



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη της επίδρασης της δεκαήμερης νηστείας της κλινικής Buchinger Wilhelmi σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης.»**



**ΒΑΣΣΗ ΕΛΕΝΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2021**

**«Μελέτη της επίδρασης της δεκαήμερης νηστείας της  
κλινικής Buchinger Wilhelmi σε δείκτες οξειδοαναγωγικής  
κατάστασης.»**

ΒΑΣΣΗ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος  
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

**«Influence of Long-Term Fasting on Blood Redox Status in  
Humans. »**

VASSI ELENI

Supervisor Professor: Kouretas Dimitrios  
Laboratory of animal physiology

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Κουρέτας Δημήτριος** (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών  
Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Στάγκος Δημήτριος:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών Τοξικολογίας,  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Βεσκούκης Αριστείδης:** Επίκουρος Καθηγητής Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας της  
Διατροφής και τη Άσκησης, Τμήμα Διατροφολογίας και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να αναλάβω μια τόσο σημαντική και ενδιαφέρουσα πτυχιακή εργασία καθώς και για την καθοδήγηση του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον μεταδιδάκτορα Νικόλαο Γκουτζουρέλα για την βοήθεια του κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας, καθώς και όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για το φιλικό κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους να βοηθήσουν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

## Περίληψη

Η νηστεία χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για τη βελτίωση της υγείας, καθώς και για τα κυτταροπροστατευτικά της αποτελέσματα. Οι αλλαγές στην κατάσταση της οξειδοαναγωγής του αίματος, που συνδέονται με την ανάπτυξη μιας ποικιλίας μεταβολικών ασθενειών, έχουν τεκμηριωθεί πρόσφατα κατά τη διάρκεια του περιορισμού των θερμίδων και της διαλειμματικής νηστείας, αλλά όχι με τη μακροχρόνια νηστεία. Έχουν διεξαχθεί μόνο λίγες μελέτες για μεγαλύτερες περιόδους νηστείας σε μεγάλες ομάδες, συμπεριλαμβανομένων μη παχύσαρκων συμμετεχόντων. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να τεκμηριώσει την ασφάλεια και τυχόν αλλαγές στη βασική υγεία και δείκτες οξειδοαναγωγής κατά τη μακροχρόνια νηστεία σε μια εξειδικευμένη κλινική. Διερευνήθηκαν ορισμένες παράμετροι του προφίλ οξειδοαναγωγής αίματος σε 109 άτομα πριν και μετά από περίοδο νηστείας 10 ημερών. Η νηστεία είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, βελτιωμένη ευεξία και είχε ευεργετική επίδραση ρύθμισης στα λιπίδια του αίματος και στη ρύθμιση της γλυκόζης. Παρατηρήθηκε ότι η νηστεία μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων (TBARS) ενώ αύξησε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στο πλάσμα, ταυτόχρονα με αύξηση του ουρικού οξέος, που είναι γνωστό ότι αυξάνεται με τη νηστεία. Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οι υπεροξειδωμένες πρωτεΐνες (CARBS), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) και η καταλάση στα ερυθροκύτταρα δεν έδειξαν σημαντικές αλλαγές. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με την ομαδοποίηση ατόμων βάσει των αλλαγών στα επίπεδα GSH τους, δείχνοντας ότι μια περίοδος 10 ημερών νηστείας βελτιώνει την κατάσταση οξειδοαναγωγής αίματος ανεξάρτητα από την κατάσταση GSH στο αίμα.

## Abstract

Fasting is increasingly practiced to improve health and general well-being, as well as for its cytoprotective effects. Changes in blood redox status, linked to the development of a variety of metabolic diseases, have been recently documented during calorie restriction and intermittent fasting, but not with long-term fasting (LF). Only few studies document longer periods of fasting in large cohorts including non-obese participants. The aim of this study was to document the safety and any changes in basic health and redox indicators during long term fasting within a specialised clinic. We investigated some parameters of the blood redox profile in 109 subjects before and after a 10-day fasting period. Fasting resulted in a significant reduction in body weight, improved well-being and had a beneficial modulating effect on blood lipids and glucose regulation. We observed that fasting decreased lipid peroxidation (TBARS) and increased total antioxidant capacity (TAC) in plasma, concomitant with a uric acid elevation, known to be associated with fasting and did not cause gout attacks. Reduced glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and catalase in erythrocytes did not show significant changes. In addition, reduction in body weight, waist circumference, and glucose levels were associated to a reduced lipid peroxidation. Similar results were obtained by grouping subjects on the basis of the changes in their GSH levels, showing that a period of 10 days fasting improves blood redox status regardless of GSH status in the blood.

## Πίνακας περιεχομένων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ .....	- 2 -
Ευχαριστίες .....	- 3 -
Περίληψη .....	- 4 -
Abstract .....	- 5 -
Κατάλογος διαγραμμάτων .....	- 8 -
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	- 9 -
1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών.....	- 10 -
1.3 Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου .....	- 12 -
1.3.1 Θετικές επιδράσεις.....	- 12 -
1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις.....	- 12 -
1.4 Οξειδωτικό στρες.....	- 13 -
1.5 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	- 14 -
1.5.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	- 15 -
1.6 Νηστεία.....	- 16 -
1.6.1 Ιστορική αναδρομή – Νηστεία στην φύση .....	- 16 -
1.6.3 Μεταβολική αλλαγή (Metabolic switch) .....	- 18 -
1.6.4 Νηστεία και επιπτώσεις .....	- 19 -
1.6.5 Περιοδική νηστεία .....	- 21 -
2. Σκοπός.....	- 23 -
3. Μέθοδοι και υλικά .....	- 24 -
3.1 Συμμετέχοντες .....	- 24 -
3.2 Πρωτόκολλο νηστείας .....	- 24 -
3.3 Κλινικά δεδομένα .....	- 24 -
3.4 Πρωτόκολλα προσδιορισμού οξειδοαναγωγικών δεικτών στο αίμα.....	- 25 -
3.4.3 Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH).....	- 26 -
3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) .....	- 27 -
3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουτυρικό οξύ (TBARS).....	- 27 -
3.4.6 Δραστικότητα Καταλάσης (CAT) .....	- 28 -
3.4.7 Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	- 29 -
3.4.8 Δραστηριότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx).....	- 30 -
3.4.9 Δραστικότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) .....	- 31 -
3. Στατική ανάλυση.....	- 32 -
4.Αποτελέσματα.....	- 33 -
4.1. Κλινικά αποτελέσματα .....	- 33 -
4.2 Αποτελέσματα στους δείκτες οξειδοαναγωγής .....	- 34 -
4.2.1Εκτίμηση αντιοξειδωτικών παραγόντων .....	- 34 -

4.2.1.1 Εκτίμηση επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) πριν και μετά τη νηστεία .	- 34 -
4.2.2.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πριν και μετά τη νηστεία.....	- 35 -
4.2.3 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες.....	- 35 -
4.2.3.1 Προσδιορισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης πριν και μετά τη νηστεία .....	- 35 -
4.2.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης πριν και μετά τη νηστεία....	- 36 -
4.2.5 Προσδιορισμός δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (GR, GPx, Cat)	- 37 -
4.2.6 Ομαδοποίηση συμμετεχόντων με βάση την τιμή της GSH .....	- 38 -
5. Συζήτηση .....	- 40 -
Βιβλιογραφία .....	- 44 -

## **Κατάλογος πινάκων**

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου .....	- 9 -
Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου .....	- 9 -
Πίνακας 3. Ενδογενή αντιοξειδωτικά .....	- 15 -
Πίνακας 4. Εξωγενή αντιοξειδωτικά .....	- 16 -
Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης .....	- 26 -
Πίνακας 6. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της TAC.....	- 27 -
Πίνακας 7. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων και μεθολογία για τον προσδιορισμό των TBARS .....	- 28 -
Πίνακας 8. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων και μεθολογία για τον προσδιορισμό της καταλάσης.....	- 29 -
Πίνακας 9. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx).....	- 31 -
Πίνακας 10. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αναγωγάσης της γλουταθειόνης(GR).....	- 32 -
Πίνακας 11. Αποτελέσματα κλινικών δεικτών πριν και μετά τη νηστεία .....	- 33 -

## **Κατάλογος εικόνων**

Εικόνα 1 . Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οξειδωτική φωσφορυλίωση .....	- 10 -
Εικόνα 2 . Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελεύθερων ριζών .....	- 11 -



Εικόνα 3. Οξειδωτικό στρες .....	- 13 -
Εικόνα 4. Δράση αντιοξειδωτικών μορίων.....	- 14 -
Εικόνα 5. Αντιδράσεις αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	- 15 -
Εικόνα 6. Ενεργοποίηση αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού mTOR-ULK1/ATG	- 19 -
Εικόνα 7. Ενεργοποίηση αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού mTOR-TFEB .....	- 20 -
Εικόνα 8. Μονοπάτι SIRT1 σε απόκριση στη νηστεία.....	- 20 -
Εικόνα 9. Ενεργοποίηση μονοπατιού Nrf2.....	- 21 -
Εικόνα 10. Συνολικά αποτελέσματα έρευνας.....	- 39 -

## Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Επίπεδα γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία. Το * συμβολίζει ακραία τιμή. ....	- 34 -
Διάγραμμα 2. Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πριν και μετά τη νηστεία. * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των ατόμων πριν και μετά τη νηστεία. Το * συμβολίζει ακραία τιμή.....	- 35 -
Διάγραμμα 3. Επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης πριν και μετά τη νηστεία. * $p < 0,05$ στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των ατόμων πριν και μετά τη νηστεία .....	- 36 -
Διάγραμμα 4. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης πριν και μετά τη νηστεία.....	- 36 -
Διάγραμμα 5. Δραστηκότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία. Το * συμβολίζει ακραία τιμή.....	- 37 -
Διάγραμμα 6. Δραστηκότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία. Το * συμβολίζει ακραία τιμές.....	- 37 -
Διάγραμμα 7. Δραστηκότητα του ενζύμου καταλάσης πριν και μετά τη νηστεία ..	- 38 -

## 1.Εισαγωγή

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται μόρια ή και άτομα που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα και έχουν τη δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (Halliwell et al., 1990). Η δημιουργία τους γίνεται είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στιβάδα. (Mylonas & Kouretas., 1999) Τα μόρια αυτά λόγω της αστάθειας τους είναι ιδιαίτερα δραστικά και μπορούν να προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια όπως νουκλεικά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια και εν τέλει να δημιουργήσουν βλάβες στη λειτουργία του κυττάρου και κατά επέκταση του οργανισμού( Lobo et al., 2010).

Οι ελεύθερες ρίζες που συναντώνται συχνά στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές  $O_2$  (οξυγόνου) (Πίνακας 1) καθώς και ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το  $N_2$  (άζωτο) (Πίνακας 2) (Sengupta et al., 2004).

**Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου**

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	Σύμβολο
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	$OH \cdot$
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	$O_2$
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	$O_2 \cdot^-$
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxy Radical)	$RO \cdot$
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxyl Radical)	$ROO \cdot$
Όζον (Ozone)	$O_3$
Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	$H_2O_2$
Υδροϋπεροξειδίο (Hydroperoxide)	$ROOH$

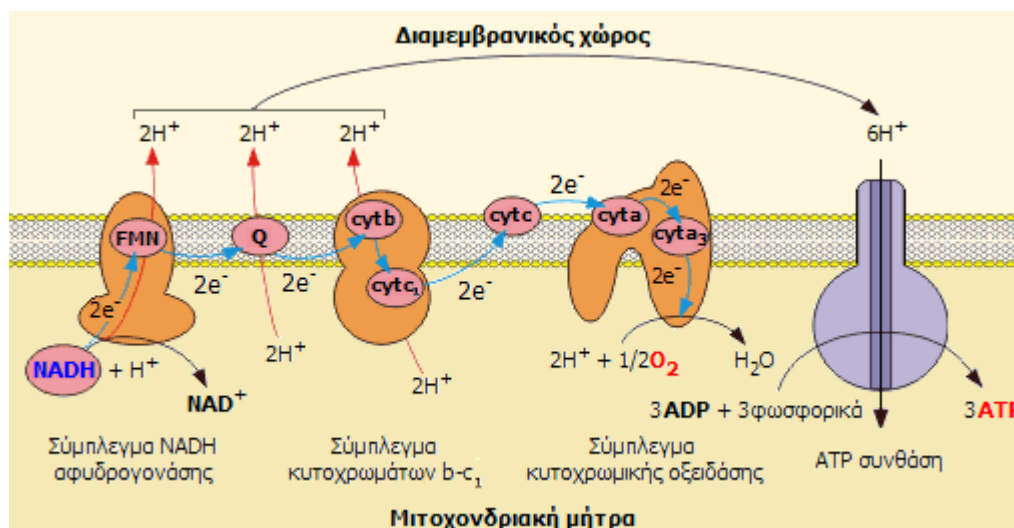
**Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου**

Δραστικές Μορφές Αζώτου	Σύμβολο
Περοξυνιτρίτης (Peroxynitrite)	$ONOO^-$
Μονοξειδίο του Αζώτου (Nitric Oxide)	$NO \cdot$
Διοξειδίο του Αζώτου (Nitric Dioxide)	$NO_2$
Περοξυνιτρώδες Οξύ (Peroxynitrous Acid)	$ONOOH$

## 1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές είναι δυνατόν να παραχθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και λόγω επίδρασης κάποιων εξωγενών παραγόντων.

Την κύρια ενδογενή πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κατά τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c), όπως φαίνονται και στην Εικόνα 2, μέσω των οποίων μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>), το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό. Παράλληλα, λόγω της διαβάθμισης των πρωτονίων και την μεταφορά τους μέσω της ATPase παράγεται ATP (5-αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ), η κύρια πηγή ενέργειας στο κύτταρο. Το οξύγONO το οποίο δεν καταλήγει σε νερό θα μετατραπεί σε δραστικές μορφές (Παπαγαλάνης, 2014).



Εικόνα 1 . Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

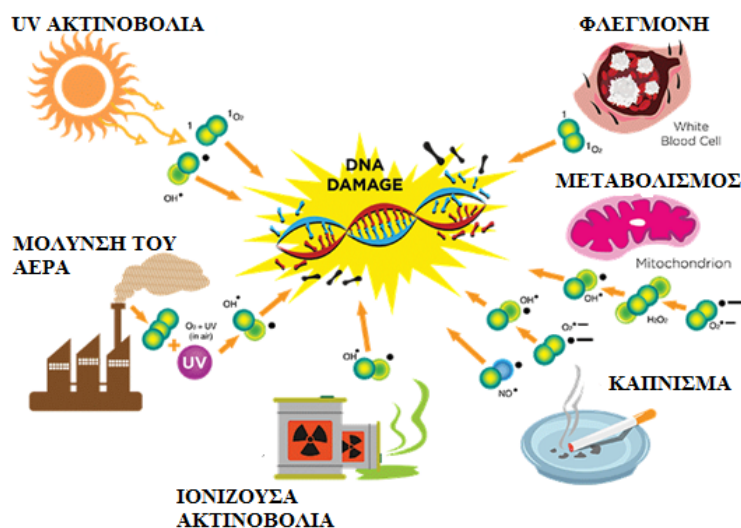
Το O<sub>2</sub> το οποίο δεν καταλήγει στα μιτοχόνδρια, λειτουργεί σαν υπόστρωμα για ένζυμα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η NADH-οξειδάση, η οξειδάση του CYT-P450, η κυκλοξυγενάση και η οξειδάση της ζανθίνης αποτελούν κάποια από τα ένζυμα που σταδιακά μεταφέρουν ένα e<sup>-</sup> στο μοριακό

οξυγόνο. Κατά τη διαδικασία μπορεί να παραχθούν παραπροϊόντα όπως το σουπεροξειδίο ( $O_2^{\cdot-}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ρίζα υδροξυλίου ( $HO^{\cdot}$ ) (Παπαγαλάνης, 2014).

Επιπρόσθετα, κάποια ιόντα μετάλλων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, είναι ενζυμικοί συμπαράγοντες και όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα είναι σε θέση να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια και να οδηγήσουν στην καταστροφή τους όπως οι πρωτεΐνες, τα λίπη και το DNA (Barrera, 2012).

Τέλος, ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού αποτελούν πηγή ελεύθερων ριζών καθώς παράγουν ρίζες προκειμένου να καταπολεμήσουν εξωγενείς παράγοντες όπως βακτήρια (Knight, 2000).

Ωστόσο, η παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να προκληθεί και από επίδραση εξωγενών παραγόντων, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η περιβαλλοντική ρύπανση, το κάπνισμα (Koren, 1995). Επιπρόσθετα, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων άλλων ξеноβιοτικών, παραδείγματος χάρη τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992) Σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι επίσης η διατροφή (Ames., 1896; Phaniendra et al., 2011)



Εικόνα 2 . Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελεύθερων ριζών

## 1.3 Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου

### 1.3.1 Θετικές επιδράσεις

Ενώ για δεκάδες χρόνια υπήρχε η πεποίθηση ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι μόνο επιβλαβείς, πλέον μέσα από εκατοντάδες έρευνες έχει διαπιστωθεί υπό συνθήκες ότι όχι μόνο δεν είναι επιβλαβείς αλλά είναι απαραίτητες καθώς συμμετέχουν σε σημαντικές διεργασίες όπως στην μεταγωγή σήματος μεταξύ των κυττάρων (Rimbach et al., 1999). Επιπλέον, συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Finaud et al., 2006). Διαδικασίες σημαντικές και απαραίτητες για έναν οργανισμό.

### 1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις

Ωστόσο, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να φανούν επιβλαβείς για τον οργανισμό καθώς προκαλούν αλλαγές σε βιομόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν (Cooper et al., 2012). Η αλληλεπίδραση των δραστικών μορφών με λιπίδια την οξειδωτική των λιπιδίων, του DNA και των πρωτεϊνών. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού, που προκλήθηκε από οξειδωτική βλάβη, αποτελεί το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση, την μεταλλαξιγένεση και την γήρανση (Lobo et al., 2010; Valko et al., 2006 ; Leaf et al., 1997).

#### ➤ Βλάβες στο DNA

Οι ROS αλληλεπιδρούν με το DNA και μπορούν να προκαλέσουν καταστροφές, όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών καθώς και στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Παρόλο που το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA είναι συνεχές, οι τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν από τις δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν ως συνέπεια την οξείδωση του DNA που οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Ames, 1989).

#### ➤ Επιβλαβείς επιδράσεις στις πρωτεΐνες

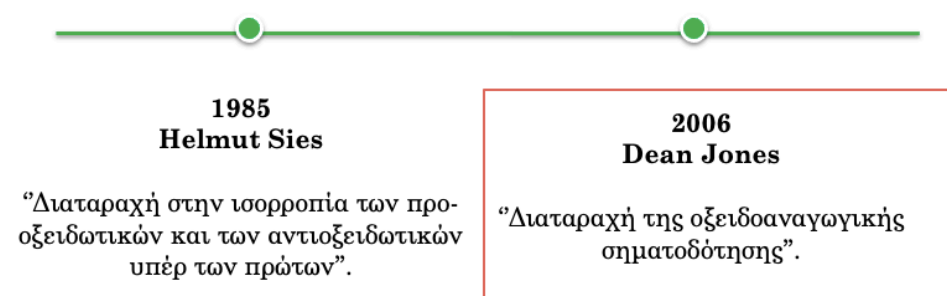
Η οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλεί δισουλφιδικές γέφυρες, αλλάζει την στροφή τους στο χώρο και εν τέλει επηρεάζει τη λειτουργία τους. Ορισμένα αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η κυστεΐνη, είναι πιο

επιρρεπή στην οξειδωση. Γενικά οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη δευτεροταγή όσο και την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Dröge, 2002). Η οξειδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από αυξήσεις στα επίπεδα των ομάδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων( Rodney et al., 2002; Levine et al.,2000). Οι ROS έχουν, επίσης, την ικανότητα να αλλάζουν το λυσοσωμικό σύστημα και το πρωτεάσωμα, δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών(Szweda et al.,2002).

### ➤ Επιβλαβείς Επιδράσεις στα Λιπίδια

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στα λιπίδια των μεμβρανών μέσω της λιπιδιακής υπεροξειδωσης (Land, 1990). Πολύ επιρρεπή στην επίδραση των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι τα υπολείμματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Μόλις σχηματιστούν, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να μετατραπούν μέσω διεργασίας κυκλοποίησης σε ενδο-υπεροξειδία (πρόδρομες μορφές της μαλονδιαλδεΐδης), ενώ τελικό προϊόν της υπεροξειδωσης αποτελεί η μαλονδιαλδεΐδη (MDA) (Wang et al., 1996; Marnett, 1999). Επίσης, η καταστροφή των λιπιδίων μπορεί να έχει συνέπειες στη λειτουργία και στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Τα πολυακόρεστα λιπαράοξέα (PUFA) είναι λιγότερο ανθεκτικά στην οξειδωση σε σχέση με τα μονοακόρεστα ή τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, ώστε η ποικιλία σε PUFA στις μεμβράνες είναι δυνατόν να επηρεάσει και την αναλογία της οξειδωτικής καταστροφής( Hulbert et al., 2007).

## 1.4 Οξειδωτικό στρες



Εικόνα 3. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίστηκε αρχικά από τον Helmut Sies ως "διαταραχή στην ισορροπία των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ του πρώτου". Αφορά την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, με αποτέλεσμα είτε να υπάρχει πλεόνασμα ελευθέρων ριζών είτε να υπάρχει μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού.

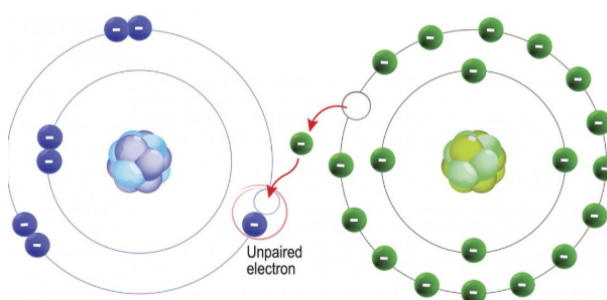
Όμως αυτός ο ορισμός με την πάροδο του χρόνου φάνηκε ότι είναι ασαφής και όχι καλά χαρακτηρισμένος. Έτσι, ο Dean Jones το 2006 εισήγαγε έναν νέο ορισμό στην επιστημονική κοινότητα, "Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης". Αυτός θεωρείται ο πλέον ακριβής και αποδεκτός ορισμός μέχρι σήμερα (Jones, 2006).

### 1.5 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ενας αντιοξειδωτικός παράγοντας όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος.

Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες ένα ηλεκτρόνιο ή ένα μόριο υδρογόνου, που τους λείπει και με αυτόν τον τρόπο είτε εμποδίζουν τη δράση τους, είτε ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα του οργανισμού (Εικόνα 5). Έπειτα, τα ίδια τα αντιοξειδωτικά μετατρέπονται σε

ελεύθερες ρίζες αλλά δεν είναι τόσο δραστικές μορφές και δεν προκαλούν κάποια σοβαρή βλάβη στα βιομόρια (Halliwell, 2001).

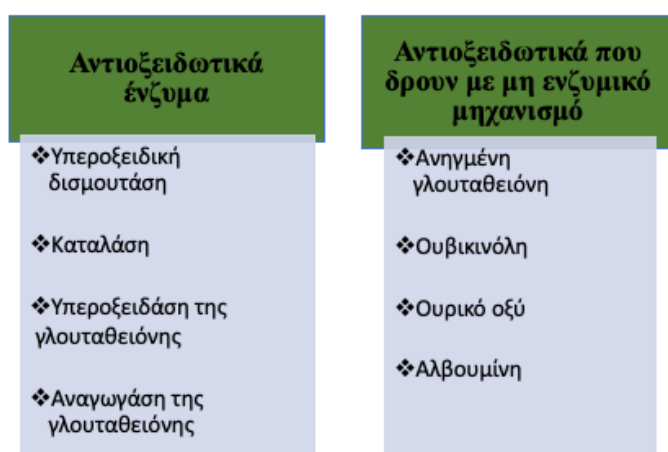


Εικόνα 4. Δράση αντιοξειδωτικών μορίων

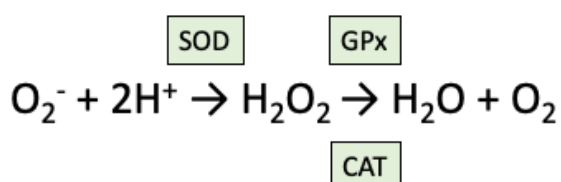
### 1.5.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αντιοξειδωτικά υπάρχουν τόσο φυσιολογικά στον οργανισμό μας ,τα οποία χαρακτηρίζονται ως ενδογενή, αλλά προσλαμβάνουμε και από την διατροφή μας, εξωγενή.

Οι μηχανισμοί, με τους οποίους δρουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους ενζυμικούς και στους μη ενζυμικούς (Lobo et al., 2010).



Πίνακας 3. Ενδογενή αντιοξειδωτικά



Εικόνα 5. Αντιδράσεις αντιοξειδωτικών ενζύμων

Η γλουταθειόνη είναι το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό καθώς έχει δράση και ενάντια των ελευθέρων ριζών αλλά και για την αποτοξικοποίηση του οργανισμού. Βιοχημικά είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Μέσα στους οργανισμούς η ουσία υπάρχει σε δύο μορφές: την ανηγμένη και την οξειδωμένη. Με τις μορφές αυτές, έχει τον ρόλο μεταφορέα του υδρογόνου και αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου.



Κάποια εξωγενή αντιοξειδωτικά καταγράφονται στην Πίνακα 4(Lobo et al., 2010).

**Πίνακας 4. Εξωγενή αντιοξειδωτικά**

<b>Εξωγενή αντιοξειδωτικά</b>
❖Βιταμίνη E
❖Βιταμίνη C
❖Β-καροτένιο
❖Σελήνιο
❖Ανθοκυανίνες
❖Φαινόλες

## 1.6 Νηστεία

### 1.6.1 Ιστορική αναδρομή – Νηστεία στην φύση

Η νηστεία δεν αποτελεί νέο φαινόμενο καθώς από τα αρχαία κιόλας χρόνια οι άνθρωποι αναγκαζόταν να στερηθούν το φαγητό στην καθημερινότητα τους, διανύοντας μεγάλες αποστάσεις έως και μέρες προκειμένου να βρουν τροφή. Καθαυτό τον τρόπο οι αρχαίοι, αν και δεν γνώριζαν, επωφελούνταν από αυτόν τον τρόπο ζωής μέσω της απώλειας βάρους, την πρόληψη του καρκίνου, του γήρατος και άλλα. Ωστόσο με το πέρας των χρόνων, ο άνθρωπος είχε πλέον εγκατασταθεί μόνιμα σε περιοχές καλλιεργώντας πια τη δικιά του γη και έχοντας ζώα (Prentice et al., 2005). Η κουλτούρα της νηστείας πάραυτα παρέμεινε μέσω θρησκειών όπως ο Χριστιανισμός, ο Ινδουισμός κ.α. που νηστεύουν συγκεκριμένες μέρες. Επιπλέον, σε θρησκείες όπως ο Μουσουλμανισμός νηστεύουν από την αυγή μέχρι το σούρουπο κατά τη διάρκεια του μήνα του Ραμαζανιού (Haene et al., 2019).

Είναι γεγονός ότι όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί εναλλάσσονται μεταξύ περιόδων πρόσληψης τροφής και νηστείας καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Οι άνθρωποι νηστεύουν καθημερινά κατά τη διάρκεια των νυκτερινών φάσεων ύπνου, οι οποίες γενικά διαρκούν από 6 έως 10 ώρες

Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε πολλά ζώα στην φύση. Ο πιγκουίνος κατά την εποχή του ζευγαρώματος διανύει τεράστιες αποστάσεις με σκοπό να ζευγαρώσει. Τα διαστήματα αυτά που ζει εκτός ωκεανού χρησιμοποιεί τα αποθέματα

του σε λίπος, μικροθρεπτικά και πρωτεΐνη. Όταν τα αποθέματα λίπους εξαντληθούν και η ενέργεια του φτάνει μόνο για να επιστρέψει στον ωκεανό το συμπαθητικό νευρικό σύστημα στέλνει μηνύματα για αύξηση του μεταβολικού ρυθμού ώστε να πάρει τις τελικές του δυνάμεις για να μπορέσει να επιστρέψει (Le Maho et al., 1976; Stirling et al., 2012).

Ένα ακόμα παράδειγμα αποτελούν τα ζώα τα οποία πέφτουν σε χειμερία νάρκη καθώς είναι δύσκολο να βρουν τροφή τους ψυχρούς μήνες. Κατά τη διάρκεια της ο μεταβολισμός επιβραδύνεται και χρησιμοποιούν σιγά σιγά τα αποθέματα λίπους (Mahlert et al., 2018).

Ωστόσο, υπάρχουν και παραδείγματα σε ανθρώπους. Το πιο χαρακτηριστικό αποτελούν οι γυναίκες στην Γκάμπια. Σε μία έρευνα στην οποία συμμετείχαν 20.000 γυναίκες φάνηκε ότι κατά τη διάρκεια των μουσώνων, όπου η τροφή ήταν περιορισμένη, έχαναν σωματικό βάρος χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Αξιοσημείωτο ήταν ότι σε σχέση με γυναίκες σε άλλες χώρες ήταν το ίδιο υγιείς και με λιγότερα σημάδια οστεοπόρωσης. (Κουρέτας, 2019)

### 1.6.2 Διατροφικά προγράμματα και τύποι νηστείας

Προκειμένου ο ανθρώπινος οργανισμός να διατηρηθεί στη ζωή, πρέπει να προσλαμβάνει τροφή. Με άλλα λόγια, ο οργανισμός χρησιμοποιεί τα θρεπτικά συστατικά για να παράγει ενέργεια από την καύση τους. Ωστόσο, αυτό μπορεί να επιτευχθεί δύο βασικούς τρόπους:

- **Μέσω της θρέψης:**

Η τροφή η οποία προσλαμβάνεται από ένα άτομο υποβάλλεται σε πέψη ώστε να διασπαστεί και μετέπειτα να ακολουθήσει ο μεταβολισμός στα κύτταρα ώστε να αποθηκευτεί ενέργεια ή να απελευθερωθεί ενέργεια από τα μόρια (Pico et al., 2019).

- **Μέσω της νηστείας:**

Όταν ο οργανισμός δεν τρέφεται, τα κύτταρα προσλαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το λιπώδη ιστό (Rodin et al., 1988; Thankamony et al., 2014)

Μέσω της τροφής ο άνθρωπος προσλαμβάνει λίπος και υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη για την παροχή ενέργειας. Στην περίπτωση που η πρόσληψη θερμίδων μέσω της διατροφής υπερτερεί από την καύση και τις ανάγκες του εκάστοτε οργανισμού

τότε δημιουργούνται αποθήκες λίπους. Σε περιόδους νηστείας λοιπόν ο οργανισμός χρησιμοποιεί το αποθηκευμένο αυτό λίπος ώστε να μπορέσει να δώσει ενέργεια στον οργανισμό. Επομένως, υποδεικνύεται ότι η νηστεία δεν αποτελεί μία κατάσταση υποσιτισμού αλλά μία μετάβαση σε θρέψη από ήδη υπάρχουσες πηγές (Thankamony et al., 2014).

Υπάρχουν πολλοί τύποι νηστείας, κάποιιοι από αυτούς που συναντώνται συχνά είναι η περιοδική νηστεία, η διαλειμματική νηστεία καθώς και το Ραμαζάνι.

Με τον όρο περιοδική νηστεία εννοούμε τον περιορισμό στην πρόσληψη θερμίδων, προσλαμβάνοντας 200-800 kcal την ημέρα. Η περιοδική νηστεία (PF), ορίστηκε πρόσφατα ότι διαρκεί από 2 έως και 21 ή περισσότερες ημέρες, και έχει μελετηθεί ελάχιστα στον άνθρωπο, ειδικά για περιόδους μεγαλύτερες από 4 ημέρες (Mattson et al., 2017). Κατά τη διαλειμματική νηστεία (IF), μέσα στην ημέρα υπάρχουν ώρες που το άτομο τρέφεται κανονικά ενώ άλλες, από 12 ώρες και πάνω, βρίσκεται υπό θερμιδικό περιορισμό. Υπάρχουν πολλά μοτίβα διαλειμματικής με επικρατέστερο το 16/8, όπου για 16 ώρες δεν επιτρέπεται λήψη τροφής ή ποτού το οποίο έχει θερμίδες. Ωστόσο, μπορεί να ακολουθηθούν και μοτίβα στα οποία ο θερμιδικός περιορισμός μπορεί να κρατήσει και εβδομάδα (Longo et al., 2014). Το Ραμαζάνι, το οποίο βγαίνει από την τούρκικη λέξη ραμαζάν (και την αντίστοιχη αραβική, ραμαντάν), είναι η θρησκευτική γιορτή νηστείας των Μουσουλμάνων. Οι περισσότεροι Μουσουλμάνοι δεν τρώνε και δεν πίνουν τίποτα από την αυγή μέχρι τη δύση του ήλιου, καθ' όλη τη διάρκεια του μήνα που ισχύει το Ραμαζάνι. (Ahmed et al., 2020)

Τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των επιστημόνων στην μελέτη των επιπτώσεων διαφόρων τύπων νηστείας στην υγεία καθώς φαίνεται να επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα.

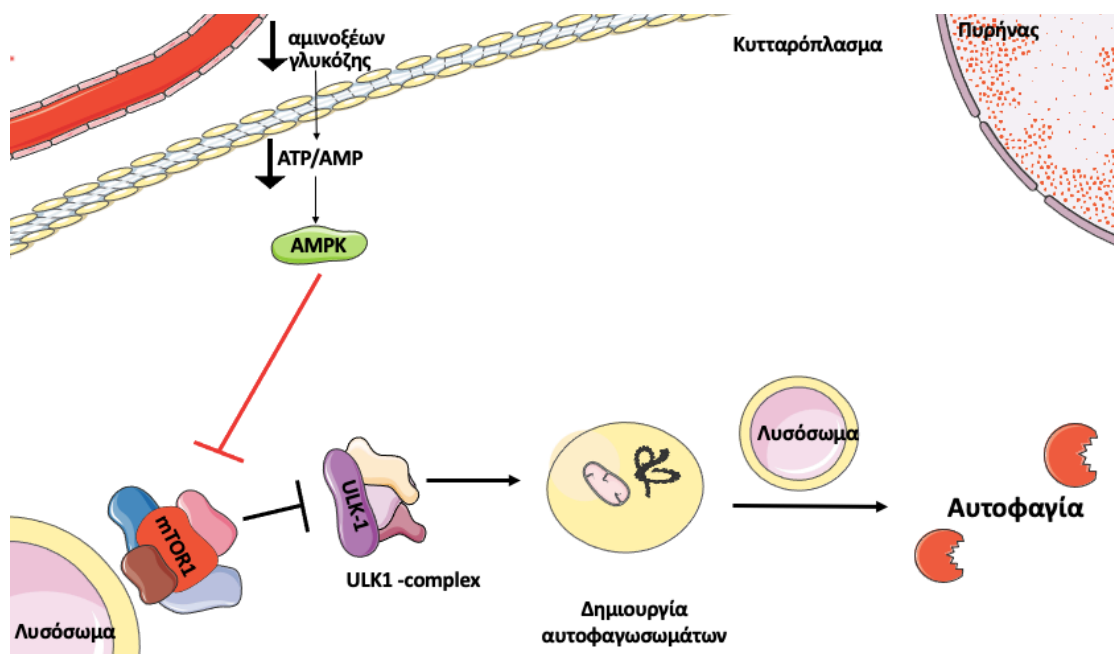
### 1.6.3 Μεταβολική αλλαγή (Metabolic switch)

Κατά τη νηστεία τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, ινσουλίνης και του ινσουλινομόρφου αυξητικού παράγοντα (IGF-1) μειώνονται, ενώ η γλυκαγόνη και η αυξητική ορμόνη αυξάνονται. Τα σώματα κετόνης χρησιμοποιούνται ως πηγές ενέργειας και ρυθμίζουν την έκφραση και τη δραστηριότητα διαφόρων παραγόντων μεταγραφής. Αυτή η μετάβαση είναι γνωστή ως «μεταβολική αλλαγή» από γλυκόζη που προέρχεται από το ήπαρ σε κετόνες που προέρχονται από λιπώδη κύτταρα (G-to-K) (Anton et al., 2018).

### 1.6.4 Νηστεία και επιπτώσεις

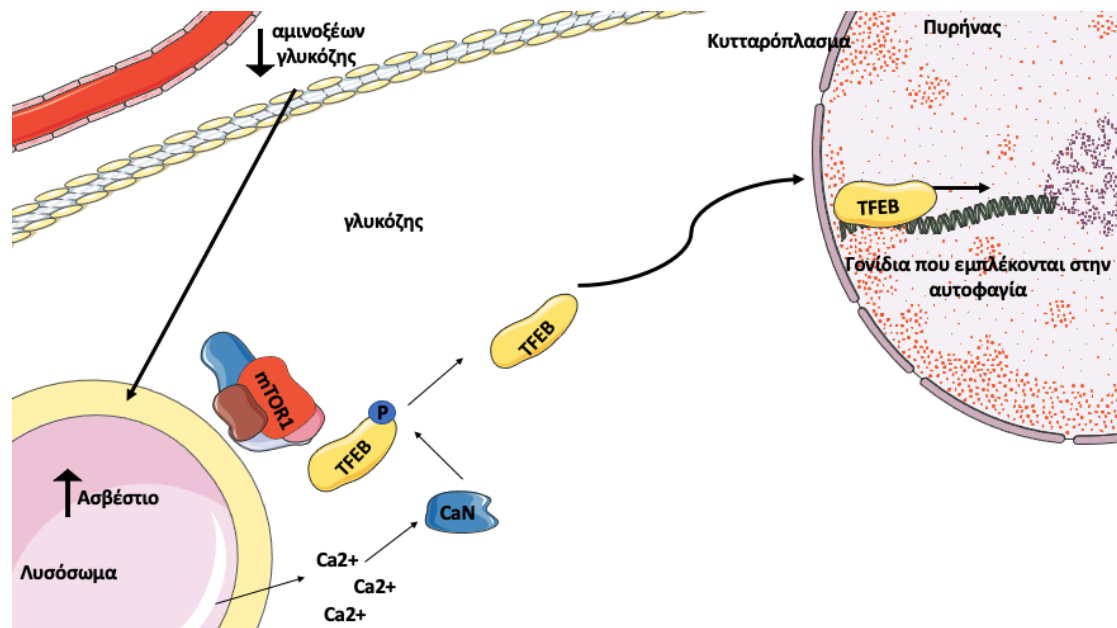
Κατά τη διάρκεια της νηστείας, τα αμινοξέα και γενικά τα θρεπτικά συστατικά στην κυκλοφορία μειώνονται, γεγονός που προκαλεί πολλές διαφορετικές ρυθμίσεις. Τα επίπεδα AMP αυξάνονται με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της AMP πρωτεϊνική κινάσης (AMPK), η οποία θα απενεργοποιήσει τον παράγοντα mTOR. Η απενεργοποίηση του θα οδηγήσει με δύο τρόπους στην αυτοφαγία:

- Ενεργοποίηση του συμπλόκου ULK1/ATG το οποίο θα οδηγήσει στην δημιουργία των αυτοφαγωσωμάτων που σε σύντηξη με τα λυσοσώματα θα οδηγήσουν στην αυτοφαγία ( Dossou et al., 2019).



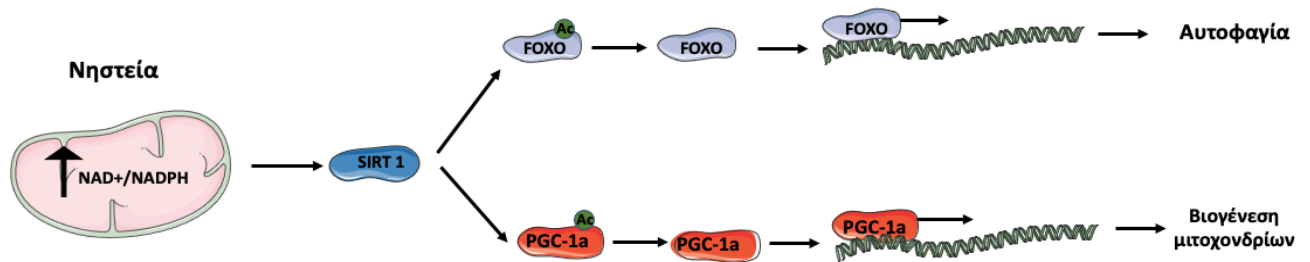
Εικόνα 6. Ενεργοποίηση αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού mTOR-ULK1/ATG

- Το σύμπλοκο mTOR1 σε συνθήκες σιτισμού φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα TFEB και παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Αντιθέτως, σε περιόδους νηστείας μειώνεται η φωσφορυλίωση του και σε συνδυασμό με την αποφωσφορυλίωση του από την καλσινευρίνη (CaN) ,λόγω της αύξηση ασβεστίου στα λυσοσώματα, ο TFEB θα μεταφερθεί στον πυρήνα όπου θα εκφράσει γονίδια που συμμετέχουν στην αυτοφαγία ( Chung, 2019 ; Vázquez -Medina et al., 2015).



**Εικόνα 7. Ενεργοποίηση αυτοφαγίας μέσω του μονοπατιού mTOR-TFEB**

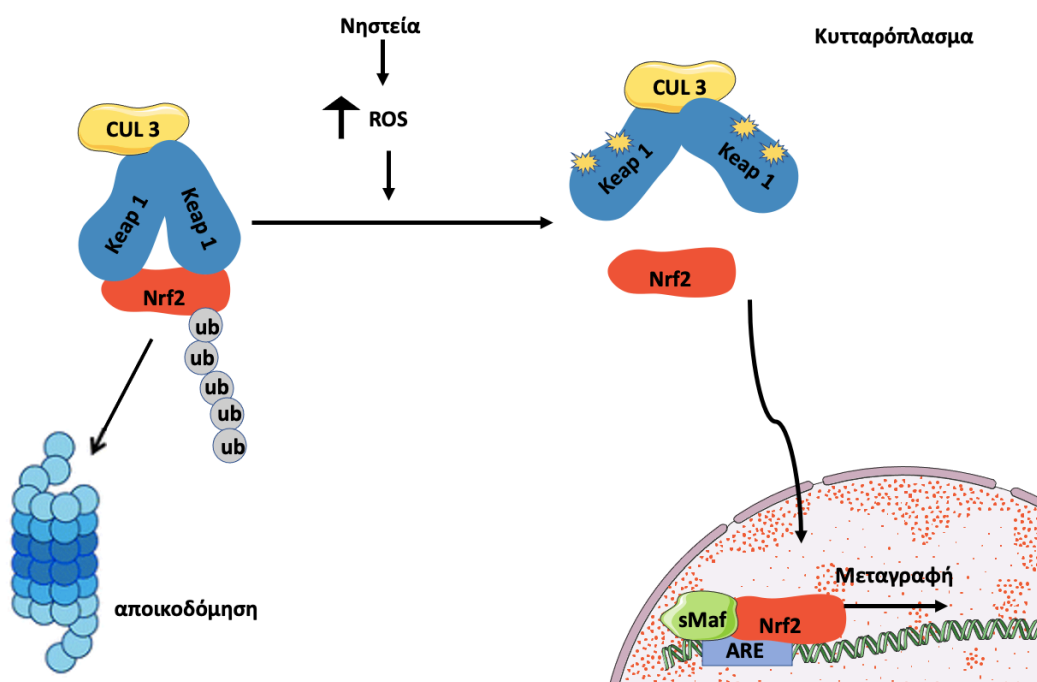
Επιπρόσθετα, η μείωση του NADH σε συνθήκες νηστείας προκύπτει καθώς μειώνεται η λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA) λόγω μειωμένης ποσότητας πυροσταφυλικού που θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση της απακετυλάσης SIRT1. Η SIRT1 αποκετυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO και PGC-1a, τους καθιστά ενεργούς ώστε να μεταγράψουν γονίδια για την αυτοφαγία και την βιογένεση μιτοχονδρίων αντιστοίχως (Grabacka et al., 2013; Cheng et al., 2014; Madkour et al., 2019). Επιπλέον, η SIRT1 αναστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB μειώνοντας έτσι την έκφραση γονιδίων τα οποία προκαλούν φλεγμονή (Margina et al., 2020; Yeung et al., 2004)



**Εικόνα 8. Μονοπάτι SIRT1 σε απόκριση στη νηστεία**

Τέλος, κατά τη νηστεία υπάρχει μία αύξηση των ελεύθερων ριζών λόγω αυξημένης δραστηριότητας της αναπνευστικής αλυσίδας για παραγωγή ενέργειας. Το ερέθισμα αυτό απομακρύνει τον Keap1 οδηγώντας στην αποδέσμευση της από τον Nrf2,

που φυσιολογικά είναι προσδεμένος με τον Keap1 και παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Ο ελεύθερος Nrf2 μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με πρωτεΐνες Maf. Έπειτα, δεσμεύεται στις αλληλουχίες ARE στους προαγωγείς γονιδίων στόχου, προκαλώντας επαγωγή αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, η καταλάση, η δισμουτάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης (Tebay et al., 2005).



Εικόνα 9. Ενεργοποίηση μονοπατιού Nrf2

### 1.6.5 Περιοδική νηστεία

Η περιοδική νηστεία πάνω στην οποία βασίστηκε αυτή η έρευνα αναφέρεται σε ολική αποχή ή σε μεγάλη μείωση της πρόσληψης τροφής για 2 έως 21 ημέρες ή περισσότερο. Έχει μελετηθεί εκτενώς σε ζώα που ζουν ελεύθερα και επιβιώνουν με τα αποθέματα ενέργειας του σώματος, όπως σε μεταναστευτικά πουλιά, ζώα νάρκης και πιγκουΐνους. Η περιοδική νηστεία στον άνθρωπο ασκείται εδώ και δεκαετίες μόνο υπό ιατρική επίβλεψη σε εξειδικευμένα κέντρα (Toledo et al., 2020) Η περιοδική νηστεία έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πολλών παθολογιών. Αρχικά, οδηγεί σε απώλεια βάρους και μείωση λίπους που προλαμβάνει την παχυσαρκία και άλλες παθήσεις (Zouhal et al., 2020). Επιπλέον, μέσα από αρκετές έρευνες τόσο σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους έχουν αποδείξει ότι μειώνει τα καρδιαγγειακά προβλήματα. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε μελέτη με παχύσαρκα άτομα (Caviezel et al., 1986).

Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ανάκαμψη της αρτηριακής πίεσης μετά από άσκηση σε αρουραίους (Wan et al., 2003). Επιπλέον, μέσω της ενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού που προαναφέραμε υπάρχει προστασία από οξειδωτικές βλάβες των βιομορίων και μείωση του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με πολλές ασθένειες (Percario et al., 2020) .

## 2. Σκοπός

Στις μέρες μας όλο και περισσότερες ασθένειες λόγω διαταραχών στον μεταβολισμό φαίνεται να εμφανίζονται στους ανθρώπους. Σε αυτές τις ασθένειες περιλαμβάνονται τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης, ο καρκίνος αλλά και άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο. Βασική αιτία τους είναι ο σύγχρονος τρόπος ζωής και διατροφής που περιλαμβάνει υπερβολική κατανάλωση πλήθους επεξεργασμένων έτοιμων τροφών. Για πολύ κόσμο τα φάρμακα φαντάζουν να είναι η μόνη λύση. Ωστόσο, η πραγματική λύση βρίσκεται στη διατροφή μας, η οποία μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη καθώς και στην αντιμετώπιση πολλών ασθενειών.

Η μελέτη αυτή έγινε προκειμένου να δούμε πως η περιοδική νηστεία μπορεί να επηρεάζει την μεταβολική υγεία των εθελοντών και πως μεταβάλλονται μια σειρά από οξειδοαναγωγικούς βιοδείκτες μετά το πέρας της νηστείας. Στο τέλος της μελέτης αναμένονται να απαντηθούν κάποια ερωτήματα σχετικά με τις μεταβολικές αλλαγές λόγω της νηστείας αλλά και να αξιολογηθούν οι μεταβολές σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης καθώς και πως αυτές σχετίζονται με την υγεία του ανθρώπου.

Για τον σκοπό της εργασίας, 109 εθελοντές υποβλήθηκαν σε περιοδική νηστεία για 7 ημέρες σε ειδική κλινική, με ημερήσια πρόσληψη θερμίδων περίπου 250 kcal. Αίμα λήφθηκε πριν και μετά από τη νηστεία και να ελεγχθούν οι επιπτώσεις. Ύστερα από διαχωρισμό του δείγματος αίματος, τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση δεικτών όπως η γλουταθειόνη, καθώς και για τον προσδιορισμό δραστηριότητας κάποιων αντιοξειδωτικών ενζύμων, της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). Ενώ από το πλάσμα εκτιμήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η λιπιδική υπεροξείδωση μέσω ουσιών που αντιδρούν με το θιοβαρβουτυρικό (TBARS) καθώς και η οξείδωση των πρωτεϊνών (CARBS).



### 3. Μέθοδοι και υλικά

#### 3.1 Συμμετέχοντες

Στο πείραμα, οι συμμετέχοντες είχαν εισαχθεί στην κλινική Buchinger Wilhelmi (BWC) και η ηλικία τους είναι μεταξύ 18 και 70 ετών. Τα άτομα υποβλήθηκαν σε νηστεία για 7 ημέρες ( $10 \pm 3$  ημέρες). Ενώ συνιστάται η διακοπή λήψης συμπληρωμάτων μικροθρεπτικών μία εβδομάδα πριν και κατά τη διάρκεια της περιόδου νηστείας, με εξαίρεση τα συμπληρώματα μαγνησίου. Από την μελέτη αποκλείστηκαν άτομα με χρόνιες ψυχιατρικές παθήσεις, καθώς και έγκυες ή θηλάζουσες γυναίκες. Επιπλέον, εξαιρέθηκαν άτομα που δεν μπόρεσαν να επικοινωνήσουν στα γερμανικά, αγγλικά ή γαλλικά, και συνεπώς δεν μπόρεσαν να απαντήσουν στα ερωτηματολόγια. Από τα 182 άτομα που εισήχθησαν στην κλινική, 37 δεν πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης, 35 άτομα δεν ήθελαν να συμμετάσχουν και ένα άτομο τερμάτισε τη μελέτη πρόωρα λόγω των χαμηλών επιπέδων αιμοσφαιρίνης και νατρίου. Συνολικά 109 άτομα ολοκλήρωσαν τη μελέτη.

#### 3.2 Πρωτόκολλο νηστείας

Μία μέρα πριν την έναρξη της νηστείας, τα άτομα υποβλήθηκαν σε δίαιτα 600 kcal/μέρα με ρύζι, λαχανικά και φρούτα. Την πρώτη μέρα χορηγήθηκε καθαρτικό στους συμμετέχοντες ( $20-40$  g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  σε 500 mL νερό). Κάθε δεύτερη ημέρα κατά τη διάρκεια της νηστείας, εφαρμόστηκε ένα κλύσμα για την απομάκρυνση των εντερικών υπολειμμάτων και των αποφλοιωμένων βλεννογόνων κυττάρων. Μια ημερήσια πρόσληψη θερμίδων ήταν περίπου 250 kcal, 20 g μέλι καθώς και 250 mL φρέσκου οργανικού χυμού το μεσημέρι και 250 mL σούπας λαχανικών το βράδυ. Επιπλέον, στα άτομα συστήθηκε να πίνουν 2-3 L νερό και τσάι. Μετά τη νηστεία, ακολούθησε μία οργανική δίαιτα προσαρμογής 800-1.600 kcal/μέρα. Εξειδικευμένοι γιατροί και εκπαιδευμένοι νοσηλευτές επιβλέπουν την πορεία του προγράμματος, που περιλαμβάνει επίσης σωματική άσκηση και άλλες ατομικές θεραπείες.

#### 3.3 Κλινικά δεδομένα

Δείγματα αίματος (10 mL) λήφθηκαν από τους συμμετέχοντες την πρώτη ημέρα εισαγωγής στην κλινική μεταξύ 7.30-9.00 π.μ. και την  $10 \pm 3$  ημέρα της

νηστείας. Το αίμα συλλέχθηκε σε EDTA tubes, φυγοκεντρήθηκαν απευθείας ( $1.370 \times g$ , 10 λεπτά,  $4^{\circ}C$ ). Έπειτα το πλάσμα απομακρύνθηκε και συλλέχθηκε για να προσδιοριστεί η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουτυρικό (TBARS) ως δείκτης οξείδωσης των λιπιδίων καθώς και η πρωτεϊνική υπεροξείδωση (CARBS). Στα ερυθροκύτταρα έγινε λύση με νερό (1:1 v/v) και φυγοκέντρωση ( $4.020 \times g$ , 15 λεπτά,  $4^{\circ}C$ ) και το λύμα των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η ενεργότητα της καταλάσης (CAT). Στη συνέχεια, σε 500  $\mu L$  ερυθρολύματος γίνεται προσθήκη 5% τριχλωρικού οξέος (TCA) (1:1 v/v), vortex και φυγοκέντρωση ( $28.020 \times g$ , 5 λεπτά,  $4^{\circ}C$ ). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και έγινε προσθήκη 5% TCA (1,3:1 v/v) και φυγοκεντρήθηκαν ( $28.020 \times g$ , 5 λεπτά,  $4^{\circ}C$ ). Το καθαρό υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH). Το πλάσμα και το ερυθρόλυμα αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}C$  μέχρι να γίνουν οι βιοχημικές αναλύσεις.

### **3.4 Πρωτόκολλα προσδιορισμού οξειδοαναγωγικών δεικτών στο αίμα**

#### **3.4.1 Προσδιορισμός των επιπέδων αιμοσφαιρίνης**

Ο υπολογισμός της αιμοσφαιρίνης στο RBCL γίνεται προκειμένου να κανονικοποιηθούν οι τιμές των δεικτών οι οποίοι μετρούνται στα ερυθροκύτταρα. Γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο του hemiglobincyanide (HiCN) χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ (Dutch Diagnostics, Zutphen, Ολλανδία). Στην αντίδραση γίνεται προσθήκη 1 mL αντιδραστηρίου και 5 $\mu L$  ερυθροκυττάρων. Στο τυφλό, για να δούμε την καθαρή αύξηση, προστίθεται 1 mL αντιδραστηρίου και 5 $\mu L$  νερό. Η τιμή αυτή μετέπειτα αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων. Επώζονται για 10 λεπτά και η μέτρηση γίνεται στα 540nm.

#### **3.4.2 Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεΐνης**

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται προκειμένου να κανονικοποιηθούν οι τιμές των δεικτών οι οποίοι μετρούνται στο πλάσμα. Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται είναι η Bradford, η οποία χρησιμοποιεί τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Η μέθοδος μετρά στην πραγματικότητα την παρουσία των υπολειμμάτων αμινοξέων, αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης. Με την παρουσία πρωτεϊνών με τα αμινοξέα που προαναφέρθηκαν το χρώμα μεταβάλλεται από καφέ

σε μπλε. Στην αντίδραση γίνεται προσθήκη 1 mL αντιδραστηρίου και 5μL πλάσματος με αραιώση 1:1000. Στο τυφλό, για να δούμε την καθαρή αύξηση, προστίθεται 1 mL αντιδραστηρίου και 5μL νερό. Η τιμή αυτή μετέπειτα αφαιρείται από τις τιμές των δειγμάτων. Επωάζονται για 20 λεπτά και η μέτρηση γίνεται στα 595nm.

### 3.4.3 Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)

Η GSH παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα και δρα εξουδετερώνοντας τις ρίζες υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο και διάφορα ηλεκτρονιόφιλα. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών, και λειτουργεί ως ένας συμπαραάγοντας σε αποτοξινωτικά ένζυμα, συμμετέχει στην μεταφορά καθώς και στην αναγέννηση σημαντικών αντιοξειδωτικών όπως Βιταμίνες E και C στις δραστικές μορφές τους. Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειο-δυο-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται προσθήκη των όγκων από τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον Πίνακα:

**Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης**

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH =7.95	660 μL	660 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	—
Αιμόλυμα	—	20 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL

Επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά στο σκοτάδι ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση μεταξύ του DTNB και της GSH και μέτρηση απορρόφησης στα 412 nm.

### 3.4.4 Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) είναι η ικανότητα ενός δείγματος να εξουδετερώνει τη ρίζα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Με την παρουσία ένας δότη υδρογόνου στο πλάσμα η ελεύθερη ρίζα DPPH• ανάγεται στην αντίστοιχη υδραζίνη. Η εξουδετέρωση της ρίζας προσδιορίζεται από την μείωση της απορρόφησης στα 520 nm.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται προσθήκη των όγκων από τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον Πίνακα:

**Πίνακας 6. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της TAC**

	Blank	Positive control	Sample
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Πλάσμα	—	—	20 μL

Επώαση για μία ώρα στο σκοτάδι και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C. Μεταφορά 900 μL από το υπερκείμενο με την πιπέτα στην κυψελίδα και μετρώ την απορρόφηση στα 520 nm.

### 3.4.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουτυρικό οξύ (TBARS)

Η μέτρηση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβουτυρικό οξύ (TBARS) είναι μια καθιερωμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα TBA adduct RS εκφράζονται ως ανάλογα μαλονδιαλδευδης (MDA). Δύο ανάλογα θειοβαρβουτυρικού οξέος (TBA) αντιδρούν με ένα ανάλογο μαλονδιαλδευδης (MDA). Τα TBARS μπορούν να επιστρέψουν σε φυσιολογικές τιμές με την παρουσία αντιοξειδωτικών.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται προσθήκη των όγκων από τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον Πίνακα:

Πίνακας 7. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων και μεθολογία για τον προσδιορισμό των TBARS

	Blank	Δείγμα
Πλάσμα	-	100 μL
dH <sub>2</sub> O	100 μL	-
TCA 35%	500 μL	500 μL
Tris-HCl	500 μL	500 μL
Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου		
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – TBA	1000 μL	1000 μL
<i>Επώαση για 45 λεπτά στους 95 °C στο υδατόλουτρο και μεταφορά στον πάγο για 5 λεπτά</i>		
TCA 70%	1000 μL	1000 μL
Μεταφορά 1 mL σε Eppendorf tubes και φυγοκέντρηση στα 11200 g στους 25 °C για 3 λεπτά		

Μέτρηση απορρόφησης στα 530 nm.

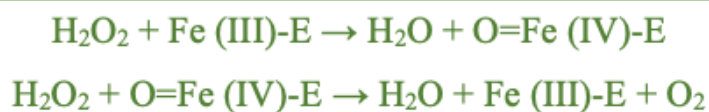
### 3.4.6 Δραστικότητα Καταλάσης (CAT)

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> το δευτερόλεπτο σε H<sub>2</sub>O και οξυγόνο. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το ιδανικό της pH για να δράσει είναι το ουδέτερο.

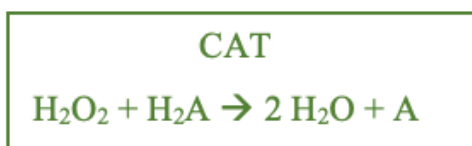
Η αντίδραση διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H<sub>2</sub>A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



### 3.4.7 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαιλυδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαιλυδραζονίου).

**Πίνακας 8. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων και μεθολογία για τον προσδιορισμό της καταλάσης**

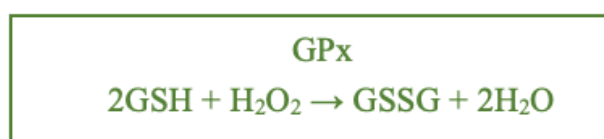
	Τυφλά*	Δείγμα
<b>Πλάσμα</b>	50 μL	50 μL
<b>TCA 20%</b>	50 μL	50 μL
Vortex / 15 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρωση 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση υπερκειμένου		
<b>DNPH 14mM (σε 2,5N HCl)</b>	-	500 μL
<b>HCl 2,5N</b>	500 μL	-
Vortex και σπάσιμο της πελέτας και επώαση σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και κάθε τέταρτο vortex		
Φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση υπερκειμένου.		
<b>TCA 10%</b>	1000 μL	1000 μL
Vortex και φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση υπερκειμένου.		
<b>Αιθανόλης- οξικό αιθυλεστέρα (1:1 v/v)</b>	1000 μL	1000 μL
Vortex και φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση υπερκειμένου.		
<b>Ουρία 5M( pH=2,3)</b>	1000 μL	1000 μL
Φυγοκέντρωση στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C		

Φωτομέτρηση στα 375 nm.

\*Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

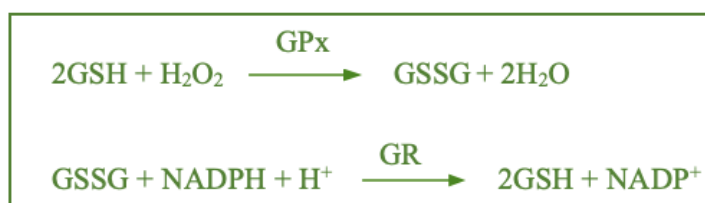
### 3.4.8 Δραστηριότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα τετραμερές ένζυμο, μέλος μιας οικογένειας ενζύμων με σελενοκυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση μέσω αναγωγής των λιπιδικών υπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες. Η κύρια αντίδραση της περοξειδάσης της γλουταθειόνης είναι η εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) μέσω της αναγωγής του σε νερό, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Το κατάλοιπο της σελενοκυστεΐνης συμμετέχει άμεσα στην μεταφορά ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα του περοξειδίου και οξειδώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το ένζυμο τότε χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη ως έναν δότη υδρογόνου για να ξαναπαράγει σελενοκυστεΐνη με ταυτόχρονη οξείδωση της GSH σε GSSG. Σχετικά με την GPx και την καταλάση, ένα ερώτημα αφορά τη συνέργειά τους ή την ανταγωνιστικότητα τους καθώς και τα δύο ένζυμα απομακρύνουν το περοξειδίο του υδρογόνου. Στα ερυθροκύτταρα, στα οποία υπάρχει έλλειψη υποκυτταρικών οργανιδίων, και τα δύο ένζυμα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Όταν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παράγεται σε φυσιολογικά επίπεδα, με μικρό ρυθμό μέσω της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης και της δράσης της SOD, τότε η GPx είναι το ένζυμο το οποίο εξουδετερώνει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Σε αντίθεση, όταν τα επίπεδα του περοξειδίου του υδρογόνου είναι αυξημένα, η καταλάση είναι το κύριο ένζυμο που το απομακρύνει.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPx βασίζεται στην οξείδωση του NADPH. Πιο συγκεκριμένα, η GSSG που παράγεται κατά την αναγωγή του περοξειδίου του υδρογόνου από την GPx και ανάγεται αμέσως και συνεχώς από περίσσεια GR παρέχοντας ένα σταθερό επίπεδο GSH.



**Πίνακας 9.** Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

	Δείγμα
Phosphate buffer 100 mM (pH 7)	500 μL
RBCL diluted (1/100)	100 μL
GR 2.4 U/ml	100 μL
GSH 10 mM	100 μL
Επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.	
1.5 mM NADPH σε διάλυμα 0.1% NaHCO <sub>3</sub>	100 μL
Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.	

Μεταφορά στην κυβελίδα, προσθήκη 100μL *t*-BuOOH και φωτομέτρηση στα 340 nm για 2,5 λεπτά. Παρατήρηση μείωση της απορρόφησης.

### 3.4.9 Δραστικότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), επίσης γνωστή ως δισουλφιδική αναγωγή της γλουταθειόνης είναι ένα βασικό ένζυμο έναντι στο οξειδωτικό στρες συμβάλλοντας στην διατήρηση του αναγωγικού περιβάλλοντος υποκυτταρικά. Λειτουργεί ως διμερές αποτελούμενο από τη δισουλφιδική οξυρεδουκτάση που χρησιμοποιεί το FAD ως ένα προσθετικό μέλος και το NADPH για να ανάγουν ένα μοριακό ανάλογο της GSSG σε δύο μοριακά ανάλογα GSH. Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της GR βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις. Η GR παράγει GSH μέσω της αναγωγής της GSSG. Μετά, η GSH αντιδρά με το DTNB και παράγεται TNB, που έχει μέγιστη απορρόφηση στα 412 nm. Η ενζυμική δραστικότητα της GR αξιολογείται μέσω του προσδιορισμού της αλλαγής της απορρόφησης στα 412 nm για 1 λεπτό.



Η αναλογία GSH/GSSG είναι ένας θεμελιώδης παράγοντας για την διατήρηση της οξειδωτικής ισορροπίας ενδοκυτταρικά. Έτσι είναι σημαντικό ότι τα κύτταρα διατηρούν υψηλά GSH και χαμηλά επίπεδα GSSG. Αυτή η λεπτή ισορροπία διατηρείται από την GR.



Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ακολουθείται η διαδικασία που αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 10. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αναγωγάσης της γλουταθειόνης(GR)**

	Control	Δείγμα
<b>Phosphate buffer 200 mM, 1 mM EDTA (pH 7.8)</b>	700 μl	700 μl
<b>DTNB 3 mM</b>	250 μl	250 μl
<b>β-NADPH 2 mM</b>	50 μl	50 μl

Για το Control: τα μεταφορά του περιεχομένου στην κυψελίδα , και προσθήκη 50 μl 20 mM GSSG. Προσθήκη 25 μl GR 1U/ml, ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 412 nm για 1 λεπτό.

Για τα δείγματα: μεταφορά του περιεχομένου στην κυψελίδα, προσθήκη 50 μl 20 mM GSSG. Προσθήκη RBCL αραιωμένα 1/100, ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 412 nm για 1 λεπτό.

### 3. Στατική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας R έκδοση 3.6.1. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά ζεύγος χρησιμοποιώντας t-test. Τα δεδομένα οπτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πακέτο R ggplot2. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SD στον πίνακα 11.

## 4.Αποτελέσματα

### 4.1. Κλινικά αποτελέσματα

Η μελέτη αυτή διεξάχθηκε στην κλινική Buchinger Wilhelmi στη Γερμανία όπου έγιναν και οι αρκετές μετρήσεις. Είναι αξιοσημείωτο να αναφέρουμε μερικά από τα κλινικά δεδομένα που παρατήρησαν όπως η μείωση του σωματικού βάρους, μείωση της περιφέρειας μέσης καθώς και σε μείωση της γλυκόζης, της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε αύξηση κάποιων ηπατικών ενζύμων. Τέλος, υπήρξε μία μείωση της κρεατίνης αλλά και αύξηση του ουρικού οξέος, που αποτελεί ενδογενές αντιοξειδωτικό. Κάποιες περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τους δείκτες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 11. Αποτελέσματα κλινικών δεικτών πριν και μετά τη νηστεία**

Παράμετροι	Pre-Fasting	Post-Fasting	p-Value
Περιφέρεια μέσης, cm	95,8 (±14,2)	91,0 (±13,1)	$<2 \times 10^{-16}$
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28,34 (±6,01)	27,68 (±5,20)	$<2 \times 10^{-16}$
Βάρος, kg	82,9 (±18,8)	79,9 (±16,1)	$<2 \times 10^{-16}$
Συναισθηματική ευεξία	6,4 (±1,9)	7,9 (±1,6)	$2,7 \times 10^{-13}$
Φυσική ευεξία	6,1 (±1,8)	7,8 (±1,6)	$2,7 \times 10^{-14}$
Συστολική BP, mmHg	131,9 (±19,3)	119,7 (±15,8)	$1,3 \times 10^{-11}$
Διαστολική BP, mmHg	83,8 (±10,4)	76,9 (±9,6)	$1,1 \times 10^{-10}$
Γλυκόζη, mmol/L	5,20 (±0,86)	4,46 (±0,93)	$3,54 \times 10^{-10}$
Τριγλυκερίδια, mmol/L	1,45 (±0,66)	1,07 (±0,31)	$8,34 \times 10^{-9}$
Χοληστερόλη, mmol/L	5,77 (±1,16)	5,09 (±1,16)	$<2 \times 10^{-16}$
AP, $\mu$ kat/L	1,16 (±0,33)	1,12 (±0,32)	0,0025
GPT, $\mu$ kat/L	0,54 (±0,35)	0,71 (±0,45)	$1,71 \times 10^{-8}$
GOT, $\mu$ kat/L	0,34 (±0,14)	0,54 (±0,26)	$<2 \times 10^{-16}$
GGT, $\mu$ kat/L	0,63 (±0,68)	0,44 (±0,38)	$2,41 \times 10^{-8}$
GFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	92,78 (±13,68)	90,16 (±14,32)	$6,32 \times 10^{-5}$
Κρεατινίνη, $\mu$ mol/L	69,09 (±13,47)	7,69 (±14,19)	$1,93 \times 10^{-5}$
Ουρία, mmol/L	4,73 (±1,22)	3,30 (±1,27)	$<2 \times 10^{-16}$

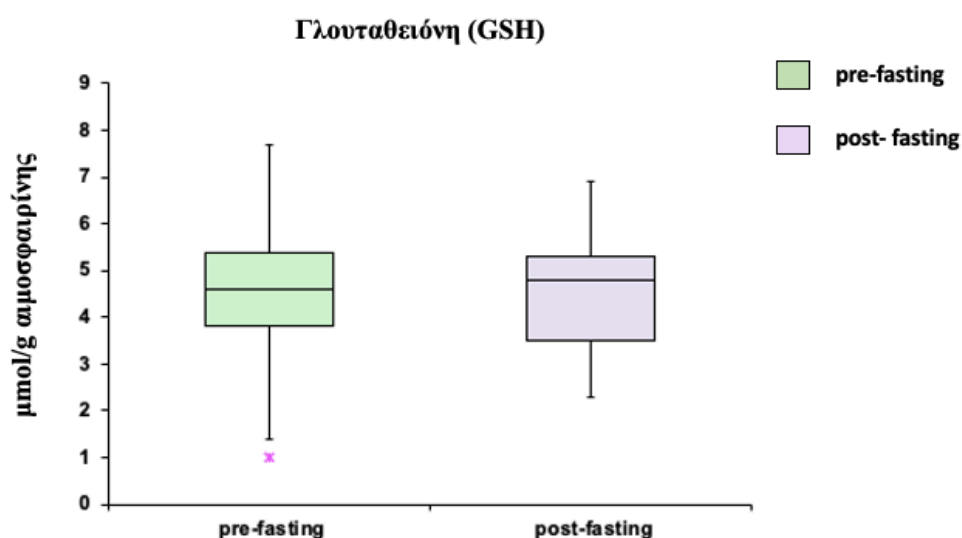
Ουρικό οξύ, $\mu\text{mol/L}$	358,9 ( $\pm 83,64$ )	533,6 ( $\pm 133,6$ )	$<2 \times 10^{-16}$
GSH, $\mu\text{mol/g Hb}$	4,63 ( $\pm 1,3$ )	4,50 ( $\pm 1,2$ )	0,27
Καταλάση, U/mg Hb	194,2 ( $\pm 33,6$ )	192,6 ( $\pm 36,0$ )	0,52
TAC, mmol DPPH/L	0,88 ( $\pm 0,1$ )	1,02 ( $\pm 0,1$ )	$<2 \times 10^{-16}$
TBARS, $\mu\text{mol/L}$	6,5 ( $\pm 1,3$ )	6,0 ( $\pm 1,1$ )	$5,9 \times 10^{-13}$
CARBS, nmol/mg πρωτεΐνης	0,46 ( $\pm 0,1$ )	0,46 ( $\pm 0,1$ )	0,47
GR, U/g Hb	8,3 ( $\pm 1,8$ )	8,3 ( $\pm 2,1$ )	0,87
GPx, U/g Hb	24,1 ( $\pm 3,9$ )	24,0 ( $\pm 4,1$ )	0,72

## 4.2 Αποτελέσματα στους δείκτες οξειδοαναγωγής

### 4.2.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικών παραγόντων

#### 4.2.1.1 Εκτίμηση επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) πριν και μετά τη νηστεία

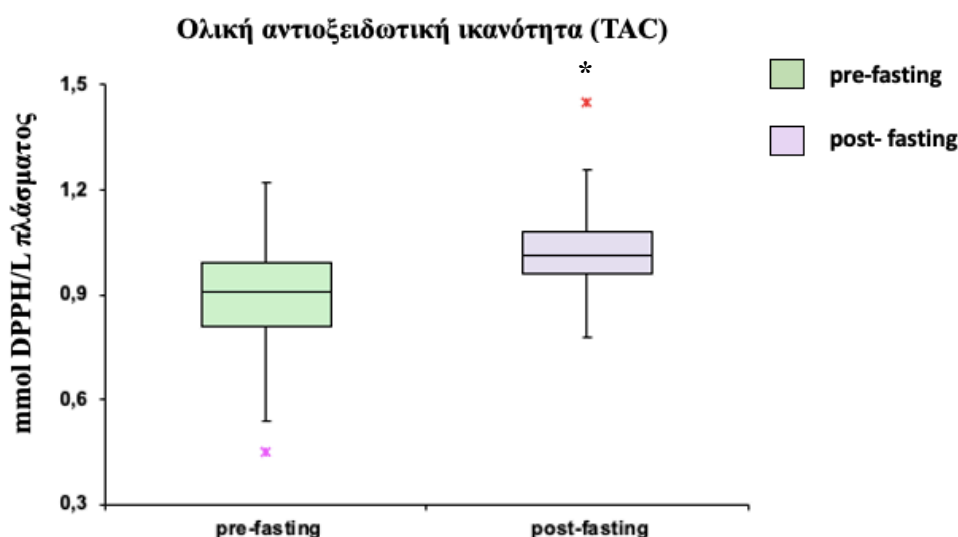
Τα επίπεδα της γλουταθειόνης δεν φάνηκε να ακολουθούν κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο. Υπήρξαν άτομα στα οποία αυξήθηκε σε άλλα μειώθηκε, ενώ σε κάποια άλλα φάνηκε να έμεινε σταθερή. Είναι ενδιαφέρον ότι τα άτομα που είχαν υψηλές συγκεντρώσεις GSH είχαν χαμηλές τιμές ουρίας. Επιπλέον, τα άτομα με χαμηλά επίπεδα παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές γλυκόζης.



**Διάγραμμα 1. Επίπεδα γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία. Το \* συμβολίζει ακραία τιμή.**

#### 4.2.2.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πριν και μετά τη νηστεία

Τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας που μετρήθηκε στο πλάσμα των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση στο σύνολο ( $p < 0,05$ ) Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο σε ελάχιστα άτομα δεν παρατηρήθηκε αύξηση. Η μεταβολή αυτή που υπήρξε πιθανόν να σχετίζεται με το ουρικό οξύ το οποίο αποτελεί ενδογενές αντιοξειδωτικό και προέρχεται από τον καταβολισμό των πουρινών.

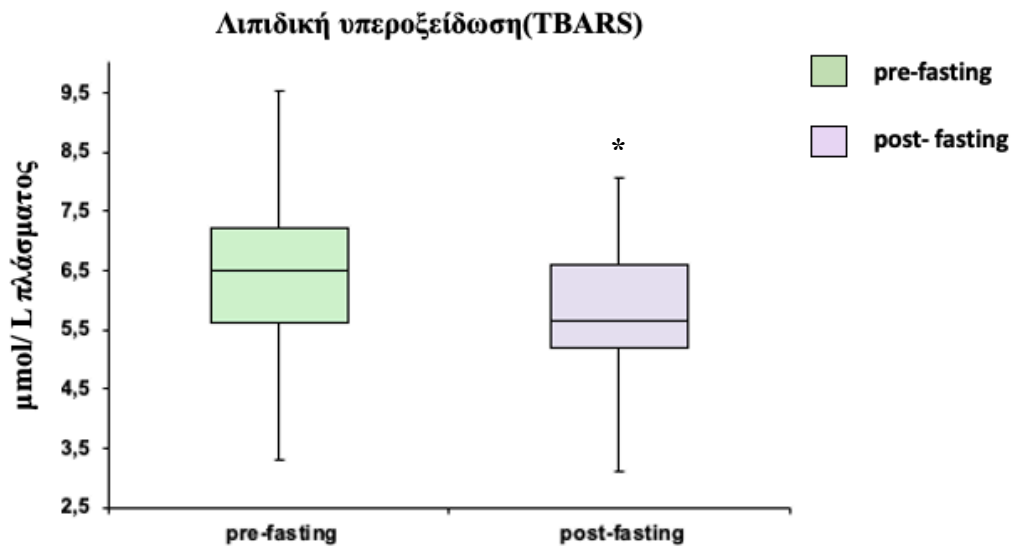


**Διάγραμμα 2. Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πριν και μετά τη νηστεία. \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των ατόμων πριν και μετά τη νηστεία. Το \* συμβολίζει ακραία τιμή.**

#### 4.2.3 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

##### 4.2.3.1 Προσδιορισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης πριν και μετά τη νηστεία

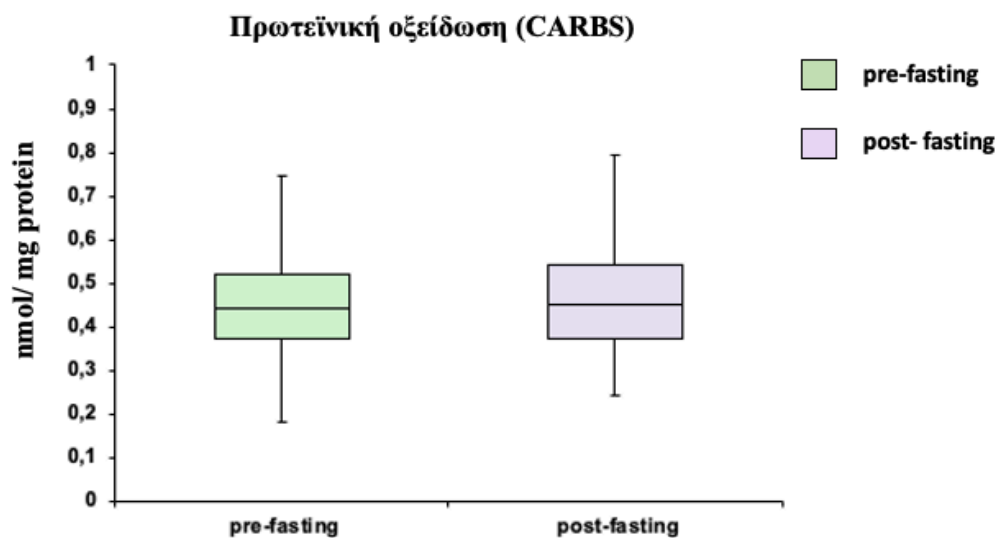
Αξιοσημείωτο εύρημα επίσης είναι η μείωση των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβουτυρικό (TBARS). Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ )



**Διάγραμμα 3. Επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης πριν και μετά τη νηστεία. \* $p < 0,05$  στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των ατόμων πριν και μετά τη νηστεία**

#### 4.2.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης πριν και μετά τη νηστεία

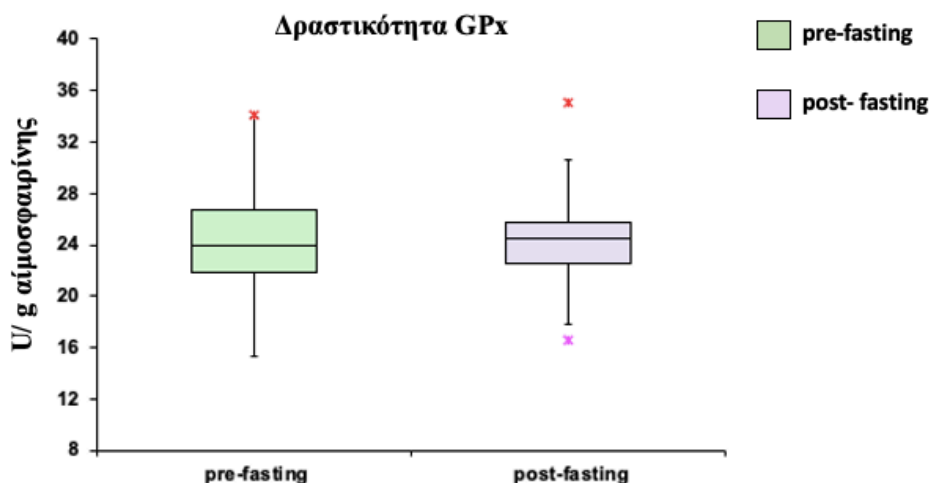
Αν και η λιπιδική υπεροξειδωση μειώθηκε μέσω προστασίας από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά δεν φάνηκε να παρατηρήθηκε το ίδιο και στην πρωτεϊνική καρβονυλίωση, καθώς τα επίπεδα παρέμειναν σταθερά.



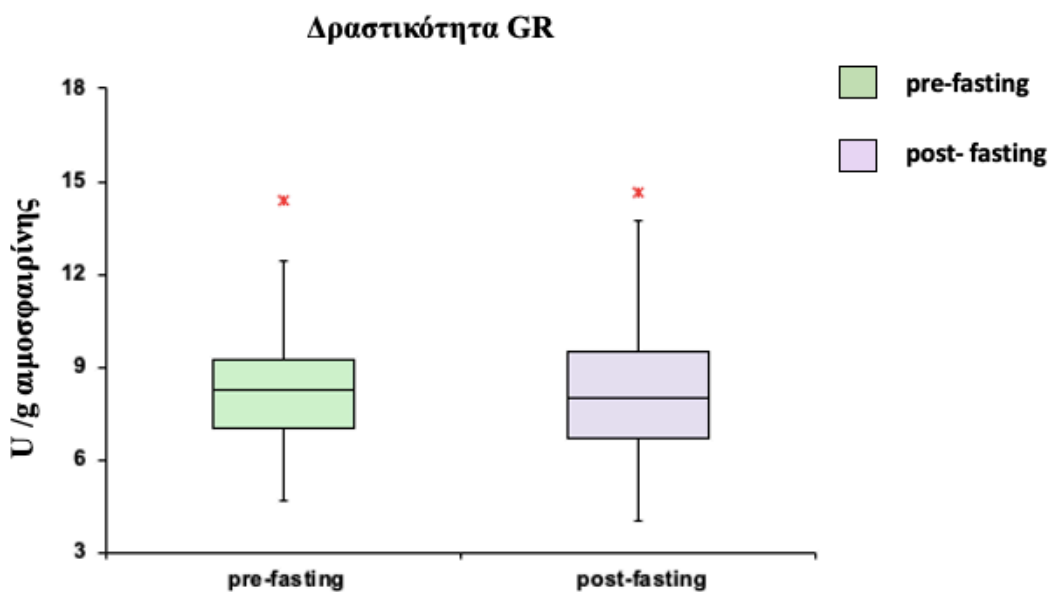
**Διάγραμμα 4. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης πριν και μετά τη νηστεία**

#### 4.2.5 Προσδιορισμός δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (GR, GPx, Cat)

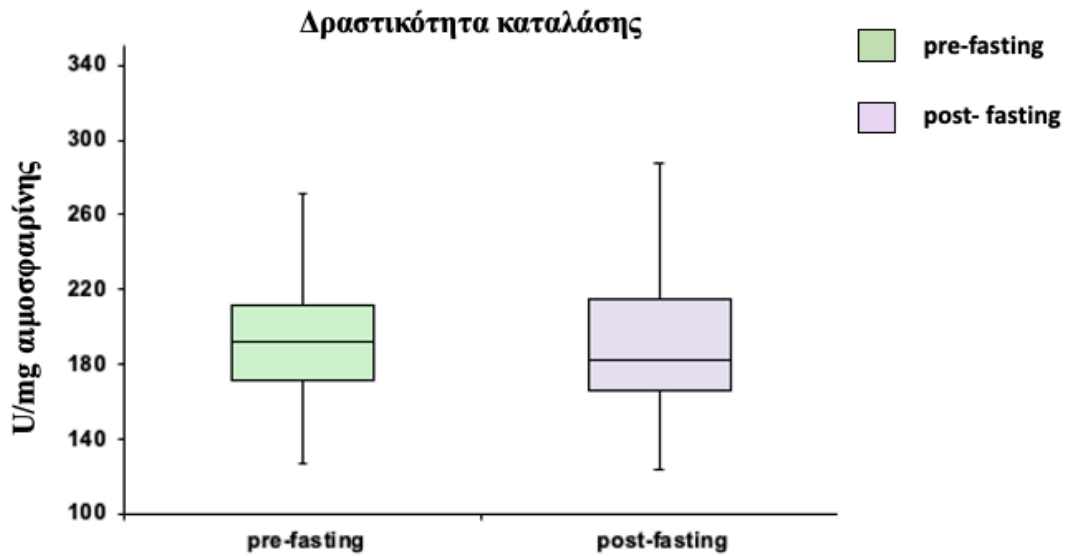
Από την μέτρηση της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, αναγωγάσης της γλουταθειόνης, περοξειδάση της γλουταθειόνης και της καταλάσης, από τα ερυθροκύτταρα των συμμετεχόντων δεν παρατηρήθηκε κάποια στατικώς σημαντική μεταβολή.



Διάγραμμα 5. Δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία. Το \* συμβολίζει ακραία τιμή



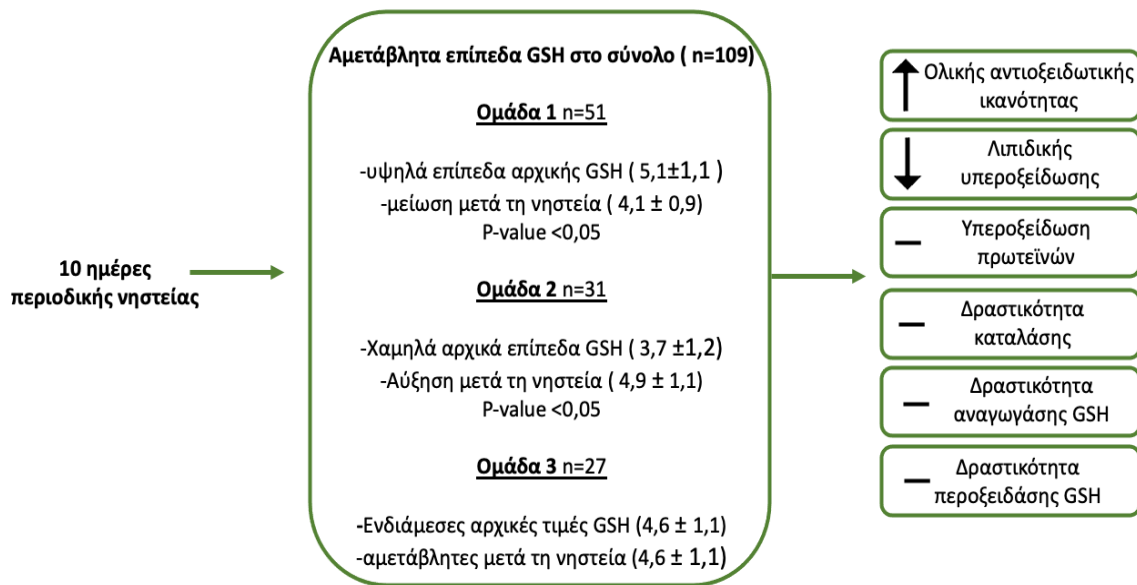
Διάγραμμα 6. Δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία. Το \* συμβολίζει ακραία τιμές



Διάγραμμα 7. Δραστικότητα του ενζύμου καταλάσης πριν και μετά τη νηστεία

#### 4.2.6 Ομαδοποίηση συμμετεχόντων με βάση την τιμή της GSH

Επειδή, τα αποτελέσματα της GSH δεν έδωσαν ένα ξεκάθαρο προφίλ για την μεταβολή των υπόλοιπων οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών και συμπεριλαμβανομένου ότι τα επίπεδα γλουταθειόνης συσχετίζονται με διάφορα μεταβολικά σύνδρομα, οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση την μεταβολή που είχαν στη γλουταθειόνη πριν και μετά τη νηστεία. Ωστόσο, οι δείκτες που μεταβλήθηκαν (TAC, TBARS) έδειξαν αλλαγή και στις 3 ομάδες πριν και μετά τη νηστεία, ενώ οι άλλοι δείκτες έμειναν αμετάβλητοι. Βέβαια, είναι αξιοσημείωτο να σχολιάσουμε είναι ότι στα άτομα που αυξήθηκε η γλουταθειόνη είχαν αρχικά χαμηλά επίπεδα και αντιστοίχως μειώθηκε στα άτομα με υψηλά αρχικά επίπεδα. Και οι δύο αυτές μεταβολές ήταν στατικά σημαντικές καθώς το  $p < 0,05$ . Στα άτομα με ενδιάμεσες τιμές τα επίπεδα έμειναν αμετάβλητα. Οι τιμές των επιπέδων της γλουταθειόνης πριν και μετά τη νηστεία με βάση την ομαδοποίηση εμφανίζεται στην Εικόνα 10.



**Εικόνα 10. Συνολικά αποτελέσματα έρευνας και ομαδοποίηση με βάση τα επίπεδα GSH**



## 5.Συζήτηση

Η νηστεία δεν αποτελεί νέο φαινόμενο, από τα αρχαία κιόλας χρόνια οι άνθρωποι αναγκαζόταν να στερηθούν το φαγητό στην καθημερινότητα τους, καθώς δεν ήταν εύκολη η εύρεση τροφής (Prentice et al., 2005). Όμως, αν και άλλαξαν οι συνθήκες η νηστεία παρέμεινε ως κουλτούρα μέσα από διάφορες θρησκείες, όπως και ο Χριστιανισμός αλλά και ο Μουσουλμανισμός (Haene et al., 2019). Μία πληθώρα μελετών έχει δείξει τα ευεργετικά αποτελέσματα τα νηστείας. Η αυξημένη αυτοφαγία διατηρεί την υγεία των κυττάρων καθώς και προάγει την αντιγήρανση (Dossou et al., 2019; Chung, 2019 ; Vázquez -Medina et al., 2015; Grabacka et al., 2013; Cheng et al., 2014; Madkour et al., 2019). Ένα ακόμα σημαντικό εύρημα είναι η βιογένεση των μιτοχονδρίων προάγοντας την παραγωγή ενέργειας. Τέλος, η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μονοπατιών, οδηγεί στην προστασία του οργανισμού από οξειδωτικές βλάβες (Tebay et al., 2005). Αυτά αποτελούν μόνο μερικά από τα ευεργετικά αποτελέσματα αλλά είναι αυτά πάνω στα οποία έχει επικεντρωθεί η έρευνα.

Αν και μελετώνται διάφοροι τύποι νηστείας, η νηστεία για μεγάλο διάστημα όπως είναι και η περιοδική, είναι δύσκολο να μελετηθεί σε ανθρώπους. Αυτές οι δοκιμές μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο σε εξειδικευμένες κλινικές. Σε αυτήν την μελέτη συμμετείχαν 109 τα οποία παραβρέθηκαν στην κλινική Buchinger Wilhelmi. Υποβλήθηκαν σε 10 ήμερη περιοδική νηστεία ακολουθώντας μία διατροφή 250 θερμίδες την ημέρα. Λήφθηκε αίμα από τους συμμετέχοντες πριν και μετά τη νηστεία και αναλύθηκαν διάφοροι κλινικοί δείκτες όπως το βάρος, δείκτες λειτουργίας της καρδιάς αλλά και τους ήπατος καθώς και οι οξειδοαναγωγικοί δείκτες στο αίμα των ασθενών.

Όλες οι βιοχημικές παράμετροι εκτός από τους οξειδοαναγωγικούς δείκτες μετρήθηκαν στην κλινική. Η νηστεία προκάλεσε σημαντική μείωση βάρους και μείωση της κοιλιακής περιφέρειας. Επιπρόσθετα, υπήρξε πτώση της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης, γλυκόζης, τριγλυκεριδίων και επιπέδων χοληστερόλης που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει παρόμοια επίδραση της νηστείας σε αυτούς τους βιοδείκτες (Li et al., 2013). Όσον αφορά τη λειτουργία του ήπατος, μελετήθηκαν τέσσερις βιοδείκτες: οι GOT και GPT παρουσίασαν μια διακριτή αλλά σημαντική αύξηση. Ταυτόχρονα, το GGT μειώθηκε. Αυτά τα ευρήματα έχουν δημοσιευτεί σε

διάφορες εργασίες, όταν η περίοδος νηστείας είναι αρκετά μεγάλη, λίγες μέρες μετά την νηστεία τα επίπεδα του GOT και του GPT επέστρεφαν στα αρχικά επίπεδα (Toledo et al., 2019). Επιπλέον, υπήρξε αύξηση των επιπέδων κρεατινίνης και ουρικού οξέος. Αυτές οι αλλαγές, εκτός από το ουρικό οξύ, ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Η αυξημένη συγκέντρωση ουρικού οξέος στο αίμα σχετίζεται αφενός με την αρχική αύξηση του καταβολισμού της πουρίνης και, αφετέρου, με την κατακράτηση που προκαλείται από ανταγωνιστική σωληνοειδή νεφρική έκκριση με κετονοσώματα. Μια παροδική αύξηση του ουρικού οξέος έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες διαφορετικής διάρκειας νηστείας και θεωρείται ως ένας από τους δείκτες νηστείας (Teruya et al., 2019).

Δεδομένου ότι η ομαδοποίηση των ατόμων με βάση τις αλλαγές στα επίπεδα GSH τους, προτάθηκε ότι παρέχει μία εικόνα για την ανάπτυξη μεταβολικών ασθενειών σε προηγούμενες μελέτες (Spanidis et al., 2016), χωρίσαμε τα άτομα σε τρεις υποομάδες: στην ομάδα 1 (46,8% των ατόμων), τα άτομα με υψηλές συγκεντρώσεις GSH έδειξαν μείωση, στην ομάδα 2 (28,4% των ατόμων), η χαμηλή συγκέντρωση GSH αυξήθηκε, πιθανώς λόγω αυξημένης βιοσύνθεσης (Grawton et al., 2018) και της ομάδας 3 (24,8% των ατόμων), στις οποίες η συγκέντρωση GSH παρέμεινε αμετάβλητη. Υποθέσαμε ότι η νηστεία θα ομαλοποιήσει τις συγκεντρώσεις GSH, οδηγώντας σε μια πιο ομοιογενή διακύμανση στο τέλος της παρέμβασης, αλλά τα παρόντα δεδομένα δεν μας επιτρέπουν να βγάλουμε ένα σαφές συμπέρασμα. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιούνται με καθημερινές μετρήσεις σε ομάδες ασθενών με διαταραγμένες τιμές GSH, όπως άτομα με χρόνιες παθήσεις (π.χ. καρκίνοι ή νευροεκφυλιστικές ασθένειες) ή με μεταλλάξεις του γονιδίου MTHFR, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της κυστεΐνης.

Επιπλέον, η συγκέντρωση της GSH έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με διαφορετικές μεταβολικές ασθένειες (Spanidis et al., 2016). Τα χαμηλά επίπεδα GSH έχουν συσχετιστεί με οξειδωτικό στρες, ενώ οι υψηλές τιμές GSH υποδηλώνουν πιθανώς αναγωγικό στρες, δύο καταστάσεις που μπορεί να εμπλέκονται σε διαφορετικές μεταβολικές διαταραχές, (Vázquez-Medina et al., 2011; Goutzourelas et al., 2018; Gerber et al., 2017). Προηγουμένως, έχει εξεταστεί και έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών που στοχεύουν στη βελτίωση του προφίλ οξειδοαναγωγής εξαρτώνται από τις βασικές τιμές των εγγενών αντιοξειδωτικών. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση βιταμίνης C και E μειώνει το οξειδωτικό στρες μόνο όταν τα επίπεδα των βιοδεικτών της οξειδωτικής

τροποποίησης μακρομορίων είναι υψηλά (Block et al., 2008), ενώ η οξεία άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες σε μη προστατευμένα άτομα που εμφανίζουν χαμηλές τιμές αντιοξειδωτικών σε ηρεμία (Stagos et al., 2015).

Είναι ενδιαφέρον ότι η TAC αυξήθηκε τόσο στο σύνολο των συμμετεχόντων όσο και σε καθεμία από τις υποομάδες. Αυτό υποδηλώνει μια αύξηση των αντιοξειδωτικών μορίων μετά την νηστεία. Δεδομένου ότι οι συμμετέχοντες δεν κατανάλωναν τροφή και επομένως εξωγενή αντιοξειδωτικά διαπιστώνουμε ότι αυξήθηκαν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια. Αυτό υποστηρίζεται από την αύξηση του ουρικού οξέος που μετρήθηκε. Πιθανόν και άλλα αντιοξειδωτικά μόρια όπως η χολερυθρίνη να αυξήθηκαν μετά την νηστεία. Παράλληλα τα TBARS μειώθηκαν σημαντικά μετά την νηστεία. Αυτό υποδηλώνει ότι μειώθηκε η λιπιδική υπεροξείδωση, άρα και το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, δεν φάνηκε να μεταβάλεται η υπεροξείδωση πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι μεταβολές δραστηριότητας Catalase, GPx και GR ήταν αμετάβλητες και στο σύνολο και στις υποομάδες.

Η αλλαγή του μεταβολισμού από καύση γλυκόζη σε καύση λίπος κατά την έναρξη της νηστείας αυξάνει μετρίως την παραγωγή ROS και προκαλεί ήπιο οξειδωτικό στρες το οποίο μερικές φορές ονομάζεται eustress (Sies et al., 2019). Αυτό ενεργοποιεί μια προσαρμοστική απόκριση που ρυθμίζει την αντιοξειδωτική άμυνα και αυξάνει την ικανότητα των κυττάρων να αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό στρες (Jones et al., 2006). Η ενεργοποίηση του Nrf2 σε απόκριση του οξειδωτικού στρες επηρεάζει την ομοιόσταση των ROS ρυθμίζοντας τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα μέσω της γονιδιακής έκφρασης πολλών γονιδίων στόχων (Miller et al., 2018; Pearson et al., 2008). Αυτά περιλαμβάνουν την επαγωγή υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης και της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης, κρίσιμων αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ma, 2013).

Υπάρχουν άτομα με οξειδωτικό στρες αλλά και άτομα με αναγωγικό στρες (Ron et al., 2012). Ένα υπερβολικά οξειδωτικό περιβάλλον μπορεί να είναι υπεύθυνο για την ακατάλληλη αναδίπλωση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ron et al., 2012; Schoenmakers et al., 2012; Sceneur et al., 2008). Στο αναγωγικό περιβάλλον, οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ υπολειμμάτων κυστεΐνης δεν μπορούν να αναπτυχθούν, και τελικά οι πρωτεΐνες δεν αποκτούν την κανονική τριτογενή δομή τους, η οποία μακροπρόθεσμα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια λειτουργίας, με αποτέλεσμα την έναρξη της νόσου (Sceneur et al., 2008). Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα άτομα με υψηλή συγκέντρωση GSH πριν από τη νηστεία (ομάδα 1) βρίσκονται σε

ένα πιο έντονο αναγωγικό κυτταρικό περιβάλλον, ενώ τα άτομα με χαμηλά επίπεδα επιπέδων GSH πριν από τη νηστεία (ομάδα 2) πρέπει να ενισχύσουν τα επίπεδα της GSH. Στην ομάδα 3, που χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσα επίπεδα αρχικής GSH, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η απουσία αλλαγής οφείλεται στην επαρκή οξειδαναγωγική κατάσταση για απόκριση του οργανισμού πριν από τη νηστεία. Επιπλέον, το αναγωγικό στρες που προκαλείται από την άσκηση, αν και γενικά είναι γνωστό ότι είναι ευεργετικό, μπορεί να είναι επιζήμιο για άτομα με χαμηλές τιμές GSH, αλλά όχι για εκείνα τα άτομα με αυξημένες αρχικές τιμές GSH ( Spanidis et al., 2018). Οι επιδράσεις των ερεθισμάτων που αλλάζουν την οξειδοαναγωγή, όπως η χορήγηση αντιοξειδωτικών και η άσκηση , εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις βασικές τιμές των εγγενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Ωστόσο, η μελέτη μας δείχνει ότι αυτό δεν ισχύει για μια περίοδο 10 ημερών νηστείας, καθώς οι επιδράσεις της στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής είναι οι ίδιες ανεξάρτητα από τις τιμές βάσης GSH. Άλλες μελέτες που ανέλυσαν αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως καταλάση και πραγματοποιήθηκαν σε ζώα έχουν παρατηρήσει αύξηση μετά από παρατεταμένη νηστεία και άλλων οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών (Mgrad et al., 2019).

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη αναφέρει ότι ένα πρωτόκολλο νηστείας δέκα ημερών οδηγεί σε απώλεια βάρους, βελτιωμένες καρδιαγγειακές παραμέτρους, μειωμένη υπεροξείδωση λιπιδίων και αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος σε 109 άτομα. Προτείναμε να διακρίνουμε τα άτομα σε τρεις ομάδες με βάση τις τιμές GSH βασικής γραμμής (δηλαδή πριν από τη νηστεία) και διαπιστώσαμε ότι η επίδραση αυτού του πρωτοκόλλου νηστείας στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν η ίδια και στις τρεις ομάδες. Αυτή είναι μία από τις πρώτες μελέτες που περιγράφουν τις επιδράσεις της περιοδικής στην κατάσταση οξειδοαναγωγής αίματος στον άνθρωπο και δείχνουν ότι αυτά τα αποτελέσματα είναι ανεξάρτητα από τις τιμές της GSH πριν από τη νηστεία. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με καθημερινές μετρήσεις για να κατανοήσουμε καλύτερα την εξέλιξη της κατάστασης οξειδοαναγωγής σε μεγάλες περιόδους νηστείας.

## Βιβλιογραφία

Ahmed, S. H., Chowdhury, T. A., Hussain, S., Syed, A., Karamat, A., Helmy, A., Ghouri, N. (2020). Ramadan and Diabetes: A Narrative Review and Practice Update. *Diabetes Therapy*.

Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.

Anton, S.D., Moehl, K., Donahoo, W.T., Marosi, K., Lee, S.A., Mainous, A.G., Leeuwenburgh, C., Mattson, M.P. (2018) Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting. *Obesity*, 26, 254–268

Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*.

Block, G., Jensen, C.D., Morrow, J.D., Holland, N., Norkus, E.P., Milne, G.L., Hudes, M., Dalvi, T.B., Crawford, P.B., Fung, E.B.(2008) The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radic. Biol. Med*, 45, 377–384.

Caviezel, A., Margonato, G., Slaviero, F., Bonetti, G., Vicedomini, A., Cattaneo, G. (1986). Early improvement of left ventricular function during caloric restriction in obesity. *Int J Obes*, 10(6), 421-6.

Cheng, Z., Almeida, FA., (2014). Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity. *Cell cycle*, 13(6), 890-897.

Cheng, C.-W., Adams, G.B., Perin, L., Wei, M., Zhou, X., Lam, B.S., Da Sacco, S., Mirisola, M., Quinn, D.I., Dorff, T.B.(2014) Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression. *Cell Stem Cell*, 14, 810–823.

Chung, K.W., Chung, H.Y. (2019) The Effects of Calorie Restriction on Autophagy: Role on Aging Intervention. *Nutrients*, 11, 2923

Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285.

Dossou, A.S., Basu,A.(2019) The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancer*, 11, 1422

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*.

Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J., & Korte, D. W. J. (1992). Free radical mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), 153–165.

Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4), 327–358.

Gerber, P.A., Rutter, G.A. (2017) The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid. Redox Signal*, 26, 501–518.

Goutzourelas, N., Orfanou, M., Charizanis, I., Leon, G., Spandidos, D.A., Kouretas, D.(2018) GSH levels affect weight loss in individuals with metabolic syndrome and obesity following dietary therapy. *Exp. Ther. Med*, 16, 635–642.

Grabacka, M., Pierzchalska, M., Reiss,K., (2013) Peroxisome proliferator activated receptor a ligand as anticancer drugs targeting mitochondrial metabolism. *Current Pharmaceutical biotechnology*, 14(3).

Haene, E., Desiere, S., D’Haese, M., Verbeke, W., & Schoors, K. (2019). Religion, Food Choices, and Demand Seasonality: Evidence from the Ethiopian Milk Market. *Foods*, 8(5), 167.

Halliwell, Barry, & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*.

Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1865–1879.

Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), 145–158.

Land, E. T. (1990). Free radicals in biology and medicine. *International Journal of Radiation Biology*.

Leaf, D. A., Kleinman, M. T., Hamilton, M., & Barstow, T. J. (1997). The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.

Levine, R. L., Moskowitz, J., & Stadtman, E. R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: Roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*.

Le Maho, Y., Delclitte, P., & Chatonnet, J. (1976). Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 231(3), 913–922

Li, C., Ostermann, T., Hardt, M., Lüdtkke, R., Broecker-Preuss, M., Dobos, G., Michalsen, A. (2013) Metabolic and psychological response to 7-day fasting in obese patients with and without metabolic syndrome. *Complementary Med. Res*, 20, 413–420.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy*

Madina, D.L., Paola, Simone., Peluso, Ivana., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., Settembre, C., Wang, W., Gao, Q., Xu, H., Sandri, M., Rizzuto, R., De Matteis, M. A., Ballabio, A. (2015) Lysosomal calcium signaling regulates autophagy via calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol*, 17(3), 288-299.

Madkour, M.I., El-Serafi, A.T., Jahrami, H.A., Sherif, N.M., Hassan, R.E., Awadallah, S. (2019) Ramadan diurnal intermittent fasting modulates SOD2, TFAM,

Nrf2, and sirtuins (SIRT1, SIRT3) gene expressions in subjects with overweight and obesity. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 155, 107801.

Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Tsoukalas, D., Sarandi, E., Thanasoula, M., Tsatsakis, A. (2020). Chronic Inflammation in the Context of Everyday Life: Dietary Changes as Mitigating Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 4135.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.

Ma, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013, 53, 401–426

Malhert ,B., Gerritsmann,H., Stalder,G., Ruf,T., Zahariev,A., Blanc, S., Giroud,S. (2018) Implications of being born late in the active season for growth, fattening, torpor use, winter survival and fecundity. *eLife*, 7

Mattson, M. P., Longo, V. D., & Harvie, M. (2017). Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Research*

Miller, V. J., Villamena, F. A., & Volek, J. S. (2018). Nutritional Ketosis and Mitohormesis: Potential Implications for Mitochondrial Function and Human Health. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2018, 1–27.

Mrad, S., Rejeb, H., Ben Abdallah, J., Graiet, H., Ben Khelifa, M., Abed, A., Ferchichi, S., Limem, K., Ben Saad, H.(2019) The impacts of ramadan intermittent fasting on oxidant/antioxidant stress biomarkers of stable chronic obstructive pulmonary disease male patients. *Am. J. Men's Health*, 13.

Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*.

Pearson, K.J., Lewis, K.N., Price, N.L., Chang, J.W., Perez, E., Cascajo, M.V., Tamashiro, K.L., Poosala, S., Csiszar, A., Ungvari, Z.(2008) Nrf2 mediates cancer protection but not prolongevity induced by caloric restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2325–2330.



Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal Clinical Biochemistry* : IJCB, 30(1), 11–26.

Picó, Serra, Rodríguez, Keijer, & Palou. (2019). Biomarkers of Nutrition and Health: New Tools for New Approaches. *Nutrients*, 11(5), 1092.

Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., & Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv Fur Tierernahrung*, 52(3), 203–222.

Percário, S., da Silva Barbosa, A., Varela, E. L. P., Gomes, A. R. Q., Ferreira, M. E. S., de Nazaré Araújo Moreira, T., & Dolabela, M. F. (2020). Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–23.

Pentice, A.M. Starvation in humans: Evolutionary background and contemporary implications. *Mech. Ageing Dev.* 2005, 126, 976–981

Robin, J. P., Frain, M., Sardet, C., Groscolas, R., & Le Maho, Y. (1988). Protein and lipid utilization during long-term fasting in emperor penguins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 254(1), 61–68

Ron, D., Harding, H.P.(2012) Protein-folding homeostasis in the endoplasmic reticulum and nutritional regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M. T., Nissen, P., & Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural and Molecular Biology*.

Scheuner, D., Kaufman, R.J. (2008) The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with  $\beta$ -cell failure and diabetes. *Endocr. Rev*, 29, 317–333.

Schoenmakers, E., Agostini, M., Mitchell, C., Schoenmakers, N., Papp, L., Rajanayagam, O., Padidela, R., Ceron-Gutierrez, L., Doffinger, R., Prevosto,

C.(2010)Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J. Clin. Investig.*, 120,4220–4235.

Sies, H. (2019) *Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis*. In *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 153–163.

Spanidis, Y., Mpesios, A., Stagos, D., Goutzourelas, N., Bar-Or, D., Karapetsa, M., Zakynthinos, E., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M., Leon, G. (2016) Assessment of the redox status in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes reveals great variations. *Exp. Ther. Med*, 11, 895–903.

Spanidis, Y., Veskoukis, A.S., Papanikolaou, C., Stagos, D., Priftis, A., Deli, C.K., Jamurtas, A.Z., Kouretas, D.(2018) Exercise-induced reductive stress is a protective mechanism against oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells. *Oxidative Med. Cell. Longev.*

Stagos, D., Goutzourelas, N., Ntontou, A.-M., Kafantaris, I., Deli, C.K., Poullos, A., Jamurtas, A.Z., Bar-Or, D., Kouretas, D.(2015) Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative Med. Cell. Longev.*

Szweda, P. A., Friguet, B., & Szweda, L. I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(1), 29–36.

Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., Dinkova-Kostova, A. T., & Hayes, J. D. (2015). Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 108–146.

Thankamony, A., Capalbo, D., Marcovecchio, M. L., Sleight, A., Jørgensen, S. W., Hill, N. R., Dunger, D. B. (2014). Low Circulating Levels of IGF-1 in Healthy Adults Are Associated With Reduced  $\beta$ -Cell Function, Increased Intramyocellular Lipid, and

Enhanced Fat Utilization During Fasting. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(6), 2198–2207

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*

Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., Forman, H.J., Crocker, D.E., Ortiz, R.M. (2011) Prolonged fasting increases glutathione biosynthesis in postweaned northern elephant seals. *J. Exp. Biol*, 214, 1294–1299.

Vázquez-Medina, J.P., Soñanez-Organis, J.G., Rodriguez, R., Viscarra, J.A., Nishiyama, A., Crocker, D.E., Ortiz, R.M. (2013) Prolonged fasting activates Nrf2 in post-weaned elephant seals. *J. Exp. Biol*, 216, 2870–2878.

Wan, R., Camandola, S., & Mattson, M. P. (2003). Intermittent Food Deprivation Improves Cardiovascular and Neuroendocrine Responses to Stress in Rats. *The Journal of Nutrition*, 133(6), 1921–1929

Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., De Andrade, M., & Li, D. (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.

Wilhelmi de Toledo, F., Grundler, F., Goutzourelas, N., Tekos, F., Vassi, E., Mesnage, R., & Kouretas, D. (2020). Influence of Long-Term Fasting on Blood Redox Status in Humans. *Antioxidants*, 9(6)

Wilhelmi de Toledo, F., Grundler, F., Sirtori, C. R., & Ruscica, M. (2020). Unravelling the health effects of fasting: a long road from obesity treatment to healthy life span increase and improved cognition. *Annals of Medicine*, 1–15.

Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., & Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal*, 23(12), 2369–2380.

Zouhal, H., Saeidi, A., Salhi, A., Li, H., Essop, M. F., Laher, I., ... Ben Abderrahman, A. (2020). Exercise Training and Fasting: Current Insights. Open Access Journal of Sports Medicine, Volume 11, 1–28.

Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου 26, 151–194.

Κουρέτας, Δ., Γκουτζουρέλας, Ν., Τέκος, Φ. (2019) Διαλειμματική νηστεία και αποφυγή νόσων. 13-19