



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

### **Πτυχιακή Εργασία**

**«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ  
ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ (ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΩΝ) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΕ  
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ»**



**ΣΑΝΤΟΡΙΝΑΚΗ ΗΛΙΑΝΑ**

**ΑΜ: 71617176**

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:**

**ΘΑΛΕΙΑ ΤΣΙΑΚΑ**

**Αθήνα, Φεβρουάριος 2023**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**SCHOOL OF FOOD SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**Diploma Thesis**

**«METABOLIC SYNDROMES AND FUNCTIONAL FOODS: DETERMINATION OF  
INFLAMMATION MARKERS (ISOPROSTANES) USING CHROMATOGRAPHIC  
TECHNIQUES IN CLINICAL SAMPLES»**

**SANTORINAKI ILIANA**

**RN: 71617176**

**Supervisor:**

**THALIA TSIAKA**

**Athens, February 2023**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ  
ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ (ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΩΝ) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΕ  
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ»**

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή**

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

<b>A/α</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>1.</b>	<b>Θάλεια Τσιάκα</b>	<b>Διδακτικό προσωπικό ΕΣΠΑ</b>	
<b>2.</b>	<b>Παναγιώτης Ζουμπουλάκης</b>	<b>Αναπληρωτής Καθηγητής</b>	
<b>3.</b>	<b>Σωτήριος Μπρατάκος</b>	<b>ΕΔΙΠ</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Σαντορινάκη Ηλιάνα του Χαράλαμπου, με αριθμό μητρώου 71617176 και φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου.»

Η Δηλούσα



## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, τα λειτουργικά τρόφιμα βρίσκονται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω των βιοδραστικών συστατικών τους και των ευεργετικών, για την ανθρώπινη υγεία, δράσεων που παρουσιάζουν. Τα μανιτάρια και διάφορα προϊόντα τους, συνιστούν τρόφιμα με πληθώρα λειτουργικών συστατικών. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των λειτουργικών τροφίμων στην αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων που προκαλούν διάφορα μεταβολικά σύνδρομα, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, κ.ά. Επιπλέον, τα ισοπροστανία, που ανήκουν στα ενδογενή λιπίδια και παράγονται, μέσω διατροφής, από ω-6 λιπαρά οξέα, αποτελούν χαρακτηριστικούς βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Για αυτό το λόγο, επιλέγονται ως κατάλληλες υπό μελέτη ενώσεις σε διατροφικές κλινικές μελέτες που περιλαμβάνουν εθελοντές με μεταβολικά σύνδρομα. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο προσδιορισμός ισοπροστανίων, σε δείγματα πλάσματος αίματος εθελοντών με μεταβολικά σύνδρομα, που έχουν λάβει λειτουργικό σνακ μανιταριών με χρήση υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας, (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) και ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου LC-MS με σκοπό τον προσδιορισμό ισοπροστανίων σε δείγματα εθελοντών. Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου LC-MS, το περιεχόμενο των ισοπροστανίων στο πλάσμα των εθελοντών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ELISA. Τέλος, έγινε στατιστική αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της διατροφής (λειτουργικό σνακ μανιταριού) στις συγκεντρώσεις ισοπροστανίων και στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες και φλεγμονής.

**Λέξεις κλειδιά:** Λειτουργικά τρόφιμα, μανιτάρια, μεταβολικά σύνδρομα, οξειδωτικό στρες, φλεγμονή, ισοπροστανία, υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS), ενζυμική ανοσοδοκιμασία (ELISA)

## **Abstract**

In recent years, functional foods are at the center of research interest due to their bioactive components and their beneficial effects on human health. Mushrooms and their various products, are foods with a plethora of functional ingredients. The role of functional foods is particularly important in the treatment of pathological conditions that cause various metabolic syndromes, such as obesity, diabetes, hypertension, dyslipidemia, etc. In addition, isoprostanes, which belong to endogenous lipids and are produced, through diet, from  $\omega$ -6 fatty acids, are characteristic biomarkers of oxidative stress and inflammation. For this reason, they are selected as suitable compounds of interest in nutritional clinical studies involving volunteers with metabolic syndromes. The purpose of this thesis is the determination of isoprostanes using the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) techniques in blood plasma samples of volunteers with metabolic syndromes, who have received a functional mushroom snack. In particular, the LC-MS method was developed, validated and applied to volunteer samples for the determination of isoprostanes. Due to the low sensitivity of the LC-MS method, the content of isoprostanes in the plasma of the volunteers was determined by the ELISA method. Finally, a statistical evaluation and comparison of the results that occurred was made, in order to study the effect of nutrition (functional mushroom snack) on isoprostanes concentrations and on the occurrence of oxidative stress and inflammation.

**Keywords:** Functional foods, mushrooms, metabolic syndromes, oxidative stress, inflammation, isoprostanes, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

## Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε στα πλαίσια του προγράμματος Ενιαίας Δράσης Κρατικών Ενισχύσεων Έρευνας, Τεχνολογικής Ανάπτυξης & Καινοτομίας «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» με τίτλο "Αξιοποίηση γεωργικών υποπροϊόντων ως νέων υποστρωμάτων για την παραγωγή μανιταριών *Pleurotus* υψηλής διατροφικής αξίας – Ανάπτυξη και κλινική αξιολόγηση ενός καινοτόμου πολυδύναμου λειτουργικού τροφίμου (“σνακ μανιταριών”) με αυξημένη περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις (βιταμίνη D και αντιοξειδωτικά)”. Η υλοποίησή του πραγματοποιήθηκε από την εταιρία «*MANITARIA ΔΙΠΦΥΣ*», σε συνεργασία με τρεις ερευνητικούς φορείς, το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, και το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Στην μητέρα μου,  
τον άνθρωπο που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζει  
και στην Δρ. Θάλεια Τσιάκα,  
που αποτέλεσε πηγή έμπνευσης και γνώσης.



## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την συγγραφή της πτυχιακής αυτής εργασίας και παράλληλα φτάνοντας στο τέλος του κύκλου των προπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που με στήριξαν και με βοήθησαν από την πρώτη έως και την τελευταία ημέρα.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Θάλεια Τσιάκα η οποία αφιέρωσε χρόνο ώστε να μου εξηγήσει πλήρως το θέμα της εργασίας, να μου λύσει κάθε απορία και να μοιραστεί απλόχερα μαζί μου τις γνώσεις και την εμπειρία της. Από την πρώτη στιγμή με εμπιστεύτηκε και με υποστήριξε τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο. Επιπλέον, οι υποδείξεις και οι διορθώσεις της είναι καθοριστικές και πολύτιμες ώστε να μπορέσω να υποστηρίξω και στο μέλλον μια αντίστοιχη διατριβή. Κυρία Τσιάκα, πραγματικά σας ευχαριστώ για όλα!

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τα αδέρφια μου, για την στήριξή τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου, για την υπομονή τους και κυρίως για την ενθάρρυνση και την αγάπη τους.

# Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ</b> .....	<b>9</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ</b> .....	<b>11</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΑ</b> .....	<b>12</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Λειτουργικά Τρόφιμα</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 Ιστορία και Ορισμός .....	13
1.1.2 Λειτουργικά συστατικά/Βιοδραστικές ενώσεις και Βιολογική δράση .....	19
1.1.3 Νομοθεσία.....	23
1.1.4 Τάσεις της αγοράς, προώθηση (Marketing) και αποδοχή από τους καταναλωτές .....	25
<b>1.2 Μανιτάρια</b> .....	<b>28</b>
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά και κατηγορίες μανιταριών .....	28
1.2.2 Διατροφική αξία και Χημική σύσταση .....	30
1.2.3 Βιοδραστικές ενώσεις και βιολογική δράση.....	33
<b>1.3 Λειτουργικά τρόφιμα και μανιτάρια</b> .....	<b>37</b>
1.3.1 Μελέτες για την ενσωμάτωση μανιταριών σε τρόφιμα .....	38
1.3.2 Λειτουργικά τρόφιμα με βάση τα μανιτάρια στο εμπόριο.....	41
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΑ ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1 Οξειδωτικό στρες</b> .....	<b>43</b>
2.1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS).....	43
2.1.2 Άμυνα του οργανισμού κατά των ROS.....	45
2.1.3 Ορισμός Οξειδωτικού στρες.....	47
<b>2.2 Φλεγμονή και Προφλεγμονώδεις μεσολαβητές</b> .....	<b>48</b>
2.2.1 Ορισμός Φλεγμονής .....	48
2.2.2 Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή .....	50
2.2.3 Προφλεγμονώδεις και λιπιδικοί μεσολαβητές .....	50

<b>2.3 Ισοπροστάνια.....</b>	<b>53</b>
2.3.1 Δείκτες οξειδωτικού στρες .....	53
2.3.2 Προέλευση, δομή, είδη και ονοματολογία Ισοπροστανίων .....	54
<b>2.4 Ισοπροστάνια και παθολογικές καταστάσεις.....</b>	<b>57</b>
<b>2.5 Ισοπροστάνια και Διατροφή.....</b>	<b>66</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>73</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Στοιχεία κλινικής μελέτης.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2 Στοιχεία λειτουργικού σνακ μανιταριών.....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Στοιχεία εθελοντών.....</b>	<b>78</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) .....</b>	<b>80</b>
<b>5.1 Αναλώσιμα.....</b>	<b>80</b>
<b>5.2 Πρότυπα Διαλύματα.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3 Συσκευές και επιστημονικά όργανα.....</b>	<b>80</b>
<b>5.4 Προκατεργασία Δειγμάτων/Μέθοδοι εκχύλισης.....</b>	<b>81</b>
5.4.1 Μέθοδος εκχύλισης για ελεύθερα ισοπροστάνια .....	81
5.4.2 Μέθοδος εκχύλισης για ολικά ισοπροστάνια .....	82
<b>5.5 Μέθοδος Υγρής χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχική θραυσματοποίηση (MS<sup>2</sup>) (HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>) για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ισοπροστανίων.....</b>	<b>82</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) ....</b>	<b>87</b>
<b>6.1 Αναλώσιμα.....</b>	<b>87</b>
<b>6.2 Συσκευές και επιστημονικά όργανα.....</b>	<b>87</b>
<b>6.3 Συνοπτικό διάγραμμα πειραματικής πορείας/πρωτοκόλλου ELISA.....</b>	<b>88</b>
<b>6.4 Προετοιμασία αντιδραστηρίων.....</b>	<b>88</b>

<b>6.5 Προετοιμασία Πρότυπων Διαλυμάτων.....</b>	<b>89</b>
<b>6.6 Προκατεργασία Δειγμάτων.....</b>	<b>90</b>
<b>6.7 Μέθοδος ELISA.....</b>	<b>91</b>
<b>6.8 Στοιχεία μεθόδου.....</b>	<b>93</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>96</b>
<b>7.1 Επικύρωση μεθόδου LC-MS/MS.....</b>	<b>96</b>
7.1.1 Γραμμικότητα και ευαισθησία .....	96
7.1.2 Πιστότητα εντός ημέρας (Επαναληψιμότητα) .....	96
7.1.3 Ανάκτηση εσωτερικού προτύπου .....	97
<b>7.2 Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικής ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.....</b>	<b>98</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>101</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>103</b>

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

<b>Εικόνα 1.1</b> Διαφορές λειτουργικών προϊόντων και φαρμάκων ( <i>Reis et al., 2017</i> ).....	16
<b>Εικόνα 1.2</b> Διαφορά μεταξύ διατροφής και φαρμακευτικής αγωγής ( <i>Domínguez Díaz et al., 2019</i> ) .....	17
<b>Εικόνα 1.3</b> Περιφερειακές προβλέψεις για την αγορά λειτουργικών τροφίμων μεταξύ 2020-2030 (\$δισεκατομμύρια). ( <a href="https://www.visiongain.com/report/functional-foods-market-report-2020-2030/">https://www.visiongain.com/report/functional-foods-market-report-2020-2030/</a> ).....	26
<b>Εικόνα 1.4</b> Κατάλογος προβιοτικών προϊόντων που διατίθενται στην αγορά ( <i>Kaur &amp; Das, 2011</i> ) .	26
<b>Εικόνα 1.5</b> Τα διαφορετικά μέρη ενός επιγειακού μανιταριού με καρποφόρο σώμα: (Α) Πίλος, (Β) Στέλεχος και (Γ) Μυκήλια. ( <i>Martinez-Medina et al., 2021</i> ).....	29
<b>Εικόνα 1.6</b> Οι βιοδραστικές ενώσεις των μανιταριών και τα οφέλη τους για την υγεία ( <i>Yadav &amp; Negi, 2021</i> ).....	33
<b>Εικόνα 1.7</b> Αντιοξειδωτικές ενώσεις που προσδιορίζονται σε βρώσιμα άγρια μανιτάρια ( <i>Bulam et al., 2018</i> ) .....	35
<b>Εικόνα 1.8</b> Μελέτες για λειτουργικά τρόφιμα με βάση τα μανιτάρια, είτε σε σκόνες, είτε με τα εκχυλίσματα, τις ενώσεις και τα μυκήλιά τους ( <i>Üstün et al., 2018</i> ) .....	40
<b>Εικόνα 1.9</b> Ζυμαρικά με μανιτάρια, Σνακ (σοκολάτα και μπισκότα) από μανιτάρια, Ριζότο με αποξηραμένα μανιτάρια ( <a href="https://www.manitariadirfis.gr/">https://www.manitariadirfis.gr/</a> ) .....	42
<b>Εικόνα 2.1</b> Υπερπαραγωγή ROS και η συμβολή τους σε διάφορες οικογένειες ασθενειών ( <i>Brieger et al., 2012</i> ) .....	44
<b>Εικόνα 2.2</b> Οι συνέπειες των ROS στον οργανισμό, όταν βρίσκονται σε χαμηλές, μέτριες και υψηλές συγκεντρώσεις ( <i>Brieger et al., 2012</i> ).....	44
<b>Εικόνα 2.3</b> Παραγωγή και αποδόμηση ROS που συμβάλλει στην οξειδωτική ισορροπία ( <i>Brieger et al., 2012</i> ) .....	48
<b>Εικόνα 2.4</b> Αιτίες και συνέπειες της συστηματικής χρόνιας φλεγμονής ( <i>Furman et al., 2019</i> ).....	49
<b>Εικόνα 2.5</b> Διαφορές οξείας και χρόνιας φλεγμονής ( <i>Furman et al., 2019</i> ).....	50
<b>Εικόνα 2.6</b> Απελευθέρωση και μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος (AA) ( <i>Galvão et al., 2018</i> )	51
<b>Εικόνα 2.7</b> Ανθρώπινες ασθένειες που οφείλονται στην απορρυθμισμένη σύνθεση εικοσανοειδών ( <i>Galvão et al., 2018</i> ) .....	52
<b>Εικόνα 2.8</b> Μηχανισμός σχηματισμού των F2-ισοπροστανίων ( <i>Milne et al., 2015</i> ) .....	55

<b>Εικόνα 2.9</b> Ταξινόμηση των ισοπροστανίων, ανάλογα με τη δομή των λειτουργικών ομάδων στον δακτύλιο κυκλοπεντανίου ( <i>Milne et al., 2015</i> ).....	56
<b>Εικόνα 2.10</b> Μεταβολίτες του 15-F2t-IsoP καθώς και F2-IsoPs συζευγμένα με γλυκουρονίδιο και συζυγή ταυρίνης ( <i>Milne et al., 2015</i> ).....	57
<b>Εικόνα 4.1</b> Περιληπτική απεικόνιση της μελέτης ( <i>Kleftaki et al., 2022</i> ). Interleukin-6 (IL-6), Waist Circumference (WC), Hip Circumferences (HC), Short Form-12 Physical Composite Score (PCS-12), Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) .....	76
<b>Εικόνα 4.2</b> Διατροφική σύνθεση του σνακ ( <i>Kleftaki et al., 2022</i> ).....	77
<b>Εικόνα 4.3</b> Το λειτουργικό σνακ μανιταριών της εταιρίας «MANITAPIA ΔΙΡΦΥΣ» και το ακατέργαστο <i>Pleurotus eryngii</i> (King Oyster). ( <a href="https://manitariadirfis.g/">https://manitariadirfis.g/</a> ) .....	78
<b>Εικόνα 5.1</b> Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα των τριών μελετούμενων ισοπροστανίων .....	86
<b>Εικόνα 6.1</b> Πρότυπη καμπύλη (Καμπύλη αναφοράς) .....	94

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

<b>Πίνακας 1.1</b> Ορισμοί λειτουργικών τροφίμων από διάφορες πηγές ( <i>Henry, 2010;Kaur &amp; Das, 2011</i> ) .....	14
<b>Πίνακας 1.2</b> Κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων ( <i>Kaur &amp; Das, 2011</i> ) .....	18
<b>Πίνακας 1.3</b> Λειτουργικά συστατικά και η επίδρασή τους στην υγεία .....	20
<b>Πίνακας 1.4</b> Λειτουργικά τρόφιμα στο εμπόριο ( <i>Bulam et al., 2018</i> ) .....	41
<b>Πίνακας 2.1</b> Αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού .....	46
<b>Πίνακας 2.2</b> Δείκτες του οξειδωτικού στρες .....	53
<b>Πίνακας 2.3</b> Μελέτες που αφορούν την επίδραση διαφόρων ασθενειών, της παχυσαρκίας και του καπνίσματος στα επίπεδα των ισοπροστανίων .....	60
<b>Πίνακας 2.4</b> Επίδραση των αντιοξειδωτικών και της διατροφής στα επίπεδα των ισοπροστανίων .....	67
<b>Πίνακας 2.5</b> Κλινικές διατροφικές παρεμβάσεις σε άτομα με μεταβολικά σύνδρομα και μέτρηση ισοπροστανίων ως δείκτη οξειδωτικού στρες.....	69
<b>Πίνακας 5.1</b> Πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλυσης διαλυτών .....	84
<b>Πίνακας 5.2</b> Συνθήκες ιοντισμού πηγής και πρότυπων ενώσεων ισοπροστανίων.....	84
<b>Πίνακας 5.3</b> Στοιχεία των προς ανάλυση ενώσεων .....	85
<b>Πίνακας 6.1</b> Πρότυπα διαλύματα .....	89
<b>Πίνακας 6.2</b> Πρότυπα διαλύματα .....	94
<b>Πίνακας 6.3</b> Στοιχεία καμπύλης .....	94
<b>Πίνακας 7.1</b> Γραμμικότητα μεθόδου .....	96
<b>Πίνακας 7.2</b> Επαναληψιμότητα (RSD%) για τα ισοπροστανία .....	97
<b>Πίνακας 7.3</b> Τιμές ανάκτησης του εσωτερικού προτύπου στο πρωτόκολλο εκχύλισης Α και Β. ....	98
<b>Πίνακας 7.4</b> Συγκέντρωση ισοπροστανίων στα δείγματα πλάσματος (ομάδα ελέγχου), όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA .....	98
<b>Πίνακας 7.5</b> Συγκέντρωση ισοπροστανίων στα δείγματα πλάσματος (ομάδα παρέμβασης), όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA .....	99

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

<b>Σχήμα 6.1</b> Συνοπτικό διάγραμμα του πρωτοκόλλου ELISA. ....	88
<b>Σχήμα 6.2</b> Πρωτόκολλο προετοιμασίας των δειγμάτων.....	90
<b>Σχήμα 6.3</b> Διαδικασία ELISA .....	93



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

## 1.1 Λειτουργικά Τρόφιμα

### 1.1.1 Ιστορία και Ορισμός

#### **Ιστορία**

Το μεγάλο και διαχρονικό ενδιαφέρον του ανθρώπου για τα τρόφιμα και τη διατροφή καθώς και η άμεση σχέση τους με την υγεία, έστρεψε τη σύγχρονη έρευνα στη μελέτη της σημασίας των τροφίμων και διαφόρων συστατικών τους σε συγκεκριμένες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, όπως η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, της αντικαρκινικής και αντιοξειδωτικής δράσης του οργανισμού, καθώς και ο έλεγχος των λιπιδίων και των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Οι ευεργετικές ιδιότητες που εμφανίζει η κατανάλωση συγκεκριμένων συστατικών των τροφίμων, όπως οι βιταμίνες, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή, αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη μια νέας κατηγορίας τροφίμων, που χαρακτηρίζονται ως λειτουργικά τρόφιμα.

Η έννοια «λειτουργικά τρόφιμα» (functional foods), καταγράφεται για πρώτη φορά στην Ινδία σε κείμενα Βεδικής περιόδου και στην παραδοσιακή ιατρική της Κίνας. Επιπλέον, την δεκαετία του 1980 στην Ιαπωνία, η αύξηση του κόστους της υγειονομικής περίθαλψης οδήγησε το Υπουργείο Υγείας και Πρόνοιας στη θέσπιση κανονισμών για την έγκριση τροφίμων με αποδεδειγμένα οφέλη για την υγεία, όπως τα λειτουργικά τρόφιμα, που στόχευαν κυρίως στην βελτίωση της υγείας του ηλικιωμένου πληθυσμού. Στην σημερινή εποχή, η Ιαπωνία είναι η χώρα με το μεγαλύτερο μερίδιο στην αγορά λειτουργικών τροφίμων καθώς και η μοναδική που τα αναγνωρίζει ως ξεχωριστή κατηγορία, γνωστή ως «Τρόφιμα για συγκεκριμένη χρήση στην υγεία» (Food for Specified Health Use, FOSHU). Αντίθετα, στην Ευρώπη, τα λειτουργικά τρόφιμα δεν αποτελούν συγκεκριμένη κατηγορία προϊόντων, γι' αυτό και πρέπει να ακολουθούν τη γενική νομοθεσία που ισχύει για τα τρόφιμα. Ωστόσο και η Ευρώπη έχει σημαντική θέση στην παγκόσμια αγορά τέτοιων τροφίμων, με χώρες όπως η Γερμανία, η Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ολλανδία και η Ισπανία, να βρίσκονται στην κορυφή του ευρωπαϊκού χάρτη χωρών που καταναλώνουν λειτουργικά τρόφιμα (Henry, 2010; Domínguez Díaz et al., 2019; Chhikara & Panghal, 2022).

Η πρώτη απόπειρα παραγωγής λειτουργικής τροφής, έγινε στις αρχές του 1900 και αφορούσε την ενσωμάτωση ενός λειτουργικού συστατικού σε τρόφιμο. Συγκεκριμένα, το συστατικό αυτό ήταν το ιωδιούχο αλάτι, η προσθήκη του οποίου στόχευε στην πρόληψη της βρογχοκήλης. Αργότερα, στα τέλη της δεκαετίας του 1960, η εταιρία Unilever με στόχο την αντιμετώπιση των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης, δημιούργησε αλλεϊμάτα τροφίμων (spreads) πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. (Chhikara & Panghal, 2022)

Σύμφωνα με τους Siro et al. (2018), τα πρώτα λειτουργικά τρόφιμα που αναπτύχθηκαν, ήταν κυρίως εμπλουτισμένα με βιταμίνες ή/ και μέταλλα (βιταμίνη C, βιταμίνη E, φολικό οξύ, ψευδάργυρος, σίδηρος και ασβέστιο). Αργότερα το ενδιαφέρον στράφηκε σε διάφορα μικροθρεπτικά συστατικά και έτσι ακολούθησε ο εμπλουτισμός τροφίμων με συστατικά, όπως ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, φυτοστερόλες και διαλυτές φυτικές ίνες.

## Ορισμός

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποιος επίσημα θεσπισμένος ορισμός για τα λειτουργικά τρόφιμα. Ωστόσο λόγω των ποικίλων ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί παγκοσμίως, έχουν προκύψει ορισμοί από διαφορετικούς οργανισμούς και φορείς, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1). (Kaur & Das, 2011)

**Πίνακας 1.1** Ορισμοί λειτουργικών τροφίμων από διάφορες πηγές (Henry, 2010; Kaur & Das, 2011)

Πηγή	Ορισμός
Διεθνές Συμβούλιο Πληροφοριών Τροφίμων (International Food Information Council (IFIC))	Τρόφιμα ή διαιτητικά συστατικά που μπορεί να προσφέρουν οφέλη για την υγεία πέρα από την βασική διατροφή.
Τμήμα της κυβέρνησης του Καναδά αρμόδιο για την εθνική πολιτική υγείας (Health Canada)	Παρόμοια σε εμφάνιση με τα συμβατικά (συνηθισμένα) τρόφιμα, που καταναλώνονται ως μέρος της συνηθισμένης διατροφής με αποδεδειγμένα φυσιολογικά οφέλη ή/και την μείωση του κινδύνου χρόνιας νόσου πέρα από τις βασικές διατροφικές λειτουργίες.
Γενικό Λογιστήριο των ΗΠΑ (US General Accounting Office (GAO))	Τρόφιμα με ισχυρισμούς για οφέλη στην υγεία πέρα από τη βασική διατροφή.

<p>Διεθνές Ινστιτούτο Επιστημών Ζωής της Βόρειας Αμερικής (The International Life Sciences Institute of North America (ILSI))</p>	<p>Τρόφιμα που λόγω των φυσιολογικά δραστικών συστατικών τους παρέχουν οφέλη για την υγεία πέρα από την βασική διατροφή.</p>
<p>Συντονισμένη Δράση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Επιστήμη Λειτουργικών Τροφίμων στην Ευρώπη (The European Commission Concerted Action Group on Functional Food Science in Europe (FUSOSE))</p>	<p>Τα τρόφιμα που θα μπορούσαν να θεωρηθούν «λειτουργικά», αν έχει αποδειχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό ότι επηρεάζουν ευεργετικά μία ή περισσότερες λειτουργίες-στόχους στο σώμα, πέρα από επαρκείς διατροφικές επιδράσεις, με τρόπο που σχετίζεται είτε με την βελτίωση της κατάστασης της υγείας και της ευημερίας ή/και τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθένειας.</p>
<p>Συμβούλιο Τροφίμων και Διατροφής (FNB) της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών των ΗΠΑ (Food and Nutrition Board (FNB) of the National Academy of Sciences of the U.S)</p>	<p>Τα τρόφιμα που ενδεχομένως περιλαμβάνουν υγιεινά προϊόντα συμπεριλαμβανομένου «οποιοδήποτε τροποποιημένου τροφίμου ή συστατικού τροφίμου που μπορεί να προσφέρει όφελος για την υγεία πέρα από αυτό των παραδοσιακών θρεπτικών συστατικών που περιέχει»</p>

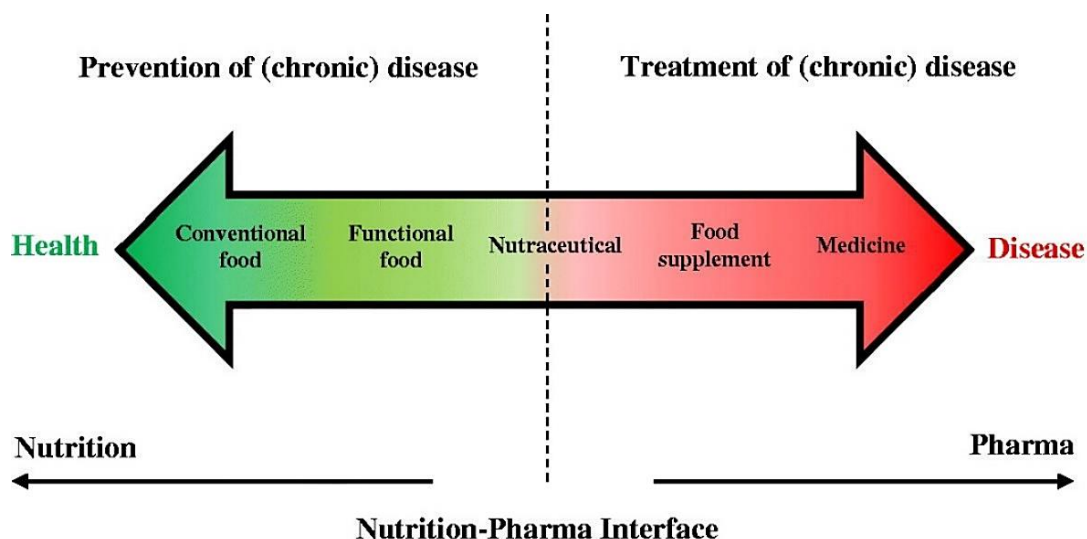
Εκτός από αυτούς τους ορισμούς, είναι σημαντικό να γίνει αναφορά και σε κάποιους βασικούς όρους που συνδέονται με τα λειτουργικά τρόφιμα και τις ευεργετικές ενώσεις, που αυτά περιέχουν. Πιο συγκεκριμένα, ως βιοδραστικές ενώσεις χαρακτηρίζονται οι φυσικές ενώσεις που υπάρχουν ή προέρχονται από φυτική, ζωική ή θαλάσσια πηγή και ασκούν ευεργετικό όφελος στην υγεία, όπως για παράδειγμα οι πολυφαινόλες (π.χ φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, λιγνάνες κ.α.) και τα καροτενοειδή (π.χ λυκοπένιο, β-καροτένιο, λουτεΐνη, κ.ά.). Λειτουργικά συστατικά είναι τα τυποποιημένα και χαρακτηρισμένα παρασκευάσματα, τεμάχια ή εκχυλίσματα που περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις (επομένως παρέχουν και θετικές βιολογικές δράσεις) ποικίλης καθαρότητας, που χρησιμοποιούνται ως συστατικά στα τρόφιμα από τις εταιρείες τροφίμων. (Kaur & Das, 2011).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί, πως εκτός από τα λειτουργικά τρόφιμα, έχουν αναπτυχθεί και άλλες έννοιες και όροι σχετικοί με τα τρόφιμα, όπως τα διατροφοδραστικά συστατικά (nutraceuticals) και τα «συμπληρώματα διατροφής». Αν και σχετίζονται μεταξύ τους, οι όροι αυτοί δεν πρέπει να συγχέονται. (Εικόνα 1.1)

**Εικόνα 1.1** Διαφορές λειτουργικών προϊόντων και φαρμάκων (Reis et al., 2017)

	<b>Functional food</b>	<b>Nutraceutical</b>	<b>Food supplement</b>	<b>Medicines</b>
<b>Form</b>	Food	Pill, tablet, capsule, syrup	Pill, tablet, capsule, syrup	Pill, tablet, capsule, syrup, injectable, etc.
<b>Consumption</b>	Consumed as part of the normal diet	Daily consumed, (usually for a period of time) once they are food constituents/extracts	Usually during a certain period of time	Controlled doses according to medical prescription and for a predetermined period of time
<b>Purpose</b>	Exert a health or physiological effect; Improvement of the state of health and well-being and/or reduction of the risk of disease	Promote well-being through the prevention and/or treatment of diseases and/or disorders	Typically consumed to ensure the intake of certain ingredient(s) (e.g., vitamins, minerals, amino acids); They may also help to reduce the risk of disease	Pharmacological purpose; To treat a specific disease

Για παράδειγμα, τα λειτουργικά τρόφιμα, είναι συμβατικά ή καθημερινά τρόφιμα που καταναλώνονται ως μέρος της κανονικής καθημερινής διατροφής ενώ τα nutraceuticals δεν είναι απαραίτητα μια πλήρης τροφή, αλλά μπορεί να είναι ένα θεραπευτικό συστατικό ή ένα εκχύλισμα που μπορεί να έχει φαρμακευτική μορφή, δηλαδή να παρέχεται σε χάπια (Reis et al., 2017). Επιπλέον αν και παρέχουν φαρμακολογική λειτουργία, τα nutraceuticals δεν είναι φάρμακα καθώς αυτά απαιτούν ιατρική επίβλεψη, ακριβείς δόσεις και δρουν ενάντια σε συγκεκριμένες ασθένειες. (Domínguez Díaz et al., 2019). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.2) παρουσιάζονται τα διάφορα είδη λειτουργικών προϊόντων (λειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής και nutraceuticals) και διακρίνεται η διαφορά μεταξύ διατροφής και φαρμακευτικής αγωγής.



**Εικόνα 1.2** Διαφορά μεταξύ διατροφής και φαρμακευτικής αγωγής (Domínguez Díaz et al., 2019)

Κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων

Ο Henry (Oxford, 2010), δήλωσε ότι τα λειτουργικά τρόφιμα μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής:

- Συμβατικές τροφές οι οποίες περιέχουν εκ φύσεως κάποια βιοδραστική ουσία, όπως για παράδειγμα ο πολυσακχαρίτης β-γλυκάνη στην βρώμη που συμβάλλει στην μείωση της χοληστερόλης στο αίμα.
- Τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία και έχουν ενισχυθεί με βιοδραστικές ενώσεις. Για παράδειγμα η προστιθέμενη φυτοστερόλη στην μαργαρίνη, η οποία μειώνει την χοληστερόλη του ορού.
- Συνθετικά συστατικά τροφίμων, όπως κάποιοι ειδικευμένοι πολυσακχαρίτες που δρουν ως προβιοτικά.

Συμπερασματικά, επισήμανε ότι ένα λειτουργικό τρόφιμο μπορεί να είναι, (α) ένα φυσικό τρόφιμο (π.χ ένα φρούτο), (β) τρόφιμο στο οποίο έχει προστεθεί ένα συστατικό με αποδεδειγμένα ευεργετικά αποτελέσματα, (γ) τρόφιμο από το οποίο έχει αφαιρεθεί ένα συστατικό που είναι επιβλαβές για την υγεία, (δ) τρόφιμο στο οποίο ένα ή περισσότερα συστατικά του έχουν τροποποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε τελικά να έχει τα προβλεπόμενα ευεργετικά αποτελέσματα και (ε) τρόφιμο με τροποποιημένη βιοδιαθεσιμότητα ή οποιοσδήποτε συνδυασμός των παραπάνω.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.2) περιγράφονται ορισμένες από τις κύριες κατηγορίες των λειτουργικών τροφίμων.

**Πίνακας 1.2** Κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων (Kaur & Das, 2011)

Τύπος λειτουργικού Τροφίμου	Περιγραφή	Παράδειγμα
Ενισχυμένο τρόφιμο	Τρόφιμο ενισχυμένο με πρόσθετα θρεπτικά συστατικά	Χυμοί φρούτων ενισχυμένοι με βιταμίνη C
Εμπλουτισμένο τρόφιμο	Τρόφιμο με πρόσθετα νέα θρεπτικά συστατικά ή συστατικά που δεν βρίσκονται συνήθως σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο	Μαργαρίνη με εστέρα φυτικών στερολών, προβιοτικά, πρεβιοτικά
Τροποποιημένο τρόφιμο	Τρόφιμο από το οποίο ένα επιβλαβές συστατικό έχει αφαιρεθεί, μειωθεί ή αντικατασταθεί με άλλη ουσία με ευεργετικά αποτελέσματα	Ύνες ως απελευθερωτές λίπους σε προϊόντα κρέατος ή παγωτού
Βελτιωμένα προϊόντα	Τρόφιμο στο οποίο ένα από τα συστατικά του έχει φυσικά ενισχυθεί μέσω ειδικών συνθηκών καλλιέργειας, νέας σύνθεσης τροφής, γενετικού χειρισμού ή άλλο τρόπο	Αυγά με αυξημένη περιεκτικότητα σε ωμέγα-3 που επιτυγχάνεται με τροποποιημένη τροφή κοτόπουλου

Σύμφωνα με τους Kaur και Das (2011), ορισμένα από τα πιο χαρακτηριστικά είδη λειτουργικών τροφίμων που κυκλοφορούν στην αγορά είναι τα παρακάτω:

- Προβιοτικά (κυρίως με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων και σε ορισμένες περιπτώσεις χυμούς φρούτων)
- Πρεβιοτικά
- Λειτουργικά ποτά
- Λειτουργικά δημητριακά
- Προϊόντα αρτοποιίας
- Spreads (μαργαρίνη, βούτυρο, τυρί)
- Λειτουργικό κρέας
- Λειτουργικά αυγά

### 1.1.2 Λειτουργικά συστατικά/Βιοδραστικές ενώσεις και Βιολογική δράση

Ορισμένες κατηγορίες λειτουργικών τροφίμων που συναντάμε στην αγορά, είναι μεταξύ άλλων, προϊόντα με βάση τα γαλακτοκομικά, τα δημητριακά, τα θαλασσινά, το κρέας, τα αυγά, το τσάι, τα φρούτα και τα λαχανικά. Τα προϊόντα αυτά θεωρούνται λειτουργικά διότι περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις φυτικής ή ζωικής προέλευσης (πολυφαινόλες, καροτενοειδή, βιταμίνες κ.α) οι οποίες παρέχουν λειτουργίες όπως η μείωση της υψηλής αρτηριακής πίεσης, της χοληστερόλης, του σακχάρου στο αίμα και της οστεοπόρωσης. Επομένως εμφανίζουν θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, όπως αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδης, υπογλυκαιμικές, αντιδιαβητικές και άλλες. (Kaur & Das, 2011)

Βασικές κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων είναι οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή (π.χ λυκοπένιο) και ορισμένα λιπαρά οξέα. Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε πολλές υποκατηγορίες και περιέχουν μεγάλο αριθμό ενώσεων, έτσι είναι η πιο διακεκριμένη κατηγορία βιοδραστικών μορίων. Οι υποκατηγορίες αυτές διαχωρίζονται στα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Στα μη φλαβονοειδή ανήκουν ενώσεις όπως τα φαινολικά οξέα (π.χ γαλλικό οξύ), τα κουρκουμνοειδή, οι στιβλίνες, οι λιγνάνες και οι τανίνες. Τα φλαβονοειδή μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες (π.χ κερκετίνη), φλαβανόλες ή φλαβαν-3-όλες (π.χ κατεχίνες), ισοφλαβόνες (π.χ νταϊντζεΐνη) και ανθοκυανίνες (π.χ κυανιδίνη). Λιπαρά οξέα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά συστατικά, μεταξύ άλλων, είναι τα συζευγμένα λινολεϊκά οξέα (conjugated linoleic acids, CLAs), το α-λινολενικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ. (Abbas et al., 2016; Lakey-Beitia et al., 2015; Ruiz-Rodriguez et al., 2010).

Εκτός από τις κατηγορίες αυτές, βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν και οι βιταμίνες (π.χ ασκορβικό οξύ), τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία, ορισμένοι πολυσακχαρίτες (π.χ β-γλυκάνες), φυτικές ίνες, οργανικές ενώσεις θείου και άλλα. (Kaur & Das, 2011) Γενικά, τα φρούτα μπορούν να θεωρηθούν σημαντικές πηγές βιοδραστικών ενώσεων, όπως οι φυτοστερόλες οι οποίες εμφανίζουν υποχοληστερολαιμική δράση. (Singh et al., 2016)

Για παράδειγμα τα αυγά, περιέχουν αντιοξειδωτικά (βιταμίνες, καροτενοειδή, μέταλλα και ιχνοστοιχεία) στα οποία ανήκουν και ορισμένες βασικές πρωτεΐνες που βρίσκονται είτε στο ασπράδι, όπως η ωοτρανσφερίνη, είτε στον κρόκο, όπως η φωσβιτίνη. Επιπλέον, είναι πηγή αντιμικροβιακών ενώσεων (π.χ ένζυμο λυσοζύμη, πρωτεΐνη αβιδίνη και κυστατίνη), αντικαρκινικών ενώσεων (λυσοζύμη, γλυκοπρωτεΐνη ωμουκίνη και τα πεπτίδια που προέρχονται από αυτή, τα τριπεπτίδια και τα υδρολιτικά πεπτίδια της ωοτρανσφερίνης), ανοσοτροποποιητικών πρωτεϊνών (λυσοζύμη και κυτοκίνες όπως η πλειοτροφίνη κ.α) και πεπτίδια που εμφανίζουν αντι-υπερτασικές ιδιότητες. (Réhault-Godbert et al., 2019)



Το πράσινο τσάι αποτελεί σημαντική πηγή πολυφαινόλων, κυρίως κατεχινών, όπως επικατεχίνες (EC), επικατεχίνη γαλλικού εστέρα (ECG), επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG). Οι πολυφαινόλες αυτές παρέχουν στο τσάι αντιοξειδωτικές, αντικαρκινογόνες, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντικές, αντιμεταλλαξιογόνες και θερμογόνες ιδιότητες ενώ παράλληλα μπορούν να ελέγχουν την γλυκόζη και τα λιπίδια του αίματος. (Kaur & Das 2011)

Αντίστοιχα το κρέας είναι πηγή πολλών σημαντικών θρεπτικών συστατικών, όπως ταυρίνη, L-καρνιτίνη, κρεατίνη, συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA), ενδογενή αντιοξειδωτικά, μέταλλα, βιταμίνες, πολυφαινόλες, καροτενοειδή, διαιτητικές ίνες (περιλαμβάνονται πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και η λιγνίνη), προβιοτικά και βιοενεργά πεπτίδια. Τα συστατικά αυτά παρέχουν λειτουργίες όπως, η πρόληψη της παχυσαρκίας, του καρκίνου, του διαβήτη, της αθηροσκλήρωσης, της οστεοπόρωσης, της μη αλκοολικής λιπώδης νόσου του ήπατος και αλλεργικών παθήσεων, ενώ τονώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα και μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, γλυκαιμίας και γαστρεντερικών διαταραχών. (Kaur & Das 2011; Pogorzelska-Nowicka et al., 2018)

Βάση δεδομένων από βιβλιογραφική ανασκόπηση των Kaur και Das (2011), στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.3), παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα λειτουργικών συστατικών και βιοδραστικών ενώσεων τροφίμων, καθώς και η ωφέλιμη επίδρασή τους στην υγεία.

**Πίνακας 1.3** Λειτουργικά συστατικά και η επίδρασή τους στην υγεία

Κατηγορία ενώσεων	Λειτουργικό συστατικό	Πηγή/Τρόφιμο	Ευεργετικά αποτελέσματα
Πολυσακχαρίτες	Αλγινικό οξύ και ξυλοφουκάνες	<i>Sargassum vulgare</i> (φύκια)	Αντική δράση
Μέταλλα	Ασβέστιο	Γάλα και παράγωγα	Μειώνει τον καρκίνο του παχέος εντέρου, μειώνει τις πολλαπλασιαστικές και ερεθιστικές επιδράσεις στο έντερο
Αμίδια λιπαρών οξέων	Καψαϊκίνη	Κόκκινες και πράσινες πιπεριές	Δεσμεύει τα ανιόντα υπεροξειδίου/Αντιριζική δράση
Καροτενοειδή	Καροτενοειδή και λυκοπένιο	Ντομάτες, καρότα, πιπεριές, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, φρούτα και φοινικέλαιο	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινογόνος δράση, αναστέλλουν την οξείδωση της LDL, μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων



Λιπαρά οξέα	Συζευγμένα λινολεϊκά οξέα (CLA)	Αρνί, γαλοπούλα, μοσχάρι,	Μειώνουν τον καρκίνο του μαστού, την αθηροσκλήρωση, τον διαβήτη τύπου 2
Φυτικές ίνες	Φυτοχημικές ίνες (διαλυτές και αδιάλυτες)	Δημητριακά βρώμης, ενισχυμένος χυμός, Chondrus crispus (φύκια)	Μειώνουν την ολική και LDL χοληστερόλη
Πολυφαινόλες και οργανικές ενώσεις θείου	Γαλλικό οξύ, σουλφίδια και θειόλες, κερκετίνη και οργανικές ενώσεις θείου	Σκόρδο, κρεμμύδι και μπρόκολο	Μειώνει την αρτηριακή πίεση
Πολυφαινόλες	Λιγνάνες	Λιναρόσπορος, φρούτα και λαχανικά	Οιστρογόνο
	Ανθοκυανίνες, κατεχίνες, κυανιδίνες, φλαβονόλες, μυρικετίνη και κερκετίνη	Φλούδες σταφυλιών, χυμός και κρασί (από κόκκινα σταφύλια) μούρα και μελιτζάνες	Αντιοξειδωτική δράση, αναστέλλουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein, LDL) και αποτελούν σαρωτές υπεροξειδίου
	Καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ	Εκχυλίσματα δεντρολίβανου	Αναστέλλει την υπεροξείδωση των ελαίων
	Φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβαν-3-ολες)	Σέλινο, μαϊντανός, εσπεριδοειδή, κρεμμύδια, τσάι, πράσινα φασόλια, ντομάτες, κακάο, μήλα, μούρα, ορισμένα φασόλια και σοκολάτα	Αντιοξειδωτική, αντιπολλαπλασιαστική, αντιυπερτασική, αντικαρκινογόνος, αντιθρομβωτική δράση, διακοπή του κυτταρικού κύκλου, αναστολή οξείδωσης LDL, βελτίωση της αγγειακής αντίστασης

	Κουρκουμινοειδή (Curcuminoids)	<i>Curcuma longa</i> (κουρκουμάς)	Μειώνουν την οξείδωση των λιπιδίων, αποφυγή της ισχαιμικής υποξίας
	Νταϊντζεΐνη, Γενιστεΐνη και ισοφλαβόνες	Σόγια και παράγωγα	Αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και τον καρκίνο
	Sesaminol	Ρύζι και ρυζέλαιο, σησαμέλαιο	Αναστέλλει την οξείδωση της LDL και μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου
	Στιλβένια	Σταφύλια, φιστίκια	Αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική δράση, αντιγηραντική δράση
	Φαινολικά οξέα	Καφές, πράσινο τσάι, μαύρο τσάι, πίτουρο δημητριακών, φρούτα, έξτρα παρθένο ελαιόλαδο	Αντιφλεγμονώδης δράση
Λιπαρά οξέα	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα		
Πρεβιοτικά	Πρεβιοτικά	Μπανάνα, σκόρδο, κρεμμύδια, γάλα, μέλι, αγκινάρες	Διεγείρουν την ανάπτυξη και/ή τη δραστηριότητα ευεργετικών βακτηρίων στο παχύ έντερο, βελτιώνοντας έτσι την υγεία του ξενιστή
Προβιοτικά	Προβιοτικά	Ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα	Υποστηρίζουν την υγεία του εντερικού σωλήνα, ενισχύουν την ανοσία

Πολυφαινόλες και τζινσενοσίδες	Ρεσβερατρόλη, άλλες πολυφαινόλες σταφυλιού, τζινσενοσίδες	Σταφύλια, κόκκινα κρασιά, τζίνσεγκ (panax ginseng), εσπεριδοειδή	Μειώνουν την αρτηριακή πίεση, αποτρέπουν την προχωρημένη κακοήθεια
Βιταμίνες	Ασκορβικό οξύ		
Βιταμίνες, συνένζυμα, λιπαρά οξέα, φυτοστερόλες	Τοκοφερόλες, ουμπικινόλη, τοκοτριενόλες, ω-3 λιπαρά οξέα, φυτοστερόλες και άλλα	Αμύγδαλα, ξηροί καρποί σιτάρι, ιχθυέλαιο, έλαια (από ρύζι, σόγια, ελιά), λίπος και μαργαρίνη	Μειώνουν τη χοληστερόλη του αίματος, αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων

Η ανάπτυξη και η επακόλουθη αγορά των προϊόντων αυτών, κρύβει μια σειρά περιορισμών που πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν. Πέρα από τεχνολογικά εμπόδια που μπορεί να προκύψουν (π.χ πιθανές αλλαγές στην σύσταση των τροφίμων κατά την επεξεργασία), παράγοντες όπως είναι το νομοθετικό πλαίσιο, η προώθηση των προϊόντων (marketing), οι απαιτήσεις και η αποδοχή των καταναλωτών, είναι υψίστης σημασίας. Η αποδοχή από τους καταναλωτές αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες για την πορεία των λειτουργικών τροφίμων από την παρασκευή στο εμπόριο. Επιπλέον είναι απαραίτητη η έρευνα σε διάφορους τομείς, όπως (1) ο εντοπισμός των λειτουργικών συστατικών, (2) η αξιολόγηση της λειτουργικής δράσης τους, (3) οι πιθανές αλλαγές που μπορεί να προκύψουν κατά την επεξεργασία και την προετοιμασία τους, (4) οι στρατηγικές ενημέρωσης των καταναλωτών και (5) η πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών για την αποτελεσματικότητα του προϊόντος ώστε να μπορέσει να εγκριθεί νομοθετικά και άλλα. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι είναι μια διαδικασία αρκετά περίπλοκη, χρονοβόρα και με υψηλό κόστος λόγω των πολλών απαιτήσεων που φέρει. (Siro' et al., 2008)

### 1.1.3 Νομοθεσία

Σε ότι αφορά στην νομοθεσία σχετικά με τα λειτουργικά τρόφιμα, όπως προαναφέρθηκε, **στην Ιαπωνία** τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ξεχωριστή κατηγορία. Επιπλέον, είναι η μόνη χώρα που έχει εφαρμόσει μια συγκεκριμένη διαδικασία έγκρισης για λειτουργικά τρόφιμα, το σύστημα «Τρόφιμα με ισχυρισμούς υγείας» (Food with Health Claims, FHC). Στο σύστημα αυτό, ανάλογα με το σκοπό και την βιολογική δράση, τα τρόφιμα μπορούν να εγκριθούν είτε ως «τρόφιμα για εξειδικευμένη

χρήση στην υγεία» (Foods for Specified Health Use, FOSHU) είτε ως «τρόφιμα με ισχυρισμούς για τη λειτουργία των θρεπτικών συστατικών» Foods with Nutrient Function Claims (FNFC). Τα FOSHU, σύμφωνα με το άρθρο 21 του διατάγματος για την υγιεινή των τροφίμων, ορίζονται ως «τρόφιμα για τα οποία δηλώνεται ότι η κατανάλωση αναμένεται να συμβάλει στη διατήρηση και την προαγωγή της υγείας των ατόμων που καταναλώνουν τέτοια τρόφιμα για συγκεκριμένο σκοπό διατήρησης της υγείας», ενώ τα FNFC ως «τρόφιμα για τα οποία δηλώνεται ότι η κατανάλωση μπορεί να αναμένεται να παρέχει ένα συγκεκριμένο διατροφικό συστατικό, σύμφωνα με τα πρότυπα που ορίζονται από τον Υπουργό, για άτομα που καταναλώνουν τέτοια τρόφιμα με σκοπό την απόκτηση του συγκεκριμένου διατροφικού συστατικού». Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα FOSHU, ώστε να εγκριθούν είναι οι εξής: 1) αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια στους ανθρώπινους οργανισμούς, 2) σωστό διατροφικό προφίλ (π.χ. αποφυγή υπερβολικού αλατιού), 3) ύπαρξη μεθόδων ποιοτικού ελέγχου (προδιαγραφές προϊόντων και συστατικών, διαδικασίες και μέθοδοι ανάλυσης) και 4) εγγύηση συμβατότητας με τις προδιαγραφές του προϊόντος μέχρι τη στιγμή της κατανάλωσης. Όταν ένα τρόφιμο FOSHU συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές αυτές, κατηγοριοποιείται ως «Τυποποιημένο FOCHO» (Standardized FOCHO). (Domínguez Díaz et al., 2019)

Αντίθετα, **στην Ευρώπη** τα λειτουργικά τρόφιμα αποτελούν κυρίως έννοια και όχι συγκεκριμένες κατηγορίες τροφίμων, επομένως πρέπει να πληρούν τους γενικούς νόμους που ισχύουν για τα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) 1925/2006 (με τελευταία τροποποίηση από τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/1203 της επιτροπής), ορίζει τα εμπλουτισμένα/ενισχυμένα τρόφιμα ως «τρόφιμα στα οποία έχουν προστεθεί θρεπτικά συστατικά ή συστατικά για να προσθέσουν ή να τονίσουν συγκεκριμένα διατροφικά χαρακτηριστικά». Επιπλέον ο κανονισμός (ΕΚ) 1925/2006 καθορίζει μέσω ενός καταλόγου τις κατηγορίες βιταμινών, μετάλλων και άλλων ουσιών που επιτρέπεται να ενσωματώνονται στα τρόφιμα ως εκχυλίσματα βοτάνων. Για τα λειτουργικά τρόφιμα με νέα συστατικά, ή αυτά που παρασκευάζονται με νέες διαδικασίες, ισχύει ο κανονισμός (ΕΕ) 2015/2283. Σύμφωνα με αυτόν, όλα τα νέα τρόφιμα και συστατικά για τα οποία δεν υπάρχει ιστορικό κατανάλωσης πριν από τις 15 Μαΐου 1997, πριν κυκλοφορήσουν στην αγορά και παραδοθούν στους καταναλωτές, πρέπει απαραίτητα να φέρουν επιστημονική αξιολόγηση. Κανονισμοί που αφορούν τα διαιτητικά τρόφιμα, τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ΓΤΟ) και τα συμπληρώματα διατροφής, μπορεί επίσης να εφαρμοστούν στα λειτουργικά τρόφιμα.

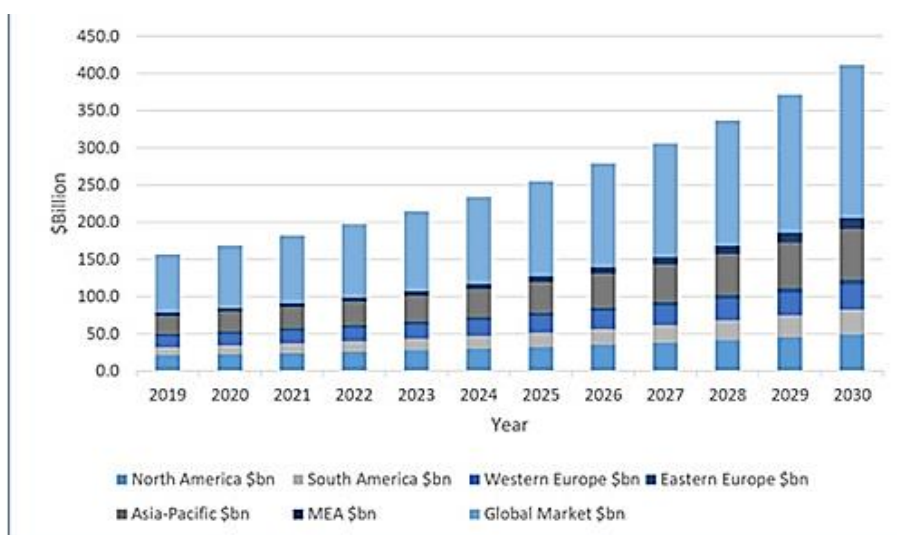
Σχετικά με τους ισχυρισμούς υγείας των λειτουργικών τροφίμων, ο κανονισμός (ΕΚ) 1924/2006, διασφαλίζει πως κάθε ισχυρισμός που παρουσιάζεται στις ετικέτες, στις παρουσιάσεις ή στις διαφημίσεις του προϊόντος, πρέπει να είναι σαφής, ακριβής και να βασίζεται σε επιστημονικά στοιχεία. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority,

EFSA) είναι υπεύθυνη για την αξιολόγηση των αιτήσεων που αφορούν τους ισχυρισμούς υγείας. Επομένως η περιγραφή ενός τροφίμου, πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες για την βοτανική πηγή, τις χημικές προδιαγραφές και τη βιολογική δραστηριότητα, την αναπαραγωγιμότητα και τη σταθερότητα από παρτίδα σε παρτίδα, καθώς και τη διαδικασία παρασκευής, ενώ πολύ σημαντικά είναι και τα στοιχεία που αφορούν και αποδεικνύουν τους ισχυρισμούς υγείας. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, έχει λάβει καταλόγους με συνολικά περίπου 44.000 ισχυρισμούς υγείας, εκ των οποίων 4600 στάλθηκαν τελικά στην EFSA για αξιολόγηση. Μέχρι το 2019 είχαν εγκριθεί 2337 από αυτούς, γεγονός που αποδεικνύει την πολυπλοκότητα και την δυσκολία έγκρισης ενός ισχυρισμού υγείας στην Ευρώπη. (Domínguez Díaz et al., 2019)

Τέλος, στην Αμερική, τα λειτουργικά τρόφιμα θεωρούνται άλλη κατηγορία τροφίμων και πρέπει να πληρούν όλες τις προδιαγραφές που ορίζει ο Ομοσπονδιακός Νόμος των Ηνωμένων Πολιτειών για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά. (Domínguez Díaz et al., 2019)

#### *1.1.4 Τάσεις της αγοράς, προώθηση (Marketing) και αποδοχή από τους καταναλωτές*

Σχετικά με την παγκόσμια αγορά λειτουργικών τροφίμων, οι ΗΠΑ, η Ιαπωνία και η Ευρώπη διαθέτουν το μερίδιο του λέοντος με πάνω από το 90% των συνολικών πωλήσεων. Για τον λόγο αυτό αποτελούν τις σημαντικότερες αγορές παγκοσμίως. Ανάμεσα σε αυτές, η πρώτη μεγαλύτερη είναι η Αμερική (πάνω από το 50%), η οποία το 2017 έχει τζίρο 60 δισεκατομμύρια δολάρια , που ανεβαίνει σταθερά κάθε χρόνο κατά 8%, γεγονός που οφείλεται στη ζήτηση για υγιεινά ποτά και γαλακτοκομικά προϊόντα. Δεύτερη ακολουθεί η Ιαπωνία και τέλος η Ευρώπη (κυρίως Γερμανία, Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ολλανδία και Ισπανία). Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι εντός της Ευρώπης, υπάρχει μεγάλη διαφορά ως προς την αποδοχή των τροφίμων αυτών. Για παράδειγμα, υπάρχει μεγαλύτερη αποδοχή των λειτουργικών τροφίμων σε χώρες της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης και μικρότερη στις Μεσογειακές. (Chhikara & Panghal, 2022 ; Kaur & Das, 2011). Στην εικόνα 1.3, παρουσιάζονται οι προβλέψεις για την αγορά τροφίμων μεταξύ του 2020 και του 2030.



**Εικόνα 1.3** Περιφερειακές προβλέψεις για την αγορά λειτουργικών τροφίμων μεταξύ 2020-2030 (\$δισεκατομμύρια). (<https://www.visiongain.com/report/functional-foods-market-report-2020-2030/>)

Ανάμεσα στις τρεις μεγαλύτερες αγορές (ΗΠΑ, Ιαπωνία, Ευρώπη), τα λειτουργικά τρόφιμα που επικρατούν σε κάθε μία εξαρτώνται από τις επιλογές και τις προτιμήσεις των καταναλωτών της κάθε χώρας (π.χ γαλακτοκομικά, δημητριακά, ποτά). Συγκεκριμένα στην Ευρώπη ξεχωρίζουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα (49%) και τα προϊόντα δημητριακών (30%). Το βασικότερο λειτουργικό συστατικό των γαλακτοκομικών, είναι τα προβιοτικά. Κυρίως στην Ευρώπη, εδρεύουν πολλές επώνυμες εταιρίες οι οποίες παράγουν προϊόντα με προβιοτική δράση, μερικές από αυτές παρουσιάζονται στην εικόνα 1.4. Στις ΗΠΑ και την Ιαπωνία ξεχωρίζουν τα ποτά (60%) και στη συνέχεια τα δημητριακά (20% στις ΗΠΑ) και τα είδη ζαχαροπλαστικής (15% στην Ιαπωνία), (Chhikara & Panghal, 2022).

Brand/Trade name	Description	Producer
Actimel	Probiotic drinking yogurt with <i>Lactobacillus casei imunitass</i> <sup>®</sup> cultures	Danone (France)
Activia	Creamy yogurt containing <i>Bifidus ActiRegularis</i> <sup>®</sup>	Danone (France)
Jovita Probiotisch	Blend of cereals, fruit, and probiotic yogurt	H&J Bruggen (Germany)
ProViva	Refreshing natural fruit drink and yogurt in many different flavors containing <i>Lactobacillus plantarum</i>	Skånemejerier (Sweden)
Rela	Yogurts, cultured milks, and juices with <i>Lactobacillus reuteri</i>	Ingman Foods (Finland)
Revital Active	Yogurt and drink yogurt with probiotics	Olma (Czech Republic),
Yakult	Milk drink containing <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult (Japan)
Vitality	Yogurt with pre-and probiotics and ω-3	Müller (Germany)
Vifit	Drink yogurts with LGG (lactobacillus strain), vitamins, and minerals	Campina(The Netherlands)
Snack Fibra	Snacks and bars with natural fibers and extra minerals and vitamins	Celigüets (Spain)

**Εικόνα 1.4** Κατάλογος προβιοτικών προϊόντων που διατίθενται στην αγορά (Kaur & Das, 2011)

Σχετικά με την αποδοχή από τους καταναλωτές, σε γενικές γραμμές, βρέθηκε πως οι Ευρωπαίοι, εμφανίζονται πιο σκεπτικιστές, με περισσότερες ανησυχίες ως προς τη χρήση των λειτουργικών τροφίμων και ως εκ τούτου είναι περισσότερο επιφυλακτικοί απέναντι σε νέα προϊόντα και

τεχνολογίες σε σχέση με το καταναλωτικό κοινό των ΗΠΑ (Siro' et al., 2008). Οι γυναίκες και οι ηλικιωμένοι αποτελούν τις πληθυσμιακές ομάδες που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τα τρόφιμα αυτά καθώς και μεγαλύτερη πρόθεση να συμβιβαστούν με τη γεύση τους, δίνοντας έμφαση στα οφέλη για την υγεία. Η έλλειψη γνώσης και εκπαίδευσης, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αποδοχή των λειτουργικών τροφίμων από τους καταναλωτές (Topolska et al., 2021). Γενικά, παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, το εισόδημα, η κατάσταση υγείας, το μορφωτικό επίπεδο και η διαθεσιμότητα των προϊόντων μπορούν να επηρεάσουν την κατανάλωση και την επιλογή των λειτουργικών τροφίμων. Για παράδειγμα, όλες οι ηλικιακές ομάδες προτιμούν τρόφιμα, όπως το γάλα χαμηλών λιπαρών/αποβουτυρωμένο, τα δημητριακά, το χυμό φρούτων και τα προβιοτικά. Αντίθετα προϊόντα που μειώνουν την χοληστερόλη και προϊόντα με βάση την σόγια, καταναλώνονται κυρίως από ενήλικες και ηλικιωμένους. Ακόμα, προβλήματα υγείας όπως η υψηλή αρτηριακή πίεση, το υψηλό επίπεδο χοληστερόλης και ο διαβήτης ωθούν τους καταναλωτές σε αγορά τροφίμων που μειώνουν την χοληστερόλη. (Chhikara & Panghal, 2022)

Σε ό,τι αφορά στην Ελλάδα, ύστερα από μελέτη που έλαβε χώρα σε 325 καταναλωτές στην περιοχή της Θεσσαλονίκης, με σκοπό την αξιολόγηση της στάσης τους απέναντι στα λειτουργικά τρόφιμα, η πλειοψηφία των συμμετεχόντων είχε πλήρως θετική στάση, ενώ παράλληλα βρέθηκε ότι οι περισσότεροι είναι διατεθειμένοι να πληρώσουν έως και 20% περισσότερα για την αγορά τους, αλλά και να συμβιβαστούν με την γεύση εφόσον το τρόφιμο είναι λειτουργικό. Βέβαια, υπήρχε και ένα μικρό ποσοστό με έντονη ανησυχία όσον αφορά τα ισχυριζόμενα οφέλη στην υγεία. Επιπλέον βρέθηκε πως οι γυναίκες έχουν πιο θετικές αντιλήψεις και φαίνεται να καταναλώνουν πιο συχνά λειτουργικά τρόφιμα σε σχέση με τους άντρες. Σύμφωνα με την έρευνα οι καταναλωτές, έδειξαν να προτιμούν περισσότερο λειτουργικά τρόφιμα/ποτά (περιστασιακά ή μόνιμα), όπως εμπλουτισμένους χυμούς (92%), τρόφιμα με χαμηλά λιπαρά (79,8%), εμπλουτισμένα δημητριακά (70,2 %), τσίχλες με ξυλιτόλη (62,6%) και μαργαρίνη με φυτικές στερόλες (54,2%) ενώ οι περισσότεροι δεν γνώριζαν για προϊόντα, όπως τα αυγά με ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, το γάλα με ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα με προβιοτικά. (Karelakis et al., 2019)

Σε άλλη έρευνα που εξετάστηκε η προθυμία των καταναλωτών της Γερμανίας (502 καταναλωτές) και της Κίνας (443 καταναλωτές) για να αγοράσουν λειτουργικά τρόφιμα, βρέθηκε πως οι καταναλωτές στην Κίνα ήταν πιο πρόθυμοι, ενώ στη Γερμανία, παρά τα πολλά ευεργετικά οφέλη η εμπιστοσύνη των καταναλωτών για την αγορά αυτών των προϊόντων φαίνεται να μειώθηκε. Αυτό ίσως να είναι αποτέλεσμα της επιφυλακτικότητας των καταναλωτών απέναντι σε νέα προϊόντα καθώς και της έλλειψης εμπιστοσύνης προς τα υποσχόμενα για την υγεία οφέλη τους. Επιπλέον το ενδιαφέρον ήταν μεγαλύτερο από τους καταναλωτές που είχαν περισσότερη εμπιστοσύνη στην βιομηχανία των τροφίμων καθώς και πιο έντονη επιθυμία για την ενίσχυση της υγείας τους. Αρνητική

επίδραση στην αποδοχή των λειτουργικών τροφίμων για τους καταναλωτές της Κίνας, είχε και η τροφική νεοφοβία. Ως τροφική νεοφοβία χαρακτηρίζεται η απροθυμία και ο φόβος κατανάλωσης νέων προϊόντων, που εμφανίζεται κυρίως στα παιδιά αλλά και στους ενήλικες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σημαντικό ρόλο για την αποδοχή των λειτουργικών τροφίμων, διαδραματίζουν και οι πολιτισμικοί παράγοντες. (Siegrist et al., 2015)

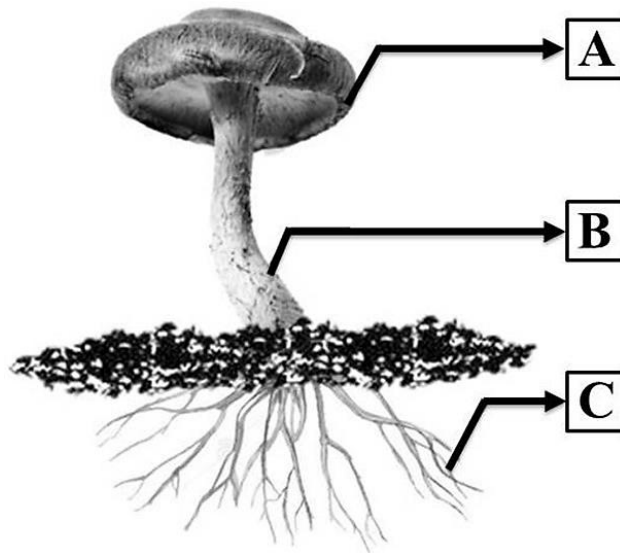
Στην Τουρκία παρατηρήθηκε πως οι καταναλωτές, σε ποσοστό περίπου 60%, είναι ελάχιστα ενημερωμένοι για τα λειτουργικά τρόφιμα, ενώ η μεγαλύτερη ενημέρωση και προθυμία για αγορά παρατηρήθηκε από το γυναικείο φύλο. Παράγοντες που επηρεάζουν την κατανάλωση των τροφίμων αυτών, είναι ορισμένα κοινωνικοδημογραφικά χαρακτηριστικά, όπως η ηλικία, η εκπαίδευση, το μέγεθος του εισοδήματος, το φύλο και οι τιμές. Τέλος, η κατηγορία λειτουργικών τροφίμων με τη μεγαλύτερη προτίμηση από τους καταναλωτές στην αγορά της Τουρκίας, είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα. (Gok & Ulu, 2018)

## 1.2 Μανιτάρια

### 1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά και κατηγορίες μανιταριών

Τα μανιτάρια, που χαρακτηρίζονται και ως μακρομύκητες ή ανώτεροι μύκητες, είναι *μύκητες με διακριτικά καρποφόρα σώματα, τα οποία είναι αρκετά μεγάλα ώστε να φαίνονται με γυμνό μάτι και να αγγίζονται*. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν δύο φάσεις ανάπτυξης: την αναπαραγωγική φάση (καρποφόρα σώματα) και τη βλαστική φάση (μυκήλια). Το χαρακτηριστικό τους καρποφόρο σώμα, μπορεί να είναι είτε επιγειακό, όταν αναπτύσσεται πάνω από το έδαφος, είτε υπογείως, όταν αναπτύσσεται κάτω από το έδαφος (Martinez-Medina et al., 2021). Τα μανιτάρια χωρίζονται στις οικογένειες των ασκομυκήτων και των βασιδιομυκήτων, ανάλογα με την ειδική δομή στην οποία βρίσκονται τα σπόρια τους. Η ειδική αυτή δομή ονομάζεται βασίδιο για τους βασιδιομύκητες ή ασκός για τους ασκομύκητες (Sánchez, 2017).





**Εικόνα 1.5** Τα διαφορετικά μέρη ενός επιγειακού μανιταριού με καρποφόρο σώμα: (Α) Πίλος, (Β) Στέλεχος και (Γ) Μυκήλια. (Martinez-Medina et al., 2021)

Εκτός από την μοναδική γεύση που προσφέρουν (γεύση umami), αποτελούν και σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών και βιοδραστικών ενώσεων, με αποτέλεσμα να θεωρούνται πολύτιμα συστατικά για τρόφιμα, φάρμακα και θρεπτικά προϊόντα. Υπάρχουν τόσο τα καλλιεργημένα όσο και τα άγρια μανιτάρια, τα οποία καταναλώνονται εξίσου από τους ανθρώπους. Γενικά τα μανιτάρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε βρώσιμα, φαρμακευτικά και δηλητηριώδη. Τα βρώσιμα (κυρίως το καρποφόρο σώμα) μπορούν να καταναλωθούν είτε ως σάρκα/φρέσκα (π.χ *Agaricus bisporus* ή button mushroom), είτε αποξηραμένα (π.χ *Lentinus edodes* ή shiitake) είτε συντηρημένα με άλλους τρόπους. Πολλές φορές, άγρια μανιτάρια που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα θεωρούνται βρώσιμα, ενώ στην πραγματικότητα μπορεί να είναι δηλητηριώδη. Πολλά μανιτάρια έχουν αποδειχθεί και χαρακτηρισθεί ως δηλητηριώδη, όπως το *Amanita phalloides* ή αλλιώς death cap. Οι μυκοτοξίνες (κυκλοπεπτίδιο, φαινυλυδραζίνη και ισοξαζόλη) που υπάρχουν σε κάποια είδη μανιταριών, είναι πολύ τοξικές για τον άνθρωπο. Τα φαρμακευτικά μανιτάρια (π.χ *Ganoderma lucidum* ή lingzhi), περιέχουν βιοενεργά συστατικά, όπως ορισμένοι πολυσακχαρίτες, που έχουν εφαρμογή στην παραδοσιακή ιατρική. Η χρήση τους στην ιατρική ήταν διαδεδομένη για πολλά χρόνια σε χώρες κυρίως της Ασίας, όπως στην Κίνα, στην Κορέα και στην Ιαπωνία, ενώ πρόσφατα διαδόθηκε και στην Δύση. Τόσο τα φαρμακευτικά όσο και τα βρώσιμα μανιτάρια μπορεί να λειτουργούν ευεργετικά για τον άνθρωπο. (Cheung, 2010)

Έχουν καταγραφεί περίπου 14.000 διαφορετικά είδη μανιταριών, εκ των οποίων τα 2.300 έχουν αποδειχθεί ως βρώσιμα. Μεταξύ αυτών, το *Agaricus bisporus*, το *Lentinula edodes* και διάφορα είδη *Pleurotus*, είναι τα μανιτάρια που έχουν σημειώσει την μεγαλύτερη κατανάλωση στην αγορά. Συγκεκριμένα, τα είδη *Pleurotus* ανήκουν στα πιο ευρέως καλλιεργούμενα μανιτάρια και αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής (Kleftaki et al., 2022). Στο

χρονικό διάστημα μεταξύ του 2013 και του 2017, η συνολική παραγωγή των μανιταριών και της τρούφας αυξήθηκε κατά 80,5% στην Ασία, 13,2% στην Ευρώπη, 5,5% στην Αμερική, 0,5% στην Ωκεανία και κατά 0,3% στην Αφρική. Επίσης, το 2017 καταγράφηκε παραγωγή 10,2 εκατομμυρίων τόνων παγκοσμίως. (Martinez-Medina et al., 2021)

### 1.2.2 Διατροφική αξία και Χημική σύσταση

Η χημική σύσταση ενός μανιταριού είναι συνάρτηση παραγόντων, όπως το είδος του, η θερμοκρασία, το pH, η σύνθεση του αέρα και άλλα. Τα μανιτάρια, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το button, το oyster και το paddy straw, αποτελούν σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών και αρωματικών ενώσεων. Γενικά, αν και η περιεκτικότητά τους είναι χαμηλή σε λιπαρά και θερμίδες, είναι αντιθέτως πλούσια σε πρωτεΐνες (π.χ λεκτίνες), υδατάνθρακες (π.χ β-γλυκάνες) και διαιτητικές ίνες. Επιπλέον είναι πλούσια σε μέταλλα, ιχνοστοιχεία (π.χ κάλιο και χαλκό) και βιταμίνες, όπως η ριβοφλαβίνη, η θειαμίνη, η νιασίνη και άλλες. (Cheung, 2010; Martinez-Medina et al., 2021).

Οι **υδατάνθρακες** των μανιταριών, είναι μια ομάδα μορίων που αποτελούν πολυυδροξυλιωμένες αλδεΐδες ή κετόνες και βρίσκονται σε ποσοστά μεταξύ 46,6 και 81,1%. Οι κυριότεροι είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μαλτόζη, η ραμνόζη, η αραβινόζη, η σακχαρόζη, η μαννιτόλη, η θρεαλόζη και η ξυλόζη, ενώ πολύ σημαντικές είναι και οι γλυκάνες. Βάση του βαθμού πολυμερισμού τους, χωρίζονται σε μονο-, δι-, ολίγο- και πολύ-σακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να δράσουν και ως διαιτητικές ίνες οι οποίες δεν υδρολύονται και δεν απορροφώνται στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου με αποτέλεσμα να εμφανίζουν πρεβιοτική δράση. Επιπλέον, οι μαννάνες, οι γλυκάνες και η χιτίνη είναι πολυσακχαρίτες που μπορούν να ληφθούν από μανιτάρια. Εκτός από την πρεβιοτική τους δράση, πολλά είδη πολυσακχαριτών (ομο-γλυκάνες, έτερο-γλυκάνες και σύμπλοκο πολυσακχαρίτη-πρωτεΐνης) με κύριες τις β-γλυκάνες (με σύνδεση β (1-3) στην κύρια δομή και β (1-6) στις διακλαδώσεις), μπορούν να εμφανίσουν ανοσοδιαμορφωτική και αντι-ογκική δράση. Οι πολυσακχαρίτες αυτοί μπορούν να βρεθούν σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των μανιταριών όπως στο μυκήλιο, στα καρποφόρα σώματα, στο σκληρότιο (συμπαγής σκληρή μάζα μυκηλίου) ή ακόμα και σε ζωμούς καλλιέργειας. Άλλες σημαντικές λειτουργίες τους οφείλονται στην η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινική τους δράση. Η αντιοξειδωτική μπορεί να οφείλεται σε κλάσματα πρωτεογλυκάνης που προσδίδεται στην παρουσία ορισμένων αμινοξέων, ή στο σελήνιο ,που βρίσκεται σε κλάσμα του πολυσακχαρίτη *Ganoderma sp* και λειτουργεί ως συμπάραγοντας στα ένζυμα που σχετίζονται με τον έλεγχο του οξειδωτικού στρες. Διάφορα βρώσιμα και φαρμακευτικά μανιτάρια στα οποία έχουν μελετηθεί βιολογικά ενεργοί πολυσακχαρίτες (με σημαντική ανοσορυθμιστική και αντικαρκινική λειτουργία) είναι το *Lentinus edodes* (πολυσακχαρίτης λεντινάνη), το *Grifola frondosa*

(πολυσακχαρίτης γκριφολάνη), το *Schizophyllum commune* (πολυσακχαρίτης σχιζοφυλλάνη) και το *Pleurotus ostreus* (πολυσακχαρίτης πλευράνη). (Martinez-Medina et al., 2021)

Εξίσου σημαντικές ενώσεις με τους υδατάνθρακες είναι οι **πρωτεΐνες**. Μάλιστα, από πρόσφατες έρευνες έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες που προέρχονται από μανιτάρια, έχουν μεγαλύτερη θρεπτική απόδοση σε σχέση με φυτικές πρωτεΐνες που λαμβάνονται από άλλες πηγές. Στα βρώσιμα μανιτάρια, οι πρωτεΐνες αποτελούν το 19 με το 39% σε ξηρό βάρος. Κυριότερες θεωρούνται: α) οι λεκτίνες, β) ορισμένα ένζυμα που δρουν ως πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσώματος, γ) τα ένζυμα λακκάσες καθώς και δ) ορισμένες ανοσοτροποποιητικές μυκητιακές πρωτεΐνες. Οι λεκτίνες αποτελούν γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες δεσμευμένες σε σάκχαρο) που τις συναντάμε κυρίως στα καρποφόρα σώματα και σπάνια στα μυκήλια ή στο στέλεχος. Οι ενώσεις αυτές στα μανιτάρια έχουν ορισμένες βιολογικές λειτουργίες οι οποίες είναι είτε εξωτερικές, όπως η προστασία από ιούς και έντομα είτε εσωτερικές, όπως διάφορες αλληλεπιδράσεις με ένζυμα (Rüdiger & Gabius, 2002). Οι λεκτίνες μπορούν να συνδεθούν αναστρέψιμα με μόνο- και oligοσακχαρίτες με αποτέλεσμα να μπορούν να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με διάφορους υδατάνθρακες και ορισμένες πρωτεογλυκάνες στην κυτταρική επιφάνεια. Έτσι συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές δραστηριότητες (όπως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων), ενώ εμφανίζουν ανοσοτροποποιητικές, αντικαρκινικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες (Venturella et al., 2021). Στα μανιτάρια, τα ένζυμα που δρουν ως πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσώματος, χαρακτηρίζονται με αυτό το τρόπο καθώς σχετίζονται άμεσα με τις ριβοσωμικές δομές, όπου προάγουν την αποβολή της αδενίνης στο RNA με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Αντίστοιχα, οι λακκάσες αποτελούν και αυτές μια ομάδα ενζύμων, η οποία προάγει την οξειδωση διαφορετικών φαινολικών και ανόργανων ενώσεων που σχετίζονται με διάφορους παράγοντες, όπως αλληλεπιδράσεις του μύκητα με παθογόνο ξενιστή, αποδόμηση λιγνίνης, αποδόμηση χρωστικής ουσίας, διόρθωση και απόκριση στρες. Τέλος, οι ανοσοτροποποιητικές πρωτεΐνες των μυκήτων, αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών με 111-114 αμινοξέα και με υψηλή σε συγκέντρωση ασπαραγίνη και ακετυλιωμένη βαλίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται με διάφορες ανοσοτροποποιητικές δραστηριότητες. Ολοκληρώνοντας, αξίζει να σημειωθεί πως στα μανιτάρια, σε συγκέντρωση μεταξύ 7,14 και 12,3 mg/g (σε ξηρή βάση), μπορούν να βρεθούν και ελεύθερα αμινοξέα τα οποία συμβάλουν κυρίως στην γεύση τους. Τα βασικότερα ελεύθερα αμινοξέα που συναντάμε είναι η θρεονίνη και η βαλίνη, ενώ υπάρχει έλλειψη/μειωμένη περιεκτικότητα σε αμινοξέα που περιέχουν θείο όπως είναι η μεθειονίνη και η κυστεΐνη. (Martinez-Medina et al., 2021).

Ένα ποσοστό ενώσεων που βρίσκονται στα μανιτάρια (περίπου μεταξύ 1,18 και 8,39% σε ξηρή βάση), έχουν ως βάση τα **λιπίδια**. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζονται συνήθως με την μορφή λιπαρών οξέων, στερολών και φωσφολιπιδίων. Για αυτά, έχουν γίνει πολλές μελέτες καθώς αποτελούν

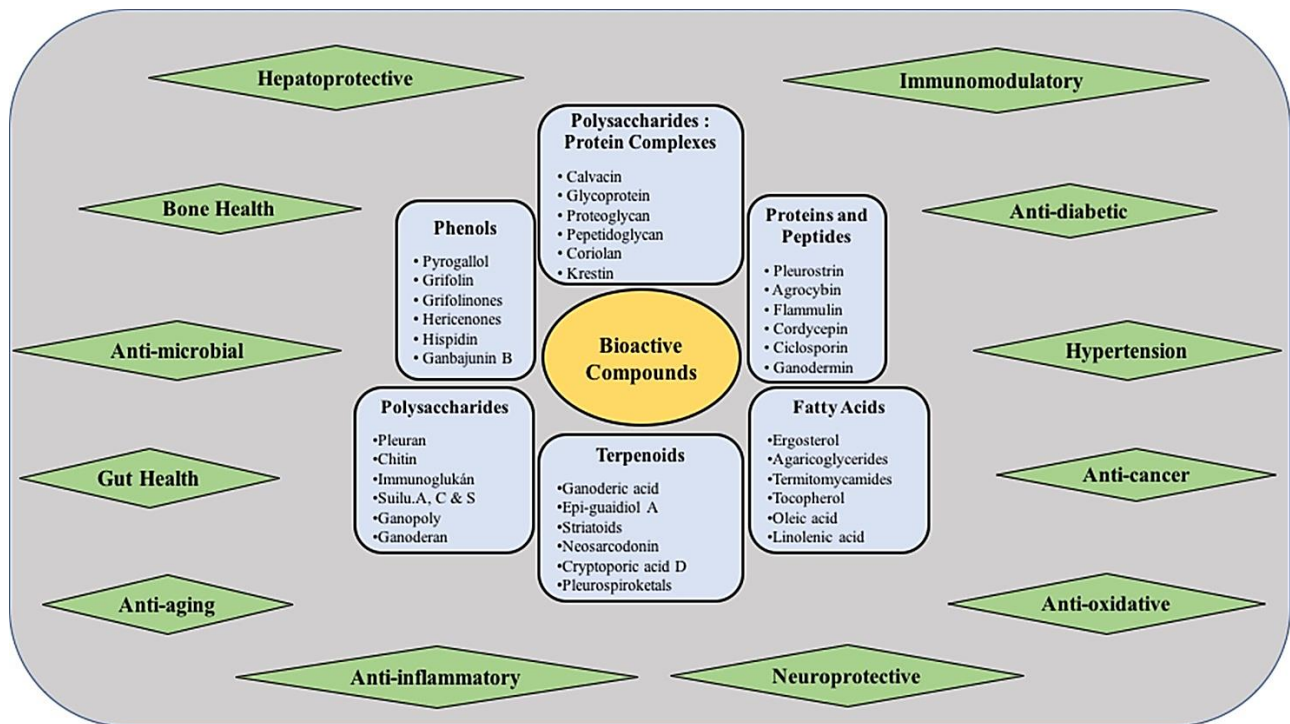
συστατικά τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός με αποτέλεσμα να καθίσταται απαραίτητη η πρόσληψή τους από την τροφή. Στα μανιτάρια, συναντάμε κυρίως το λινολεϊκό, το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ, που συνήθως προσλαμβάνονται αποκλειστικά από τη διατροφή. Η πιο συνηθισμένη στερόλη στα μανιτάρια, είναι η εργοστερόλη, η λειτουργία της οποίας συνδέεται με την ανάπτυξη των μυκήτων, την δημιουργία σπορίων και τον σχηματισμό υφών. Επιπλέον η στερόλες αποτελούν πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D και παρουσιάζουν θετική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. (Martinez-Medina et al., 2021)

Άλλα στοιχεία με θρεπτικές ιδιότητες που βρίσκονται στα μανιτάρια είναι οι **βιταμίνες** και τα **μέταλλα**. Οι πιο συνηθισμένες βιταμίνες είναι το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), η νιασίνη, η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη (που αποτελούν σύμπλεγμα βιταμίνης B), οι τοκοφερόλες και η βιταμίνη D. Μέταλλα με αυξημένη συγκέντρωση στα μανιτάρια, είναι το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), ο φώσφορος (P) και το νάτριο (Na). Επιπλέον μπορούν να βρεθούν και μέταλλα όπως το κάδμιο (Cd), ο χαλκός (Cu) (με υψηλότερη συγκέντρωση στα είδη *Pleurotus*), ο σίδηρος (Fe), το μαγγάνιο (Mn), το μολυβδαίνιο (Mo) και ο ψευδάργυρος (Zn) (Kaliyaperumal et al., 2018). Άλλα μόρια με πολύ σημαντική βιολογική δράση, που συναντάμε στους ανώτερους μύκητες, είναι οι **πολυφαινόλες**, οι οποίες στα μανιτάρια συμβάλλουν στην προστασία τους έναντι της κατανάλωσης από ζώα ή έντομα, προσδίδουν προστασία UV (Ultraviolet radiation, υπεριώδης ακτινοβολία), παρεμβαίνουν σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η γεύση ή το χρώμα, και έχουν επίσης την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ορισμένα μακρομόρια προσδίδοντας ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Στις φαινολικές αυτές ενώσεις, ανήκουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τα υδροξυκιναμικά οξέα, η λιγνάνη, η ταννίνη, το στιλβένιο και οξειδωμένες πολυφαινόλες. (Martinez-Medina et al., 2021)

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην **εργοθειονίνη**. Η εργοθειονίνη είναι ένα μόριο θειόλης/θειόνης (περιέχει θείο) που συντίθεται αποκλειστικά από μύκητες και βακτήρια (π.χ κυανοβακτήρια και μυκοβακτήρια). Η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη στα μανιτάρια (μεταξύ 0,06-5,54 mg/g σε ξηρό βάρος) και βρίσκεται τόσο στα καρποφόρα σώματα όσο και στο μυκήλιο. Παρουσιάζει σημαντική βιολογική σημασία λόγω των πολλά υποσχόμενων θεραπευτικών δυνατοτήτων που φαίνεται να έχει (στον καρκίνο, σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στον διαβήτη, στην οστεοπόρωση κ.α). Η εξέχουσα λειτουργία της είναι η αντιοξειδωτική, καθώς μπορεί να συνεργάζεται με άλλα αντιοξειδωτικά, ενάντια στο οξειδωτικού στρες (στα μιτοχόνδρια) και να προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS). Τέλος, όντας ένας σημαντικός κυτταροπροστάτης, έχει προταθεί ως νέα βιταμίνη, ενώ έχει χαρακτηριστεί και ως «βιταμίνη μακροζωίας». (Martinez-Medina et al., 2021)

### 1.2.3 Βιοδραστικές ενώσεις και βιολογική δράση

Τα μανιτάρια λοιπόν, εκτός από τη θρεπτική τους αξία είναι και μια σημαντική πηγή βιοδραστικών ενώσεων όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, φαινολικές ενώσεις, λιπαρά οξέα, τερπένια (γανοδερικά οξέα, λουσιδενικά οξέα, τριτερπενικά οξέα) και στερόλες. Για παράδειγμα, τα καρποσώματα του *Pleurotus eryngii*, εκτός του ότι αποτελούν καλή πηγή βιταμίνης D<sub>2</sub>, παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως εργοστερόλη, β-γλυκάνη και εργοθειονεΐνη (Kleflaki et al., 2022). Οι βιοδραστικές αυτές ενώσεις, είναι ο λόγος που ορισμένα μανιτάρια χαρακτηρίζονται ως φαρμακευτικά και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών δράσεων (Εικόνα 1.6). Τέτοιες δράσεις είναι η πρεβιοτική, η αντιοξειδωτική, η υπογλυκαιμική και η αντιδιαβητική, η ανοσοτροποποιητική και η αντι-πολλαπλασιαστική, η αντιμικροβιακή, η αντική, η αντιφλεγμονώδης και η αντι-αλλεργική. (Elkhateeb et al., 2019; Venturella et al., 2021; Martinez-Medina et al., 2021)



**Εικόνα 1.6** Οι βιοδραστικές ενώσεις των μανιταριών και τα οφέλη τους για την υγεία (Yadav & Negi, 2021)

### Πρεβιοτικές ιδιότητες

Οι πρεβιοτικές ιδιότητες των μανιταριών, σχετίζονται με την ενίσχυση της ανάπτυξης και του μεταβολισμού μιας ομάδας μικροοργανισμών που βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο. Η ιδιότητα αυτή, οφείλεται στην παρουσία ενώσεων όπως οι β-γλυκάνες, η χιτίνη και άλλοι ολιγοσακχαρίτες καθώς και ορισμένες πρωτεογλυκάνες. (Martinez-Medina et al., 2021)

## Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Ορισμένα μανιτάρια με αντιοξειδωτική δράση είναι το *Hypsizygus ulmarius*, *P. sajorcaju*, *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. flabellatus*, *P. eryngii*, *P. djamor*, και *P. Citrinopileatus* (Martinez-Medina et al., 2021). Από υδατικό εκχύλισμα του άγριου και βρώσιμου μανιταριού *Lentinus sajor-caju*, απομονώθηκε μια υδατοδιαλυτή ετερογλυκάνη η οποία παρουσίασε μέτρια αντιοξειδωτική δράση (Ji Won Ha et al., 2020). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.7) παρουσιάζονται ορισμένες βιοδραστικές αντιοξειδωτικές ενώσεις που βρίσκονται σε βρώσιμα άγρια μανιτάρια.

**Εικόνα 1.7** Αντιοξειδωτικές ενώσεις που προσδιορίζονται σε βρώσιμα άγρια μανιτάρια (*Bulam et al., 2018*)

<b>Mushroom species</b>	<b>Bioactive antioxidant compounds</b>	<b>References</b>
<i>Agaricus arvensis</i>	$\beta$ -carotene, ascorbic acid, lycopene, phenolic compounds, flavonoids	Barros et al., 2007c; 2008a
<i>Agaricus bisporus</i>	Phenolic compounds, flavonoids, $\beta$ -carotene, lycopene	Robaszekiewicz et al., 2010
<i>Boletus edulis</i>	$\beta$ -carotene, lycopene, ascorbic acid, flavonoids, tocopherols, Se, anthocyanidins, phenolic compounds	Vamanu and Nita, 2013; Turfan et al., 2018
<i>Cantharellus cibarius</i>	Flavonoids, homogentisic acid, pyrogallol, gentisic acid, myricetin	Palacios et al., 2011; Kosanic et al., 2013
<i>Craterellus cornucopioides</i>	$\beta$ -glucan, homogentisic acid, gallic acid, pyrogallol, flavonoids	Palacios et al., 2011; Özcan and Ertan, 2018
<i>Hydnum repandum</i>	Phenolic compounds, indole compounds, sterols	Sulkowska-Ziaja et al., 2014
<i>Lactarius deliciosus</i>	Dietary fibre, ascorbic acid, $\alpha$ -tocopherol, phenolic compounds, flavonoids, $\beta$ -carotene	Barros et al., 2007a; Bozdoğan et al., 2018
<i>Lactarius piperatus</i>	Phenolic compounds, flavonoids, ascorbic acid, $\beta$ -carotene, lycopene	Barros et al., 2007b; Kosanic et al., 2013
<i>Lactarius volemus</i>	Phenolic compounds, ascorbic acid	Keleş et al., 2011
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Gallic, p-coumaric, and vanillic acids, ascorbic acid, ergosterol	Karaman et al., 2010; Gasecka et al., 2018
<i>Lepista nuda</i>	$\beta$ -carotene, tocopherols, lycopene, phenolic compounds, ascorbic acid	Elmastaş et al., 2007; Barros et al., 2008b
<i>Marasmius oreades</i>	Phenolic compounds, flavonoids, ascorbic acid, Se	Ramesh and Pattar, 2010; Turfan et al., 2018
<i>Morchella conica</i>	Total phenolic compounds, total flavonoids, Se	Turfan et al., 2018
<i>Morchella esculenta</i>	Phenolic compounds, flavonoids, ascorbic acid, ergosterol	Gasecka et al., 2018
<i>Pleurotus eryngii</i>	Gallic acid, protocatechuic acid, naringin, kaempferol, resveratrol	Cıkcıkoğlu Yıldırım et al., 2012
<i>Pleurotus florida</i>	$\beta$ -carotene, lycopene, ascorbic acid, phenolic compounds	Vishwakarma et al., 2017
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Phenolic compounds, flavonoids, $\beta$ -carotene, ascorbic acid, lycopene	Tel et al., 2015; Bozdoğan et al., 2018
<i>Russula delica</i>	$\beta$ -carotene, $\alpha$ -tocopherol, total phenolic compounds	Elmastaş et al., 2007
<i>Sarcodon imbricatus</i>	$\beta$ -carotene, ascorbic acid, lycopene, phenolic compounds	Barros et al., 2007c
<i>Sparassis crispa</i>	Phenolic compounds, indole compounds, sterols	Sulkowska-Ziaja et al., 2014
<i>Tricholoma acerbum</i>	Tocopherols, phenolic compounds, ascorbic acid, $\beta$ -carotene, lycopene	Barros et al., 2008b

## Υπογλυκαιμικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες

Ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού κάθε χρόνο (με περίπου 415 εκατομμύρια περιπτώσεις το 2015), εμφανίζουν σακχαρώδη διαβήτη. Ένας τρόπος αντιμετώπισης της υπεργλυκαιμίας, είναι η αναστολή ενζύμων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων (στο λεπτό έντερο), περιορίζοντας την απορρόφησή τους. Ορισμένες πρωτεϊνούχες ενώσεις και πολυφαινολικά μόρια των μανιταριών, αποδείχθηκε ότι μπορούν να αναστείλουν αποτελεσματικά τέτοια ένζυμα, όπως είναι η α-γλυκοσιδάση και η α-αμυλάση. Αντιγλυκαιμική δράση έχουν και άλλες ενώσεις των μανιταριών, όπως οι α-γλυκάνες και οι β-γλυκάνες. (Martinez-Medina et al., 2021)

## Ανοσοτροποποιητικές, αντι-πολλαπλασιαστικές και αντικαρκινικές ιδιότητες

Η δεύτερη μεγαλύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, είναι ο καρκίνος. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες και ορισμένες πολυφαινόλες από εδώδιμα φαρμακευτικά μανιτάρια έχει αναφερθεί ότι έχουν αντι-πολλαπλασιαστική και αντικαρκινική δράση. (Martinez-Medina et al., 2021). Για παράδειγμα το βουλπινικό οξύ (πολυφαινόλες), που απομονώθηκε από το εκχύλισμα του *Pulveroboletus ravenelii*, μειώνει τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, ενώ από το μανιτάρι *Albatrellus confluens*, απομονώθηκε η γριφολίνη, ένας δευτερογενής μεταβολίτης, που βρέθηκε ότι αυξάνει την απόπτωση (κυτταρικό θάνατο) των καρκινικών κυττάρων. Το *Pleurotus eryngii*, περιέχει πολλούς πολυσακχαρίτες (με κύριους μονοσακχαρίτες ως συστατικά την D γλυκόζη, D γαλακτόζη και D μανόζη) που έχουν αντικαρκινική δράση καθώς και τρία πεντακυκλικά τριτερπενοειδή (2,3,6,23-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 2,3,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid και λουπεόλη), με αντικαρκινική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τέλος, πολυσακχαρίτες (κυρίως β-(1 → 3)-D-γλυκάνης με πλευρικές αλυσίδες β-(1 → 6)-γλυκοζυλικών μονάδων) από το μανιτάρι *Dictyophora indusiata* (Bridal veil) έχουν ανοσοδιεγερτική αλλά και ανοσοκατασταλτική δράση. (Ji Won Ha et al., 2020)

## Αντιμικροβιακές και αντικές ιδιότητες

Τα καρποφόρα σώματα των μανιταριών, προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους στο φυσικό τους περιβάλλον, παράγουν ενώσεις οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενάντια σε κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς. (Martinez-Medina et al., 2021). Για παράδειγμα οι ενώσεις Terrestrin E, vialinin B και ganbajunin E που απομονώθηκαν από φρέσκα καρποφόρα σώματα του μανιταριού *Thelephora palmata* έχουν αντιμικροβιακή δράση κατά του *Staphylococcus aureus*, ενώ ενώσεις που απομονώθηκαν από άγριο μανιτάρι *Agaricus bisporus*, εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*E. coli*, *Pasteurella multocida* και *Neisseria gonorrhoeae*). Επιπλέον βρέθηκε ότι η ένωση Rhodatin (μεροτερπένιο) από το μανιτάρι *Rhodotus palmatus*, έχει ισχυρές αντικές ιδιότητες κατά του ιού της ηπατίτιδας C και ο πολυσακχαρίτης



λεντινάνη, από το *Lentinus edodes*, παρουσιάζει δράση έναντι του ιού της λοιμώδους αιμοποιητικής νέκρωσης (Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV). (Ji Won Ha et al., 2020)

### Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Ορισμένοι δευτερογενής μεταβολίτες των μανιταριών είναι γνωστοί για τη βελτίωση και την ενίσχυση που παρέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η εργοστερόλη, για παράδειγμα, που μπορεί να βρεθεί στα καρποφόρα σώματα βρώσιμων μανιταριών, όπως το *A. bisporus* και το *Imleria badia*, παρουσιάζει αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Αντιφλεγμονώδη δράση παρουσιάζει και το καφεϊκό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε υψηλή περιεκτικότητα (15μg/g σε ξηρό βάρος) σε μανιτάρια όπως το *A. bisporus*, *C. cibarius*, *I. badia*, March mushroom (*H. marzuolus*), *P. ostreatus*, penny bun (*B. edulis*), red pine mushroom (*L. deliciosus*) και St. George's mushroom (*Calocybe gambosa*) (Martinez-Medina et al., 2021). Οι Ji Won Ha, Juhui Kim, Hyunwoo Kim, Wonyoung Jang και Ki Hyun Kim (2020) ανέφεραν ότι το μανιτάρι *Agaricus brasiliensis*, που αποτελεί πηγή λινελαϊκού οξέος, θα μπορούσε διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη φλεγμονωδών ασθενειών.

### Αντιαλλεργικές ιδιότητες

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εργοστερόλη που παραλαμβάνεται από εκχύλισμα του μανιταριού *Grifola frondosa* και βρέθηκε ότι αποτελεί μια δραστική αντιαλλεργική ένωση (αλλεργία τύπου 1). (Ji Won Ha et al., 2020)

### 1.3 Λειτουργικά τρόφιμα και μανιτάρια

Τα μανιτάρια λοιπόν, αποτελούν πηγή θρεπτικών συστατικών (πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, βιταμίνες, ανόργανα άλατα κ.α) και βιοδραστικών ενώσεων (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, πολυφαινόλες, εργοθειονίνη κ.α). Έτσι πέρα από την υψηλή θρεπτική τους αξία, παρουσιάζουν και βιοδραστικές ιδιότητες (αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντιδιαβητικές, ανοσοτροποποιητικές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές κ.α) με αποτέλεσμα να προάγουν την υγεία του ανθρώπου.

Τα **μανιτάρια** επομένως, κυρίως λόγω των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχουν, μπορούν να χαρακτηριστούν «**ως**» λειτουργικά τρόφιμα (δηλαδή ως τρόφιμα στην φυσική τους μορφή) ή να χρησιμοποιηθούν ως **συστατικά «μέσα»** σε λειτουργικά τρόφιμα, είτε με τη χρήση σκόνης μανιταριών σε προϊόντα (π.χ εφαρμογή σκόνης μανιταριών σε προϊόντα αρτοποιίας και σε σνακ) είτε με την προσθήκη σε διάφορα προϊόντα, εκχυλισμάτων και ενώσεων που έχουν απομονωθεί από

μανιτάρια (π.χ η προσθήκη σε τρόφιμα πολυσακχαριτών απομονωμένων από μανιτάρια, όπως είναι οι γλυκάνες). Γενικά, εκτός από τρόφιμα, τα μανιτάρια μπορούν να καταναλωθούν και με την μορφή συμπληρώματος διατροφής (Dietary Supplement, DS) καθώς και ως τρόφιμα/συστατικά με φαρμακευτική δράση που συνήθως ονομάζονται «mushroom pharmaceuticals». Επιπλέον ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη διατροφοδραστικών προϊόντων, μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν και ως φυσικοί παράγοντες βιοελέγχου στη φυτοπροστασία (εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα) και μέσα σε καλλυντικά. (Reis et al., 2017; Salehi, 2019)

### 1.3.1 Μελέτες για την ενσωμάτωση μανιταριών σε τρόφιμα

Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες για την ενσωμάτωση των μανιταριών στα τρόφιμα, μέχρι το 2017 δεν είχαν κυκλοφορήσει πολλά προϊόντα αυτού του είδους (λειτουργικά τρόφιμα μανιταριών) στην αγορά. Ωστόσο, καταναλώνονται κυρίως στη φυσική τους κατάσταση ή ως συμπληρώματα διατροφής (Reis et al., 2017). Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί, στη συνέχεια αναλύεται περαιτέρω η χρήση των μανιταριών με στόχο την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων.

Δεδομένου ότι τα μανιτάρια αποτελούν πλούσια πηγή φυτικών ινών, θεωρούνται εξαιρετική επιλογή για να αντικαταστήσουν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αλεύρια δημητριακών σε διάφορα προϊόντα αρτοποιίας (ψωμί, κέικ, μπισκότα κ.α). Για παράδειγμα, σε μελέτη από τους E. Ulzijiargal, J. Yang, L. Lin, C. Chen και J. Mau (2013), κατά την παρασκευή ψωμιού, 5% του αλευριού σίτου αντικαταστάθηκε με σκόνη από μυκήλιο των μανιταριών *Antrodia Camphorata*, *Agaricus Blazei*, *Hericium erinaceus* και *Phellinus linteus*. Παρατηρήθηκε πως μετά το ψήσιμο, το ψωμί με μυκήλιο περιείχε σχετικά μεγάλες ποσότητες γ-αμινο-βουτυρικού οξέος (ή GABA) και εργοθειονίνης, γεγονός που το καθιστά ωφέλιμο για την υγεία. Παράλληλα αυξήθηκε η τιμή των ελεύθερων αμινοξέων umami και των 5-νουκλεοτιδίων umami. Σε άλλη μελέτη έγινε προσθήκη πάστας του μανιταριού *L. edodes* σε αλεύρι σίτου για την παραγωγή νουντλς. Αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή ενός λειτουργικού τροφίμου υψηλότερης ποιότητας και πλούσιου σε φυτικές ίνες με αντιοξειδωτικές και υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες (Kim et al., 2008; Kim et al., 2009). Λίγο αργότερα, χρησιμοποιήθηκε σκόνη μανιταριού *Pleurotus sajor-caju* (20%) από τους Parab, Dhalagade, Sahoo, και Ranveer (2012), προκειμένου να αναπτυχθεί ένα είδος ινδικού σνακ,. Το τελικό προϊόν παρουσίασε βελτιωμένη θρεπτική αξία, με αυξημένες τιμές σε φυτικές ίνες, πρωτεΐνες, μέταλλα και ακατέργαστες ίνες. Σε αντίστοιχη μελέτη, είχαν χρησιμοποιηθεί εκχυλίσματα από το *A. bisporus* για την παραγωγή ενός σνακ με αντιοξειδωτική ικανότητα και ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών. (Singla et al., 2009).

Παρ' όλα αυτά, εκτός από την χρήση σκόνης, εκχυλισμάτων και ενώσεων μανιταριών σε προϊόντα αρτοποιίας και σε διάφορα σνακ, έχουν διεξαχθεί επίσης μελέτες για την χρήση μανιταριών σε τυρί.

Τα γαλακτικά βακτήρια των γενών *Lactobacillus* και *Streptococcus* χρησιμοποιούνται συνήθως στην παραγωγή τυριού καθώς παράγουν το ένζυμο πήξης του γάλακτος αφυδρογονάση. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως κάποια γένη μανιταριών, μπορούν να παράξουν γαλακτική αφυδρογονάση αλλά και ένα άλλο ένζυμο πήξης του γάλακτος. Για παράδειγμα το μανιτάρι *Schizophyllum Commune*, χρησιμοποιήθηκε στην θέση κάποιου γαλακτικού βακτηρίου, για την παραγωγή ενός υποκατάστατου τυριού. Το τρόφιμο που παράχθηκε, χαρακτηρίστηκε ως λειτουργικό καθώς αποδείχθηκε ότι λειτουργούσε προληπτικά κατά του καρκίνου και της θρόμβωσης (Okamura-Matsui et al., 2001). Σε άλλη μελέτη, χρησιμοποιώντας ως τεχνική την μικροενθυλάκωση με ξήρανση με ψεκασμό (spray-drying microencapsulation), ενσωματώθηκαν υδροαλκοολικά εκχυλίσματα δύο ειδών μανιταριών (*Suillus luteus* και *Coprinopsis atramentaria*) σε τυρί cottage. Το τελικό προϊόν διατήρησε τις θρεπτικές του ιδιότητες, ενώ παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση (Ribeiro et al., 2015).

Πέρα από τις αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες που προσδίδουν τα μανιτάρια σε ορισμένα τρόφιμα, έχει διερευνηθεί και η αντιμικροβιακή δράση, δηλαδή η χρήση φυσικών εκχυλισμάτων ως συντηρητικών (αποφυγή αλλοίωσης) για τα τρόφιμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η ενσωμάτωση εκχυλισμάτων του μανιταριού *Boletus edulis* σε μπιφτέκια βόειου κρέατος, που είχε ως αποτέλεσμα την προστασία του κρέατος από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. (Barros et al., 2011) Επιπλέον βρέθηκε ότι εκχύλισμα από το *Boletus aereus*, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας για τον έλεγχο κατά των βακτηρίων που είναι ικανά να οδηγήσουν σε τροφική δηλητηρίαση όπως *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium*. (Stojković et al., 2015) Το *A. Bisporus* και το *A. Blazei*, βρέθηκε πως μπορούν να λειτουργούν ως συντηρητικά στο γιαούρτι, ενάντια στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* (Stojković et al., 2014). Τέλος, το μανιτάρι *Tirmania pinoyi* από την Λιβύη, όταν προστέθηκε σε σούπα, παρουσίασε αποτελεσματικότητα ενάντια στον *Staphylococcus aureus*. (Stojković et al., 2013).

Αν και όλα αυτά τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα, είναι πολύ σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την βιοδραστικότητα των ενώσεων ή των εκχυλισμάτων και τις λειτουργίες που εμφανίζουν. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι οι αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά που υπάρχουν στα τρόφιμα, ή διάφορες επεξεργασίες των τροφίμων. Για παράδειγμα το πολυμερές καραγενάνη, που χρησιμοποιείτε σε διάφορα τρόφιμα ως πηκτωματοποιητής, πυκνωτικό και σταθεροποιητής, μπορεί να επηρεάσει την αντικαρκινική δράση ορισμένων πολυσακχαριτών, όπως η λεντινάνη. Επιπλέον βρέθηκε πως ένζυμα όπως οι πηκτινάσες και οι δεξτρανάσες που βρίσκονται σε ορισμένα τρόφιμα, μπορούν να καταστρέψουν την βιοδραστικότητα μιας β-(1,3) γλυκάνης, απομονωμένης από το υδατοδιαλυτό κλάσμα του καρπού ή από τα διηθήματα υγρών καλλιεργειών του μυκηλίου του μανιταριού *G. Lucidum*. Εκτός από τους

παράγοντες που επηρεάζουν την βιοδραστικότητα, πρέπει να ελέγχεται η βιοπροσβασιμότητα και η βιοδιαθεσιμότητα, ώστε ο ισχυρισμός ότι το λειτουργικό τρόφιμο λειτουργεί ευεργετικά για την υγεία, να είναι αληθής. Για παράδειγμα, ορισμένες πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους που βρίσκονται στα τρόφιμα, δεν είναι βιοπροσβάσιμες (δεν απορροφούνται από το ανώτερο έντερο) στο ανθρώπινο σώμα. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι ορισμένες διαλυτές και αδιάλυτες διαιτητικές ίνες, που απαντώνται σε υψηλή συγκέντρωση στα μανιτάρια, (δημιουργούν πρόβλημα στην βιοδιαθεσιμότητα και την απορρόφηση μακροθρεπτικών συστατικών και βιομορίων στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου (π.χ λίπος, ορισμένα μέταλλα και ιχνοστοιχεία). (Reis et al., 2017)

Τέλος, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στις ποσότητες των συστατικών (π.χ πολυσακχαρίτες) που χρησιμοποιούνται για να αποδώσουν βιοδραστικότητα σε τρόφιμα, προκειμένου να μην παρουσιάσουν τοξικές επιδράσεις. Σε αυτή την περίπτωση, το τρόφιμο δεν θα μπορεί να χαρακτηριστεί ως λειτουργικό. Μερικοί από τους πιο μελετημένους πολυσακχαρίτες των μανιταριών όπως η σχιζοφυλλάνη και η λεντινάνη, είναι ήδη διαθέσιμοι ως nutraceuticals στο εμπόριο. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.8), παρουσιάζονται μελέτες για λειτουργικά τρόφιμα με βάση τα μανιτάρια, είτε σε σκόνες, είτε με τα εκχυλίσματα, τις ενώσεις και τα μυκήλιά τους.

**Εικόνα 1.8** Μελέτες για λειτουργικά τρόφιμα με βάση τα μανιτάρια, είτε σε σκόνες, είτε με τα εκχυλίσματα, τις ενώσεις και τα μυκήλιά τους (Üstün et al., 2018)

Mushroom species	Functional food	References
<i>Agaricus aegerita</i>	Cream cheese	Petrovic et al., 2015
<i>Agrocybe aegerita</i>	Snack food	Brennan et al., 2012; 2013
<i>Auricularia auricula</i>	Bread	Fan et al., 2006
<i>Agaricus bisporus</i>	Snack food	Singla et al., 2009
	Bread	Ahmad and Singh, 2016
	Sponge cake	Arora et al., 2017
<i>Agaricus blazei</i>	Yoghurt	Stojkovic et al., 2014
	Milk	Vital et al., 2017
<i>Agaricus blazei</i> , <i>Antrodia camphorata</i> , <i>Hericium erinaceus</i> and <i>Phellinus linteus</i>	Bread	Ulzizjargal et al., 2013
<i>Agaricus bohusii</i>	Cream cheese	Reis et al., 2012
<i>Boletus aereus</i>	Pork meat product	Stojkovic et al., 2015
<i>Boletus edulis</i>	Beef burger	Barros et al., 2011
<i>Cordyceps militaris</i>	Extruded product	Zhong et al., 2017
<i>Ganoderma amboinense</i> , <i>Agaricus</i> spp. or <i>Fomes yucatanensis</i> or mixed mushrooms	Soup and sauce	Laroche and Michaud, 2007
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Chicken pate	Petrovic et al., 2014
<i>Lentinula edodes</i>	Baked food	Kim et al., 2011
	Noodle	Kim et al., 2008; 2009
	Frying batter	Kim et al., 2010
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Papad (An Indian snack food)	Parab et al., 2012
<i>Schizophyllum commune</i>	Cheese-like food	Okamura-Matsui et al., 2001
<i>Suillus luteus</i> and <i>Coprinopsis atramentaria</i>	Cottage cheese	Ribeiro et al., 2015
<i>Tirmania pinoyi</i>	Soup	Stojkovic et al., 2013

References: Giavasis, 2014b; Reis et al., 2017; Ma et al., 2018.

### 1.3.2 Λειτουργικά τρόφιμα με βάση τα μανιτάρια στο εμπόριο

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα λειτουργικά τρόφιμα και ποτά με βάση τα μανιτάρια, που έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά.

**Πίνακας 1.4** Λειτουργικά τρόφιμα στο εμπόριο (Bulam et al., 2018)

Λειτουργικά Τρόφιμα	Παραγωγός
Μείγμα μπιφτεκιού με μανιτάρια	<i>Sonic Drive-In</i>
Παγωτό με μανιτάρι <i>Hericium erinaceus</i>	<i>Unframed Ice Cream</i>
Λειτουργικό ποτό με μανιτάρι	<i>Koios</i>
Ρόφημα πλούσιο σε κολλαγόνο που περιέχει <i>Auricularia auricula</i>	<i>Simply Auri</i>
Μείγμα λεμονάδας με μανιτάρι <i>Inonotus obliquus</i>	<i>Four Sigmatic</i>
Μείγματα καφέ-μανιταριών	<i>Four Sigmatic Sol-ti</i>
Τσάι (σε μπουκάλι)	
Ρόφημα σοκολάτας-μανιταριού με βάση το μανιτάρι <i>Ganoderma lucidum</i>	<i>REBBL</i>
Ποτό cold brew	<i>REBBL Health-Ade</i>
Πλούσιο σε προβιοτικά ζυμωμένο τσάι	
Καφές cold brewed με φαρμακευτικό μανιτάρι	<i>Love Grace</i>
Τσάγια εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά μανιτάρια	<i>Choice</i>
Κρύο πράσινο τσάι	<i>Mudra Mushroom</i>

Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα λειτουργικών τροφίμων στην αγορά, αποτελούν και ορισμένα προϊόντα της ελληνικής εταιρίας «MANITARIA ΔΙΡΦΥΣ» (<https://www.manitariadirfis.gr/>), όπως ζυμαρικά με μίγμα από σιμιγδάλι και αποξηραμένα μανιτάρια, σούπες με αποξηραμένα μανιτάρια, ριζότο και κριθαρότο με αποξηραμένα μανιτάρια σε αναλογία 10%, και σνακ από μανιτάρια όπως μπισκότα, σοκολάτες και κριτσίνια.



**Εικόνα 1.9** Ζυμαρικά μεμανιτάρια, Σνακ (σοκολάτα και μπισκότα) απόμανιτάρια, Ριζότο με αποξηραμέναμανιτάρια (<https://www.manitariadirfis.gr/>)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΑ ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

### 2.1 Οξειδωτικό στρες

#### 2.1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

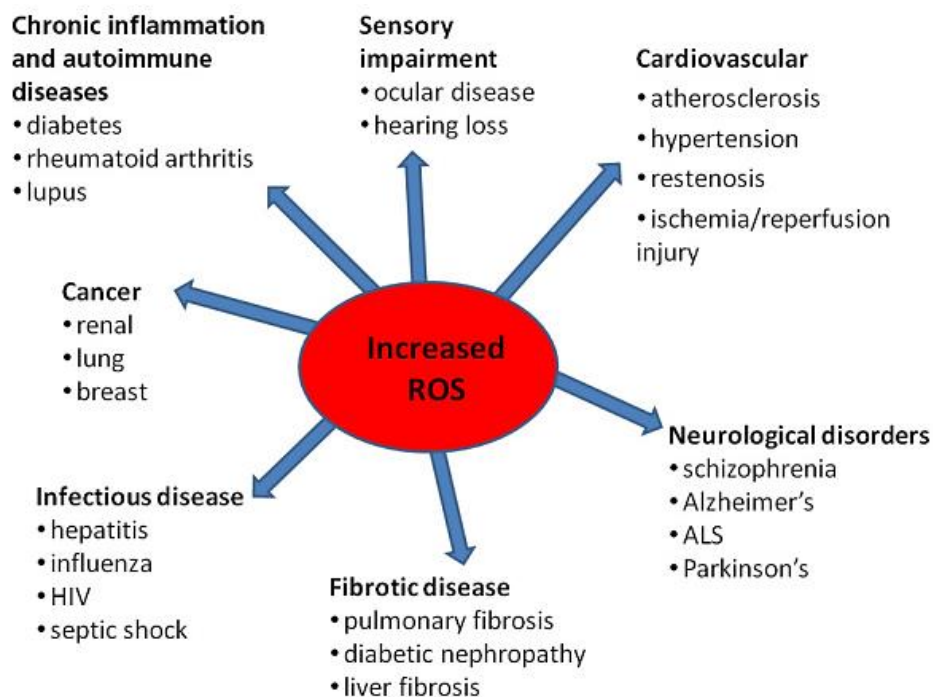
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), αποτελούν μεμονωμένα μόρια τα οποία είναι πολύ ασταθή και δραστικά διότι περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια σθένους ή ασταθείς δεσμούς. Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι είτε ουδέτερα, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), είτε ιόντα όπως το ανιόν υπεροξειδίου ( $\cdot O_2^-$ ), είτε ρίζες όπως οι ρίζες υδροξυλίου ( $\cdot OH$ ). Ωστόσο, λόγω της δραστικότητάς τους, μπορούν εύκολα να μεταβαίνουν από το ένα είδος στο άλλο (Brieger et al., 2012). Πολλές φορές συγχέονται με της ελεύθερες ρίζες, κάτι το οποίο σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις είναι σωστό. Για παράδειγμα, το  $H_2O_2$  αν και ανήκει στα ROS διότι είναι περισσότερο χημικά δραστικό από το μοριακό οξυγόνο, δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα. Ομοίως και το μοριακό οξυγόνο. (Lushchak, 2014; Γιαννακοπούλου 2007). Εκτός από τις ROS, υπάρχουν και οι δραστικές μορφές αζώτου όπως η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO\cdot$ ) το υπεροξεινιτρώδες ( $ONOO^-$ ) και οξειδία του αζώτου ( $NO^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $N_2O$ ) (Dounousi et al., 2009).

Πάνω από το 90% των ROS παράγεται (1) κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια, (2) σε μεταβολικές διεργασίες, (3) από την ακτινοβολία και (4) από ορισμένα κυτταρικά ένζυμα που ονομάζονται οξειδάσες NADPH (NOX).

Τα ROS, όταν βρίσκονται σε χαμηλά/μέτρια και ρυθμισμένα επίπεδα, παρουσιάζουν φυσιολογικές θετικές επιδράσεις. Οι επιδράσεις αυτές αφορούν το ανοσοποιητικό σύστημα (θανάτωση μικροβίων, βακτηρίων και μυκήτων, περιορισμός φλεγμονής), τη λειτουργία του θυροειδούς αδένου (παραγωγή θυροειδικών ορμονών), την ρύθμιση των μηχανισμών ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών (π.χ. ρύθμιση της πρωτεϊνικής κίνησης «στόχος της ραπαμκίνης» ή αλλιώς TOR που ανιχνεύει τα θρεπτικά συστατικά) και την ρύθμιση της διαδικασίας της γήρανσης, μεσολαβώντας στην απόκριση στρες σε βλάβες που εξαρτώνται από την ηλικία. Επιπλέον τα ROS, συμβάλλουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, ενισχύουν την λειτουργία της μνήμης, ενώ θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι διαδραματίζουν και σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των εγκεφαλικών κυττάρων ή και στην επικοινωνία από κύτταρο σε κύτταρο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Brieger et al., 2012). Επίσης, εμπλέκονται στη ρύθμιση διαδικασιών, όπως η διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, καθώς και λειτουργιών, όπως η μεταγωγή σήματος, η γονιδιακή έκφραση και η ενεργοποίηση των υποδοχέων (Hussain et al., 2016).

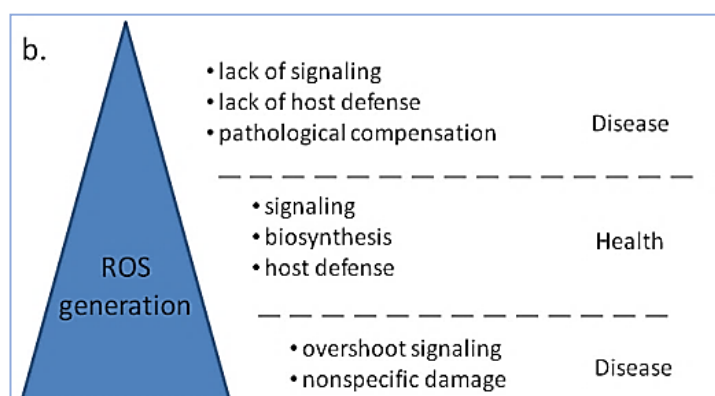
Αντίθετα, όταν τα ROS βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις και ο οργανισμός είναι εκτεθειμένος σε αυτά για μεγάλο χρονικό διάστημα, τότε μπορούν να προκαλέσουν την οξείδωση λιπιδίων,

πρωτεϊνών και του DNA. Έτσι δημιουργούν βλάβες σε διάφορες λειτουργίες των κυττάρων και μπορούν να οδηγήσουν σε ορισμένες ασθένειες. Τέτοιες ασθένειες είναι ο καρκίνος (λόγω της βλάβης που μπορεί να προκαλέσουν στο DNA), καρδιαγγειακές παθήσεις (π.χ υπέρταση), νευρολογικές/ψυχιατρικές παθήσεις (π.χ πάρκινσον, σχιζοφρένεια) και διάφορες βλάβες στις αισθήσεις (π.χ καταρράκτης, απώλεια ακοής), όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2. Εκτός από την υπερπαραγωγή των ROS, ασθένειες μπορεί να προκαλέσει και η απουσία τους (π.χ χρόνια κοκκιωματώδης νόσος, ορισμένες αυτοάνοσες διαταραχές). (Brieger et al., 2012)



**Εικόνα 2.1** Υπερπαραγωγή ROS και η συμβολή τους σε διάφορες οικογένειες ασθενειών (Brieger et al., 2012)

Επομένως, σε μέτρια επίπεδα, τα ROS έχουν σημαντικούς ρόλους στην υγεία καθώς λαμβάνουν μέρος σε μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη σηματοδότηση, τις βιοσυνθετικές διεργασίες και την άμυνα του ξενιστή. Σε πολύ χαμηλά επίπεδα, η κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αντιμικροβιακή άμυνα (π.χ χρόνια κοκκιωματώδης νόσος), σε υποθυρεοειδισμό, σε χαμηλή αρτηριακή πίεση ή απώλεια ωτοκοινίας. Ενώ



**Εικόνα 2.2** Οι συνέπειες των ROS στον οργανισμό, όταν βρίσκονται σε χαμηλές, μέτριες και υψηλές συγκεντρώσεις (Brieger et al., 2012)



αντίθετα, σε πολύ υψηλά επίπεδα, μπορούν να προκύψουν καρδιαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές διαταραχές, καρκίνοι και χρόνιες φλεγμονές (Εικόνα 2.1). (Brieger et al., 2012)

### 2.1.2 Άμυνα του οργανισμού κατά των ROS

Η άμυνα του οργανισμού κατά των ROS, βασίζεται στον έλεγχο της παραγωγής τους, αλλά και στην εξάλειψη ή την ελαχιστοποίηση των αρνητικών τους επιπτώσεων. Δηλαδή, στόχος είναι να βρίσκονται σε ισορροπία η παραγωγή και η εξάλειψή τους, ώστε να διατηρούνται σε σταθερά και μέτρια/χαμηλά επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν ένα αρκετά περίπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα.

Το αντιοξειδωτικό αυτό σύστημα, αν ταξινομηθεί με βάση τις μοριακές μάζες, χωρίζεται σε δύο ομάδες. Η πρώτη είναι τα αντιοξειδωτικά χαμηλής (κάτω από 1 kilodalton) μοριακής μάζας. Αυτά είναι είτε συστατικά τροφίμων και συμπληρωμάτων που λαμβάνονται από την διατροφή, όπως η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (τοκοφερόλη), τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες και το ουρικό οξύ, είτε ουσίες που συντίθενται από τον οργανισμό, όπως η γλουταθειόνη.

Η δεύτερη ομάδα αντιοξειδωτικών είναι τα αντιοξειδωτικά υψηλής μοριακής μάζας (μεγαλύτερη από ένα ή και δέκα kilodaltons), όπως το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD), καθώς και το SOD με την παρουσία των μετάλλων χαλκού / ψευδαργύρου (Cu/Zn) στο μόριο (SOD1), το SOD με την παρουσία μαγγανίου (Mn) στο μόριο (SOD2), η καταλάση ή άλλες υπεροξειδάσες όπως οι εξαρτώμενες από γλουταθειόνη υπεροξειδάσες (GPx), οι οποίες μπορούν και μειώνουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και τα υπεροξειδία των λιπιδίων. Άλλα αντιοξειδωτικά είναι η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR-1 ή TRR), ένζυμο της οδού της φωσφορικής πεντόζης όπως η Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PDH) και η 6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση (6PG1) (Lushchak, 2014). Ένας άλλος τρόπος κατάταξης των αντιοξειδωτικών, είναι ο διαχωρισμός τους σε ενζυμικά (π.χ. SOD) και σε μη ενζυμικά (π.χ. βιταμίνη C) αντιοξειδωτικά. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να διακόψουν αλυσιδωτές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα την αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων. (Yiannakopoulou, 2007)

Έτσι, η άμυνα του οργανισμού κατά των ROS, βασίζεται σε αντιοξειδωτικά ένζυμα και σε μη-ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες συνήθως λαμβάνονται από την διατροφή ή παράγονται *in vivo*. (Πίνακας 2.1)

**Πίνακας 2.1** Αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού

Κατηγορία αντιοξειδωτικού	Αντιοξειδωτικά	Πηγή
Αντιοξειδωτικά ένζυμα	Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και ισομορφές κυτταροπλασματική CuZn-SOD (SOD1), η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD (SOD2).	(Yiannakopoulou, 2007)  (Dounousi et al., 2009)
	Καταλάση (CAT)	
	Ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης	
	Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)	
	Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs)	
	Υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης.	
	Συνένζυμο Q (ουβικινόνη)	
	Περοξυρεδοξίνες (Prxs)	
	Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση	
Θειοαναγωγάσες TRX.		
Βιταμίνη C.		
Βιταμίνη E (τοκοφερόλες)		
Καροτενοειδή		
Μέταλλα (σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος)		
Ουρικό οξύ		
Πολυφαινόλες		
Πρωτεΐνες που δεσμεύουν τοξικά μέταλλα (π.χ Cu)	Μεταλλοθειονίνες	(Yiannakopoulou, 2007)
Άλλες αντιοξειδωτικές εξωκυττάρια ουσίες στα βιολογικά συστήματα (παράγονται <i>in vivo</i> ή προσλαμβάνονται από την διατροφή)	Αλβουμίνη	(Dounousi et al., 2009)
	Χολερυθρίνη	
	Γλυκόζη	
	Σερουλοπλασμίνη	
	Ερυθροκύτταρα	
	Λακτοφερρίνη	
	Τρανσφερρίνη	
Απτογλοβουλίνη και αιμοπηξίνη		

	α-λιποϊκό οξύ	
	Μελατονίνη- Σερατονίνη	
	Μελανίνες	

Ωστόσο, οι φυσικές αντιοξειδωτικές άμυνες του ανθρώπου δεν είναι πάντα επαρκείς για τη διατήρηση της σωστής ισορροπίας των ROS. Από την άλλη πλευρά, η υψηλή κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά, έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά ασθενειών και προστασία έναντι διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. (Brieger, 2012)

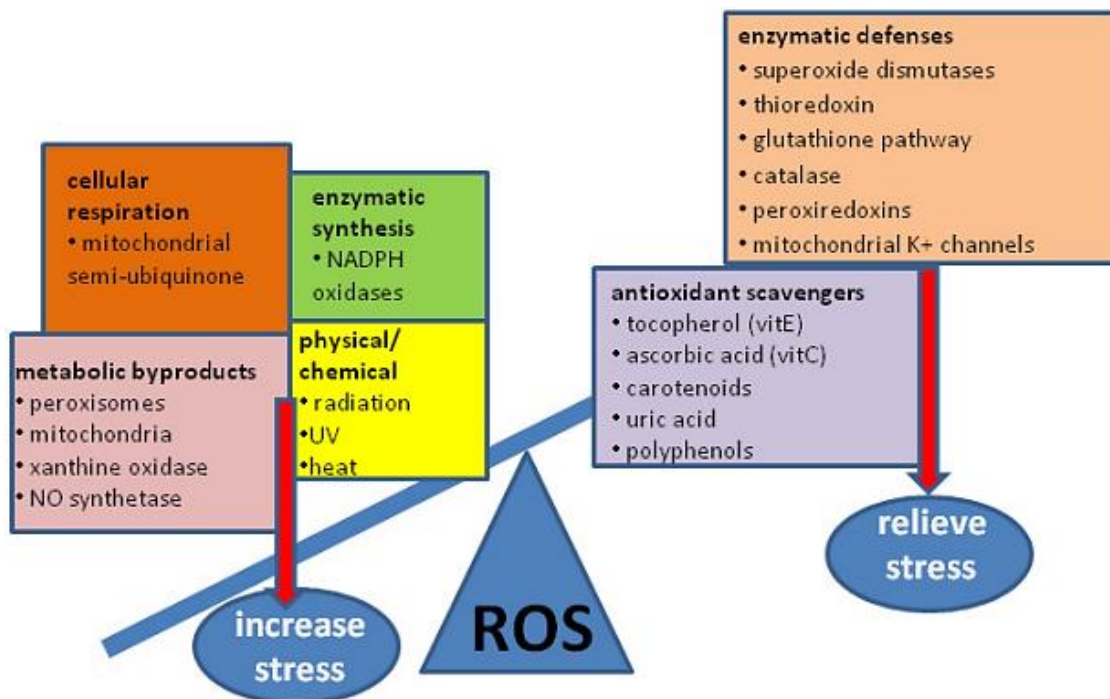
### 2.1.3 Ορισμός Οξειδωτικού στρες

Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η ισορροπία της εξάλειψης και παραγωγής των ROS που αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να διαταραχθεί. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα διάφορων παραγόντων όπως: 1) αυξημένες συγκεντρώσεις ενδογενών και εξωγενών ενώσεων των οποίων η αυτοοξείδωση σχετίζεται με παραγωγή ROS, 2) απουσία αντιοξειδωτικών χαμηλής μοριακής μάζας στον οργανισμό λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων τους (αντιοξειδωτικών προσλαμβανόμενων κυρίως από την διατροφή, όπως βιταμίνες και φαινολικά), 3) αδρανοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων, 4) ελάχιστη παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων και αντιοξειδωτικών χαμηλής μοριακής μάζας, 5) συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων. Έτσι, αν η ισορροπία διαταραχθεί, τα επίπεδα των ROS θα αυξηθούν και μπορούν να επηρεάσουν πολλές λειτουργίες του οργανισμού. (Lushchak, 2014)

Ως «οξειδωτικό στρες», χαρακτηρίζεται η κατάσταση κατά την οποία υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και της διαθεσιμότητας ή/και της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών. Αυτή η ανισορροπία είναι αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής ROS ή της μειωμένης αντιοξειδωτικής δράσης (Εικόνα 2.3) (Czerska et al., 2015).

Το χρόνια οξειδωτικό στρες σχετίζεται με διάφορες μεταβολικές διαταραχές και παθολογίες, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, η υπέρταση στην εγκυμοσύνη με πρωτεϊνουρία (προεκλαμψία), καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. (Silva et. al., 2019; Lushchak, 2014). Ωστόσο, σύμφωνα με τον Lushchak (2014), χρειάζεται προσεκτική έρευνα για να διαπιστωθεί αν το οξειδωτικό στρες προκαλεί τις ασθένειες αυτές ή το αντίθετο. Σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζονται ταυτόχρονα χωρίς να έχει διελευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός λειτουργίας και εμφάνισής τους. Τέλος, αν και το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ως επιβλαβές λόγω των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που επιτίθενται σε βιολογικά μόρια, όπως λιπίδια πρωτεΐνες και DNA, έχει επίσης

χρήσιμο ρόλο στη φυσιολογική προσαρμογή και στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος (Czerska et al., 2015).



**Εικόνα 2.3** Παραγωγή και αποδόμηση ROS που συμβάλλει στην οξειδωτική ισορροπία (Brieger et al., 2012)

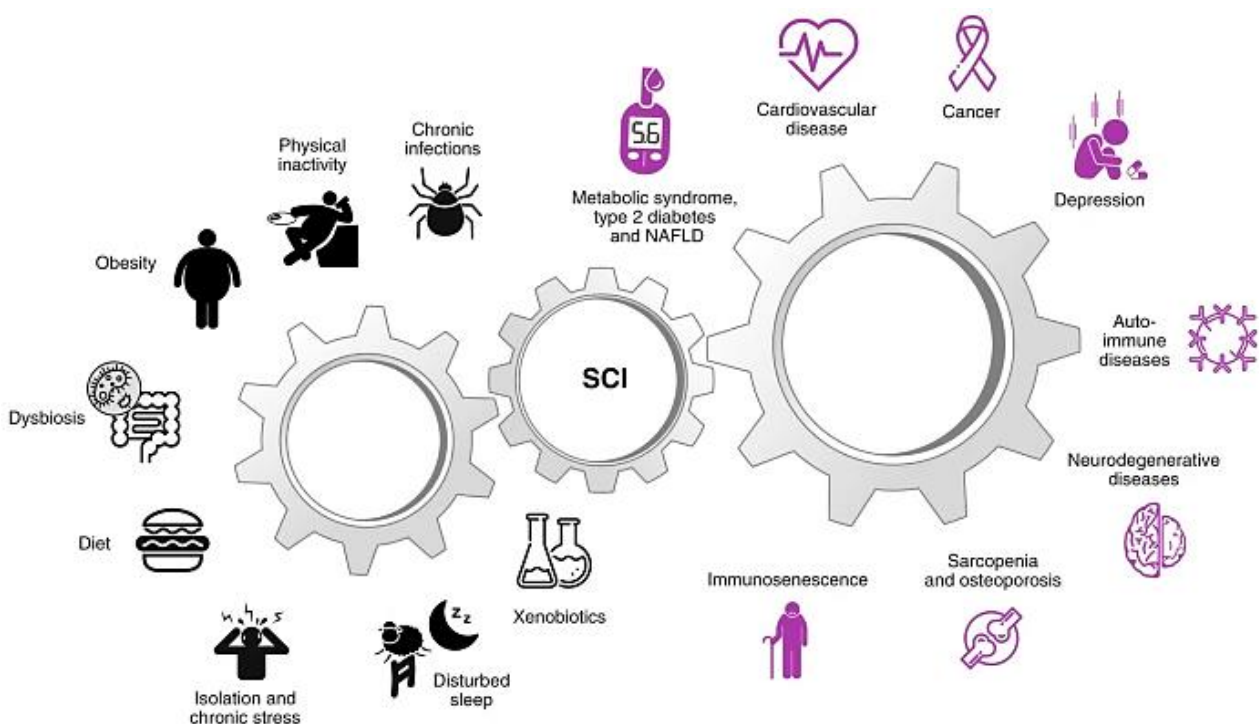
## 2.2 Φλεγμονή και Προφλεγμονώδεις μεσολαβητές

### 2.2.1 Ορισμός Φλεγμονής

Η φλεγμονή αποτελεί μια φυσιολογική απόκριση και έναν φυσικό μηχανισμό άμυνας του οργανισμού ενάντια σε επιβλαβή ερεθίσματα (π.χ αλλεργιογόνα, ακτινοβολία, τοξικές χημικές ουσίες, αυτοάνοσες και χρόνιες ασθένειες, παχυσαρκία, κατανάλωση αλκοόλ, χρήση καπνού, διατροφή υψηλής θερμιδικής αξίας) και μικροβιακούς εισβολείς. Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται, μεταξύ άλλων, από κύτταρα ξενιστές, αιμοφόρα αγγεία, πρωτεΐνες και μεσολαβητές λιπιδίων. Με την συνεργιστική δράση όλων των παραπάνω, στόχος είναι η εξάλειψη και η επιδιόρθωση του φλεγμονώδους ερεθίσματος. (Galvão et al., 2018; Hussain et al., 2016)

Επομένως, η ίδια η φλεγμονή (οξεία φλεγμονή) δεν αποτελεί ασθένεια αλλά μια βιολογική διαδικασία (Hussain et al., 2016). Ωστόσο η παρουσία ορισμένων κοινωνικών, ψυχολογικών, περιβαλλοντικών και βιολογικών παραγόντων, όπως χρόνιες λοιμώξεις, η σωματική αδράνεια, η (σπλαχνική) παχυσαρκία, η εντερική δυσβίωση, η διατροφή, η κοινωνική απομόνωση, το

ψυχολογικό στρες, ο διαταραγμένος ύπνος και ο διαταραγμένος κερκάρδιος ρυθμός, καθώς και η έκθεση σε ξενοβιοτικά, όπως ατμοσφαιρικούς ρύπους, επικίνδυνα απόβλητα, βιομηχανικές χημικές ουσίες και το κάπνισμα, μπορούν να οδηγήσουν στην συστηματική χρόνια φλεγμονή (Systemic Chronic Inflammation, SCI). Η SCI προάγει διάφορες ασθένειες, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις (ισχαιμική καρδιοπάθεια, εγκεφαλικό), καρκίνος, σακχαρώδης διαβήτης, χρόνια νεφρική νόσο, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD), αυτοάνοσες και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Οι χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες έχουν αναγνωριστεί ως η πιο σημαντική αιτία θανάτου καθώς ένα ποσοστό περισσότερο από το 50% όλων των θανάτων, οφείλεται σε ασθένειες που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζονται τα πιο κοινά ερεθίσματα της SCI καθώς και οι συνέπειές της. (Furman et al., 2019)



**Εικόνα 2.4** Αιτίες και συνέπειες της συστηματικής χρόνιας φλεγμονής (Furman et al., 2019)

Η οξεία φλεγμονή και η χρόνια συστηματική φλεγμονή, αν και παρουσιάζουν ορισμένους κοινούς μηχανισμούς, διαφέρουν σημαντικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.5. Η οξεία φλεγμονή, ενεργοποιείται είτε με μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τον παθογόνο (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) είτε με μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs). Επιπλέον δεν σχετίζεται με την ηλικία και εμφανίζει φλεγμονώδους βιοδείκτες όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και ορισμένες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF)- α. Αντίθετα η SCI, σχετίζεται με την ηλικία και ξεκινά από τα DAMPs αλλά με απουσία οξείας λοιμώδους προσβολής και χωρίς ενεργοποίηση των PAMPs. Είναι χαμηλού βαθμού, επίμονη και

προκαλεί βλάβες σε ιστούς και όργανα, διότι μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες. (Furman et al., 2019)

	Acute inflammation	Systemic chronic inflammation
Trigger	PAMPs (infection), DAMPs (cellular stress, trauma)	DAMPs ('exposome', metabolic dysfunction, tissue damage)
Duration	Short-term	Persistent, non-resolving
Magnitude	High-grade	Low-grade
Outcome(s)	Healing, trigger removal, tissue repair	Collateral damage
Age-related	No	Yes
Biomarkers	IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CRP	Silent—no canonical standard biomarkers

## Εικόνα 2.5 Διαφορές οξείας και χρόνιας φλεγμονής (Furman et al., 2019)

### 2.2.2 Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στις χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες είναι επιβλαβής (Hussain et al., 2016). Κατά το οξειδωτικό στρες, η περίσσεια των ROS μπορεί να οξειδώσει βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) ή να τροποποιήσει δομικά πρωτεΐνες και γονίδια και να οδηγήσει στην εμφάνιση και την εξέλιξη φλεγμονωδών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες, μπορεί να ενεργοποιήσει μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι με την σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν στην διαφορική έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων (πάνω από 500 διαφορετικά, συμπεριλαμβανομένων εκείνων για αυξητικούς παράγοντες, φλεγμονώδεις κυτοκίνες, χημειοκίνες, μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και αντιφλεγμονώδη μόρια) και τελικά στην έναρξη φλεγμονής. Η φλεγμονή που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες είναι η αιτία εξέλιξης πολλών παθολογιών και χρόνιων ασθενειών. Για παράδειγμα, αν το οξειδωτικό στρες προκαλέσει βλάβες όπως οξειδωμένες πρωτεΐνες, γλυκοζυλιωμένα προϊόντα και υπεροξείδωση των λιπιδίων, αυτές στην συνέχεια οδηγούν σε εκφυλισμούς νευρώνων που συναντάμε σε εγκεφαλικές διαταραχές. Έτσι, το συνεχές οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή, η οποία με την σειρά της να είναι η αιτία έναρξης χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές, νευρολογικές και πνευμονικές παθήσεις. (Chatterjee, 2016; Hussain et al., 2016)

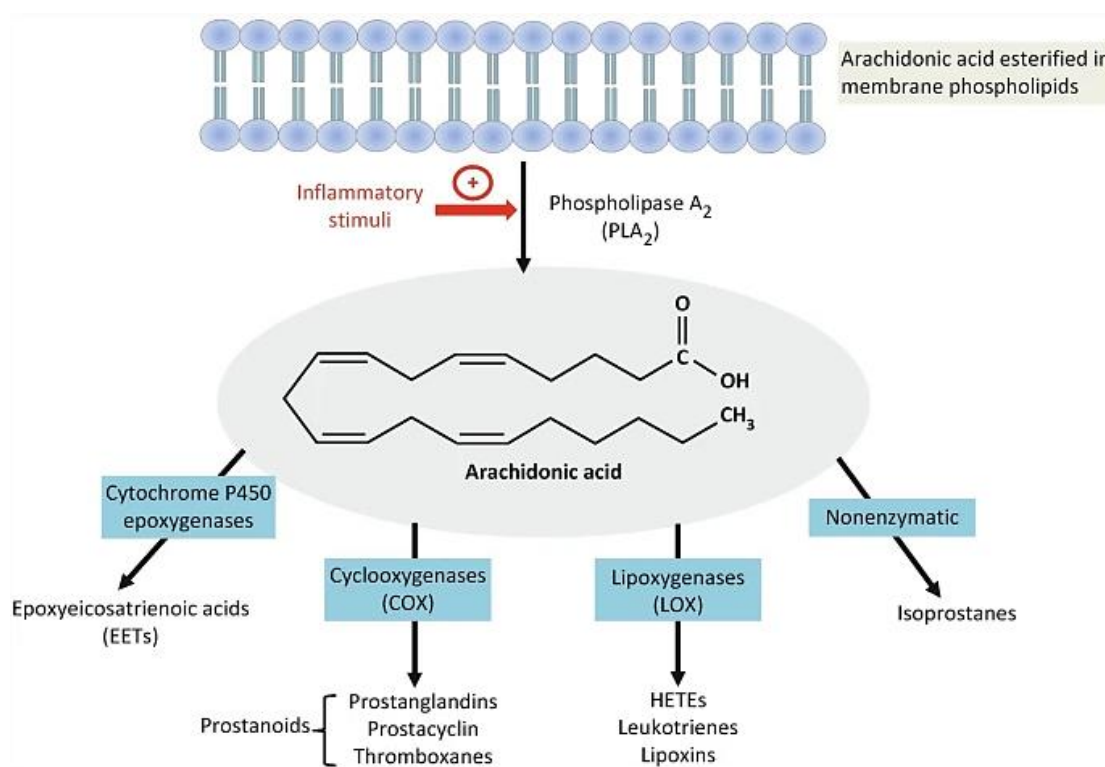
### 2.2.3 Προφλεγμονώδεις και λιπιδικοί μεσολαβητές

Ως μεσολαβητές, χαρακτηρίζονται ρυθμιστικά μόρια που ο ρόλος τους είναι να ελέγχουν τη δημιουργία, τη διατήρηση και την επίλυση της φλεγμονής, που ενεργοποιείται μόλις αναγνωριστεί η μόλυνση ή ο τραυματισμός. Προφλεγμονώδεις μεσολαβητές είναι μεσολαβητές που παράγονται κατά την αρχική αναγνώριση των φλεγμονωδών ερεθισμάτων (αρχική φάση φλεγμονής) και προέρχονται είτε από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ αγγειοδραστικές αμίνες,



λιπιδικοί μεσολαβητές, αντιδραστικά είδη οξυγόνου, μονοξείδιο του αζώτου, κυτοκίνες και χημειοκίνες) είτε από πρωτεΐνες οξείας φάσης (π.χ συστήματα καλλιкреΐνης-κινίνης).

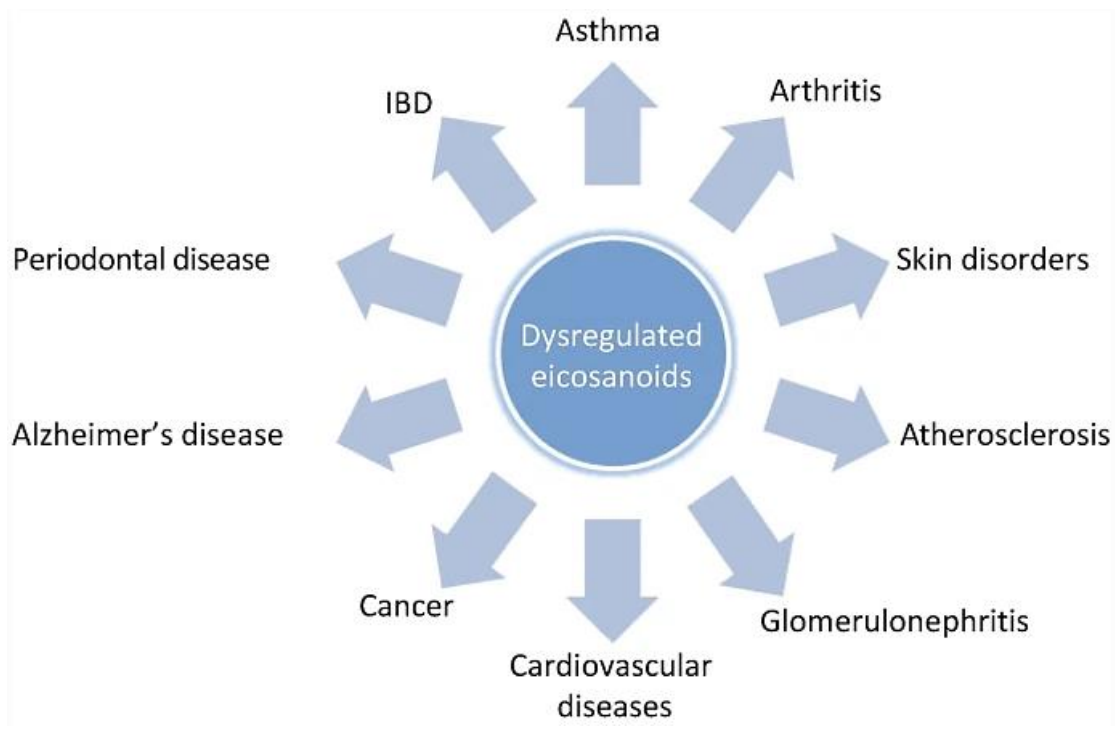
Οι λιπιδικοί μεσολαβητές αποτελούν μεσολαβητές που προέρχονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Μια οικογένεια βιοδραστικών λιπιδικών μεσολαβητών είναι τα εικοσανοειδή. Αυτά παράγονται από πρόδρομες ενώσεις φωσφολιπιδίων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Συγκεκριμένα συντίθενται από το αραχιδονικό οξύ (AA), που αποτελεί συστατικό των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, καθώς και από άλλα προερχόμενα από ωμέγα-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs). Στην Εικόνα 2.6, το ένζυμο φωσφολιπάση A2 (PLA2) καταλύει την απελευθέρωση AA από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Το ελεύθερο μη εστεροποιημένο AA στη συνέχεια μεταβολίζεται σε εικοσανοειδή μέσω διαφορετικών οδών. Η οξείδωση του αραχιδονικού οξέως και η ακόλουθη σύνθεση των εικοσανοειδών, γίνεται είτε ενζυμικά από κυκλοοξυγενάσες (COX), λιποξυγενάσες (LOX) και το κυτόχρωμα P450 (CYP), είτε από μια μη ενζυματική οδό. (Galvão et al., 2018)



**Εικόνα 2.6** Απελευθέρωση και μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος (AA) (Galvão et al., 2018)

Δεν είναι όλα τα εικοσανοειδή προφλεγμονώδη, αλλά ορισμένα εμφανίζουν και αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες. Επομένως έχουν ιδιαίτερη σημασία, τόσο για τη διατήρηση και την ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης όσο και για την επίλυση της φλεγμονής και την επιδιόρθωση των ιστών.

Βέβαια, η ανισορροπία στη σύνθεση εικοσανοειδών μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και τελικά σε χρόνια φλεγμονή (Εικόνα 2.7). (Galvão et al., 2018)



**Εικόνα 2.7** Ανθρώπινες ασθένειες που οφείλονται στην απορρυθμισμένη σύνθεση εικοσανοειδών (Galvão et al., 2018)

Η μη ενζυμική οδός μεταβολισμού του AA, αφορά την υπεροξειδωσή του από ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξειδωση αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας μοναδικής ομάδας ενώσεων, παρόμοιες με τις προσταγλανδίνες, που ονομάζονται ισοπροστανία (isoprostanes, IsoPs). Τα ισοπροστανία αν και δεν έχουν άμεση σχέση με την φλεγμονή, παρουσιάζονται σε αυξημένα επίπεδα στο αίμα κατά το οξειδωτικό στρες. Επομένως, ως προϊόντα κυτταρικής οξειδωσης, τα επίπεδα των ισοπροστανίων στο αίμα, μπορεί να είναι ενδεικτικά της οξειδωτικής βλάβης, η οποία πολλές φορές συνοδεύεται από ένα ευρύ φάσμα παθολογιών. Έτσι τα ισοπροστανία μπορούν να αποτελέσουν δείκτες του οξειδωτικού στρες. (Galvão et al., 2018)



## 2.3 Ισοπροστάνια

### 2.3.1 Δείκτες οξειδωτικού στρες

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος του οξειδωτικού στρες σε ασθένειες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής (υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, ισχαιμικές ασθένειες, την νόσο του Alzheimer, την νόσο του Πάρκινσον και της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης) καθώς και για την αξιολόγηση μιας θεραπείας, πρέπει να γίνει ακριβής μέτρηση και αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες *in vivo*. Για το σκοπό αυτό, είναι σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων και η εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών (Czerska et al. (2015)).

Παρόλο που ο χρόνος ζωής των ελεύθερων ριζών είναι πολύ μικρός (δευτερόλεπτα) και η μέτρησή τους *in vivo* είναι απαιτητική, τα παράγωγά τους (π.χ υπεροξειδίου του υδρογόνου ή υδροϋπεροξειδία λιπιδίων) είναι πολύ πιο σταθερά με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής (ώρες ή εβδομάδες). Έτσι, μπορούν να μετρηθούν πολύ πιο εύκολα και να παρακολουθούνται επανειλημμένα. Αρχικά οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι δείκτες του οξειδωτικού στρες ήταν οι δραστικές ουσίες με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH) και η 4-υδροξυνεεάλη, ενώ στην συνέχεια αντικαταστάθηκαν από δείκτες πολύ πιο ακριβείς όπως τα ισοπροστάνια (IsoPs) και τους μεταβολίτες τους, την αλλαντοΐνη και την 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG). Τα ισοπροστάνια, έχουν αποδειχθεί ως αξιόπιστοι δείκτες οξειδωτικής βλάβης *in vivo* και *in vitro*, με τον ποσοτικό προσδιορισμό τους σε βιολογικά υγρά. Βάση δεδομένων από βιβλιογραφική ανασκόπηση των Czerska et al. (2015), στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2), παρουσιάζονται ορισμένοι δείκτες του οξειδωτικού στρες.

**Πίνακας 2.2** Δείκτες του οξειδωτικού στρες

Διεργασία σχηματισμού	Δείκτες οξειδωτικού στρες
Υπεροξείδωση των λιπιδίων	Μαλονδιαλδεΐδη (MDA)
	F2-ισοπροστάνια
	Οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL)
	οξειδωμένα αντισώματα LDL
	Προηγμένα προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων
	Ακρολεΐνη
4-υδροξυνεεάλη	
Οξείδωση πρωτεϊνών	Δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)

	Προηγμένης οξείδωσης πρωτεϊνικά προϊόντα
	Προηγμένα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (AGEs)
	Σχηματισμός δισουλφιδίου
Οξείδωση υδατανθράκων	Σχηματισμός καρβονυλίου
	3-νιτροτυροσίνη
Οξείδωση νουκλεϊκού οξέος	Αντιδραστικές αλδεϋδες
	Μειωμένα σάκχαρα (ασκορβικό, ριβόζη κ.λπ.)
	8-οξυ-2-δεοξυγουανοσίνη

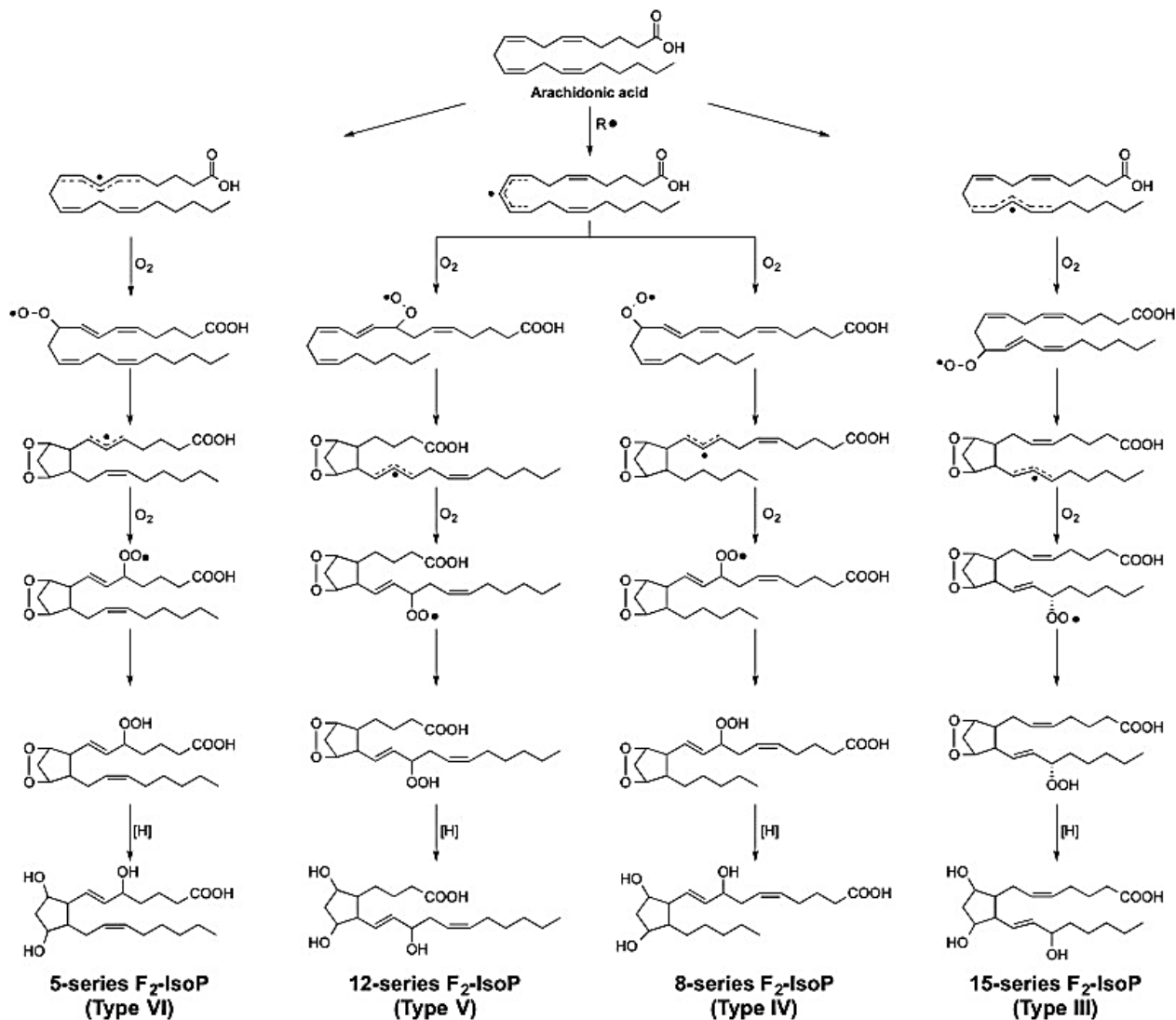
### 2.3.2 Προέλευση, δομή, είδη και ονοματολογία Ισοπροστανίων

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs), όπως το αραχιδονικό οξύ, είναι μόρια που προσβάλλονται από τις ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες (Milne et al., 2015). Τα ισοπροστάνια, αποτελούν ισομερείς ενώσεις των προσταγλανδινών (PGs) και παράγονται *in vivo* από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως από το αραχιδονικό οξύ (με την υπεροξείδωσή του), μέσω μιας μη ενζυμικής διαδικασίας. Κατά την διαδικασία αυτή, οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη οξυγόνου προκαλούν την υπεροξείδωση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης του κυττάρου.

Οι βασικές διαφορές ανάμεσα στις προσταγλανδίνες και τα ισοπροστάνια, αφορούν κυρίως τον σχηματισμό τους. Αρχικά, ενώ τα ισοπροστάνια παράγονται μη ενζυμικά, οι προσταγλανδίνες είναι προϊόν της δράσης των κυκλοοξυγενασών (COX-1 και COX-2). Επιπλέον τα ισοπροστάνια παράγονται *in situ* σε λιπιδικές μεμβράνες (φωσφολιπίδια) από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με την απελευθέρωσή τους να γίνεται από τα ένζυμα φωσφολιπάσες (ή από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων-ακετυλοϋδρολάση, PAF-AH), ενώ οι PGs σχηματίζονται από ελεύθερο αραχιδονικό οξύ. Άλλη μια διαφορά είναι ότι οι πλευρικές ομάδες προσταγλανδίνης είναι *trans* ενώ των ισοπροστανίων είναι κυρίως *cis* ισομερή. (Czerska et al., 2015; Milne et al., 2015)

Η μεγαλύτερη κατηγορία ισοπροστανίων χαρακτηρίζεται ως F2-IsoPs, καθώς οι ενώσεις αυτές αποτελούν ισομερή της προσταγλανδίνης F2α (ή PGF2α). Στην συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν και άλλες ομάδες ισοπροστανίων (IsoPs), οι οποίες ανάλογα με την δομή του δακτυλίου τους (κυκλοπεντανίου) χωρίστηκαν στις κατηγορίες D2-isoP, E2-isoP, A2-isoP και J2-isoP. Επιπλέον, υπάρχουν IsoPs που εκτός από το αραχιδονικό οξύ, παράγονται και από άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το εικοσιδυαεξανοϊκό (DHA) και το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA). Τα ισοπροστάνια, έχουν προσδιοριστεί και ως βιοδείκτες, αλλά και ως μεσολαβητές του οξειδωτικού στρες σε πολλές ασθένειες/παθολογίες (π.χ διαβήτη, παχυσαρκία). (Czerska et. al., 2015; Milne et al., 2015)

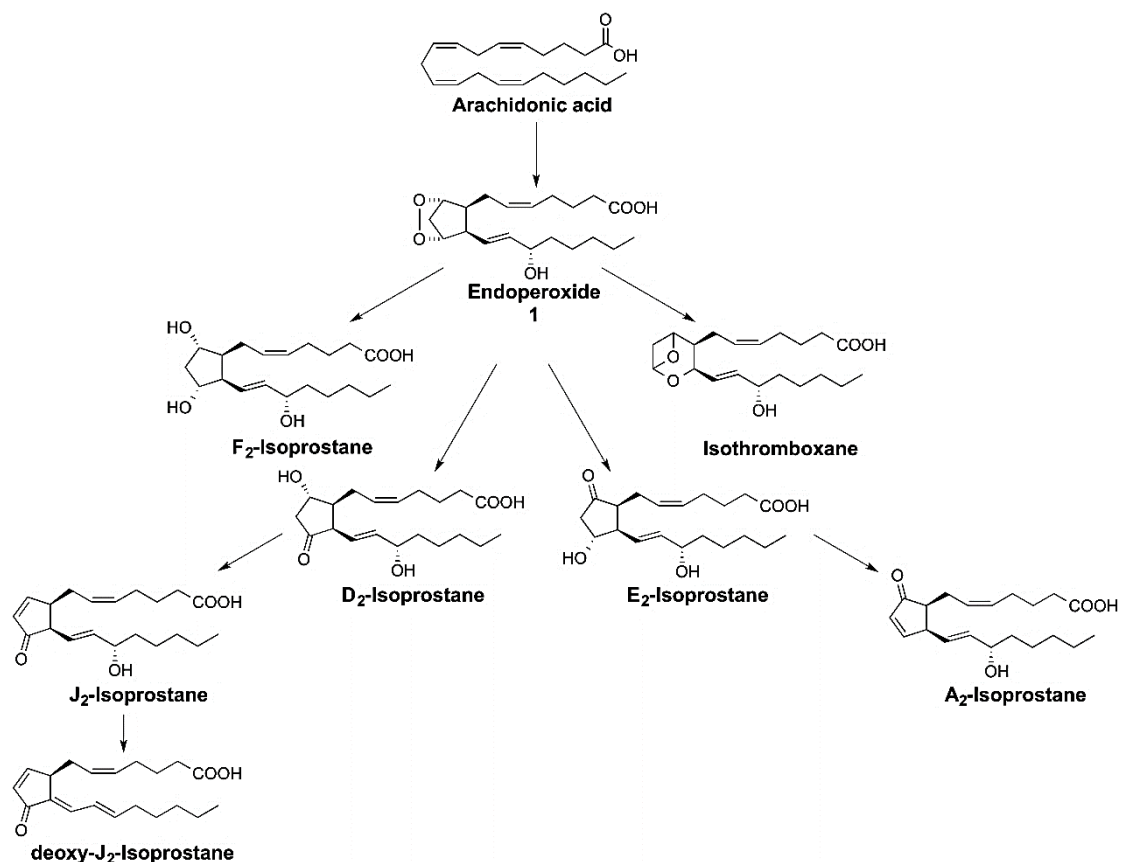
Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2.8) παρουσιάζεται ο μηχανισμός σχηματισμού των F<sub>2</sub>-ισοπροστανίων από την υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος από ελεύθερες ρίζες. Γενικά, υπάρχουν 2 συστήματα ονοματολογίας για την ταξινόμηση των ισοπροστανίων.



**Εικόνα 2.8** Μηχανισμός σχηματισμού των F<sub>2</sub>-ισοπροστανίων (Milne et al., 2015)

Το πρώτο (ονοματολογία του Taber), έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ονοματολογίας Εικοσανοειδών (Eicosanoid Nomenclature Committee). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, τα ισοπροστανία έχουν την συντομογραφία IsoP και οι τέσσερις κατηγορίες τοποϊσομερών ονομάζονται με βάση τον αριθμό του άνθρακα στον οποίο είναι συνδεδεμένη η υδροξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας (με την αρίθμηση να ξεκινάει από τον καρβοξυλικό άνθρακα). Έτσι οι τέσσερις κατηγορίες τοποϊσομερών, είναι η 5-series, η 12-series, η 8-series και η 15-series F<sub>2</sub>-IsoP. Στο δεύτερο σύστημα ονοματολογίας (ονοματολογία του Rockach), η συντομογραφία των ισοπροστανίων είναι iP και τα τοποϊσομερή συμβολίζονται ως VI, V, IV και III αντίστοιχα, ανάλογα με τον αριθμό των ανθράκων μεταξύ του άνθρακα ωμέγα και του πρώτου διπλού δεσμού. Στην εικόνα

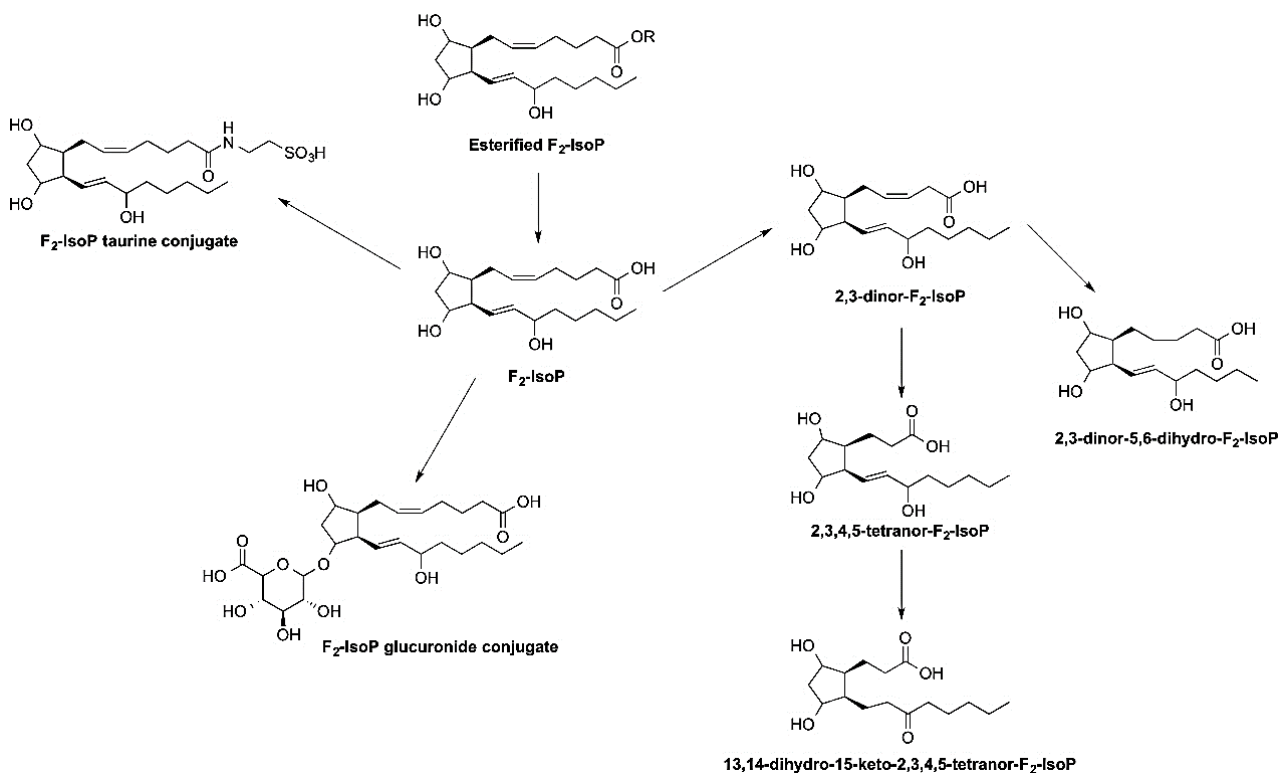
2.9, παρουσιάζεται ο διαχωρισμός των ισοπροστανίων, ανάλογα με τη δομή των λειτουργικών ομάδων στον δακτύλιο κυκλοπεντανίου. Αν και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ως βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες σε ανθρώπινες ασθένειες, είναι τα F<sub>2</sub>-Ισοπροστάνια, κάτω από ορισμένες συνθήκες έχουν χρησιμοποιηθεί και τα E<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>-Ισοπροστάνια. Εκτός από αυτά σχηματίζονται και ισοθρομβοξάνες καθώς και A<sub>2</sub>/J<sub>2</sub>-Ισοπροστάνια και δεοξυ-J<sub>2</sub>-ισοπροστάνια. Επιπλέον, υπάρχουν και τα ισοπροστάνια F<sub>3</sub>-, E<sub>3</sub>/D<sub>3</sub>- και A<sub>3</sub>/J<sub>3</sub>, τα οποία δημιουργούνται από την υπεροξειδωση του EPA, ενώ τα προϊόντα από DHA, που βρίσκεται στον εγκέφαλο, έχουν ταυτοποιηθεί και ονομάζονται νευροπροστάνες. (Milne et al., 2015)



**Εικόνα 2.9** Ταξινόμηση των ισοπροστανίων, ανάλογα με τη δομή των λειτουργικών ομάδων στον δακτύλιο κυκλοπεντανίου (Milne et al., 2015)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι προερχόμενες από COX προσταγλανδίνες, παράγονται από το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ, σε αντίθεση με τα ισοπροστάνια που παράγονται από αραχιδονικό οξύ *in situ* στα λιπίδια. Στην συνέχεια, απελευθερώνονται ως ελεύθερα οξέα με τη δράση της φωσφολιπάσης ή και από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων-ακετυλοϋδρολάση. Τα F<sub>2</sub>-IsoPs, ελεύθερα πλέον, βρίσκονται στο πλάσμα και αργότερα φιλτράρονται στα νεφρά και απεκκρίνονται στα ούρα. Ωστόσο, τα F<sub>2</sub>-IsoPs μπορούν επίσης να μεταβολιστούν στο ήπαρ και να παράξουν μια ποικιλία μεταβολιτών. Από τα πιο άφθονα ενδογενή F<sub>2</sub>-IsoPs, τα 15-F<sub>2</sub>t-IsoP

(αναφέρονται και ως 8-iso-PGF<sub>2</sub>α ή iPF<sub>2</sub>α-III), έχουν ταυτοποιηθεί δύο κύριοι μεταβολίτες σύρων, οι λεγόμενοι 2,3-dinor-15-F<sub>2</sub>t-IsoP και 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F<sub>2</sub>t-IsoP. Εκτός από αυτούς, έχουν βρεθεί και οι μεταβολίτες, 13,14-dihydro-15-keto-2,3,4,5-tetranor-F<sub>2</sub>-IsoP και 2,3,4,5-tetranor-F<sub>2</sub>-IsoP, που αποτελούν επίσης παράγωγα του 15-F<sub>2</sub>t-IsoP. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί μόρια 15-F<sub>2</sub>t-IsoP συζευγμένα με ταυρίνη, καθώς και μόρια F<sub>2</sub>-IsoPs συζευγμένα με γλυκουρονίδια (Εικόνα 2.10). Επίσης, στερεοϊσομερή των F<sub>2</sub>-IsoP (π.χ. 5- και 15-F<sub>2</sub>t-IsoP) καθώς και οι μεταβολίτες 2,3-dinor-15-F<sub>2</sub>t-IsoP και 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F<sub>2</sub>t-IsoP, έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες του σχηματισμού ισοπροστανίων *in vivo*. (Milne et al., 2015)



**Εικόνα 2.10** Μεταβολίτες του 15-F<sub>2</sub>t-IsoP καθώς και F<sub>2</sub>-IsoPs συζευγμένα με γλυκουρονίδιο και συζυγή ταυρίνης (Milne et al., 2015)

## 2.4 Ισοπροστάνια και παθολογικές καταστάσεις

Ορισμένοι βασικοί λόγοι για τους οποίους τα ισοπροστάνια αποτελούν κατάλληλους και ακριβείς δείκτες οξειδωτικού στρες είναι ότι: (1) Αποτελούν σταθερές ενώσεις, (2) Αποτελούν αποκλειστικά προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων που προκαλείται από ROS και (3) Υπάρχουν σε ανιχνεύσιμες

ποσότητες σε όλα τα βιολογικά υγρά (ελεύθερη μορφή) και σε φυσιολογικούς ιστούς (εστεροποιημένη μορφή).

Τα ισοπροστάνια έχουν προσδιοριστεί τόσο στα **ούρα** (λόγω των σταθερών επιπέδων τους) όσο και στο **πλάσμα**, στο **εγκεφαλονωτιαίο υγρό**, στο **συμπύκνωμα αναπνοής** (Exhaled Breath Condensate, EBC), σε **οποιοδήποτε ιστό**, στο **αμνιακό υγρό** και στο **σάλιο**. Οι αναλύσεις των F2-IsoPs σε ανθρώπους, γίνονται πιο συχνά στα ούρα και στο πλάσμα. Ωστόσο, η συλλογή και αποθήκευση του πλάσματος απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς στο πλάσμα μπορεί να πραγματοποιηθεί *ex vivo* οξειδωση του αραχιδονικού οξέος και παραγωγή F2-IsoPs. Γι' αυτό το λόγο, προτείνεται η συλλογή των δειγμάτων σε σωλήνες που περιέχουν το αντιπηκτικό EDTA και τα αντιοξειδωτικά βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και γλουταθειόνη (GSH) καθώς και η αποθήκευση των δειγμάτων στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  και όχι στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Έτσι μπορεί να αποφευχθεί η τεχνητή δημιουργία F2-IsoPs *ex vivo*. Παρόλο που στις περισσότερες κλινικές μελέτες γίνεται ποσοτικοποίηση των F2-IsoPs ως ελεύθερα λιπαρά οξέα, αυτά υπάρχουν και ως εστεροποιημένα σε φωσφολιπίδια στο πλάσμα. Επομένως, προκειμένου να γίνει μέτρηση των συνολικών F2-IsoPs, απαιτείται μια βασική υδρόλυση των λιπιδίων του πλάσματος πριν από την ανάλυση.

Οι ανοσοδοκιμασίες (Enzyme-linked Immunosorbent Assays, **ELISAs**), η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (Liquid chromatography–mass spectrometry, **LC–MS**) και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (Gas chromatography–mass spectrometry, **GC–MS**), αποτελούν τις πιο γνωστές και διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού των ισοπροστανίων. Παρόλο που οι μέθοδοι που βασίζονται σε φασματομετρία μάζας είναι αρκετά δαπανηρές και χρονοβόρες, χρησιμοποιούνται αρκετά σε μελέτες λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας και ειδικότητας τους. Λόγω της ομοιότητας των προσταγλανδινών και των F2-IsoPs ως προς την δομή τους, τα αποτελέσματα σε μια δοκιμή ELISA, μπορεί να συνπροσδιορίζουν και ποσότητες προσταγλανδινών. (Czerska et al., 2015; Milne et al., 2015)

Οι συγκεντρώσεις των ισοπροστανίων, σε αντίθεση με υγιείς ανθρώπους, έχουν βρεθεί αυξημένες σε ανθρώπους με παχυσαρκία, διαβήτη, υπερχοληστερολαιμία και σε καπνιστές. (Czerska et al., 2015) Επιπλέον, καθώς είναι γνωστό ότι η ισχαιμία/επαναδιάχυση (I/R) μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό ROS, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων των ισοπροστανίων σε ασθενείς με χρόνια ισχαιμία του κάτω άκρου, μετά από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και μετά από ρήξη ανευρύσματος. Ο εγκέφαλος σε σύγκριση με άλλα όργανα, έχει υψηλή συγκέντρωση PUFA, με αποτέλεσμα οι εγκεφαλικές βλάβες που οφείλονται σε ελεύθερες ρίζες, να έχουν ως πρωταρχικό αποτέλεσμα την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Έτσι, τα ισοπροστάνια είναι αυξημένα σε χρόνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Huntington, η νόσος του Parkinson και η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση. Στις ασθένειες αυτές η μέτρηση των

ισοπροστανίων γίνεται συνήθως στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τέλος, αν και η υπεροξειδωση των λιπιδίων, το οξειδωτικό στρες και ο ρόλος των ισοπροστανίων, είναι πολύπλοκοι στην παθοφυσιολογία του καρκίνου, σε ορισμένες μελέτες βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίων τα οποία συσχετίστηκαν με τον κίνδυνο καρκίνου (π.χ καρκίνων του μαστού, του προστάτη και του στομάχου). Ωστόσο οι μελέτες αυτές ήταν λίγες και ασαφής, κυρίως διότι δεν έχει διευκρινιστεί αν το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε καρκίνο ή προκύπτει από αυτόν. (Milne et al., 2015). Ορισμένες μελέτες για την επίδραση του καπνίσματος και διαφόρων ασθενειών, στα επίπεδα των ισοπροστανίων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.3** Μελέτες που αφορούν την επίδραση διαφόρων ασθενειών, της παχυσαρκίας και του καπνίσματος στα επίπεδα των ισοπροστανίων

Ασθένεια/Κάπνισμα	Συμμετέχοντες μελέτης	Μέθοδος προσδιορισμού	Βιολογικό υγρό	Αποτελέσματα	Αναφορές
Διαβήτης τύπου 2 (ΔΤ2)	10 ασθενείς με ΔΤ2 (ηλικίας 50 έως 68 ετών) και 10 μη διαβητικοί υγιείς μάρτυρες (ηλικίας 51 έως 68 ετών)	ELISA	Πλάσμα (n=10)	Τα επίπεδα ισοπροστανίων έτειναν να είναι χαμηλότερα (p=0,08) σε διαβητικούς σε σχέση με τους μάρτυρες.	(Feillet-Coudray et al., 2002)
			Ούρα (n=10)	Αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίων σε διαβητικούς ασθενείς (p<0,01) σε σχέση με τους μάρτυρες.	
	21 ενήλικες με ΔΤ2 (17 άντρες, 4 γυναίκες με μέση ηλικία 59 ετών) και 16 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) (13 άνδρες και 3 γυναίκες με μέση ηλικία 59 ετών)	LC-MS	Πλάσμα (n=21)	Σημαντική αύξηση στα επίπεδα των ολικών ισοπροστανίων στα ούρα όσο και στο πλάσμα βρέθηκε σε νεφροπαθείς ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (P <0,01) σε σχέση με τους μάρτυρες.	(Calabrese et al., 2007)
			Ούρα (n=21)		
	8 άτομα με διαβήτη τύπου 2 ηλικίας 59-78 και 16 άτομα, μη διαβητικά ηλικίας 55-84	GC-MS	Πλάσμα (n=8)	Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα F2-ισοπροστάνια.	(Kathir et al., 2010)
10 άτομα με διαβήτη τύπου 2 και 8 άτομα χωρίς χρόνια ιατρική πάθηση (ηλικίες 40-60 ετών)	ELISA	Ούρα	Τα επίπεδα ισοπροστανίων αυξήθηκαν και στις 2 ομάδες. Στα άτομα με ΔΤ2 η διαφορά ήταν σημαντική στην αρχή της υπογλυκαιμίας (P = 0,016) με αρχική τιμή 73,4 ng/mL και σε σχέση με 24 ώρες μετά την υπογλυκαιμία που ήταν 91,7 ng/mL .	(Kahal et al., 2020)	



Νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Νόσος Alzheimer, NA)	50 ασθενείς με NA και 40 άτομα ελέγχου	GC-MS	Ούρα (n=50)	Παρατηρήθηκε αύξηση των 8,12-iso-iPF <sub>2α</sub> -VI (ng/mg κρεατινίνης) στα άτομα με πιθανή NA ( $4.6 \pm 0.2$ ) σε σχέση με τα άτομα ελέγχου ( $1.5 \pm 0.1$ ) ( $P < .001$ )	(Praticò et al., 2002)
			Πλάσμα (n=50)	Σημαντική διαφορά στα επίπεδα ισοπροστανίων μεταξύ ασθενών με NA ( $0,61 \pm 0,03$ ng/mL) και ατόμων ελέγχου ( $0,19 \pm 0,01$ ng/mL)	
Νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Νόσος του Huntington)	22 άτομα ελέγχου και άτομα με νόσο του Huntington	GC-MS	Ούρα (n=11)	Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα F2-ισοπροστανία του πλάσματος ή των ούρων μεταξύ ασθενών με νόσο Huntington ή νόσο Alzheimer και ατόμων ελέγχου.	(Montine et al., 2000)
			Πλάσμα Ελεύθερα F2-IsoP (n=20) Συνολικά F2-IsoP (n=19)		
Υπέρταση	155 υπερτασικά άτομα και 40 άτομα ελέγχου	GC-MS	Πλάσμα (n=155)	Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις F2-ισοπροστανίων (ούρα ή πλάσμα) μεταξύ όλων των υπερτασικών ατόμων και των ατόμων ελέγχου.	(Ward et al., 2004)
			Ούρα (n=155)		
	31 άτομα με υπέρταση και 35 υγιή άτομα ελέγχου	ELISA	Ούρα (n=31)	Αύξηση των επιπέδων των 8-ισοπροστανίων (nmol/μmol κρεατινίνης) σε άτομα με υπέρταση ( $167,1 \pm 10,9$ ) σε σχέση με τα υγιή άτομα ( $126,5 \pm 8,8$ ) ( $< 0.006$ )	(Rodrigo et al., 2007)

			Πλάσμα (n=31)	Αύξηση των επιπέδων των 8-ισοπροστανίων (pmol/L) σε άτομα με υπέρταση (104,1±3,6) σε σχέση με τα υγιή άτομα (76,7±3,6) (p<0,001)	
Καρκίνος (προστάτη)	304 άτομα με καρκίνο και 233 άτομα ελέγχου	ELISA	Ούρα (n=304)	Παρατήρησαν ότι τα επίπεδα F2-ισοπροστανίων ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη	(Brys et al., 2013)
Μεταβολικό σύνδρομο (MetS)	Ασθενείς με MetS (n = 10) και υγιή άτομα με αντιστοιχία ηλικίας (n = 11)	ELISA	Πλάσμα (n=10)	Τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων (ng/liter) ήταν αυξημένα σε ασθενείς με MetS (115 ± 63) σε σύγκριση με τους μάρτυρες (31 ± 18) (P < 0.001)	(Hansel et al., 2004)
Μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος	92 ασθενείς με NAFLD (33 γυναίκες ηλικίας 52 ± 11 ετών και 59 άνδρες ηλικίας 45 ± 12 ετών) και 20 υγιείς εθελοντές (12 γυναίκες ηλικίας 59 ± 5 ετών και 8 άνδρες ηλικίας 55 ± 15 ετών)	ELISA	Πλάσμα (n=92)	Αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίων (8-epi-PGF <sub>2α</sub> III) σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με υγιή άτομα. Παρατηρήθηκαν επίσης υψηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο (Alcoholic liver disease, ALD) σε σύγκριση με ασθενείς με NAFLD και οι πιο σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ισοπροστανίων βρέθηκαν όταν συγκρίθηκαν υγιή άτομα και ασθενείς με ALD ανεξάρτητα από το φύλο.	(Raszeja-Wyszomirska et al., 2012)
Παχυσαρκία	2828 άτομα (1286 άνδρες και 1542 γυναίκες με μέση ηλικία 61 έτη)	ELISA	Ούρα (n=2828)	Το κάπνισμα, ο διαβήτης και ο δείκτης μάζας σώματος συσχετίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με το συστηματικό οξειδωτικό στρες, όπως προσδιορίζεται από τα αυξημένα επίπεδα 8-epi-PGF <sub>2α</sub> .	(Keaney Jr. et al., 2003)

Κάπνισμα	120 άτομα (81 καπνιστές και 39 μη καπνιστές)	GC-MS	Ούρα (n=120)	Τα επίπεδα των ισοπροστανίων στους καπνιστές (605,2±59,01 ng/mg κρεατινίνης) ήταν σημαντικά αυξημένα (p < 0,05) σε σχέση με τους μη καπνιστές (424,0±70,37 ng/mg κρεατινίνης).	(Obata et al., 2000)
	3322 καπνιστές ηλικίας 43,3 ± 14,7 ετών και 1044 μη καπνιστές ηλικίας 41,7 ± 12,71 ετών	ELISA	Ούρα (n=3322)	Η μέση 24ωρη απέκκριση 8-epi-PGF <sub>2α</sub> στα ούρα ήταν 42% υψηλότερη μεταξύ των καπνιστών σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (p < 0,0001)	(Frost-Pineda et al., 2011)
Πνευματική νόσο (Άσθμα)	12 υγιή παιδιά, 12 παιδιά με άσθμα που δεν είχαν λάβει στεροειδή και 30 παιδιά που είχαν λάβει.	Ειδικές ραδιοανοσοδοκιμασίες (Radioimmunoassay, RIA)	Συμπύκνωμα αναπνοής (EBC)	Παιδιά με άσθμα (με λήψη στεροειδών και χωρίς) είχαν υψηλότερα επίπεδα ισοπροστανίων σε σχέση με παιδιά που δεν είχαν καθόλου άσθμα. Συγκεκριμένα παιδιά με άσθμα που έπαιρναν στεροειδή είχαν επίπεδα 47,2±2,3 pg/ml και παιδιά με άσθμα που δεν είχαν λάβει στεροειδή είχαν 56±7,7 pg/ml, ενώ τα δείγματα ελέγχου είχαν 34,2±4,5 pg/ml	(Balardi et al., 2003)
	(1) Παιδιά με ήπιο επίμονο άσθμα χωρίς τη λήψη στεροειδών (14 δείγματα), (2) Παιδιά με σταθερό ήπιο έως μέτριο επίμονο άσθμα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή ICS (inhaled corticosteroids, ICS) (13 δείγματα) και (3) Παιδιά με ασταθές	ELISA	EBC	Τα υγιή άτομα είχαν επίπεδα ισοπροστανίων 3,5 pg/ml που ήταν πολύ χαμηλότερα, σε σχέση με τα παιδιά με άσθμα όλων των ομάδων, τα οποία είχαν διάμεση συγκέντρωση (1) 16,2 pg/ml, (2) 18,1 pg/ml και (3) 29,7 pg/ml αντίστοιχα, με τιμή p < 0,001. Δεν βρέθηκε επίσης μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις των ισοπροστανίων του EBC, μεταξύ των ομάδων ασθματικών παιδιών.	(Zanconato et al., 2004)

	άσθμα (9 δείγματα) και 19 υγιή παιδιά.				
--	---	--	--	--	--

Συμπερασματικά, σε πολλές μελέτες, παρατηρήθηκε πως η υπεροξειδωση των λιπιδίων που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες είναι αυξημένη σε παχύσαρκους πληθυσμούς. Τα επίπεδα των F2-IsoPs αυξάνονται σε παχύσαρκους ενήλικες, ενώ σχετίζονται θετικά με τον δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), την περίμετρο της μέσης (Waist Circumference, WC), την περιοχή του σπλαχνικού λίπους και το ποσοστό του σωματικού λίπους (Milne et al., 2015). Ο διαβήτης μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε της παχυσαρκίας είτε διάφορων γενετικών και επιγενετικών παραγόντων. Ανεξάρτητα από τα αίτια προέλευσης του διαβήτη, βρέθηκε πως τα επίπεδα των ισοπροστανίων (αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων) τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα, είναι αυξημένα σε διαβητικούς ασθενείς. Επιπλέον ο ρόλος του οξειδωτικού στρες, είναι καθοριστικός σε ορισμένες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως για παράδειγμα στην παθογένεση του εκφυλισμού των νευρώνων στη Νόσο Αλτσχάιμερ, αλλά και σε πολλά από τα κλινικά χαρακτηριστικά του Συνδρόμου Down. (Milne et al., 2015; Czarska et al., 2015)

Τέλος, παρόλο που τα ισοπροστανία χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως δείκτες οξειδωτικού στρες οι Morrow et al. (1999) εμφανίζουν ορισμένους **πιθανούς περιορισμούς** κατά τη μελέτη τους. Αρχικά, μπορεί να υπάρξει μη-ενδογενής παραγωγή F2 -IsoPs σε βιολογικά δείγματα (κυρίως στο πλάσμα), κάτω από ακατάλληλο χειρισμό. Επιπλέον η μεγαλύτερη ποσότητα των F2-IsoP στα ούρα, μπορεί να παράγεται τοπικά από το νεφρό με αποτέλεσμα να μην είναι χαρακτηριστική του ολικού οξειδωτικού στρες του σώματος. Έτσι, πρότειναν ότι ο μεσολαβιτής (2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-IsoP ή 15-F2t-IsoP-M) των IsoPs (15-F2t-IsoP) στα ούρα, ίσως να είναι πιο ακριβής δείκτης για το συστηματικό οξειδωτικό στρες, ενώ έχει ήδη αναπτυχθεί η μέθοδος προσδιορισμού του. Σύμφωνα με τους J. van 't Erve et al. (2017), εκτός από την μη ενζυμική υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος από ελεύθερες ρίζες (κατά το οξειδωτικό στρες), η παραγωγή 8-ισο-PGF2α μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα και ενζυμικά, από τα ένζυμα συνθάση προσταγλανδίνης-ενδοϋπεροξειδίου που προκαλούνται κατά τη φλεγμονή. Επομένως η αύξηση της συγκέντρωσης 8-ισο-PGF2α σε μια μελέτη δεν είναι απαραίτητα αποτέλεσμα της μη ενζυματικής υπεροξειδωσης. Η ύπαρξη της εναλλακτικής αυτής οδού, μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα 8-ισο-PGF2α, από μόνα τους, δεν μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ο ορός δεν αποτελεί κατάλληλο βιολογικό δείγμα για την μέτρηση των F2-ισοπροστανίων, διότι κατά την διαδικασία της πήξης το 8-ισο-PGF2α παράγεται ex vivo από τη συνθάση προσταγλανδίνης-ενδοϋπεροξειδίου. Επιπλέον τα ισοπροστανία διαχωρίζονται σε ολικά και ελεύθερα (μη δεσμευμένα) 8-ισο-PGF2α. Τα ολικά αποτελούν άθροισμα των εστεροποιημένων σε φωσφολιπίδια 8-ισο-PGF2α και των ελεύθερων 8-ισο-PGF2α. Τα ελεύθερα 8-ισο-PGF2α επηρεάζονται περισσότερο από την ενζυματική οδό, ενώ τα ολικά επηρεάζονται λιγότερο καθώς το εστεροποιημένο αραχιδονικό οξύ δεν είναι υπόστρωμα για συνθάσες προσταγλανδίνης-

ενδοϋπεροξειδίου. Οι ίδιοι ερευνητές, συμπέραναν ότι η μέτρηση μόνο των εστεροποιημένων 8-ισο-PGF2α ή των συνολικών 8-ισο-PGF2α (εστεροποιημένα 8-ισο-PGF2α στην πλειοψηφία τους), μπορεί να είναι ένας πιο ενδεικτικός δείκτης οξειδωτικού στρες. Τέλος, σε περιπτώσεις που τα ολικά είναι περισσότερα σε σχέση με τα ελεύθερα, η πιο πιθανή οδός παραγωγής είναι η μη ενζυμική (κάπνισμα, στεφανιαία νόσο). Αντίθετα, στην προεκλαμψία η πιο πιθανή πηγή παραγωγής 8-ισο-PGF2α είναι η ενζυμική, καθώς τα ελεύθερα 8-ισο-PGF2α έχουν μεγαλύτερη απόκριση από τα ολικά.

## 2.5 Ισοπροστάνια και Διατροφή

Τα τελευταία χρόνια, έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες μελέτες που αφορούν στη συσχέτιση των **διατροφικών αντιοξειδωτικών** με τα ισοπροστάνια και το οξειδωτικό στρες (Πίνακας 2.4). Για παράδειγμα, συμπληρώματα διατροφής με **βιταμίνη E** (α-τοκοφερόλη), ένα ευρέως διαδεδομένο αντιοξειδωτικό που σχετίζεται άμεσα με τη μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και το οξειδωτικό στρες, ήταν αποτελεσματικά στην μείωση των F2-IsoPs. Αντίστοιχα αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μελέτες που αφορούσαν στην **βιταμίνη C**, η οποία έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την εξέλιξη του όγκου του καρκίνου του παγκρέατος σε προκλινικά μοντέλα. Οι Javanbakht et al. (2016) μελέτησαν 57 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) με χαμηλή **βιταμίνη D** (< 30 ng/mL) και 48 ασθενείς T2DM με φυσιολογικά επίπεδα βιταμίνης D (> 30 ng/mL). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης D στον ορό συσχετίστηκαν αντιστρόφως με τα F2-ισοπροστάνια. Επομένως, η βιταμίνη D μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση στο οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με T2DM. Μειωμένα επίπεδα ισοπροστανίων, παρατηρήθηκαν και σε διατροφή με **πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά**, όπως είναι οι ανθοκυανίνες, που βρίσκονται σε σκούρα φρούτα, τα βατόμουρα, οι φράουλες, τα φραγκοστάφυλα και τα κεράσια. Επιπλέον, σε δίαιτες μεγάλης διάρκειας (πάνω από 20 χρόνια) που ήταν πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά και με μειωμένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, έχουν παρατηρηθεί χαμηλότερα επίπεδα F2-IsoPs στο πλάσμα. Επιπλέον, το θαλάσσιο ιχθυέλαιο, αποτελεί έναν σημαντικό διατροφικό παράγοντα μείωσης των ενδογενών ισοπροστανίων, καθώς είναι πλούσιο σε **ωμέγα-3 PUFAs**, **εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA)** και **εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)**. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι ο περιορισμός των λαμβανόμενων θερμίδων, μειώνει και από μόνος του τα F2-IsoP. (Milne et al., 2015)

**Πίνακας 2.4** Επίδραση των αντιοξειδωτικών και της διατροφής στα επίπεδα των ισοπροστανίων

Αντιοξειδωτικό/ Τρόφιμο (Παρέμβαση)	Σχέδιο παρέμβασης	Πληθυσμός Μελέτης	Επίπεδα F2-IsoPs	Αναφορές
Βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη)	1600 IU/ημέρα ή περισσότερο για τουλάχιστον 8 εβδομάδες	Άτομα με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία, ενισχυμένο οξειδωτικό στρες και κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάντα	Μείωση	(Robert II et. al., 2007)
Βιταμίνη C & Βιταμίνη Ε	1000 mg/ημέρα βιταμίνη C ή 800 IU/ημέρα βιταμίνη Ε για 2 μήνες	Παχύσαρκος πληθυσμός/μη καπνιστές	Μείωση	(Block et. al., 2008)
Βιταμίνη C	Ενδοφλέβιες φαρμακολογικές δόσεις βιταμίνης C δύο φορές την εβδομάδα (15–125 g), χορηγούμενες σε συνδυασμό με γεμισταβίνη	Ασθενείς με ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο ανεγχείρητο, μεταστατικό ή υποτροπιάζον αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος	Μείωση	(Welch et. al., 2013)
Ανθοκυανίνες (πολυφαινόλες) (Χυμός Κερασιού) (Tart Cherry Juice)	240 mL δύο φορές την ημέρα για 14 ημέρες	Υγιείς άτομα/ηλικίας 61-75 ετών/μη καπνιστές/ χωρίς ιστορικό χρόνιας νόσου	Μείωση	(Traustadóttir et. al., 2009)
Ανθοκυανίνες (φράουλες)	500 g φράουλες για 1 μήνα	Υγιείς άτομα/μη καπνιστές/χωρίς ιστορικό χρόνιας νόσου που συνδέεται με οξειδωτικό στρες	Μείωση κατά 27,90% των ισοπροστανίων στα ούρα	(Alvarez-Suarez et. al., 2014)
n-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (n-3 PUFA)	4g/ ημέρα κάψουλες είτε ιχθυελαίου είτε ελαιόλαδου σε μια ελεγχόμενη δοκιμή από την 20η εβδομάδα κύησης έως τον τοκετό	Έγκυες γυναίκες με αλλεργική νόσο (ιστορικό αλλεργικής ρινίτιδας και/ή άσθματος και θετικών δερματικών τεστ με τσίμπημα σε κοινά αλλεργιογόνα)	Μείωση στο πλάσμα και στα ούρα	(Barden et. al, 2004)
n-3 λιπαρά οξέα	Κάψουλες ιχθυελαίου [3,6 g (n-3) λιπαρά οξέα/ημέρα] ή εικονικό φάρμακο (placebo)	Υγιή άτομα/ηλικίας 30–65 ετών/ φυσιολογικό ή μέτρια αυξημένο σωματικό βάρος	Μείωση των 8-iso-PGF2α στο πλάσμα μετά από 3 μήνες συμπλήρωσης με (n-3) λιπαρά οξέα	Nälsén et. al., 2006)

Το οξειδωτικό στρες και ο κίνδυνος εμφάνισης μεταβολικών συνδρόμων όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, μπορούν να αυξηθούν από την διατροφή με **υψηλή πρόσληψη λίπους**. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα των F2-isoP σε ενήλικες (υγής ή με επιδεινωμένα μεταβολικά σύνδρομα) δεν επηρεάζονται από δίαιτες πλούσιες σε κορεσμένα ή μονοακόρεστα λιπαρά. Σύμφωνα όμως με την βιβλιογραφική ανασκόπηση των Silva et. al. (2017), τα επίπεδα των F2-isoP μειώνονται από τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της διατροφής ενώ αυξάνονται από τα trans-λιπαρά οξέα σε πολυάριθμες μελέτες. Τα επίπεδα των ισοπροστανίων, μπορούν να επηρεαστούν από τα διαιτητικά λίπη, είτε άμεσα είτε έμμεσα καθώς τα διαιτητικά λίπη (1) αποτελούν μεταβολικά υποστρώματα για το σχηματισμό των F2-isoP, (2) μπορούν να τροποποιήσουν τη λιπιδική σύνθεση (σύνθεση φωσφολιπιδικών λιπαρών οξέων) στους ιστούς και (3) μπορούν να επηρεάσουν τις συγκεντρώσεις λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα, οι οποίες εμπλέκονται στη μεταφορά F2-isoP. Επομένως τα trans-λιπαρά οξέα της διατροφής, μπορούν να ευνοούν μεταβολικές καταστάσεις που συνδέονται με την παραγωγή F2-ισοπροστανίων, όπως δυσλιπιδαιμία, φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και υπέρταση (Silva et. al., 2017). Στον πίνακα 2.5 που ακολουθεί, συνοψίζονται μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν διατροφικές παρεμβάσεις σε άτομα με μεταβολικά σύνδρομα. Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της παρέμβασης στα άτομα αυτά, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ισοπροστανίων (δείκτες οξειδωτικού στρες) με διάφορες μεθόδους.



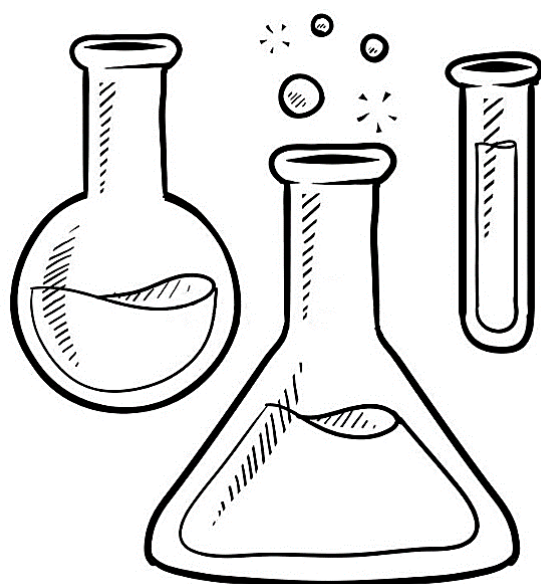
**Πίνακας 2.5** Κλινικές διατροφικές παρεμβάσεις σε άτομα με μεταβολικά σύνδρομα και μέτρηση ισοπροστανίων ως δείκτη οξειδωτικού στρες.

Ασθένεια	Διατροφική παρέμβαση	Μέθοδος προσδιορισμού	Βιολογικό υγρό	Τιμές Ισοπροστανίων		Μονάδες	Αποτέλεσμα παρέμβασης στα Ισοπροστάνια (Αύξηση/Μείωση)	Βιβλιογραφία
69 υπέρβαρα άτομα (Δείκτης μάζας σώματος BMI $\geq 25$ kg/m <sup>2</sup> ), δυσλιπιδαιμία	Υποενεργειακή διαίτα (hypoenergetic diet, HD) με 200 g πολτού αçaί (πλούσιο σε ανθοκυανίνες ελαϊκό οξύ, ίνες και φυτοστερόλες) ή εικονικού φαρμάκου (placebo) για 60 ημέρες	ELISA	Πλάσμα	HD + αçaί (n=30)		pg/ml	Μείωση συγκέντρωσης 8-isoprostane	(Aranha et al., 2020)
				36.3 ± 27.1 (T=0)	15.3 ± 25.3 (T=60 ημέρες)			
				HD + εικονικό φάρμακο (n=39)				
				23.7 ± 20.1 (T=0)	28.3 ± 40.9 (T=60 ημέρες)			
7 παχύσαρκα παιδιά (<21 ετών) (BMI >95th percentile) με έλλειψη (25OHD<20 ng/mL) ή ανεπάρκεια (25OHD μεταξύ 20 και 30 ng/mL) βιταμίνης D	Διόρθωση της έλλειψης/ανεπάρκειας βιταμίνης D (25OHD>30 ng/mL) μετά από θεραπεία με βιταμίνη D	ELISA	Ούρα	Πριν την θεραπεία (T=0) 8292 ± 7083	Μετά την θεραπεία και την διόρθωση (T=3 μήνες) 3034 ± 3074	pg/ml	Μείωση 8-iso-PGF2α	(Grunwald et al., 2016)
15 έφηβοι με παχυσαρκία και έλλειψη/ανεπάρκεια βιταμίνης D	2000 IU βιταμίνης D/ημέρα για 3 μήνες, με αποτέλεσμα να αυξηθεί από 17,3 (12,5–27,8) σε 32,6 (14,3–68,0) ng/ml, p = 0,005). Ακολουθήθηκε και	ELISA	Ούρα	(T=0) 41.5 (23.6–117.4)	(T=3μήνες) 30.0 (22.0–41.5)	ng/mmol κρεατινίνης	Αμετάβλητα επίπεδα 8-epiPGF2α	(Makariou et al., 2020)

	πρόγραμμα διατροφικής παρέμβασης (12 εβδομάδων)								
37 Ενήλικες (μη-καπνιστές) με μεταβολικό σύνδρομο και με γενετική προδιάθεση να αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 (type 2 diabetes, T2D) και καρδιαγγειακή νόσο (cardiovascular disease, CVD)	Βιταμίνη D από μανιτάρια <i>Agaricus bisporus</i> ή White button mushrooms (WBM) Κατανάλωση 100 g WBM καθημερινά για 16 εβδομάδες	ELISA	Ορός	(T=0) (αρχή παρέμβασης) 159 (123–195)	(T=16 εβδομάδες) (τέλος παρέμβασης) 156 (107–202)	(T=20 εβδομάδες) (1 μήνας χωρίς παρέμβαση) 154 (115–240)	pg/ml	Καμία αλλαγή	(Calvo et al., 2016)
80 υπέρβαρα άτομα (60 γυναίκες και 20 άνδρες, BMI >27 kg/m <sup>2</sup> )	800 IU/ημέρα φυσική βιταμίνη E ή εικονικό φάρμακο (n = 41) για 3 μήνες. Αύξηση της δόσης σε 1200 IU/ημέρα για άλλους 3 μήνες. Η Βιταμίνη E (p < 0,001) αυξήθηκε κατά 76% μετά από 6 μήνες.	HPLC-MS	Πλάσμα	Placebo (n = 39)			ng/L	(T=6 μήνες) Μείωση 8-ισοπροστανίων (-11%, p = 0,03)	(Sutherland et al., 2012)
				(T=0) 87 ± 27					
				Vitamin E (n = 41)					
				(T=0) 88 ± 23 (n = 40) *					
				*Λείπει τιμή για τεχνικούς λόγους.					
50 συμμετέχοντες με μεταβολικό	Διατροφικές οδηγίες + συμπλήρωμα 25(OH)VitD 2.000	ELISA	Ούρα	(α) Ομάδα με συμπλήρωμα (Τα επίπεδα βιταμίνης D αυξήθηκαν κατά 90% μετά την παρέμβαση)			ng/mmol κρεατίνης	Τα 8-isoPGF2a μειώθηκαν κατά 22,7%	(Makariou et al., 2019)

σύνδρομο (ΜΣ) (52 ± 10 έτη)	IU/ημέρα ή χωρίς συμπλήρωμα			T=0 (έναρξη) 48,8 (26,8–137,1)	T=3 μήνες 37,7 ( 12,3–99,0)		στην ομάδα (α) και κατά 14,4% στην ομάδα (β)	
				(β) Ομάδα χωρίς συμπλήρωμα (Τα επίπεδα βιταμίνης D αυξήθηκαν κατά 33,3%)				
				T=0 45,8 (16,6–99,3)	T=3 μήνες 39,2 (13,3–120,1)			
126 καπνιστές (μέση ηλικία, 46 έτη, εύρος ηλικίας, 20-78 έτη)	2 μήνες ημερήσιας λήψης συμπληρωμάτων με 500 mg βιταμίνης C (Α) Κάψουλες βιταμίνης C ή (Β) Κάψουλες βιταμίνης C + αντιοξειδωτικό μείγμα που περιέχει, α-λιποϊκό οξύ και βιταμίνη E ή (Γ) κάψουλες βιταμίνης C +εικονικό φάρμακο	GC-MS	Πλάσμα	Βιταμίνη C (n = 42)		pmol/liter	Μείωση	(Dietrich et al., 2002)
				Πριν την παρέμβαση 129.1 ± 67.1	Μετά την παρέμβαση 114.7 ± 61.9			
				Μείγμα (n = 39)				
				123.9 ± 52.3	122.7 ± 43.7			
				Εικονικό φάρμακο (n = 45)				
				164.3± 80.2	159.7 ± 77.3			

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ

### ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία, στοχεύει στον προσδιορισμό των ισοπροστανίων, με χρήση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας – διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) σε δείγματα πλάσματος αίματος εθελοντών με μεταβολικά σύνδρομα. Οι εθελοντές, είχαν λάβει καθημερινά για 3 μήνες ένα λειτουργικό σνακ μανιταριών *Pleurotus eryngii*, ελληνικής παραγωγής με ενισχυμένη περιεκτικότητα σε βιταμίνη D<sub>2</sub> και αντιοξειδωτικές ενώσεις, καθώς τα μανιτάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο σνακ έχουν καλλιεργηθεί σε υποστρώματα παραπροϊόντων ελαιοτριβείου και οινολασπών.

Τα τελευταία χρόνια, τα λειτουργικά τρόφιμα βρίσκονται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω των βιοδραστικών συστατικών τους και των ευεργετικών, για την ανθρώπινη υγεία, δράσεων που παρουσιάζουν. Είναι ιδιαίτερα σημαντικός ο ρόλος τους στην αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων, που προκαλούν διάφορα μεταβολικά σύνδρομα, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, κ.ά. Αντίστοιχα, τα μανιτάρια και διάφορα προϊόντα τους, είναι πλούσιες πηγές θρεπτικών ουσιών που τα καθιστούν τρόφιμα με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Συνιστούν επομένως τρόφιμα με πληθώρα λειτουργικών συστατικών.

Το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ή η μειωμένη αντιοξειδωτική δράση, μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή, η οποία είναι η αιτία εξέλιξης πολλών παθολογιών και χρόνιων ασθενειών (π.χ. καρκίνος, διαβήτης). Τα ισοπροστανία, που ανήκουν στα ενδογενή λιπίδια και παράγονται μέσω διατροφής από ω-6 λιπαρά οξέα, αποτελούν χαρακτηριστικούς βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Για αυτό το λόγο, επιλέγονται ως κατάλληλες υπό μελέτη ενώσεις σε διατροφικές κλινικές μελέτες που περιλαμβάνουν εθελοντές με μεταβολικά σύνδρομα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του λειτουργικού σνακ μανιταριών στα επίπεδα των ισοπροστανίων σε δείγματα πλάσματος εθελοντών με μεταβολικά σύνδρομα (όπως παχυσαρκία, διαβήτης τύπου 2, δυσλιπιδαιμία, κ.ά.). Πιο συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια LC-MS/MS μέθοδος, που στη συνέχεια εφαρμόστηκε στα δείγματα εθελοντών για τον προσδιορισμό ισοπροστανίων. Κατά την εφαρμογή της LC-MS/MS μεθόδου στα δείγματα πλάσματος, δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των ισοπροστανίων, καθώς οι συγκεντρώσεις τους ήταν αρκετά χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε και της οργανολογίας που χρησιμοποιήθηκε. Για αυτό το λόγο, για τον προσδιορισμό των ισοπροστανίων χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας (Enzyme-linked Immunosorbent Assay,

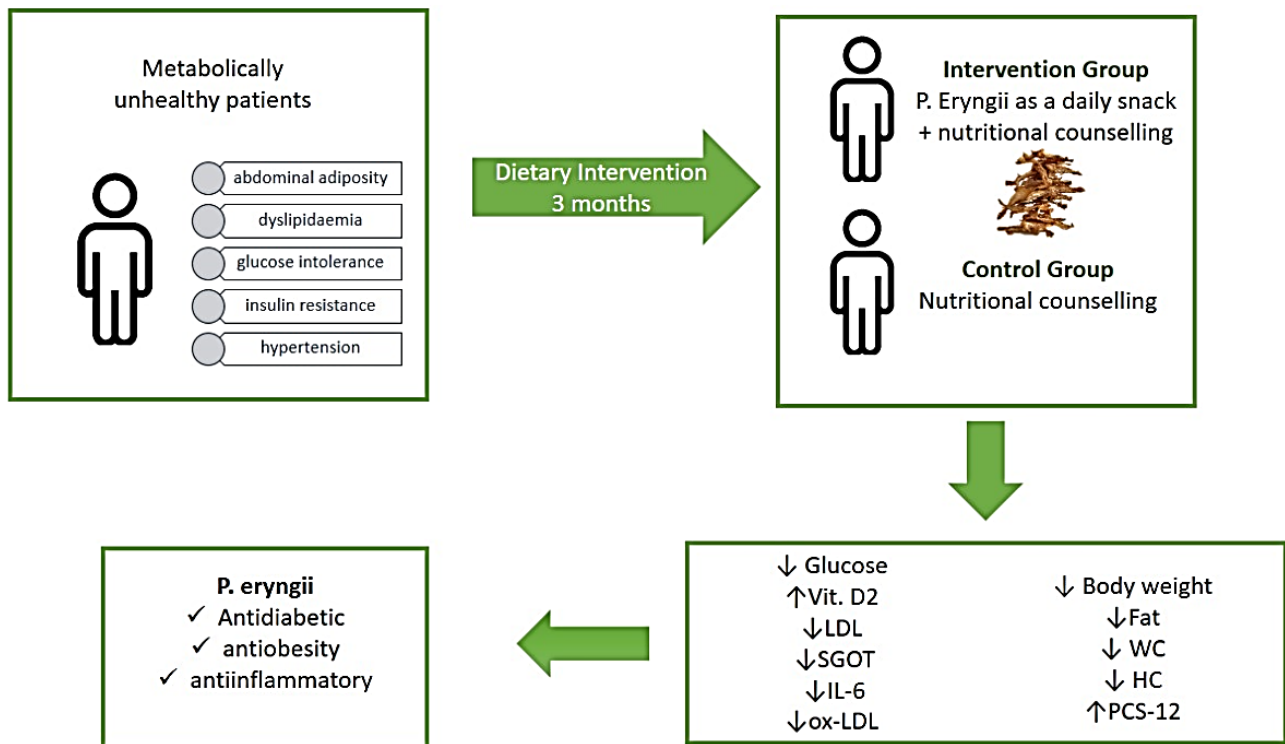
ELISA). Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε στατιστική αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της λήψης του λειτουργικό σνακ μανιταριού στις συγκεντρώσεις ισοπροστανίων και κατ' επέκταση στην πιθανή εμφάνιση οξειδωτικού στρες και φλεγμονής.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

### 4.1 Στοιχεία κλινικής μελέτης

Η κλινική μελέτη, εντάσσεται στα πλαίσια του προγράμματος Ενιαίας Δράσης Κρατικών Ενισχύσεων Έρευνας, Τεχνολογικής Ανάπτυξης & Καινοτομίας «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» με τίτλο "Αξιοποίηση γεωργικών υποπροϊόντων ως νέων υποστρωμάτων για την παραγωγή μανιταριών *Pleurotus* υψηλής διατροφικής αξίας – Ανάπτυξη και κλινική αξιολόγηση ενός καινοτόμου πολυδύναμου λειτουργικού τροφίμου (“σνακ μανιταριών”) με αυξημένη περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις (βιταμίνη D και αντιοξειδωτικά)” με κωδικό έργου T1EDK-02560. Η υλοποίηση του εν λόγω προγράμματος, πραγματοποιήθηκε από την εταιρία «*MANITARIA ΔΙΠΦΥΣ*», σε συνεργασία με τρεις ερευνητικούς φορείς, το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, και το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Η κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών από το 2020 ως το 2021. Σκοπός της ήταν να εξεταστεί η επίδραση του σνακ μανιταριών *Pleurotus eryngii* σε ανθρώπους με μεταβολικά σύνδρομα ως προς τη μείωση δεικτών σχετικών με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές μετρήσεις (γλυκόζη αίματος, χοληστερόλη, ιντερλευκίνη-6, κ.ά.) σε δείγματα αίματος και προσδιορίστηκε η 25(OH)D2 (μορφή βιταμίνης D) του ορού αίματος. Περιληπτικά, η μελέτη παρουσιάζεται στην εικόνα 4.1. Ειδικότερα, η πτυχιακή αυτή εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες μέσω της ανάλυσης των ισοπροστανίων σε δείγματα πλάσματος.



**Εικόνα 4.1** Περιληπτική απεικόνιση της μελέτης (Kleftaki et al., 2022). Interleukin-6 (IL-6), Waist Circumference (WC), Hip Circumferences (HC), Short Form-12 Physical Composite Score (PCS-12), Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT)

#### 4.2 Στοιχεία λειτουργικού σνακ μανιταριών

Η κλινική αξιολόγηση αφορά το προϊόν ελληνικής παραγωγής “μανιτάρια chips”, της εταιρίας «MANITAPIA ΔΙΠΦΥΣ». Το λειτουργικό αυτό σνακ, αποτελείται από φέτες μανιταριών *Pleurotus eryngii* ή αλλιώς «Βασιλικά πλευρώτους» ή «King Oyster» (99%) σε συνδυασμό με εκχύλισμα μαγιάς, φυσικές αρωματικές ύλες και αλάτι. Από διατροφική άποψη, το σνακ παρέχει μεγάλο μέρος της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης σε βιταμίνη D, είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες και αποτελεί πηγή πρωτεϊνών.

Πιο συγκεκριμένα μετά τη συλλογή τους, τα μανιτάρια κόπηκαν σε φέτες πάχους 2 mm και προκειμένου να ενισχυθεί η γεύση τους, προστέθηκε εκχύλισμα μαγιάς και σκόνη γεύσης σκόρδου σε αναλογία 0,5% κατά βάρος. Τα βασιλικά πλευρώτους, αποτελούν σημαντική πηγή βιταμίνης D<sub>2</sub>. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί πως η εργοστερόλη, επίσης συστατικό των μανιταριών, μπορεί να μετατραπεί σε εργοκαλσιφερόλη (γνωστή και ως βιταμίνη D<sub>2</sub>) ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Ultraviolet, UV). Έτσι, αφού οι φέτες μανιταριών ψήθηκαν σε κατάλληλο φούρνο για 20 λεπτά στους 120°C, υποβλήθηκαν στη συνέχεια για 120 λεπτά σε ακτινοβολία UV-B με μήκος κύματος 290-315 nm. Τα μανιτάρια τοποθετήθηκαν σε απόσταση 20 cm από τους λαμπτήρες, οι οποίοι είχαν ισχύ 39W και βρίσκονταν σε απόσταση 20cm μεταξύ τους. Για τον σκοπό της μελέτης,



τα μανιτάρια σφραγίστηκαν ερμητικά ανά 6g, σε φακελάκια από αλουμίνιο. Τέλος, έγιναν οι απαραίτητοι έλεγχοι ώστε το σνακ να είναι ασφαλές προς κατανάλωση και να πληροί τα κριτήρια υγιεινής (Κανονισμός 2073/2005), ενώ πραγματοποιήθηκε και οργανοληπτική αξιολόγηση. Τα 6g περιείχαν  $\approx$ 2,5g γλυκάνη, ενώ η υπόλοιπη διατροφική και θερμιδική αξία του σνακ παρουσιάζεται στην εικόνα 4.2 (Kleftaki et al., 2022).

**Εικόνα 4.2** Διατροφική σύνθεση του σνακ (Kleftaki et al., 2022)

	<b>Snack (6 g)</b>
Energy content (Kcal)	18.42
Available carbohydrates (g)	1.77
Fat (g)	0.288
Protein (g)	1.35
Salt (g)	0.08
Vitamin D <sub>2</sub> (μg)	20



**Εικόνα 4.3** Το λειτουργικό σνακ μανιταριών της εταιρίας «*MANITAPIA ΔΙΠΦΥΣ*» και το ακατέργαστο *Pleurotus eryngii* (King Oyster). (<https://manitariadirfis.g/>)

#### 4.3 Στοιχεία εθελοντών

Για την μελέτη, επιλέχθηκαν συνολικά 180 άτομα, ηλικίας μεταξύ 18 και 76 ετών με μεταβολικά σύνδρομα. Το βάρος των ατόμων αυτών, ήταν σταθερό για τουλάχιστον 3 μήνες πριν την εγγραφή τους και είχαν έναν μέτρια δραστήριο τρόπο ζωής. Κριτήρια αποκλεισμού αποτελούσαν η εγκυμοσύνη, η γαλουχία, η οποιαδήποτε χρήση συμπληρωμάτων μέσα σε 3 μήνες πριν την παρέμβαση, παθήσεις του θυρεοειδούς άνευ θεραπείας, ψυχιατρικές/ψυχικές διαταραχές, ιστορικό κατάχρησης ναρκωτικών ή αλκοόλ. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου (Αριθμός πρωτοκόλλου: 62/03-07-2018) και διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και τον Νόμο για την Προστασία Δεδομένων του 1998. Επιπλέον, καταχωρήθηκε στο [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) με Αριθμό ID: NCT04081818. Όλοι οι συμμετέχοντες,

ενημερώθηκαν πλήρως για τη μορφή και τις διαδικασίες της έρευνας και υπέγραψαν μια φόρμα συγκατάθεσης πριν από τη συμμετοχή.

Τελικά στην κλινική μελέτη, συμμετείχαν συνολικά 100 εθελοντές οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα ελέγχου και την ομάδα παρέμβασης. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, οι δύο ομάδες έλαβαν διατροφική συμβουλευτική ενώ η ομάδα παρέμβασης κατανάλωσε καθημερινά το σνακ. Υπήρχε παρακολούθηση για τη συμμόρφωση μέσω τηλεφωνικών κλήσεων, ανά δύο εβδομάδες.

Για τον προσδιορισμό των ισοπροστανίων, εξετάστηκαν συνολικά 39 εθελοντές, ηλικίας μεταξύ 32 και 74 ετών, εκ των οποίων 24 ήταν γυναίκες και 15 ήταν άνδρες. Τα άτομα αυτά ήταν όλα υπέρβαρα, ενώ κάποιοι παρουσίαζαν επιπλέον παθολογικές καταστάσεις όπως αρτηριακή υπέρταση, διαβήτη και δυσλιπιδαιμία. Εκτός από τα μεταβολικά αυτά σύνδρομα, ορισμένοι είχαν εμφανίσει και άλλες ασθένειες όπως καρκίνος, έμφραγμα, εγκεφαλικό, οστεοπενία και οστεοπόρωση, υπερλιπιδαιμία, υποθυρεοειδισμό, μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) και αυξημένη χοληστερόλη. Ένα μέρος αυτών, λάμβανε επίσης φαρμακευτική αγωγή (αντικαταθλιπτικά, πίεση, σάκχαρο, χοληστερόλη, θυροειδής κ.α.).

Ο αριθμός των εθελοντών με μεταβολικό σύνδρομο που δεν κατανάλωσαν το σνακ ήταν 20 (ομάδα ελέγχου), ενώ οι εθελοντές με μεταβολικό σύνδρομο που κατανάλωσαν το σνακ ήταν 19 (ομάδα παρέμβασης). Επιπλέον, από κάθε εθελοντή λήφθηκε δείγμα 2 φορές, μια φορά στην αρχή της κλινικής μελέτης ( $t=0$ ) και μια στο τέλος της κλινικής μελέτης ( $t=3$ ), δηλαδή με χρονική διαφορά τριών μηνών. Αυτό ήταν απαραίτητο ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των 2 χρονικών σημείων και τελικά να εκτιμηθεί η επίδραση της διατροφής με το λειτουργικό σνακ μανιταριών στα ισοπροστανία και κατ' επέκταση στο οξειδωτικό στρες. Έτσι, τα δείγματα (πλάσμα αίματος) που μελετήθηκαν με την μέθοδο ELISA, ήταν συνολικά 78.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)

### 5.1 Αναλώσιμα

Για τις αναλύσεις LC-MS, χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο, μυρμηκικό οξύ (Formic acid, FA), νερό και μεθανόλη LC-MS καθαρότητας. Για τις εκχυλίσεις των ισοπροστανίων από τα δείγματα πλάσματος χρησιμοποιήθηκαν υδροχλωρικό οξύ (HCl), οξικός αιθυλεστέρας, βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (Butylated hydroxytoluene, BHT), αιθανόλη, υδροξείδιο του καλίου (KOH), μεθανόλη, φορμικό οξύ, HCl και εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας. Όλοι οι διαλύτες παραλήφθηκαν από την εταιρία Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν απιονισμένο/υπερκαθαρό. Οι πρότυπες ενώσεις ισοπροστανίων, αγοράστηκαν από την Cayman Chemical (Μίσιγκαν, ΗΠΑ) και περιλάμβαναν την 8-iso prostaglandin F2α (8-iso-PGF2α ή 8-isoP), την 8-iso-15(R)-prostaglandin F2α (8-iso-15(R)-PGF2α ή 8,15-isoP), την 8-iso prostaglandin F2β (8-iso-PGF2β) και το εσωτερικό πρότυπο (internal standard, IS) 8-iso prostaglandin F2α – d4 (8-iso-PGF2α–d4).

### 5.2 Πρότυπα Διαλύματα

Αρχικά, για κάθε πρότυπη ένωση παρασκευάστηκε διάλυμα stock συγκέντρωσης 1000 µg/mL σε μεθανόλη. Σε όλα τα διαλύματα ισοπροστανίων διαφορετικών συγκεντρώσεων, η τελική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (8-iso prostaglandin F2α – d4) ήταν 0,5 µg/mL. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκαν ύστερα από αραιώσεις των stock και είχαν εύρος τελικών συγκεντρώσεων 0,1-10,0 µg/mL. Ως διαλύτης, τόσο για τα πρότυπα όσο και για τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη (MeOH) με 0,1% FA (v/v), το οποίο βοηθάει στην θραυσματοποίηση των ιόντων.

### 5.3 Συσκευές και επιστημονικά όργανα

Για την μέθοδο LC-MS χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPLC 1200 της εταιρίας Agilent (Santa Clara, USA) και περιελάμβανε έναν απαερωτή G1379B, μια διπλή αντλία χρωματογραφίας G1312A, έναν αυτόματο δειγματολήπτη G1329 και έναν θερμοστατούμενο θάλαμο στήλης (Thermostatted Column Compartment, TCC) G1316A. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ο υβριδικός φασματογράφος

μάζας 3200 QTrap® τριπλού τετραπόλου γραμμικής παγίδας ιόντων της εταιρίας Sciex (Framingham, USA) με διπλή πηγή ιοντισμού (Turbo-V) (Sciex) και με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI). Ο ζυγός ήταν ο METTLER AT261 DeltaRange της εταιρίας METTLER TOLEDO και η φυγόκεντρος της εταιρίας HERMLE (Wehingen, Germany).

#### **5.4 Προκατεργασία Δειγμάτων/Μέθοδοι εκχύλισης**

Τα δείγματα (πλάσμα αίματος) διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Εξετάστηκαν 2 διαφορετικά πρωτόκολλα εκχύλισης των ισοπροστανίων από το πλάσμα αίματος. Το πρώτο αφορά την εκχύλιση μόνο των ελεύθερων ισοπροστανίων (Μέθοδος Α). Αντίθετα, με το δεύτερο πρωτόκολλο (Μέθοδος Β), που περιλαμβάνει και ένα στάδιο υδρόλυσης, μπορούν να προσδιοριστούν τα ολικά επίπεδα των ισομερών F2-IsoP, δηλαδή τόσο τα εστεροποιημένα όσο και τα μη δεσμευμένα ισοπροστάνια

##### *5.4.1 Μέθοδος εκχύλισης για ελεύθερα ισοπροστάνια*

#### **Πορεία εκχύλισης για ελεύθερα ισοπροστάνια**

Η πορεία εκχύλισης βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Aszyk et al. (2017). Αρχικά, 400μL ομογενοποιημένου (pooled) πλάσματος από τα δείγματα της κλινικής μελέτης (Sample A) μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια falcon, όπου προστέθηκαν 4mL νερό οξιμισμένο με υδροχλωρικό οξύ ( $\text{pH} = 2$ ) και 4mL οξικού αιθυλεστέρα. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση για 4 λεπτά σε 4400 περιστροφές ανά λεπτό (revolutions per minute, rpm) και με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας συλλέχθηκε η οργανική στοιβάδα σε ποσότητα  $V=3\text{mL}$ . Η εκχύλιση με 4mL οξικού αιθυλεστέρα επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές, επομένως ο τελικός όγκος της οργανικής φάσης που συλλέχθηκε ήταν 9 mL. Τέλος έγινε εξάτμιση του οργανικού διαλύτη σε ήπιο ρεύμα αζώτου και το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 400 μL διαλύματος MeOH+FA 0,1% v/v για την ανάλυση LC-MS/MS.

Σε διαφορετικό falcon, σε αντίστοιχο ομογενοποιημένο μίγμα πλάσματος (400μL) προστέθηκε αυτή τη φορά και εσωτερικό πρότυπο τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/mL από διάλυμα stock 100μg/mL (Sample A+IS, pre-spiked διάλυμα). Συμπληρώθηκαν στη συνέχεια 4mL νερό με HCl ( $\text{pH}=2$ ), 3,994mL οξικού αιθυλεστέρα και ακολούθησαν οι ίδιες διαδικασίες προκατεργασίας του δείγματος.

#### 5.4.2 Μέθοδος εκχύλισης για ολικά ισοπροστάνια

Για την μέθοδο αυτή παρασκευάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (Butylated hydroxytoluene, BHT) 1% σε αιθανόλη. (1% w/v BHT)
- KOH 50% w/w, απαραίτητο για το διάλυμα υδρόλυσης
- Διάλυμα υδρόλυσης (1ml KOH 50% w/w, 1ml H<sub>2</sub>O, 10ml MeOH)
- Μυρμηκικό/Φορμικό οξύ (Formic acid, FA) 0,05% v/v
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 5M
- Διάλυμα 3:1 v/v Αιθυλεστέρα:Εξάνιου
- Διαλύτης LC-MS/MS ένεσης (100μL MeOH+0,1%FA)

#### Πορεία εκχύλισης για ολικά ισοπροστάνια

Η πορεία εκχύλισης βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Larose et al. (2013). Σε 250μL πλάσματος (Sample B) προστέθηκαν 10μL του διαλύματος BHT (1% αιθανόλη) και στη συνέχεια συμπληρώθηκε νερό έως τα 500μL. Προστέθηκαν 500μL διαλύματος υδρόλυσης και έγινε ανάδευση σε vortex και επώαση στους 37 °C για 60 λεπτά (ανάδευση για 2 λεπτά, ανά 15 λεπτά). Η αντίδραση τερματίστηκε με 100μL μυρμηκικού οξέος (φορμικό οξύ, FA) 0,05% v/v και οξίνιση με 90μL HCl 5M. Ακολούθησε εκχύλιση με 1,5ml του εξανίου, που πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Στη συνέχεια συλλέχθηκε η υδατική φάση (κάτω φάση) και απορρίφθηκε η οργανική (εξάνιο, πάνω φάση). Η υδατική φάση, εκχυλίστηκε με διάλυμα 1,5ml 3:1 αιθυλεστέρα:εξανίου. Η εκχύλιση αυτή επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές. Τέλος, συλλέχθηκε η προκύπτουσα οργανική φάση και των τριών εκχυλίσεων και πραγματοποιήθηκε εξάτμιση μέχρι ξηρού με άζωτο. Ακολούθησε ανασύσταση έως 100μL σε MeOH+0,1% FA.

Στο δείγμα με το εσωτερικό πρότυπο (Sample B+IS) , προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/mL από διάλυμα stock 10 μg/mL.

#### 5.5 Μέθοδος Υγρής χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και διαδοχική θραυσματοποίηση (MS<sup>2</sup>) (LC-ESI-MS/MS) για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ισοπροστανίων.

Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS) αποτελεί μια μέθοδο ανάλυσης η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό ουσιών ενός μίγματος και τον εν συνέχεια ποιοτικό και

ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ο διαχωρισμός των ουσιών από το μίγμα τους, επιτυγχάνεται με την υγρή χρωματογραφία (HPLC), ενώ η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια μέθοδος υψηλής ευαισθησίας η οποία με μεγάλη ακρίβεια, παρέχει στοιχεία για την δομή των ενώσεων και επιτρέπει την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίησή τους. Με την μέθοδο LC-MS, μπορούν να αναλυθούν βιοχημικές, οργανικές και ανόργανες ενώσεις που προέρχονται από περίπλοκα φυσικά ή και βιολογικά δείγματα. Επομένως, αποτελεί μια αναλυτική τεχνική, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους, όπως η βιοτεχνολογία, τα τρόφιμα και η περιβαλλοντική μελέτη καθώς και σε διάφορες βιομηχανίες όπως φαρμάκων, αγροχημικών και καλλυντικών (Πολυχρονάκη, 2019).

Στην παρούσα μελέτη ο διαχωρισμός των ισοπροστανίων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο HPLC, αντίστροφης φάσης (Reversed Phase, RP). Πολλές φορές, προκειμένου να βελτιωθεί ο χρόνος κατακράτησης των ουσιών στη στήλη και ο διαχωρισμός, γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητας φορμικού ή οξικού οξέος στο σύστημα των διαλυτών. Έτσι οι κορυφές των ενώσεων είναι πιο έντονες ενώ παράλληλα μπορεί να αποτραπεί η ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων στην πηγή ιοντισμού.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια τεχνική ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων. Χαρακτηρίζεται ως μια τεχνική υψηλής ευαισθησίας που μπορεί με μεγάλη ακρίβεια να προσδιορίσει το μοριακό βάρος των προς ανάλυση ενώσεων. Η τεχνική αυτή, βασίζεται στον ιοντισμό μορίων (συστατικών του δείγματος) ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων των αρχικών μορίων, που στην συνέχεια διαχωρίζονται με βάση το λόγο «μάζα προς φορτίο» (mass to charge,  $m/z$ ). Το φάσμα μαζών που λαμβάνεται (σχετική ένταση μετρούμενου ρεύματος ως προς το λόγο  $m/z$ ), παρέχει τις κατάλληλες πληροφορίες για την δομική ταυτοποίηση της προς ανάλυση ουσίας.

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές ιοντισμού, μια εκ των οποίων είναι ο ηλεκτροψεκασμός (Electrospray Ionization, ESI), ο οποίος σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό της συγκεκριμένης μελέτης. Η τεχνική αυτή είναι ήπια και επομένως η πιθανότητα δημιουργίας θραυσμάτων ιόντων στην πηγή του ιοντισμού, γεγονός ανεπιθύμητο κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων, είναι ελάχιστη. Ο ESI δημιουργεί είτε θετικά είτε αρνητικά ιόντα, που συμβολίζονται ως  $[M+H]^+$  ή  $[M+Na/K]^+$  ή  $[M+NH_4]^+$  και ως  $[M-H]^-$ , αντίστοιχα. Ο θετικός ιοντισμός ( $ESI^+$ ) των μορίων δηλαδή, πραγματοποιείται είτε μέσω πρωτονίωσης είτε μέσω σχηματισμού προϊόντων προσθήκης με μεταλλικά κατιόντα όπως  $Na^+$  και  $K^+$  ή με τεταρτοταγή αμμωνιακά είδη. Αντίθετα, ο αρνητικός ιοντισμός ( $ESI^-$ ) είναι αποτέλεσμα αποπρωτονίωσης και οδηγεί στον σχηματισμό ψευδομοριακών ιόντων. (Πολυχρονάκη, 2019)



Όπως περιγράφηκε παραπάνω (ενότητα 5.3), η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LC-MS/MS αποτελούμενο αρχικά από το σύστημα HPLC 1200 της εταιρίας Agilent και από τον υβριδικό φασματογράφο μάζας 3200 QTrap® τριπλού τετραπόλου γραμμικής παγίδας ιόντων της εταιρίας Sciex. Ο φασματογράφος διέθετε διπλή πηγή ιοντισμού (Turbo V) και πηγή ιοντισμού ESI, ενώ η διάταξη HPLC περιείχε έναν απαερωτή (μοντέλο G1379B), μια διπλή αντλία χρωματογραφίας G1312A, έναν αυτόματο δειγματολήπτη G1329 και έναν θερμοστατούμενο θάλαμο στηλών (θερμοστάτη στηλών) (Thermostatted Column Compartment, TCC) G1316A.

Η χρωματογραφική στήλη (column) (στατική φάση) στην οποία πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των ενώσεων, ήταν η στήλη αντίστροφης φάσης InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, της εταιρίας Agilent, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm x 100 mm και μέγεθος σωματιδίων 2,7 μm. Η κινητή φάση ήταν μείγμα 2 διαλυτών, του διαλύτη A [Ακετονιτρίλιο+0.01 %FA] και του διαλύτη B [νερό+0.01%FA], ενώ η τεχνική έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν βαθμιδωτή, δηλαδή η σύσταση της κινητής φάσης μεταβαλλόταν με σταθερό ρυθμό. Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης φαίνεται στον Πίνακα 5.1. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν σταθερός στα 300μL/min και η ποσότητα δείγματος (ή διαλύματος πρότυπου) που λάμβανε ο δειγματολήπτης (injection volume) ήταν 5μL.

**Πίνακας 5.1** Πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης διαλυτών

Χρόνος (min)	(A) Ακετονιτρίλιο + 0.01 %FA	(B) H <sub>2</sub> O + 0.01%FA
0,00	25%	75%
17,00	30%	70%
17,10	25%	75%
25,00	25%	75%

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για την φασματομετρία μάζας (MS) η πηγή ιοντισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και η ανίχνευση έγινε σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού. Οι ενώσεις δηλαδή, ιονίστηκαν αποβάλλοντας ένα πρωτόνιο (H<sup>+</sup>) ώστε να σχηματίσουν το μοριακό ιόν [M-H]<sup>-</sup>. Οι συνθήκες ιοντισμού της πηγής και των πρότυπων ενώσεων παρατίθενται στον Πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2** Συνθήκες ιοντισμού πηγής και πρότυπων ενώσεων ισοπροστανίων

(Curtain gas) CUR:	10
(Nebulizer Gas 1) GS1:	45
(Heater Gas 2) GS2:	45



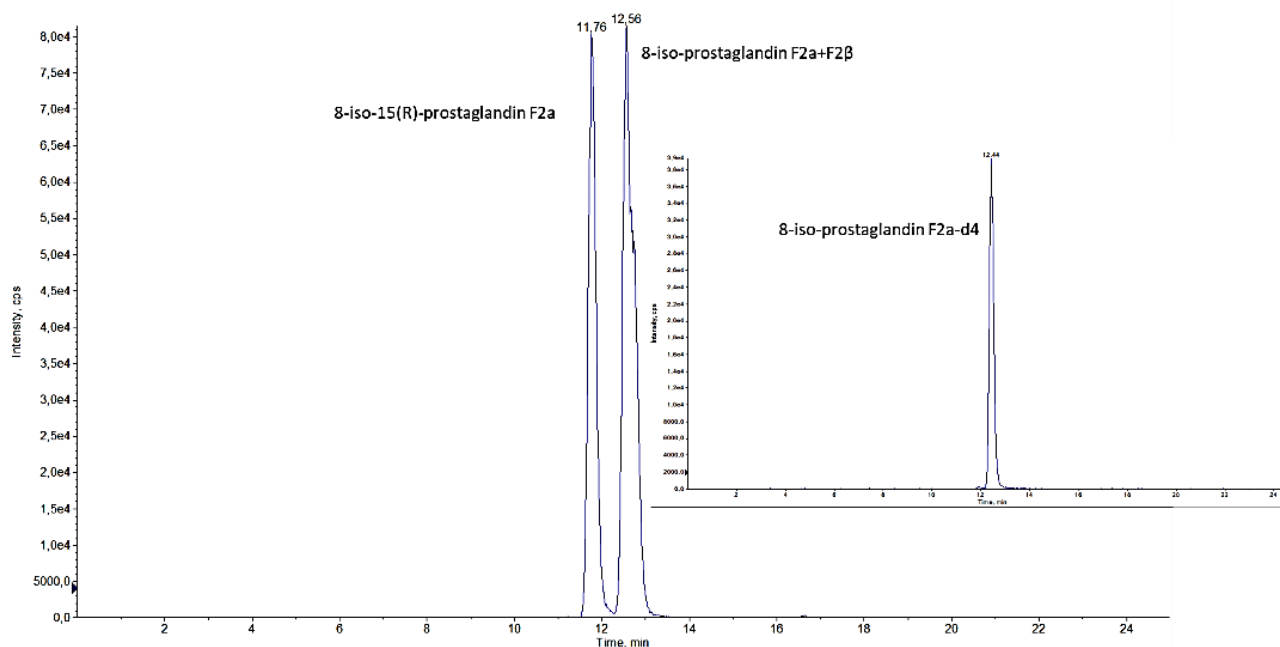
(Temperature, °C) TEM:	300
(Interface heater) ihe:	ON
(Collisionally Activated Dissociation Gas) CAD:	Medium
(Ion spray needle voltage) IS:	-4500
(Declustering potential) DP	-60
(Entrance Potential) EP	-10
(Collision Energy) CE (8-iso-15(R)-prostaglandin F2a)	-34
CE (8-iso-prostaglandin F2a-d4)	-32
CE (8-iso-prostaglandin F2a)	-29
CE (8-iso-prostaglandin F2b)	-33

Το φασματόμετρο μάζας χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων ιόντων (Multiple Reaction Monitoring, MRM) με την χρήση των μεταπτώσεων (m/z) 353.3→193.1 για όλα τα ισοπροστάνια και 357.1 → 197.1 για το εσωτερικό πρότυπο, 8-iso prostaglandin F2a – d4. Στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται τα θραύσματα μάζας (m/z) και ο χρόνος έκλυσης των πρότυπων ισοπροστανίων. Τα ισομερή ισοπροστάνια 8-iso-prostaglandin F2a και 8-iso-prostaglandin F2b, δεν ήταν δυνατό να διαχωριστούν χρωματογραφικά και επομένως υπολογίστηκαν ως σύνολο, εφόσον διαθέτουν το ίδιο μοτίβο θραυσματοποίησης και παρόμοιο χρόνο έκλυσης.

**Πίνακας 5.3** Στοιχεία των προς ανάλυση ενώσεων

Αναλυτές	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Διαγνωστικά θυγατρικά ιόντα (m/z)	Θυγατρικό MS <sup>2</sup> ιόν για ποσοτικοποίηση (m/z)	Χρόνος έκλυσης/ κατακράτησης (RT) minutes
8-iso-prostagland in F2a-d4	357.1	197.1/313.1/251.3	197.1	12.32
8-iso-15(R)-prostagland in F2a	353.3	193.1/309.3/247.0	193.1	11.76
8-iso-prostagland in F2a	353.3	193.1/309.3/247.0	193.1	12.56
8-iso-prostagland in F2b	353.3	193.1/309.3/247.0	193.1	12.56

Όλα τα δεδομένα λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν στο λογισμικό Analyst 1.4.2. (Sciex, USA). Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα των τριών υπό ανάλυση ισοπροστανίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.1.



**Εικόνα 5.1** Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα των τριών μελετούμενων ισοπροστανίων

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ENZYMIΚΗ ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

### 6.1 Αναλώσιμα

Η ποσοτική ανάλυση των 8-ισοπροστανίων στο πλάσμα έγινε με το ab175819 ELISA kit της εταιρίας Abcam (Cambridge, United Kingdom). Το kit αυτό περιελάμβανε μια πλάκα ELISA με 96 πηγάδια (wells) καθώς και όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια, εκτός του διαλύματος 2N Θεικού οξέος (διάλυμα διακοπής της αντίδρασης).

Αντιδραστήρια που περιείχε το kit:

- Πρότυπο διάλυμα 8-ισοπροστανίων **(8-isoprostane Standard)**
- Συζεύγματα 8-ισοπροστανίων με HRP **(1,000X) (8-isoprostane HRP Conjugates)**
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δειγμάτων **(10X) (Sample Dilution Buffer)**
- Ρυθμιστικό διάλυμα υπεροξειδάσης χρένου **(HRP Buffer)** (Horseradish peroxidase, HRP)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης **(10X) (Wash Buffer Solution)**
- Υπόστρωμα TMB (3,3',5,5'-τραμεθυλοβενζιδίνη) **(TMB Substrate)**

Αντιδραστήρια που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο:

- Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης 2N Θεικό οξύ **(Stop Solution)**

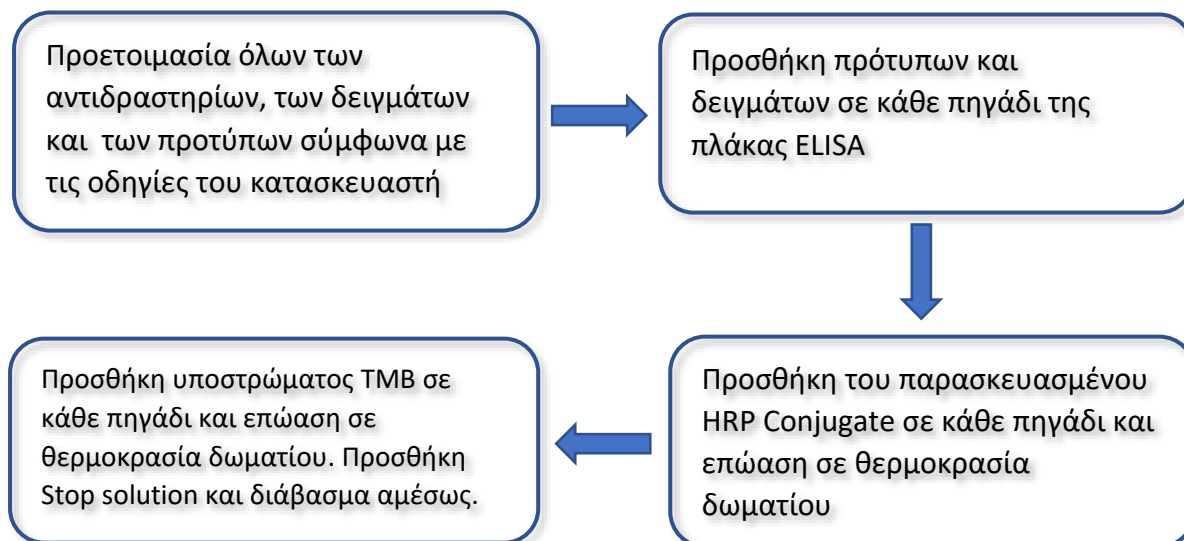
Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ήταν απαραίτητα τα εξής: οξικό οξύ, οξικός αιθυλεστέρας, υδροξείδιο του καλίου (KOH) και μυρμηκικό οξύ. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Τέλος, το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο.

### 6.2 Συσκευές και επιστημονικά όργανα

Χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτικός ζυγός METTLER AT261 DeltaRange της εταιρίας METTLER TOLEDO και η φυγόκεντρος της εταιρίας HERMLE (Wehingen, Germany). Η συσκευή ανάγνωσης της μικροπλάκας ELISA (microplate reader) ήταν η Safire II της εταιρίας TECAN (Switzerland).

### 6.3 Συνοπτικό διάγραμμα πειραματικής πορείας/πρωτοκόλλου ELISA

Για να πραγματοποιηθεί η ενζυμική ανοσοδοκιμασία, ήταν απαραίτητη η κατάλληλη προετοιμασία των αντιδραστηρίων, των προτύπων και των δειγμάτων. Στο σχήμα 6.1 παρουσιάζεται συνοπτικά η πειραματική πορεία της μεθόδου ELISA, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή ([https://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/8-isoprostane-ELISA-Kit-protocol-book-v10e-ab175819%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/8-isoprostane-ELISA-Kit-protocol-book-v10e-ab175819%20(website).pdf)).



Σχήμα 6.1 Συνοπτικό διάγραμμα του πρωτοκόλλου ELISA.

### 6.4 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα αντιδραστήρια που αναφέρθηκαν στην υποενότητα 6.1, ήταν απαραίτητο να πραγματοποιηθούν αραιώσεις. Τα αραιωμένα αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο την ημέρα της ανάλυσης και πριν τη χρήση τους αφέθηκαν ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).

Παρασκευή αραιωμένων αντιδραστηρίων:

- ο Ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσης (**1X**) (**Wash Buffer**): Αρχικά, το (10X) Wash Buffer αναμείχθηκε με ράβδο ανάδευσης και ταυτόχρονη εφαρμογή ήπιας θερμότητας, έως ότου να ληφθεί ένα διαυγές άχρωμο διάλυμα. Στη συνέχεια ολόκληρο το περιεχόμενο του (10X) Wash Buffer (25mL) αραιώθηκε με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 250mL.
- ο Σύζευγμα ενζύμου HRP (**1X**) (**HRP Conjugate**): Ένα φιαλίδιο του 8-isoprostane HRP Conjugate (12μL) που περιεχόταν στο κιτ, αραιώθηκε με 12mL HRP Buffer.

- ο Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δειγμάτων (**1X**) (**Sample Dilution Buffer**): 25mL του (10X) Sample Dilution Buffer αραιώθηκαν με 225mL απιονισμένο νερό.

### 6.5 Προετοιμασία Πρότυπων Διαλυμάτων

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα 8-ισοπροστανίων που περιείχε το kit (8-isoprostane Standard). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος αυτού με το Sample Dilution Buffer ως διάλυμα αραιώσης. Παρασκευάστηκαν συνολικά 6 πρότυπα διαλύματα και ένα control (Πίνακας 6.1).

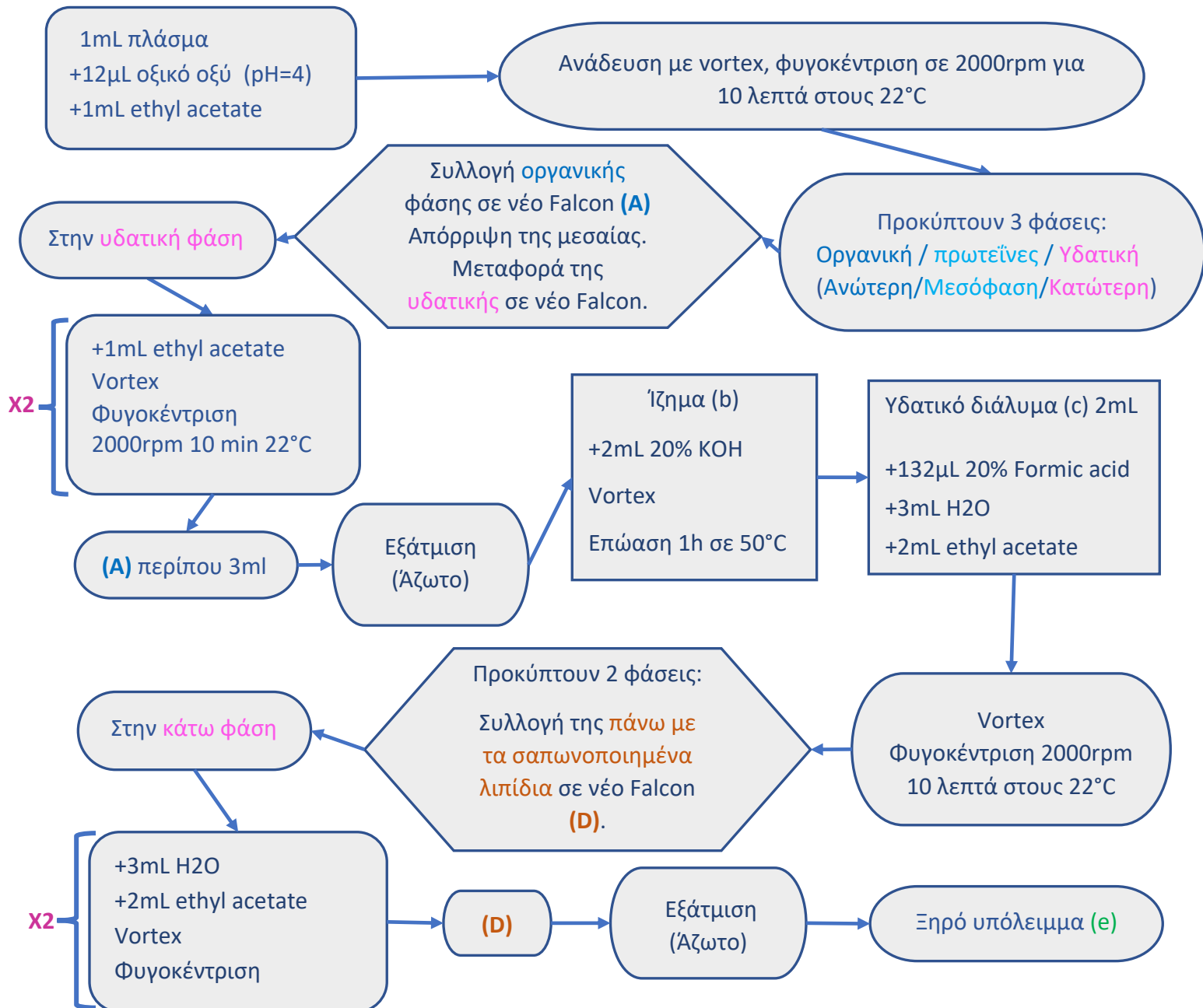
Πιο αναλυτικά, για το πρότυπο #1, το 8-isoprostane Standard vial (2μL με αδρανές αέριο) αναδεύτηκε σε vortex και στην συνέχεια αραιώθηκε με 1X Sample Dilution Buffer ώστε να ληφθούν 2mL διαλύματος. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το πρότυπο #2 ύστερα από ανάμειξη του πρότυπου #1 (400μL) και συμπλήρωση με (1,6mL) 1X Sample Dilution Buffer έως τα 2mL. Για το πρότυπο #3 αναμείχθηκε το πρότυπο #2 (1mL) με (1mL) 1X Sample Dilution Buffer. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και για τα πρότυπα #4, #5 και #6 όπως φαίνεται στον πίνακα 13. Το διάλυμα #7 αποτελεί το control, δηλαδή περιέχει μόνο 1,6mL του 1X Sample Dilution Buffer.

**Πίνακας 6.1** Πρότυπα διαλύματα

Πρότυπο #	Όγκος προς αραιώση (μL)	Όγκος αραιωτικού διαλύματος (μL)	Αρχική συγκέντρωση (pg/mL)	Τελική συγκέντρωση (pg/mL)
1	2μL 8-isoprostane Standard vial (10ng)	1.998μL	5,0 x 10 <sup>6</sup>	5.000
2	400μL πρότυπο #1	1.600	5.000	1.000
3	1.000μL πρότυπο #2	1.000	1.000	500
4	400μL πρότυπο #3	1.600	500	100
5	1.000μL πρότυπο #4	1.000	100	50
6	400μL πρότυπο #5	1.600	50	10
7 (control)	-	1.600	-	-

## 6.6 Προκατεργασία Δειγμάτων

Τα δείγματα (πλάσμα αίματος) διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Η προετοιμασία τους έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναγράφεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Στο σχήμα 6.2, παρουσιάζεται το πρωτόκολλο προετοιμασίας των δειγμάτων.



Σχήμα 6.2 Πρωτόκολλο προετοιμασίας των δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό ELISA, το ξηρό υπόλειμμα του δείγματος, διαλύθηκε σε 20μL αιθανόλης και στη συνέχεια προστέθηκαν 380μL από το 1X Sample Dilution Buffer (pH= 7,4).

## 6.7 Μέθοδος ELISA

Η μέθοδος ELISA, , αποτελεί μια ενζυμική ανοσοδοκιμασία (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Το ανοσολογικό αυτό τεστ, είναι πολύ ευαίσθητο και χρησιμοποιείται για ανίχνευση (ποιοτικό) και ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ουσιών. Η ELISA πραγματοποιείται πάνω σε πλάκα (plate), με συνήθως 96 πηγαδάκια, που είναι επικαλυμμένα με κάποιο αντίσωμα ή αντιγόνο. Επομένως, η ανίχνευση και ο εν συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός, είναι αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης αντισωμάτων και αντιγόνων. Πιο αναλυτικά, η ανίχνευση επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός υποστρώματος που μπορεί να εμφανίσει ένα χρώμα. Για παράδειγμα η υπεροξειδάση χρένου (horseradish peroxidase, HRP), ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται σε βιοχημικές εφαρμογές, συνδυάζεται με υπόστρωμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μπλε χρώματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός, βασίζεται στην σχεδίαση μιας πρότυπης καμπύλης που προκύπτει από πρότυπα διαλύματα. Στη καμπύλη αυτή, η συγκέντρωση αναγράφεται στον άξονα x με τη χρήση μιας λογαριθμικής κλίμακας, ενώ η απορρόφηση στον άξονα y χρησιμοποιώντας μια γραμμική κλίμακα.

Υπάρχουν 4 τύποι ELISA:

1. Άμεση ELISA (πλάκα επικαλυμμένη με αντιγόνο, διαλογή αντισώματος)
2. Έμμεση ELISA (πλάκα επικαλυμμένη με αντιγόνο, διαλογή αντιγόνου/αντισώματος)
3. Sandwich ELISA (πλάκα επικαλυμμένη με αντίσωμα, διαλογή αντιγόνου)
4. Ανταγωνιστική ELISA (Competitive ELISA) (διαλογή αντιγόνου)

Στην ανταγωνιστική ELISA, χρησιμοποιούνται δύο ειδικά αντισώματα, ένα συζευγμένο με ένζυμο και ένα που υπάρχει στο δείγμα προς ανάλυση (αν το δείγμα είναι θετικό). Ο συνδυασμός των δύο αντισωμάτων στα πηγαδάκια της πλάκας ELISA, θα δημιουργήσει έναν ανταγωνισμό για τη σύνδεση με το αντιγόνο. Εάν υπάρξει αλλαγή χρώματος, σημαίνει πως το συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα (και όχι το αντίσωμα του δείγματος), δέσμευσε τα αντιγόνα. Επομένως, σε αυτή τη περίπτωση το τεστ είναι αρνητικό. Αντίθετα, η απουσία χρώματος δηλώνει θετικό τεστ και παρουσία αντισωμάτων στο δείγμα (Alhajj & Farhana, 2022).

Το kit που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιεί **ELISA ανταγωνιστικού τύπου**. Δηλαδή, , τα 8-ισοπροστάνια (15-isoprostane F2t) που βρίσκονται

στα δείγματα των εθελοντών, ανταγωνίζονται μια σταθερή ποσότητα επισημασμένης πρότυπης αναλυόμενης ουσίας (8-isoprostane HRP Conjugates) για δέσμευση σε πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για 8-ισοπροστάνια, που είναι προ-επικαλυμμένο στη μικροπλάκα.

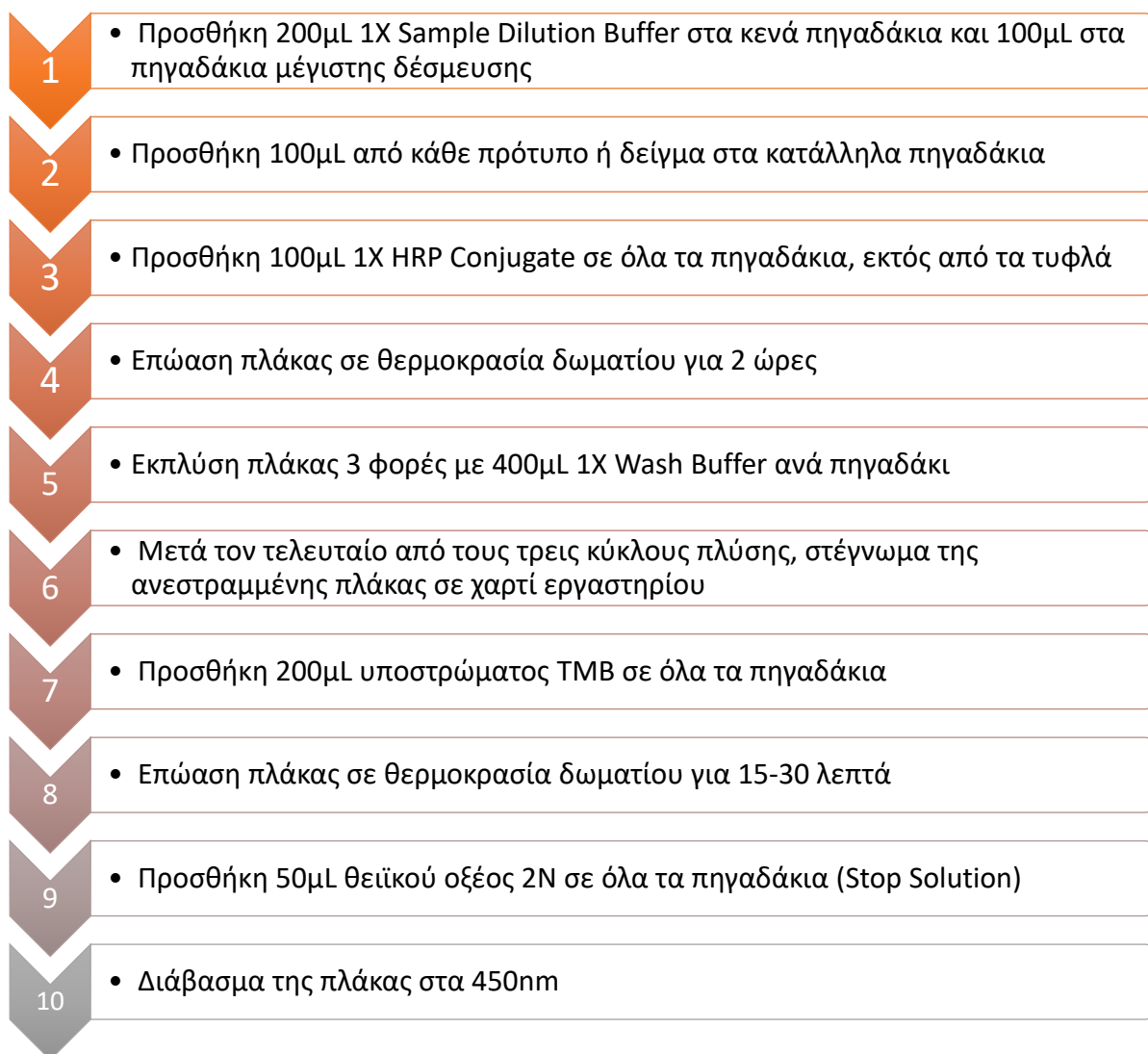
Το υπόστρωμα **TMB** (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη) είναι ένα υπόστρωμα για την υπεροξειδάση χρένου (HRP). Ο συνδυασμός **HRP** και υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλεί την οξείδωση του TMB, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί μπλε χρώμα. Το μπλε χρώμα που αναπτύσσεται με την προσθήκη του TMB, έχει σχέση αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα των 8-ισοπροστανίων στα αρχικά δείγματα ή πρότυπα. Επομένως, κατά την προσθήκη του υποστρώματος TMB, ξεκινάει μια κινητική αντίδραση η οποία στη συνέχεια τερματίζεται με την προσθήκη του διαλύματος διακοπής (Stop solution). Είναι σημαντικό, η προσθήκη του TMB και του Stop Solution στα πηγάδια της πλάκας, να γίνει με την ίδια σειρά, έτσι ώστε να μην υπάρξουν χρονικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ως προς την διάρκεια της αντίδρασης. Επιπλέον, εάν ο χρόνος αντίδρασης σε κάθε πηγάδι δεν είναι σταθερός, τα αποτελέσματα δεν θα είναι επαναλήψιμα. Έτσι, η μεταφορά των δειγμάτων στα πηγάδια, δεν έπρεπε να διαρκέσει περισσότερο από 10 λεπτά ώστε να μην επηρεαστεί η αξιοπιστία των τελικών αποτελεσμάτων.

Το ab175819 ELISA kit, είναι σχεδιασμένο για τον προσδιορισμό των 8-ισοπροστανίων σε βιολογικά δείγματα. Ο προσδιορισμός μπορεί να γίνει σε ούρα, ορό, πλάσμα, κύτταρα και ιστούς, μετά από κατάλληλη απομόνωση των υπό μελέτη εικοσανοειδών από τα δείγματα. Η ευαισθησία της μεθόδου, είναι 1 pg/ml και το εύρος 0.005 ng/ml έως 5 ng/ml. Το kit διατηρήθηκε στους -20 °C αμέσως μετά την παραλαβή του.

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, των αντιδραστηρίων και των προτύπων, το kit ήταν έτοιμο για χρήση. Χρησιμοποιήθηκαν 2 πηγάδια για το τυφλό διάλυμα, το οποίο δεν περιέχει δείγμα και HRP conjugate και άλλα 2 πηγάδια για τα διαλύματα μέγιστης δέσμευσης (maximum binding) (#7) που δεν περιέχουν δείγμα.

Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται η διαδικασία της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας που ακολουθήθηκε. Όλα τα υλικά και τα παρασκευασμένα αντιδραστήρια αφέθηκαν ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Η απορρόφηση διαβάστηκε στο φωτόμετρο μικροπλακών, στο κατάλληλο μήκος κύματος (450nm).





**Σχήμα 6.3** Διαδικασία ELISA

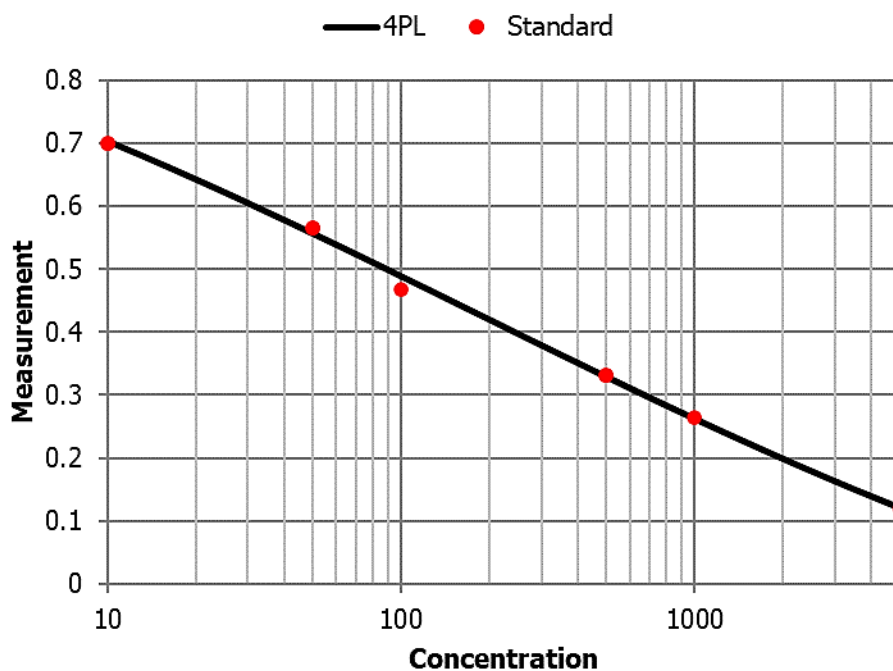
### 6.8 Στοιχεία μεθόδου

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στην διαδικτυακή πλατφόρμα MyAssays® (<https://www.myassays.com/>) με τη χρήση μιας προσαρμοσμένης 4PLC (Four Parameter Logistic Curve) εξίσωσης. Αρχικά, με την χρήση των πρότυπων διαλυμάτων (Πίνακας 6.2), σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 6.1) σε ημι-λογαριθμικούς άξονες. Στον άξονα x αναγράφεται η συγκέντρωση σε pg/mL και στον άξονα y οι διορθωμένες απορροφήσεις. Προκειμένου να ληφθεί η διορθωμένη απορρόφηση, από τις αρχικές μετρήσεις αφαιρέθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων που λήφθηκαν από τα τυφλά διαλύματα (blank).

**Πίνακας 6.2** Πρότυπα διαλύματα

Πρότυπα #	Συγκέντρωση (µg/mL)
1	5000
2	1000
3	500
4	100
5	50
6	10

**Εικόνα 6.1** Πρότυπη καμπύλη (Καμπύλη αναφοράς)



Η εξίσωση της καμπύλης αυτής, έχει τη μορφή:  $y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$ . Όπου οι παράμετροι a ,b ,c

και d έχουν τις τιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3. Στον ίδιο πίνακα δίνεται και το μέσο τετράγωνο σφάλμα (Mean squared error, MSE), η τιμή R, το άθροισμα των τετραγώνων (Sum of Squares, SS) και το άθροισμα τετραγώνων που οφείλεται στην παλινδρόμηση (Sum of squares due to regression, SYX ή SSR).

**Πίνακας 6.3** Στοιχεία καμπύλης

Στοιχεία καμπύλης	
a	-0,2763
b	-0,2821
c	181,6
d	1,134
MSE	6,32E-05

R <sup>2</sup>	0,9985
SS	0,000632
SYX	0,01026

Κατά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των 8-ισοπροστανίων στα δείγματα λήφθηκε υπόψη και ο συντελεστής αραίωσης (Dilution factor). Ο συντελεστής αραίωσης υπολογίστηκε ως εξής:

$$\mathbf{Dilution\ Factor} = \frac{\mathbf{Αρχικός\ όγκος\ δείγματος}}{\mathbf{Όγκος\ στο\ πηγάδι\ ELISA}}, \text{ όπου ο όγκος στο πηγάδι ELISA ήταν για όλα τα}$$

δείγματα 400μL και ο αρχικός όγκος δείγματος αναφέρεται στο δείγμα που προέκυψε μετά από την προκατεργασία των αρχικών δειγμάτων πλάσματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### 7.1 Επικύρωση μεθόδου LC-MS/MS

#### 7.1.1 Γραμμικότητα και ευαισθησία

Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς των τριών υπό εξέταση ισοπροστανίων με βάση το λόγο εμβαδού κορυφής της πρότυπης ουσίας προς το εμβαδό κορυφής του εσωτερικού προτύπου (Area ratio) και τη συγκέντρωση (C) των ισοπροστανίων. Το γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων των καμπυλών αναφοράς κυμαινόταν μεταξύ 0,1-10 µg/mL, ενώ οι καμπύλες ήταν γραμμικές σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων τόσο για την 8-iso-15(R)-prostaglandin F2a (Area ratio=4,24C-0,726, R<sup>2</sup>=0,999) όσο και για το σύνολο των 8-iso-prostaglandin F2 (F2α+F2β) (Area ratio=6,209C-1,291, R<sup>2</sup>=0,999). Η γραμμικότητα, η οποία υποδεικνύεται μέσα από τις καμπύλες βαθμονόμησης και τους συντελεστές προσδιορισμού (R<sup>2</sup>), παρουσιάζεται στον πίνακα 7.1.

**Πίνακας 7.1** Γραμμικότητα μεθόδου

Ένωση	Εύρος συγκεντρώσεων στην καμπύλη (µg/mL)	Εξίσωση	R <sup>2</sup>
8-iso-15(R)-PGF2α	0,1 - 10	y = 4,2405x - 0,7259	0,999
8-iso-PGF2α και 8-iso-PGF2β (total)	0,1 - 10	y = 6,209x - 1,2907	0,999

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) υπολογίστηκαν LOD=0,052 µg/ml και LOQ=0.160 µg/ml για το 8-iso-15(R)-PGF2α και LOD=0,034 µg/ml, LOQ=0.103 µg/ml για τα 8-iso-PGF2α και 8-iso-PGF2β.

#### 7.1.2 Πιστότητα εντός ημέρας (Επαναληψιμότητα)

Προκειμένου να εκτιμηθεί η πιστότητα, χρησιμοποιήθηκε η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) ενός διαλύματος χαμηλής (0,1 µg/mL), ενός διαλύματος μεσαίας (1 µg/mL) και ενός διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (10 µg/mL). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν επαναλήψιμη καθώς η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD),  $RSD\% =$

$\frac{\text{Τυπική Απόκλιση}}{\text{Μέσος όρος}} * 100$ , είχε την τιμή RSD (%) ≤15% (Πίνακας 7.2).

**Πίνακας 7.2** Επαναληψιμότητα (RSD%) για τα ισοπροστάνια

Ένωση	Επίπεδα συγκεντρώσεων (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (RSD%)
8-iso-15(R)-PGF2α	0,1	3,48
	1	4,33
	10	15,39
8-iso-PGF2α και 8-iso-PGF2β (total)	0,1	1,90
	1	3,23
	10	16,22
8-iso-prostaglandin F2α-d4	0,1	0,09
	1	4,45
	10	14,18

### 7.1.3 Ανάκτηση εσωτερικού προτύπου

Το εσωτερικό πρότυπο αποτελεί μια ένωση που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα στα δείγματα, τα τυφλά και τα πρότυπα κατά την ανάλυση με χρωματογραφικές, κυρίως, τεχνικές. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε περιπτώσεις όπου το μητρικό υλικό (matrix) του δείγματος, δεν έχει απόλυτα επαναλαμβανόμενη επίδραση σε διαδικασίες της μεθόδου, όπως για παράδειγμα κάποια εκχύλιση του αναλύτη ή άλλες προκατεργασίες του δείγματος. Με την σωστή επιλογή και χρήση του, το εσωτερικό πρότυπο μπορεί να βελτιώσει την ακρίβεια και την πιστότητα της μεθόδου και να εξαλείψει όσο το δυνατό περισσότερο αρκετά τυχαία αλλά και συστηματικά σφάλματα. Η ένωση αυτή, προκειμένου να είναι κατάλληλη, θα πρέπει (1) να απουσιάζει από το υπό μελέτη δείγμα και παράλληλα (2) να έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες και ίδια αναλυτική συμπεριφορά με τον αναλύτη. Αυτό είναι απαραίτητο ώστε ο αναλύτης και το εσωτερικό πρότυπο, να συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο στο στάδιο προκατεργασίας των δειγμάτων. Επιπλέον είναι ιδιαίτερα σημαντικό (3) να έχει την κατάλληλη συγκέντρωση, έτσι ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με το σήμα των αναλυόμενων ουσιών αλλά και να διακρίνεται εύκολα από το όργανο (Αντωνάκη, 2017). Η ουσία 8-iso-PGF2α-d4, που αποτελεί τη δευτεριωμένη μορφή του προτύπου 8-iso-PGF2α κρίθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο για την συγκεκριμένη μελέτη.

Στον πίνακα 7.3 παρουσιάζονται οι τιμές ανάκτησης (recovery) του εσωτερικού προτύπου (IS) στη μέθοδο Α και Β. Η ανάκτηση της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε (εκχύλιση και LC-MS/MS μέθοδος, που ονομάζεται process recovery, υπολογίστηκε ως **Process recovery =**

$$\frac{\text{Εμβαδό κορυφής} \times 10^4 \text{ Δείγματος} + \text{IS Pre-spiked}}{\text{Εμβαδό κορυφής} \times 10^4 \text{ διαλύματος IS σε διαλύτες}} * 100$$
. Για τιμές συνολικής ανάκτησης μεγαλύτερες από

85–90%, οι συνολικές απώλειες της ανάλυσης είναι αποδεκτές. Έτσι, δεν απαιτείται περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών της προκατεργασίας των δειγμάτων ή της συνολικής μεθοδολογίας.

**Πίνακας 7.3** Τιμές ανάκτησης του εσωτερικού προτύπου στο πρωτόκολλο εκχύλισης A και B.

Πρωτόκολλα Εκχύλισης (μL πλάσμα)	Pre-spiked Sample+IS peak area x 10 <sup>4</sup> (a.u) (Εμβαδό κορυφής x 10 <sup>4</sup> Δείγματος+IS Pre-spiked)	Peak area x 10 <sup>4</sup> (a.u) of IS solution in solvents (Εμβαδό κορυφής x 10 <sup>4</sup> διαλύματος IS σε διαλύτες Pre-spiked)	Process recovery (%)
A (400)	3,5133	2,9082	120,8066845
B (250)	2,531	2,601	97,30872741

Στις μεθόδους εκχύλισης A και B το εσωτερικό πρότυπο (pre-spiked IS) εκχυλίστηκε πλήρως και προσδιορίστηκε με την μέθοδο LC-MS. Επομένως και τα δύο πρωτόκολλα εκχύλισης δουλεύουν. Ωστόσο, παρόλο που η μέθοδος LC-MS παρουσίασε αποδεκτά ποσοστά, η συγκέντρωση των ισοπροστανίων στα δείγματα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και του οργάνου, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να προσδιοριστούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο και οργανολογία LC-MS. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η απαιτούμενη ευαισθησία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ισοπροστανίων στο πλάσμα αίματος των εθελοντών, ο προσδιορισμός των ισοπροστανίων πραγματοποιήθηκε με μέθοδο ELISA ανταγωνιστικού τύπου, με ευαισθησία που ανέρχεται στο 1 pg/ml.

## 7.2 Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικής ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της μεθόδου ELISA πραγματοποιήθηκε στα 450 nm και η συγκέντρωση των περιεχόμενων ισοπροστανίων εκφράστηκε ως προς pg 8-isoprostane/mL. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη μέθοδο ELISA, με τη χρήση του myassays (<https://www.myassays.com/>), παρουσιάζονται στον πίνακα 7.5 και στον πίνακα 7.6. Πιο συγκεκριμένα, στον πίνακα 7.5 αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των 8-ισοπροστανίων (σε pg/mL), στην αρχή της μελέτης (t=1) και μετά από 3 μήνες (t=3) που αφορούν την ομάδα ελέγχου (control), ενώ στον πίνακα 7.6 οι συγκεντρώσεις (pg/mL) της ομάδας παρέμβασης.

**Πίνακας 7.4** Συγκέντρωση ισοπροστανίων στα δείγματα πλάσματος (ομάδα ελέγχου), όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA

Ομάδα ελέγχου (control)	Συγκέντρωση 8-ισοπροστανίων (pg/mL)	
	t1	t3
MUSH21	379,3	226,9
MUSH22	788,3	44,9

MUSH41	82,8	1473,0
MUSH42	1173,0	1098,0
MUSH43	900,2	3790,0
MUSH64	24,0	44,9
MUSH103	155,8	832,9
MUSH108	1180,0	408,2
MUSH109	1129,0	4425,0
MUSH110	1459,0	9767,0*
MUSH112	3789,0	2611,0
MUSH115	26,1	75,4
MUSH117	187,9	534,2
MUSH120	1385,0	412,3
MUSH122	12,0	44,9
MUSH123	25,6	115,7
MUSH127	475,9	44,9
MUSH128	240,8	76,2
MUSH130	1690,0	8598,0*
MUSH133	7148,0*	1366,0

\* Οι τιμές των συγκεντρώσεων βρίσκονται εκτός της καμπύλης αναφοράς

Με κόκκινο χρώμα αναγράφονται τα δείγματα που παρουσίασαν χαμηλότερη συγκέντρωση IsoP στην t3.

Από τα είκοσι δείγματα ελέγχου τα επτά, τα οποία σημειώνονται με κόκκινο χρώμα, παρουσίασαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ισοπροστανία στους 3 μήνες. Ωστόσο, η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ισοπροστανία φαίνεται να διαφέρει σημαντικά, χωρίς να παρουσιάζει σαφή τάση μείωσης ή αύξησης, μεταξύ της χρονικής περιόδου t1 και t3.

**Πίνακας 7.5** Συγκέντρωση ισοπροστανίων στα δείγματα πλάσματος (ομάδα παρέμβασης), όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA

Ομάδα παρέμβασης	Συγκέντρωση 8-ισοπροστανίων (pg/mL)	
	t1	t3
MUSH01	185,1	721,3
MUSH02	1503,0	785,5
MUSH07	14,4	34,3
MUSH08	30,9	26,9
MUSH09	284,8	282,3
MUSH14	202,2	15,4
MUSH16	14,4	71,5
MUSH17	24,8	10,6
MUSH18	1697,0	4037,0
MUSH20	171,5	90,7
MUSH23	24,4	216,7
MUSH27	4352,0	1460,0
MUSH28	1014,0	2069,0
MUSH31	3517,0	8106*

MUSH32	15800*	6927*
MUSH33	5715*	2870,0
MUSH34	1325,0	8526,0
MUSH45	15,4	43,7
MUSH46	77,7	46,6

\* Οι τιμές των συγκεντρώσεων βρίσκονται εκτός της καμπύλης αναφοράς

Με **κίτρινο** χρώμα αναγράφονται τα δείγματα που παρουσίασαν **υψηλότερη** συγκέντρωση IsoP στην t3.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.6, σχεδόν τα μισά από τα δείγματα της ομάδας παρέμβασης (σημειωμένα με κίτρινο χρώμα), παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα ισοπροστανίων στην χρονική περίοδο t3 σε σχέση με την t1.

Ύστερα από σύγκριση των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου και της ομάδας παρέμβασης στην χρονική περίοδο t3, δεν ήταν εφικτό να εξαχθεί σαφές συμπέρασμα σχετικά με την επίδραση της διατροφικής παρέμβασης (ενισχυμένου σνακ μανιταριών) στην περιεκτικότητα των ισοπροστανίων. Γενικά, η συγκέντρωση των ισοπροστανίων φαίνεται να μην εξαρτάται από τη πρόσληψη του σνακ μανιταριών, καθώς δεν παρατηρείται μείωση του περιεχόμενου τους στο σύνολο ή την πλειοψηφία των δειγμάτων παρέμβασης. Επιπλέον, η συγκέντρωσή τους φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από άλλους ανθρωπομετρικούς και βιοχημικούς παράγοντες, όπως το φύλο, η ηλικία, ο τύπος μεταβολικού συνδρόμου, κ.α.

Να σημειωθεί, πως κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ένας πιθανός συσχετισμός των επιπέδων της βιταμίνης D2 και των ισοπροστανίων στο πλάσμα των εθελοντών που συμμετείχαν στην ομάδα παρέμβασης (Kleftaki et al., 2022). Πιο συγκεκριμένα, εθελοντές που παρουσίασαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα βιταμίνης D2 στο σημείο t3 της κλινικής μελέτης (π.χ τα δείγματα MUSH32, MUSH20, MUSH17 και MUSH8), εμφάνισαν μείωση των περιεχόμενων ισοπροστανίων. Αντιθέτως, μια ελαφριά ή καθόλου αύξηση της βιταμίνης D2 παρατηρήθηκε σε ορισμένα δείγματα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε ισοπροστανία στην t3 (MUSH18, MUSH34, MUSH45, MUSH 01).



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα λειτουργικά τρόφιμα έχουν δικαίως προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια καθώς έχουν καθοριστικό ρόλο στην πρόληψη και αντιμετώπιση μεταβολικών διαταραχών όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπέρταση. Στην ομάδα των λειτουργικών τροφίμων ανήκουν και τα βρώσιμα μανιτάρια, καθώς έχουν μεγάλη διατροφική αξία και αποτελούν πηγή ποικίλων βιοδραστικών ενώσεων, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιυπεργλυκαιμικές, αντιυπερτασικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Στην κλινική αυτή μελέτη, ερευνήθηκε η επίδραση του ενισχυμένου με βιταμίνη D<sub>2</sub> σνακ μανιταριού *Pleurotus eryngii* σε παραμέτρους που σχετίζονται με μεταβολικά σύνδρομα. Μια από αυτές τις παραμέτρους είναι και το οξειδωτικό στρες. Προκειμένου να εκτιμηθεί ο βαθμός του οξειδωτικού στρες, κατά τη διάρκεια της κλινικής μελέτης μετρήθηκαν ορισμένοι βιοδείκτες όπως τα ισοπροστανία, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF)- $\alpha$ , η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (oxLDL) κ.α. Η εργασία αυτή επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό των ισοπροστανίων.

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα, δεν υπάρχει στατιστικά μεγάλη διαφορά ( $p\text{-value} \geq 0,05$ ) στη συγκέντρωση των ισοπροστανίων μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας παρέμβασης. Το αποτέλεσμα αυτό, έρχεται σε συμφωνία με τα λεγόμενα των J. van 't Erve et al. (2017) οι οποίοι υποστήριξαν ότι άτομα με μεταβολικά σύνδρομα εμφανίζουν πολύ μικρή αύξηση των ισοπροστανίων σε σχέση με τα υγιή άτομα. Έντονη αύξηση παρατηρείται μόνο σε περιπτώσεις εγκυμοσύνης, παθήσεις του πεπτικού συστήματος, έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, λοιμώδη νοσήματα, διαταραχές της αναπνευστικής οδού, εκ γενετής νοσήματα και ουρογεννητικές παθήσεις.

Με την καθημερινή κατανάλωση του σνακ για 3 μήνες, η βιταμίνη 25(OH)D<sub>2</sub> αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα παρέμβασης (Kleftaki et al., 2022). Τα αυξημένα επίπεδα της βιταμίνης D<sub>2</sub>, είναι πιθανό να επηρεάζουν και τα επίπεδα των ισοπροστανίων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως εθελοντές με σημαντικά αυξημένα επίπεδα βιταμίνης D<sub>2</sub> στο σημείο t<sub>3</sub> της κλινικής μελέτης, εμφάνισαν μείωση των περιεχόμενων ισοπροστανίων. Παρόμοιο αποτέλεσμα βρέθηκε και στην μελέτη των Makariou et al. (2019). Στην μελέτη αυτή, τα 8-ισοπροστανία μειώθηκαν κατά 22,7% σε ενήλικα άτομα με μεταβολικό σύνδρομο τα οποία είχαν καταναλώσει καθημερινά για 3 μήνες συμπλήρωμα 25(OH)D και είχαν λάβει διατροφικές οδηγίες. Στα άτομα αυτά, τα επίπεδα της βιταμίνης D είχαν αυξηθεί κατά 90% στο τέλος της παρέμβασης. Αντίστοιχο αποτέλεσμα παρουσίασε και η μελέτη των Grunwald et al. (2016) καθώς τα ισοπροστανία μειώθηκαν σε μεγάλο βαθμό ύστερα από θεραπεία με βιταμίνη D για 3 μήνες σε άτομα που είχαν έλλειψη ή/και ανεπάρκεια σε αυτή. Η βιταμίνη E μπορεί επίσης να μειώσει τα ισοπροστανία σε υπέρβαρα άτομα σύμφωνα με

τους Sutherland et al. (2012). Μετά από 6 μήνες κατανάλωσής της, η βιταμίνη E είχε αυξηθεί κατά 76% και τα ισοπροστανία είχαν μειωθεί κατά 11%. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και με την βιταμίνη C καθώς ύστερα από ημερήσια κατανάλωσή της για 2 μήνες, παρατηρήθηκε μείωση των ισοπροστανίων σε καπνιστές (Dietrich et al., 2002). Σε αντίθεση με όλες αυτές τις μελέτες, έρχονται τα αποτελέσματα των Calvo et al. (2016) καθώς και των Makariou et al. (2020). Οι Calvo et al., δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στα επίπεδα των ισοπροστανίων σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο και γενετική προδιάθεση για ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακής νόσου, ύστερα από κατανάλωση βιταμίνης D από το μανιτάρι *Agaricus bisporus*. Αντίστοιχα στην μελέτη των Makariou et al. (2020), τα επίπεδα των ισοπροστανίων ήταν αμετάβλητα σε παχύσαρκους έφηβους που είχαν καταναλώσει βιταμίνη D για 3 μήνες. Τα αποτελέσματα της δημοσίευσης αυτής είναι αντικρουόμενα με τα αποτελέσματα που δημοσίευσε η ίδια ερευνητική ομάδα το 2019, όπως φαίνεται από αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Αυτό ίσως να οφείλεται στην διαφορά ηλικίας των εθελοντών (έφηβοι έναντι ενηλίκων), στην παθολογία (παχυσαρκία και έλλειψη βιταμίνης D έναντι μεταβολικού συνδρόμου) ή/και στο αν παρέχονται επιπλέον διατροφικές οδηγίες στους εθελοντές.

Έτσι, η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων βιταμίνης D και των ισοπροστανίων μπορεί να εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η ηλικία και η κατάσταση της υγείας των εθελοντών, η δόση και η διάρκεια χορήγησης βιταμίνης D και η παρουσία άλλων διατροφικών παραγόντων αλλά και παραγόντων που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής. Γενικά, τα διαθέσιμα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η σημαντική αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης D ύστερα από παρέμβαση, μπορεί να είναι ευεργετική για τη μείωση των επιπέδων ισοπροστανίων σε ορισμένους πληθυσμούς, όπως σε ενήλικες με μεταβολικό σύνδρομο.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη υπάρχει πιθανότητα συσχέτισης των επιπέδων της βιταμίνης D2 και των ισοπροστανίων στο πλάσμα των εθελοντών που συμμετείχαν στην ομάδα παρέμβασης. Επιπλέον, παρόλο που δεν μπορεί να διεξαχθεί σαφές συμπέρασμα για την επίδραση του σνακ μέσω της μέτρησης των επιπέδων των ισοπροστανίων, μπορεί να διεξαχθεί με τους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής IL-6 και oxLDL. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση της IL-6 και της oxLDL στην ομάδα παρέμβασης σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (Kleftaki et al., 2022). Το γεγονός αυτό επιδεικνύει ότι το ενισχυμένο με βιταμίνη D2 σνακ *Pleurotus eryngii* έχει την δυνατότητα να ρυθμίσει τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε άτομα με μεταβολικά σύνδρομα. Επομένως είναι πιθανό να κατέχει αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις και κατά της παχυσαρκίας ιδιότητες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική βιβλιογραφία/ πτυχιακές/ μεταπτυχιακές εργασίες

1. Αντωνακάκη Μ. (2017). Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού της α-τοκοφερόλης με HPLC σε υπόστρωμα αίματος επίμυων και εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα (Διπλωματική εργασία). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
2. Γιανακοπούλου, Ε. (2007). Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί: Κλινική σημασία. *Αρχεία ελληνικής ιατρικής* 2009, 26(1), 23-35. <http://www.mednet.gr/archives/2009-1/23per.html>
3. Ντουνούση, Ε. Χ., Τσελέπης, Ξ., & Σιαμόπουλος, Κ. Χ. (2009). Οξειδωτικό στρες, μηχανισμοί δράσης και ο ρόλος του στη χρόνια νεφρική νόσο. *Ελληνική Νεφρολογία - Hellenic Nephrology*, 21(1), Art. 1. [https://www.ene.gr/eneojs\\_new/index.php/en/article/view/107](https://www.ene.gr/eneojs_new/index.php/en/article/view/107)
4. Πολυχρονάκη Γ. (2019). Χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων από υποπροϊόντα βιομηχανίας ροδάκινων (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία). Πανεπιστήμιο Πατρών.

### Ξένη βιβλιογραφία

1. Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
2. Alhajj, M., & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
3. Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Busco, F., Quiles, J. L., Cordero, M. D., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.002>
4. Aranha, L. N., Silva, M. G., Uehara, S. K., Luiz, R. R., Nogueira Neto, J. F., Rosa, G., & Moraes de Oliveira, G. M. (2020). Effects of a hypoenergetic diet associated with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp consumption on antioxidant status, oxidative stress and inflammatory biomarkers in overweight, dyslipidemic individuals. *Clinical Nutrition*, 39(5), 1464–1469. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.06.008>

5. Aszyk, J., Kot, J., Tkachenko, Y., Woźniak, M., Bogucka-Kocka, A., & Kot-Wasik, A. (2017). Novel liquid chromatography method based on linear weighted regression for the fast determination of isoprostane isomers in plasma samples using sensitive tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography B*, *1051*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.021>
6. Baraldi, E., Ghiso, L., Piovan, V., Carraro, S., Ciabattoni, G., Barnes, P. J., & Montuschi, P. (2003). Increased Exhaled 8-Isoprostane in Childhood Asthma. *Chest*, *124*(1), 25–31. <https://doi.org/10.1378/chest.124.1.25>
7. Barden, A. E., Mori, T. A., Dunstan, J. A., Taylor, A. L., Thornton A., C. A., Croft, K. D., Beilin, L. J., & Prescott, S. L. (2004). Fish oil supplementation in pregnancy lowers F2-isoprostanes in neonates at high risk of atopy. *Free Radical Research*, *38*(3), 233–239. Scopus. <https://doi.org/10.1080/10715760310001656722>
8. Block, G., Jensen, C. D., Morrow, J. D., Holland, N., Norkus, E. P., Milne, G. L., Hudes, M., Dalvi, T. B., Crawford, P. B., Fung, E. B., Schumacher, L., & Harmatz, P. (2008). The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radical Biology and Medicine*, *45*(4), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.005>
9. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J. (Jr), & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, *142*, w13659. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
10. Brys, M., Morel, A., Forma, E., Krzeslak, A., Wilkosz, J., Rozanski, W., & Olas, B. (2013). Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *372*(1), 149–153. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1455-z>
11. Bulam, S., Üstün, N., & Peksen, A. (2018). *Edible Wild Mushroom Antioxidants*.
12. Calabrese, V., Mancuso, C., Sapienza, M., Puleo, E., Calafato, S., Cornelius, C., Finocchiaro, M., Mangiameli, A., Di Mauro, M., Stella, A. M. G., & Castellino, P. (2007). Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress & Chaperones*, *12*(4), 299–306. <https://doi.org/10.1379/CSC-270.1>
13. Calvo, M. S., Mehrotra, A., Beelman, R. B., Nadkarni, G., Wang, L., Cai, W., Goh, B. C., Kalaras, M. D., & Uribarri, J. (2016). A Retrospective Study in Adults with Metabolic Syndrome: Diabetic Risk Factor Response to Daily Consumption of *Agaricus bisporus* (White Button Mushrooms). *Plant Foods for Human Nutrition*, *71*(3), 245–251. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0552-7>

14. Chatterjee, S. (2016). Chapter Two—Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In T. Dziubla & D. A. Butterfield (Eds.), *Oxidative Stress and Biomaterials* (pp. 35–58). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4>
15. Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292–299. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x>
16. Chhikara, N., & Panghal, A. (2022). Overview of Functional Foods. In *Functional Foods* (pp. 1–20). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119776345.ch1>
17. Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2015). Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy*, 66(3). <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00137>
18. Da Silva, M. S., Bilodeau, J.-F., Julien, P., & Rudkowska, I. (2017). Dietary fats and F2-isoprostanes: A review of the clinical evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3929–3941. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1196646>
19. Dietrich, M., Block, G., Hudes, M., Morrow, J. D., Norkus, E. P., Traber, M. G., Cross, C. E., & Packer, L. (2002). Antioxidant Supplementation Decreases Lipid Peroxidation Biomarker F2-isoprostanes in Plasma of Smokers<sup>1</sup>. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11(1), 7–13.
20. Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., & Cámara, M. (2020). The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1738–1746. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1592107>
21. Elkhateeb, W. A., Daba, G. M., Thomas, P. W., & Wen, T.-C. (2019). Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 18(2), 88–101. [https://doi.org/10.4103/epj.epj\\_17\\_19](https://doi.org/10.4103/epj.epj_17_19)
22. Feillet-Coudray, C., Choné, F., Michel, F., Rock, E., Thiéblot, P., Rayssiguier, Y., Tauveron, I., & Mazur, A. (2002). Divergence in plasmatic and urinary isoprostane levels in type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 324(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00213-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00213-9)
23. Frost-Pineda, K., Liang, Q., Liu, J., Rimmer, L., Jin, Y., Feng, S., Kapur, S., Mendes, P., Roethig, H., & Sarkar, M. (2011). Biomarkers of Potential Harm Among Adult Smokers and Nonsmokers in the Total Exposure Study. *Nicotine & Tobacco Research*, 13(3), 182–193. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntq235>

24. *Functional Foods Market Size | Growth & Trends—Industry Report, 2030*. (n.d.). Visiongain. Retrieved 14 January 2023, from <https://www.visiongain.com/report/functional-foods-market-report-2020-2030/>
25. Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, 25(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
26. Galvão, I., Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Machado, M. G., & Sousa, L. P. (2018). Mediators of Inflammation. In C. Riccardi, F. Levi-Schaffer, & E. Tiligada (Eds.), *Immunopharmacology and Inflammation* (pp. 3–32). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77658-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77658-3_1)
27. Grunwald, T., Fadia, S., Bernstein, B., Naliborski, M., Wu, S., & Luca, F. D. (2017). Vitamin D supplementation, the metabolic syndrome and oxidative stress in obese children. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 30(4), 383–388. <https://doi.org/10.1515/jpem-2016-0211>
28. Ha, J. W., Kim, J., Kim, H., Jang, W., & Kim, K. H. (2020). Mushrooms: An Important Source of Natural Bioactive Compounds. *Natural Product Sciences*, 26(2).
29. Hansel, B., Giral, P., Nobecourt, E., Chantepie, S., Bruckert, E., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2004). Metabolic Syndrome Is Associated with Elevated Oxidative Stress and Dysfunctional Dense High-Density Lipoprotein Particles Displaying Impaired Antioxidative Activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(10), 4963–4971. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0305>
30. Henry, C. J. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.101>
31. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, e7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
32. Javanbakht, M. H., Mohammady, H., Fooladsaz, K., Razzaghi, M., Zarei, M., & Djalali, M. (2016). Are Serum Levels of F2-Isoprostane and Oxidized-LDL Related to Vitamin D Status in Type 2 Diabetic Patients? A Case-Control Study. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 5(1), 26–32.

33. Kahal, H., Halama, A., Aburima, A., Bhagwat, A. M., Butler, A. E., Graumann, J., Suhre, K., Sathyapalan, T., & Atkin, S. L. (2020). Effect of induced hypoglycemia on inflammation and oxidative stress in type 2 diabetes and control subjects. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61531-z>
34. Karelakis, C., Zevgitis, P., Galanopoulos, K., & Mattas, K. (2020). Consumer Trends and Attitudes to Functional Foods. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing*, *32*(3), 266–294. <https://doi.org/10.1080/08974438.2019.1599760>
35. Kathir, K., Dennis, J. M., Croft, K. D., Mori, T. A., Lau, A. K., Adams, M. R., & Stocker, R. (2010). Equivalent lipid oxidation profiles in advanced atherosclerotic lesions of carotid endarterectomy plaques obtained from symptomatic type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(3), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.006>
36. Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, *20*(4), 861. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>
37. Keaney, J. F., Larson, M. G., Vasan, R. S., Wilson, P. W. F., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J. M., Sutherland, P., Vita, J. A., & Benjamin, E. J. (2003). Obesity and Systemic Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *23*(3), 434–439. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>
38. Kleftaki, S.-A., Amerikanou, C., Gioxari, A., Lantzouraki, D. Z., Sotiroudis, G., Tsiantas, K., Tsiaka, T., Tagkouli, D., Tzavara, C., Lachouvaris, L., Zervakis, G. I., Kalogeropoulos, N., Zoumpoulakis, P., & Kaliora, A. C. (2022). A Randomized Controlled Trial on *Pleurotus eryngii* Mushrooms with Antioxidant Compounds and Vitamin D2 in Managing Metabolic Disorders. *Antioxidants*, *11*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/antiox11112113>
39. Lakey-Beitia, J., Berrocal, R., Rao, K. S., & Durant, A. A. (2015). Polyphenols as Therapeutic Molecules in Alzheimer's Disease Through Modulating Amyloid Pathways. *Molecular Neurobiology*, *51*(2), 466–479. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8722-9>
40. Larose, J., Julien, P., & Bilodeau, J.-F. (2013). Analysis of F2-isoprostanes in plasma of pregnant women by HPLC-MS/MS using a column packed with core-shell particles. *Journal of Lipid Research*, *54*(5), 1505–1511. <https://doi.org/10.1194/jlr.D034553>
41. Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, *224*, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>



42. Makariou, S. E., Challa, A., Siomou, E., Tellis, C., Tselepis, A., Elisaf, M., & Liberopoulos, E. (2020). Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in Greek adolescents with obesity – the effect of vitamin D supplementation: A pilot study. *Archives of Medical Science – Atherosclerotic Diseases*, 5(1), 64–71. <https://doi.org/10.5114/amsad.2020.95569>
43. Makariou, S. E., Elisaf, M., Challa, A., Tellis, C., Tselepis, A. D., & Liberopoulos, E. N. (2019). Effect of combined vitamin D administration plus dietary intervention on oxidative stress markers in patients with metabolic syndrome: A pilot randomized study. *Clinical Nutrition ESPEN*, 29, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.10.004>
44. Martínez-Medina, G. A., Chávez-González, M. L., Verma, D. K., Prado-Barragán, L. A., Martínez-Hernández, J. L., Flores-Gallegos, A. C., Thakur, M., Srivastav, P. P., & Aguilar, C. N. (2021). Bio-functional components in mushrooms, a health opportunity: Ergothionine and huitlacoche as recent trends. *Journal of Functional Foods*, 77, 104326. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104326>
45. Milne, G. L., Dai, Q., & Roberts, L. J. (2015). The isoprostanes—25 years later. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 433–445. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.007>
46. Montine, T. J., Shinobu, L., Montine, K. S., Roberts II, L. J., Kowall, N. W., Beal, M. F., & Morrow, J. D. (2000). No difference in plasma or urinary F2-isoprostanes among patients with Huntington's disease or Alzheimer's disease and controls. *Annals of Neurology*, 48(6), 950–950. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200012\)48:6<950::AID-ANA23>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200012)48:6<950::AID-ANA23>3.0.CO;2-F)
47. Morrow, J. D., Zackert, W. E., Yang, J. P., Kurhts, E. H., Callewaert, D., Dworski, R., Kanai, K., Taber, D., Moore, K., Oates, J. A., & Roberts, L. J. (1999). Quantification of the Major Urinary Metabolite of 15-F2t-Isoprostane (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) by a Stable Isotope Dilution Mass Spectrometric Assay. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 326–331. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4008>
48. Nälsén, C., Vessby, B., Berglund, L., Uusitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G., Rivellese, A., Storlien, L., Erkkilä, A., Ylä-Herttuala, S., Tapsell, L., & Basu, S. (2006). Dietary (n-3) fatty acids reduce plasma F2-isoprostanes but not prostaglandin F2 $\alpha$  in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 136(5), 1222–1228. Scopus. <https://doi.org/10.1093/jn/136.5.1222>
49. Obata, T., Tomaru, K., Nagakura, T., Izumi, Y., & Kawamoto, T. (2000). Smoking and oxidant stress: Assay of isoprostane in human urine by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 746(1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00182-1)



50. Pogorzelska-Nowicka, E., Atanasov, A. G., Horbańczuk, J., & Wierzbicka, A. (2018). Bioactive Compounds in Functional Meat Products. *Molecules*, 23(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules23020307>
51. Praticò, D., Clark, C. M., Liun, F., Lee, V. Y.-M., & Trojanowski, J. Q. (2002). Increase of Brain Oxidative Stress in Mild Cognitive Impairment: A Possible Predictor of Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 59(6), 972–976. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.6.972>
52. Raszeja-Wyszomirska, J., Safranow, K., Milkiewicz, M., Milkiewicz, P., Szykowska, A., & Stachowska, E. (2012). Lipidic last breath of life in patients with alcoholic liver disease. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 99(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.06.001>
53. Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>
54. Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.010>
55. Roberts, L. J., Oates, J. A., Linton, M. F., Fazio, S., Meador, B. P., Gross, M. D., Shyr, Y., & Morrow, J. D. (2007). The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(10), 1388–1393. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.019>
56. Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., Guichard, C., & Bächler, J. P. (2007). Relationship between Oxidative Stress and Essential Hypertension. *Hypertension Research*, 30(12), Article 12. <https://doi.org/10.1291/hypres.30.1159>
57. Salehi, F. (2019). Characterization of different mushrooms powder and its application in bakery products: A review. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1375–1385. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1650765>
58. Sánchez, C. (2017). Bioactives from Mushroom and Their Application. In M. Puri (Ed.), *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications* (pp. 23–57). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4_2)

59. Siegrist, M., Shi, J., Giusto, A., & Hartmann, C. (2015). Worlds apart. Consumer acceptance of functional foods and beverages in Germany and China. *Appetite*, *92*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.05.017>
60. Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. *Food Chemistry*, *206*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.033>
61. Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, *51*(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>
62. Sutherland, W. H. F., Manning, P. J., Walker, R. J., De Jong, S. A., Ryalls, A. R., & Berry, E. A. (2007). Vitamin E Supplementation and Plasma 8-Isoprostane and Adiponectin in Overweight Subjects. *Obesity*, *15*(2), 386–391. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.546>
63. Topolska, K., Florkiewicz, A., & Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105327>
64. Traustadóttir, T., Davies, S. S., Stock, A. A., Su, Y., Heward, C. B., Roberts, L. J., II, & Harman, S. M. (2009). Tart Cherry Juice Decreases Oxidative Stress in Healthy Older Men and Women. *The Journal of Nutrition*, *139*(10), 1896–1900. <https://doi.org/10.3945/jn.109.111716>
65. Üstün, N., Bulam, S., & Peksen, A. (2018, June 27). *The Use of Mushrooms and Their Extracts and Compounds in Functional Foods and Nutraceuticals*.
66. van 't Erve, T. J., Kadiiska, M. B., London, S. J., & Mason, R. P. (2017). Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human diseases: A meta-analysis. *Redox Biology*, *12*, 582–599. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.024>
67. Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., & Gargano, M. L. (2021). Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22020634>
68. Ward, N. C., Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Mori, T. A., Beilin, L. J., & Croft, K. D. (2004). Oxidative stress in human hypertension: Association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(2), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.021>

69. Welsh, J. L., Wagner, B. A., van't Erve, T. J., Zehr, P. S., Berg, D. J., Halfdanarson, T. R., Yee, N. S., Bodeker, K. L., Du, J., Roberts, L. J., Drisko, J., Levine, M., Buettner, G. R., & Cullen, J. J. (2013). Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): Results from a phase I clinical trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(3), 765–775. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2070-8>
70. Zanconato, S., Carraro, S., Corradi, M., Alinovi, R., Pasquale, M. F., Piacentini, G., Zacchello, F., & Baraldi, E. (2004). Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.10.046>

#### Διαδικτυακές πηγές

1. <https://www.manitariadirfis.gr/>
2. <https://www.myassays.com/>
3. [https://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/8-isoprostane-ELISA-Kit-protocol-book-v10e-ab175819%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/8-isoprostane-ELISA-Kit-protocol-book-v10e-ab175819%20(website).pdf)