείας. Αμέσως μετά, ακολουθεί η κατανάλωση του προκαθορισμένου γεύματος υψηλής περιεκτικότητας λίπους (5.1.3) με την ταυτόχρονη λήψη 6 καψουλών οι οποίες είτε ήταν placebo, είτε περιείχαν το εκχύλισμα στέμφυλων. Για κάθε εθελόντρια η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές, σε απόσταση τουλάχιστον ενός μήνα, ώστε την μια φορά να της χορηγηθούν οι κάψουλες με το εκχύλισμα των στέμφυλων και την άλλη οι κάψουλες placebo. Η σειρά με την οποία έγινε η λήψη των καψουλών είναι τυχαία και τυφλή, τόσο ως προς τις εθελόντριες, όσο και προς τους ερευνητές. Οι εθελόντριες έχουν στη διάθεση τους 15 λεπτά για τη λήψη του γεύματος και των καψουλών και αμέσως μετά, λαμβάνεται δείγμα αίματος. Ακολουθούν αιμοληψίες για τις επόμενες 6 ώρες ανά μισή ώρα. Μετά το χρονικό διάστημα των 4 ωρών και μέχρι το πέρας των 6 ωρών ακολουθούν άλλες δύο αιμοληψίες ανά μία ώρα. Επιπλέον, λαμβάνονται δείγματα ούρων κατά τις χρονικές στιγμές των 60, 120 και 240 λεπτών και τελικά μετράται ο συνολικός όγκος ούρων της εθελόντριας μέσα στο χρονικό διάστημα 6ώρου των αιμοληψιών. Συγκεκριμένα, οι χρόνοι είναι οι εξής:

- Π (πριν το γεύμα)
- 0 (αμέσως μετά το γεύμα) + *ούρα (πρωινά)*
- 30 min
- 60 min + ούρα
- 90 min
- 120 min + *ούρα*
- 150 min
- 180 min
- 210 min
- 240 min + *ούρα*
- 300 min
- 360 min

Επιπροσθέτως, κάποια στιγμή μεταξύ των αιμοληψιών οι εθελόντριες συμπληρώνουν ένα Ερωτηματολόγιο Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων (FFQ) καθώς και ένα Ερωτηματολόγιο καταγραφής Φυσικής Δραστηριότητας.

5.1.3: Χαρακτηριστικά γεύματος

Το γεύμα που δόθηκε στις εθελόντριες αποτελούταν από δύο τοστ, διαφορετικού είδους το κάθε ένα. Κοινό τους χαρακτηριστικό η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος. Η κατανάλωση τους έγινε μέσα σε 15 λεπτά με την συνοδεία ενός ποτηριού (250 ml) νερού. Ακολουθούν δύο πίνακες (5.1, 5.2) διατροφικής ανάλυσης, ένας για κάθε τοστ. Στην συνέχεια, στον Πίνακα 5.3., παρουσιάζεται

η ανάλυση του συνολικού γεύματος. Κάθε εθελόντρια κατανάλωσε συνολικά 1131θερμίδες εκ των οποίων το 19,7 % προερχόταν από τους υδατάνθρακες (222,4 kcal), το 11,2% από την πρωτεΐνη (126,7 kcal) και το 66,7 % από το λίπος (754 kcal).

Πίνακας 5.1: ΤΟΣΤ 1. Διατροφική ανάλυση

ΤΟΣΤ 1 (υλικά)	γραμμ.	Ποσότητα γεύματος	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γραμμ.)	Πρωτεΐνη (γραμμ.)	Λίπος (γραμμ.)
Ψωμί σταρένιο ΔΕΚΑ Καραμολέγκος	27,5	55	170	26,8	4,6	4,6
Μανούρι Θεσσαλίας	28	28	153	0,39	2,07	13,38
Σαλάμι αέρος ΝΙΚΑΣ	9	18	76	0,2	3,6	6,8
Βούτυρο Όλυμπος Soft	10	20	146	0,1	0,2	16
Σύνολο			**545**	27	10	41
Θερμίδες/ομάδα				109,96	41,88	367,02
%ομάδας				**20,2**	**7,7**	**67,3**

Πίνακας 5.2: ΤΟΣΤ 2. Διατροφική ανάλυση

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

Πίνακας 5.3: Συνολικό γεύμα

Συνολικό γεύμα	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γραμμ.)	Πρωτεΐνη (γραμμ.)	Λίπος (γραμμ.)
2 ΤΟΣΤ	**1131**	56	32	84
Θερμίδες/ομάδα		222,4	126,7	754
%ομάδας		**19,7**	**11,2**	**66,7**

5.1.4: Πρωτόκολλο αιμοληψίας

Η αιμοληψία πραγματοποιείται με την τοποθέτηση φλεβοκαθετήρα, στην κατάσταση νηστείας πριν την κατανάλωση του γεύματος (Π). Τότε πραγματοποιείται και η πρώτη αιμοληψία και ακολουθούν και οι υπόλοιπες στις χρονικές στιγμές που προαναφέρθηκαν (0-360). Συμπερασματικά, κάθε μία εκ των δύο φορών, λαμβάνεται αίμα σε 12 χρονικές στιγμές, συνολικής ποσότητας 240,5 ml. Το αίμα στην συνέχεια μεταφέρεται στο εργαστήριο σε διαφορετικά Vacutainers ή γυάλινη φιάλη, και ακολουθούνται διαφορετικές αναλύσεις όπως: απομόνωση PAF, η απομόνωση ορού (S), η απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP), η απομόνωση πλάσματος πλούσιο σε λευκοκύτταρα (LRP) και η απομόνωση πλάσματος (P). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι χρόνοι αιμοληψίας, η ποσότητα αίματος που λαμβάνεται και ο λόγος που θα αξιοποιηθεί.

Πίνακας 5.4: Χρονική στιγμή αιμοληψίας, δείγμα και ποσότητα

Π	**0**	**30**	**60**	**90**	**120**	**150**	**180**	**210**	**240**	**300**	**360**
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
LRP			LRP		LRP		LRP	LRP	LRP	LRP	LRP
PRP		PRP		PRP		PRP		PRP		PRP	
PAF			PAF		PAF		PAF		PAF		PAF
ml	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**	**ml**
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
4			4		4		4	4	4	4	4
13,5		13,5		13,5		13,5		13,5		13,5	
5			5		5		5		5		5
30,7	**8**	**21,5**	**17**	**21,5**	**17**	**21,5**	**17**	**24,5**	**17**	**24,5**	**17**

5.1.5: Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε λευκοκύτταρα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε πλάσμα πλούσιο σε λευκοκύτταρα (3) του οποίου και θα αναλυθεί η διαδικασία της απομόνωσης. Αναφερόμαστε λοιπόν πλέον στις χρονικές στιγμές Π, 0, 60, 120, 180, 210, 240, 300, 360 στις οποίες:

- Παραλαμβάνονται 4ml αίματος σε πράσινο Vacutainer με ηπαρίνη
- Προστίθεται 1,33ml διαλύματος δεξτράνης 3% σε φυσιολογικό ορό, τοποθετείται parafilm και πραγματοποιείται ανάδευση για την κατανομή της δεξτράνης

- Αφαιρείται το parafilm και το μίγμα αφήνεται για καταβύθιση για διάρκεια 40 λεπτών
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο (LRP) με πιπέτα και μεταφέρεται σε άλλο πλαστικό σωληνάκι
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 500g για 10 λεπτά
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται με απόχυση (μία φορά στρέφεται ο σωλήνας προς τα κάτω και στη συνέχεια σε ένα χαρτί για να φύγει το περισσευούμενο υγρό) και το εναπομείνον ίζημα αναδιασπείρεται σε 3ml Lysis Buffer (καλή ανάδευση με tip) και αφήνεται για 5 λεπτά
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 300g για 10 λεπτά
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται με δεύτερη αντίστοιχη απόχυση
- Το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε 0,6ml Tris 50mM pH 7.4 (παγωμένο)
- Ακολουθεί κατεργασία με υπέρηχους (sonicator) για 10 δευτερόλεπτα (4 φορές) (υπό ψύξη) με μεσοδιάστημα 30 δευτερολέπτων για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του μίγματος (power 30-40%)
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 500g για 10 λεπτά στους 4°C
- Το περιεχόμενο παραλαμβάνεται και διανέμεται σε eppendorfs ανά 200μl
- Αποθήκευση στους -80°C

5.2: Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

5.2.1: Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών να δεσμεύουν χρωστικές ουσίες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική *Coomassie Brilliant Blue*, η οποία απαντάται σε τρεις μορφές: την κατιονική, την ουδέτερη και την ανιονική. Κάθε μορφή έχει το δικό της χρώμα και, ως εκ τούτου, απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος. Όταν η χρωστική συνδέεται με την πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον, τότε η πρώτη λαμβάνει δύο πρωτόνια, μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε και η απορρόφηση της αυξάνεται. Όσο περισσότερη η ποσότητα της πρωτεΐνης, τόσο πιο έντονο το μπλε χρώμα.

Κατιονική μορφή	⇆	ουδέτερη μορφή	⇆	Ανιονική μορφή
Κόκκινο χρώμα		Πράσινο χρώμα		Μπλέ χρώμα
470nm		650nm		595nm

<u>Εικόνα 5.1</u>: Οι τρείς μορφές της χρωστικής και οι αντίστοιχες απορροφήσεις.

5.2.2: Αντιδραστήρια

1. <u>Διάλυμα BSA (Bovine serum albumin) 0,1mg/ml</u>

   Παρασκευάζεται με αραίωση 10mg BSA σε 100ml απεσταγμένο νερό, αποθηκεύεται στους 4°C.

2. Stock Διάλυμα Bradford

   Σε 50ml Μεθανόλης διαλύονται 100mg της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G 250 (C.I. # 42655)*. Το διάλυμα αυτό προστίθεται σε 100ml διαλύματος 85% H_3PO_4 και αραιώνεται μέχρι τελικό όγκο 200ml με H_2O. Το τελικό διάλυμα έχει βαθύ κόκκινο χρώμα και τελικές συγκεντρώσεις 0,5 mg/ml *Coomassie Blue G*, 25% μεθανόλη και 42,5% H_3PO_4. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους $4^{\circ C}$ και είναι σταθερό για πάρα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

3. Working Διάλυμα Bradford

   Αραίωση 1/5, αραιώνεται δηλαδή 1ml stock διαλύματος με 4ml H_2O. Το διάλυμα είναι σκούρου καφέ χρώματος, με pH 1.1 και είναι σταθερό για εβδομάδες στους $4^{\circ C}$ και σε σκουρόχρωμη φιάλη.

5.2.3: Αναλυτική πορεία

1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς:

   Προσθέτουμε σε plate κατάλληλη ποσότητα νερού και στη συνέχεια διαλύματος BSA (0,1mg/ml) έτσι ώστε σε κάθε πηγαδάκι να δημιουργήσουμε διαφορετική συγκέντρωση/ ποσότητα πρωτεΐνης. Οι όγκοι νερού και πρωτεΐνης αλληλοσυμπληρώνονται για τελικό όγκο 200 μl ανά πηγαδάκι. Συνολικά, φτιάχνουμε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε συγκέντρωση φτιάχνεται δύο φορές (σετ). Το πρώτο σετ πηγαδιών είναι το τυφλό και περιέχει 200 μl νερό. Οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.5: Ποσότητες πρότυπης καμπύλης αναφοράς Bradford

C (μg/μl)	3	V (μl) BSA (0,1mg/ml)	V H_2O (μl)
0	0	-	200
0,01	0,2	2	198
0,025	0,5	5	195
0,05	1	10	190
0,075	1,5	15	185
0,1	2	20	180
0,125	2,5	25	175

2. Προετοιμασία διαλυμάτων δειγμάτων:

   Πραγματοποιείται απόψυξη και μετέπειτα επεξεργασία των δειγμάτων ενός εθελοντή τη φορά. Αρχικά, πραγματοποιείται αραίωση δειγμάτων 1/10 με νερό σε τελικό όγκο 50 μl σε eppendorfs. Συγκεκριμένα, μπαίνουν 45 μl H_2O και έπειτα 5 μl δείγματος LRP σε κάθε eppendorf. Για κάθε δείγμα (χρονική στιγμή) γίνονται από δύο αραιώσεις, άρα από δύο eppendorfs. Τα δείγματα του

καθενός εθελοντή είναι 8 για εκχύλισμα στεμφύλων και 8 για το εκχύλισμα placebo οπότε συνολικά δημιουργούνται 32 αριθμημένα eppendorfs αραιώσεων (16 για το εκχύλισμα στεμφύλων και άλλα 16 για το placebo).

3. Μεταφέρονται 7 μl αραιωμένου δείγματος στο ίδιο plate που έχουν μπει και τα σετ της BSA (βήμα 1) και συμπληρώνεται όγκος με νερό έως τα 200μl. Για κάθε ένα εκ των 32 αραιωμένων δειγμάτων φτιάχνουμε δύο πηγαδάκια, δηλαδή δύο επαναλήψεις. Συνολικά, 64 πηγαδάκια του plate.
4. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 50 μl working διαλύματος Bradford ταυτοχρόνως.
5. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Φωτομέτρηση απορρόφησης στα 595 nm.

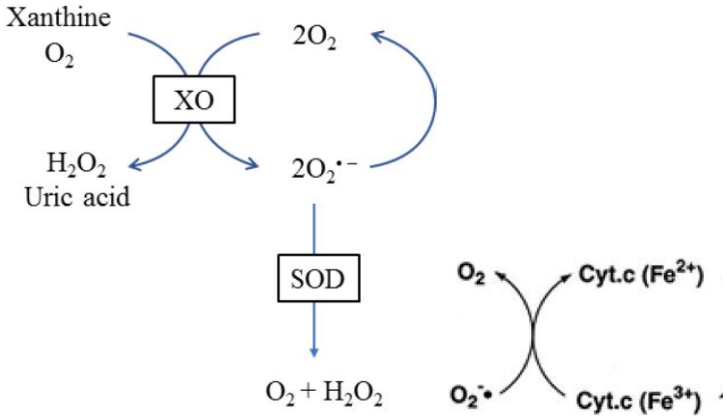
5.2.4: Υπολογισμοί

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς που φτιάξαμε με την βοήθεια της BSA αφαιρούμε από τις τιμές των απορροφήσεων (A) τις τιμές των αντίστοιχων τυφλών (T) παίρνοντας πλέον σετ τιμών A-T. Βγάζουμε τον μέσο όρο και με δεύτερο άξονα την μάζα της BSA σε mg (0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5) κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με 6 σημεία ή και λιγότερα, λαμβάνοντας τα γραμμικά. Έτσι, προκύπτει και η αντίστοιχη εξίσωση που θα χρησιμοποιήσουμε στην συνέχεια. Αντίστοιχα, από τις τιμές απορροφήσεων των δειγμάτων αφαιρούμε τον Μ.Ο των τυφλών και προκύπτουν 64 τιμές καθαρών απορροφήσεων. Η εξίσωση μορφής $y=\alpha x+\beta$ που προκύπτει από την καμπύλη γνωστής πρωτεΐνης BSA, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας της άγνωστης πρωτεΐνης που υπάρχει σε κάθε πηγαδάκι δείγματος. Για κάθε y που ισούται με την εκάστοτε απορρόφηση που βρέθηκε από την φωτομέτρηση, προκύπτει ένα x που υπολογίζει την μάζα πρωτεΐνης. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε 4 εκτιμήσεις της ποσότητας της για κάθε ένα από τα 16 δείγματα. Αυτή όμως είναι η ποσότητα που περιέχει το κάθε πηγαδάκι. Για την αναγωγή της στο αρχικό δείγμα πρέπει να συνυπολογιστεί η πρώτη αραίωση δείγματος που έγινε (βήμα 2) η οποία εφόσον ήταν 1/10, πολλαπλασιάζουμε με το 10 την κάθε τιμή πρωτεΐνης. Παράλληλα, αφού πήραμε 7 μl από αυτήν την αραίωση (βήμα 3), διαιρούμε με το 7. (Σε εξαιρέσεις που πήραμε 6 μl αραιωμένου δείγματος διαιρούμε αντιστοίχως με 6) Με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίζεται η ποσότητα στο αρχικό δείγμα LRP. Βγαίνει ο Μ.Ο. των τιμών κάθε τετράδας καταλήγοντας σε μία τιμή πρωτεΐνης για κάθε αρχικό δείγμα LRP η οποία θα αποτελέσει μετέπειτα τον οδηγό στον εκάστοτε όγκο δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί και θα μετρηθεί στη δοκιμασία της SOD.

5.3: Προσδιορισμός Δραστικότητας Υπεροξειδικής Δισμουτάσης

5.3.1: Αρχή μεθόδου-Αντίδραση

Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση μεταξύ ξανθίνης και O_2, παράγοντας ανιόν του υπεροξειδίου $O_2^{\bullet -}$. Το $O_2^{\bullet -}$ ανάγει τον τρισθενή σίδηρο του Cyt Fe^{+3} σε δισθενή (Cyt Fe^{+2}) προκαλώντας μία αύξηση στην απορρόφηση στα 550nm. Η SOD στο δείγμα των λευκοκυττάρων (LRP) εμποδίζει την αναγωγή αυτή, καθώς μετατρέπει το $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 και O_2 ,που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης στα 550nm. Συγκεκριμένα, κατά την αντίδραση της SOD δύο $O_2^{\cdot -}$ αντιδρούν μεταξύ τους. Το ένα θα οξειδωθεί προς σχηματισμό O_2 και το άλλο θα αναχθεί στο λιγότερο δραστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Μετρώντας την απορρόφηση $CytFe^{+3}$ υπολογίζουμε την δραστηριότητα της SOD.



<u>Εικόνα 5.2</u> : Αντίδραση XO και SOD

5.3.2: Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια

<u>Όργανα</u>

- Φασματοφωτόμετρο

<u>Αναλώσιμα</u>

- tips (άσπρα, κίτρινα, μπλε)
- αυτόματες πιπέτες
- κυψελίδες

<u>Στερεά αντιδραστήρια/Διαλύτες</u>

- KH_2PO_4
- EDTA
- κυτόχρωμα c
- διθειονώδες νάτριο (sodium dithionite)
- ξανθίνη
- οξειδάση της ξανθίνης (XO)
- υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Διαλύματα

- Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8
  Ζυγίζονται 3,4g KH2PO4 και διαλύονται σε 500ml απδεσταγμένο νερό. Η ρύθμιση του pH γίνεται με διάλυμα KOH 1N.
- Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8 / EDTA 0,1Mm
  Ζυγίζονται 0,0093g EDTA και διαλύονται σε 250ml Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8. Η ρύθμιση του pH γίνεται με διάλυμα KOH 1N.
- Cocktail
  Σε 141ml Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8 / EDTA 0,1mM, προστίθενται 7,5 ml stock ξανθίνης 1mM και 1,5 ml διαλύματος κυτοχρώματος c 1mM. Η συγκέντρωση του κυτοχρώματος c ελέγχεται με τοποθέτηση δείγματος σε κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 550nm. Στη συνέχεια προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι στερεού διθειονώδους νατρίου (που αποτελεί ισχυρό αναγωγικό μέσο), γίνεται ανάδευση και πραγματοποιείται εκ νέου μέτρηση της απορρόφησης, που θα πρέπει να αυξηθεί κατά 0,20 ακριβώς. Εάν δεν γίνει και ανάλογα τη μεταβολή, προστίθεται στο διάλυμα είτε ποσότητα κυτοχρώματος c ή PBS μέχρι να επιτευχθεί η αύξηση κατά 0,20. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.
- Διάλυμα ξανθίνης 1mM
  Ζυγίζονται 0,0174g και διαλύονται σε 100ml Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8. Μοιράζεται σε 12 aliquots των 8ml.
- Stock διάλυμα οξειδάσης της ξανθίνης 3units/ml
  Η αρχική συγκέντρωση του προϊόντος στην συσκευασία είναι 25,41 units/ml (1ml). Προστίθενται 7,47ml Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8 / EDTA 0,1mM. Μοιράζεται σε 19 aliquots των 106.6μl και 1 των 74.6μl. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.
- Διάλυμα οξειδάσης της ξανθίνης εργασίας
  Αραίωση 1:10 του stock διαλύματος οξειδάσης της ξανθίνης 0,3IU/ml με Buffer Potassium phosphate 0,05M pH 7.8 / EDTA 0,1mM. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.
- Πρότυπο διάλυμα SOD 0.03 u/ml
  Αραίωση 1/500 του πυκνού stock διαλύματος SOD 15 IU/μl με νερό και ακολουθεί αποθήκευση στους-20°C.
- Διάλυμα KOH 4N
  Ζυγίζονται 11,222g KOH σε 50ml νερό
- Δείγματα λευκοκυττάρων

  Αποθήκευση στους -80°C.

5.3.3: Αναλυτική Πορεία

Δοκιμασία Control

Αρχικά πραγματοποιείται μία δοκιμή χωρίς δείγμα λευκοκυττάρων για να προσδιοριστεί η κατάλληλη ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης που θα πρέπει να προστίθεται σε κάθε assay ώστε να ισχύει: 0,014≤ κλίση control ≤0,025. Ο όγκος σε κάθε assay ρυθμίζεται με PBS στα 1000μl και όπως φαίνεται παρακάτω δοκιμάζονται ποσότητες 8, 10 και 12μl.

Πίνακας 5.6: Δοκιμασία Control XO

Αντιδραστήρια	Κυψελίδα 1	Κυψελίδα 2	Κυψελίδα 3
Cocktail	800μl	800μl	800μl
PBS/EDTA	192μl	190μl	188μl
XO	8μl	10μl	12μl

Επειδή η οξειδάση της ξανθίνης είναι πολύ δραστική, η μέτρηση πρέπει να ξεκινήσει όσο πιο γρήγορα γίνεται μετά την προσθήκη της. Η κινητική παρακολουθείται για 5 λεπτά στα 550nm. Εάν οι προκύπτουσες κλίσεις control από τις παραπάνω ποσότητες είναι είτε <0,015 είτε >0,025 επαναλαμβάνεται η δοκιμασία με περισσότερη ή μικρότερη αντίστοιχα, ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης. Δουλέψαμε κυρίως με 8 μl XO.

Δοκιμασία δειγμάτων LRP

Στη συνέχεια, όταν βρεθεί η κατάλληλη ποσότητα της XO, πραγματοποιείται η δοκιμασία για τα δείγματα του LRP σύμφωνα με τις ποσότητες του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.7: Δοκιμασία για τα δείγματα λευκοκυττάρων

Cocktail	PBS	Δείγμα λευκοκυττάρων	XO
800μl	Συμπληρώνεται η κατάλληλη ποσότητα ώστε Vτελ=1000μl	Ποσότητα που αντιστοιχεί σε ≈35-55μg πρωτεΐνης	Ποσότητα που μόλις καθορίστηκε από τη δοκιμασία για το control

Ο προσδιορισμός πρωτεΐνης κάθε δείγματος έχει προηγηθεί σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford που αναφέρθηκε (5.2) και στην συνέχεια ακολουθεί αναγωγή για την εύρεση του κατάλληλου όγκου δείγματος που περιέχει 35-55 μg Pr καθώς και των αντίστοιχων συμπληρωματικών όγκων του PBS/EDTA. Η οξειδάση της ξανθίνης προστίθεται κι εδώ τελευταία και η μέτρηση ξεκινάει ακριβώς μετά την προσθήκη της. Η κινητική παρακολουθείται για 5 λεπτά στα 550nm.

Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς SOD

Τέλος, για να προσδιοριστούν τα units της SOD που προκαλούν την εκάστοτε αναστολή, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη. Πραγματοποιείται αραίωση 1/500 του πρότυπου διαλύματος SOD 0,03 units/μl και σύμφωνα με αυτήν την ποσότητα, προστίθενται οι παρακάτω όγκοι V της SOD για τις αντίστοιχες ποσότητες (x) για την κατασκευή της καμπύλης όπου V SOD (ml) = x (units) / 0,03 (units/ml). Μετράμε A για κάθε Σ στην διάρκεια των 5 λεπτών.

Πίνακας 5.8: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς SOD

	Cocktail	SOD		PBS	XO
Σ1	800μl	3,13μl	0,094 units	Συμπληρώνεται η κατάλληλη ποσότητα ώστε Vτελ=1000μl	Ποσότητα που καθορίστηκε από τη δοκιμασία για το control
Σ2		6,25 μl	0,188 units		
Σ3		12,5 μl	0,375 units		
Σ4		18,75 μl	0,562 units		
Σ5		25 μl	0,750 units		
Σ6		30 μl	0,900 units		
Σ7		35 μl	1,050 units		

Από την κλίση (α), η οποία δείχνει την δραστικότητα της κάθε ποσότητας, βρίσκεται η %αναστολή που προκαλείται από την SOD από τον τύπο: %Αναστολή= 100*(κλίση control – κλίση (α)/κλίση control και κατασκευάζεται η καμπύλη %Αναστολή-units SOD από τα σημεία που παρουσιάζουν γραμμικότητα. Με τη βοήθεια της υποκύπτουσας εξίσωσης, προσδιορίζεται η ποσότητα των units SOD/mg πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα έτσι ώστε η %αναστολή να κυμαίνεται σε ένα επιθυμητό εύρος ≈30%-60%, ανάλογα πάντα με τα όρια της εκάστοτε πρότυπης καμπύλης.

5.3.4: Υπολογισμός δραστικότητας SOD

Από την δοκιμασία της φωτομέτρησης των δειγμάτων φτιάχνονται διαγράμματα απορρόφησης-χρόνου 5 σημείων (μέτρηση για 5 λεπτά ανά λεπτό) και προκύπτουν εξισώσεις της μορφής $y=\alpha x+\beta$ για κάθε δείγμα στις οποίες η κλίση αντιστοιχεί στην δραστικότητα της SOD στο εκάστοτε δείγμα. Κάθε δείγμα φωτομετρείται τουλάχιστον δύο φορές έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα. Μέσω του τύπου : %Αναστολή= 100*(κλίση control – κλίση δείγματος/κλίση control) βρίσκεται η %αναστολή που προκαλείται από την SOD.

Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της SOD έχει προκύψει η εξίσωση σύμφωνα με την οποία προσδιορίζεται η ποσότητα των units της SOD /mg πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Αρχικά, αντικαθιστώντας όπου y το ποσοστό της εκάστοτε αναστολής βρίσκουμε τα units στα οποία αντιστοιχεί. Όσες επαναλήψεις έχουμε κάνει στην φωτομέτρηση τόσες κλίσεις θα λάβουμε και αντίστοιχα τόσες %ανατολές και τιμές των units. Διαιρώντας στην συνέχεια με την μάζα της πρωτεΐνης που περιέχεται στο εκάστοτε δείγμα (35-55 μg) βρίσκουμε τα units/μg πλέον της SOD. Εφόσον και αυτές οι τιμές θα είναι τουλάχιστον δύο, βγαίνει ο Μ.Ο. τους.

Όταν η διαδικασία ολοκληρωθεί και για τα 8 δείγματα (8 χρονικές στιγμές), κατασκευάζεται διάγραμμα συγκέντρωσης SOD (units/μg) και χρόνου (λεπτά). Σε κάθε εθελοντή αντιστοιχούν από δύο καμπύλες, μία για τα δείγματα της placebo παρέμβασης και μία για της παρέμβασης της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων.

5.4: Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS για τα Windows. Αρχικά, ελέγξαμε την διαφοροποίηση τόσο των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών όσο και των βιοχημικών δεικτών στην αρχή των δύο παρεμβάσεων, σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία one way ANOVA (επίπεδο σημαντικότητας $p_s<0,05$). Αντιστοίχως, με την ίδια δοκιμασία, συγκρίναμε τις τιμές αυτές και ανά ομάδα ΔΜΣ για κάθε παρέμβαση ξεχωριστά. Ο έλεγχος συσχέτισης της δραστικότητας της SOD με δείκτες πριν την παρέμβαση έγινε με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης rho του Spearman. Ο έλεγχος της κανονικότητας έγινε με το Kolmogorov-Smirnov test για να δούμε αν οι συγκεντρώσεις της SOD, για κάθε χρονική στιγμή, ακολουθούν την κανονική κατανομή. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας εδώ ήταν το $p>0,05$. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της αρχικής δραστικότητας της SOD των δύο παρεμβάσεων με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, για να ελεγχθεί αν υπήρχε σημαντική διαφοροποίησή της και επίπεδο σημαντικότητας $p<0,05$. Ελέγχθηκε επίσης με το ίδιο τεστ και η διαφοροποίηση της SOD έναρξης ανάμεσα στις δύο ομάδες διαφορετικού ΔΜΣ. Όσον αφορά την επίδραση του χρόνου στην μεταβολή της δραστικότητας του ενζύμου, αυτή εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman με στατιστικά σημαντικό $p_{time}<0,05$. Στην συνέχεια προχωρήσαμε σε σύγκριση σε ζεύγη κάθε διαφορετικής χρονικής στιγμής ξεχωριστά με την Π χρησιμοποιώντας τον έλεγχο Wilcoxon ($p<0,05$). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σύγκρισης μεταξύ των ομάδων παρέμβασης για κάθε διαφορετική χρονική στιγμή σύμφωνα με το Mann-Whitney test ($p<0,05$). Οι τρείς τελευταίοι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν και με περαιτέρω διαχωρισμό του δείγματος μας στις δύο ομάδες διαφορετικού ΔΜΣ. Ελέγχθηκε αρχικά η επίδραση του παράγοντα του χρόνου με τον έλεγχο Friedman. Ακολούθως, έλεγχος κατά ζεύγη Wilcoxon και τέλος, διεξάχθηκε ένας Mann-Whitney έλεγχος σύγκρισης των παρεμβάσεων ξεχωριστά για τις εθελόντριες φυσιολογικού βάρους και τις υπέρβαρες εθελόντριες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί κομμάτι μίας ευρύτερης κλινικής παρέμβασης η οποία βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Ως εκ τούτου, στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δεκατεσσάρων (14) εθελοντριών που έχουν ολοκληρώσει και τις δύο παρεμβάσεις. Οι εθελόντριες αυτές περιλαμβάνουν οκτώ (8) νορμοβαρείς (ΔΜΣ<25 kg/m^2) και έξι (6) υπέρβαρες (ΔΜΣ>25 kg/m^2) γυναίκες. Ο διαχωρισμός των δύο αυτών ομάδων θα πραγματοποιηθεί σε πολλά σημεία της ανάλυσης για την εκάστοτε σύγκριση τους.

6.1: Βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά πριν την παρέμβαση

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των δεκατεσσάρων εθελοντριών πριν την κάθε παρέμβαση (χρονική στιγμή Π για placebo/εκχύλισμα) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ως μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, καμία από τις μεταβλητές δεν διέφερε σημαντικά στην αρχή των δύο παρεμβάσεων (p_s >0,05). Το αποτέλεσμα αυτό είναι και το επιθυμητό σε μία κλινική μελέτη σαν αυτή, έτσι ώστε το δείγμα των συμμετεχόντων να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφο, οδηγώντας στην διεξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.
Πιο συγκεκριμένα, η μέση ηλικία των εθελοντριών ήταν τα έτη 26,9 ± 2,7 και ο μέσος όρος του βάρους τους πριν την παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα (placebo) μετρήθηκε στα 69,1 ± 13,6 κιλά το οποίο πριν την παρέμβαση του εκχυλίσματος παρέμεινε σχεδόν ίδιο στα 68,9 ± 14,3 κιλά. Ως εκ τούτου, η μέση τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματος ήταν 25,8 ± 4,8 kg/m^2 πριν τη λήψη του εικονικού σκευάσματος (placebo) και δεν φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά στην έναρξη της παρέμβαση με το εκχύλισμα (25,7 ± 5,0 kg/m^2). Ο λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρειας ισχύων που μετρήθηκαν σε κάθε εθελόντρια πριν από κάθε παρέμβαση ήταν 0,7 ± 0,0. Η μέση τιμή της συστολικής αρτηριακής πίεσης ήταν 112,4 ± 7,9 mmHg και 110,5 ± 10,2 mmHg, αντίστοιχα ενώ η διαστολική αρτηριακή πίεση μετρήθηκε στα 71,3 ± 9,7 mmHg και στις δύο παρεμβάσεις. Ο βασικός μεταβολικός ρυθμός των εθελοντριών ήταν 1456,9 ± 145,8 kcal και 1442,1 ± 153,9 kcal. Τέλος, το ποσοστό λίπους τους ήταν 30,0 ± 8,0 % και 30,1 ± 8,6 % του συνολικού τους βάρους, πριν τη λήψη του εικονικού σκευάσματος και του εκχυλίσματος, αντίστοιχα.

Πίνακας 6.1.1: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση

	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)	Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης	p*
Ηλικία (έτη)	26,9 ± 2,7	26,9 ± 2,7	1,000
Βάρος (kg)	69,1 ± 13,6	68,9 ± 14,3	0,959
ΔΜΣ (kg/m^2)	25,8 ± 4,8	25,7 ± 5,0	0,969
Περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίων (cm)	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,849
Συστολική ΑΠ (mmHg)	112,4 ± 7,9	110,5 ± 10,2	0,610
Διαστολική ΑΠ (mmHg)	71,3 ± 9,7	71,3 ± 9,7	1,000
BMR (kcal)	1456,9 ± 145,8	1442,1 ± 153,9	0,796
% Λιπώδης μάζα σώματος	30,0 ± 8,0	30,1 ± 8,6	0,969

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (μέγιστη και ελάχιστη τιμή). *one-way ANOVA test*

Επιπλέον, έγινε και κατηγοριοποίηση με βάση τον ΔΜΣ των εθελοντριών (<25 και >25 kg/m^2) έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί έλεγχος για την διαφοροποίηση των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες για κάθε παρέμβαση ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.1.2: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση ανά ΔΜΣ

	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)			Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης		
	ΔΜΣ<25 kg/m^2	ΔΜΣ>25 kg/m^2	p*	ΔΜΣ<25 kg/m^2	ΔΜΣ>25 kg/m^2	p*
Ηλικία (έτη)	25,6 ± 1,7	28,7 ± 3,0	**0,033**	25,6 ± 1,7	28,7 ± 3,0	**0,033**
Βάρος (kg)	59,7 ± 3,6	81,7 ± 11,6	**0,000**	59,2 ± 4,0	81,8 ± 12,5	**0,000**
Περιφέρεια μέσης /περιφέρεια ισχίων (cm)	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,932	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,578
Συστολική ΑΠ (mmHg)	111,0 ± 7,8	114,0 ± 8,5	0,519	106,0 ± 8,1	117,8 ± 9,3	**0,034**
Διαστολική ΑΠ (mmHg)	68,1 ± 10,9	75,0 ± 7,4	0,220	69,1 ± 10,9	74,8 ± 6,9	0,325
BMR (kcal)	1360,9 ± 31,0	1585,3 ± 139,0	**0,001**	1345,8 ± 31,7	1570,7 ± 159,7	**0,002**
% Λιπώδης μάζα σώματος	25,0 ± 5,2	36,7 ± 5,8	**0,002**	24,5 ± 5,3	37,6 ± 5,9	**0,001**

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (μέγιστη και ελάχιστη τιμή). *one-way ANOVA test*

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα αποτελέσματα έδειξαν πως διαφέρει σημαντικά το βάρος τους, το ποσοστό λίπους αλλά και το BMR τους. Συγκεκριμένα, στην έναρξη των παρεμβάσεών του εικονικού σκευάσματος τους το βάρος είχε μέση τιμή 59,7 ± 3,6 kg για του φυσιολογικού βάρους

και 28,7 ± 3,0 kg για τις υπέρβαρες με **p= 0,000**. Το % λίπος ήταν αντίστοιχα 25,0 ± 5,2 και 36,7 ± 5,8 (**p=0,002**) και το BMR 1360,9 ± 31,0 kcal και 1585,3 ± 139,0 kcal με **p=0,001**). Αντίστοιχα, στις μετρήσεις πριν από κάθε παρέμβαση με το εκχύλισμα, το βάρος των νορμοβαρών είχε μέση τιμή 59,2 ± 4,0 ενώ των υπέρβαρων γυναικών 81,8 ± 12,5 (**p=0,000**). Το %λίπος ήταν 24,5 ± 5,3 και 37,6 ± 5,9 (**p=0.001**) αντίστοιχα. Το BMR μετρήθηκε στα 1345,8 ± 31,7 kcal για την κατηγορία <25 kg/m^{2}και 1570,7 ± 159,7 για την κατηγορία >25 kg/m^2 (**p=0,001**). Επιπλέον, εδώ διέφερε σημαντικά και η Συστολική ΑΠ των εθελοντριών που λήφθηκε στην αρχή κάθε παρέμβασης με το εκχύλισμα με το p να ισούται με **0,034** και τη μέση τιμή να είναι 106,0 ± 8,1 mmHg για τις νορμοβαρείς και 117,8 ± 9,3 mmHg για τις υπέρβαρες εθελόντριες. Τέλος, υπήρχε σημαντική διαφορά στην ηλικία η οποία είχε μέση τιμή τα 25,6 ± 1,7 έτη για του φυσιολογικού βάρους και τα 28,7 ± 3,0 έτη για τις υπέρβαρες γυναίκες στην ένραξη και των δύο παρεμβάσεων **(p= 0,033).**

6.2: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες πριν την παρέμβαση

Στον Πίνακα 6.2.1 παρουσιάζονται οι κλασικοί βιοχημικοί δείκτες των δεκατεσσάρων εθελοντριών στην έναρξη κάθε τις εκ των παρεμβάσεων εκφρασμένες ως μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση. Ούτε εδώ παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο παρεμβάσεων πριν την κατανάλωση του γεύματος αφού p >0,05. Αναλυτικότερα, η γλυκόζη νηστείας μετρήθηκε στα 84,0 ± 5,7 mg/dl και στα 85,9 ± 5,5 mg/τις για τις παρεμβάσεις με το placebo και το εκχύλισμα, αντίστοιχα. Το ουρικό οξύ βρέθηκε στην τιμή των 3,7 ± 1,1 mg/dl και 4,1 ± 0,8 mg/dl αντίστοιχα. Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ, μετρήθηκαν οι εξής δείκτες: ολική χοληστερόλη 149,4 ± 32,1 και 152,2 ± 24,1 mg/dl, HDL 48,8 ± 13,9 και 44,6 ± 10,3 mg/dl, LDL 94,3 ± 27,4 και 101,1 ± 19,4 mg/dl και TG 32,6 ± 18,4 και 32,8 ± 15,6 mg/dl στην παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα και το εκχύλισμα υπο-προϊόντων αντίστοιχα.

Πίνακας 6.2.1: Βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση

	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)	**Εκχύλισμα υπο-προϊόντων**	**p***
Γλυκόζη (mg/dl)	84,0 ± 5,7	85,9 ± 5,5	0,381
Ουρικό οξύ (mg/dl)	3,7 ± 1,1	4,1 ± 0,8	0,249
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	149,4 ± 32,1	152,2 ± 24,1	0,796
HDL (mg/dl)	48,8 ± 13,9	44,6 ± 10,3	0,379
LDL (mg/dl)	94,3 ± 27,4	101,1 ± 19,4	0,460
TG (mg/dl)	32,6 ± 18,4	32,8 ± 15,6	0,973

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (μέγιστη και ελάχιστη τιμή). *one-way ANOVA test*

Συγκρίνοντας στην συνέχεια και τους βιοχημικούς δείκτες των δύο ομάδων ΔΜΣ μεταξύ τους και για κάθε παρέμβαση ξεχωριστά, κανένας δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά (p_s >0,05 στο *one-way ANOVA test*). Τα δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.2 που έπεται.

Πίνακας 6.2.2: Βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση ανά ΔΜΣ

	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)			**Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης**		
	ΔΜΣ <25 kg/m^2	ΔΜΣ >25 kg/m2	p*	ΔΜΣ <25 kg/m2	ΔΜΣ >25 kg/m2	p*
Γλυκόζη (mg/dl)	82,7 ± 4,8	85,7 ± 6,7	0,348	84,1 ± 6,0	88,2 ± 4,0	0,174
Ουρικό οξύ (mg/dl)	3,6 ± 1,1	3,8 ± 1,1	0,829	4,3 ± 0,9	3,9 ± 0,6	0,388
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	147,6 ± 33,2	151,7 ± 33,6	0,823	150,6 ± 25,9	151,7 ± 33,6	0,792
HDL (mg/dl)	48,9 ± 17,2	48,6 ± 9,2	0,974	44,0 ± 10,7	45,5 ± 10,6	0,802
LDL (mg/dl)	91,8 ± 23,8	97,8 ± 33,6	0,700	100,1 ± 22,7	102,4 ± 16,0	0,833
TG (mg/dl)	36,5 ± 19,2	27,4 ± 17,6	0,150	32,8 ± 19,5	32,7 ± 9,8	0,987

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (μέγιστη και ελάχιστη τιμή). *one-way ANOVA test*

6.3: Δραστικότητα SOD

Έλεγχος κανονικότητας

Αρχικά, ελέγχθηκε αν οι συγκεντρώσεις της SOD, για κάθε χρονική στιγμή, ακολουθούν την κανονική κατανομή. Αν και τα περισσότερα δείγματα ακολουθούσαν την κανονική κατανομή (p>0,05), υπήρχαν και αρκετές εξαιρέσεις (p<0,05), οπότε και χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικοί στατιστικοί έλεγχοι. Επακολούθως, τα αποτελέσματα θα εκφραστούν ως διάμεσοι (25ο και 75ο τεταρτημόριο).

Δραστικότητα SOD στην έναρξη των δύο παρεμβάσεων

Στην συνέχεια, ελέγχθηκε η διαφοροποίησή της δραστικότητας της SOD στην έναρξη των δύο παρεμβάσεων. Εν τέλη, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσά στις δύο παρεμβάσεις αφού p=0,734. Ελέγχθηκε επίσης και η διαφοροποίηση της δραστικότητας της SOD έναρξης ανάμεσα στις δύο ομάδες φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρων εθελοντριών. Η διαφορά δεν ήταν σημαντική (p=0,302). Τέλος, με περεταίρω διαχωρισμό και εξέταση ξεχωριστά για κάθε παρέμβαση, αλλά και ως προς τον ΔΜΣ δεν βρέθηκε κάποια διαφοροποίηση με το p να ισούται με 0,573 για την placebo και με 0,414 για την εκχυλίσματος παρέμβαση. Εν κατακλείδι, η συγκέντρωση επομένως και η δραστικότητα της αρχικής SOD (Π) δεν διέφερε σημαντικά ούτε ως προς το είδος της παρέμβασης αλλά ούτε και ως προς την ομάδα ΔΜΣ.

Συσχέτιση της δραστικότητας της SOD με δείκτες πριν την παρέμβαση

Ακολούθως, εξετάσθηκε η συσχέτιση της δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης με ορισμένους ανθρωπομετρικούς, βιοχημικούς και οξειδωτικούς δείκτες κατά την έναρξη των παρεμβάσεων. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η συσχέτιση του ενζύμου με: την ηλικία (έτη), τον ΔΜΣ (kg/m^2), τον λόγο περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίων (cm), την γλυκόζη (mg/dl), το ουρικό οξύ (mg/dl), την ολική χοληστερόλη (mg/dl), την HDL (mg/dl), την LDL (mg/dl), τα TG (mg/dl), τις αντιδρώσες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ουσίες-TBARS (μM MDA), το χρόνο αντίστασης του ορού στην οξείδωση-lagtime (min) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/μg prot). Από όλους τους παραπάνω δείκτες, μόνο δύο ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά φαίνεται να έχουν μία τάση για συσχέτιση με την δραστικότητα του ενζύμου. Συγκεκριμένα, αυτά είναι η ηλικία (r=0,355 με **p=0,064**) και ο λόγος περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίων (r=0,356 με **p=0,063**).

6.4: Επίδραση των παρεμβάσεων στην δραστικότητα της SOD

Δραστικότητα SOD ανά παρέμβαση σε κάθε χρονική στιγμή

Στους δύο παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται η δραστικότητα της SOD ως απόλυτη τιμή (U/μg ολικής πρωτείνης) και ως ποσοστιαία μεταβολή από την αρχική της τιμή Π αντίστοιχα, σε κάθε χρονική στιγμή και για κάθε παρέμβαση ξεχωριστά. Στον πίνακα 6.4 φαίνεται επίσης και η επίδραση του χρόνου (p_{time}) καθώς και η σύγκριση μεταξύ των ομάδων παρέμβασης (p_{trial}) στις οποίες θα αναφερθούμε αναλυτικότερα παρακάτω.

Πίνακας 6.3: Απόλυτες τιμές συγκέντρωσης SOD (U/μg ολικής πρωτείνης

Χρονική στιγμή	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)	Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης
Π	0,0108 (0,0084-0,0148)	0,0115 (0,0080-0,0138)
60	0,0105 (0,0075-0,0126)	0,0095 (0,0073-0,0134)
120	0,0091 (0,0072-0,0170)	0,0091 (0,0052-0,0122)
180	0,0077 (0,0067-0,0129)	0,0092 (0,0075-0,0129)
210	0,0093 (0,0062-0,0131)	0,0086 (0,0070-0,0126)
240	0,0094 (0,0074-0,0155)	0,0099 (0,0075-0,0133)
300	0,0091	0,0096

	(0,0065-0,0109)	(0,0078-0,0115)
360	0,0096 (0,0072-0,0117)	0,0109 (0,0083-0,0128)

Πίνακας 6.4: Ποσοστιαία μεταβολή από την τιμή της στιγμής Π

Χρονική στιγμή	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)	Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης	p_{trial}
Π	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,000
60	83,5 (78,4-123,8)	89,1 (73,0-112,0)	0,685
120	99,9 (76,8-151,0)	74,0 (71,0-99,5)	**0,077**
180	90,5 (72,0-135,9)	93,3 (79,6-105,4)	0,874
210	91,6 (75,7-105,7)	85,8 (66,9-102,5)	0,603
240	95,8 (82,0-112,7)	89,5 (72,6-143,5)	1,000
300	92,5 (59,9-100,7)	85,0 (67,5-105,45)	0,705
360	91,5 (68,3-110,9)	103,6 (69,9-123,6)	0,432
p_{time}	0,701	**0,066**	

ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, έλεγχος *Mann-Whitney*. *ptime*: Η επίδραση του χρόνου (*within group*), έλεγχος *Friedman*

Εξετάσαμε την επίδραση του χρόνου στην μεταβολή της δραστικότητας του ενζύμου. Για την παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα βρέθηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης της SOD στην πάροδο του χρόνου αφού p_{time}=0,701. Αντιθέτως, στην παρέμβαση με το εκχύλισμα φαίνεται να υπάρχει μία τάση για διαφοροποίηση αφού το $\mathbf{p_{time}}$ ισούται με **0,066.**

Για να εντοπίσουμε και τη χρονική στιγμή της διαφοροποίησης αυτής προχωρήσαμε σε σύγκριση σε ζεύγη κάθε διαφορετικής χρονικής στιγμής ξεχωριστά με την Π. Έτσι, φάνηκε πως όντως στην παρέμβαση με το **εκχύλισμα** υπάρχει σημαντική ποσοστιαία μεταβολή του ενζύμου τόσο την χρονική στιγμή 120 λεπτά (**p=0,035**) όσο και την χρονική στιγμή 210 λεπτά **(p=0,048).** Αντιθέτως, την παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα κανένα ζευγάρι δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σύγκρισης μεταξύ των ομάδων παρέμβασης εικονικό σκεύασμα/εκχύλισμα για κάθε διαφορετική χρονική στιγμή όπου και φάνηκε ότι στα 120 λεπτά υπάρχει μία τάση για διαφοροποίηση (**p=0,077**).

Ακολουθεί διαγραμματική απεικόνιση των δεδομένων του πίνακα 6.4 (Διάγραμμα 1). Η παρουσίαση αυτή θέτει σίγουρα αισθητές δύο εκ των στατιστικά σημαντικών διαφορών που έχουμε βρει, αυτές της χρονικής στιγμής 120 λεπτά, τόσο ανάμεσα στις δύο παρεμβάσεις όσο και στην συγκεκριμένη μεταβολή της SOD στην εκχυλίσματος παρέμβαση.

<u>Διάγραμμα 1</u>: Ποσοστιαία μεταβολή SOD ανά τον χρόνο

Το σύνολο των παραπάνω ελέγχων πραγματοποιήθηκε και με διαχωρισμό του δείγματος μας στις δύο ομάδες διαφορετικού ΔΜΣ. Ελέγχθηκε αρχικά η επίδραση του παράγοντα του χρόνου. Τόσο στην παρέμβαση placebo όσο και στην παρέμβαση του εκχυλίσματος δεν φάνηκε να υπάρχει διαφοροποίηση, αφού όλα τα p_{time} ήταν μεγαλύτερα του 0,05. Συγκεκριμένα, στην παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα βρήκαμε p_{time}=0,483 για τις γυναίκες με ΔΜΣ<25 kg/m^2 και p_{time}=0,893 για αυτές με ΔΜΣ>25 kg/m^2. Στην παρέμβαση με το εκχύλισμα βρέθηκε p_{time}=0,282 και για τις δύο ομάδες.

Προχωρώντας στον έλεγχο κατά ζεύγη, στην παρέμβαση placebo φαίνεται μόνο μία τάση για διαφοροποίηση της ποσοστιαίας μεταβολής του ενζύμου (**p=0,069**), η οποία αφορά την χρονική στιγμή 210 λεπτά για την ομάδα του ΔΜΣ<25 kg/m^2 μόνο, γεγονός που προηγουμένως, χωρίς τον

διαχωρισμό του ΔΜΣ, δεν είχε φανεί. Παράλληλα, στην παρέμβαση του εκχυλίσματος υπάρχει σημαντική ποσοστιαία μεταβολή του ενζύμου στις χρονικές στιγμές 120 (**p=0,028**) και 300 λεπτά **(p=0,046)** για την ομάδα του ΔΜΣ>25 kg/m^2 αλλά και μία τάση (**p=0,093**) για την ομάδα του φυσιολογικού βάρους πάλι στα 210 λεπτά.

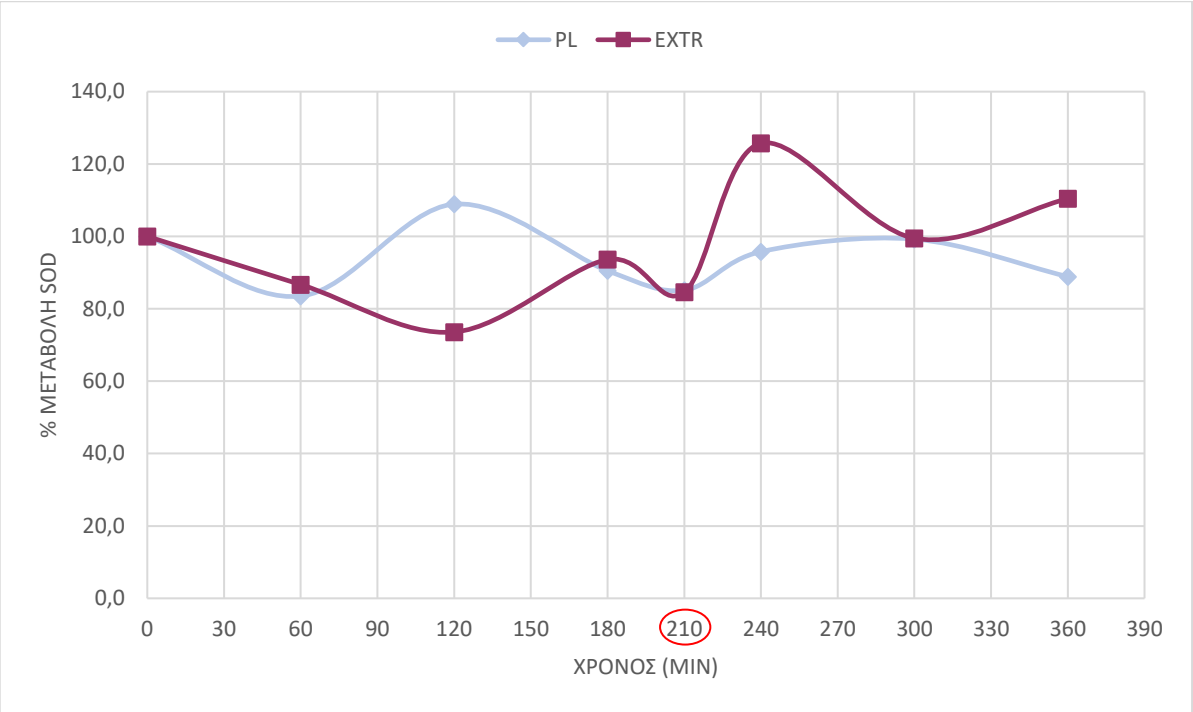
Τέλος, συγκρίναμε την διαφορά των αποτελεσμάτων στους διαφορετικούς χρόνους μεταξύ των ομάδων παρέμβασης placebo/εκχύλισμα ξεχωριστά για τις εθελόντριες φυσιολογικού βάρους και τις υπέρβαρες εθελόντριες. Το αξιοσημείωτο αποτέλεσμα εδώ ήταν αυτό για την ομάδα του ΔΜΣ>25 kg/m^2 και αφορούσε την χρονική στιγμή 120 λεπτά στην οποία φάνηκε μία τάση για διαφοροποίηση της % μεταβολής της συγκέντρωσης του ενζύμου μεταξύ των δύο παρεμβάσεων με **p=0,093**.

Τα παραπάνω αποτυπώνονται στους δύο επόμενους πίνακες για ΔΜΣ<25 kg/m^2 και ΔΜΣ>25 kg/m^2 αντίστοιχα. Η δραστικότητα της SOD εκφράζεται ως ποσοστιαία μεταβολή από την αρχική της τιμή Π αντίστοιχα, σε κάθε χρονική στιγμή και για κάθε παρέμβαση ξεχωριστά. Ακολουθούν και τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε κατηγορία.

Πίνακας 6.5: Ποσοστιαία μεταβολή από την τιμή της στιγμής Π για ΔΜΣ<25 kg/m^2

Χρονική στιγμή	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)	Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης	p_{trial}
Π	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,000
60	83,5 (75,9-137,2)	86,7 (70,7-120,1)	0,536
120	108,9 (59,1-157,1)	73,6 (72,0-110,1)	0,382
180	90,5 (57,8-200,2)	93,6 (86,0-102,9)	0,878
210	85,2 (43,1-92,2)	84,6 (62,7-103,3)	0,798
240	95,8 (76,9-113,7)	125,7 (58,5-198,3)	0,463
300	99,2 (61,8-101,0)	99,5 (66,3-119,5)	0,779
360	88,9 (66,8-101,0)	110,5 (76,5-131,6)	0,281
p_{time}	0,483	0,282	

ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, έλεγχος *Mann-Whitney*. *ptime*: Η επίδραση του χρόνου (*within group*), έλεγχος *Friedman*

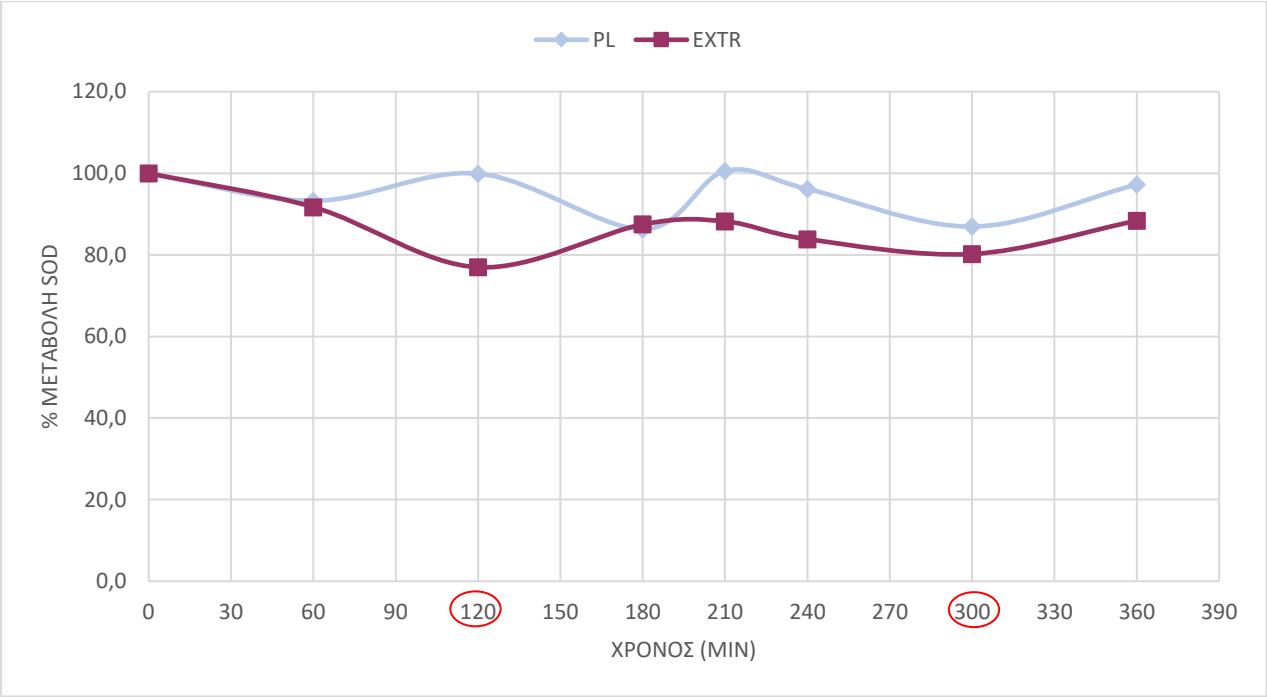


Διάγραμμα 2: Ποσοστιαία μεταβολή SOD ανά τον χρόνο για ΔΜΣ<25 kg/m^2

Πίνακας 6.6: Ποσοστιαία μεταβολή από την τιμή της στιγμής Π για ΔΜΣ>25 kg/m^2

Χρονική στιγμή	Έικονικό σκεύασμα (Placebo)	Εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης	p_{trial}
Π	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,000
60	93,2 (81,1-121,5)	91,7 (78,9-111,8)	1,000
120	99,9 (76,8-151,0)	77,0 (67,0-95,6)	**0,093**
180	86,3 (72,0-135,9)	87,5 (75,4-126,5)	0,937
210	100,5 (92,2-152,6)	88,2 (75,4-107,7)	0,240
240	96,2 (82,7-116,6)	83,8 (78,4-104,6)	0,310
300	86,9 (47,8-101,8)	80,2 (67,5-92,4)	1,000
360	97,2 (76,8-116,2)	88,4 (69,8-125,8)	0,792
p_{time}	0,893	0,282	

ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, έλεγχος *Mann-Whitney*. *ptime*: Η επίδραση του χρόνου (*within group*), έλεγχος *Friedman*



<u>Διάγραμμα 3</u>: Ποσοστιαία μεταβολή SOD ανά τον χρόνο για ΔΜΣ>25 kg/m^2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεταγευματική κατάσταση αφορά το χρονικό διάστημα κατά το οποίο σχεδόν όλα τα όργανα και οι ιστοί αντιδρούν στη βραχυπρόθεσμη διαταραχή που επιφέρει η πρόσληψη νέων θρεπτικών συστατικών. **(40-42)** Αποτελεί μία πλήρως φυσιολογική διαδικασία του μεταβολισμού η οποία κατέχει ένα μεγάλο χρονικό διάστημα της ημέρας. **(43)** Μηχανισμοί που διαταράσσουν την μεταγευματική ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων οδηγούν στην κατάσταση που ονομάζεται «μεταγευματικός δυσμεταβολισμός» ο οποίος εμφανίζεται μετά από λήψη πλούσιων θερμιδικά γευμάτων και χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων μεταγευματικά. **(47,48)** Τόσο η μεταγευματική υπεργλυκαιμία όσο και η μεταγευματική δυσλιπιδαιμία μέσω της υπερπροσφοράς των ενεργειακών υποστρωμάτων οδηγούν τον οργανισμό σε υπέρβαση των πεπερασμένων μεταβολικών δυνατοτήτων επάγοντας μεταγευματικό οξειδωτικό στρες. **(52)** Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία ανισορροπία που παρατηρείται είτε σε υπερβολική παραγωγή προ-οξειδωτικών παραγόντων ή/και έλλειψη αντι-οξειδωτικών μηχανισμών. **(1, 2)** Το φάσμα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που επιστρατεύονται για την καταπολέμηση του δημιουργούμενου οξειδωτικού στρες αποτελείται τόσο από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όσο και από μη ενζυμικά συστατικά. Όλα τα συστατικά αυτά του αντιοξειδωτικού μας συστήματος αλληλοεπιδρούν για να διατηρήσουν ή να αποκαταστήσουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Τα μη ενζυμικά αντι-οξειδωτικά μπορεί να είναι ενδογενή ή και να προέρχονται εξωγενώς.**(32,33)** Ένα εξ αυτών είναι και οι φαινολικές ενώσεις η παρουσία των οποίων είναι ιδιαιτέρως αισθητή στο κρασί. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει μελετηθεί διεξοδικά το κρασί για τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδης και αντιθρομβωτικές του ιδιότητες και κατ' επέκταση, την προστατευτική δράση που προσφέρει έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να μην συνυπολογισθεί ο επιβαρυντικός παράγοντας της παρουσίας της αιθανόλης που αποτελεί και βασικό του συστατικό. Εξαιτίας αυτής, η κατανάλωση κρασιού δεν μπορεί να γίνει σε υπέρμετρο βαθμό. Για τον λόγο αυτό, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στα υπο-προϊόντα που δημιουργούνται από την οινοποιητική διαδικασία τα οποία αποτελούν μία εναλλακτική πηγή μικρο-συστατικών παρόμοιων με αυτά που απαντώνται στο κρασί, οπότε και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αντί αυτού. Η χρήση τους βρίσκει ποικίλες δυνατότητες και εφαρμογές. Σχετικά με την βιομηχανία τροφίμων, τα υπο-προϊόντα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον εμπλουτισμό τροφίμων αποτελώντας πηγή φαινολικών συστατικών αλλά και μία καλή πηγή διαιτητικών ινών. Ταυτοχρόνως, η αξιοποίησή τους έχει οικονομικά αλλά και σημαντικά περιβαλλοντολογικά πλεονεκτήματα.

Πληθώρα in vitro μελετών έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών δράσεων των υποπροϊόντων οινοποίησης αναδεικνύοντας ενθαρρυντικά δεδομένα. Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, ερευνήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιαιμοπεταλική δράση διαφόρων εκχυλισμάτων από υποπροϊόντα οινοποίησης. Καταλληλότερος διαλύτης αναδείχθηκε η αιθανόλη και επιλέχθηκε για το εκχύλισμα που χορηγήθηκε και στην παρούσα μελέτη το οποίο φάνηκε να εμφανίζει πολύ καλή in vitro αντιοξειδωτική και αντιαιμοπεταλική ικανότητα. **(112)**

Σε αντίθεση με τα in vitro δεδομένα, υπάρχουν πολύ λίγες κλινικές δοκιμές σήμερα, που να αξιολογούν τις δράσεις των υποπροϊόντων. Αυτό το κενό προσπαθεί να αναπληρώσει και η ευρύτερη μελέτη στην οποία εντάσσεται και η συγκεκριμένη εργασία, πηγαίνοντας ένα βήμα παρακάτω την έρευνα της δράσης του εκχυλίσματος στεμφύλων που δημιουργήσαμε. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μεταγευματική μελέτη σε πληθυσμό φαινομενικά υγειών γυναικών οι οποίες, παράλληλα με ένα γεύμα, κατανάλωσαν είτε κάψουλες που περιείχαν εκχύλισμα υποπροϊόντων οινοποίησης είτε εικονικές κάψουλες. Με αυτήν την παρέμβαση θέλουμε να προσδιορίσουμε τις μεταβολές που επιφέρει στην δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, και συγκεκριμένα της SOD, η κατανάλωση του γεύματος αρχικά και η ποσότητα των φαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος ακολούθως. Το γεύμα ήταν θερμιδικής αξίας 1131kcal αποτελούμενο από 56γρ. (19,7%) υδατανθράκων, 84γρ. (66,7%) λίπος και 32γρ. (11,2%) πρωτεΐνης.

Όσον αφορά την επίδραση του γεύματος αυτού καθ' αυτού (ομάδα αναφοράς με το εικονικό σκεύασμα) στα επίπεδα της SOD στο σύνολο των εθελοντριών, δεν φαίνεται να προκάλεσε σημαντική μεταβολή ($p>0,05$). Συγκεκριμένα, σε σύγκριση των επιμέρους χρονικών στιγμών με τα επίπεδα έναρξης κάθε παρέμβασης, φαίνεται να υπάρχει στα 60 λεπτά μία τάση για μείωση της SOD της τάξεως του 17%, τόσο στο σύνολο των εθελοντριών όσο και στις νορμοβαρείς γυναίκες, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Μόνο στην κατηγορία των νορμοβαρών βρέθηκε μείωση στο ένζυμο που θα μπορούσε να θεωρηθεί σττιστικά σημαντική στα 210 λεπτά ($p=0,069$).

Στην βιβλιογραφία, αντιθέτως, η πλειονότητα των μεταγευματικών μελετών που μελετούν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά από κατανάλωση υψηλά θερμιδικού γεύματος με αυξημένη περιεκτικότητα υδατανθράκων ή λιπών ή και των δύο, δείχνει μία αύξηση στους δείκτες οξειδωτικού στρες ακόμα και με κατανάλωση λιγότερων θερμίδων από αυτές του δικού μας γεύματος. Σε μελέτη με 20 υγιείς ενήλικες που κατανάλωσαν γεύμα 805kcal περιεκτικότητας 50γρ. υδατανθράκων και 53,4γρ. λίπους (60%) παρατηρήθηκε αύξηση του παραγόμενου

ανινόντος του υπεροξειδίου και μικρή μείωση της α-τοκοφερόλης. **(141)** Σε αντίστοιχη μελέτη με παραπλήσιο γεύμα (900kcal με 55γρ.υδατάνθρακες και 50γρ. λίπος/50%) που έγινε σε 17 υγιείς άνδρες, αυξήθηκε ο λόγος oxLDL/LDL και MDA στις 6 ώρες. **(144)** Ακόμα, μελέτη σε 9 υγιείς άνδρες έδειξε μάλιστα ότι μόνο το πλούσιο σε λίπος γεύμα οδήγησε σε σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες και της λιπαιμίας σε σύγκριση με το αντίστοιχο ισοθερμιδικό υδατανθρακικό γεύμα αλλά και με το λιπιδικό υποθερμιδικό γεύμα. Η συγκεκριμένη παρέμβαση χρησιμοποίησε τέσσερα γεύματα διαφορετικής περιεκτικότητας αλλά και αναλογίας υδατανθράκων και λιπών. Σημειώθηκε αύξηση TAG, MDA και υπεροξειδίου του υδρογόνου μόνο στην παρέμβαση γεύματος 66 γρ. λίπους που προσέφερε 600 kcal. **(145)**

Προχωρώντας στην επίδραση του εκχυλίσματος των υποπροϊόντων, συγκρίνοντας για αρχή τις δύο παρεμβάσεις μεταξύ τους, είδαμε ότι στην χρονική στιγμή των 120 λεπτών, υπάρχει εμφανής μείωση της τάξεως του 25% στην SOD της παρέμβασης με το εκχύλισμα σε σχέση με την παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα η οποία αφορά την ομάδα του ΔΜΣ>25 kg/m^2 (p=0,093) αλλά και το σύνολο των εθελοντριών (p=0,077). Επιπλέον, στην παρέμβαση του εκχυλίσματος φάνηκε εξ αρχής η διαφοροποίησή της μεταβολής της SOD σε σχέση με την αρχική της κατάσταση (SOD νηστείας) αφού p_{time} = 0,066. Συγκρίνοντας τις επιμέρους χρονικές στιγμές με τα επίπεδα έναρξης της παρέμβασης, τρεις εξ αυτών πρωταγωνιστούν. Στην χρονική στιγμή των 120 λεπτών η SOD είναι μειωμένη κατά 26% στο σύνολο των εθελοντών (p=0,035), μεταβολή η οποία φαίνεται να οφείλεται στην ομάδα των υπέρβαρων γυναικών αφού και σε αυτήν την κατηγορία το ένζυμο ήταν σημαντικά μειωμένο (p=0,028) κατά 23%. Στα 210 λεπτά το ένζυμο μειώθηκε κατά 14% στο σύνολο του πληθυσμού (p=0,048) πιθανώς εξ' αιτίας της ομάδα του φυσιολογικού βάρους αφού κι εκεί βρέθηκε μείωση της τάξεως του 15% με p=0,093. Τέλος, τη χρονική στιγμή 300 στην ομάδα του ΔΜΣ>25 kg/m^2 το ένζυμο ήταν μειωμένο κατά 20% (p=0,046).

Από την βιβλιογραφία, δύο μόνο μελέτες έχουν εξετάσει τη μεταγευματική επίδραση των υποπροϊόντων οινοποίησης σε δείκτες οξειδωτικού στρες, ενώ η πλειοψηφία αφορά μακροχρόνιες παρεμβάσεις. Από τις τελευταίες, μία που εξέτασε την δραστικότητα του ενζύμου της SOD έδειξε αύξηση αυτού μετά από παρέμβαση 10 εβδομάδων. Συγκεκριμένα, η έρευνα αφορούσε 76 εθελοντές ηλικίας 30-70 ετών με ΔΜΣ ≥ 23 kg/m^2. Η παρέμβαση εξέτασε δύο ποσότητες στεμφύλων, 342,5 και 685 mg φαινολικών ανά ημέρα, οι οποίες δόθηκαν παράλληλα με ένα φρούτο ονόματι omija, 57,5 και 115 mg φαινολικών αντίστοιχα. Η τρίτη παρέμβαση έγινε με εικονικό σκεύασμα. Παρατηρήθηκε αύξηση του ενζύμου και στις δύο ποσότητες των στεμφύλων

με ταυτόχρονη μείωση οξειδωτικών δεικτών όπως της ολικής χοληστερόλης, της LDL,της μη-HDL, του TNF-α, των TBARS,του H_2O_2 κ.α. **(131)**

Ανατρέχοντας τώρα στις μεταγευματικές μελέτες, μόνο στη μία βρέθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η μελέτη αφορούσε 8 υγιείς άνδρες 25 έως 40 ετών στους οποίους δόθηκε εκχύλισμα γιγάρτων 300 mg πολυφανολών ή εικονικό σκεύμασμα παράλληλα με γεύμα που κάλυπτε το 40% των ημερήσιων ενεργειακών αναγκών του κάθε εθελοντή (18% πρωτεΐνη, 32% λίπος, 50% υδατάνθρακες). Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση σε δείκτες όπως το ασκορβικό οξύ, οι σουλφυδρυομάδες και η TRAP στα 60 λεπτά μόλις η οποία και διατηρήθηκε στα 180 λεπτά. Ταυτόχρονα υπήρξε μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων, στα 60 λεπτά μετά τη λήψη του συμπληρώματος. **(124)** Αντιθέτως, σε μελέτη που συμμετείχαν 20 εθελοντές ηλικίας 40-60 ετών με κεντρική παχυσαρκία στους οποίους δόθηκε συμπλήρωμα από στέμφυλα σταφυλιών (και ροδιού) και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη μαζί με το συμπλήρωμα ή μετά από 10 ώρες, δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά σε δείκτες οξειδωτικού στρες ή αντιοξειδωτικής ικανότητας. **(134)**

Με σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης μας με αυτά της έρευνας **131,** καθώς αφορούν και τα δύο το ίδιο ένζυμο, σημειώνεται ότι η παρατηρηθείσα μεταβολή σε εμάς αφορά μείωση και όχι αύξηση του ενζύμου. Αυτό το στοιχείο από μόνο του δεν μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για το οξειδωτικό στρες, καθώς η SOD είναι ένας μόνο εκ των πολλών μηχανισμών που εμπλέκονται στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και θα μπορούσε να δρα και να αλληλοεπιδρά με ποικίλους διαφορετικούς τρόπους σε κάθε περίπτωση. Μία μείωση της θα μπορούσε να ισοδυναμεί με χαμηλή δραστικότητα ενός εκ των σημαντικότερων αντιοξειδωτικών ενζύμων αλλά θα μπορούσε να δείχνει και αυξημένη χρήση του, άρα και αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Με άλλα λόγια, το εκχύλισμα των στεμφλύλων των υπορποϊόντων οινοποίησης μπορεί να δρα είτε ενισχυτικά της λειτουργίας της, είτε ανασταλτικά, θέτοντας την μη απαραίτητη λόγω επίτευξης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μέσω των προσφερόμενων αντιοξειδωτικών συστατικών των πολυφαινολών. Η αυξομείωση ενός και μόνο ενζύμου δεν μπορεί να μας δώσει ασφαλή συγκεντρωτικά συμπεράσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος in vivo.

Δεν θα μπορούσαμε να μην αναφέρουμε ότι η μελέτη μας έγινε κάτω από συγκεκριμένα κριτήρια, γεγονός που θέτει ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, το δείγμα μας αποτελούταν αποκλειστικά από φαινομενικά υγιείς γυναίκες οπότε το οποιοδήποτε αποτέλεσμα δεν μπορεί να γενικευτεί στον γενικό πληθυσμό. Το δείγμα δεν χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία αλλά και ούτε από κάποιον άλλο παθολογικό παράγοντα. Αυτό πιθανότατα να άλλαζε τα δεδομένα μας καθώς γνωρίζουμε ότι παθολογικές καταστάσεις όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης και η παχυσαρκία χαρακτηρίζονται από αυξημένο οξειδωτικό στρες. Παράλληλα, η παρέμβαση που εφαρμόσαμε δεν ήταν

δοσοεξαρτώμενη, αφορούσε μία συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος στεμφύλων χωρίς να εξετασθεί τυχόν διαφορά αν η δοσολογία τους ήταν μικρότερη ή μεγαλύτερη. Ένας ακόμη περιορισμός, είναι ότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η κατανάλωση του γεύματος αυτή καθ' αυτή, θα έπρεπε να οδηγήσει σε αύξηση του οξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε κάποιο τέτοιο αποτέλεσμα, όσον αφορά την μέτρηση της δραστικότητας της SOD τουλάχιστον. Χωρίς την αύξηση αυτή στο οξειδωτικό στρες οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οι οποίες συμβαίνουν αφορούν διατήρηση και όχι αποκατάσταση της ομοιόστασης. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν μόνο ένα μέρος της μεταγευματικής κλινικής δοκιμής η οποία βρίσκεται υπο-εξέλιξη, καθώς υπολείπονται τόσο κι άλλες εθελόντριες να ολοκληρώσουν τις παρεμβάσεις, όσο κι άλλοι δείκτες οξειδωτικού στρες να μελετηθούν πέρα της SOD. Εν κατακλείδι, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα προς το παρόν.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η κατανάλωση εκχυλίσματος στέμφυλων, παράλληλα με ένα πλούσιο σε λίπος γεύμα, έδειξε να έχει κάποια επίδραση στην δραστικότητα της SOD, σε νορμοβαρείς αλλά και σε υπέρβαρες φαινομενικά υγιείς νέες γυναίκες. Παρόλα αυτά, δεν μπορούν να εξαχθούν ακόμα ασφαλή συμπεράσματα καθώς η κλινική δοκιμή βρίσκεται υπο-εξέλιξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. BioMed research international, 2014.
2. Ceriello A, Testa R, Genovese S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2016 Apr;26(4):285-92.
3. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian journal of clinical biochemistry, 30(1), 11-26.
4. Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Oxygen Radicals In Biological Systems Part B: Oxygen Radicals And Antioxidants, 1-85.
5. SEN, C. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. Medicine And Science In Sports And Exercise, 33(3), 368-370.
6. Gropper Sarren S., Smith Jack L., Groff Jones (επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Λάμπρος Συντώσης), Διατροφή και Μεταβολισμός, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007 (Τόμος ΙΙ)
7. Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1985). Free radicals in biology and medicine. Journal Of Free Radicals In Biology & Medicine, 1(4), 331-332.
8. Di Meo, S., Reed, T., Venditti, P., & Victor, V. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. Oxidative Medicine And Cellular Longevity, 2016, 1-44.
9. Venditti, P., & Di Meo, S. (2020). The Role of Reactive Oxygen Species in the Life Cycle of the Mitochondrion. International Journal Of Molecular Sciences, 21(6), 2173.
10. Chen, Q., Vazquez, E., Moghaddas, S., Hoppel, C., & Lesnefsky, E. (2003). Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. Journal Of Biological Chemistry, 278(38), 36027-36031.
11. Berg, Jeremy M., Stryer, Lubert, Tymoczko, John L. (απόδοση στα ελληνικά) (2014). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
12. Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free radical biology and medicine, 29(3-4), 222-230.
13. Δημόπουλος, Κ., Αντωνοπούλου, Σ. (2020). Βασική Βιοχημεία. Αθήνα : Εκδόσεις Νέον

14. Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nature reviews Molecular cell biology, 15(6), 411-421.
15. Del Río, L. A., & López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. Plant and Cell Physiology, 57(7), 1364-1376.
16. Tu, B., & Weissman, J. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes. Journal Of Cell Biology, 164(3), 341-346.
17. Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 93(5), 1464-1476.
18. Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Yoo, Y. D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. Molecules and cells, 32(6), 491-509.
19. Aziz, N., & Jamil, R. T. (2019). Biochemistry, Xanthine Oxidase.
20. Schmidt, H. M., Kelley, E. E., & Straub, A. C. (2019). The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. Redox biology, 21, 101072.
21. Cantu-Medellin, N., & Kelley, E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: a process in critical need of reevaluation. Redox biology, 1(1), 353-358.
22. Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 567(1), 1-61.
23. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clinical chemistry, 52(4), 601-623.
24. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria journal of medicine, 54(4), 287-293.
25. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxidants & redox signaling, 15(6), 1583-1606.
26. Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes 1. The FASEB Journal, 6(9), 2675-2683.
27. Hsu, J. L., Hsieh, Y., Tu, C., O'Connor, D., Nick, H. S., & Silverman, D. N. (1996). Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry, 271(30), 17687-17691.
28. Sah, S. K., Agrahari, G., & Kim, T. Y. (2020). Insights into superoxide dismutase 3 in regulating biological and functional properties of mesenchymal stem cells. Cell & Bioscience, 10(1), 1-12.
29. Matés, J. M., & Sánchez-Jiménez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci, 4(4), D339-D345.

30. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. Oxidative medicine and cellular longevity, 2019.
31. Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1830(5), 3289-3303.
32. Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxidative medicine and cellular longevity, 3(4), 228-237.
33. Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 28(2).
34. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Advances in medical sciences, 63(1), 68-78.
35. Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutrition journal, 15(1), 1-22.
36. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European journal of medicinal chemistry, 97, 55-74.
37. Nguyen, H., & Gupta, V. (2021). Alpha-Lipoic Acid. StatPearls [Internet].
38. Maruhashi, T., Kihara, Y., & Higashi, Y. (2019). Bilirubin and endothelial function. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 26(8), 688-696.
39. Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. Critical reviews in food science and nutrition, 48(7), 649-671.
40. Λάμπρος Συντώσης, Κατερίνα Σκενδέρη, Διατροφή & Μεταβολισμός, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης/ 2016 Broken Hill Publishers (Μέρος Ι)
41. Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., (ελληνική επιμέλεια Τσακόπουλος Μ.) (2011). Φυσιολογία του ανθρώπου: Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού. Broken Hill Publishers
42. Sottero, B., Gargiulo, S., Russo, I., Barale, C., Poli, G., & Cavalot, F. (2015). Postprandial Dysmetabolism and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies. Medicinal Research Reviews, 35(5), 968-1031.
43. Lebovitz, H. E. (2001). Effect of the postprandial state on nontraditional risk factors. The American journal of cardiology, 88(6), 20-25.
44. Kahn, R. (2001). Postprandial blood glucose. Diabetes Care, 24(4), 775-778.
45. Pappas, C., Kandaraki, E., Tsirona, S., Kountouras, D., Kassi, G., & Diamanti-Kandarakis, E. (2016). Postprandial dysmetabolism: Too early or too late?. HORMONES, 15(3).

46. Lambert, J., & Parks, E. (2012). Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids, 1821(5), 721-726.
47. O'Keefe, J., & Bell, D. (2007). Postprandial Hyperglycemia/Hyperlipidemia (Postprandial Dysmetabolism) Is a Cardiovascular Risk Factor. The American Journal Of Cardiology, 100(5), 899-904.
48. Sottero, B., Gargiulo, S., Russo, I., Barale, C., Poli, G., & Cavalot, F. (2015). Postprandial Dysmetabolism and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies. Medicinal Research Reviews, 35(5), 968-1031.
49. Tushuizen, M. (2005). Postprandial dysmetabolism and cardiovascular disease in type 2 diabetes. Postgraduate Medical Journal, 81(951), 1-6.
50. Sies, H., Stahl, W., & Sevanian, A. (2005). Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. The Journal Of Nutrition, 135(5), 969-972.
51. Ceriello, A., & Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 24(5), 816-823.
52. Λιάσκος, Χ., Κατσιλάμπρος, Ν. (2017) Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός. Αρχεία ελληνικής ιατρικής. 34(1):127-131
53. Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Macronutrient specific postprandial oxidative stress: relevance to the development of insulin resistance. Current Diabetes Reviews, 5(4), 228-238.
54. Lefebvre, P. J., & Scheen, A. J. (1999). Glucose metabolism and the postprandial state. European journal of clinical investigation, 29, 1-6.
55. Muñoz, A., & Costa, M. (2013). Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013.
56. Ursini, F., & Sevanian, A. (2002). Postprandial oxidative stress.
57. Wallace, J. P., Johnson, B., Padilla, J., & Mather, K. (2010). Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review. International journal of clinical practice, 64(3), 389-403.
58. Κουράκου – Δραγώνα, Σ. (1998). Θέματα οινολογίας. Εκδόσεις Τροχαλία, ISBN: 960-7809-29-7
59. Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. Journal of clinical laboratory analysis, 11(5), 287-313.

60. Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. Critical reviews in food science and nutrition, 45(4), 265-286.
61. Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. Trends in Food Science & Technology, 17(11), 579-590.
62. Renaud, S. D., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. The Lancet, 339(8808), 1523-1526
63. Fragopoulou, E., & Antonopoulou, S. (2020). The French paradox three decades later: Role of inflammation and thrombosis. Clinica Chimica Acta, 510, 160-169.
64. Haseeb, S., Alexander, B., Santi, R. L., Liprandi, A. S., & Baranchuk, A. (2019). What's in wine? A clinician's perspective. Trends in Cardiovascular Medicine, 29(2), 97-106.
65. Σουφλερός Η. Ευάγγελος. Οινολογία, επιστήμη και τεχνογνωσία, τόμος Ι. Θεσσαλονίκη 2000. Ιδιωτική έκδοση. Ανατύπωση 2009
66. Fragopoulou, E., Antonopoulou, S., & Demopoulos, C. A. (2002). Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(9), 2684-2694.
67. Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. International journal of molecular sciences, 15(9), 15638-15678.
68. Monagas Juan, M. J., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine.
69. Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, 2(12), 1231-1246.
70. Fragopoulou, E., Petsini, F., Choleva, M., Detopoulou, M., S Arvaniti, O., Kallinikou, E., ... & Samaras, Y. (2020). Evaluation of anti-inflammatory, anti-platelet and anti-oxidant activity of wine extracts prepared from ten different grape varieties. Molecules, 25(21), 5054.
71. Covas, M. I., Gambert, P., Fitó, M., & de la Torre, R. (2010). Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. Atherosclerosis, 208(2), 297-304
72. Fragopoulou, E., Choleva, M., Antonopoulou, S., & Demopoulos, C. A. (2018). Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. Metabolism, 83, 102-119.
73. Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. Clinica Chimica Acta, 412(5-6), 410-424.

74. Arranz, S., Chiva-Blanch, G., Valderas-Martínez, P., Medina-Remón, A., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2012). Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. Nutrients, 4(7), 759-781.
75. Mathews, M. J., Liebenberg, L., & Mathews, E. H. (2015). The mechanism by which moderate alcohol consumption influences coronary heart disease. Nutrition journal, 14(1), 1-12.
76. Peralbo-Molina, Á., & de Castro, M. D. L. (2013). Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. Trends in Food Science & Technology, 32(1), 16-24
77. Nerantzis, E. T., & Tataridis, P. (2006). Integrated enology-utilization of winery by-products into high added value products. J. Sci. Tech, 1, 79-89.
78. Giacobbo, A., Dias, B. B., Onorevoli, B., Bernardes, A. M., de Pinho, M. N., Caramão, E. B., ... & Jacques, R. A. (2019). Wine lees from the 1st and 2nd rackings: valuable by-products. Journal of food science and technology, 56(3), 1559-1566.
79. Jara-Palacios, M. J. (2019). Wine lees as a source of antioxidant compounds. Antioxidants, 8(2), 45
80. Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. International Journal of Food Science & Technology, 48(2), 221-237.
81. Gerardi, G., Cavia-Saiz, M., & Muñiz, P. (2021). From winery by-product to healthy product: Bioavailability, redox signaling and oxidative stress modulation by wine pomace product. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1-23.
82. Beres, C., Costa, G. N., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S., Cruz, A. P., ... & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. Waste management, 68, 581-594.
83. Ma, Z. F., & Zhang, H. (2017). Phytochemical constituents, health benefits, and industrial applications of grape seeds: A mini-review. Antioxidants, 6(3), 71.
84. Lucarini, M., Durazzo, A., Romani, A., Campo, M., Lombardi-Boccia, G., & Cecchini, F. (2018). Bio-based compounds from grape seeds: A biorefinery approach. Molecules, 23(8), 1888.
85. Ribeiro, L. F., Ribani, R. H., Francisco, T. M. G., Soares, A. A., Pontarolo, R., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Profile of bioactive compounds from grape pomace (Vitis vinifera and Vitis labrusca) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. Journal of chromatography B, 1007, 72-80.

86. Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). Understanding wine chemistry. John Wiley & Sons.
87. Machado, N. F., & Domínguez-Perles, R. (2017). Addressing facts and gaps in the phenolics chemistry of winery by-products. Molecules, 22(2), 286.
88. Hogervorst, J. C., Miljić, U., & Puškaš, V. (2017). Extraction of bioactive compounds from grape processing by-products. In Handbook of grape processing by-products (pp. 105-135). Academic Press.
89. Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J., & Gullón, P. (2017). The biorefinery concept for the industrial valorization of grape processing by-products. In Handbook of Grape Processing By-Products (pp. 29-53). Academic Press.
90. Sun, T., Chen, Q. Y., Wu, L. J., Yao, X. M., & Sun, X. J. (2012). Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. Food and chemical toxicology, 50(10), 3462-3467.
91. Mukamal, K. J., & Rimm, E. B. (2008). Alcohol consumption: risks and benefits. Current atherosclerosis reports, 10(6), 536-543.
92. Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. The American journal of clinical nutrition, 81(1), 223S-229S.
93. Hussain, M., Cholette, S., & Castaldi, R. M. (2008). An analysis of globalization forces in the wine industry: implications and recommendations for wineries. Journal of Global Marketing, 21(1), 33-47.
94. 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture. [(accessed on 6 March 2020)];2019 Available online: https://www.scribd.com/document/477017910/2019-world-vitiviniculture
95. Beres, C., Costa, G. N., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S., Cruz, A. P., ... & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. Waste management, 68, 581-594.
96. García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(1), 3-22.
97. Pereira, P., Palma, C., Ferreira-Pêgo, C., Amaral, O., Amaral, A., Rijo, P., ... & Nicolai, M. (2020). Grape Pomace: A Potential Ingredient for the Human Diet. Foods, 9(12), 1772.
98. Brito, A. G., Peixoto, J., Oliveira, J. M., Oliveira, J. A., Costa, C., Nogueira, R., & Rodrigues, A. (2007). Brewery and winery wastewater treatment: some focal points of design and operation. In Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry (pp. 109-131). Springer, Boston, MA.

99. Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (Vitis vinifera L. and Vitis labrusca L.) widely produced in Brazil. Food chemistry, 127(1), 174-179.
100. Amerine, A., & Joslyn, M. A. (1987). Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production. Berkeley: University of California Press, 234-238.
101. Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. R. (2014). The market potential of grape waste alternatives. Journal of Food Research, 3(2), 91-91.
102. Gómez-Brandón, M., Lores, M., Insam, H., & Domínguez, J. (2019). Strategies for recycling and valorization of grape marc. Critical reviews in biotechnology, 39(4), 437-450
103. Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J., & Gullón, P. (2017). The biorefinery concept for the industrial valorization of grape processing by-products. In Handbook of Grape Processing By-Products (pp. 29-53). Academic Press.
104. Muhlack, R. A., Potumarthi, R., & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. Waste management, 72, 99-118.
105. Soceanu, A., Dobrinas, S., Sirbu, A., Manea, N., & Popescu, V. (2021). Economic aspects of waste recovery in the wine industry. A multidisciplinary approach. Science of The Total Environment, 759, 143543.
106. Soto, M. L., Falqué, E., & Domínguez, H. (2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. Cosmetics, 2(3), 259-276.
107. Τιτάκης-Καρτσωνάκης Γ. (2006). Αξιοποίηση των στεμφύλων (στερεά υπολείμματα οινοποίησης) σε μονάδες παραγωγής εκχυλισμάτων σταφυλής πλούσιων σε πολυφαινόλες. Διπλωματική Εργασία
108. Iora, S. R., Maciel, G. M., Zielinski, A. A., da Silva, M. V., Pontes, P. V. D. A., Haminiuk, C. W., & Granato, D. (2015). Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. International Journal of Food Science & Technology, 50(1), 62-69.
109. Trikas, E., Melidou, M., Papi, R., Zachariadis, G., & Kyriakidis, D. (2016). Extraction, separation and identification of anthocyanins from red wine by-product and their biological activities. Journal Of Functional Foods, 25, 548-558.
110. De Sales, N. F., Silva da Costa, L., Carneiro, T. I., Minuzzo, D. A., Oliveira, F. L., Cabral, L., ... & El-Bacha, T. (2018). Anthocyanin-rich grape pomace extract (Vitis vinifera L.) from

wine industry affects mitochondrial bioenergetics and glucose metabolism in human hepatocarcinoma HepG2 cells. Molecules, 23(3), 611.

111. Luchian, C. E., Cotea, V. V., Vlase, L., Toiu, A. M., Colibaba, L. C., Răschip, I. E., ... & Rotaru, L. (2019). Antioxidant and antimicrobial effects of grape pomace extracts. In BIO Web of Conferences (Vol. 15, p. 04006). EDP Sciences.

112. Choleva, M., Boulougouri, V., Panara, A., Panagopoulou, E., Chiou, A., Thomaidis, N. S., ... & Fragopoulou, E. (2019). Evaluation of anti-platelet activity of grape pomace extracts. Food & Function, 10(12), 8069-8080.

113. Kiralan, M., Ulaş, M., Özaydin, A., Özdemır, N., Özkan, G., Bayrak, A., & Ramadan, M. F. (2017). Blends of cold pressed black cumin oil and sunflower oil with improved stability: A study based on changes in the levels of volatiles, tocopherols and thymoquinone during accelerated oxidation conditions. Journal of food biochemistry, 41(1), e12272.

114. González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., & Teissedre, P. L. (2012). Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (Vitis vinifera L.). Journal of agricultural and food chemistry, 60(48), 11850-11858.

115. Romero-Díez, R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., Duarte, C. M., Matias, A. A., & Bronze, M. R. (2018). Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. Food chemistry, 259, 188-195.

116. Triqui, R., & Bouchriti, N. (2003). Freshness assessments of Moroccan sardine (Sardina pilchardus): comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. Journal of agricultural and food chemistry, 51(26), 7540-7546.

117. Melo, P. S., Massarioli, A. P., Denny, C., dos Santos, L. F., Franchin, M., Pereira, G. E., ... & de Alencar, S. M. (2015). Winery by-products: extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. Food Chemistry, 181, 160-169.

118. Reis, G. M., Faccin, H., Viana, C., Rosa, M. B. D., & de Carvalho, L. M. (2016). Vitis vinifera L. cv Pinot noir pomace and lees as potential sources of bioactive compounds. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 67(7), 789-796.

119. Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. Food research international, 43(3), 805-813.

120. García-Lomillo, J., Gonzalez-SanJose, M. L., Del Pino-García, R., Rivero-Perez, M. D., & Muniz-Rodriguez, P. (2014). Antioxidant and antimicrobial properties of wine byproducts and

their potential uses in the food industry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(52), 12595-12602.

121. Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. Food Chemistry, 253, 132-138.
122. Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 20(2), 125-132.
123. Jara-Palacios, M. J., Gonçalves, S., Hernanz, D., Heredia, F. J., & Romano, A. (2018). Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. Food Research International, 109, 433-439.
124. Natella, F., Belelli, F., Gentili, V., Ursini, F., & Scaccini, C. (2002). Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. Journal of Agricultural and food Chemistry, 50(26), 7720-7725.
125. Vigna, G. B., Costantini, F., Aldini, G., Carini, M., Catapano, A., Schena, F., ... & Facino, R. M. (2003). Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. Metabolism, 52(10), 1250-1257.
126. Sano, A., Uchida, R., Saito, M., Shioya, N., Komori, Y., Tho, Y., & Hashizume, N. (2007). Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. Journal of nutritional science and vitaminology, 53(2), 174-182.
127. Kar, P., Laight, D., Rooprai, H. K., Shaw, K. M., & Cummings, M. (2009). Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. Diabetic Medicine, 26(5), 526-531.
128. Mellen, P. B., Daniel, K. R., Brosnihan, K. B., Hansen, K. J., & Herrington, D. M. (2010). Effect of muscadine grape seed supplementation on vascular function in subjects with or at risk for cardiovascular disease: a randomized crossover trial. Journal of the American College of Nutrition, 29(5), 469-475.
129. Weseler, A. R., Ruijters, E. J., Drittij-Reijnders, M. J., Reesink, K. D., Haenen, G. R., & Bast, A. (2011). Pleiotropic benefit of monomeric and oligomeric flavanols on vascular health-a randomized controlled clinical pilot study. PLoS One, 6(12), e28460.

130. Urquiaga, I., D'Acuña, S., Pérez, D., Dicenta, S., Echeverría, G., Rigotti, A., & Leighton, F. (2015). Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: A randomized controlled trial. Biological Research, 48(1), 1-10.

131. Han, H. J., Jung, U. J., Kim, H. J., Cho, S. J., Kim, A. H., Han, Y., & Choi, M. S. (2016). Combined supplementation with grape pomace and omija fruit ethanol extracts dose-dependently improves body composition, plasma lipid profiles, inflammatory status, and antioxidant capacity in overweight and obese subjects. Journal of medicinal food, 19(2), 170-180.

132. Safaei, N., Babaei, H., Azarfarin, R., Jodati, A. R., Yaghoubi, A., & Sheikhalizadeh, M. A. (2017). Comparative effect of grape seed extract (Vitis vinifera) and ascorbic acid in oxidative stress induced by on-pump coronary artery bypass surgery. Annals of cardiac anaesthesia, 20(1), 45.

133. Urquiaga, I., Troncoso, D., Mackenna, M. J., Urzúa, C., Pérez, D., Dicenta, S., ... & Rigotti, A. (2018). The consumption of beef burgers prepared with wine grape pomace flour improves fasting glucose, plasma antioxidant levels, and oxidative damage markers in humans: a controlled trial. Nutrients, 10(10), 1388.

134. Pérez-Ramírez, I. F., de Diego, E. H., Riomoros-Arranz, M., Reynoso-Camacho, R., Saura-Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (2020). Effects of acute intake of grape/pomegranate pomace dietary supplement on glucose metabolism and oxidative stress in adults with abdominal obesity. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 71(1), 94-105.

135. Gropper SarrenS., Smith JackL., Groff Jones (επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Λάμπρος Συντώσης), Διατροφή και Μεταβολισμός, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007(ΤόμοςΙ)

136. Mohanty, P., Hamouda, W., Garg, R., Aljada, A., Ghanim, H., & Dandona, P. (2000). Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. The journal of clinical endocrinology & metabolism, 85(8), 2970-2973.

137. Nappo, F., Esposito, K., Cioffi, M., Giugliano, G., Molinari, A. M., Paolisso, G., ... & Giugliano, D. (2002). Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. Journal of the American College of Cardiology, 39(7), 1145-1150.

138. Ceriello, A., Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., … & Giugliano, D. (2004). Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. Diabetes, 53(3), 701-710.

139. Miyazaki, Y., Kawano, H., Yoshida, T., Miyamoto, S., Hokamaki, J., Nagayoshi, Y., ... & Ogawa, H. (2007). Pancreatic B-cell function is altered by oxidative stress induced by acute hyperglycaemia. Diabetic Medicine, 24(2), 154-160.

140. Mah, E., Noh, S. K., Ballard, K. D., Matos, M. E., Volek, J. S., & Bruno, R. S. (2011). Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine: arginine. The Journal of nutrition, 141(11), 1961-1968.

141. Bae, J. H., Bassenge, E., Kim, K. B., Kim, Y. N., Kim, K. S., Lee, H. J., ... & Schwemmer, M. (2001). Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. Atherosclerosis, 155(2), 517-523.

142. Bae, J. H., Schwemmer, M., Lee, I. K., Lee, H. J., Park, K. R., Kim, K. Y., & Bassenge, E. (2003). Postprandial hypertriglyceridemia-induced endothelial dysfunction in healthy subjects is independent of lipid oxidation. International journal of cardiology, 87(2-3), 259-267.

143. Tsai, W. C., Li, Y. H., Lin, C. C., Chao, T. H., & Chen, J. H. (2004). Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. Clinical Science, 106(3), 315-319.

144. Tushuizen, M. E., Nieuwland, R., Scheffer, P. G., Sturk, A., Heine, R. J., & Diamant, M. (2006). Two consecutive high-fat meals affect endothelial-dependent vasodilation, oxidative stress and cellular microparticles in healthy men. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 4(5), 1003-1010.

145. Bloomer, R. J., Kabir, M. M., Marshall, K. E., Canale, R. E., & Farney, T. M. (2010). Postprandial oxidative stress in response to dextrose and lipid meals of differing size. Lipids in health and disease, 9(1), 1-11.

146. Xanthopoulou, M. N., Fragopoulou, E., Kalathara, K., Nomikos, T., Karantonis, H. C., & Antonopoulou, S. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. Food chemistry, 120(3), 665-672.