



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ: «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

**“Η εκτίμηση της επίδρασης του κεφίρ στο
οξειδωτικό στρες ενήλικων ατόμων”**

Χύτα Μαριάννα

Λάρισα 2023

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**«Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΦΙΡ
ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ
ΑΤΟΜΩΝ»**

THESIS TITLE:

**«THE EFFECT OF KEFIR CONSUMPTION ON
OXIDATIVE STRESS IN ADULTS»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τζιαμούρτας Αθανάσιος (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής στο γνωστικό αντικείμενο «Βιοχημεία της άσκησης», Τμήμα Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Γεωργακούλη Καλλιόπη: Επίκουρη Καθηγήτρια στο γνωστικό αντικείμενο «Κλινική Διατροφή και Άσκηση για Εθιστικές Καταστάσεις», Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Μάρτιο του 2023 μέχρι τον Ιούλιο του 2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου και επιβλέποντα της διπλωματικής μου διατριβής κ. Τζιαμούρτα Αθανάσιο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την συγκεκριμένη εργασία, καθώς και για την βοήθεια του όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τη κ. Γεωργακούλη Καλλιόπη για την πολύτιμη βοήθεια της και την συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και τη φιλική τους διάθεση.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου, στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Γεωργία, και στις αδελφές μου, Νικολέτα και Σοφία, καθώς χάρη στην αμέριστη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την ατέρμονη ενθάρρυνση τους όλα αυτά τα χρόνια κατάφερα να ολοκληρώσω τόσο τις προπτυχιακές όσο και τις μεταπτυχιακές σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση του κεφίρ έχει αυξηθεί σημαντικά. Πρόκειται για ένα γαλακτοκομικό προϊόν ευρέως διαδεδομένο σε διάφορες χώρες κυρίως λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του. Η κατανάλωση του κεφίρ έχει πολλά σημαντικά οφέλη για την υγεία και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών, στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού, στην ομαλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος, καθώς επίσης, παρουσιάζει και αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να εξετασθεί η επίδραση του κεφίρ στο οξειδωτικό στρες ενήλικων ατόμων. Σε μία τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή με εικονικό συμπλήρωμα, διασταυρούμενη μελέτη συμμετείχαν εθελοντικά 17 ενήλικα υγιή άτομα, ηλικίας 20-60 ετών. Η χρονική διάρκεια του κεφίρ ή του εικονικού συμπληρώματος ήταν 2 εβδομάδες, ενώ υπήρξαν 2 εβδομάδες έκπλυσης μεταξύ των 2 καταστάσεων. Η ποσότητα του κεφίρ ή του εικονικού σκευάσματος που καταναλώθηκε από κάθε άτομο καθορίστηκε σε 300ml/ημέρα. Σε κάθε επίσκεψη των συμμετεχόντων στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές (βάρος, ύψος, δείκτης μάζας σώματος, περιφέρειες μέσης και ισχύου), φυσιολογικές μετρήσεις (συστολική, διαστολική και μέση αρτηριακή πίεση, καρδιακή συχνότητα, διπλό γινόμενο), μετρήσεις απόδοσης (μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου, ευλυγισία, δύναμη χειρολαβής), ενώ λήφθηκαν δείγματα αίματος με σκοπό τη μέτρηση αιματολογικών (γενική αίματος) και παραμέτρων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (καταλάση, ολική αντιοξειωτική ικανότητα, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ).

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της συνθήκης [$F(1, 32) = 8.92, p = .005$] στη διαστολική πίεση. Εξέταση των ζευγαρωτών συγκρίσεων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < .005$) της διαστολικής πίεσης μόνο μετά την κατανάλωση του κεφίρ. Επιπλέον, μετά από την κατανάλωση κεφίρ φάνηκε ότι η διαστολική πίεση ήταν σημαντικά μικρότερη ($p < .05$) σε σύγκριση με την κατανάλωση εικονικού σκευάσματος. Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της συνθήκης [$F(1, 32) = 4.52, p = .041$] στη μέση αρτηριακή πίεση. Εξέταση των ζευγαρωτών συγκρίσεων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < .05$) της μέσης

αρτηριακής πίεσης μετά την κατανάλωση κεφίρ. Τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της συνθήκης [$F(1, 32) = 6.99, p = 0,013$], καθώς και στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου [$F(1, 32) = 4.63, p = 0,039$] στην ολική χολερυθρίνη. Εξέταση των ζευγαρωτών συγκρίσεων έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < .005$) της ολικής χολερυθρίνης μόνο μετά την κατανάλωση του κεφίρ. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης υποδεικνύουν πως η βραχύχρονη κατανάλωση κεφίρ μπορεί να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στην αρτηριακή πίεση.

Λέξεις κλειδιά: κεφίρ, αρτηριακή πίεση, οξειδωτικό στρες, αντιοξειδωτική άμυνα

ABSTRACT

In recent years the consumption of kefir has increased significantly. Kefir is a dairy product that is widely consumed in various countries, mainly due to its beneficial health properties. The consumption of kefir has many important health benefits and plays an important role in the treatment of various diseases, in boosting the immune system and in the proper function of gastrointestinal system. Also, kefir consumption has anti-cancer, antimicrobial and antioxidant properties.

The aim of this study was to evaluate the effect of kefir on the oxidative stress in adults. For this purpose, 17 healthy adults aged 20-60 of both sexes participated voluntarily in this study. A randomized, double blinded, placebo-controlled design was followed with subjects receiving either the kefir or placebo for two weeks. A two-week wash-out period between treatments was allowed. The amount of kefir or placebo consumed by each subject was 300 ml per day. Anthropometric (weight, height, body mass index, waist and hip circumferences), physiological (systolic, diastolic and mean arterial pressure, heart rate, double product), performance (maximal oxygen consumption, flexibility, hand grip dynamometry) measurements were performed and blood sampling was carried out prior to and after the end of each supplementation period to assess indices of the complete blood count and oxidative stress (catalase, total antioxidant capacity, bilirubin, uric acid, TBARS).

Results showed a significant interaction between time and condition [$F(1, 32) = 8.92, p = .005$] on diastolic blood pressure. Post hoc analysis revealed a significant decrease ($p < .005$) in diastolic blood pressure following kefir consumption. Furthermore, there was a significant interaction between time and condition [$F(1, 32) = 4.52, p = .041$] on mean arterial pressure. Post hoc analysis revealed a significant decrease ($p < .005$) in mean arterial pressure following kefir consumption. Finally, there was a significant interaction between time and condition [$F(1, 32) = 6.99, p = 0.013$], and a significant effect of time [$F(1, 32) = 4.63, p = 0.039$] on total bilirubin. Post hoc analysis revealed a significant decrease ($p < .005$) in total bilirubin following kefir consumption. In conclusion, the results from the present study indicate that short term kefir consumption may lead to significant changes in blood pressure.

Key words: kefir, blood pressure, oxidative stress, antioxidant defence

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ – ΕΙΚΟΝΩΝ - ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Κατάλογος πινάκων:

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές Οξυγόνου	16
Πίνακας 2: Δραστικές μορφές Αζώτου	16
Πίνακας 3: Βακτηριακή μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ	35
Πίνακας 4: Κατηγορίες ζυμομυκήτων στους κόκκους κεφίρ	36
Πίνακας 5: Ανθρωπομετρικές και φυσιολογικές παράμετροι PPIN και META την κατανάλωση κεφίρ (K) και εικονικού φαρμάκου (PL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO±TA	53
Πίνακας 6: Παράμετροι φυσικής κατάστασης PPIN και META την κατανάλωση κεφίρ (K) και εικονικού φαρμάκου (PL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO±TA...	54
Πίνακας 7: Παράμετροι εξέτασης γενικής αίματος PPIN και META την κατανάλωση κεφίρ (K) και εικονικού φαρμάκου (PL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO±TA	55
Πίνακας 8: Παράμετροι οξειδοαναγωγικής κατάστασης PPIN και META την κατανάλωση κεφίρ (K) και εικονικού φαρμάκου (PL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως MO±TA	56

Κατάλογος εικόνων:

Εικόνα 1: Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών (Halliwell et al, 2015)	17
Εικόνα 2: Απεικόνιση της καταστροφής φυσιολογικού κυττάρου από το οξειδωτικό στρες	18
Εικόνα 3: Απεικόνιση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας (Saxena et al, 2019).....	20
Εικόνα 4: Απεικόνιση της δράσης των αντιοξειδωτικών ως δότες ηλεκτρονίων, προκειμένου να ανάγουν και να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες (Kaplan et al, 2001).	24
Εικόνα 5: Απεικόνιση της δομής της βιταμίνης E (Halliwell & Gutteridge, 2015).....	28
Εικόνα 6: Απεικόνιση της δομής της βιταμίνης C (Halliwell & Gutteridge, 2015)	28
Εικόνα 7: Απεικόνιση της δομής της γλουταθειόνης (Scholz et al, 1989)	29
Εικόνα 8: Απεικόνιση των κόκκων κεφίρ	31
Εικόνα 9: Απεικόνιση της βιομηχανικής (αριστερά) και της παραδοσιακής (δεξιά) μεθόδου παραγωγής κεφίρ (Otles et al, 2003).....	33
Εικόνα 10: Κόκκοι κεφίρ (Leito et al, 2013)	34

Κατάλογος γραφημάτων:

Γράφημα 1: Απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου	44
--	----

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ – ΕΙΚΟΝΩΝ - ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	9
<i>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</i>	<i>12</i>
1.1. Ιστορική αναδρομή	12
1.2. Σημασία της έρευνας.....	12
1.3. Ερευνητικές υποθέσεις.....	13
1.4. Στατιστικές υποθέσεις	13
1.5. Περιορισμοί της έρευνας.....	13
<i>II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....</i>	<i>15</i>
2.1. ΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	15
2.1.1. Ελεύθερες ρίζες	15
2.1.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου	15
2.1.2. Παραγωγή ελεύθερων ριζών	16
2.1.3. Οξειδωτικό στρες	18
2.1.4. Κυτταρικές καταστροφές από οξειδωτικό στρες	18
2.1.4.1. Βλάβες στο DNA	19
2.1.4.2. Λιπιδική υπεροξείδωση.....	19
2.1.4.3. Βλάβες στις πρωτεΐνες	21
2.1.5. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία.....	22
2.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ	23
2.2.1. Ορισμός.....	23
2.2.2. Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών	23
2.2.3. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών	24
2.2.4. Ενδογενή αντιοξειδωτικά	24
2.2.4.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	24
2.2.4.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	26
2.2.5. Εξωγενή αντιοξειδωτικά	30

2.2.6.	Άλλα αντιοξειδωτικά	30
2.3.	ΚΕΦΙΡ	31
2.3.1.	Ορισμός του κεφίρ.....	31
2.3.2.	Παρασκευή του κεφίρ	32
2.3.3.	Δομή και μικροχλωρίδα κόκκων κεφίρ	34
2.3.4.	Χημική σύσταση.....	36
2.3.5.	Ευεργετικές ιδιότητες κεφίρ.....	37
2.3.5.1.	Οστεοπόρωση	37
2.3.5.2.	Δυσανεξία στην λακτόζη	38
2.3.5.3.	Χοληστερόλη	38
2.3.5.4.	Ρύθμιση της γλυκόζης του πλάσματος.....	38
2.3.5.5.	Υπέρταση.....	39
2.3.5.6.	Φλεγμονή	39
2.3.5.7.	Αντικαρκινικές ιδιότητες.....	39
2.3.5.8.	Αντιμικροβιακές ιδιότητες.....	40
2.3.5.9.	Αντιοξειδωτικές ιδιότητες	40
III.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	42
3.1.	Συμμετέχοντες.....	42
3.2.	Πειραματικό πρωτόκολλο	42
3.3.	Συλλογή και χειρισμός του αίματος.....	44
3.3.1.	Αναλύσεις στο πλάσμα.....	45
3.3.2.	Αναλύσεις στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	47
3.3.3.	Αναλύσεις στον ορό	48
3.4.	Στατιστική ανάλυση	52
IV.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
V.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
VI.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	62
VII.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63
VIII.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	72

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ιστορική αναδρομή

Ο όρος κεφίρ προέρχεται από τη λέξη *keyif*, η οποία είναι τούρκικης προέλευσης και υποδηλώνει την ευχάριστη αίσθηση ύστερα από την κατάποσή του (Lopitz-Otsoa et al, 2006; Tamime, 2006). Το ρόφημα του κεφίρ προέρχεται από τα Καυκάσια Όρη και πρόκειται για ένα προϊόν που καταναλώνεται εδώ και αιώνες σε μεγάλο βαθμό στη Ρωσία, στην Νοτιοδυτική Ασία και στην Ανατολική Ευρώπη (Tamime, 2006). Η προέλευση του ζυμούμενου γάλακτος ανάγεται στην αρχαιότητα, από τότε που ο άνθρωπος ξεκίνησε να καταναλώνει ζωικό γάλα. Οι Καυκάσιοι ανακάλυψαν πως η μεταφορά του φρέσκου γάλακτος σε σάκους από δέρμα ζώων οδηγούσε περιστασιακά σε ζύμωση αυτού, συντελώντας στην δημιουργία ενός ροφήματος του οποίου η διάρκεια ζωής ήταν μεγαλύτερη από εκείνη του νωπού γάλακτος (Alves et al, 2021). Προσφάτως, έχει σημειωθεί αύξηση της κατανάλωσης κεφίρ σε πολλές χώρες, λόγω των ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου και των μοναδικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του (Farnworth, 2005; Otles & Cagindi, 2003; Tamime, 2006).

Το κεφίρ είναι ένα ζυμούμενο προβιοτικό γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο έγινε δημοφιλές μεταξύ των ανθρώπων σε χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η Γαλλία, η Ιαπωνία και η Βραζιλία (Fiorda et al, 2017). Το κεφίρ παρασκευάζεται παραδοσιακά από οποιονδήποτε τύπο γάλακτος με τη χρήση κόκκων κεφίρ, μεγέθους ενός έως τεσσάρων εκατοστών σε μήκος που οπτικά μοιάζουν με κουνουπίδι ως προς το σχήμα και το χρώμα (Azizi et al, 2021).

1.2. Σημασία της έρευνας

Η ζήτηση των καταναλωτών, τα τελευταία χρόνια, για ροφήματα με βάση το κεφίρ έχει αυξηθεί ολοένα και περισσότερο λόγω των προβιοτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων του. Με τη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιείται μια προσπάθεια να διερευνηθεί αν η χορήγηση μιας αντιοξειδωτικής ουσίας που εντοπίζεται σε ένα γαλακτοκομικό προϊόν (κεφίρ) ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα υγιών ατόμων.

1.3. Ερευνητικές υποθέσεις

- i) Η χορήγηση κεφίρ θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity, TAC) και της καταλάσης (catalase, CAT).
- ii) Η χορήγηση κεφίρ θα έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως αυτή εκφράζεται με τα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric Acid Reactive Species, TBARS).
- iii) Η χορήγηση κεφίρ θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ουρικού οξέος και της χολερυθρίνης.

1.4. Στατιστικές υποθέσεις

Μηδενικές υποθέσεις

- i) Μηδενική υπόθεση ($\mu_1 = \mu_2$): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της TAC και της CAT μετά τη χορήγηση του κεφίρ.
- ii) Μηδενική υπόθεση ($\mu_1 = \mu_2$): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των TBARS μετά τη χορήγηση του κεφίρ.
- iii) Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του ουρικού οξέος και της χολερυθρίνης μετά τη χορήγηση του κεφίρ.

Εναλλακτικές υποθέσεις

- i) Εναλλακτική υπόθεση ($\mu_1 \neq \mu_2$): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της TAC και της CAT μετά τη χορήγηση του κεφίρ.
- ii) Εναλλακτική υπόθεση ($\mu_1 \neq \mu_2$): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των TBARS μετά τη χορήγηση του κεφίρ.
- iii) Εναλλακτική υπόθεση ($\mu_1 \neq \mu_2$): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του ουρικού οξέος και της χολερυθρίνης μετά τη χορήγηση του κεφίρ.

1.5. Περιορισμοί της έρευνας

Η μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά στο αίμα. Σε περίπτωση συλλογής περισσότερων βιολογικών υλικών, εκτός του αίματος, οι μετρήσεις των πειραμάτων θα ήταν πιο αντιπροσωπευτικές για την κατάσταση διαφόρων ιστών του σώματος. Επιπρόσθετα, περιοριστικό παράγοντα αποτελούν ορισμένα χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στο συγκεκριμένο πείραμα, όπως είναι η κατάσταση υγείας τους (υγιείς), το βάρος, η εθνικότητα, οι διαφορετικές συνήθειες (φυσική κατάσταση, διατροφή).

II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1. ΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

2.1.1. *Ελεύθερες ρίζες*

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (Jenkins, 1988). Αυτό προκύπτει είτε από την πρόσληψη είτε από την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική στοιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερος δραστικά και ασταθή μόρια και έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια με σκοπό να συμπληρώσουν την εξωτερική στοιβάδα σθένους τους και να αποκτήσουν μια πιο σταθερή δομή. Οι ελεύθερες ρίζες δρουν ως οξειδωτικά καθώς οξειδώνουν τα μόρια με τα οποία αντιδρούν, ενώ αυτές ανάγονται (Lobo et al, 2010).

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται μέσω του φυσιολογικού μεταβολισμού του κυττάρου. Ακολουθούν το φαινόμενο της όρμησης και έχουν διττό ρόλο. Όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αποτελούν επιβλαβή παράγοντα για τον οργανισμό, ενώ όταν υπάρχουν σε μια βέλτιστη συγκέντρωση είναι απαραίτητες σε θεμελιώδεις διεργασίες του κυττάρου (Valko et al, 2007). Για παράδειγμα συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση, στην μεταγραφή γονιδίων, στην απόκριση του κυττάρου έναντι στο στρες και σε λειτουργίες του ανοσοποιητικού όπως η αντιμετώπιση της φλεγμονής και η φαγοκυττάρωση (Durackova, 2010).

2.1.1.1. *Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου*

Οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το κεντρικό άτομο που περιέχουν. Έτσι μπορεί να ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), τις δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS), ή τις δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) (Pani et al, 2010; Sengupta et al, 2004).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στις δραστικές μορφές ανήκουν όχι μόνο ελεύθερες ρίζες αλλά και μη ρίζες.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου απαρτίζονται από τα ενδιάμεσα προϊόντα της ατελούς αναγωγής του οξυγόνου. Οι ROS δρουν ως οξειδωτικά καθώς έχουν την ικανότητα να αποσπούν ηλεκτρόνια (Vainio, 1999).

Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	Σύμβολο
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	$^1\text{O}_2$
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	$\text{OH}^\bullet$
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxyl Radical)	$\text{RO}^\bullet$
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxyl Radical)	$\text{ROO}^\bullet$
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	$\text{O}_2^\bullet$
Όζον (Ozone)	O_3
Υδροϋπεροξείδιο (Hydroperoxide)	ROOH
Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	H_2O_2

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές Οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) προέρχονται από το μονοξείδιο του αζώτου. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά τόσο με την αιμοσφαιρίνη όσο και με άλλες πρωτεΐνες και έχει την ικανότητα να επηρεάζει διάφορα βιομόρια και να συμμετέχει στο οξειδωτικό στρες (Iovine et al, 2008).

Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)	Σύμβολο
Μονοξείδιο του Αζώτου (Nitric Oxide)	$\text{NO}^\bullet$
Διοξείδιο του Αζώτου (Nitric Dioxide)	NO_2
Περοξυνιτρίτης (Peroxynitrite)	$\text{ONOO}^\bullet$
Περοξυνιτρώδες Οξύ (Peroxynitrous Acid)	ONOOH

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές Αζώτου

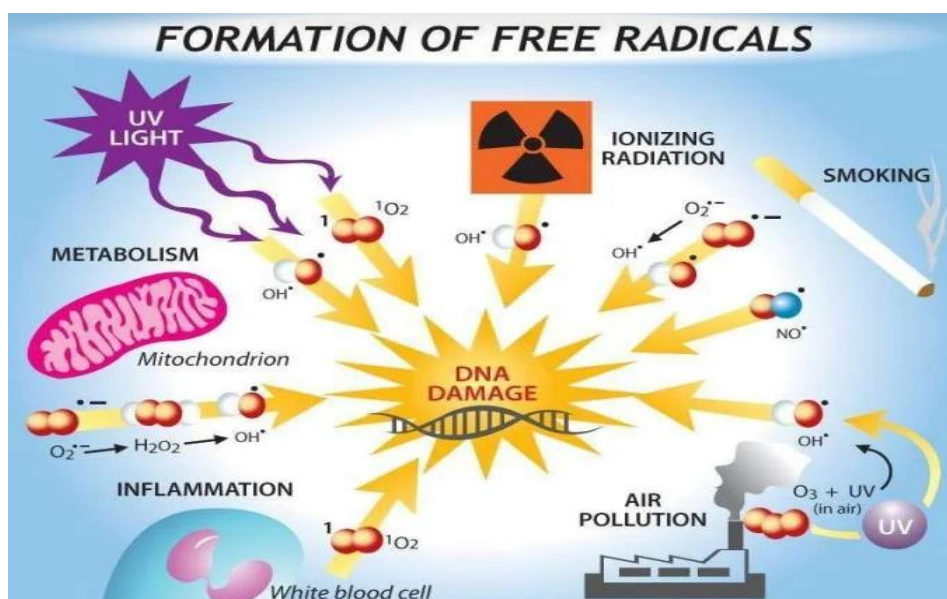
2.1.2. Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται είτε ενδογενώς, από φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, είτε εξωγενώς από διάφορους παράγοντες. Ενδογενώς, οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να παραχθούν είτε από ενζυμικές είτε από μη ενζυμικές αντιδράσεις. Το

μεγαλύτερο ποσοστό ελευθέρων ριζών μέσα στο κύτταρο παράγεται κατά την διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Κατά την διαδικασία αυτή, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ως παραπροϊόντα, όταν τα ηλεκτρόνια διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα (Di Meo, 2001). Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, παράγεται το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), από την αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και την αναγωγή του κυτοχρώματος (Chance et al, 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη, ενώ το $O_2^{\cdot-}$ προκύπτει λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο (Veskoukis et al, 2012).

Επιπλέον, στα μιτοχόνδρια παράγεται μονοξείδιο του αζώτου από τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου ($NO^{\cdot}$). Άλλες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών για το κύτταρο αποτελούν τα υπεροξειδισώματα, αλλά και τα ηπατικά κύτταρα λόγω της δράσης του κυτοχρώματος P-450 (Brantley et al, 1993). Τέλος, ελεύθερες ρίζες είναι πιθανό επίσης να παραχθούν και κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων από τα φαγοκύτταρα (Veskoukis et al, 2012).

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να προκληθεί και από διάφορες εξωγενείς πηγές. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, το κάπνισμα, η ακτινοβολία UV, η ραδιενέργεια και τα βιομηχανικά απόβλητα (Ames, 1981). Ακόμα, σημαντικές πηγές παραγωγής αποτελούν διάφορα φάρμακα, ξеноβιοτικές ουσίες όπως είναι τα εντομοκτόνα και οι τοξίνες, αλλά και η διατροφή και το αλκοόλ (Halliwell et al, 2015).



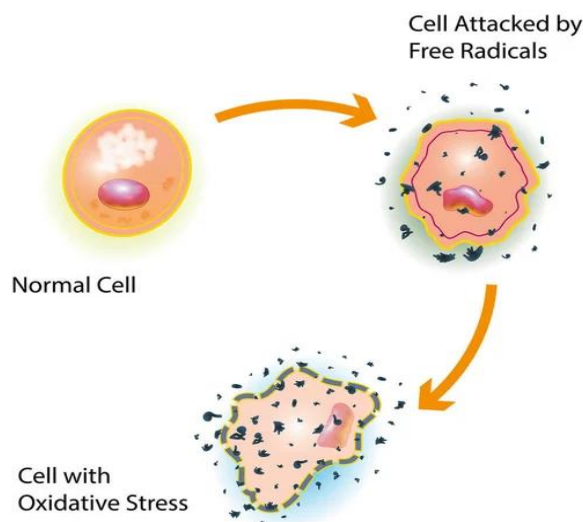
Εικόνα 1: Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών (Halliwell et al, 2015).

2.1.3. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αφορά τη διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων (Sies, 1991). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση ή ακόμα και σε νέκρωση του κυττάρου. Το οξειδωτικό στρες είναι δυνατόν να προκύψει είτε από αύξηση του ρυθμού παραγωγής ελευθέρων ριζών (για παράδειγμα λόγω έκθεσης των κυττάρων σε παράγοντες που προάγουν την παραγωγή τους), είτε από ανεπαρκή δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (για παράδειγμα λόγω μεταλλάξεων που τροποποιούν την δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων) (Jones, 2006). Στην δεύτερη περίπτωση, παρατηρείται επίσης συσσώρευση ελεύθερων ριζών, όπου το κύτταρο είτε προσαρμόζεται, είτε δέχεται την βλαπτική επίδραση των ριζών αυτών. Η προσαρμογή του κυττάρου πραγματοποιείται μέσω αύξησης της παραγωγής της αντιοξειδωτικής άμυνας, στην περίπτωση ήπιου οξειδωτικού στρες.

2.1.4. Κυτταρικές καταστροφές από οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα και να προσβάλλει τα μακρομόρια (DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες).



Εικόνα 2: Απεικόνιση της καταστροφής φυσιολογικού κυττάρου από το οξειδωτικό στρες.

2.1.4.1. Βλάβες στο DNA

Παρόλο που το DNA και το RNA συνιστούν τα κυριότερα συστατικά των κυττάρων, παρατηρείται πως υπόκεινται ευκολότερα σε βλάβες εξαιτίας των ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται *in vivo*. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου, κυρίως οι ρίζες υδροξυλίου, αποτελούν την κύρια πηγή βλαβών στο DNA. Οι ρίζες αυτές είναι πολύ δραστικές με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαχυθούν, προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες. Ένα παράδειγμα τροποποίησης του DNA από την ρίζα υδροξυλίου είναι η προσβολή της γουανίνης στην θέση C-8. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG) που πρόκειται για ένα οξειδωτικό προϊόν, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μεταλλαξιογένεσης και της καρκινογένεσης (Beckman et al, 1996).

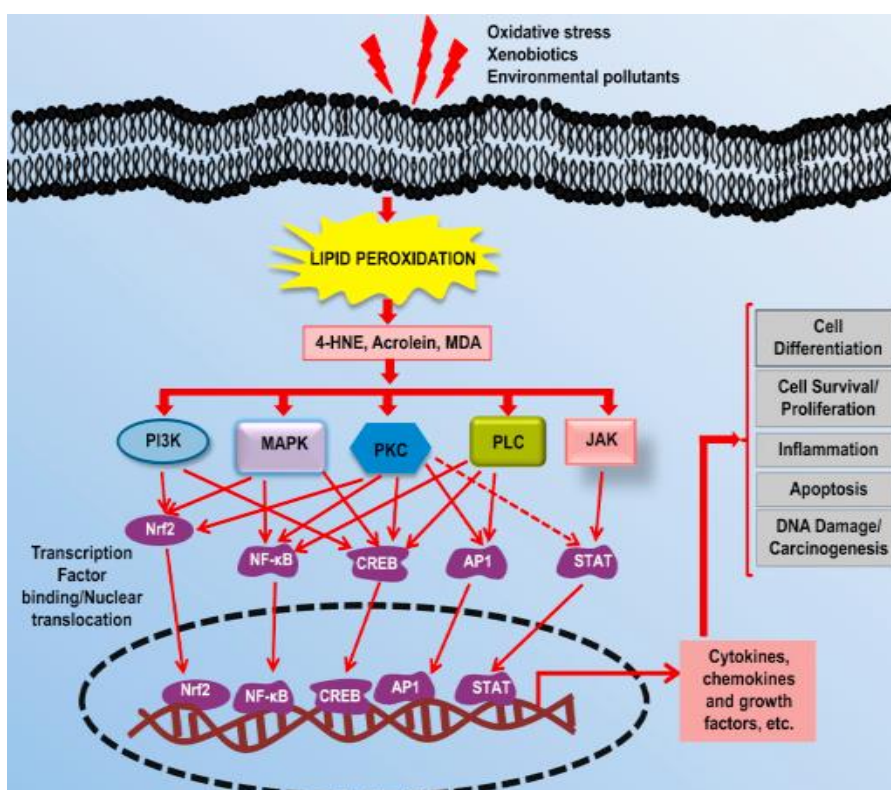
Η οξειδωτική τροποποίηση στο DNA μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα αποτελέσματα, όπως τροποποίηση ή αποικοδόμηση των βάσεων του DNA, μονόκλωνες ή δίκλωνες ρίξεις, απώλεια ή τροποποίηση πουρινών ή πυριμιδινών, βλάβες στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης, καθώς και βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (Sharma et al, 2018). Από τις βάσεις του DNA, οι πυριμιδίνες θυμίνη και κυτοσίνη αποτελούν τις πιο ευαίσθητες βάσεις σε οξειδωτικές τροποποιήσεις, συντελώντας στο σχηματισμό απυριμιδινικών ή απουρινικών θέσεων. Επιπρόσθετα, βλάβες μπορούν να πραγματοποιηθούν ακόμη και στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των αλυσίδων του DNA, καθώς οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών με αυτό είναι μη ειδικές. Αυτό έχει ως απόρροια, είτε τη σχάση της αλυσίδας σε κάποια σημεία, οδηγώντας στη δημιουργία μη τυπικών 3' και 5' άκρων, είτε σχάσεις στη διπλή έλικα του DNA, οι οποίες είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν.

2.1.4.2. Λιπιδική υπεροξείδωση

Οι κυτταρικές μεμβράνες συνίστανται από λιπίδια και στην πλειονότητά τους από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία περιέχουν δύο ή και περισσότερους διπλούς δεσμούς άνθρακα στο μόριο τους (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA). Τα λιπίδια αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση και στην προσβολή από τις ελεύθερες ρίζες (Young & McEneny, 2001). Ο όρος λιπιδική υπεροξείδωση αφορά την οξείδωση που υφίστανται τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης λόγω των ελευθέρων ριζών. Η λιπιδική υπεροξείδωση πραγματοποιείται ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μικρό βαθμό, σε όλα τα κύτταρα (Halliwell, 1993). Ωστόσο, μπορεί να πυροδοτηθεί

από διάφορους παράγοντες, ο κυριότερος των οποίων είναι οι ελεύθερες ρίζες, ενεργοποιώντας έτσι ένα καταρράκτη αλληπάλληλων αντιδράσεων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) και μηλονυλοδιαλδεύδης (MDA). Η μέτρηση της MDA αποτελεί μέσο αξιολόγησης της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και αποτελεί μία από τις ουσίες που μπορεί να αντιδράσει το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARs). Ο προσδιορισμός των TBARs αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο αξιολόγησης της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Marrocco et al., 2017).

Στην παρούσα μελέτη θα χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες. Η ρίζα περοξυλίου μπορεί να αντιδράσει με γειτονικά λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα να παραχθούν εκ νέου ρίζες λιπαρών οξέων. Η αντίδραση των ελεύθερων ριζών με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται στα φωσfolιπίδια και πρόκειται για τα βασικότερα συστατικά των λιποπρωτεϊνών και των μεμβρανών του κυττάρου, θεωρείται ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης. Η λιπιδιακή υπεροξειδωση έχει ως συνέπεια κυρίως την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης του κυττάρου, τη μείωση της ρευστότητας, τη μείωση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού και πιθανόν τελικά τη λύση του κυττάρου (Halliwell & Gutteridge, 1990).



Εικόνα 3: Απεικόνιση της λιπιδιακής υπεροξειδωσής (Saxena et al, 2019).

2.1.4.3. Βλάβες στις πρωτεΐνες

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου είναι πιθανό να προσβάλλουν τις πρωτεΐνες και να προκαλέσουν αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές βλάβες, ανεξαρτήτως της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του οργανισμού. Για παράδειγμα, η νίτρωση και η καρβονυλίωση αποτελούν μη αντιστρεπτές βλάβες, οι οποίες προκαλούν μόνιμες βλάβες στην λειτουργία των πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι πρωτεΐνες είτε να αποικοδομούνται, είτε να συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα (Giasson et al, 2000). Στην κατηγορία των αντιστρεπτών τροποποιήσεων ανήκουν η γλουταθειονυλίωση και η νιτροσυλίωση, οι οποίες συμβάλλουν ενεργά στην οξειδοαναγωγική ισορροπία.

Επιπρόσθετα, οι δραστικές μορφές έχουν την ικανότητα να τροποποιούν ποικίλα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με πιο επιρρεπή σε τροποποίηση την κυστεΐνη, την τρυπτοφάνη, τη μεθειονίνη, την τυροσίνη, την ιστιδίνη και τη φαινυλαλανίνη. Το μέγεθος της βλάβης που θα υποστούν οι πρωτεΐνες, λόγω της δράσης των ελεύθερων ριζών, είναι ανάλογο με την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε αυτά τα ευαίσθητα αμινοξέα, τον ρόλο των συγκεκριμένων αμινοξέων, αλλά και την ικανότητα επιδιόρθωσης της βλάβης στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη από τα κύτταρα. (Davies et al, 2003).

Οι τροποποιήσεις που προκαλούν οι δραστικές μορφές έχουν ως συνέπεια την τροποποίηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και συνεπώς και της λειτουργίας τους (Davis, 1987). Για παράδειγμα, στην περίπτωση που η πρωτεΐνη αφορά κάποιο ένζυμο, το αποτέλεσμα της οξείδωσης μπορεί να είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας (Stadtman, 1986). Οι πρωτεΐνες μπορεί να οδηγηθούν σε εκφυλισμό ή ακόμη και σε καταστροφή. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους αποικοδομούνται από τα λυσοσώματα και το πρωτεάσωμα, ενώ οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους, οι οποίες είναι αδύνατον να αποικοδομηθούν, συσσωρεύονται με αποτέλεσμα την δημιουργία συσσωματωμάτων (Levine, 2002).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η καρβονυλίωση είναι μια μη ενζυμική τροποποίηση των πρωτεϊνών, η οποία είναι μη αντιστρεπτή και μπορεί να πραγματοποιηθεί ύστερα από την προσθήκη καρβονυλικών ομάδων μέσω ορισμένων οξειδωτικών μονοπατιών (Dalle-Donne et al, 2006). Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει βλάβες στη διαδικασία αναδίπλωσής τους, καθώς και απώλεια ή μείωση της λειτουργικής τους δραστηριότητας (Aldini et al, 2007). Η συσσώρευση καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών σχετίζεται με πλήθος παθολογικών νοσημάτων και

καταστάσεων, όπως η νόσος Parkinson και η νόσος Alzheimer, η αθηρωμάτωση, ο διαβήτης (Conrad et al, 2000; Floor et al, 1998). Είναι σημαντικό να τονιστεί, πως ο εντοπισμός αυξημένων επιπέδων πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης αποτελεί έναν ειδικό και ευαίσθητο δείκτη αυξημένου οξειδωτικού στρες και πρωτεϊνικής δυσλειτουργίας.

2.1.5. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία

Το οξειδωτικό στρες έχει πολλές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και ευθύνεται για πληθώρα ασθενειών, μεταξύ των οποίων είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης καθώς και καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι δραστικές μορφές μπορούν να επάγουν την δημιουργία γονιδιακών μεταλλάξεων, οι οποίες με την σειρά τους είναι ικανές να επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να αποτελέσουν αφορμή για την έναρξη της καρκινογένεσης. Επιπλέον, οι δραστικές μορφές μπορεί να επάγουν την φλεγμονή.

2.2. ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ

2.2.1. Ορισμός

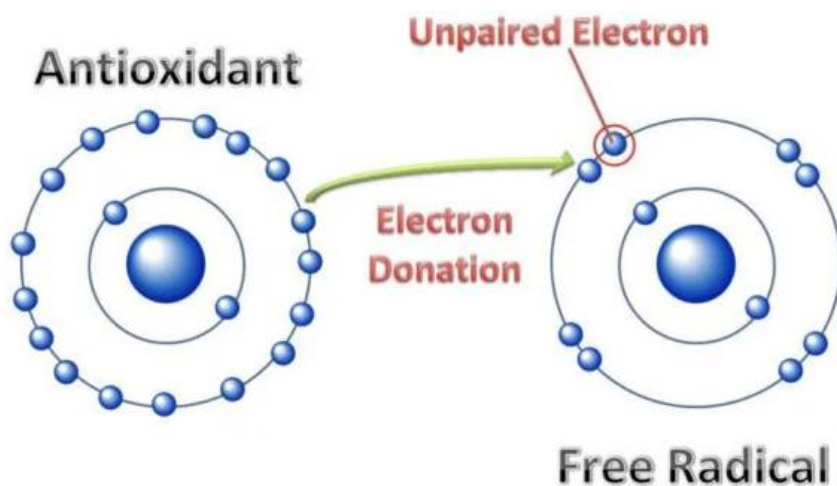
Γενικότερα, οι δραστικές μορφές παράγονται στα κύτταρα, ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες. Είναι πολύ σημαντικό όμως να διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία στον οργανισμό. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων ριζών που παράγονται και αυτών που απομακρύνονται (Valko et al, 2007). Έτσι λοιπόν, έχουν αναπτυχθεί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, οι οποίοι αναλαμβάνουν να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, προτού αυτές συσσωρευτούν και προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες στο κύτταρο (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Με τον όρο αντιοξειδωτικό ορίζεται μια ουσία, η οποία όταν βρεθεί σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την συγκέντρωση του υποστρώματος που πρόκειται να οξειδωθεί είναι δυνατόν, όχι μόνο να καθυστερήσει, αλλά και να εμποδίσει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky, 2002).

2.2.2. Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά δρουν ποικιλοτρόπως. Οι πρώτοι τύποι αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων κατά της οξειδωτικής βλάβης είναι εκείνοι που παρεμποδίζουν την δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου, καθώς και εκείνοι που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται (Kaplan et al, 2001). Τα αντιοξειδωτικά δρουν ως δότες ηλεκτρονίων σε οξειδωτικούς παράγοντες, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4 και συμβάλλουν στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Επιπρόσθετα, τα αντιοξειδωτικά είναι ικανά να καθυστερούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις, να διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις διάδοσης των ελεύθερων ριζών και να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell, 2007). Ακόμη ένας μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών είναι η δημιουργία συμπλόκων με μέταλλα (Cu^{2+} , Fe^{2+}) που ευνοούν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των συγκεκριμένων μετάλλων, συντελώντας στην ανικανότητα δράσης τους. Τέλος, τα αντιοξειδωτικά έχουν συνεργιστική δράση, καθώς η παρουσία ενός αντιοξειδωτικού μπορεί να ευνοεί τη δράση κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού (Halliwell, 1994).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της δράσης των αντιοξειδωτικών ως δότες ηλεκτρονίων, προκειμένου να ανάγουν και να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες (Kaplan et al, 2001).

2.2.3. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται κυρίως με βάση την προέλευσή τους, όπου διακρίνονται σε ενδογενή ή εξωγενή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά με την σειρά τους διακρίνονται σε ενζυμικά ή μη ενζυμικά, ανάλογα με τη χημική τους φύση.

2.2.4. Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Ενδογενή ονομάζονται τα αντιοξειδωτικά που παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα, αλλά και μη ενζυμικές ουσίες.

2.2.4.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του κυττάρου διασφαλίζεται από το πολύπλοκο ενδογενές αντιοξειδωτικό αμυντικό του σύστημα, το οποίο απαρτίζεται από ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι η καταλάση (Catalase, CAT), οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (Superoxide Dismutase, SOD), οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR). Διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, όπως και διαφορετικά τμήματα των κυττάρων είναι δυνατόν να περιέχουν διαφορετική ποσότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Sies, 1997).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η οικογένεια της υπεροξειδικής δισμουτάσης απαρτίζεται από ένα πλήθος μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες καταλύουν την αντίδραση των επιβλαβών ριζών του οξυγόνου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SOD) απαντώνται σε τρεις ισομορφές και συνιστούν την βασική άμυνα του οργανισμού έναντι των ριζών οξυγόνου ($O_2^{\bullet-}$). Οι ρίζες αυτές παράγονται στα μιτοχόνδρια κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μετατρέπονται από την μιτοχονδριακή SOD σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και οξυγόνο, ενώ όταν διαχέονται στο κυτταρόπλασμα ανάγονται από την κυτταροπλασματική SOD. Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο αυτό είναι η εξής: $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από την αντίδραση αυτή αποτοξινώνεται περαιτέρω από την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Valko et al, 2006).

Καταλάση (CAT)

Πρόκειται για ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που απαντάται στα υπεροξειδιοσώματα, καθώς και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς και πρόκειται για ένα ένζυμο ιδιαίτερα σταθερό και ανθεκτικό σε θερμική αποδιάταξη, pH και πρωτεόλυση, λόγω της άκαμπτης και σταθερής δομής του. Βασικός του ρόλος είναι να μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, σύμφωνα με την αντίδραση: $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ (Antunes et al, 2002). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορούν να μετατραπούν κάθε λεπτό από ένα και μόνο μόριο του συγκεκριμένου ενζύμου. Η μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων.

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Πρόκειται για ένα ένζυμο το οποίο εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα, στον εξωκυττάριο χώρο και βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στους πνεύμονες. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) προκειμένου να καταλύσει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Κατά την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται, όπως φαίνεται παρακάτω: $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$ (Antunes et al, 2002). Παρατηρείται λοιπόν ότι η καταλάση και η υπεροξειδάση της

γλουταθειόνης συνεργάζονται με στόχο να απομακρυνθεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα, ενώ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Συνεπώς, τα συγκεκριμένα ένζυμα συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα αντίστοιχα σημεία του κυττάρου. Ωστόσο, σε κάποια κύτταρα βρίσκονται και τα δύο ένζυμα στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, όταν το H_2O_2 βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναλαμβάνει την απομάκρυνσή του η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ενώ η καταλάση αναλαμβάνει την απομάκρυνσή του όταν αυτό βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Gaetani et al, 1994).

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Πρόκειται για το ένζυμο που ανάγει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) σε ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο το φλαβινο-αδενινι-δινουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide, FAD). Με τον τρόπο αυτό διατηρούνται ενδοκυτταρικά τα επίπεδα GSH/GSSG. Η αντίδραση που καταλύει η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι η εξής: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$. Ουσιαστικά το συνένζυμο FAD ανάγεται από τη φωσφορυλιωμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH) και τα ηλεκτρόνιά του μεταφέρονται στην δισουλφιδική γέφυρα, η οποία ενώνει τα δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης (Valko et al, 2006).

2.2.4.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ορισμένες ενώσεις δρουν ως μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Πρόκειται για μία ποικιλόμορφη ομάδα ενώσεων που δρουν ενάντια στο οξειδωτικό στρες, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που αυτές προκαλούν. Σε αντίθεση με τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτές οι ουσίες δεν απαιτούν συγκεκριμένες ενζυμικές αντιδράσεις για να λειτουργήσουν και δεν πρόκειται για πρωτεΐνες. (Halliwell and Gutteridge 2015).

Τα υδατοδιαλυτά και τα λιποδιαλυτά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι μικρομοριακές ουσίες, οι οποίες δρουν προστατευτικά όπως για παράδειγμα, η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή. (Pisoschi, 2015). Τα μόρια αυτά κατανέμονται είτε στο ενδοκυττάριο, είτε στο εξωκυττάριο τμήμα του οργανισμού.

Στο εξωκυττάριο τμήμα, και κυρίως στο πλάσμα, εντοπίζονται η χολερυθρίνη, η λευκωματίνη και το ουρικό οξύ. Με τον όρο λευκωματίνη (ή αλβουμίνη) αναφερόμαστε σε οποιαδήποτε υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη παράγεται από το ήπαρ και εντοπίζεται στο αίμα.

Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη αποτελεί το τελικό προϊόν του καταβολισμού της αίμης στη συστηματική κυκλοφορία. Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι η χολερυθρίνη εμπλέκεται στην ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών παραγόντων λόγω των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων.

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Πειραματικά και κλινικά στοιχεία δείχνουν πως το ουρικό οξύ έχει σημαντικό *in vivo* ρόλο ως αντιοξειδωτικό και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες (Glantzounis et al, 2005). Στο πλάσμα τα επίπεδα του ουρικού οξέος αυξάνονται κατά την άσκηση και τότε το ουρικό οξύ μπορεί να διοχετευθεί στα μυϊκά κύτταρα, με σκοπό να τα προστατεύσει από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Green & Fraser, 1988).

Στο ενδοκυττάριο τμήμα, οι ουσίες που αποτελούν το αντιοξειδωτικό σύστημα κατανέμονται ισότιμα είτε στις μεμβράνες, είτε στο κυτταρόπλασμα. Στις μεμβράνες εντοπίζονται τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, όπως το β-καροτένιο, τα οποία αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των ελεύθερων ριζών παράγονται σε τμήματα όπου παρευρίσκονται λιπίδια. Στο κυτταρόπλασμα βρίσκονται υδατοδιαλυτά μόρια, όπως η γλουταθειόνη (Markoulis et al, 2006).

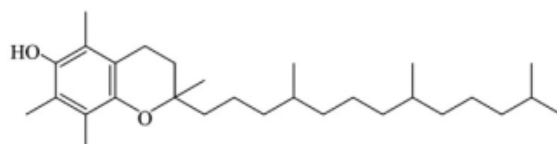
Β-καροτένιο

Το β-καροτένιο είναι ένα λιποδιαλυτό μόριο στις κυτταρικές μεμβράνες, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού. Επίσης, έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και να εμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε αποτελεί μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική και στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Απαντάται σε οκτώ

διαφορετικές μορφές, εκ των οποίων η α-τοκοφερόλη αποτελεί την δραστικότερη μορφή της βιταμίνης E στον άνθρωπο. Ο ρόλος της είναι η προστασία των λιπιδίων και των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες και η προστασία από το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, η βιταμίνη E δρα προστατευτικά για τα κύτταρα του πνεύμονα, τα οποία εκτίθενται στο οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 2015).

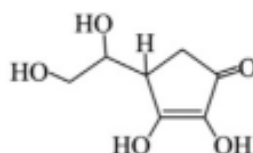


Vitamin E

Εικόνα 5: Απεικόνιση της δομής της βιταμίνης E (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ο βασικός της ρόλος αφορά τη συμμετοχή της στη σύνθεση του κολλαγόνου. Συμβάλλει επίσης, στην ορθή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ευκολότερη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, όπως είναι το σελήνιο. Έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει άμεσα τις δραστικές μορφές οξυγόνου και έχει προστατευτικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, καθώς αυξάνει την «καλή» χοληστερίνη (HDL) και παρεμποδίζει την οξείδωση της LDL (Halliwell & Gutteridge, 2015).



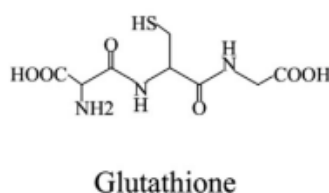
Vitamin C

Εικόνα 6: Απεικόνιση της δομής της βιταμίνης C (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο απαρτίζεται από τα αμινοξέα κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμινικό οξύ. Η γλουταθειόνη συντίθεται στο ήπαρ και όντας υδατοδιαλυτό μόριο, μεταφέρεται στους διάφορους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του

αίματος. Η προστασία των ερυθροκυττάρων έναντι στις οξειδωτικές βλάβες αποτελεί τον βασικότερο ρόλο της γλουταθειόνης (Scholz RW et al, 1989). Η γλουταθειόνη ανακυκλώνεται συνεχώς από την οξειδωμένη (GSSG) στην ανηγμένη (GSH) μορφή της, η οποία ευθύνεται για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που παρουσιάζει. Μάλιστα, έχει βρεθεί πως ο λόγος της ανηγμένης γλουταθειόνης προς την οξειδωμένη της μορφή στο κύτταρο αποτελεί δείκτη ύπαρξης ελευθέρων ριζών και συνεπώς και οξειδωτικού στρες (Halliwell & Gutteridge, 1998).



Εικόνα 7: Απεικόνιση της δομής της γλουταθειόνης (Scholz et al, 1989).

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Η έννοια Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC) αφορά την ικανότητα που έχουν οι ιστοί να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες. Πρόκειται για ένα μέτρο το οποίο χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του συνολικού αντιοξειδωτικού δυναμικού σε ένα βιολογικό δείγμα και αποτελεί δείκτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας ολόκληρου του οργανισμού. Η TAC μπορεί να ποσοτικοποιηθεί είτε με το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού μεμονωμένα, είτε να ποσοτικοποιηθεί ως σύνολο. Όσον αφορά τον πρώτο τρόπο, προσδιορίζεται ποσοτικά η αθροιστική επίδραση όλων των αντιοξειδωτικών, ενζυμικών και μη ενζυμικών, του εκάστοτε βιολογικού δείγματος, τα οποία είναι ικανά να εξουδετερώσουν τα ενεργά είδη οξυγόνου και τις ελεύθερες ρίζες, παρέχοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα των αντιοξειδωτικών δυνατοτήτων. Αυτός ο τρόπος είναι και ο δυσκολότερος, καθώς υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα και κάθε ένας από αυτούς συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο.

2.2.5. Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Ως εξωγενή αντιοξειδωτικά αναφέρονται εκείνα τα οποία λαμβάνουμε από εξωγενείς πηγές, συνήθως μέσω της διατροφής. Τα πιο κοινά εξωγενή αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής είναι οι βιταμίνες C, E και A, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά ολικής αλέσεως, ξηρούς καρπούς, σπόρους και άλλα φυτικά τρόφιμα. Πέραν της διατροφής, μία άλλη πηγή εξωγενών αντιοξειδωτικών αποτελούν τα συμπληρώματα διατροφής, τα οποία δρουν ως προμηθευτές θρεπτικών συστατικών όπως βιταμίνες, φυτικές ίνες, μέταλλα, λιπαρά οξέα ή αμινοξέα, τα οποία είτε απουσιάζουν, είτε βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες στη διατροφή. Τα συμπληρώματα διατροφής μπορεί να περιλαμβάνουν μια σειρά από αντιοξειδωτικά, όπως βιταμίνες C και E, βιταμίνη A, γλουταθειόνη, πολυφαινόλες.

2.2.6. Άλλα αντιοξειδωτικά

Είναι γνωστές και άλλες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, όπως η σερουλοπλασμίνη, η λακτοφερίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες των κυτοχρωμάτων, το συνένζυμο Q10 και η μελατονίνη (Markoulis et al, 2006). Το συνένζυμο Q10 είναι ένα κύριο συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συμβάλλει στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης. Σημαντική δράση έχει και η μελατονίνη, που παράγεται κατά τον ύπνο και σε συνθήκες πλήρους συσκότισης και αποτελεί ένα δραστικό αντιοξειδωτικό. Αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, σουπεροξειδίου και μονοξειδίου του αζώτου και έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθώς και να διασχίζει τις κυτταρικές μεμβράνες (Poljsak, 2011).

2.3. ΚΕΦΙΡ

2.3.1. Ορισμός του κεφίρ

Τα τελευταία χρόνια το γάλα καθώς και τα γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, έχουν ισχυρή επίδραση στην υγεία, προσδίδοντας ανυπολόγιστα οφέλη. Σε αντίστοιχη κατηγορία γαλακτοκομικών προϊόντων ανήκει και το κεφίρ. Πρόκειται για ένα υπόξινο, παχύρρευστο λευκό ρόφημα, το οποίο παράγεται από φρέσκο γάλα ύστερα από την προσθήκη ποσότητας νωπών κόκκων κεφίρ, οι οποίοι προκαλούν τη ζύμωση της λακτόζης (Gronneviketal et al, 2011). Ο όρος «κεφίρ» προέρχεται από την λέξη “keyif” η οποία είναι τούρκικης προέλευσης και σημαίνει «καλή ζωή» (Rosa et al, 2017).



Εικόνα 8: Απεικόνιση των κόκκων κεφίρ.

Το κεφίρ ήταν γνωστό ήδη στους αρχαίους Έλληνες και στους Ρωμαίους (Tamine et al, 2006). Παραδοσιακά, καταναλώνεται από λαούς της Νοτιοδυτικής Ασίας, της Ρωσίας, αλλά και της Ανατολικής Ευρώπης (Prado et al, 2015). Ωστόσο, είναι γνωστό σε πολλές χώρες όπως είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη, η Ιαπωνία και διάφορες χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης. Το κεφίρ χρησιμοποιείται από τους λαούς αυτούς για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών και γαστρεντερικών διαταραχών, αλλά και ως μέσο πρόληψης για χρόνια νοσήματα (Rosa et al, 2017).

Το κεφίρ παράγεται παραδοσιακά από κόκκους κεφίρ με γάλα αγελάδος. Συχνά όμως μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη γάλακτος όπως γάλα προβάτου, κατσίκας, καμήλας ή βουβαλιού, ανάλογα με τον τόπο ή τη χώρα όπου παρασκευάζεται. Εναλλακτικά είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί γάλα καρύδας ή σόγιας (Prado et

al,2015). Το γάλα σόγιας χρησιμοποιείται στην παραγωγή κεφίρ, συνδυάζοντας δύο πολύ ευεργετικά συστατικά, με σκοπό την παραγωγή ενός λειτουργικού τροφίμου νέου τύπου που θα είναι ιδανικό και για τους χορτοφάγους, οι οποίοι αποτελούν πλέον μια διαρκώς αυξανόμενη μερίδα πληθυσμού (Liu and Lin, 2000).

2.3.2. Παρασκευή του κεφίρ

Το κεφίρ παρασκευάζεται με μία από τις τρεις βασικές μεθόδους που ακολουθούν: α) η παραδοσιακή χειροποίητη διαδικασία παρασκευής, β) η βιομηχανική διαδικασία με την χρήση της «Ρωσικής» μεθόδου και γ) η βιομηχανική διαδικασία παρασκευής με τη χρήση καθαρών καλλιεργείων (de Oliveira Leite et al, 2013).

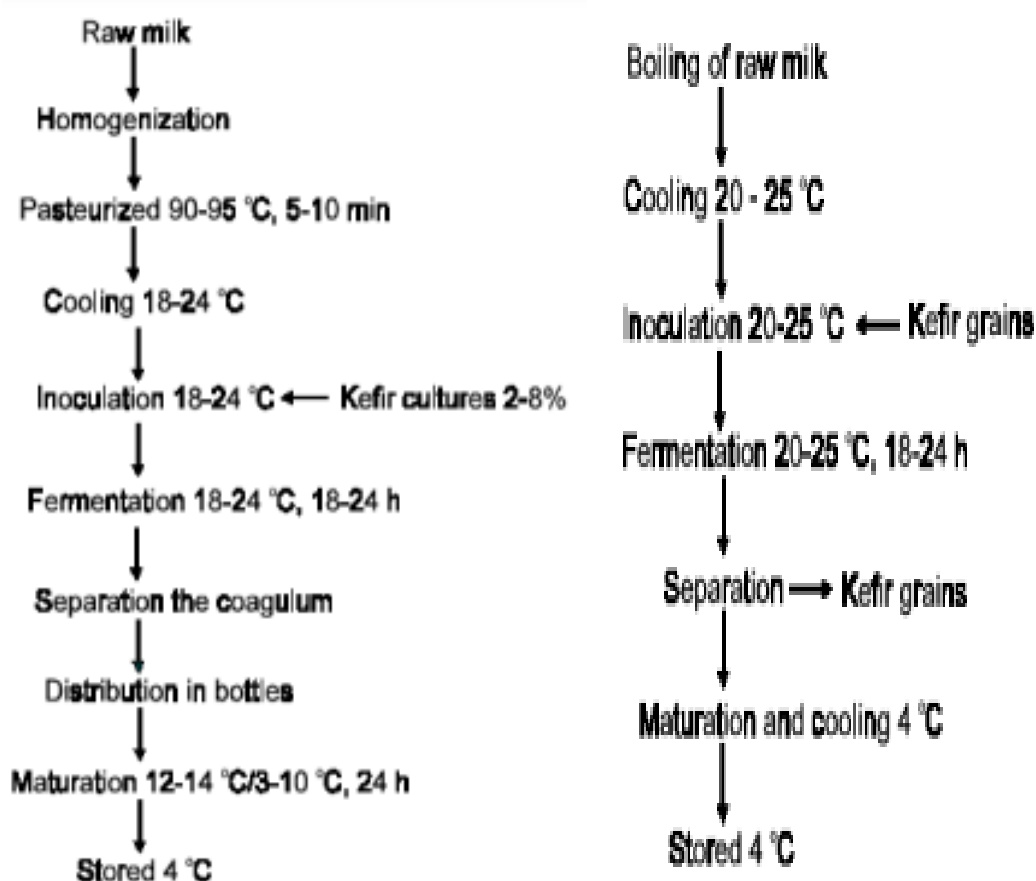
Σύμφωνα με την παραδοσιακή μέθοδο, μια ποσότητα παστεριωμένου γάλακτος ενοφθαλμίζεται με κόκκους κεφίρ σε αναλογία 2-10% και ακολουθεί ζύμωση στους 20-25 °C για 18-20 ώρες (Kesenkas et al, 2013). Αφού ολοκληρωθεί η ζύμωση, το τελικό προϊόν έχει περιεκτικότητα σε αιθανόλη 0,8% και σε διοξείδιο του άνθρακα 1% (Suroño & Hosono, 2002). Έπειτα, ακολουθεί το κοσκίνισμα και αμέσως μετά διαχωρίζονται οι κόκκοι από το τελικό προϊόν με φιλτράρισμα (Leite et al, 2013).

Η «Ρωσική» μέθοδος παρασκευής αποτελείται από δύο στάδια και χαρακτηρίζεται ως βιομηχανική, καθώς είναι ιδανική για παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων κεφίρ. Το πρώτο στάδιο είναι κοινό με την παραδοσιακή μέθοδο παρασκευής του κεφίρ. Στο δεύτερο στάδιο και αφού διαχωριστούν οι κόκκοι από το τελικό προϊόν, αυτό προστίθεται σε παστεριωμένο γάλα σε αναλογία 1-3% και ακολουθεί εκ νέου ζύμωση για 12-18 ώρες. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η παραγωγή κεφίρ σε μεγαλύτερη κλίμακα και παράλληλα ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος επιμόλυνσης (Leite et al, 2013).

Κατά τη βιομηχανική μέθοδο πραγματοποιείται αρχικά παστερίωση και ομογενοποίηση του γάλακτος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9. Η παστερίωση του γάλακτος πραγματοποιείται στους 90-95 °C για 5-10 λεπτά, ενώ ακολούθως η θερμοκρασία του προσεγγίζει τη θερμοκρασία δωματίου(18-24°C), ώστε να πραγματοποιηθεί ενοφθαλμισμός με κόκκους κεφίρ σε αναλογία 2-8% και ζύμωση σε αντίστοιχες συνθήκες με εκείνες της παραδοσιακής παρασκευής. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του προϊόντος, λαμβάνει χώρα παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, με κίνδυνο να τραυματιστεί η συσκευασία. Συνίσταται, λοιπόν, η παραμονή του προϊόντος

σε θερμοκρασία 12-14 °C ή σε 3-10 °C για 24 ώρες. Τέλος, ακολουθεί η συσκευασία και η αποθήκευσή του σε θερμοκρασία 4 °C (Otles et al, 2003).

Η αναλογία της μικροχλωρίδας των κόκκων συγκριτικά με τη μικροχλωρίδα του τελικού προϊόντος πιθανόν να έχουν μεγάλη διαφορά, γεγονός που οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, ο τύπος του γάλακτος που χρησιμοποιείται και ο χρόνος ζύμωσης (Simona et al, 2012). Για τον λόγο αυτό, το τελικό προϊόν είναι αδύνατο να επαναχρησιμοποιηθεί σε νέα παρτίδα, γεγονός που οδήγησε τη βιομηχανία να εισάγει τη χρήση καθαρών καλλιιεργειών σε κάθε νέα παρτίδα (Farnworth et al, 2015). Στις μέρες μας, κατά την παραγωγική διαδικασία του κεφίρ συμμετέχουν μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από κόκκους κεφίρ ή καλλιέργειες που η σύστασή τους περιλαμβάνει οξυγαλακτικά βακτήρια και ζυμομύκητες που βρίσκονται στους κόκκους κεφίρ.



Εικόνα 9: Απεικόνιση της βιομηχανικής (αριστερά) και της παραδοσιακής (δεξιά) μεθόδου παραγωγής κεφίρ (Otles et al, 2003).

2.3.3. Δομή και μικροχλωρίδα κόκκων κεφίρ

Οι κόκκοι του κεφίρ οπτικά εμφανίζονται σαν μικρές συμπαγείς μάζες κουνουπιδιού και η διάμετρός τους μπορεί να ποικίλλει από 3 έως 20nm. Μοιάζουν με ζελατινώδη κίτρινα ή λευκά σωματίδια, έχοντας ακανόνιστη μορφή, ελαστική συνοχή και ανομοιόμορφη επιφάνεια (Pranav et al, 2017). Οι κόκκοι του κεφίρ είναι αδιάλυτοι στο νερό και ανθεκτικοί στα ένζυμα.



Εικόνα 10: Κόκκοι κεφίρ (Leito et al, 2013).

Οι κόκκοι του κεφίρ αποτελούν ένα ιδιαίτερα σύνθετο σύμπλεγμα συμβίωσης βακτηρίων και ζυμών. Το σύμπλεγμα αυτό συγκρατείται στην μήτρα ενός πολυσακχαρίτη που ονομάζεται kefiran (Lopitz-Otsoa et al, 2006). Σε αυτή την συμβιωτική σχέση, τα βακτήρια εκμεταλλεύονται τις βιταμίνες και τα αμινοξέα που παράγονται από τους ζυμομύκητες προκειμένου να αναπτυχθούν, ενώ οι ζυμομύκητες αξιοποιούν ως πηγή ενέργειας προϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων. Συνεπώς, μέσω αυτής της συμβιωτικής σχέσης, εξασφαλίζεται η σταθερότητα του μικροβιολογικού προφίλ των κόκκων και του ροφήματος, παρά το γεγονός ότι μπορεί να υπάρξουν μεταβολές σε ποικίλες παραμέτρους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζύμωσης (Rosa et al, 2017).

Η μικροβιακή σύσταση των κόκκων ποικίλλει και εξαρτάται από την προέλευσή τους, το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στη ζύμωση, τις διαφορετικές τεχνικές που ακολουθούνται, τις θερμοκρασίες που εφαρμόζονται, τη μέθοδο συντήρησης της καλλιέργειας και τις συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων (Prado et al, 2015). Το σύμπλεγμα των κόκκων κεφίρ απαρτίζεται από τουλάχιστον 100 είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων, βακτηρίων οξικού οξέος, μυκήτων και ζυμών (Cheirsilp et al, 2011). Τα βακτήρια που περιλαμβάνει αυτό το σύμπλεγμα ανήκουν στα προβιοτικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν γαλακτόζη και γλυκόζη, οι οποίες σχηματίζουν τον πολυσακχαρίτη kefiran (Dailin et al, 2016). Γενικά, οι μικροοργανισμοί από τους οποίους αποτελούνται οι κόκκοι του κεφίρ κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: α) τα ομοζυγωτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος, β) τα ετεροζυγωτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος, γ) οι ζύμες οι οποίες μεταβολίζουν λακτόζη και δ) οι ζύμες οι οποίες δεν μεταβολίζουν λακτόζη (Cheirsilp et al, 2011).

Το τελικό προϊόν της ζύμωσης αποτελείται κυρίως από το βακτηριακό είδος *Lactobacillus kefir*, το οποίο καταλαμβάνει το 80% του μικροβιακού πληθυσμού. Το

υπόλοιπο 20% του βακτηριακού πληθυσμού αντιπροσωπεύεται από τα εξής είδη: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus kefiranofaciens* (Sarkar et al, 2008). Η σύνθεση αυτή είναι πιθανό να διαφέρει ανάλογα με την προέλευση, το υπόστρωμα της ζύμωσης, αλλά και την μέθοδο συντήρησης της καλλιέργειας (Prado et al, 2015). Στον πίνακα 3 και 4 απεικονίζεται η βακτηριακή μικροχλωρίδα και η ποικιλία ζυμομυκήτων που χρησιμοποιούνται στη μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ αντίστοιχα, όπως έχει καταγραφεί από ποικίλες έρευνες (Simona et al, 2002; Koroleva et al, 1991).

Οξυγαλακτικά βακτήρια	Lactobacilli	<i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefirgranum</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. viridescens</i> , <i>L. bulgaricus</i>
	Lactococci	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	Streptococci	<i>S. thermophilus</i>
	Enterococci	<i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i>
	Leuconostocs	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp., <i>cremoris</i>
Βακτήρια οξικού οξέος		<i>A. aceti</i> , <i>Ac. Pasteurianus</i>
Άλλα βακτήρια		<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Micrococcus</i> sp.

Πίνακας 3: Βακτηριακή μικροχλωρίδα των κόκκων κεφίρ.

<u>Klyveromyces species</u>	K. <u>matxianus</u> , K. <u>Lactis</u>
<u>Saccharomyces species</u>	S. <u>cerevesiae</u> , S. <u>Unisporus</u> , S. <u>Exiguss</u> , S. <u>Turicensis</u> , S. <u>Delbrueckii</u>
<u>Torulaspora species</u>	T. <u>delbrus</u> , T. <u>delbrueckii</u>
<u>Candida species</u>	C. <u>pseudotropicalis</u> , C. <u>Tenuis</u> , C. <u>Inconspicua</u> , C. <u>maris</u> , C. <u>Lambica</u> , C. <u>Tannotelerans</u> , C. <u>valida</u> 6, C. <u>kefyr</u> , C. <u>Holmii</u>
<u>Other yeasts</u>	<u>Pichia fermentans</u> , <u>Zygosaccharomyces rouxii</u> , <u>Debaryomyces hansenii</u> , <u>Bretannomyces anomalus</u> , <u>Issatchenkia occidentalis</u>

Πίνακας 4: Κατηγορίες ζυμομυκήτων στους κόκκους κεφίρ.

2.3.4. Χημική σύσταση

Όσον αφορά τη χημική σύσταση των κόκκων κεφίρ, αποτελούνται από 45,7% μυκοπολυσακχαρίτες, 34,3% πρωτεΐνες, 4,4% λιπαρά. Επίσης περιέχουν βιταμίνη Β και Κ, ασβέστιο, τρυπτοφάνη, μαγνήσιο, φώσφορο (Rosa et al, 2017). Το κεφίρ περιέχει κατά κύριο λόγο νερό, σε ποσοστό 86,3% και περιέχει σε μικρότερο ποσοστό σάκχαρα, λιπίδια, πρωτεΐνες και σε ακόμα μικρότερη ποσότητα αλκοόλη και γαλακτικό οξύ (Ahmed et al, 2013). Κατά την διάρκεια της ζύμωσης παράγεται διοξείδιο του άνθρακα, σε ποσοστό που εξαρτάται από τους κόκκους κεφίρ. Η επιθυμητή ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα είναι 1,98 g/L προϊόντος. Επιπρόσθετα, κατά την διαδικασία της ζύμωσης παράγονται πυροσταφυλικό, οξικό, προπιονικό, ιππουρικό και βουτυρικό οξύ, καθώς και ακεταλδεϋδη και διακετύλιο, που επηρεάζουν το άρωμα και την γεύση του τελικού προϊόντος (Rosa et al, 2017).

Τα βιοενεργά συστατικά, όπως το διοξειδίο του άνθρακα, οργανικά οξέα, αιθανόλη, υπεροξειδίο του υδρογόνου, βιοενεργά πεπτίδια, βακτηριοσίνες και αντιβιοτικά, τα οποία παράγονται κατά την ζύμωση των κόκκων, ευθύνονται για τις ευεργετικές ιδιότητες του κεφίρ (de Oliveira Leite et al, 2013).

2.3.5. Ευεργετικές ιδιότητες κεφίρ

Η κατανάλωση κεφίρ έχει ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες στην λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως το κεφίρ συμβάλλει στην ελάττωση της χοληστερίνης, στη βελτίωση της ανοχής στη λακτόζη και στη βελτίωση της λειτουργίας του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ έχει και αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Chen et al, 2017).

2.3.5.1. Οστεοπόρωση

Πρόκειται για μία από τις συχνότερες παθήσεις των οστών που προσβάλλει κυρίως τους ηλικιωμένους και εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες. Η οστεοπόρωση είναι μια χρόνια ασθένεια που οδηγεί σε μείωση της οστικής πυκνότητας και σε διαταραχή της δομής των οστών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση καταγμάτων, ενώ μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε αναπηρία του ατόμου (Looker et al, 1997). Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η πρόληψη της οστεοπόρωσης με σκοπό να μειωθεί ο κίνδυνος νόσησης. Φαίνεται ότι η οστεοπόρωση συνδέεται με την ανεπαρκή πρόσληψη ασβεστίου. Μία σημαντική πηγή ασβεστίου που βοηθά στην διατήρηση της οστικής μάζας είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Honkanen et al, 1991).

Συγκεκριμένα, το κεφίρ είναι ικανό να καλύψει τις ημερήσιες ανάγκες του οργανισμού σε ασβέστιο και επιπλέον δρα ευεργετικά στην πρόληψη της οστεοπόρωσης. Αυτό αποδεικνύεται από μια μελέτη διάρκειας 6 μηνών, η οποία πραγματοποιήθηκε σε 40 ασθενείς με οστεοπόρωση. Στους ασθενείς αυτούς χορηγήθηκε κεφίρ σε συνδυασμό με διττανθρακικό ασβέστιο ή μόνο διττανθρακικό ασβέστιο, με σκοπό να βρεθεί η επίδραση του κεφίρ στην ασθένεια. Στους ασθενείς αυτούς μετρήθηκε η οστική πυκνότητα πριν την παρέμβαση με το κεφίρ και το διττανθρακικό ασβέστιο, ένα μήνα μετά την παρέμβαση, τρεις μήνες μετά την παρέμβαση και τέλος έξι μήνες μετά την παρέμβαση. Βρέθηκε ότι στους ασθενείς που έλαβαν κεφίρ σε συνδυασμό με διττανθρακικό ασβέστιο, οι τιμές της οστικής πυκνότητας βελτιώθηκαν σημαντικά, συγκριτικά με τους ασθενείς στους οποίους

χορηγήθηκε μόνο διττανθρακικό ασβέστιο. Φαίνεται λοιπόν, πως ο συνδυασμός του κεφίρ με το διττανθρακικό ασβέστιο δρα ευεργετικά στην εξέλιξη της νόσου (Marco et al, 2016).

2.3.5.2. Δυσανεξία στην λακτόζη

Ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού παγκοσμίως έχει δυσανεξία την λακτόζη. Η δυσανεξία στην λακτόζη αφορά την ανεπαρκή δράση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάσπαση της λακτόζης προκειμένου αυτή να απορροφηθεί από το έντερο. Η β-γαλακτοσιδάση υπάρχει στους κόκκους κεφίρ και δρα κατά την διάρκεια της ζύμωσης, διασπώντας την λακτόζη του γάλακτος. Επομένως, η ποσότητα της λακτόζης μειώνεται και έτσι το κεφίρ είναι κατάλληλο ακόμα και για άτομα που έχουν δυσανεξία (Rosa et al, 2017).

2.3.5.3. Χοληστερόλη

Έχει αποδειχθεί πως η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά βοηθά στη ρύθμιση των επιπέδων της χοληστερόλης. Σύμφωνα με μια συγκεκριμένη μελέτη (Guo et al, 2011) βρέθηκε ότι τα γαλακτοκομικά προβιοτικά προϊόντα μείωσαν την χοληστερόλη του πλάσματος. Ένας πιθανός τρόπος να συμβεί αυτό, είναι χάρη στα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία αναστέλλουν την απορρόφηση εξωγενούς χοληστερόλης και επιπλέον μειώνουν την παραγωγή χοληστερόλης. Ένας δεύτερος τρόπος μείωσης της χοληστερόλης μέσω των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η αύξηση της παραγωγής προπιονικού οξέος. Το προπιονικό οξύ μειώνει την παραγωγή χοληστερόλης, αναστέλλοντας τη δράση ενός ενζύμου το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της (Rosa et al, 2017).

2.3.5.4. Ρύθμιση της γλυκόζης του πλάσματος

Τα προβιοτικά βοηθούν στη ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου του αίματος. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της ικανότητας των προβιοτικών να τροποποιούν την σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας, μειώνοντας έτσι τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Τις ίδιες ιδιότητες κατέχει και το κεφίρ. Σε μια κλινική δοκιμή στην οποία συμμετείχαν άτομα με διαβήτη, η κατανάλωση κεφίρ μείωσε σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης (Ostadrahimi et al, 2015).

2.3.5.5. Υπέρταση

Το κεφίρ διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και έχει αντι-υπερτασικές ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί πως το κεφίρ μειώνει την πίεση του αίματος, καθώς αναστέλλει τη δράση του ενζύμου αγγειοτενσίνης (angiotensin converting enzyme, ACE) μέσω βιοενεργών πεπτιδίων που προκύπτουν από την καζεΐνη του γάλακτος (Quirós et al, 2005). Αυτά τα βιοενεργά πεπτίδια αναστέλλουν επίσης και την παραγωγή της αγγειοτενσίνης I, καθώς και της αλδοστερόνης. Η αλδοστερόνη είναι μια ορμόνη η οποία επάγει την αύξηση της συγκέντρωσης νατρίου στον ορό, αυξάνοντας έτσι την πίεση του αίματος (Rosa et al, 2017).

2.3.5.6. Φλεγμονή

Το κεφίρ εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται είτε στο μικροβίωμα που περιέχει, είτε σε διάφορα βιοενεργά συστατικά που παράγονται από το μικροβίωμα κατά την διαδικασία της ζύμωσης. Αυτά τα βιοενεργά συστατικά έχουν την ικανότητα να αντιμετωπίζουν διάφορα παθογόνα, ενεργοποιώντας τα μακροφάγα, αυξάνοντας την φαγοκυττάρωση, την παραγωγή κυτοκινών και επάγοντας την παραγωγή αντισωμάτων από τα β-λεμφοκύτταρα (Zhou et al, 2009). Η αντιφλεγμονώδης δράση του κεφίρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και στη θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, καθώς η φλεγμονή σχετίζεται με χρόνιες παθήσεις όπως είναι η παχυσαρκία, ο διαβήτης και ο καρκίνος (Adiloglu et al, 2013).

2.3.5.7. Αντικαρκινικές ιδιότητες

Έχει βρεθεί ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια που εμπεριέχονται στους κόκκους κεφίρ εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια αυτά παρεμβαίνουν σε διάφορες διεργασίες του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων η απόπτωση, η μετάλλαξη και ο πολλαπλασιασμός. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Sharifi et al, 2017). Ακόμη, η λήψη προβιοτικών προϊόντων που περιλαμβάνουν το στέλεχος *Lactobacillus reuteri* βοηθά στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Iyer et al, 2008). Επιπρόσθετα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus lactis* και *Lactobacillus casei* εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς επάγουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του πρωκτού και σε καρκινικά κύτταρα στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία, αντίστοιχα. Τα βακτήρια *Lactobacillus paracasei* και *Lactobacillus kefir* μπορούν να οδηγήσουν σε

απόπτωση των καρκινικών κυττάρων στομάχου (Ghoneum et al, 2015). Επιπλέον, τα οξυγαλακτικά βακτήρια συσχετίζονται και με την πρόληψη του καρκίνου του μαστού (Chen et al, 2007).

Επομένως το κεφίρ λόγω της ποικιλίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων που περιέχει μπορεί να στοχεύσει αρκετά είδη καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί προληπτικά για διάφορες μορφές καρκίνου, αλλά και ως θεραπεία συνδυαστικά με την χημειοθεραπεία (Sugamura et al, 1997).

2.3.5.8. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Το κεφίρ εμφανίζει επίσης και αντιμικροβιακές ιδιότητες χάρη στη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus paracasei* και *Lactobacillus plantarum*, που περιέχει (Miao et al, 2014). Αυτά τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία ονομάζονται βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες έχουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε παθογόνα του εντέρου, όπως είναι η *E.coli*, ο *Staphylococcus aureus*, η *Listeria monocytogenes*, η *Salmonella enteritidis* και ο *Bacillus cereus* (Guzel-Seydim et al, 2011).

Επιπρόσθετα, η κατανάλωση του κεφίρ έχει συσχετιστεί με μείωση του πληθυσμού παθογόνων βακτηρίων όπως βακτήρια του γένους *Clostridia* και *Enterobacteriaceae* και αύξηση των ωφέλιμων οξυγαλακτικών βακτηρίων στο έντερο (Marquina et al, 2002).

2.3.5.9. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Έχει βρεθεί πως το κεφίρ έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και δρα προστατευτικά ενάντια στις βλάβες του DNA και στο οξειδωτικό στρες. Παραδείγματος χάρη, σε μία πειραματική μελέτη σε τρωκτικά βρέθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση του κεφίρ ήταν μεγαλύτερη από αυτή της βιταμίνης E (Rosa et al, 2017). Το γεγονός πως το κεφίρ μπορεί να δράσει ενάντια στο οξειδωτικό στρες, επιβεβαιώνεται από μελέτη όπου ύστερα από έξι εβδομάδες αγωγής με κεφίρ, σημειώθηκε αύξηση του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και μείωση της μηλονυλοδιαλδεϋδης (MDA) (Rosa et al., 2017).

Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα άλλης μελέτης η αντιοξειδωτική δράση του κεφίρ είναι αισθητή λόγω της παρουσίας των ενζύμων καταλάση, υπεροξειδάση

της γλουταθειόνης και υπεροξειδική δισμουτάση. Η υπεροξειδική δισμουτάση εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, παράγοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου που εξουδετερώνεται με τη σειρά του από την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Liu et al, 2005).

III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Συμμετέχοντες

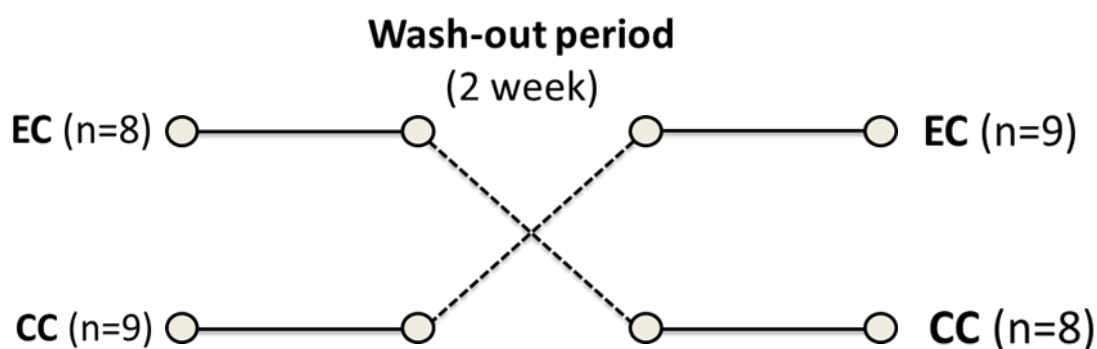
Το πειραματικό πρωτόκολλο πήρε έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (ΤΕΦΑΑ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Αρ. πρωτ. 2031). Στη μελέτη έλαβαν μέρος δεκαεπτά (17) ενήλικα υγιή άτομα, ηλικίας 20-60 ετών. Πρόκειται για μία διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη μελέτη, όπου στη μία συνθήκη τα άτομα έλαβαν κεφίρ (300 ml την ημέρα - 150 ml το πρωί και 150ml το βράδυ) και στην επόμενη έλαβαν εικονικό σκεύασμα (γάλα). Η συμμετοχή των ατόμων στην έρευνα ήταν εθελοντική, δίνοντας την προφορική και την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους, αφού ενημερώθηκαν πλήρως για όλους τους κινδύνους και τα προσδοκώμενα οφέλη που πιθανόν να προκύψουν από την μελέτη. Ορισμένα από τα κριτήρια αποκλεισμού των εθελοντών ήταν άτομα με πρόσφατο ιατρικό ιστορικό, άτομα που έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή που να επηρεάζει τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού ή συμπληρώματα διατροφής με αντιοξειδωτικά, και άτομα των οποίων η αρτηριακή πίεση δεν κυμαίνεται σε φυσιολογικά όρια. Από τους συμμετέχοντες ζητήθηκε για τρεις ημέρες πριν από κάθε επίσκεψή τους στο εργαστήριο να μην συμμετέχουν σε αθλητικές δραστηριότητες ή έντονη γυμναστική, καθώς και να απέχουν κάποιες ώρες πριν από κάθε επίσκεψή τους στο εργαστήριο από το αλκοόλ και το κάπνισμα. Επιπλέον, δόθηκαν οδηγίες στους συμμετέχοντες να μην αλλάξουν τις συνήθειές τους, όπως την διατροφή, το επίπεδο φυσικής κατάστασης, τις καπνιστικές συνήθειες, κατά τη διάρκεια ολόκληρης της μελέτης.

3.2. Πειραματικό πρωτόκολλο

Το πειραματικό πρωτόκολλο απεικονίζεται στο Γράφημα 1. Οι συμμετέχοντες χρειάστηκε να παραστούν στο εργαστήριο πέντε φορές. Κατά την πρώτη επίσκεψη πραγματοποιήθηκε ενημέρωση για τη διαδικασία του πειράματος, υπεγράφησαν οι συναινέσεις (βλ. Παράρτημα 1), συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια σχετικά με το ιατρικό ιστορικό των συμμετεχόντων (βλ. Παράρτημα 2 και Παράρτημα 3) και δόθηκαν οι οδηγίες για την τριήμερη καταγραφή της διατροφής. Στους συμμετέχοντες δόθηκε οδηγία επίσης να ακολουθήσουν την ίδια διατροφή πριν από κάθε επόμενη αιμοληψία με αυτή που είχαν ακολουθήσει πριν την πρώτη αιμοληψία. Κατά τη

δεύτερη επίσκεψή τους, τα άτομα που συμμετείχαν στο πείραμα παρουσιάστηκαν στο εργαστήριο πρωί, ενώ προηγήθηκε ολονύκτια νηστεία και αποχή από αλκοόλ, καφεΐνη και έντονη άσκηση για 24 ώρες. Μετρήθηκε το σωματικό τους ύψος κατά προσέγγιση 0,5 cm (Stadiometer 208, Seca, UK) και το σωματικό τους βάρος κατά προσέγγιση 0,5 kg (Beam Balance, Seca, UK), με τους συμμετέχοντες να είναι ελαφρά ντυμένοι και ξυπόλυτοι, ενώ το ποσοστό του σωματικού τους λίπους υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου Βιοηλεκτρικής Εμπέδησης (TANITA BF-522 W, TANITA CORP., ILLINOIS USA).

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης, της καρδιακής συχνότητας ηρεμίας, καθώς και της περιμέτρου μέσης και ισχίων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η πρώτη αιμοληψία και οι συμμετέχοντες προμηθεύτηκαν το κεφίρ ή το εικονικό σκεύασμα. Ακολούθησαν μετρήσεις αναφορικά με τη φυσική κατάσταση των συμμετεχόντων, οι οποίες περιλάμβαναν push ups, sit ups, 4min Submaximal τεστ, Sit-and-reach τεστ και Handgrip strength τεστ σε αριστερό και δεξί χέρι. Η ποσότητα κεφίρ ή εικονικού σκευάσματος που χορηγήθηκε σε κάθε άτομο καθορίστηκε σε 300 ml/ημέρα, 150ml το πρωί και 150ml το βράδυ. Η σύσταση του κεφίρ ήταν γάλα, βανίλια και τρία είδη καλλιεργείων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι καλλιέργειες Bb-12, XPL-20 και nu-trish LA-5 (*Lactobacillus acidophilus*). Η σύσταση του εικονικού σκευάσματος ήταν γάλα, βανίλια και Γλυκόνο-Δέλτα-Λακτόνη (επίτευξη ήπιας οξίνισης). Η χορήγηση του κεφίρ έγινε για διάστημα δύο εβδομάδων, όπως και η χορήγηση του εικονικού σκευάσματος, ενώ μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων υπήρξαν δύο εβδομάδες κατά τις οποίες οι συμμετέχοντες δεν καταλάωναν κάποιο σκεύασμα. Η σειρά με την οποία τα άτομα έλαβαν κεφίρ ή εικονικό σκεύασμα ήταν τυχαία. Οι παραπάνω μετρήσεις επαναλήφθηκαν σε κάθε επόμενη επίσκεψη.



○ : Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και συλλογή αίματος

EC : Πειραματική συνθήκη; Κατανάλωση κεφίρ (300 ml/ημέρα) για 2 εβδομάδες.

CC : Συνθήκη ελέγχου; Κατανάλωση εικονικού σκευάσματος-γάλα (300 ml/ημέρα) για 2 εβδομάδες.

Γράφημα 1: Απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου.

3.3. Συλλογή και χειρισμός του αίματος

Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες από τη μεσοβασίλική ή βασίλική ή κεφαλική φλέβα των άνω άκρων με τη χρήση βελόνας. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μιας χρήσης και ακολουθήθηκαν όλοι οι απαιτούμενοι κανόνες ασηψίας και αντισηψίας. Κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας οι συμμετέχοντες βρίσκονταν σε ύπτια θέση. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν.

Γενική ανάλυση αίματος: Συγκεκριμένη ποσότητα αίματος συλλέχθηκε σε ειδικό φιαλίδιο, το οποίο περιείχε αντιπηκτικό ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) για τον προσδιορισμό των αιματολογικών παραμέτρων. Οι αιματολογικές μετρήσεις έγιναν σε αυτόματο αναλυτή Mythic 18 (Orphée).

Προετοιμασία πλάσματος: Ποσότητα αίματος συλλέχθηκε σε σωληνάριο διαχωρισμού, το οποίο περιείχε EDTA σε αναλογία 20μl EDTA/ml αίματος. Ακολούθησε ανακίνηση του σωληναρίου προκειμένου να επιτευχθεί ανάμιξη του αίματος με το EDTA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C στην ειδική ψυχόμενη φυγόκεντρο (Thermo scientific Heraeus Labofuge 300 centrifuge) για τον διαχωρισμό του πλάσματος. Έπειτα, το υπερκείμενο (πλάσμα) συλλέχθηκε σε ισόποσες ποσότητες σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C και αποψύχθηκαν μόνο μια φορά πριν από την ανάλυση. Το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των TBARs.

Προετοιμασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος: Ύστερα από την συλλογή του υπερκείμενου πλάσματος, αφαιρέθηκαν με προσοχή από το σωληνάριο διαχωρισμού τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, ώστε να μείνουν μόνο τα ερυθροκύτταρα. Ακολούθησε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων με προσθήκη ίσης ποσότητας απιονισμένου νερού και έντονη ανάδευση, ώστε να επιτευχθεί λύση των

ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 4,000 g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το καθαρό υπερκείμενο συλλέχθηκε σε ισόποσες ποσότητες σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C και αποψύχθηκαν μόνο μια φορά πριν από την ανάλυση. Το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της καταλάσης και της αιμοσφαιρίνης.

Προετοιμασία ορού: Ποσότητα αίματος συλλέχθηκε σε σωληνάριο διαχωρισμού, το οποίο περιείχε πηκτικό παράγοντα σε μορφή σφαιριδίων. Μετά το πέρας 20-30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου το αίμα να πήξει, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε η συλλογή του ορού σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Ο ορός χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), της χολερυθρίνης και του ουρικού οξέος.

3.3.1. Αναλύσεις στο πλάσμα

Προσδιορισμός των TBARS

Διαλύματα

(α) Tris-HCl 200 mM (pH 7,4), MB (Tris): 121,14, MB (HCl): 36,46 (stock 37%)
[10,1 N]

Για την παρασκευή περίπου 100 ml διαλύματος Tris-HCl, χρησιμοποιούμε 25 ml διαλύματος Tris (200 mM) και 42 ml διαλύματος HCl (0,1 N). Για το διάλυμα Tris, το οποίο είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7, ζυγίζουμε 0,61g και τα διαλύουμε σε 25ml νερού. Για το διάλυμα HCl, διαλύουμε 0,42ml του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42ml νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε αρχικά τα 25ml από το Tris και έπειτα προσθέτουμε αργά τα 42ml του HCl και στη συνέχεια προσθέτουμε νερό ως τα 100ml. Ελέγχουμε το pH του διαλύματος να είναι στο 7,4.

(β) Na₂SO₄ (2 M) -TBA (55 mM), MB (TBA): 144,1, MB (Na₂SO₄):142,04

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος, ζυγίζουμε 2,84g Na₂SO₄ και 0,08g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Σε ένα ποτήρι ζέσεως μεταφέρουμε τις ποσότητες που

ζυγίσαμε και προσθέτουμε 10ml νερού. Ακολουθεί θέρμανση και ανάδευση με μαγνητάκι, μέχρι να πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση των συστατικών. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

(γ) TCA 35%

Ζυγίζουμε 35g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml (σε θερμοκρασία δωματίου).

(δ) TCA 70%

Ζυγίζουμε 70g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 500μl TCA 35% και 500μl Tris-HCl. Έπειτα, προσθέτουμε 100μl πλάσμα(για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό) και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1ml Na₂SO₄-TBA και επωάζουμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια τα μεταφέρουμε στον πάγο, όπου τα αφήνουμε να κρυώσουν για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 1ml TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1ml από τους δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3 λεπτά ανά 12 Eppendorfs. Τέλος, μεταφέρουμε ποσότητα 900μl από το υπερκείμενο σε κυψελίδα με τη βοήθεια πιπέτας και μετράμε την απορρόφηση στα 530nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση των TBARS(μmol/l) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 x 31

όπου:

- 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100μl) με τον όγκο του ορού (100μl) ($3100 / 100 = 31$).
- Ο αριθμός 0,156 προέρχεται από τη διαίρεση του συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA, ο οποίος είναι 156000 (mol/L), με 10^{-6} , με σκοπό να

μετατραπούν τα mol/l σε $\mu\text{mol/l}$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/l.

•

3.3.2. Αναλύσεις στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Προσδιορισμός δραστηριότητας καταλάσης

Διαλύματα

(α) Phosphate buffer 67mM (pH 7,4), MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178

Για την παρασκευή 500 ml του Phosphate buffer αναμιγνύουμε αρχικά 100 ml διαλύματος KH_2PO_4 (67 mM) και 400 ml διαλύματος Na_2HPO_4 (67 mM). Για το διάλυμα KH_2PO_4 , ζυγίζουμε 0,91 g KH_2PO_4 και τα διαλύουμε σε 100 ml νερού. Για το διάλυμα Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4,77g Na_2HPO_4 και τα διαλύουμε σε 400 ml νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Προκειμένου να ρυθμιστεί το pH του παραγόμενου διαλύματος στο 7,4, αν χρειαστεί, προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1N.

(β) 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθήκη των παρακάτω όγκων σε πλαστικά σωληνάρια των 7ml:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67mM, pH 7,4	2991 μL
Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα αραιωμένο 1/10 με νερό	4 μL

Κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις διπλούν, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τα δείγματα φωτομετρούνται κατευθείαν μετά την επώαση. Ύστερα από ήπια ανάδευση στο vortex και επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 10 λεπτά, ακολούθησε μεταφορά του περιεχομένου του σωληναρίου σε UV γυάλινη κυψελίδα. Τέλος, προστέθηκαν 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, και ύστερα από ήπια ανάδευση με τη βοήθεια Parafilm, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 240 nm στα 5 και 125 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta \text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min}/40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/ml)}$

όπου:

- $\Delta \text{Abs}_{\text{sample}}$ είναι η διαφορά των απορροφήσεων του δείγματος στα 5 και 125 δευτερόλεπτα, διαιρεμένη δια 2,
- $\Delta \text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν, συνεπώς δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού,
- $U = \mu\text{mol/min}$
- 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 σε mol/l πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/ml}$,
- 750 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3000 μL) με τον όγκο του ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (4 μL) (3000/4=750),
- 10 είναι η αραιώση του δείγματος (1/10),
- 2 είναι η αραιώση των ερυθροκυττάρων με H_2O όταν λύνονται,
- Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μετατρέπεται σε mg/ml πολλαπλασιάζοντας την τιμή που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με 10x2. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας με το 10 μετατρέπεται σε g/L (mg/ml) και με το 2 λαμβάνεται υπόψη η αραιώση 1/1 κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων,
- Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης

Ο προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900, χρησιμοποιώντας έτοιμα αντιδραστήρια από την εταιρεία Ζαφειρόπουλος.

3.3.3. Αναλύσεις στον ορό

Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Διαλύματα

(α) Phosphate buffer 10 mM (pH 7,4), MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178

Για την παρασκευή 500 ml του Phosphate buffer αναμιγνύουμε αρχικά 100 ml διαλύματος KH_2PO_4 (10 mM) και 400 ml διαλύματος Na_2HPO_4 (10 mM). Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,136g KH_2PO_4 και τα διαλύουμε σε 100 ml νερού. Για το διάλυμα Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0,712g Na_2HPO_4 και τα διαλύουμε σε 400 ml νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Προκειμένου να ρυθμιστεί το pH του παραγόμενου διαλύματος στο 7,4, αν χρειαστεί, προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1N.

(β) DPPH(2,2-διφαινυλ-1-πικρυλνυδραζύλ) 0,1 mM, MB: 394,32

Διαλύουμε 0,02g DPPH σε 5 ml μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Ακολουθεί αραιώση 100 φορές με μεθανόλη και εκ νέου ανάδευση με μαγνητάκι. Παραδείγματος χάρη, αραιώνουμε 200 μl του διαλύματος DPPH (10 mM) σε 19,8 ml μεθανόλης, ποσό αρκετό για δέκα δείγματα συμπεριλαμβανομένου του τυφλού και το δείγμα θετικού ελέγχου.

Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 ml αρκεί για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο παρασκευάσαμε το DPPH, για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται τη μέρα του πειράματος.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθήκη των παρακάτω ποσοτήτων σε Eppendorfs:

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 10mM, pH 7,4	500 μl	480 μl
DPPH 0,1 mM	500 μl	500 μl
Ορός	-	20 μl

Ακολουθεί ανακίνηση των Eppendorfs και επώαση στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Ύστερα, φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25°C, προκειμένου να καταβυθιστούν σωματίδια που θα αυξήσουν την απορρόφηση. Μεταφέρουμε 900 μl από το υπερκείμενο κάθε Eppendorf με πιπέτα σε καθαρή πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την

πάροδο του χρόνου, συνεπώς είναι σημαντική η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

- i. ποσοστό μείωσης της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό
- ii. $\text{ποσοστό μείωσης της απορρόφησης (Abs)} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / (\text{Abs τυφλού}) \times 100$
- iii. $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{ml ορού} = [(\text{ποσοστό μείωσης της απορρόφησης (Abs)} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$

όπου:

- Η διαίρεση με το 100 αποσκοπεί στη μετατροπή της ποσοστιαίας μείωσης της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.
- Ο πολλαπλασιασμός με το 50 πραγματοποιείται, καθώς η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/l}$ της κυψελίδας.
- Ο πολλαπλασιασμός με το 50 πραγματοποιείται, διότι έχει γίνει αραίωση του ορού στην κυψελίδα κατά 50 φορές.
- Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα l ορού σε ml ορού.

Προσδιορισμός ολικής χολερυθρίνης

Ο προσδιορισμός της ολικής χολερυθρίνης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια βιοχημικού αναλυτή με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Ζαφειρόπουλος.

Αρχή μεθόδου

Η χολερυθρίνη αντιδρά με DPD σχηματίζοντας Azobilirubin, της οποίας η απορρόφηση στα 546nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χολερυθρίνης.

- Ολική χολερυθρίνη = Άμεση + Έμμεση χολερυθρίνη
- Bilirubin + DPD $\rightarrow$ Direct Azobilirubin
- Bilirubin + DPD + caffeine $\rightarrow$ Total Azobilirubin

Προσδιορισμός ουρικού οξέος

Ο προσδιορισμός του ουρικού οξέος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια βιοχημικού αναλυτή με τη χρήση αντιδραστηρίων της εταιρείας Ζαφειρόπουλος.

Αρχή μεθόδου

Παρουσία του ενζύμου ουρικάση, το ουρικό οξύ οξειδώνεται και παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο έπειτα αντιδρά με φαινολικό παράγωγο και την 4-αμινοφαιναζόνη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ενζύμο υπεροξειδάση (POD), παράγοντας ένα έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος στο δείγμα.

- Ουρικό οξύ + O_2 + $2\text{H}_2\text{O}$ $\xrightarrow{\text{ουρικάση}}$ αλλαντοΐνη + CO_2 + H_2O_2
- $2\text{H}_2\text{O}_2$ + φαινολικό παράγωγο + 4-αμινοφαιναζόνη $\xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}}$ έγχρωμο προϊόν + $4\text{H}_2\text{O}$.

3.4. Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων διπλής κατεύθυνσης (two-way repeated measures ANOVA) με ένα επαναλαμβανόμενο παράγοντα (χρόνος, πριν – μετά) και έναν ανεξάρτητο παράγοντα (συνθήκη, κεφίρ – εικονικό σκεύασμα), ώστε να εξεταστούν πιθανές μεταβολές σε διάφορες παραμέτρους, και να γίνει σύγκριση αυτών ανάλογα με το χορηγούμενο σκεύασμα. Σε όσες μεταβλητές παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη (post-hoc tests) με το κριτήριο LSD. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση ($MO \pm TA$). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS έκδοση 21.0 (SPSS Inc., ΗΠΑ).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τις ανθρωπομετρικές και φυσιολογικές παραμέτρους. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της συνθήκης [$F(1, 32) = 8.92, p = .005$] στη διαστολική πίεση. Εξέταση των ζευγαρωτών συγκρίσεων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < .005$) της διαστολικής πίεσης μόνο μετά την κατανάλωση του κεφίρ. Επιπλέον, μετά από την κατανάλωση κεφίρ φάνηκε ότι η διαστολική πίεση ήταν σημαντικά μικρότερη ($p < .05$) σε σύγκριση με την κατανάλωση εικονικού σκευάσματος. Τέλος, τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της συνθήκης [$F(1, 32) = 4.52, p = .041$] στη μέση αρτηριακή πίεση. Εξέταση των ζευγαρωτών συγκρίσεων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < .05$) της μέσης αρτηριακής πίεσης μετά την κατανάλωση κεφίρ.

Πίνακας 5: Ανθρωπομετρικές και φυσιολογικές παράμετροι ΠΡΙΝ και ΜΕΤΑ την κατανάλωση κεφίρ (K) και εικονικού σκευάσματος (PL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm TA$.

Παράμετρος	K		PL	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
Σωματικό βάρος (kg)	66,0 ± 12,2	66,2 ± 12,1	66,2 ± 12,5	66,3 ± 12,2
ΔΜΣ(kg/m ²)	23,5 ± 3,3	23,5 ± 3,3	23,5 ± 3,4	23,6 ± 3,3
Σωματικό λίπος(%)	28,6 ± 8,1	28,8 ± 7,3	28,9 ± 7,7	28,9 ± 7,9
Περίμετρος μέσης(cm)	77,9 ± 11,3	77,3 ± 10,9	77,3 ± 11,6	77,7 ± 11,2
Περίμετρος ισχίων(cm)	98,3 ± 7,9	99,4 ± 7,0	98,0 ± 7,8	98,8 ± 5,9
WHR	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
ΣΑΠ(mm Hg)	108,2 ± 11,2	104,2 ± 9,2	106,9 ± 14,2	106,4 ± 13,4
ΔΑΠ(mm Hg)	73,6 ± 7,5	67,3 ± 6,4*#	70,3 ± 8,8	73,3 ± 9,2
ΜΑΠ(mm Hg)	90,9 ± 8,9	85,8 ± 6,4**	88,6 ± 11,1	89,9 ± 10,3

ΚΣΗ	65,5±7,6	68,5±10,5	63,5±6,5	62,2±9,3
ΔΓ	7053,9±846,8	7167,6±1431,1	6829,4±1394,9	6678,1±1599,4

*Σημαντική (p<.05) διαφορά από αρχική τιμή (ΠΡIN) στην ίδια κατάσταση.

**Σημαντική (p<.005) διαφορά από αρχική τιμή (ΠΡIN) στην ίδια κατάσταση. #

Σημαντική διαφορά (p<.05) μεταξύ καταστάσεων στην ίδια χρονική στιγμή ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος; WHR: Waist to Hip Ratio (Λόγος περιφέρειας μέσης προς περιφέρειας ισχίων); ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση; ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση; ΜΑΠ: Μέση Αρτηριακή Πίεση; ΚΣΗ: Καρδιακή Συχνότητα Ηρεμίας; ΔΓ: Διπλό Γινόμενο (Γινόμενο καρδιακής συχνότητας ηρεμίας και συστολικής αρτηριακής πίεσης).

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τις παραμέτρους της φυσικής κατάστασης. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση για καμία από τις μεταβλητές που εξετάστηκαν.

Πίνακας 6: Παράμετροι φυσικής κατάστασης ΠΡIN και ΜΕΤΑ την κατανάλωση κεφίρ (Κ) και εικονικού σκευάσματος (PL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ΜΟ±ΤΑ.

Παράμετρος	Κ		PL	
	ΠΡIN	ΜΕΤΑ	ΠΡIN	ΜΕΤΑ
4 min				
Submaximal	40,6±9,2	42,7±7,5	40,9±11,4	41,1±8,6
Test				
Sit-and-reach	35,4±10,5	35,3±10,9	33,7±11,2	35,2±11,1
Test				
Push ups	15,6±7,2	15,7±7,4	15,4±8,1	16,7±8,9
Sit ups	19,4±4,0	19,6±1,8	19,0±5,2	19,1±3,2
Handgrip				
strength test	21,6±8,3	21,5±8,7	22,4±9,2	22,7±8,9
(left)				

Handgrip strength test (right)	23,6±8,4	23,2±9,1	23,2±8,3	23,9±8,7
---------------------------------------	----------	----------	----------	----------

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τις αιματολογικές παραμέτρους. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση για καμία από τις μεταβλητές που εξετάστηκαν.

Πίνακας 7: Παράμετροι εξέτασης γενικής αίματος ΠΡIN και ΜΕΤΑ την κατανάλωση κεφίρ (Κ) και εικονικού σκευάσματος (ΡΛ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ΜΟ±ΤΑ.

Παράμετρος	Κ		ΡΛ	
	ΠΡIN	ΜΕΤΑ	ΠΡIN	ΜΕΤΑ
WBC (10³/μl)	6,3±1,4	6,7±1,1	6,4±1,4	6,6±1,3
LYM (%)	37,0±6,2	38,1±5,0	37,9±7,0	37,9±5,6
MON (%)	5,2±1,1	5,2±1,0	5,1±1,1	5,3±1,1
GRA (%)	57,7±6,8	56,7±5,3	57,0±7,2	56,8±5,9
RBC (10⁶/μl)	4,9±0,4	4,8±0,3	4,9±0,4	4,8±0,4
HGB (g/dl)	13,6±1,8	13,4±1,7	13,3±1,7	13,4±1,7
Hct (%)	42,0±4,4	41,6±4,0	41,5±4,3	41,9±4,1
MCV (μm³)	86,2±7,6	86,7±7,7	85,8±7,7	86,6±8,0
MCH (pg)	27,8±3,0	27,9±3,0	27,5±3,0	27,8±3,1
MCHC (g/dl)	32,2±1,0	32,1±1,1	32,0±1,0	32,0±1,0

RDW (%)	14,8±1,4	14,9±1,4	15,0±1,3	14,8±1,7
Platelets (10³/μl)	241,2±46,3	247,1±39,4	245,2±42,6	243,7±51,0
MPV (μm³)	7,9±0,7	7,7±0,5	7,9±0,7	7,7±0,5
PCT (%)	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
PDW (%)	15,2±1,2	15,4±1,1	14,9±1,1	15,9±1,1

WBC: White blood cells; **LYM:** Lymphocytes; **MON:** Monocytes; **GRA:** Granulocytes; **RBC:** Red blood cells; **HGT:** Hemoglobin; **Hct:** Hematocrit; **MCV:** Mean corpuscular volume; **MCH:** Mean corpuscular hemoglobin; **MCHC:** Mean corpuscular hemoglobin concentration; **RDW:** Red cell distribution width; **MPV:** mean platelet volume; **PCT:** Plateletcrit; **PDW:** Platelet distribution width.

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τις παραμέτρους οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της συνθήκης [$F(1, 32) = 6.99, p = 0,013$], καθώς και στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου [$F(1, 32) = 4.63, p = 0,039$] στην ολική χολερυθρίνη. Εξέταση των ζευγαρωτών συγκρίσεων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση ($p < .005$) της ολικής χολερυθρίνης μόνο μετά την κατανάλωση του κεφίρ.

Πίνακας 8: Παράμετροι οξειδοαναγωγικής κατάστασης ΠΠΙΝ και ΜΕΤΑ την κατανάλωση κεφίρ (Κ) και εικονικού σκευάσματος (ΡΛ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ΜΟ±ΤΑ.

Παράμετρος	Κ		ΡΛ	
	ΠΠΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΠΙΝ	ΜΕΤΑ
TAC (μmol DPPH/mL)	0,88±0,17	0,95±0,11	0,92±0,12	0,98±0,22
Ουρικό οξύ (mg/dL)	4,4±0,9	4,5±1,1	4,2±1,0	4,3±1,1

Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	1,33±0,56	1,09±0,53**	1,15±0,56	1,17±0,62
CAT (U/mg Hb)	328,6±57,4	336,8±61,8	326,5±50,0	351,2±58,5
Αιμοσφαιρίνη (mg/mL)	324,1±48,3	319,7±35,8	319,1±44,1	301,1±33,1
TBARs (μmol/L)	5,1±1,0	4,9±1,0	5,1±1,3	5,0±1,2

**Σημαντική ($p<.005$) διαφορά από αρχική τιμή (ΠΠΙΝ) στην ίδια κατάσταση.
TAC: Total Antioxidant Capacity; **CAT:** Catalase; **TBARs:** Thiobarbituric acid reactive substances

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η συμπληρωματική λήψη ροφήματος κεφίρ από υγιή ενήλικα άτομα σε παραμέτρους που σχετίζονται με την ανθρωπομετρία, την αρτηριακή πίεση, την ανθρώπινη απόδοση, την γενική αίματος και το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η συμπληρωματική λήψη του κεφίρ οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων της διαστολικής αρτηριακής πίεσης και της μέσης αρτηριακής πίεσης. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μια μείωση στα επίπεδα της ολικής χολερυθρίνης μετά τη συμπληρωματική λήψη του κεφίρ.

Αναφορικά με τις ανθρωπομετρικές μετρήσεις, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή σε καμία από τις μεταβλητές που αξιολογήθηκαν. Τα αποτελέσματά μας συνάδουν με τα αποτελέσματα ορισμένων ερευνών που διεξήχθησαν, όπως οι μελέτες των Da Silva Ghizi και συνεργατών (2021), των Ostadrahimi και συνεργατών (2015) και των Lee και συνεργατών (2021), όπου στην πρώτη χορηγήθηκε κεφίρ για έντεκα εβδομάδες σε εθελοντές με υψηλό δείκτη μάζας σώματος και υψηλό ποσοστό λίπους, στη δεύτερη για οκτώ εβδομάδες σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και στην τρίτη για τέσσερις εβδομάδες σε υγιή άτομα. Σε καμία από τις τρεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις ανθρωπομετρικές παραμέτρους. Μη σημαντικές διαφορές σε ανθρωπομετρικούς δείκτες παρατηρήθηκαν και στη μελέτη των Bellikci-Koyu και των συνεργατών του, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις τιμές του σωματικού βάρους και του σωματικού λίπους, μεταξύ των ατόμων που κατανάλωσαν κεφίρ για δώδεκα εβδομάδες και των ατόμων που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου (Bellikci-Koyu et al, 2019). Ωστόσο, στοιχεία από άλλες έρευνες (Hosainzadegn et al, 2021; Fathi et al, 2015; Bellikci-Koyu et al, 2019) έρχονται σε σύγκρουση με τα παραπάνω, επισημαίνοντας τη σημαντική επίδραση του κεφίρ στην μείωση του βάρους. Στην πρώτη μελέτη (Hosainzadegn et al, 2021), η επίδραση του κεφίρ στην μείωση του βάρους ήταν αξιοσημείωτη, ύστερα από κατανάλωση αυτού για τρεις μήνες από άτομο με σακχαρώδη διαβήτη. Στη δεύτερη μελέτη (Fathi et al, 2015), ύστερα από το πέρας 8 εβδομάδων κατανάλωσης κεφίρ, σημειώθηκαν σημαντικές μειώσεις στο βάρος, στον δείκτη μάζας σώματος και στην περίμετρο μέσης. Και στις δύο προαναφερθείσες περιπτώσεις, η διαφορά αυτή των αποτελεσμάτων πιθανόν να οφείλεται στο μεγαλύτερο διάστημα κατανάλωσης του κεφίρ σε σύγκριση με την παρούσα μελέτη

που διήρκεσε 2 εβδομάδες. Επομένως, περισσότερες μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας μπορεί να αποσαφηνίσουν εάν η κατανάλωση κεφίρ επιφέρει ευνοϊκές αλλαγές σε αυτούς τους δείκτες.

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της έρευνας για τις φυσιολογικές παραμέτρους, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση του χρόνου και της κατάστασης στη διαστολική πίεση. Συγκεκριμένα, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση της διαστολικής πίεσης μόνο μετά την κατανάλωση του κεφίρ. Στοιχεία από ποικίλες έρευνες δείχνουν μείωση της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης, ύστερα από την κατανάλωση κεφίρ για διάστημα δώδεκα και έντεκα εβδομάδων, αντίστοιχα (Bellikci-Koyu et al, 2019; Da Silva Ghizi et al, 2021), γεγονός που σηματοδοτεί τον σπουδαίο ρόλο του κεφίρ στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και επιβεβαιώνεται η αντιυπερτασική επίδρασή του. Η κατανάλωση κεφίρ για μεγαλύτερο διάστημα στις συγκεκριμένες μελέτες πιθανόν αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα για την παρατήρηση της επίδρασης του κεφίρ στην αρτηριακή πίεση. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν πως η επίδραση που έχει η κατανάλωση κεφίρ μπορεί να επιφέρει σημαντική μείωση στα επίπεδα της διαστολικής και μέσης αρτηριακής πίεσης μετά από κατανάλωση δύο εβδομάδων. Επομένως, φαίνεται πως η επίδραση που έχει η κατανάλωση κεφίρ είναι αρκετά άμεση. Αλλαγές σε επίπεδο μικροβιώματος συνδέονται με μεταβολές στην αρτηριακή πίεση και πιθανόν αυτές να επέδρεσαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να εμφανιστεί η μείωση στα επίπεδα της διαστολικής και μέσης αρτηριακής πίεσης. Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εξετάσουν την οξεία επίδραση της κατανάλωσης κεφίρ καθώς επίσης και να γίνει μια διαχρονική εκτίμηση με ενδιάμεσα στάδια εκτίμησης (π.χ. εβδομαδιαία). Παράλληλα, θα μπορούσε να γίνει μια εκτίμηση του μικροβιώματος για να εξεταστεί η πιθανή σχέση μεταξύ αυτού του συστήματος και της αρτηριακής πίεσης.

Στην τρέχουσα μελέτη ύστερα από κατανάλωση κεφίρ για δύο εβδομάδες, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις μετρήσεις που αφορούν τις παραμέτρους της φυσικής κατάστασης. Αντιθέτως, στην μελέτη των Lee και συνεργατών (2021), όπου χορηγήθηκε κεφίρ σε υγιή άτομα για τέσσερις εβδομάδες, παρατηρήθηκε αποτελεσματική μείωση στην κόπωση μετά την άσκηση και βελτίωση της απόδοσης στην ομάδα που κατανάλωσε κεφίρ, σε σχέση με εκείνη που κατανάλωσε το εικονικό φάρμακο (Lee et al, 2021). Σε μελέτη των Hsu και συνεργατών (2018) που

έγινε σε ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε κεφίρ για τέσσερις εβδομάδες, παρατηρήθηκε βελτίωση στην αντοχή στην κολύμβηση και στη δύναμη λαβής (Hsu et al, 2018).

Σύμφωνα με τις μετρήσεις της έρευνας στις παραμέτρους εξέτασης γενικής αίματος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα μη ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών. Χαρακτηριστικά, σε μελέτη χορήγησης κεφίρ για τέσσερις εβδομάδες (Lee et al, 2021) σε υγιή άτομα, δεν παρατηρήθηκαν σπουδαίες διαφορές μεταξύ των ατόμων που κατανάλωσαν κεφίρ, συγκριτικά με εκείνους που κατανάλωσαν το εικονικό φάρμακο, όπου μετρήθηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια, η αναλογία ουδετερόφιλων προς λεμφοκύτταρα, η αναλογία αιμοπεταλίων προς λεμφοκύτταρα, καθώς και τα βασεόφιλα, ηωσινόφιλα και μονοκύτταρα. Αντίστοιχα αποτελέσματα σημειώθηκαν σε μελέτες με αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε κεφίρ για 21 και 7 ημέρες, αντίστοιχα (Dhia et al, 2021; Taheur et al, 2022).

Επιπρόσθετα, ακολούθησαν μετρήσεις στα επίπεδα γνωστών δεικτών οξειδωτικού στρες στο δείγμα της έρευνας. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η καταλάση (CAT), η αιμοσφαιρίνη, τα TBARS ως δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης, το ουρικό οξύ και η ολική χολερυθρίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στους προαναφερθέντες δείκτες δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μετά την κατανάλωση κεφίρ, εκτός από τη σημαντική μείωση των επιπέδων της χολερυθρίνης μετά την κατανάλωση κεφίρ. Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα έδειξαν πως δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της ολικής χολερυθρίνης μετά την κατανάλωση κεφίρ (Golli-Bennour et al, 2019). Στην μελέτη των Taheur και συνεργατών (2002), ύστερα από την χορήγηση κεφίρ για 7 ημέρες η ολική χολερυθρίνη είχε αντίστοιχη τιμή με την κατανάλωση εικονικού σκευάσματος (Taheur et al, 2022). Η διαφορά μεταξύ των προαναφερθέντων ερευνών και της παρούσας μελέτης μπορεί να οφείλεται και στη χρονική διάρκεια της κατανάλωσης του κεφίρ. Στις προηγούμενες μελέτες η χρονική διάρκεια ήταν της μιας εβδομάδας, ενώ η παρούσα μελέτη διήρκησε δύο εβδομάδες. Αποτελέσματα της έρευνας των Taheur και συνεργατών (2002), κατά την οποία χορηγήθηκε κεφίρ σε αρουραίους για 7 ημέρες έδειξαν μικρή αύξηση στη δραστητικότητα της καταλάσης στο ήπαρ, συγκριτικά με εκείνους που κατανάλωσαν το εικονικό σκεύασμα (γάλα) (Taheur et al, 2022). Απαιτούνται περισσότερες μελέτες μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας για

να μπορέσουν να αποσαφηνίσουν με περισσότερη ακρίβεια την επίδραση του κεφίρ σε παράγοντες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η συμπληρωματική λήψη του κεφίρ οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων της διαστολικής αρτηριακής πίεσης και της μέσης αρτηριακής πίεσης. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στα επίπεδα της ολικής χολερυθρίνης μετά τη συμπληρωματική λήψη του κεφίρ.

Μελλοντικές κλινικές δοκιμές θα είχε ενδιαφέρον να τροποποιήσουν την ποσότητα χορήγησης και τη χρονική διάρκεια κατανάλωσης του κεφίρ. Επιπλέον, θα μπορούσε να ερευνηθεί η επίδραση του φύλου των συμμετεχόντων στα αποτελέσματα, καθώς στην παρούσα έρευνα έλαβαν μέρος μόνο τέσσερις άνδρες. Περισσότερες πληροφορίες για την επίδραση του κεφίρ στο οξειδωτικό στρες θα μπορούσε επίσης να δώσει η μελέτη άλλων δεικτών οξειδωτικού στρες που δεν αναλύθηκαν στην συγκεκριμένη έρευνα, όπως τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η γλουταθειόνη. Τέλος, θα μπορούσε να γίνει μια εκτίμηση του μικροβιώματος για να εξεταστεί η πιθανή σχέση μεταξύ αυτού του συστήματος και της αρτηριακής πίεσης.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adiloğlu A.K., Gönülateş N., İşler M., Senol A. (2013). The effect of kefir consumption on human immune system: A cytokine study. *Mikrobiyol. Bul*, 47, 273–281.
- Ahmed Z., Wang Y., Ahmad A., Khan ST., Nisa M., Ahmad H. & Afreen A. (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53, 422-434.
- Aldini, G., Dalle-Donne, I., Facino, R. M., Milzani, A., & Carini, M. (2007). Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Medicinal Research Reviews*, 27(6), 817–868.
- Alves E., Ntungwe E.N., Gregório J., Rodrigues L.M., Pereira-Leite C., Caleja C., Pereira E., Barros L., Aguilar-Vilas M.V. & Rosado C. (2021). Characterization of Kefir Produced in Household Conditions: Physicochemical and Nutritional Profile, and Storage Stability. *Foods*, 10, 1057.
- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, & Hochstein P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 6858-62.
- Antunes F, Derick H, & Cadenas E. (2002) Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*, 33(9), 1260-7.
- Azizi NF, Kumar MR, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, Osman A, Mortadza S, & Alitheen NB. (2021). Kefir and Its Biological Activities. *Foods*, 10, 1210.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American Journal of Physiology*, 271(5), 1424-37.
- Bellikci-Koyu E., Sarer-Yurekli B., Akyon Y., Aydin-Kose F., Karagozlu C., Gokhan Ozgen A., Brinkmann A., Nitsche A., Ergunay K., Yilmaz E. & Buyuktuncer Z. (2019). Effects of Regular Kefir Consumption on Gut Microbiota in Patients with Metabolic Syndrome: A Parallel-Group, Randomized, Controlled Study. *Nutrients*, 4, 11(9):2089.

- Brantley RE., Smerdon SJ., Wilkinson AJ., Singleton EW. & Olson JS. (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem*, 268(10), 6995-7010.
- Chen C., Chan HM. & Kubow S. (2007). "Kefir extracts suppress in vitro proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells". *J Med Food*, 10(3), 416-22.
- Conrad CC., Marshall PL., Talent JM., Malakowsky CA., Choi J. & Gracy RW. (2000). Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 678-681.
- da Silva Ghizi A., de Almeida Silva M., de Andrade Moraes F., da Silva C., Coutinho Endringer D., Scherer R., Lenz D., de Lima E., Brasil G., Ferreira Maia J., Bissoli N. & de Andrade T. (2021). Kefir improves blood parameters and reduces cardiovascular risks in patients with metabolic syndrome. *PharmaNutrition*, 16.
- Dailin D.J., Elsayed E.A., Othman N.Z., Malek R., Phin H.S., Aziz R., Wadaan M. & Enshasy H.A. (2016). "Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens* in semi industrial scale bioreactor". *Saudi J Biol Sci*, 23, 495–502.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389–406.
- Damiana D. Rosa., Manoela M. S. Dias., Łukasz M. Grzes'kowiak., Sandra A. Reis., Lisiane L. Conceição., & Maria do Carmo G. Peluzio. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research*, 30, 82–96.
- Davies MJ. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 761-770.
- de Oliveira Leite AM., Miguel MA., Peixoto RS., Rosado AS., Silva JT. & Paschoalin VM. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol*, 44, 341-349.
- Dhia O., Lasram M., Harizi N., Doghri R., Charfi L., Souai N., Najjari A., Ouzari H. & Ben-Hadj-Khalifa S. (2021). Kefir milk alleviates benzene-induced immunotoxicity and hematotoxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(31), 42230-42242.

- Di Meo S. & Venditti P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, 10, 25-40.
- Durackova Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol Res*, 59, 459-469.
- El Golli-Bennour E., Timoumi R., Annaibi E., Mokni M., Omezzine A., Bacha H., Abid-Essefi S. (2019). Protective effects of kefir against deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(18):18856-18865.
- Farnworth E. (2005). “Kefir – a complex probiotic”. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1–17.
- Farnworth E.P. (2008). “The Evidence to Support Health Claims for Probiotics”. *J. Nutr*, 138, 1250S–1254.
- Fathi Y., Faghih S., Zibaenezhad M. J. & Tabatabaei S. (2015). Kefir drink leads to a similar weight loss, compared with milk, in a dairy-rich non-energy-restricted diet in overweight or obese premenopausal women: a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 55(1).
- Fiorda F.A., de Melo Pereira G.V., Thomaz-Soccol V., Rakshit S.K., Pagnoncelli M.G.B., Vandenberghe L.P.d.S. & Soccol C.R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation—A review. *Food Microbiol*, 66, 86–95.
- Floor E. & Wetzell MG. (1998). Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *JNeurochem*, 70, 268-275.
- Gaetani GF., Kirkman HN., Mangerini R. & Ferraris AM. (1994). Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 84, 325-330.
- Ghoneum M. & Felo N. (2015). “Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by *Lactobacillus kefir* (PFT), a novel kefir product”. *Oncol Rep*, 34(4), 1659-66.
- Giasson BI., Duda JE, Murray IV., Chen Q., Souza JM., Hurtig HI., Ischiropoulos H., Trojanowski JQ. & Lee VM. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290, 985-989.

- Glantzounis, G., Tsimoyiannis, E., Kappas, A., & Galaris, D. (2005). Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, 11(32), 4145–4151.
- Green, H. J. & Fraser, I. G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 20(1), 55–59.
- Guo Z., Liu XM., Zhang QX., et al. (2011). Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 21, 844–850.
- Guzel-Seydim Z.B., Kok-Tas T., Greene AK. & Seydim AC. (2011). “Review: functional properties of kefir”, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(3), 261-268.
- Halliwell B. & Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57,715-724.
- Halliwell B. & Gutteridge JMC. (2015). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications, Sixth Edition
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52, 253-265.
- Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-50.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Honkanen R., Alhava EM., Saarikoski S. & Tuppurainen M. (1991). “Osteoporosis risk factors in perimenopausal women”. *Calcified Tissue International*, 49(1), 74–75.
- Hosainzadegn H. & Hosainzadegan M. (2021). Traditional Probiotic (Kefir) Effects on Glycated Hemoglobin A Level and Weight of an Indexed Diabetic Patient. *Int J Prev Med*, 26, 139.
- Hsu Y., Huang W., Lin J., Chen Y., Ho S., Huang C. & Tung Y. (2018). Kefir Supplementation Modifies Gut Microbiota Composition, Reduces Physical Fatigue, and Improves Exercise Performance in Mice. *Nutrients*, 4;10(7), 862.
- Iovine, N. M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M. J. & Weinrauch, Y. (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 76(3), 986–993.

- Iyer C., Kusters A., Sethi G., Kunnumakkara A.B., Aggarwal B.B. & Versalovic J. (2008). "Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signaling". *Cell Microbiology*, 10(7), 1442-52.
- Jenkins RR. (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med*, 5, 156-70.
- Jones DP. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10), 1865-79.
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 131(8), 2082–2089.
- Kesekas H., Yelikaya O. & Ozer E. (2013). "A functional milk beverage: Kefir", *Agro Food Industry Hi Tech*, 24(6), 53-55.
- Koroleva, N.S. (1991). in Robinson, R.K. (Ed.), *Products Prepared with Lactic Acid Bacteria and Yeasts, Therapeutic Properties of Fermented Milk*, Elsevier Applied Science, Barking, pp. 159-79.
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S.
- Lee M., Jhang W., Lee C., Kan N., Hsu Y., Ho C., Chang C., Cheng Y., Lin J. & Huang C. (2021). The Effect of Kefir Supplementation on Improving Human Endurance Exercise Performance and Antifatigue. *Metabolites*, 25(3), 136.
- Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixot R.S., Rosado A.S. & Silva J.T. (2013). "Paschoalin V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage", *Braz J Microbiol*, 44(2), 341–349.
- Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 32(9), 790-6.
- Liu Je-Ruei, Lin Chin-Wen. (2008). Production of Kefir from Soymilk With or Without Added Glucose, Lactose, or Sucrose. *Journal of Food Science*, 65(4), 716-719.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Looker AC., Orwoll ES. & Johnston CC Jr. (1997). "Prevalence of low femoral bone density in older US adults from NHANES III". *J Bone Miner Res*, 12, 1761-1768.
- Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N. & Garaizar J. (2006). "Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities". *Rev Iberoam Micol*, 23(2), 67-74.
- Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligne B., Ganzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J. & Hutkins R. (2017). "Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond". *Current Opinion in Biotechnologyn*, 44, 94-102.
- Markoulis, N., Gourgoulisanis, K. I., Moulas, A., Gerogianni, E., & Molyvdas, A. P. (2006). Reactive oxygen metabolites as an index of chronic obstructive pulmonary disease severity. *Panminerva Medica*, 48(4), 209–213.
- Marquina, D., Santos, A., Corpas, I., Munoz, J., Zazo, J., & Pienado, J.M. (2002). "Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel". *Lett. Appl. Microbiol*, 35, 136–140.
- Marrocco, I., Altieri, F. & Peluso, I. (2017). Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–32.
- Miao J., Guo H., Ou Y., Liu G., Fang X., Liao Z., Ke C., Chen Y., Zhao L., & Cao Y. (2014). "Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet", *China Food Control*, 42, 48-53.
- Mylonas C. & Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13, 295-309.
- Ostadrahimi A., Taghizadeh A., Mobasser M., Farrin N., Payahoo L., Beyramalipoor Gheshlaghi Z. & Vahedjabbari M. (2015). Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iran J Public Health*, 44(2), 228-237.

- Otles S. & Cagindi O. (2003). “Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects”. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2 (2), 54-59.
- Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell’s escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378.
- Pisoschi A. & Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Elsevier European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011.
- Prado MR., Blandon LM., Vandenberghe LPS., Rodrigues C., Castro GR., Thomaz-Soccol V. & Soccol C. (2015). “Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products”. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1177.
- Pranav K. Singh. & Nagendra P. Shah. (2017). Other Fermented Dairy Products: Kefir and Koumiss. In *Yoghurt in Health and Disease Prevention*, Elsevier/Academic Press, ISBN 13: 9780128051344.
- Quirós A., Hernández-Ledesma B., Ramos M., et al. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J Dairy Sci*, 88, 3480–3487.
- Rosa DD., Dias MMS., Grzeskowiak LM., Reis SA., Conceicao LL. & Peluzio M. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev* 30, 82-96.
- Saxena, A., Sonowal, H. & Ramana, K. V. (2009). Transcriptional Factor Modulation by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. *The Molecular Nutrition of Fats*, 419–431.
- Sengupta, A., Ghosh, S. & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 5(3), 237–245.
- Sharifi M., Moridinia A., Mortazavi D., Salehi M., Bagheri M. & Sheikhi A. (2017). “Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties”. *Med Oncol*, 34, 183.
- Sharma, G. N., Gupta, G. & Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 28(2), 139–154.

- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 31S–38S.
- Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G., Spasov Z. (2002). “Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them”. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 1–6.
- Sugamura K., Makino M., Shirai H., Kimuna O., Maeta M., Itoh H. & Kaibara N. (2011). “Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil”. *Cancer*, 1;79(1), 12-7.
- Surono I.S. & Hosono, (2011). Fermented milks “Types and standards of Identity. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (pp. 470-476).
- Taheur F., Mansour C., Mechri S., Laaouar H., Skhiri S., Bouricha M., Jaouadi B., Mzoughi R. & Zouaricorresponding N. (2022). Protective effects of dietary Kefir against aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in Nile tilapia fish, *Oreochromis niloticus*. *Food Sci Nutr.*, 10(7), 2300–2311.
- Tamime AY. (2006). *Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products*. Tamime AY, editor. Fermented Milk. Blackwell Science Ltd. pp. 174–216.
- Vainio, H. (1999). Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story. *British Medical Bulletin*, 55(3), 593–599.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M. & Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
- Veskoukis AS., Tsatsakis AM. & Kouretas D. (2012a). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*, 17(1), 11-21.
- Veskoukis AS., Kyparos A., Nikolaidis MG., Stagos D., Aligiannis N., Halabalaki M., Chronis K., Goutzourelas N., Skaltsounis L. & Kouretas D. (2012b). The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev*, 185867.

Young IS. & McEneny J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, 29(2), 358-62.

Zhou J., Liu X., Jiang H., et al. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol*, 26, 770–775.

VIII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1

Έντυπο συναίνεσης δοκιμαζόμενου σε ερευνητική εργασία

Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος

Τίτλος Μελέτης: «Η επίδραση του κεφίρ στο οξειδωτικό στρες ενήλικων ατόμων».

Εργαστήριο υλοποίησης της μελέτης: Κέντρο Έρευνας και αξιολόγησης της Απόδοσης, ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση του κεφίρ στο οξειδωτικό στρες ενήλικων ατόμων.

Διαδικασία μετρήσεων

Οι συμμετέχοντες θα επισκεφτούν το εργαστήριο πέντε φορές. Κατά την πρώτη επίσκεψή τους θα γίνουν οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, ποσοστό σωματικού λίπους, μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου, μέγιστη δύναμη). Έπειτα θα δοθούν πλήρεις οδηγίες για τον τρόπο καταγραφής της διατροφής τους για τρεις μέρες.

Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί η δεύτερη επίσκεψή τους στο εργαστήριο, όπου θα γίνει η πρώτη αιμοληψία, ενώ θα τους δοθεί σε καθέναν ξεχωριστά η ακριβής ποσότητα κεφίρ ή εικονικού συμπληρώματος (ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκουν), την οποία θα πρέπει να καταναλώνουν συμπληρωματικά για τις ακόλουθες δύο εβδομάδες. Η ποσότητα του κεφίρ που οφείλει να καταναλώνει καθημερινά ο κάθε εθελοντής είναι 150ml το πρωί και 150ml το απόγευμα.

Με το πέρας του χρονικού διαστήματος αυτού, οι συμμετέχοντες θα επισκεφτούν ξανά το εργαστήριο, όπου θα γίνει η δεύτερη αιμοληψία. Ο κάθε εθελοντής θα επαναλάβει για τρεις ημέρες τη διατροφή που θα έχει ήδη καταγράψει πριν από την πρώτη αιμοληψία.

Θα ακολουθήσει ένα διάστημα 2 εβδομάδων, όπου οι συμμετέχοντες δεν θα λαμβάνουν ποσότητα κεφίρ ή εικονικού συμπληρώματος (wash-out). Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, θα πραγματοποιηθεί η τέταρτη επίσκεψη στο εργαστήριο, όπου θα γίνει η τρίτη αιμοληψία. Έπειτα, θα συνεχιστεί η κατανάλωση κεφίρ ή εικονικού συμπληρώματος, με τη διαφορά ότι οι συμμετέχοντες που αρχικά κατανάλωναν κεφίρ θα λάβουν το εικονικό συμπλήρωμα και το αντίστροφο.

Η τελευταία αιμοληψία (τέταρτη) θα πραγματοποιηθεί ύστερα από δύο εβδομάδες.

Κίνδυνοι και ενοχλήσεις

Αιμοληψία:

Θα χρησιμοποιηθεί μία μικρή βελόνα σύριγγας για τη λήψη φλεβικού αίματος από τη μεσοβασιλική φλέβα. Υπάρχει πιθανότητα μικρού μώλωπα στο σημείο της αιμοληψίας, ενώ ο εθελοντής μπορεί να αισθανθεί πόνο κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας και ζαλάδα ή τάσεις λιποθυμίας τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά από την αιμοληψία. Σε κάθε δείγμα η συνολική ποσότητα αίματος που θα ληφθεί από έμπειρο γιατρό θα είναι 10ml η οποία δεν θα έχει απολύτως καμία αρνητική συνέπεια.

Προσδοκώμενες ωφέλειες

Τα ευρήματα από την εργασία θα δώσουν την δυνατότητα στους συμμετέχοντες να μάθουν ποιο είναι το ποσοστό του σωματικού λίπους, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και την ποιότητα της διατροφής τους.

Δημοσίευση δεδομένων – αποτελεσμάτων

Η συμμετοχή σου στην έρευνα συνεπάγεται ότι συμφωνείς με τη δημοσίευση των δεδομένων και των αποτελεσμάτων της, με την προϋπόθεση ότι οι πληροφορίες θα είναι ανώνυμες και δε θα αποκαλυφθούν τα ονόματα των συμμετεχόντων. Τα δεδομένα που θα συγκεντρωθούν θα κωδικοποιηθούν με αριθμό, ώστε το όνομα σου δε θα φαίνεται πουθενά.

Πληροφορίες

Μη διστάσεις να κάνεις ερωτήσεις γύρω από το σκοπό ή/και τον τρόπο πραγματοποίησης της εργασίας. Αν έχεις κάποιες αμφιβολίες ή ερωτήσεις, ζήτησέ μας να σου δώσουμε πρόσθετες εξηγήσεις.

Ελευθερία συναίνεσης

Η άδειά σου να συμμετάσχεις στην εργασία είναι εθελοντική. Είσαι ελεύθερος να μην συναινέσεις ή να διακόψεις τη συμμετοχή σου όποτε επιθυμείς.

Διάβασα το έντυπο αυτό και κατανοώ τις διαδικασίες που θα εκτελέσω. Συναινώ να συμμετέχω στην εργασία.

Ημερομηνία: __/__/__

Ονοματεπώνυμο και υπογραφή
συμμετέχοντος

Υπογραφή ερευνητή

Ονοματεπώνυμο και
υπογραφή παρατηρητή

Παράρτημα 2

Ερωτηματολόγιο υγείας

Όνοματεπώνυμο:

Ημερομηνία:

Παρακαλώ συμπληρώστε

1. Έχετε κάποιο πρόβλημα υγείας για το οποίο
Α) είστε υπό φαρμακευτική αγωγή ναι [] όχι []
Β) είστε υπό ιατρική παρακολούθηση ναι [] όχι []

2. Τα τελευταία 2 χρόνια, εξαιτίας κάποιας ασθένειας
Α) επισκεφτήκατε το γιατρό σας ναι [] όχι []
Β) επισκεφτήκατε εξωτερικά ιατρεία ναι [] όχι []
Γ) μείνατε στο νοσοκομείο ναι [] όχι []

3. Είχατε ποτέ κάποια από τις παρακάτω καταστάσεις;
Α) Επιληψία ναι [] όχι []
Β) Έκζεμα ναι [] όχι []
Γ) Διαβήτης ναι [] όχι []
Δ) Άσθμα ναι [] όχι []
Ε) Καρδιαγγειακά νοσήματα ναι [] όχι []
Ζ) Πεπτικά προβλήματα ναι [] όχι []
Η) Προβλήματα γυναικολογικά ναι [] όχι []
Θ) Προβλήματα οστών και αρθρώσεων ναι [] όχι []
Ι) Προβλήματα ισορροπίας και συναρμογής ναι [] όχι []
Κ) Προβλήματα όρασης/ ακοής ναι [] όχι []
Λ) Προβλήματα θυρεοειδούς ναι [] όχι []
Μ) Ορμονικά προβλήματα ναι [] όχι []
Ν) Προβλήματα ήπατος και νεφρών ναι [] όχι []
Ξ) Μούδιασμα άκρων ναι [] όχι []
Ο) Άλλα προβλήματα ναι [] όχι []

4. Αν είστε γυναίκα
Α) σχεδιάζετε να μείνετε έγκυος ναι [] όχι []
Β) είστε η νομίζετε ότι είστε έγκυος ναι [] όχι []
Γ) παίρνετε χάπια αντισύλληψης ή ορμόνες ναι [] όχι []
Δ) είστε στην εμμηνόπαυση ναι [] όχι []

5. Κάποιος από τους συγγενείς πρώτου βαθμού είχε
Α) Καρδιαγγειακά προβλήματα ναι [] όχι []
Β) Διαβήτη ναι [] όχι []

Παράρτημα 3

Η υγεία και η ευημερία σας

Το ερωτηματολόγιο αυτό ζητά τις δικές σας απόψεις για την υγεία σας. Οι πληροφορίες σας θα μας βοηθήσουν να εξακριβώσουμε πώς αισθάνεστε και πόσο καλά μπορείτε να ασχοληθείτε με τις συνηθισμένες δραστηριότητές σας. Σας ευχαριστούμε για τη συμπλήρωση αυτού του ερωτηματολογίου!

Παρακαλούμε, σε κάθε ερώτηση που ακολουθεί σημειώστε με ☒ το πλαίσιο που περιγράφει καλύτερα την απάντησή σας.

1. Γενικά, θα λέγατε ότι η υγεία σας είναι:

Άριστη	Πολύ καλή	Καλή	Μέτρια	Κακή
☐	☐	☐	☐	☐
☐ 1	☐ 2	☐ 3	☐ 4	☐ 5

2. Οι παρακάτω προτάσεις περιέχουν δραστηριότητες που μπορεί να κάνετε κατά τη διάρκεια μιας συνηθισμένης ημέρας. Η τωρινή κατάσταση της υγείας σας, σας περιορίζει σε αυτές τις δραστηριότητες; Εάν ναι, πόσο;

Ναι, με περιορίζει πολύ	Ναι, με περιορίζει λίγο	Όχι, δεν με περιορίζει καθόλου
☐	☐	☐

Σε μέτριας έντασης δραστηριότητες, όπως η μετακίνηση ενός τραπεζιού, το σπρώξιμο μιας ηλεκτρικής σκούπας, το κολύμπι ή όταν παίζετε ρακέτες στην παραλία ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

Όταν ανεβαίνετε μερικές σειρές από σκαλοπάτια ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

3. Τις τελευταίες 4 εβδομάδες, πόσο συχνά είχατε κάποια από τα παρακάτω προβλήματα στη δουλειά σας ή σε άλλες συνηθισμένες καθημερινές δραστηριότητες ως αποτέλεσμα της κατάστασης της σωματικής σας υγείας;

	Συνεχώς	Τις περισσότερες φορές	Μερικές φορές	Λίγες φορές	Καθόλου
a. <u>Καταφέρατε λιγότερα από όσα θα θέλατε</u>	☐	☐	☐	☐	☐
b. <u>Περιορίσατε το είδος δουλειάς ή άλλων δραστηριοτήτων σας</u>	☐	☐	☐	☐	☐

4. Τις τελευταίες 4 εβδομάδες, πόσο συχνά είχατε κάποια από τα παρακάτω προβλήματα στη δουλειά σας ή σε άλλες συνηθισμένες καθημερινές δραστηριότητες ως αποτέλεσμα οποιουδήποτε συναισθηματικού προβλήματος (όπως επειδή νοιώσατε μελαγχολία ή άγχος);

	Συνεχώς	Τις περισσότερες φορές	Μερικές φορές	Λίγες φορές	Καθόλου
a. <u>Κάνατε λιγότερα από όσα θα θέλατε</u>	☐	☐	☐	☐	☐
b. <u>Κάνατε τη δουλειά ή άλλες δραστηριότητες λιγότερο προσεκτικά απ' ότι συνήθως</u>	☐	☐	☐	☐	☐

5. Τις τελευταίες 4 εβδομάδες, πόσο επηρέασε ο πόνος τη συνηθισμένη εργασία σας (τόσο την εργασία έξω από το σπίτι όσο και μέσα σε αυτό);

Καθόλου	Λίγο	Μέτρια	Σε μεγάλο βαθμό	Υπερβολικά
☐	☐	☐	☐	☐

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

6. Οι παρακάτω ερωτήσεις αναφέρονται στο πώς αισθανόσαστε και στο πώς τα πράγματα πήγαιναν με σας τις τελευταίες 4

Συνεχώς	Τις περισσότερες φορές	Μερικές φορές	Λίγες φορές	Καθόλου
☐	☐	☐	☐	☐
☐ 1	☐ 2	☐ 3	☐ 4	☐ 5

εβδομάδες. Για κάθε ερώτηση, παρακαλείστε να δώσετε εκείνη την απάντηση που πλησιάζει περισσότερο σε ό,τι αισθανθήκατε. **Τις τελευταίες 4 εβδομάδες**, για πόσο χρονικό διάστημα...

	Συνεχώς	Τις περισσότερες φορές	Μερικές φορές	Λίγες φορές	Καθόλου
a Αισθανόσασταν ηρεμία και γαλήνη;	☐	☐	☐	☐	☐
b Είχατε πολλή ενεργητικότητα;	☐	☐	☐	☐	☐
c Αισθανόσασταν κακοκεφιά και μελαγχολία;	☐	☐	☐	☐	☐

7. Τις τελευταίες 4 εβδομάδες, για πόσο χρονικό διάστημα επηρέασαν τις κοινωνικές σας δραστηριότητες (π.χ. επισκέψεις σε φίλους, συγγενείς κλπ.) η κατάσταση της σωματικής σας υγείας ή συναισθηματικά σας προβλήματα;

Σας ευχαριστούμε για το χρόνο σας!