



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΜΟΝΑΔΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

*Μελέτη της επίδρασης του λίπους και του σιδήρου στη  
βιοδραστικότητα αφεψημάτων τσαγιού*



**Αντώνιος Ε. Κουτελιδάκης**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010**

Copyrighting 2010 Αντώνιος Ε. Κουτελιδάκης

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).*

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Μελέτη της επίδρασης του λίπους και του σιδήρου στη βιοδραστικότητα  
αφεψημάτων τσαγιού»*

**Αντώνιος Ε. Κουτελιδάκης**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:** Καψοκεφάλου Μαρία, Επίκουρος  
Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

**Τριμελής επιτροπή παρακολούθησης:**

Καψοκεφάλου Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Κωμαΐτης Μιχαήλ, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ζαμπέλας Αντώνιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

**Επταμελής εξεταστική επιτροπή:**

Καψοκεφάλου Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Κωμαΐτης Μιχαήλ, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ζαμπέλας Αντώνιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ζέρβας Γεώργιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Παναγιωτάκος Δημοσθένης, Αναπληρωτής Καθηγητής Χ.Π.Α.

Ραλλίδης Λουκιανός, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Ημερομηνία εξέτασης: 21/10/2010

*Στους γονείς μου,  
Στη γιαγιά μου,  
Στην Αγγελική*

*«Η τροφή σου ας είναι το φάρμακο σου»*

*Ιπποκράτης, 431π.χ.*

*«Αν η διατροφή μας δεν είναι σωστή κανένας γιατρός δεν μπορεί να μας γιατρέψει. Αν τρώμε σωστά, κανένας γιατρός δε μας χρειάζεται».*

*Βίκτωρ Ρόσινε (Νορβηγός γιατρός, 1930)*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές και εκ βάθους καρδίας ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Καψοκεφάλου Μαρία για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, την άψογη συνεργασία, την αμέριστη και πολύτιμη καθοδήγηση και την συμβουλευτική και διδακτική συμβολή της κατά την επιτέλεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή κο Ζαμπέλα Αντώνη για τις σημαντικές παρατηρήσεις του, την άψογη συνεργασία και καθοδήγηση κατά την επιτέλεση της διατριβής και την αμέριστη βοήθεια στην κατεύθυνση ολοκλήρωσης της κλινικής μελέτης. Θερμές ευχαριστίες εκφράζω και στον καθηγητή κο Κωμαίτη Μιχαήλ για τις πολύτιμες συμβουλές του και τις εύστοχες επισημάνσεις του. Επίσης ευχαριστώ πολύ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής αναπληρωτή καθηγητή κο Παναγιωτάκο Δημοσθένη για την πολύτιμη και καταλυτική βοήθεια κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τον επίκουρο καθηγητή καρδιολογίας κο Ραλλίδη Λουκιανό για την οργάνωση, το συντονισμό και τις συμβουλές κατά την επιτέλεση της κλινικής μελέτης στο νοσοκομείο «Αττικόν», τον Αναπληρωτή καθηγητή κο Δροσινό Ελευθέριο για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και για την άψογη συνεργασία με το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου κατά την επιτέλεση των μοριακών αναλύσεων και τον καθηγητή Διατροφής ζώων κο Ζέρβα Γεώργιο για τις σημαντικές επισημάνσεις του.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ τους υπευθύνους του κέντρου βιοϊατρικών ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και ιδίως τις ερευνήτριες κα Δρ Ντούνη Ελένη και κα Δρ Κάμπερ Μαρία, για την βοήθεια τους κατά την επιτέλεση των πειραμάτων με ποντίκια. Επίσης ευχαριστώ θερμά τον ερευνητή και επιστημονικό συνεργάτη του Τ.Ε.Ι. Αθηνών Δρ Κίζη Δημοσθένη για την πολύτιμη καθοδήγηση και την εκμάθηση των μοριακών τεχνικών που εφαρμόστηκαν στους ιστούς των ποντικίων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ολόψυχα την ειδικευόμενη ιατρό καρδιολογίας Δρ Κόνιαρη Κατερίνα για την άψογη συνεργασία της κατά τη διάρκεια της κλινικής μελέτης στο νοσοκομείο «Αττικόν». Επίσης, θερμότερες ευχαριστίες εκφράζω στη Δρ Αργύρη Κωνσταντίνα για την άψογη συνεργασία και συνεννόηση και για την πολύτιμη βοήθεια σε πληθώρα θεμάτων στο εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων. Πολλά ευχαριστώ οφείλω σε όλους τους συνεργάτες και φίλους εκ της Μονάδας

Διατροφής του εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων και των λοιπών εργαστηρίων και ιδιαίτερα στους υποψήφιους Διδάκτορες Ανδρίτσο Νικόλαο, Δήμου Ανδρέα, Μαλισόβα Όλγα και Θεοφανίδα Ελένη, στους Διδάκτορες Γαρδέλη Χρυσανγή και Προεστό Χαράλαμπο, στο μεταπτυχιακό φοιτητή Πούνη Γιώργο και στις προπτυχιακές φοιτήτριες Κυριακού Άλκηστη, Βαρβατσούλη Γιώτα και Μπουτοπούλου Ηρώ.

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής δε θα ήτο δυνατό να ολοκληρωθεί χωρίς την στήριξη από τους γονείς μου Ξανθίππη και Μανόλη και την αδελφή μου Ζωή, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την πνευματική ενθάρρυνση και την ηθική συμβολή. Θερμότατα ευχαριστώ την Αγγελική για την κατανόηση και την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την ελληνική πολιτεία και το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική ενίσχυση, η οποία ήτο πολύτιμη και συνέβαλε εις την προγραμματισμένη ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής. Επίσης ευχαριστώ την εταιρεία ΕΛΑΪΣ-Unilever για την προσφορά ειδών τσαγιού και τη γενικότερη στήριξη της μελέτης.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	6
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	9
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ</b>	10
1.1. Εισαγωγή στο τσάι ( <i>Camellia Sinensis</i> ).....	10
1.2. Είδη και βιομηχανική παραγωγή τσαγιού.....	11
1.3. Παγκόσμια κατανάλωση τσαγιού.....	13
1.4. Χημική σύσταση του τσαγιού.....	13
1.4.1. Περιεκτικότητα του τσαγιού σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά.....	13
1.4.2. Σύσταση του τσαγιού σε πολυφαινόλες.....	14
1.4.3. Οι κατεχίνες του τσαγιού.....	14
1.5. Αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας.....	16
<b>2. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ</b>	19
2.1. Εισαγωγή στην έννοια της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών.....	19
2.2. Διαδικασίες απορρόφησης των πολυφαινολών του τσαγιού.....	20
2.3. Φαρμακοκινητική, μεταβολισμός και απέκκριση των πολυφαινολών του τσαγιού.....	22
2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του τσαγιού.....	26
2.4.1. Γενετικές διαφοροποιήσεις.....	26
2.4.2. Αλληλεπιδράσεις με διατροφικούς παράγοντες.....	26
2.5. Μεθοδολογίες εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του τσαγιού.....	29
2.5.1. Μέθοδοι ταυτοποίησης των φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους εντός του οργανισμού.....	29
2.5.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των ολικών φαινολικών εντός του οργανισμού.....	30
2.5.2.1. Η μέθοδος πρότυπης καμπύλης κατεχίνης.....	30
2.5.2.2. Η μέθοδος Folin Ciocalteu.....	31
<b>3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΡΟΛΟ ΤΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ</b>	32
3.1. Οξειδωτικές καταστροφές και κυτταρικός εκφυλισμός.....	32
3.1.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	32
3.1.2. Το λίπος και ο σίδηρος ως δυνητικοί οξειδωτικοί παράγοντες.....	36
3.2. Αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού εντός του οργανισμού.....	37

3.2.1. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του τσαγιού in vitro.....	37
3.2.2. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού εντός του οργανισμού.....	38
3.2.3. Αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού: Στοιχεία από μελέτες σε ζώα και ανθρώπους.....	43
3.2.4. Βιοδείκτες και μεθοδολογίες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης εντός του οργανισμού.....	47
3.2.4.1. Βιοδείκτες προϊόντων οξείδωσης στο πλάσμα.....	47
3.2.4.2. Βιοδείκτες συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού.....	48
3.2.4.2.1. Μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου.....	50
3.2.4.2.2. Μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων.....	50
3.3. Αντικαρκινική δράση του τσαγιού.....	51
3.3.1. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού.....	51
3.3.2. Επίδραση του τσαγιού σε διάφορους τύπους καρκίνου.....	54
3.4. Άλλες βιολογικές δράσεις του τσαγιού.....	56
<b>4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ</b>	59
4.1. Διαδικασίες έκφρασης γονιδίων.....	59
4.2. Επίδραση του τσαγιού στην έκφραση γονιδίων και εμπλοκή του σε σχετικά μεταβολικά μονοπάτια.....	61
4.2.1. Επίδραση του τσαγιού σε γονίδια σχετιζόμενα με το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα.....	61
4.2.2. Επίδραση του τσαγιού σε γονίδια σχετιζόμενα με τον καρκίνο και την αθηρωμάτωση.....	62
4.3. Μεθοδολογίες διερεύνησης της έκφρασης των γονιδίων.....	67
4.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	67
4.3.2. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης.....	70
4.3.3. Πρωτεωμική ανάλυση.....	70
<b>5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ</b>	72
5.1. Εισαγωγή στις καρδιαγγειακές παθήσεις και τη στεφανιαία νόσο.....	72
5.1.1. Παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων.....	72
5.1.2. Παθοφυσιολογία της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ).....	73
5.1.3. Διατροφή και στεφανιαία νόσος.....	75



5.2. Μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων.....	77
5.2.1. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί αθηρωμάτωσης.....	77
5.2.2. Επίδραση των διαιτητικών πολυφαινολών στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηρωμάτωσης.....	79
5.2.3. Συσχέτιση της κατανάλωσης τσαγιού με τις καρδιαγγειακές παθήσεις.....	82
5.3. Ο ρόλος του τσαγιού στην απορρόφηση των λιπιδίων και το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών.....	84
5.3.1. Μηχανισμοί απορρόφησης λιπιδίων και μεταβολισμού λιποπρωτεϊνών.....	84
5.3.2. Μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού στην απορρόφηση των λιπιδίων.....	86
5.4. Η σημασία της μεταγευματικής κατάστασης στις καρδιαγγειακές παθήσεις και ο ρόλος των αντιοξειδωτικών συστατικών της διατροφής.....	89
5.4.1. Μεταγευματική κατάσταση και καρδιαγγειακές παθήσεις.....	89
5.4.2. Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών και του τσαγιού στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες.....	91
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	94
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ</b>	95
<b>6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ ΤΣΑΓΙΟΥ <i>IN VITRO</i></b>	98
6.1. Εισαγωγή-Στόχος.....	98
6.2. Υλικά και αντιδραστήρια.....	99
6.3. Μέθοδοι.....	99
6.3.1. <i>In vitro</i> προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων με τη μέθοδο FRAP.....	99
6.3.2. <i>In vitro</i> προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων με τη μέθοδο ORAC.....	101
6.3.3. <i>In vitro</i> προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων τσαγιού με τη μέθοδο FOLIN.....	102
6.4. Στατιστική επεξεργασία.....	102
6.5. Αποτελέσματα.....	103
<b>7. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ</b>	106

**ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΣΑΓΙΟΥ Ή ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟΥ**

7.1. Εισαγωγή-Στόχος.....	106
7.2. Πειραματικός σχεδιασμός.....	106
7.3. Υλικά και αντιδραστήρια.....	107
7.4. Μέθοδοι.....	107
7.4.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	107
7.4.2. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών του πλάσματος (μέθοδος εξωτερικών προτύπων).....	108
7.5. Αποτελέσματα.....	109
<b>8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ ΖΩΩΝ, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΨΗΛΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ <i>IN VITRO</i> ΠΕΨΗ</b>	115
8.1. Εισαγωγή-Στόχος.....	115
8.2. Πειραματικός σχεδιασμός.....	116
8.3. Υλικά και αντιδραστήρια.....	117
8.4. Μέθοδοι.....	118
8.4.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών παχέος εντέρου με τη μέθοδο FRAP.....	118
8.4.2. Διαδικασία <i>in vitro</i> πέψης.....	118
8.4.3. Προσδιορισμός των προϊόντων οξείδωσης με τη μέθοδο λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS (thiobarbituric acid reactive substances).....	120
8.5. Στατιστική ανάλυση.....	120
8.6. Αποτελέσματα.....	121
<b>9. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΖΩΑ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΙΠΟΣ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ</b>	127
9.1. Εισαγωγή-Στόχος.....	127
9.2. Περιγραφή μονάδας πειραματόζωων και πειραματικών ποντικών.....	128

9.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....	130
9.4. Υλικά και αντιδραστήρια.....	134
9.4.1. Δίαιτες ζώων.....	134
9.4.2. Χημικές ουσίες.....	134
9.5. Μέθοδοι.....	136
9.5.1. In vitro αξιολόγηση των ολικών φαινολικών συστατικών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των τροφών των ζώων και του GTE.....	136
9.5.2. Αναλύσεις προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα και τους ιστούς οργάνων των ποντικών.....	137
9.5.2.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP.....	137
9.5.2.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ORAC.....	138
9.5.3. Αναλύσεις διερεύνησης της επίδρασης του εκχυλίσματος τσαγιού στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στην καρδιά και το ήπαρ.....	139
9.6. Στατιστική επεξεργασία.....	143
9.7. Αποτελέσματα.....	144
<b>10. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΓΕΥΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΛΙΠΟΣ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟ ΣΕ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ</b>	154
10.1. Εισαγωγή-Στόχος.....	154
10.2. Πειραματικός σχεδιασμός.....	155
10.2.1. Κριτήρια εισόδου στη μελέτη.....	155
10.2.2. Πρωτόκολλο της κλινικής μελέτης.....	155
10.3. Υλικά και αντιδραστήρια.....	157
10.4. Μέθοδοι.....	157
10.4.1. Σύσταση και παρασκευή γευμάτων και τσαγιού.....	157
10.4.2. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα των ασθενών.....	158
10.4.3. Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών στον ορό των ασθενών.....	159
10.5. Στατιστικές αναλύσεις.....	161
10.5.1. Ανάλυση ισχύος κλινικής δοκιμής.....	161
10.5.2. Ανάλυση δεδομένων χαρακτηριστικών ασθενών.....	163
9.5.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	163

10.6. Αποτελέσματα κλινικής μελέτης.....	164
10.6.1. Αποτελέσματα χαρακτηριστικών ασθενών.....	164
10.6.2. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικών αναλύσεων στο πλάσμα και τον ορό.....	165
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	172
<b>11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΟΤΗΤΩΝ</b>	173
11.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού <i>in vitro</i> .....	173
11.2. Κλινική μελέτη για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του πλάσματος σε φαινολικά συστατικά μετά την κατανάλωση τσαγιού ή μίγματος τσαγιού και σιδήρου.....	176
11.3. Μελέτη των αντιοξειδωτικής ικανότητας που προκύπτει από την κατανάλωση τσαγιού στο παχύ έντερο ζώων, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σιδήρου που προέκυψαν από <i>in vitro</i> πέψη.....	180
11.4. Μελέτη σε ζώα της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και διαίτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και σίδηρο στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων των ιστών.....	186
11.5. Κλινική μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και γεύματος που περιέχει λίπος και σίδηρο σε βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.....	197
<b>12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ</b>	207
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	212
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>	235

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τσάι είναι το δεύτερο σε κατανάλωση ποτό παγκοσμίως, μετά το νερό, ενώ πληθώρα κλινικών και επιδημιολογικών μελετών καταδεικνύει τις σημαντικές ευεργετικές δράσεις του εντός του οργανισμού. Αν και η βιοδραστικότητα του τσαγιού έχει μελετηθεί εκτενώς, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για τη διερεύνηση του ρόλου διαφόρων διατροφικών παραγόντων οι οποίοι δύναται να επηρεάζουν τους μηχανισμούς βιοπροσβασιμότητας και βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών του με συνέπεια την τροποποίηση των βιολογικών του δράσεων. Οι κύριοι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

- Η διερεύνηση της βιοδραστικότητας του τσαγιού με χρήση βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική του ικανότητα, το λιπιδαιμικό προφίλ, τη φλεγμονή και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στις καρδιαγγειακές παθήσεις.
- Η διερεύνηση της επίδρασης δύο διατροφικών παραγόντων, συγκεκριμένα του σιδήρου και του λίπους, στην βιοδραστικότητα του τσαγιού.

Για την επίτευξη των στόχων της μελέτης, ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε διατύπωση επιμέρους ερευνητικών υποθέσεων και πολλαπλές προσεγγίσεις *in vitro* σε ιστούς ζώων, *in vivo* σε ζώα, και κλινικές μελέτες. Συγκεκριμένα τα πειράματα που έλαβαν χώρα ήταν τα ακόλουθα:

A) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του τσαγιού *in vitro*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα του ενισχυμένου με κατεχίνες πράσινου τσαγιού εμφάνισε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδοι Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) και Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)) και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (μέθοδος FOLIN) σε σχέση με το απλό πράσινο και το μαύρο τσάι. Το ενισχυμένο με κατεχίνες πράσινο τσάι χρησιμοποιήθηκε σε μία εκ των κλινικών μελετών που ακολούθησαν.

B) Κλινική μελέτη για την μέτρηση της περιεκτικότητας του πλάσματος σε φαινολικά συστατικά μετά την κατανάλωση τσαγιού ή μίγματος τσαγιού και σιδήρου. Παρατηρήθηκε με χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) ότι 30, 45 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωση του τσαγιού εμφανίστηκαν περισσότερα φαινολικά συστατικά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την κατανάλωση του μίγματος τσαγιού με σίδηρο.

Μία πιθανή εξήγηση είναι η παρεμπόδιση της απορρόφησης των πολυφαινολών ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων τους με το σίδηρο εντός του εντερικού σωλήνος.

Γ) Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας που προκύπτει από την κατανάλωση του τσαγιού στο παχύ έντερο ζώων, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σιδήρου που προέκυψαν από *in vitro* πέψη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ιστοί των ζώων που ελάμβαναν τα αφεψήματα τσαγιού είχαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα ζώα της ομάδας ελέγχου, ενώ εμφάνισαν μικρότερη ευαισθησία στην οξειδωση που προκλήθηκε από την επώαση με σίδηρο. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού καταδεικνύουν ότι μια δίαιτα υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας δύναται να προστατεύει το παχύ έντερο από τις πιθανές οξειδωτικές δράσεις του μη απορροφημένου σιδήρου.

Δ) Μελέτη σε ζώα της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και διαίτας που είναι υψηλή σε λίπος και σίδηρο στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων (*catalase*, *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, *mapk-1*, *NF-kB* και *NADPHoxidase*) των ιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τσάι δεν επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα, αλλά την αύξησε στους ιστούς καρδιάς, αορτής και δωδεκαδακτύλου εντός της κανονικής διαίτας, ενώ εντός της λιπαρής διαίτας η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των οργάνων δεν επηρεάστηκε. Ο γαλακτικός σίδηρος μείωσε την αντιοξειδωτική ικανότητα στο ήπαρ, ενώ την αύξησε στο παχύ έντερο. Τα γονίδια *mapk-1* και *NF-kB* εμφάνισαν αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις στην έκφραση τους ανάμεσα στα δείγματα της καρδιάς. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η βιοδραστικότητα του τσαγιού είναι πιθανό να επηρεάζεται από την παρουσία σιδήρου και λίπους εντός της διαίτας.

Ε) Κλινική μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και γεύματος που περιέχει λίπος και σίδηρο σε βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις (αντιοξειδωτική ικανότητα, λιπίδια, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ουρικό οξύ, παγκρεατική λιπάση και γλυκόζη) σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος 1,5 h μετά την κατανάλωση πρωινού γεύματος παρουσία τσαγιού, αλλά όχι μετά την κατανάλωση του παρουσία τσαγιού με σίδηρο ή νερού. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων του ορού 3 h μετά την κατανάλωση του γεύματος με νερό, αλλά όχι όταν αυτό καταναλώθηκε με τσάι. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι το τσάι δύναται να εμφανίσει μεταγευματική βιοδραστικότητα βελτιώνοντας την αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος και επηρεάζοντας το ρυθμό αύξησης των

λιπιδίων. Η παρουσία του σιδήρου φαίνεται ότι παρεμποδίζει την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα.

Η έρευνα που παρουσιάζεται στην παρούσα διατριβή είναι μέρος συντονισμένων προσπαθειών που διαφωτίζουν την επίδραση διατροφικών παραγόντων όπως ο σίδηρος και το λίπος στη βιοδραστικότητα του τσαγιού. Τα αποτελέσματα της μελέτης προτείνουν ότι ο σίδηρος και το λίπος δύναται να αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του τσαγιού μέσω πολύπλοκων μηχανισμών που οδηγούν σε αλλαγές στη βιοδραστικότητα του. Επιπρόσθετα, η μελλοντική μελέτη της βιοδραστικότητας του τσαγιού θα μπορούσε να εστιαστεί όχι μόνο στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των συστατικών του, αλλά και στην επίδραση τους επί συγκεκριμένων μοριακών στόχων και βιοχημικών μονοπατιών που επηρεάζουν βιοδείκτες σχετιζόμενους με τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τον καρκίνο. Επιπρόσθετη έρευνα θα συντελούσε στην καλύτερη κατανόηση των πολυπαραγοντικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους διατροφικούς παράγοντες και στις πολυφαινόλες του τσαγιού καθώς και στη διεύρυνση της γνώσης σχετικά με τη βιοδραστικότητα του τσαγιού σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις.

## ABSTRACT

Tea is second in beverage consumption worldwide. Clinical and epidemiological studies show that tea exerts bioactivity that is beneficial to health. However there is little information on whether various dietary factors may interact with the components of tea and consequently affect the bioaccessibility and bioactivity of tea components.

The objective of the study was to investigate in mice and subsequently in humans:

- tea bioactivity with the use of biochemical indicators that are related to antioxidant activity, lipidemic profile, inflammation and expression of genes that are involved in the cardiovascular disease.
- the effect of two dietary factors, specifically iron and fat, in tea bioactivity.

To reach these objectives, a series of experiments were designed and conducted:

A) Evaluation of antioxidant capacity of tea *in vitro*. Infusions of green tea with higher catechin content had higher antioxidant capacity (Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays) and higher total phenolic content (FOLIN assay) than common green and black tea. The green tea with higher catechin content was used in the clinical studies that followed.

B) Clinical trial for the measurement of antioxidant capacity and of selected phenolics in plasma after the consumption of tea in the presence or in the absence of iron. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed that 30, 45 and 90 min after tea ingestion more phenolic compounds and in higher concentrations were identified in comparison with tea plus iron ingestion. Potential inhibition of polyphenol absorption as a result of luminal interactions between iron and phenolics is a plausible mechanism that may explain the observed effect.

C) Study of the antioxidant capacity of the colon of mice that have consumed tea. The colon tissues of animals that received tea infusions had higher antioxidant capacity and lower susceptibility to oxidation caused from iron under conditions of gastrointestinal digestion, than the control animals. These results suggest that a diet of high antioxidant capacity may protect the colon from the potential oxidative effect of non absorbed iron.

D) Animal study on the effect of tea and diets rich in fat or iron on total antioxidant capacity and gene expression (*catalase*, *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, *mapk-1*, *NF-kB* and *NADPHoxidase*) of specific tissues. Tea consumption for 37 days affected heart, aorta



and duodenum antioxidant capacity but not that of plasma or other organs when incorporated in a normal diet. When tea was incorporated in a fatty diet there was no effect in any of the organs tested. Iron lactate decreased antioxidant capacity in liver tissue and increased antioxidant capacity in colon. The *mapk-1* and *NF-kB* genes were shown to have noticeable variations in its expression in between samples of heart. These results suggest that expected benefits from GTE may depend on the presence of iron or fat in the diet.

E) Clinical trial on the bioactivity of tea consumed with a meal that contained fat and iron. Bioactivity was tested on biomarkers related to cardiovascular disease (antioxidant capacity, lipids, CRP, uric acid, pancreatic lipase and glucose) in patients with coronary artery disease. Plasma antioxidant capacity increased 1,5 h after the consumption of meal with tea, but no change after consumption of meal with tea plus iron or water. Furthermore, serum triglycerides levels showed a significant increase 3 h after the meal with water consumption, but no change after meal with tea consumption. These results suggest that tea could exert postprandial bioactivity by improving plasma antioxidant capacity and lipidemic profile. The presence of iron may impede the increase of plasma antioxidant capacity.

The innovative study presented herein is part of orchestrated efforts that elucidate tea bioactivity as well as the effect of dietary factors particularly iron and fat on tea bioactivity. The results of the study suggest that:

- A) the study of tea bioactivity may not be focused only on the antioxidant properties of tea but also on its effect on specific molecular targets and biochemical pathways related to cardiovascular disease
- B) iron and fat may interact with tea components via multiple mechanisms and affect its bioactivity.

Future research may provide an in depth understanding of the multifactorial interactions among dietary factors and tea polyphenols as well as valuable information regarding the potential bioactivity of tea in specific pathological states.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αυξημένη κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε βιοδραστικά συστατικά έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης πληθώρας εκφυλιστικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Fang, Yang & Wu, 2002; Esposito et al, 2003; Kaliora, Dedousis & Schmid, 2005; Sies, Stahl & Sevanian, 2005; Bourassa & Tardif, 2006). Η μελέτη του βιολογικού ρόλου διαφόρων τροφίμων και ποτών που περιέχουν βιοενεργά συστατικά, όπως οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες και οι φυτοχημικές ουσίες, αποτελεί ενδιαφέρον αντικείμενο επιστημονικής έρευνας. Οι βιοδραστικές ιδιότητες και ειδικότερα οι αντιοξειδωτικές δράσεις πολλών φρούτων και λαχανικών και διαφόρων ποτών και εκχυλισμάτων βοτάνων, ειδικότερα του τσαγιού (*Camellia sinensis*), έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* (Serafini, Ghiselli & Ferro-Luzzi, 1996; Heim et al, 2002; Pellegrini et al, 2003; Peng Wong, Peng Leong & Koh, 2006).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μετά την κατανάλωση αφεψημάτων τσαγιού και αρωματικών φυτών αυξάνει η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και των ιστών (Kim et al, 2000; De Boer et al, 2005; Koutelidakis et al, 2009). Μετά την απορρόφηση, τα αντιοξειδωτικά συστατικά του τσαγιού, όπως οι πολυφαινόλες και οι μεταβολίτες τους, μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε διάφορα όργανα εντός των οποίων δύναται να εμφανίσουν βιοδραστικότητα (Scalbert et al, 2002; Manach et al, 2004). Η βιοδιαθεσιμότητα και συνεπώς η βιοδραστικότητα των πολυφαινολών επηρεάζεται από πολλούς διατροφικούς παράγοντες, ειδικότερα από εκείνους που εμφανίζουν χημική συγγένεια με τις πολυφαινόλες (Cabrerá, Artacho & Gimenez, 2006; Khan & Mukhtar, 2007). Οι πρωτεΐνες, ο σίδηρος και το λίπος της διατροφής δύναται να αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του τσαγιού εντός του εντερικού σωλήνα κατά την πέψη, επηρεάζοντας τόσο την αντιοξειδωτική ικανότητα, όσο και λοιπές βιολογικές δράσεις σε μοριακό επίπεδο (Kowabata et al, 1996; Yoshino & Murakami, 1998; Manach et al, 2004; Alexandropoulou, Komaitis & Kapsokoufalou, 2005; Kapsokoufalou, Zhu & Miller, 2006).

Η μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων μιας διατροφής φαίνεται ότι εμφανίζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον όταν αυτή είναι πλούσια σε λιπαρά συστατικά (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία του οργανισμού σε οξειδωτικές καταστροφές μετά την κατανάλωση ενός

γεύματος πλούσιου σε λιπίδια, δεδομένης της αύξησης των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων στο αίμα (Ursini & Sevanian, 2002; Tsai et al, 2004; Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Η μελέτη της μεταγευματικής επίδρασης τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά, όπως το τσάι, εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ιδίως στην περίπτωση της δευτερογενούς πρόληψης ασθενών με στεφανιαία νόσο, εξαιτίας του οξειδωτικού στρες και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που φαίνεται να επιτείνονται μετά το γεύμα. Οι πολυφαινόλες έχει δειχθεί ότι αποτρέπουν το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες, αφενός μεν λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης και της δέσμευσης των εκ των λιπιδίων παραγόμενων ελευθέρων ριζών, αφετέρου δε λόγω πιθανής εμπλοκής του στην αναστολή της εντερικής απορρόφησης των λιπιδίων μέσω μηχανισμών, όπως η επίδραση επί των πεπτικών υδρολυτικών ενζύμων (Fryan, 1998; Natella et al, 2002; Sies, Stahl & Sevanian, 2005; Koo & Noh, 2007; Rauno et al, 2007).

Μια πρόσφατη επιστημονική προσέγγιση υποστηρίζει ότι η βιοδραστικότητα του τσαγιού θα μπορούσε να εστιαστεί, όχι μόνο στην αντιοξειδωτική του δράση, αλλά και στην επίδραση επί της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και την εμπλοκή στα πολύπλοκα βιοχημικά μονοπάτια του κυττάρου. Πρόκειται για τη θεωρία της διατροφογενομικής, η οποία συσχετίζει τα διατροφικά συστατικά με τα αποτελέσματα που αυτά προκαλούν σε μοριακό επίπεδο (Valazquez-Arellano & Encarnation, 2008). Η επίδραση διαφόρων φυσικών βιοδραστικών συστατικών σε γονίδια και βιοχημικά μονοπάτια έχει μελετηθεί τόσο σε μοντέλα ζώων, όσο και σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων (Li et al, 2007; Dreger et al, 2008). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες ίσως είναι ικανές να τροποποιούν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα, την αθηροσκληρωτική διαδικασία και την παθοφυσιολογία του καρκίνου (Ferguson et al, 2001; Baur et al, 2004; Al-Awwadi et al, 2005). Παραδείγματα γονιδίων στα οποία έχει διερευνηθεί η επίδραση των πολυφαινολών είναι η αντιοξειδωτική καταλάση, ο αυξητικός παράγοντας *VEGF* (Vascular Endothelium Growth Factor), η κολλαγενάση *MMP-2* (Matrix Metalloproteinase-2) και η κινάση *mapk-1* (Mitogen Activated Protein Kinase) (El Bedoui et al, 2005; Oak et al, 2005; Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν αφενός μεν η εκτίμηση της βιοδραστικότητας διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού (*Camellia Sinensis*), αφετέρου δε η μελέτη της επίδρασης διατροφικών παραγόντων στη βιοδραστικότητα των αφεψημάτων αυτών. Για το σκοπό αυτό ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε διατύπωση επιμέρους

ερευνητικών υποθέσεων και πολλαπλές προσεγγίσεις οι οποίες αφορούσαν τόσο *in vitro* πειράματα με αφεψήματα τσαγιού και ιστούς ζώων, όσο και *in vivo* μελέτες με ζώα και ανθρώπους. Τα πειράματα αυτά επικεντρώθηκαν περισσότερο στο πράσινο τσάι και είχαν ως στόχο τη διερεύνηση της βιοδραστικότητας του τσαγιού τόσο από πλευράς ενδεχόμενης αντιοξειδωτικής δράσης εντός του οργανισμού, όσο και από πλευράς πιθανής επίδρασης σε συγκεκριμένα γονίδια και μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου. Παράλληλα, μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του τσαγιού με διατροφικούς παράγοντες όπως το λίπος και ο σίδηρος, ενώ διερευνήθηκε η φαρμακοκινητική και η επίδραση του σε συγκεκριμένους βιοδείκτες ορού ασθενών με εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο.

*Σημειώνεται ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή επιτελέσθη έπειτα από παροχή υποτροφίας εκ του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών.*

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΤΣΑΙ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

## 1.1. Εισαγωγή στο τσάι (*Camellia Sinensis*)

Το τσάι αποτελεί ένα προϊόν προερχόμενο από τα φύλλα του φυτού *Camellia Sinensis*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Theaceae (θειδες). Πρόκειται για το δεύτερο σε κατανάλωση ρόφημα παγκοσμίως μετά το νερό και η μελέτη του παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον δεδομένης της κατανάλωσης του από πληθώρα ανθρώπων σε όλο τον κόσμο. Η κατανάλωση του τσαγιού αποτελεί τμήμα της καθημερινής ζωής στην Ευρώπη και την Ασία, ενώ ανέκαθεν εμφάνιζε κοινωνικοοικονομικές προεκτάσεις, λόγω της σύνδεσης της με πολλές καθημερινές κοινωνικές εκδηλώσεις των ανθρώπων (Cabrerera, Artacho & Gimenez, 2006; Ho, Lin & Shahidi, 2009) (Εικόνα 1.1.). Σύμφωνα με έναν αρχαίο κινέζικο θρύλο, το τσάι φαίνεται ότι ανακαλύφθηκε τυχαία το 2737 π.Χ. από τον κινέζο αυτοκράτορα Σεν Νουνγκ. Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου του, ο άνεμος παρέσυρε λίγα φύλλα τσαγιού εντός ενός δοχείου με βραστό νερό, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα αρωματικό, αναζωογονητικό ρόφημα, που ενθουσίασε την κινέζικη φρουρά. Από τότε, το τσάι χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως φαρμακευτικό βότανο και σταδιακά διαδόθηκε ως ρόφημα, ιδίως μετά τον 3<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ., οπότε άρχισε να καλλιεργείται. Στην Ευρώπη το τσάι έφτασε το 1610 από τους Πορτογάλους. Μέχρι τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα το τσάι που καταναλώνονταν στη δύση προέρχονταν από την Κίνα. Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα αναπτύχθηκε η βιομηχανία παραγωγής τσαγιού και η εμφάνιση διαφόρων ειδών τσαγιού σε συνδυασμό με την βελτίωση της συσκευασίας (tea bags) έδωσαν ώθηση στην παγκόσμια κατανάλωση του προϊόντος αυτού (Ho, Lin & Shahidi, 2009; www.foodinfo.net).

Τα φυτά του τσαγιού είναι αειθαλή, δικοτυλήδονα δενδρύλλια, αυτοφυή στο Θιβέτ και στο Ασσάμ. Τα φύλλα είναι επαλλάσσοντα, σκουροπράσινα γυαλιστερά, δερματώδη, λεπτώς πριονωτά και λογχοειδή. Τα άνθη είναι μασχαλιαία κρεμάμενα, λευκά ή λευκορόδινα με 5 ωοειδή σέπαλα, 5 πέταλα κυρτά, σαρκώδη, διατεταγμένα σε δύο σπονδύλους και πολυάριθμους κίτρινους στήμονες που έχουν στη βάση ενωμένα νήματα. Ωριμάζουν κάψουλες τρίλοβες, κρεμάμενες με 3-4 σπέρματα. Το είδος *Camellia sinensis* έχει πολλά υβρίδια που καλλιεργούνται για το αρωματικό φύλλωμα τους "Folia Theae". Εκλεκτή ποιότητα τσαγιού λαμβάνεται από τα 2-3

νεαρά φύλλα του βλαστού. Τα φυτά έχουν ύψος 10 περίπου μέτρα και ο καρπός τους είναι κάψα. Ευδοκιμούν σε επικλινείς εκτάσεις τροπικών και υποτροπικών περιοχών με βροχόπτωση 1500 χιλιοστά. Με κατάλληλο κλάδεμα τα φυτά παραμένουν στο ύψος των 1,5 μέτρων για να γίνεται πιο εύκολα η συγκομιδή των φύλλων, που επαναλαμβάνεται 2-3 φορές το χρόνο ανάλογα με την ταχύτητα αναπτύξεως των νεαρών κλάδων. Υπάρχουν δύο κύριες ποικιλίες φυτών τσαγιού. Η ποικιλία με μικρά φύλλα, γνωστή ως *Camellia Sinensis var sinensis*, που αναπτύσσεται στις δροσερές, υψηλές ορεινές περιοχές της κεντρικής Κίνας και της Ιαπωνίας και η ποικιλία με μεγάλα φύλλα, γνωστή ως *Camellia Sinensis var assamica*, που ευδοκιμεί περισσότερο στα υγρά, τροπικά κλίματα της βορειοανατολικής Ινδίας (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999; [www.foodinfo.net](http://www.foodinfo.net)).

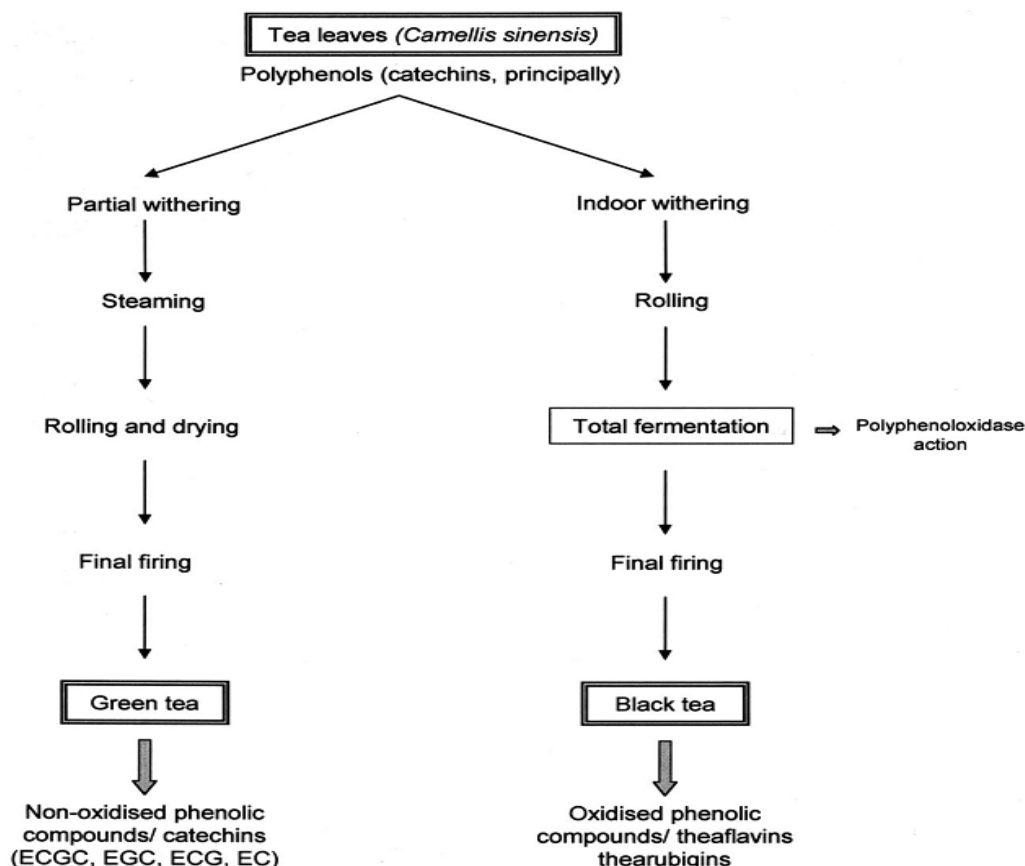


**Εικόνα 1.1.** Φυτεία τσαγιού και πίνακας που απεικονίζει την κοινωνική προέκταση της κατανάλωσης τσαγιού στην Ευρώπη στις αρχές του 18<sup>ου</sup> αιώνα ([www.campus.ncl.ac.uk/databases/history/chocs/tea.gif](http://www.campus.ncl.ac.uk/databases/history/chocs/tea.gif)).

## 1.2. Είδη και βιομηχανική παραγωγή τσαγιού

Ανάλογα με την υφιστάμενη βιομηχανική επεξεργασία, το τσάι κατηγοριοποιείται σε τρεις βασικούς τύπους: α) Μη ζυμούμενο πράσινο τσάι, το οποίο παράγεται μέσω ξήρασης και κατεργασίας με ατμό των φρέσκων φύλλων του φυτού. Με αυτόν τον τρόπο απενεργοποιούνται τα ένζυμα φαινολοξειδάσες, με συνέπεια να μην οξειδώνονται οι πολυφαινόλες. β) Ημιζυμούμενο (Oolong tea), το οποίο παράγεται

καθώς τα φύλλα του φυτού υφίστανται μία μέτρια ζύμωση πριν την αποξήρανση. γ) Ζυμούμενο μαύρο τσάι, το οποίο υφίσταται εκτεταμένη ζύμωση πριν την ξήρανση και την άτμιση. Έτσι επιτρέπεται η δράση των φαινολοξειδασών, οι οποίες οξειδώνουν τις πολυφαινόλες προς διάφορα οξειδωμένα παράγωγα (Koo & Cho, 2004; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Ho, Lin & Shahidi, 2009). Στο Σχήμα 1.1. φαίνονται οι διαφορές κατά τη βιομηχανική επεξεργασία των δύο βασικών τύπων τσαγιού, του πράσινου και του μαύρου.



**Σχήμα 1.1. Διαδικασίες παραγωγής του πράσινου και του μαύρου τσαγιού (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006).**

Άλλα δημοφιλή είδη τσαγιού είναι το dark tea ή Pu-Erh, στο οποίο η ζύμωση είναι διπλή και γίνεται παρουσία μικροοργανισμών και το Yellow tea, το οποίο είναι ένα είδος ημιζυμούμενου τσαγιού με λίγο διαφορετική επεξεργασία από αυτή του μαύρου τσαγιού. Ένα άλλο διαδεδομένο είδος τσαγιού είναι το λευκό τσάι, το οποίο προέρχεται από νεαρά φυτά που καλλιεργούνται με συγκεκριμένο τρόπο σε ορεινές περιοχές της Ασίας, ενώ τα φύλλα τους ατμίζονται αργά και ελαφρά σε ανοιχτό αέρα και η μεταχείριση τους γίνεται πολύ προσεχτικά με συνέπεια να προκύπτει ένα εκλεκτό αφέψημα (Ho, Lin & Shahidi, 2009).



Περίπου το 76-78% της παγκόσμιας παραγωγής τσαγιού είναι μαύρο τσάι, ενώ το 20-22% είναι πράσινο και το 2% Oolong (Das, Thakuria & Kanodia, 2008). Σύμφωνα με τον οργανισμό τροφίμων και γεωργίας των Η.Π.Α. (FAO), η παγκόσμια παραγωγή τσαγιού το 2005 έφτασε τα 3,5 εκατομμύρια τόνους. Οι κύριες χώρες παραγωγής τσαγιού είναι η Κίνα, η Ινδία, η Κένυα και η Σρι Λάνκα στις οποίες αποδίδεται το 26,68, 26,49, 9,38 και 9,05 % της παγκόσμιας παραγωγής, αντίστοιχα (Ho, Lin & Shahidi, 2009; www.fao.org).

### **1.3. Παγκόσμια κατανάλωση τσαγιού**

Το τσάι καταναλώνεται ως ρόφημα που προκύπτει εκ της εκχύλισης των συστατικών των φύλλων του φυτού *Camellia Sinensis* εντός ζεστού νερού. Ο τρόπος προετοιμασίας και κατανάλωσης διαφέρει από χώρα σε χώρα, ανάλογα με την παράδοση και το είδος του τσαγιού. Αν και το τσάι καταναλώνεται κυρίως ζεστό, τα τελευταία χρόνια είναι διαδεδομένο και το παγωμένο τσάι (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Την τελευταία δεκαετία η παγκόσμια κατανάλωση τσαγιού έχει αυξηθεί κατά 2,25%. Η Ινδία είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση τσαγιού (22,52%) και ακολουθεί η Κίνα με μικρή διαφορά (20,09%). Αν και το μαύρο τσάι καταναλώνεται περισσότερο από το πράσινο, την πενταετία 2000-2005 κατεγράφη αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης πράσινου τσαγιού κατά 41,5%. Η Κίνα είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση πράσινου τσαγιού, ενώ η Ινδία έχει την υπεροχή στην κατανάλωση του μαύρου. Η κατά κεφαλήν μέση κατανάλωση πράσινου τσαγιού παγκοσμίως ήταν 0,52 kg το 2005, ενώ του μαύρου τσαγιού έφτασε στα 0,69 kg (Ho, Lin & Shahidi, 2009).

### **1.4. Χημική σύσταση του τσαγιού**

#### **1.4.1. Περιεκτικότητα του τσαγιού σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά**

Τα φρέσκα φύλλα του τσαγιού περιέχουν κατά μέσο όρο περίπου 36% πολυφαινολικά συστατικά, 25% υδατάνθρακες, 15% πρωτεΐνες, 6,5% λιγνίνη, 5% τέφρα, 4% αμινοξέα, 2% λιπίδια, 1,5% οργανικά οξέα, 0,5% χλωροφύλλη, καθώς και καροτενοειδή και διάφορες άλλες ουσίες σε ποσοστό κάτω του 0,1% (Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Στο πράσινο τσάι, τα κυριότερα αμινοξέα που συναντώνται

είναι η τρυπτοφάνη, η γλυκίνη, η σερίνη, η λυσίνη και το γλουταμινικό οξύ, ενώ η θειανίνη, ένα παράγωγο των αμινοξέων, εμφανίζεται σε αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις. Από υδατάνθρακες το τσάι περιέχει γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, πηκτίνες και κυτταρίνη, ενώ από λιπίδια κυρίως λινολεϊκό οξύ, α-λινολενικό οξύ και σιγμαστερόλη. Επίσης, το πράσινο τσάι περιέχει βιταμίνες Β, C και Ε, βάσεις της ξανθίνης, όπως η καφεΐνη και η θεοφυλλίνη, αλδεΐδες, εστέρες, αλκοόλες, λακτόνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία (Ca, Mg, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Se, Na, P, Co, Sr, Ni, K, F) (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006).

#### **1.4.2. Σύσταση του τσαγιού σε πολυφαινόλες**

Οι πολυφαινόλες είναι χημικές ουσίες που προκύπτουν από το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών και είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση ως προστατευτικές ουσίες των φυτών έναντι του οξειδωτικού στρες (Robbins, 2003). Αποτελούν την πιο ενδιαφέρουσα ομάδα εκ των συστατικών των φύλλων του τσαγιού, με σημαντικότερη κατηγορία τους τα φλαβονοειδή (Das, Thakuria & Kanodia, 2008), τα οποία δύναται να καταλαμβάνουν έως και το 42% του ξηρού βάρους του εκχυλίσματος του πράσινου τσαγιού (Rice Evans, Miller & Paganga, 1997).

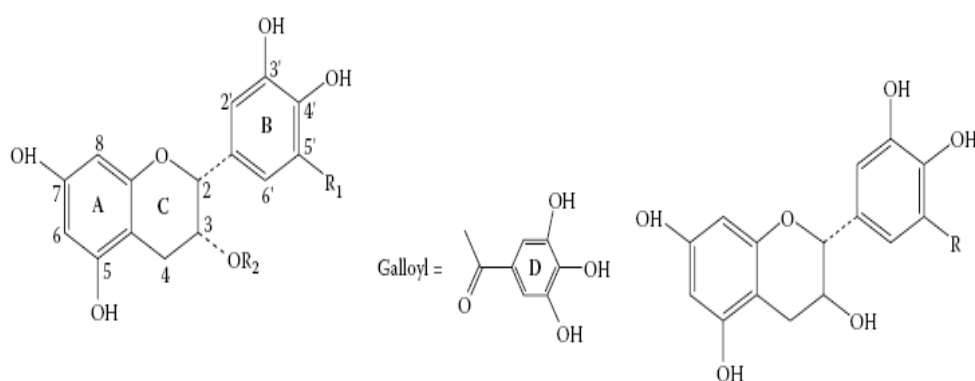
Οι πολυφαινόλες αποτελούν το 18-36% του ξηρού βάρους των φύλλων του τσαγιού και βρίσκονται είτε υπό μορφή γλυκοζιτών, είτε ως ελεύθερες αγλυκόνες. Οι κυριότερες πολυφαινόλες που απαντούν στο τσάι είναι τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Από τα φλαβονοειδή οι κατεχίνες αποτελούν το 12-24% του ξηρού βάρους, οι φλαβονόλες το 3-4% και οι ανθοκυανιδίνες το 2-3%. (Wan, Huang & Shen, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Από τις ανθοκυανιδίνες στο τσάι βρίσκονται ιδίως η πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη και η τρισετινιδίνη. Αναφορικά με τις φλαβονόλες στο τσάι απαντώνται ιδίως η κερσετίνη, η καμφερόλη, η μυρισετίνη και η ρουτίνη. Από τα φαινολικά οξέα, τα οποία βρίσκονται στα φύλλα του τσαγιού σε ποσοστό περίπου 5%, τα κυριότερα που συναντώνται είναι το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ και η θεογαλλίνη. (Ho, Lin & Shahidi, 2009).

#### **1.4.3. Οι κατεχίνες του τσαγιού**

Οι πολυφαινόλες που απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο τσάι είναι οι κατεχίνες. Πρόκειται για φλαβονοειδή που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβαν-3-ολών και δίνουν την πικρή και στυφή γεύση στο εκχύλισμα του φυτού (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Οι κυριότερες κατεχίνες που απαντώνται στα φρέσκα

φύλλα του τσαγιού είναι η επικατεχίνη ((-)-epicatechin, EC), η επιγαλλοκατεχίνη ((-)-Epigallocatechin, EGC), η γαλλική επικατεχίνη ((-)-Epicatechin gallate, ECG), η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη ((-)-Epigallocatechin gallate, EGCG), η κατεχίνη (Catechin, C) και η γαλλοκατεχίνη (Gallocatechin, GC) (Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Yilmaz, 2006; Das, Thakuria & Kanodia, 2008; Ho, Lin & Shahidi, 2009). Η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG), δηλαδή ο εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης με το γαλλικό οξύ, είναι η πιο άφθονη κατεχίνη στο τσάι (8-12%) και ακολουθεί η επιγαλλοκατεχίνη (EGC) (3-6%) και η γαλλική επικατεχίνη (ECG) (3-6%) (Wan, Huang & Shen, 2003; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006).

Η χημική δομή των κατεχινών βασίζεται στην ύπαρξη δύο αρωματικών δακτυλίων Α και Β που ενώνονται μεταξύ τους μέσω ενός οξυγονομένου ετεροδακτυλίου C. Η διαφορετική θέση των υδροξυλομάδων και η ύπαρξη ή όχι γαλλικών εστέρων καθορίζει τα είδη των κατεχινών, όπως φαίνονται στο Σχήμα 1.2. (Harborne & Williams, 2000; Ho, Lin & Shahidi, 2009).



1. $R_1 = R_2 = H$	Epicatechin	5. $R = H$	Catechin
2. $R_1 = OH, R_2 = H$	Epigallocatechin	6. $R = OH$	Gallocatechin
3. $R_1 = H, R_2 = \text{galloyl}$	Epicatechin gallate		
4. $R_1 = OH, R_2 = \text{galloyl}$	Epigallocatechin gallate		

### Σχήμα 1.2. Οι κυριότερες κατεχίνες στο τσάι (Ho, Lin & Shahidi, 2009).

Η περιεκτικότητα του ροφήματος τσαγιού σε κατεχίνες καθορίζεται από πληθώρα παραγόντων. Η γεωγραφική τοποθεσία καλλιέργειας του φυτού, το έδαφος, το κλίμα και οι καλλιεργητικές συνθήκες αποτελούν σημαντικούς παράγοντες. Το είδος του τσαγιού, το οποίο καθορίζεται από την επεξεργασία των φύλλων μετά τη συγκομιδή, καθώς και ο τρόπος παρασκευής του εκχυλίσματος του τσαγιού, καθορίζουν κατά το

πλείστον την τελική περιεκτικότητα του ροφήματος σε κατεχίνες (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006).

Το εκχύλισμα του πράσινου τσαγιού περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ολικών κατεχινών από ότι αυτό του μαύρου τσαγιού (Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Οι κατεχίνες αποτελούν το 60-90% των ολικών φλαβονοειδών στο πράσινο τσάι, ενώ μόλις το 6-24% στο μαύρο τσάι (Yilmaz, 2006). Ο Yilmaz (2006) αναφέρει ότι στο πράσινο τσάι οι κατεχίνες φτάνουν τα 420 mg/L, ενώ στο μαύρο τα 250 mg/L. Οι Wu & Wei (2002) έδειξαν ότι ένα τυπικό φλιτζάνι πράσινου τσαγιού, που παρασκευάζεται με προσθήκη 2,5 g φύλλων τσαγιού σε 200 ml ζεστό νερό, περιέχει 90 mg EGCG. Το πράσινο και το μαύρο τσάι περιέχουν παρόμοιες ποσότητες φλαβονοειδών, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη χημική δομή (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Το πράσινο τσάι περιέχει περισσότερα απλά φλαβονοειδή, ενώ οι οξειδώσεις και οι άλλες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα φύλλα κατά τη ζύμωση για την παρασκευή του μαύρου τσαγιού οδηγεί στο σχηματισμό παραγώγων οξειδωσης και πολυμερισμού (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Κατά τη ζύμωση, οι κατεχίνες στα φρέσκα φύλλα του τσαγιού οξειδώνονται κυρίως στην ο-διϋδροξυ- φαινυλομάδα, παρουσία φαινολοξειδασών και μετάλλων, σε περιβάλλον με pH=6. Με τον τρόπο αυτό παράγονται προϊόντα οξειδωσης και πολυμερισμού, όπως οι κινόνες, οι θειοφλαβίνες (theaflavins) και οι θειουρουβικίνες (thearubignins). Κατά την παραγωγή του μαύρου τσαγιού, περίπου το 75% των εις τα φύλλα περιεχόμενων κατεχινών υφίστανται μετασχηματισμό, βασιζόμενο σε οξειδωση και μερικό πολυμερισμό. Έτσι, παράγονται οι θειοφλαβίνες και οι θειουρουβικίνες, που ως αγλυκόνες ή ως εστέρες του γαλλικού οξέος προσδίδουν το άρωμα και το χρώμα στο μαύρο τσάι (Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Ho, Lin & Shahidi, 2009).

### **1.5. Αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας**

Εκτός από το τσάι, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί η αύξηση της κατανάλωσης και άλλων αφεψημάτων που προέρχονται από ενδημικά αρωματικά φυτά και βότανα. Η χώρα μας αποτελεί έναν θαυμάσιο βιότοπο που περιλαμβάνει ποικίλες μορφές φυτών και ζώων. Μία κατηγορία φυτών της ελληνικής χλωρίδας που είναι εκτενώς διαδεδομένα σε πολλές περιοχές είναι τα αρωματικά φυτά. Με τον όρο αυτό καλούνται αυτοφυή φυτά που βρίσκονται σε ορεινές, ημιορεινές ή πεδινές

περιοχές της Ελλάδας και περιέχουν αρωματικά συστατικά. Τέτοια φυτά είναι το φασκόμηλο, η λυγαριά, η λεβάντα, ο λυκίσκος, η αρμπαρόριζα, ο δίκταμος, ο κράταιγος κ.α.

Από την αρχαιότητα ακόμα, οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν πολλά αρωματικά φυτά, στα οποία αποδίδονταν φαρμακευτικές ιδιότητες ή συνδέονταν με συγκεκριμένες τελετουργίες. Για παράδειγμα, ο Ιπποκράτης αναφέρει το δίκταμο ως φυτό προώθησης του τοκετού (ωκυτόκιον), ενώ αναφέρεται ότι ο κράταιγος αποτελούσε φυτό που έφερνε τύχη και ευημερία. Στις μέρες μας, τα αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας καταναλώνονται ευρύτατα κυρίως στις επαρχιακές περιοχές, όπου η γνώση των πιθανών ευεργετικών τους ιδιοτήτων περνάει από γενιά σε γενιά. Πολλά τέτοια φυτά ή βότανα καταναλώνονται κυρίως ως αφεψήματα ή εκχυλίσματα ή χρησιμοποιούνται στη ζαχαροπλαστική και τη μαγειρική για να προσδίδουν άρωμα και γεύση. Τα φύλλα και οι βλαστοί των φυτών αυτών ξηραίνονται συνήθως σε δροσερά και σκιερά μέρη, για να μην καταστραφούν τα συστατικά τους από τον ήλιο, και από αυτά προκύπτουν ροφήματα με εξάισιο άρωμα και γεύση, αφού βραστούν μέσα σε δοχείο με νερό. Τα τελευταία χρόνια, η κατανάλωση αφεψημάτων αρωματικών φυτών έχει διαδοθεί και στις αστικές περιοχές, όπου μπορεί κανείς να τα προμηθευτεί από εγκεκριμένα καταστήματα βοτάνων, δεδομένου ότι η επιστημονική έρευνα έχει επιβεβαιώσει τη σημασία πολλών ουσιών που περιέχονται σε αυτά τα φυτά.

Η από αρχαιοτάτων χρόνων διάδοση των αρωματικών φυτών, η οποία στις μέρες μας υποστηρίζεται από αρκετές επιστημονικές μελέτες, οφείλεται στο ότι περιέχουν πληθώρα βιοδραστικών ουσιών, δηλαδή χημικών ενώσεων που όταν βρίσκονται στην κατάλληλη μορφή και σε συνθήκες που το επιτρέπουν έχουν τη δυνατότητα να εμφανίζουν ευεργετικές δράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό, σε επίπεδο κυτταρικό, ορμονικό ή γονιδιακό. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι διάφορα αλκαλοειδή, τανίνες και φαινολικές ενώσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, κάθε αρωματικό φυτό περιέχει κάποιες συγκεκριμένες ουσίες που του προσδίδουν ξεχωριστές ιδιότητες, όπως δράση σε ορισμένους ιστούς του οργανισμού. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι το αρωματικό φυτό κράταιγος μπορεί να έχει κάποια θετική επίδραση στο κυκλοφορικό σύστημα εξαιτίας μιας συγκεκριμένης ουσίας που περιέχεται σε αυτό. Συνήθως, όμως, μια συγκεκριμένη κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων απαντάται στα περισσότερα αρωματικά φυτά και ευθύνεται για τις ευεργετικές τους ιδιότητες (Σκουμπής, 1996).

Ένα παράδειγμα αρωματικού φυτού της ελληνικής χλωρίδας που χρησιμοποιείται στη μαγειρική και τη ζαχαροπλαστική είναι η Αρμπαρόριζα ή Πελαργόνιο (*Pelargonium purpureum*). Το φυτό ανήκει στην οικογένεια Geraniaceae (Γερανίδες) και στην υποοικογένεια Geraniales. Είναι φυτό θαμνώδες, πολυετές που αυτοφύεται αλλά και καλλιεργείται. Η αρμπαρόριζα απαιτεί κλίμα σχετικά θερμό με αρκετή υγρασία και δεν αντέχει τις χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, ευδοκίμει σε εδάφη μέσης συστάσεως, πηλώδη ή αμμοπηλώδη, που αποστραγγίζονται πολύ καλά και περιέχουν πληθώρα θρεπτικών συστατικών (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999; Σκουμπής, 1996). Η αρμπαρόριζα χρησιμοποιείται για το αιθέριο έλαιο της, το οποίο είναι πλούσιο σε γερανιόλη και κιτρονελλόλη. Το αιθέριο έλαιο εξάγεται με απόσταξη και είναι σημαντικό για την ζαχαροπλαστική και την παρασκευή αρωμάτων και προσθετικών τροφίμων. Επίσης το φυτό είναι δραστικό και δρα κατά πολλών ασθενειών, λόγω των φαινολικών του συστατικών (Σκουμπής, 1996; Koutelidakis et al, 2009).



**Εικόνα 1.2. Το αρωματικό φυτό Αρμπαρόριζα ή αμπερίζα ([www.hipernatural.com](http://www.hipernatural.com)).**

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες διερευνούν τη σύσταση σε πολυφαινόλες και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαφόρων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών και βοτάνων. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι πολλά εξ αυτών εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δραστηριότητα *in vitro*, σε πολλές περιπτώσεις συγκρίσιμη με αυτή του τσαγιού, αν και μικρότερη (Matsingou et al, 2003; Proestos, Sereli & Komaitis, 2003; Peng Wong, Peng Leong & Koh, 2006; Koutelidakis et al, 2009).

## **2. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ**

### **2.1. Εισαγωγή στην έννοια της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών**

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα κλινικών και επιδημιολογικών μελετών αναδεικνύει το σημαντικό βιολογικό ρόλο του τσαγιού τονίζοντας τη σημασία του στην πρόληψη ασθενειών, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Cabrerera, Artacho & Gimenez, 2006). Η κατανόηση της βιοδιαθεσιμότητας και του μεταβολισμού των πολυφαινολών του τσαγιού αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτίμηση και την πλήρη διερεύνηση της βιολογικής του δραστηριότητας. Μια φαινολική ένωση εμφανίζει μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα όταν αφενός μεν είναι βιοπροσβάσιμη, δηλαδή απορροφάται στα εντεροκύτταρα μετά την απελευθέρωση της από το τρόφιμο, αφετέρου δε το ποσό που απορροφάται δύναται να χρησιμοποιηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό από τον οργανισμό. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα για αρκετό χρονικό διάστημα, η δυνατότητα μεταφοράς τους στους ιστούς και η καταγραφή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις εκεί, σε συνδυασμό με το χαμηλό ρυθμό απέκκρισης τους από τα ούρα, συνιστούν στοιχεία που δείχνουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Αυτό συμβαίνει διότι σε αυτή την περίπτωση οι πολυφαινόλες δεν απεκκρίνονται ταχύτατα, αλλά παραμένουν στον οργανισμό, συνήθως υπό μορφή μεταβολιτών, και προσδίδουν ποικίλες δράσεις στο αίμα και τους άλλους ιστούς, όντας διαθέσιμες να πραγματοποιήσουν σημαντικό βιολογικό ρόλο. Όταν μία φαινολική ένωση εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, αλλά παραμένει ελάχιστα διότι απεκκρίνεται ταχύτατα μέσω των ούρων ή των κοπράνων, τότε θεωρείται ελάχιστα βιοδιαθέσιμη (Duthie, Duthie & Kyle, 2000; Manach et al, 2005; Saura-Calixto, Serrano & Goni, 2007).

Η σημασία της γνώσης της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του τσαγιού και άλλων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών έγκειται στο γεγονός ότι η απορρόφηση, ο μεταβολισμός, η φαρμακοκινητική καταγραφής στους ιστούς και η απέκκριση τους καθορίζουν την έκταση και τις εκφάνσεις της βιοδραστηριότητας που δύναται αυτές να εμφανίζουν εντός του οργανισμού (Holst & Williamson, 2004). Η μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας και του μεταβολισμού των πολυφαινολών γενικότερα και των κατεχινών του τσαγιού ειδικότερα, εμφανίζει τεράστια σημασία δεδομένου ότι μόνο εάν μία φαινολική ένωση φτάνει σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στους ιστούς του

οργανισμού, τότε μόνο μπορεί να προσδώσει σε αυτούς συγκεκριμένη βιολογική δράση (Saura-Calixto, Serrano & Goni, 2007). Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των διαδικασιών απορρόφησης και μεταβολισμού, τα υπάρχοντα δεδομένα περιορίζονται σε σχετικά μικρό αριθμό ερευνητικών μελετών κυρίως σε ζώα, αλλά και σε ανθρώπους (Ho, Lin & Shahidi, 2009).

Αν και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το ακριβές ποσό των πολυφαινολών που απορροφάται μετά την κατανάλωση τσαγιού, το κινητικό τους προφίλ στο πλάσμα και η απέκκριση τους στα ούρα δείχνουν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών απορροφάται εις τον εντεροσωλήνα. Η βιοδιαθεσιμότητα των κατεχινών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η χημική τους δομή, ο μετασχηματισμός τους στο έντερο και τα διαθέσιμα ένζυμα στον οργανισμό που καθορίζουν την έκταση του μεταβολισμού τους. Μόλις το 1,68% περίπου των πεπτόμενων κατεχινών εμφανίζονται στο πλάσμα, τα ούρα και τα κόπρανα μετά την κατανάλωση τσαγιού, ενώ η βιοδιαθεσιμότητα των γαλλικών εστέρων τους είναι ακόμη μικρότερη (Holst & Williamson, 2004; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Ho, Lin & Shahidi, 2009).

## **2.2. Διαδικασίες απορρόφησης των πολυφαινολών του τσαγιού**

Η απορρόφηση των πολυφαινολών του τσαγιού λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στο λεπτό έντερο, ενώ ένα μέρος αυτών μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα και απορροφάται στο κόλον (Mulder, Rietveld & vanAmelsvoort, 2005; Lambert, Sang & Yang, 2007). Οι κατεχίνες του τσαγιού (EC, ECG, EGC, EGCG) εμφανίζονται εις το εντερικό επιθήλιο και απορροφώνται με τους ίδιους μηχανισμούς. Η μεταφορά τους δια μέσου της μεμβράνης του εντερικού επιθηλίου έχει μελετηθεί στα ανθρώπινα Caco-2 κύτταρα και έχει δειχθεί ότι οι μεμονωμένες κατεχίνες εμφανίζουν παρόμοια απορροφητική συμπεριφορά, ενώ ως μίγμα διαφαίνεται ανταγωνιστικότητα μεταξύ τους (Zhang, Chow & Zuo, 2006).

Οι κατεχίνες, ευρισκόμενες εις το τσάι είτε ως αγλυκόνες είτε ως εστέρες του γαλλικού οξέος, ως βασικοί αντιπρόσωποι της υποομάδας των φλαβονοειδών, ακολουθούν της διαδικασίες απορρόφησης που ισχύουν γενικότερα για τις φαινολικές ενώσεις (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Οι φαινολικές ενώσεις απορροφώνται κατά κύριο λόγο στο λεπτό έντερο και στο κόλον υπό μορφή ελεύθερων αγλυκόνων, ενώ μόνο μερικά φλαβονοειδή, όπως κάποιες φλαβανόλες απορροφώνται καλύτερα ως γλυκοζίτες (Holman & Katan, 1999; Manach et al, 2004). Οι φαινολικές ενώσεις υπό



μορφή γλυκοζιτών ή εστέρων ή άλλων ενώσεων, όπως συνήθως βρίσκονται στα τρόφιμα, μεταφέρονται στα εντεροκύτταρα μέσω διαφόρων μεταφορέων, όπως ο νατριοεξαρτώμενος μεταφορέας SGLT1 (Sodium Dependent Glucose Transporter 1). Στην ψυκτροειδή παρυφή των εντεροκυττάρων, η δράση συγκεκριμένων ενζύμων γνωστών ως υδρολάσες, όπως η β-γλυκοσιδάση, καταλύει την υδρόλυση προς αγλυκόνες. Εν συνεχεία, οι παραγόμενες αγλυκόνες απορροφούνται στα εντεροκύτταρα με παθητική διάχυση (Heim, Tagliafero & Bobiyala, 2002; Tapiero et al, 2002; Manach et al, 2004). Στην περίπτωση των κατεχινών σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι μεταφορικές ουσίες MCT (Monocarboxylate Transporter) και MRP (Multidrug Resistance-associated Proteins). Εκ των MRP η MRP-1 επιταχύνει την απορρόφηση των κατεχινών, ενώ η MRP-2 κάνει αντίστροφη μεταφορά προς τον εντερικό σωλήνα καθυστερώντας την απορρόφηση τους (Lambert, Sang & Yang, 2007).

Σε κάποιες περιπτώσεις ένα μέρος των γλυκοζιτών δεν υδρολύεται στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα είτε να απεκκρίνονται, είτε να παραμένουν στον εντερικό σωλήνα και να διασπώνται από τη μικροχλωρίδα στο κόλον (Manach et al, 2004). Στο κόλον, η μικροχλωρίδα τους υδρολύει σε αγλυκόνες και άλλες ουσίες, όπως τα αρωματικά οξέα (φαινολοξικά και προπιονικά οξέα) και οι εντερολακτόνες. Τα αρωματικά οξέα απορροφώνται στο κόλον και φαίνεται ότι έχουν σημαντικό βιολογικό ρόλο (Scalbert et al, 2002; Tapiero et al, 2002; Manach et al, 2004; Manach et al, 2005). Η μικρή απορρόφηση των κατεχινών στο λεπτό έντερο δείχνει ότι οι περισσότερες απορροφώνται αφού πρώτα μεταβολιστούν εκ της εντερικής μικροχλωρίδας στο κόλον (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Πειράματα έχουν δείξει ότι η διάσπαση του κεντρικού δακτυλίου των κατεχινών προωθείται εκ της παρουσίας των μικροοργανισμών του παχέος εντέρου, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών όπως τα φαινολικά οξέα και οι υδροξυφαινυλ-γ-βαλερολακτόνες (Mulder, Rietveld & vanAmelsvoort, 2005).

Καθώς οι πολυφαινόλες απορροφώνται μόνο υπό μορφή αγλυκόνων, για να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος είναι απαραίτητο να υποστούν ένα μετασχηματισμό, ο οποίος αφορά την μοριακή τροποποίηση και τη σύνδεση με άλλα μόρια, γνωστή ως σύζευξη (conjugation) (Tapiero et al, 2002; Manach et al, 2004). Η μετατροπή αυτή λαμβάνει χώρα στα εντεροκύτταρα μέσω επίδρασης συγκεκριμένων ενζύμων και περιλαμβάνει τρεις περιπτώσεις: τη μεθυλίωση, τη γλουκουρονιδίωση και τη σουλφιλίωση. Η διαδικασία της μεθυλίωσης καταλύεται από το ένζυμο

κατεχολ-ο-μεθυλοτρανσφεράση, η διαδικασία της σουλφυλίωσης καταλύεται από το ένζυμο σουλφοτρανσφεράση, ενώ η διαδικασία της γλουκουρονιδίωσης λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο των εντεροκυττάρων, όπου δρουν ένζυμα γνωστά ως UDP-γλουκουροσυλτρανσφεράσες (Scalbert et al, 2002; Tapiero et al, 2002; Manach et al, 2004).

Οι κατεχίνες του τσαγιού αμέσως μετά την απορρόφηση μετασχηματίζονται στα εντεροκύτταρα ιδίως μέσω μονοπατιών γλουκουρονιδίωσης και σουλφυλίωσης, αλλά και μέσω μεθυλίωσης και μικροβιακού μεταβολισμού. Οι διαδικασίες αυτές δύναται να λάβουν χώρα σε διαφορετική έκταση στα ίδια μόρια κατεχινών (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Η κατά την απορρόφηση μετατροπή των κατεχινών του τσαγιού σε γλουκουρονιδιωμένες και μεθυλιωμένες μορφές οδηγεί στην αλλαγή των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, γεγονός που μερικώς εξηγεί την αναντιστοιχία που συχνά εμφανίζεται ανάμεσα στις *in vitro* μελέτες και στις μελέτες με ανθρώπους, στις οποίες φαίνεται ότι οι κατεχίνες μεταβολίζονται ταχύτατα (Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

### **2.3. Φαρμακοκινητική, μεταβολισμός και απέκκριση των πολυφαινολών του τσαγιού**

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του τσαγιού είναι σχετικά μικρή, αφενός μεν λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, αφετέρου δε λόγω του βιομετασχηματισμού των μορίων τους κατά τη διάρκεια της απορρόφησης στο λεπτό έντερο και στο κόλον (Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Οι κατεχίνες EC, ECG, EGC και EGCG εμφανίζουν σχετικά υψηλά μοριακά βάρη (περίπου 290-458) και περισσότερες από 5 υδροξυλομάδες. Εξαιτίας του μεγάλου τους μεγέθους παρουσιάζουν σχετικά μικρή βιοδιαθεσιμότητα (Ho, Lin & Shahidi, 2009).

Οι κατεχίνες, αμέσως μετά την απορρόφηση και τον μετασχηματισμό τους στα εντεροκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Στο πλάσμα, όπως όλες οι πολυφαινόλες, φαίνεται ότι συνδέονται με διάφορες πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη, κατά 90% και η λιποπρωτεΐνη VLDL κατά 0,5%. Ως υδρόφιλες, βρίσκονται στην υδάτινη φάση, αλλά φαίνεται ότι διαπερνούν και τις λιπόφιλες μεμβράνες των φωσφολιπιδίων, δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου (Manach et al, 2004). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των κατεχινών στο πλάσμα, σε ελεύθερη ή δεσμευμένη μορφή, μετά την κατανάλωση ποσοτήτων συναφών των εκ της τροφής καθημερινώς

λαμβανομένων, βρέθηκε ότι κυμαίνονται μεταξύ 2-3  $\mu\text{M}$  (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Τα επίπεδα των κατεχινών στο ανθρώπινο πλάσμα φτάνουν στο μέγιστο 2 με 4 ώρες μετά την κατανάλωση τους (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Η υψηλότερη συγκέντρωση στο αίμα παρατηρήθηκε ανάμεσα στις 1,6 με 2,6 ώρες μετά την κατανάλωση ενός φλιτζανιού τσαγιού, ενώ οι τιμές επανήλθαν εις φυσιολογικά επίπεδα 24 ώρες μετά (Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Από τις κατεχίνες, η EGCG φαίνεται ότι είναι η λιγότερο βιοδιαθέσιμη. Μελέτη σε ανθρώπους έδειξε ότι η κατανάλωση 1,5 mmol κάθε κατεχίνης από 10 εθελοντές οδήγησε σε μέσες συγκεντρώσεις στο πλάσμα 5  $\mu\text{mol/L}$ , 3,1  $\mu\text{mol/L}$  και 1,3  $\mu\text{mol/L}$  για την EGC, την ECG και την EGCG, αντίστοιχα (Chow, Cai & Alberts, 2001).

Ο βασικός μεταβολίτης που έχει παρατηρηθεί στο ανθρώπινο αίμα και στα ούρα μετά την κατανάλωση πράσινου τσαγιού είναι η 4'-O-μέθυλ-EGC (4'-O-MeEGC). Τα επίπεδα της 4'-O-MeEGC έφτασαν στο μέγιστο 2 ώρες μετά την κατανάλωση τσαγιού, ενώ ήταν 6 φορές μεγαλύτερα από αυτά της EGC. Ο χρόνος ημιζωής της 4'-O-MeEGC ήταν  $4,39 \pm 1,14$  ώρες, έναντι  $1,02 \pm 0,07$  της EGC, ενώ το 88% της 4'-O-MeEGC απεκκρίθη εκ των ούρων εντός 8 ωρών. Ένας άλλος μεταβολίτης είναι η 4',4''-di-O-μέθυλ-EGCG (4',4''-DiMeEGCG), η οποία έφτασε στη μέγιστη τιμή των  $20,5 \pm 7,7$  nM 2 ώρες μετά την κατανάλωση του τσαγιού, ενώ είχε χρόνο ημιζωής  $4,1 \pm 0,8$  ώρες, έναντι  $2,7 \pm 0,9$  της EGCG. Οι βασικοί μεταβολίτες της EGC και της EC είναι μονογλουκορονιδιωμένοι ή μονοσουλφυλιωμένοι. Η EGC-3'-O-b-glucuronide είναι ο βασικός μεταβολίτης της EGC που έχει βρεθεί στα ούρα, ενώ η 4'-O-μέθυλ-EGC φαίνεται να καταλαμβάνει το 30-40% των μεταβολιτών της EGC στο αίμα (Lambert, Sang & Yang, 2007; Ho, Lin & Shahidi, 2009). Από τους μεταβολίτες των κατεχινών που προέρχονται από το μικροβιακό μεταβολισμό στο κόλον οι κύριοι αντιπρόσωποι είναι οι βαλερολακτόνες και το ιπουρικό οξύ. Το ιπουρικό οξύ έχει προσδιοριστεί στα ούρα μετά από κατανάλωση τόσο πράσινου, όσο και μαύρου τσαγιού και φαίνεται ότι είναι προϊόν της μικροβιακής διάσπασης των κατεχινών και των θειοφλαβινών (Lambert, Sang & Yang, 2007; Mulder, Rietveld & vanAmelsvoort, 2005).

Παρά την υψηλή αρχική συγκέντρωση των κατεχινών, οι συγκεντρώσεις τους τόσο στο πλάσμα, όσο και στα ούρα εμφανίζονται χαμηλές. Αυτό δείχνει ότι οι διαιτητικές κατεχίνες μεταβολίζονται εκτενώς και κατά την πέψη και την απορρόφηση μετατρέπονται σε άλλα συστατικά που παραμένουν στο ανθρώπινο σώμα ή απεκκρίνονται (Lottio & Frei, 2006; Lambert, Sang & Yang, 2007; Ho, Lin &

Shahidi, 2009). Οι χημικές δομές των παραγόμενων μεταβολιτών τους είναι διαφορετικές ανάμεσα στα ζώα και τους ανθρώπους. Πειράματα με ποντίκια έχουν δείξει ότι οι κυριότεροι μεταβολίτες των κατεχινών είναι οι 3'-O-μέθυλ(-)-EC, (-)-EC-7-O-glucoronide και 3'-O-μέθυλ(-)-EC-7-O-glucoronide, δεδομένου ότι η γλουκορονιδίωση λαμβάνει χώρα στη θέση 7 και όχι στην 3', όπως στους ανθρώπους. Επίσης, η βιοδιαθεσιμότητα των κατεχινών στα ποντίκια φαίνεται να επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο από διάφορους παράγοντες, όπως η ένωση με άλλα συστατικά του τροφίμου, από ότι στον άνθρωπο (Chow, Cai & Alberts, 2001).

Οι κατεχίνες του τσαγιού φαίνεται ότι μεταβολίζονται εκτενώς και ταχύτατα, αν και δύναται να παραμείνουν για αρκετό χρόνο εντός του οργανισμού (Frei & Higdon, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι η EGCG απεκκρίνεται κυρίως μέσω της χολής, ενώ οι EC και EGC μέσω των ούρων και της χολής (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Μικρού μοριακού βάρους κατεχίνες και οι μεταβολίτες τους απεκκρίνονται μέσω των ούρων, ενώ μεγαλύτερου μοριακού βάρους κυρίως μέσω της χολής. Το ποσοστό των μεταβολιτών που απεκκρίνεται από τα ούρα συσχετίζεται καλώς με τις μέγιστες συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα. Τα ποσοστά απέκκρισης της EC και της EGC από τα ούρα είναι 18,5% και 11,1%, αντίστοιχα, ενώ της EGCG είναι 0,1%, γεγονός που εξηγεί την απέκκριση της τελευταίας μέσω της χολής (Manach et al, 2004).

Ο Silberg (2006) αναφέρει ότι οι πολυφαινόλες μετά την σύζευξη και την απορρόφηση που λαμβάνει χώρα στα εντεροκύτταρα, προωθούνται μέσω μεταφορικών πρωτεϊνών εντός της κυκλοφορίας του αίματος και εν συνεχεία κινούνται προς το ήπαρ. Στα ηπατοκύτταρα λαμβάνουν χώρα πολύπλοκες διαδικασίες μεθυλίωσης και επαναγλουκορονιδίωσης, υπό τη δράση ενζύμων και μεταφορέων, με συνέπεια την παραγωγή πληθώρας μεταβολιτών (Manach et al, 2004; Silberg, 2006). Από το ήπαρ κάποιες πολυφαινόλες, όπως οι κατεχίνες και οι μεταβολίτες τους, μεταφέρονται στη χολή από όπου εν συνεχεία εκκρίνονται στο λεπτό έντερο και κινούνται προς το κόλον. Στο κόλον διασπώνται από τη μικροχλωρίδα και επανεισέρχονται εις την κυκλοφορία, υφιστάμενες δεύτερη απορρόφηση. Έτσι δύναται να εξηγηθεί το γεγονός της ανίχνευσης κατεχινών και μεταβολιτών τους, σε μικρές βέβαια συγκεντρώσεις, ακόμα και μια μέρα μετά την κατανάλωση τους (Scalbert et al, 2002). Μετά την επαναπορρόφηση ή την πρώτη φάσης απορρόφηση, οι πολυφαινόλες κινούνται μέσω της κυκλοφορίας προς τους διάφορους ιστούς του οργανισμού. Η απέκκριση τους γίνεται ιδίως εκ των νεφρών με

τα ούρα ή εκ της χολής, από όπου εκκρινόμενες στο λεπτό έντερο, εάν δε διασπαστούν στο κόλον, κινούνται στο παχύ έντερο και απεκκρίνονται εκ των κοπράνων (Heim, Tagliafero & Bobiyla, 2002; Scalbert et al, 2002).

Ο προσδιορισμός και η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας των κατεχινών και των μεταβολιτών τους στους ιστούς εμφανίζει σημασία, μεγαλύτερη από τον προσδιορισμό τους εις το αίμα. Παραταύτα, ελάχιστες είναι οι σχετικές με ιστούς μελέτες, ακόμα και στα ζώα (Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Οι Manach et al (2004) αναφέρουν ότι μετά την απορρόφηση οι πολυφαινόλες, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μεταφέρονται στους ιστούς, όπου στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων διάφορα ένζυμα τις υδρολύουν προς αγλυκόνες. Ένας πιθανός μηχανισμός συγκέντρωσης και μεταβολισμού των φαινολικών ενώσεων στους ιστούς θεωρείται η εγκόλπωση τους εντός των κυττάρων μέσω ειδικών συστημάτων και εν συνεχεία η παρεμβολή τους εντός του κυτταρικού μεταβολισμού (Manach et al, 2004).

Η καταγραφή των πολυφαινολών του τσαγιού στους ιστούς έχει γίνει είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Οι Heining et al (2006) έδειξαν ότι οι εκ προστατεκτομής προκύπτοντες ιστοί προστάτου ατόμων που ελάμβαναν επί 5 ημέρες πράσινο ή μαύρο τσάι εμφάνισαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατεχινών από τους ιστούς των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Ένας έμμεσος τρόπος διερεύνησης της καταγραφής των πολυφαινολών στο αίμα και στους άλλους ιστούς αποτελεί η εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας τους. Οι Koutelidakis et al (2009) έδειξαν σε ποντίκια ότι η επί 5 ημέρες χορήγηση πράσινου και λευκού τσαγιού οδήγησε σε αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα, στο κόλον, στην καρδιά και στους πνεύμονες. Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα στους ιστούς μετά την κατανάλωση τσαγιού φαίνεται να υποδηλώνει παρουσία πολυφαινολών, όπως οι κατεχίνες, δεδομένου ότι οι πολυφαινόλες είτε συγκεντρώνονται στους ιστούς αυξάνοντας άμεσα την αντιοξειδωτική τους κατάσταση, είτε ενισχύουν τη δράση ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων των κυττάρων (καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης κ.α.), αυξάνοντας την έμμεσα (Frei & Higdon, 2003; Crespy & Williamson, 2004).

## **2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του τσαγιού**

Η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα των κατεχινών του τσαγιού, όπως και όλων των πολυφαινολών, επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων που σχετίζονται αφενός μεν με τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα συστατικά του τροφίμου, εκτός και εντός του οργανισμού, αφετέρου δε με τις γενετικές διαφοροποιήσεις που υπάρχουν ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Ho, Lin & Shahidi, 2009).

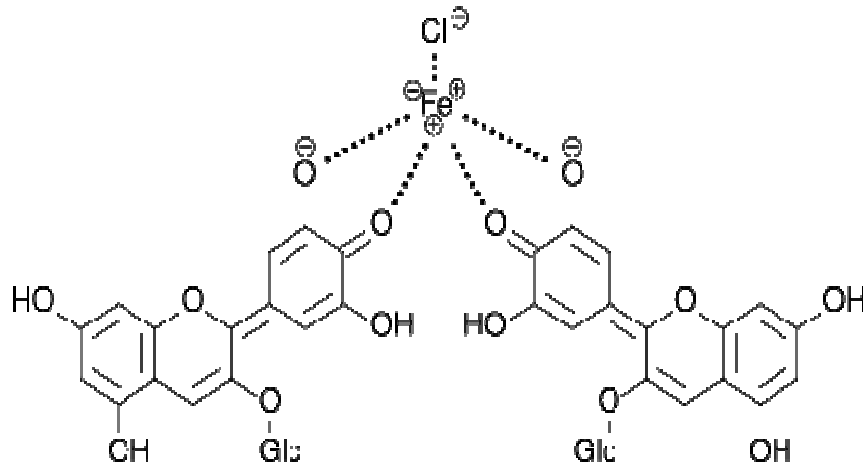
### **2.4.1. Γενετικές διαφοροποιήσεις**

Έχει δειχθεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα των κατεχινών του τσαγιού δύναται να εμφανίζει διαφοροποιήσεις από άτομο σε άτομο, γεγονός που οφείλεται σε διαφορές στη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας και σε γενετικούς πολυμορφισμούς ανάμεσα στα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό τους (Ferguson, 2001; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από παράγοντες όπως το φύλλο, η ηλικία και το γωνιδίωμα του ατόμου. Το φαινόμενο κατά το οποίο εμφανίζεται διαφορετική απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα μίας πολυφαινόλης ανάμεσα σε άτομα που κατανάλωσαν το ίδιο τρόφιμο εξηγείται λόγω της διαφορετικής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων των ατόμων. Για παράδειγμα εάν ένα άτομο εμφανίζει τη μορφή του γονιδίου που κωδικοποιεί αυξημένη έκφραση υδρολυτικών ενζύμων ή μεταφορικών ουσιών στην ψυκτροειδή παρυφή των εντεροκυττάρων, τότε θα παρουσιάζει εκτενέστερη απορρόφηση πολυφαινολών σε σχέση με ένα άλλο άτομο που δεν έχει αυτή τη μορφή του γονιδίου. Επίσης, η διαφοροποίηση ανάμεσα στη μορφή των μεταβολικών διαδικασιών μεταξύ των ατόμων συνεπάγεται διαφορετικό χρόνο παραμονής των μεταβολιτών των πολυφαινολών στο αίμα και στους ιστούς (Ferguson, 2001).

### **2.4.2. Αλληλεπιδράσεις με διατροφικούς παράγοντες**

Οι αλληλεπιδράσεις των πολυφαινολών του τσαγιού με διάφορα διατροφικά συστατικά στον εντερικό σωλήνα, όπως η σύνδεση τους με πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και μέταλλα, φαίνεται να επηρεάζει την απορρόφηση τους και ακολούθως τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδρατικότητα τους (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που δύναται να επηρεάζει την απορρόφηση των πολυφαινολών είναι η παρουσία σιδήρου. Ο σίδηρος και οι πολυφαινόλες εμφανίζουν χημική συγγένεια, με αποτέλεσμα να σχηματίζουν σύμπλοκα τα οποία περιορίζουν την απορρόφηση και τη βιοδιαθεσιμότητα τόσο του σιδήρου όσο και των πολυφαινολών. Ο σχηματισμός αυτών των συμπλόκων λαμβάνει χώρα μέσω της ένωσης του σιδήρου με διάφορες ομάδες των πολυφαινολών, όπως οι υδροξυλομάδες, οι ορθοδιϋδροξυ και οι 5-διϋδροξυ ομάδες (Alexandropoulou, Komaitis & Kapsokefalou, 2004; Argyri, Komaitis & Kapsokefalou, 2005; Kapsokefalou, Zhu & Miller, 2006). Οι Khokhar & Arpenten (2002) έδειξαν ότι οι κατεχίνες εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση σύνδεσης με το σίδηρο από ότι η κερσετίνη. Επίσης, παρατήρησαν ότι η ύπαρξη 3- και 4- διϋδροξυ ομάδων (κατεχόλη) ευνοούν περισσότερο τη σύνδεση με το σίδηρο, σε σχέση με τις τριϋδροξυ ομάδες. Οι Ryan & Hynes (2006) έδειξαν *in vitro* ότι η EGC είναι ικανή να μειώνει κατά 4 φορές την απορρόφηση διαλυμάτων τρισθενούς σιδήρου. Οι Argyri, Komaitis & Kapsokefalou (2005) και οι Alexandropoulou, Komaitis & Kapsokefalou (2004) παρατήρησαν σε μοντέλο *in vitro* πέψης ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του κόκκινου κρασιού και του πράσινου τσαγιού ήταν μικρότερη παρουσία δισθενούς ή τρισθενούς σιδήρου, λόγω μικρότερης απορρόφησης των πολυφαινολών του. Οι Kapsokefalou, Zhu & Miller (2006) παρατήρησαν σε αρουραίους που ελάμβαναν πράσινο τσάι ότι τα ολικά φαινολικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος δεν αυξήθηκαν παρουσία κιτρικού σιδήρου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με άλλα επιστημονικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα σύμπλοκα μεταξύ πολυφαινολών-σιδήρου μειώνουν και τα επίπεδα του σιδήρου στον οργανισμό (Tuntawiroon et al, 1991; Zijp, Korver & Tijburg, 2000). Παραταύτα, κάποιες άλλες μελέτες δεν παρατήρησαν επίδραση των πολυφαινολών στην απορρόφηση του σιδήρου (Ullmann et al, 2004; Mennen et al, 2007).



**Σχήμα 2.1.** Παράδειγμα δημιουργίας συμπλόκου ανάμεσα στο σίδηρο και τις ανθοκυανιδίνες, μέσω σύνδεσης του σιδήρου με τα οξυγόνα των πολυφαινολών.

Οι πρωτεΐνες του κρέατος και του γάλακτος φαίνεται να μειώνουν την απορρόφηση και τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών δημιουργώντας σύμπλοκα μαζί τους. Οι πολυφαινόλες, μέσω των υδροξυλομάδων, δημιουργούν υδρογονικούς δεσμούς με πολικές ομάδες (αμίδια, πεπτίδια και αμινομάδες) διαφόρων πρωτεϊνών, ενώ μέσω των γαλλικών ομάδων δημιουργούν υδροφοβικούς δεσμούς (He, Lv & Yao, 2006). Οι Alexandropoulou, Komaitis & Kapsokefalou (2004) έδειξαν σε μοντέλο *in vitro* πέψης ότι οι καζεΐνες του γάλακτος μείωσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πράσινου τσαγιού, ενώ οι Serafini et al (2006) παρατήρησαν ότι προσθήκη γάλακτος σε μαύρο τσάι περιόρισε την απορρόφηση των κατεχινών, με συνέπεια τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα. Άλλοι επιστήμονες έχουν δείξει ότι το γάλα δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την απορρόφηση των κατεχινών του τσαγιού, αν και η περιεκτικότητα του σε λιπαρά και η ποσότητα που προστίθεται ίσως καθορίζει πιθανή επίδραση στην αντιοξειδωτική κατάσταση του αίματος (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Οι Van het Hof et al (1998) και οι Kyle et al (2007) παρατήρησαν ότι η προσθήκη γάλακτος στο τσάι δεν άλλαξε την περιεκτικότητα του πλάσματος σε ολικές κατεχίνες. Τέλος, το λίπος αποτελεί έναν ακόμη διατροφικό παράγοντα που δύναται να επηρεάσει την βιοδιαθεσιμότητα και συνεπώς τη βιοδραστικότητα των πολυφαινολών του τσαγιού, αλληλεπιδρώντας με αυτές. Οι εκ μελετών προτεινόμενοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης του λίπους με τις πολυφαινόλες αναλύονται στο Κεφ. 5.



## **2.5. Μεθοδολογίες εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών του τσαγιού**

Η τεράστια σημασία της εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας των κατεχινών και γενικότερα των πολυφαινολών του τσαγιού για την διερεύνηση του βιολογικού του ρόλου, έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην εφαρμογή μιας σειράς από μεθόδους για τον προσδιορισμό της. Οι μέθοδοι αυτοί, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών πληθώρας τροφίμων, ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει μεθόδους που βασίζονται στην άμεση ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων εντός του οργανισμού και η δεύτερη μεθόδους που εκτιμούν τη βιοδιαθεσιμότητα μέσω βιοδεικτών όπως η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τα παραγόμενα προϊόντα οξείδωσης διαφόρων βιολογικών υγρών (αίμα, ούρα, ομογενοποιημένοι ιστοί ζώων). Η πρώτη κατηγορία άμεσης εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών του τσαγιού αφορά μεθόδους προσδιορισμού των πολυφαινολών του τσαγιού εντός του οργανισμού. Η δεύτερη κατηγορία έμμεσης εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας περιλαμβάνει ουσιαστικά μεθοδολογίες διερεύνησης της βιοδραστικότητας του τσαγιού και γι αυτό αναπτύσσεται στο Κεφ. 3. Όλες αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται και *in vitro* για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του τσαγιού (Sanchez-Moreno, 2002).

### **2.5.1. Μέθοδοι ταυτοποίησης των φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους εντός του οργανισμού**

Η χρωματογραφική μέθοδος HPLC (High Performance Liquid Chromatography) έχει χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φαινολικών ενώσεων σε τρόφιμα, ποτά και αρωματικά φυτά (Proestos, Sereli & Komaitis, 2003). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα, τα ούρα και τους ιστούς ανθρώπων ή πειραματοζώων, αποτελεί έναν τρόπο αξιολόγησης της βιοδιαθεσιμότητας τους. Ο προσδιορισμός αυτός γίνεται συνήθως με HPLC με τον κατάλληλο ανιχνευτή και με χρήση των κατάλληλων σε κάθε περίπτωση διαλυτών. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις λαμβάνει χώρα διαδικασία επεξεργασίας του δείγματος, ώστε να διασπαστούν οι πολυκοικοί γλυκοζίτες σε αγλυκόνες (Paganga & Rice-Ervans, 1998). Οι Kim et al (2000) αξιολόγησαν τη βιοδιαθεσιμότητα των

πολυφαινολών του τσαγιού στο άνθρωπο προσδιορίζοντας τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα και τα ούρα με χρήση HPLC με ανιχνευτή Coulchem electrode array detector και χρόνο απόκρισης άνω των 32 min. Η διάσπαση των δεσμών πριν την είσοδο στο χρωματογράφο έγινε με προεπάση του πλάσματος παρουσία υδρολυτικών ενζύμων, στους 37 °C, για 45 min.

Το σύστημα χρωματογραφίας HPLC αποτελείται από δοχείο κινητής φάσης, αντλία, σύστημα εισαγωγής δείγματος, στήλη, ανιχνευτή και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και μεγάλης αντιστάσεως σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης. Η ανάπτυξη της τεχνικής HPLC επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά. Η στήλη χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και οι κορυφές που λαμβάνονται είναι μικρού εύρους και μεγάλου ύψους, δηλαδή κατάλληλες για ποσοτική ανάλυση. Επιπλέον η τεχνική έχει πολύ καλή επαναληψιμότητα, ακρίβεια και δυνατότητες πλήρους αυτοματοποίησης, ενώ ο διαχωρισμός επιτελείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (Χατζηιωάννου & Κουπάρης, 1990).

## **2.5.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των ολικών φαινολικών εντός του οργανισμού**

### **2.5.2.1. Η μέθοδος πρότυπης καμπύλης κατεχίνης**

Με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης κατεχίνης προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών κατεχινών *in vitro* σε διάφορα τρόφιμα και ποτά, όπως το τσάι, καθώς και οι ολικές κατεχίνες στο πλάσμα εθελοντών που κατανάλωσαν τσάι ή άλλα τρόφιμα πλούσια σε κατεχίνες. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των προϊόντων αντίδρασης των απομονωθέντων κατεχινών με διάφορες χημικές ουσίες. Μετά από παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κατεχίνης διαφόρων συγκεντρώσεων, δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη κατεχίνης, η οποία αφορά τη συγκέντρωση κατεχίνης συναρτήσει της απορρόφησης. Εν συνεχεία, μετράται η απορρόφηση του δείγματος, το οποίο έχει υποστεί συγκεκριμένη επεξεργασία ανάλογα την περίπτωση, και από την πρότυπη καμπύλη κατεχίνης υπολογίζεται η συγκέντρωση σε ολικές κατεχίνες εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g ή ml. Για τον προσδιορισμό των ολικών κατεχινών σε πλάσμα τα πρότυπα διαλύματα κατεχίνης φτιάχνονται σε νερό ή σε πλάσμα (Kivits et al, 1996; Van het Hof et al, 1998; Kyle et al, 2007).

### 2.5.2.2. Η μέθοδος Folin Ciocalteu

Η μέθοδος αυτή έχει ως στόχο τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών τόσο *in vitro* σε τρόφιμα, όσο και *in vivo* σε βιολογικά υγρά. Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin-Ciocalteu reagent-FC) σε φωσφορομολυβδενικό/φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε χρώματος και σε αλκαλικό περιβάλλον: Phenolics + alkaline + FC reagent → blue colored product. Τα ολικά φαινολικά που περιέχονται στα φυτά προσδιορίζονται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (UV-vis) διπλής δέσμης και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών γίνεται συνήθως με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg γαλλικού οξέος/g ή ml. Οι διαδικασίες επεξεργασίας του δείγματος καθώς και η ποσότητα του δείγματος και του αντιδραστηρίου FC, προσαρμόζονται ανάλογα με την περίπτωση (Spanos & Wolgast, 1990; Kapsokefalou, Zou & Miller, 2006).

### 3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΡΟΛΟ ΤΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ

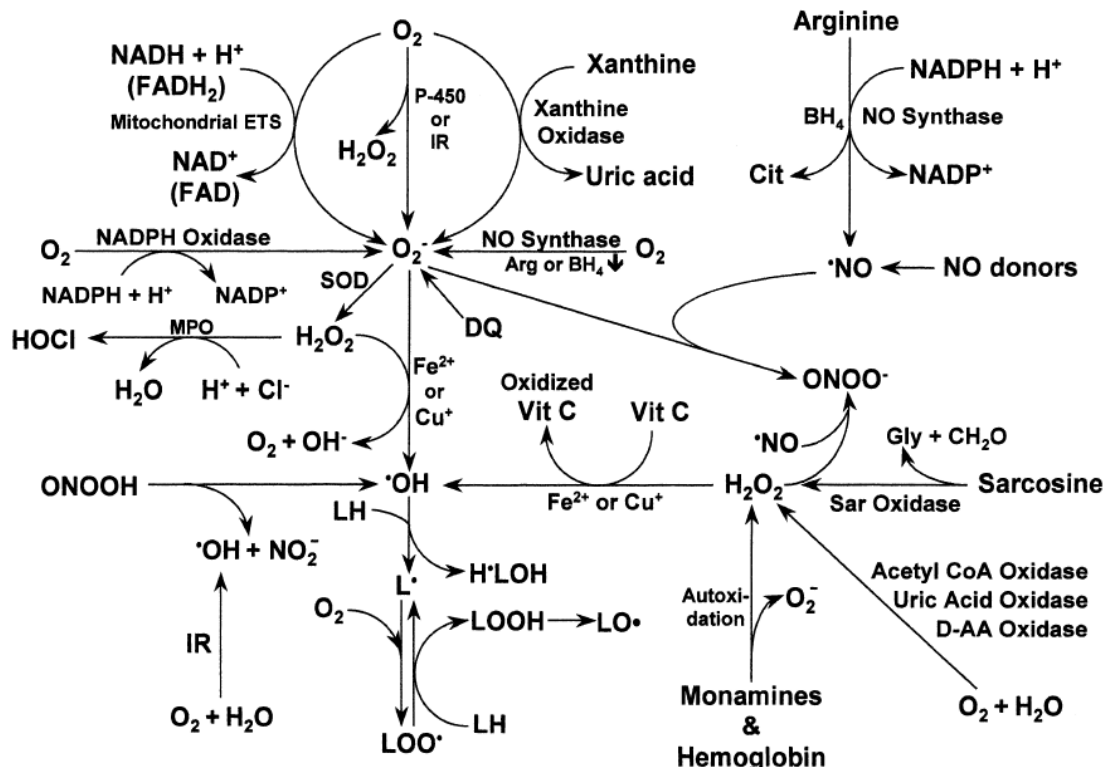
#### 3.1. Οξειδωτικές καταστροφές και κυτταρικός εκφυλισμός

##### 3.1.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Με τον όρο ελεύθερες ρίζες εννοούμε κάθε χημικό είδος που περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα. Πρόκειται για ασταθή και πολύ δραστικά μόρια που παράγονται ως συνέπεια μεταβολικών διεργασιών εντός του κυττάρου, αλλά και ως αποτέλεσμα επίδρασης εξωγενών παραγόντων (Jacob, 1999; Dufense & Farnworth, 2001; Bourasa & Tardif, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου μετατρέπονται εντός του οργανισμού σε άλλες δραστικές ουσίες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ) και το περοξυνιτρίλιο ( $ONOO^-$ ). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) παράγονται στον οργανισμό υπό φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις και περιλαμβάνουν τόσο ελεύθερες ρίζες όσο και άλλες δραστικές ουσίες (Fang, Yang & Wu, 2002). Οι πιο συχνά απαντώμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι η υδροξυλική ( $OH^-$ ), η υπεροξειδική ( $O_2^-$ ), η περοξυλική ( $ROO^-$ ) και η αλκοξυλική ( $RO^-$ ), ενώ οι κυριότερες ρίζες αζώτου είναι οι προερχόμενες εκ του μονοξειδίου ( $NO^-$ ) και εκ του διοξειδίου του αζώτου ( $NO_2^-$ ).

Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη ζωή του κυττάρου, συντελώντας εις την φυσιολογική επιτέλεση πολλών μεταβολικών διεργασιών. Τέτοιες λειτουργίες σχετίζονται με την παραγωγή ορμονών, πρωτεϊνών και άλλων σημαντικών βιομορίων και με την προστασία από εξωτερικούς εισβολείς, όπως μικρόβια και ιοί (Dufense & Farnworth, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν σε διεργασίες μεταγραφής γονιδίων και ρύθμισης της δραστηρότητας σημαντικών ενζύμων, ενώ η ρίζα  $NO^-$  υπό κανονικές συνθήκες ευνοεί την ελαστικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Dufense & Farnworth, 2001; Fang, Yang & Wu, 2002). Η φυσιολογική παραγωγή των ελευθέρων ριζών εντός του κυττάρου αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία που είναι αποτέλεσμα πληθώρας μεταβολικών μονοπατιών. Η ρίζα  $NO^-$  σχηματίζεται εκ της L-αργινίνης υπό τη δράση της συνθάσης  $NO$  (eNOS). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παράγεται εκ του  $O_2$  μέσω του κυτοχρώματος P450 και των ενζύμων οξειδάση του ουρικού οξέος και

οξειδάση του συνενζύμου A. Στο Σχήμα 3.1. φαίνονται οι πολύπλοκες αλληλοσχετιζόμενες και αλληλεπιδρώσες μεταβολικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα εντός του οργανισμού, εμπλέκουν πληθώρα ενζύμων και οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών εντός του κυττάρου (Fang, Yang & Wu, 2002).



**Σχήμα 3.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου στα κύτταρα των θηλαστικών (Fang, Yang & Wu, 2002).**

\*Συντομογραφίες πίνακα: AA, amino acid; Arg, L-arginine; BH4, (6R)-5,6,7,8,-tetrahydro-L-biopterin; CH2O, formaldehyde; Cit, L-citrulline; DQ, diquat; ETS, electron transport system; FAD, flavin adenine dinucleotide (oxidized); FADH2, flavin adenine dinucleotide (reduced); Gly, glycine; H2O2, hydrogen peroxide; HOCl, hypochlorous acid; H•LOH, hydroxy lipid radical; IR, ionizing radiation; L•, lipid radical; LH, lipid (unsaturated fatty acid); LO•, lipid alkoxy radical; LOO•, lipid peroxy radical; LOOH, lipid hydroperoxide; MPO, myeloperoxidase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized); NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (reduced); NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized); NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced); •NO, nitric oxide; O2, superoxide anion radical; •OH, hydroxyl radical; ONOO, peroxy nitrite; P-450, cytochrome P-450; PDG, phosphate-dependent glutaminase; Sar, Sarcosine; SOD, superoxide dismutase; Vit C, vitamin C; Vit E, vitamin E (tocopherol).

Οι ελεύθερες ρίζες, ως δραστικές ουσίες, δύναται ακόμα και όταν παράγονται υπό φυσιολογικούς ρυθμούς να προκαλέσουν καταστροφές βιομορίων εντός του κυττάρου (Dufense & Farnworth, 2001). Για το λόγο αυτό το κύτταρο προστατεύεται μέσω ενός ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος αποτελούμενου από σειρά αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα κυριότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα στον άνθρωπο είναι η υπεροξειδική δισμουτάση με χαλκό, ψευδάργυρο, μαγγάνιο ή σίδηρο

(Superoxide dismutase, SOD), η οποία εξουδετερώνει το υπεροξειδικό ανιόν, η καταλάση (catalase, CAT), η οποία εξουδετερώνει το  $H_2O_2$ , η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η δεϋδρογονάση του γλυκοζο-6-φωσφορικού εστέρα (G6PD) (Βαλαβανίδης, 2003; Bourasa & Tardif, 2006). Η SOD αποτρέπει την υπερπαραγωγή ριζών  $O_2^-$ , εξουδετερώνοντας δύο μόρια υπεροξειδικού ανιόντος και σχηματίζοντας  $H_2O_2$  και  $O_2$ . Η GPx βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, εξαρτάται από το σελήνιο και συμβάλει στη βιομετατροπή ξеноβιοτικών και στην απενεργοποίηση καρκινογόνων ουσιών. Η CAT καταλύει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Το γονίδιο της CAT βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p13, ενώ έχει μελετηθεί εκτενώς η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινική της δράση (Jacob, 1999; Bourasa & Tardif, 2006). Η ενίσχυση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας επιτυγχάνεται και με την παρουσία των ενδογενών βιταμινών E και C, του ουρικού οξέος και των φαγοκυττάρων (Bourasa & Tardif, 2006).

Σε παθολογικές καταστάσεις ή υπό την επίδραση εξωγενών παραγόντων δύναται να προκληθεί υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών σε κυτταρικό επίπεδο, η οποία δεν μπορεί να ελεγχθεί από το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα. Το φαινόμενο αυτό, που συνδέεται με μετατόπιση της ισορροπίας οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών ουσιών προς την οξειδωτική πλευρά, είναι γνωστό ως οξειδωτικό στρες (Jacob, 1999; Dufense & Farnworth, 2001; Fang, Yang & Wu, 2002; Bourasa & Tardif, 2006). Οι σημαντικότεροι εξωγενείς παράγοντες που ευθύνονται για την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών είναι διάφορες τοξικές ουσίες, οι μικροβιακές μολύνσεις, η UV ακτινοβολία, το όζον, ο καπνός του τσιγάρου και η έντονη άσκηση (Dufense & Farnworth, 2001), ενώ πιθανές παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών αφορούν μολυσματικές και φλεγμονώδεις ασθένειες. Η αντίδραση του οργανισμού στις ασθένειες αυτές οδηγεί σε υπερενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, των λευκοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, με συνέπεια την επίταση του οξειδωτικού στρες (Βαλαβανίδης, 2003). Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε αλλαγή της δομής των λιπαρών οξέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με συνέπεια την απώλεια της προστασίας των κυτταρικών συστατικών από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλεί την καταστροφή πολλών ενζυμικών συστημάτων, ενώ η οξείδωση των νουκλεοτιδίων συνδέεται με σημαντικές μεταλλάξεις. Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων του κυττάρου κατά το οξειδωτικό στρες συνδέεται με την αθηρωμάτωση, το διαβήτη

και την κατάπτωση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι κυτταρικές καταστροφές που προκαλούνται κατά την υπερπαραγωγή των ελευθέρων ριζών, οι οποίες συχνά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, έχουν συνδέσει το οξειδωτικό στρες με την εμφάνιση πολλών εκφυλιστικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Jacob, 1999; Dufense & Farnworth, 2001; Rietveld & Wiseman, 2003).

Κατά το οξειδωτικό στρες, το πρώτο στάδιο που λαμβάνει χώρα και οδηγεί στην κυτταρική καταστροφή είναι η λιπιδική υπεροξείδωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Με τον όρο αυτό περιγράφεται η οξειδωτική καταστροφή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης μέσω μιας αυτοκαταλυόμενης μη ελεγχόμενης διεργασίας, που οφείλεται σε οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες και οδηγεί αρχικά στην παραγωγή υδρουπεροξειδίων λιπαρών οξέων (LOOH) και δευτερευόντως σε άλλα προϊόντα, όπως οι αλδεϋδικές ενώσεις. Η λιπιδική υπεροξείδωση εκκινεί κυρίως εκ των ελευθέρων ριζών OH-, ROO- και RO- και οδηγεί αρχικώς στην παραγωγή της δραστικής ρίζας L-. Αυτή αντιδρά με οξυγόνο σχηματίζοντας υπερόξυλο-ρίζα, η οποία αποσπά ένα υδρογόνο από ένα άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ προωθώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση. Τα λιπιδικά υπεροξειδία υπόκεινται σχάσεις δεσμών παράγοντας οργανικές ενώσεις όπως η εξανάλη, η 4-υδροξυεννεανάλη, ακόρεστες αλδεϋδες, κετόνες και η μηλονική δυαλδεϋδη (malonyldialdehyde, MDA). Η λιπιδική υπεροξείδωση μειώνει τη ρευστότητα των μεμβρανών του κυττάρου, ενώ περιορίζει την ηλεκτρική τους αντίσταση. Παράλληλα, οδηγεί σε απώλεια της ιονικής ομοιόστασης της μεμβράνης, με συνέπεια την απώλεια του ελέγχου των επιπέδων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η μείωση της ενεργότητας των μεμβρανικών ενζύμων και η παραγωγή αρκετών τοξικών και καρκινογόνων αλδεϋδικών ενώσεων είναι άλλες σημαντικές συνέπειες της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Fang, Yang & Wu, 2002; Βαλαβανίδης, 2003).

Η λιπιδική υπεροξείδωση έχει συσχετισθεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών φθοράς, με τις πιο σημαντικές έρευνες να επικεντρώνονται στην εμπλοκή της στους μηχανισμούς καρκινογένεσης. Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία δύναται να προκαλέσουν βλάβες στο DNA των κυττάρων, παράγοντας οξειδωμένα προϊόντα νουκλεοβασών, όπως η 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη. Εκτός από τις ρίζες LOO-, και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως η ROO- και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δύναται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες να αντιδράσουν με το DNA προκαλώντας του συγκεκριμένες βλάβες. Οι κυριότερες εξ αυτών αφορούν την πρόκληση δομικών αλλαγών, όπως μεταλλάξεις σε ζεύγη βάσεων, ελλείψεις, νίτρωση και απαμίνωση. Οι

ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να διαμορφώσουν την ενεργότητα πρωτεϊνών και γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική απόπτωση (Βαλαβανίδης, 2003).

### **3.1.2. Το λίπος και ο σίδηρος ως δυνητικοί οξειδωτικοί παράγοντες**

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα παραγόντων έχουν μελετηθεί ως προς την επίδραση τους στην επίταση των οξειδωτικών διαδικασιών σε κυτταρικό επίπεδο. Ένας εξ αυτών αποτελεί το λίπος της διατροφής. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι ο συσχετισμός μεταξύ θερμιδικής πρόσληψης και καρκινογένεσης συνδέεται με το οξειδωτικό στρες, την ανισορροπία οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών και την υπερπαραγωγή οξυγονούχων ελευθέρων ριζών, δεδομένου του αυξημένου μεταβολισμού του οξυγόνου κατά την καύση των λιπαρών συστατικών (Βαλαβανίδης, 2003). Σημαντικός περιορισμός του κορεσμένου λίπους σε πειραματόζωα οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων και σε μείωση της έκτασης του οξειδωτικού στρες (Egelman, Noorbibi & Good, 1994). Η αυξημένη κατανάλωση ζωικού λίπους και κόκκινου κρέατος έχει συσχετισθεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο τύπος αυτός καρκίνου είναι αποτέλεσμα τόσο της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όσο και των οξειδωτικών διαδικασιών που προκύπτουν εκ της παρουσίας μεγάλων συγκεντρώσεων δισθενούς σιδήρου στο κρέας (Βαλαβανίδης, 2003).

Ο σίδηρος διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο εντός του οργανισμού, επιτελώντας πληθώρα διεργασιών σχετικών με τα ενζυμικά συστήματα, την παραγωγή πρωτεϊνών και τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Ωστόσο, ο δισθενής σίδηρος οξειδώνεται εύκολα παρουσία οξυγόνου προς υπεροξειδικό ανιόν, ενώ αντιδρώντας με το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγει υδροξυλικές ρίζες (αντίδραση Fenton). Όταν διαταραχθεί η ομοιόσταση του σιδήρου εντός του οργανισμού, τότε δύναται ο σίδηρος να αποτελέσει παράγοντα παραγωγής ελευθέρων ριζών, οι οποίες προάγουν το οξειδωτικό στρες, αναστέλλουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και επιδρούν αρνητικά στο DNA. Οι ρίζες υδροξυλίου που παράγονται από την αντίδραση Fenton, δύναται να προκαλέσουν θραύσεις χρωμοσωμάτων κλώνων, σημειακές μεταλλάξεις και σταυροδεσμούς στο DNA (Leaderson & Tagesson, 1996; Fang, Yang & Wu, 2002).



## 3.2. Αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού εντός του οργανισμού

### 3.2.1. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του τσαγιού *in vitro*

Όπως έχει αναφερθεί, το τσάι είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, αλλά περιέχει και άλλες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, όπως οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή και το σελήνιο (Das, Thakuria & Kanodia, 2008). Οι Cao, Soflic & Prior (1996) έδειξαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ότι το πράσινο και το μαύρο τσάι εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των υπεροξειδικών ριζών, από ότι λαχανικά όπως το σκόρδο, το σπανάκι και το λάχανο. Ο Langley-Evans (2000) έδειξε με τη μέθοδο FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του πράσινου τσαγιού ήταν μεγαλύτερη από αυτή του μαύρου, αν και άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι το μαύρο τσάι εμφανίζει εξίσου σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα, συγκρίσιμη με αυτή του πράσινου (Luczaj & Skrzydlewska, 2005).

Τα συστατικά του τσαγιού που συμβάλλουν σε μεγαλύτερο βαθμό στην αντιοξειδωτική δράση που αυτό εμφανίζει φαίνεται ότι είναι οι κατεχίνες. Οι Rice-Evans, Miller & Paganga (1997) αναφέρουν ότι το 78% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πράσινου τσαγιού οφείλεται στις κατεχίνες και στους γαλλικούς εστέρες τους. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των κατεχινών βασίζονται κυρίως στη δυνατότητα τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, δίνοντας το -H της υδροξυλομάδας τους ή να συμπλοκοποιούν ιόντα που καταλύουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Πολλές μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι οι κατεχίνες του τσαγιού δύναται να δεσμεύουν ρίζες υπεροξειδικές, υδροξυλικές, καθώς και τη ρίζα DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997; Yilmaz, 2006).

Η ύπαρξη της ο-διϋδροξυ κατεχόλης (3',4'-OH) στο Β δακτύλιο καθώς και η παρουσία γαλλικών εστέρων στη θέση 3 του C δακτυλίου ή η ύπαρξη και τρίτου -OH στο Β δακτύλιο φαίνεται ότι είναι παράγοντες που ενισχύουν τη δυνατότητα των κατεχινών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997; Ho, Lin & Shahidi, 2009). Συνεπώς, ο αριθμός και η θέση των υδροξυλομάδων καθώς και η παρουσία γαλλικών εστέρων φαίνεται ότι καθορίζει τη σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των κατεχινών του τσαγιού η οποία είναι η ακόλουθη: επιγαλλοκατεχίνη =

γαλλική επιγαλλοκατεχίνη > γαλλική επικατεχίνη = επικατεχίνη > κατεχίνη (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997; Luczaj & Skrzydlewska, 2005).

Η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών φαίνεται ότι, έστω μερικώς, επηρεάζεται από το δυναμικό μείωσης ενός ηλεκτρονίου (Eo). Χαμηλό Eo σημαίνει λιγότερη απαιτούμενη ενέργεια ώστε μια χημική ένωση να προσδώσει ή να λάβει ένα ηλεκτρόνιο, γεγονός που καθιστά το Eo παράγοντα καθορισμού της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (Frei & Higdon, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Το ασκορβικό οξύ φαίνεται ότι εμφανίζει μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από τις κατεχίνες έχοντας Eo=280 έναντι Eo=430-570 των κατεχινών. Οι θειοφλαβίνες και οι θειορουβικίνες του μαύρου τσαγιού φαίνεται ότι εμφανίζουν εξίσου αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση *in vitro* με τις κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, αν και λίγο μικρότερη (Eo=510) (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997; Luczaj & Skrzydlewska, 2005).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του τσαγιού και των συστατικών του έχουν μελετηθεί εκτενώς *in vitro* και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές κατεχίνες του τσαγιού, όπως οι EGC, ECG και EGCG, καθώς και το εκχύλισμα πράσινου τσαγιού έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες σε ψάρι και κρέας, αντί για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά BHT και BHA. Οι Shahidi & Alexander (1998) παρατήρησαν ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού σε συγκέντρωση 200 ppm ανέστειλαν την οξείδωση των λιπιδίων του κρέατος αποτελεσματικότερα από την α-τοκοφερόλη. Επίσης, παρατήρησαν ότι οι γαλλικοί εστέρες των κατεχινών ήταν πιο δραστικοί στον έλεγχο της λιπιδικής οξείδωσης του κρέατος, σε σχέση με άλλα φλαβονοειδή.

### **3.2.2. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων του τσαγιού εντός του οργανισμού**

Αν και ο οργανισμός εξισορροπεί την πιθανή υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος, τα αντιοξειδωτικά της διατροφής συνεισφέρουν σημαντικά στην προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες, προστατεύοντας την ακεραιότητα του και ενισχύοντας την ανοσοποιητική του λειτουργία (Osawa, 1999; Jacob, 1999; Dufense & Farnworth, 2001; Frei & Higdon, 2003; Rietveld & Wiseman, 2003). Παρά τη δυσκολία της αξιολόγησης του συνολικού συνδυαστικού ρόλου των διαφόρων αντιοξειδωτικών της διατροφής στον κυτταρικό μεταβολισμό, φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και οι τοκοφερόλες

παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες προστατευτικές δράσεις, κυρίως εξαιτίας της εμπλοκής τους στους μηχανισμούς παραγωγής των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Jacob, 1999). Τα καροτενοειδή, όπως το λυκοπένιο, εμφανίζουν δράσεις προστασίας του DNA, ενώ τα αντιοξειδωτικά μέταλλα, όπως το σελήνιο, επιτελούν ρόλο ενίσχυσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων. Τα τελευταία χρόνια μελετάται εκτενώς και η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των φυτοχημικών ουσιών, όπως οι πολυφαινόλες και κυρίως η ομάδα των φλαβονοειδών. Ένα από τα τρόφιμα του οποίου η αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, είναι το τσάι (Dufresne & Farnworth, 2001; Donovan et al, 2005).

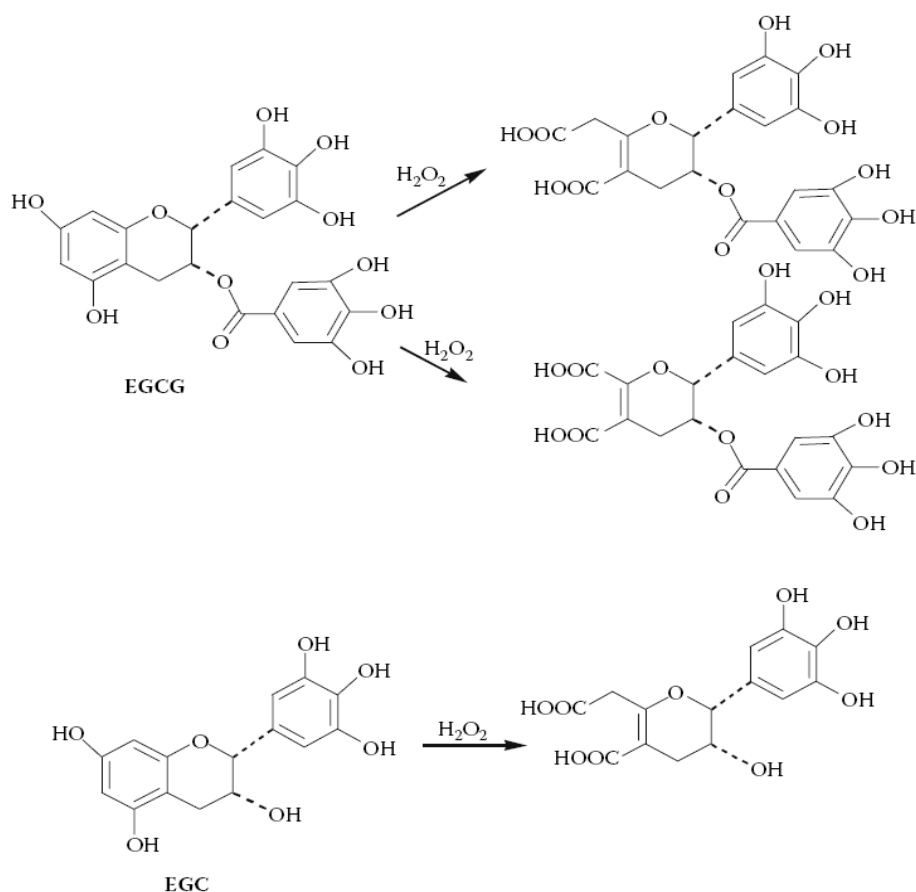
Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού εντός του οργανισμού είναι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών, η συμπλοκοποίηση ιόντων που συντελούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και η εμπλοκή στους μηχανισμούς ρύθμισης προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων (Osawa, 1999; Ho, Lin & Sahidi, 2009). Η σημαντικότερη αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών αφορά τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών (ιδίως των ριζών O<sub>2</sub>·-, ROO·-, OH·-, NO·-) και την παραγωγή αδρανών προϊόντων, με συνέπεια την αποτροπή του οξειδωτικού στρες και της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Ho, Lin & Sahidi, 2009). Οι κατεχίνες δεσμεύουν τις υπεροξειδικές ρίζες καταστέλλοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και αναστέλλοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση. Ανάμεσα στις κατεχίνες, η γαλλική επιγαλοκατεχίνη (EGCG) εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα επί των δραστηκών μορφών οξυγόνου. Έχει δείχθει ότι τα κέντρα αντιοξειδωτικής δράσης της EGCG είναι οι δακτύλιοι A-, B- και C- (Σχήμα 1.3), με συνέπεια ένα μόριο EGCG να δεσμεύει έξι ανιόντα O<sub>2</sub>·- ή OH·-, ενώ η επικατεχίνη δεσμεύει μόνο δύο, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα: (Yang et al, 1994; Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997)



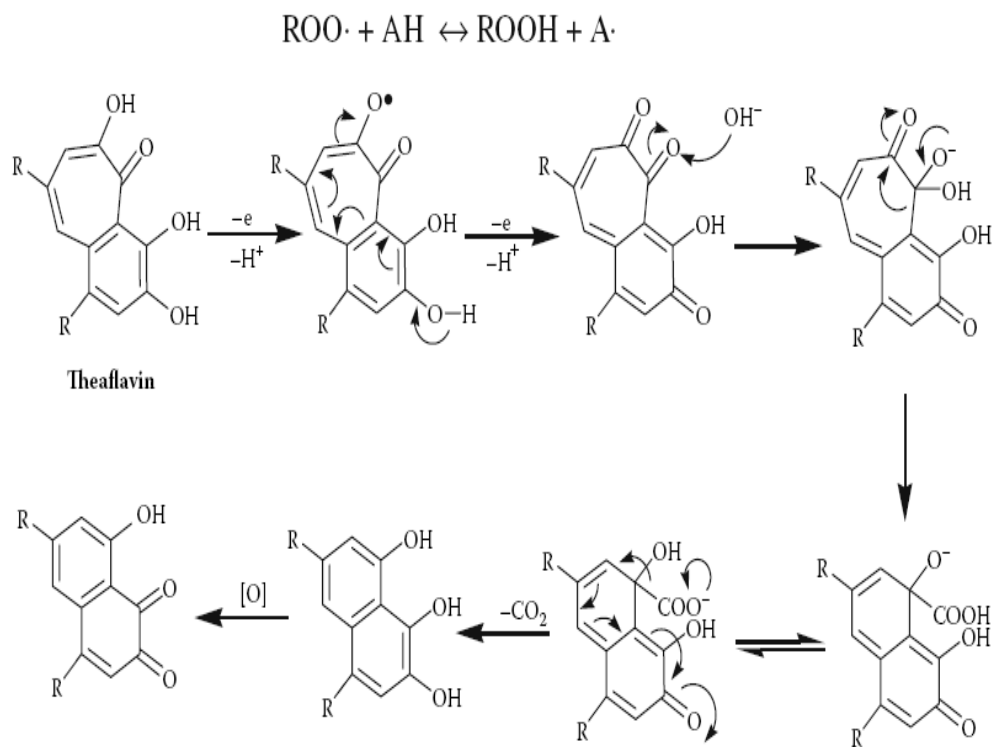
Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι κατεχίνες προστατεύουν τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων αφενός μεν δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες πριν αντιδράσουν με αυτήν, αφετέρου δε αποτρέποντας την καταστροφή των μεμβρανικών ΑΤΡασών (Saffari & Sadrzadeh, 2003). Οι κατεχίνες έχουν εμφανίσει έντονη ικανότητα δέσμευσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και των εξ αυτού παραγόμενων υδροξυλικών ριζών. Στο Σχήμα 3.2. φαίνεται ο μηχανισμός κατά τον οποίο οι κατεχίνες αντιδρούν με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και

υφίστανται οξείδωση και αποκαρβοξυλίωση στον αριστερό δακτύλιο. Με τον τρόπο αυτό παράγονται σταθερά προϊόντα και αποτρέπονται οι βλαπτικές για το κύτταρο δράσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Ho, Lin & Sahidi, 2009).

Οι θειοφλαβίνες του μαύρου τσαγιού εμφανίζουν επίσης σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέποντας το οξειδωτικό στρες (Osawa, 1999). Στο Σχήμα 3.3. φαίνεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός δέσμευσης των υπεροξειδικών ριζών από τις θειοφλαβίνες, που οδηγεί στη μετατροπή τους εις σταθερές αδρανείς ενώσεις (Ho, Lin & Sahidi, 2009). Οι θειοφλαβίνες προστατεύουν το DNA από την οξειδωτική καταστροφή, αναστέλλουν τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης και προστατεύουν την LDL από την οξείδωση (Osawa, 1999; Ho, Lin & Sahidi, 2009).

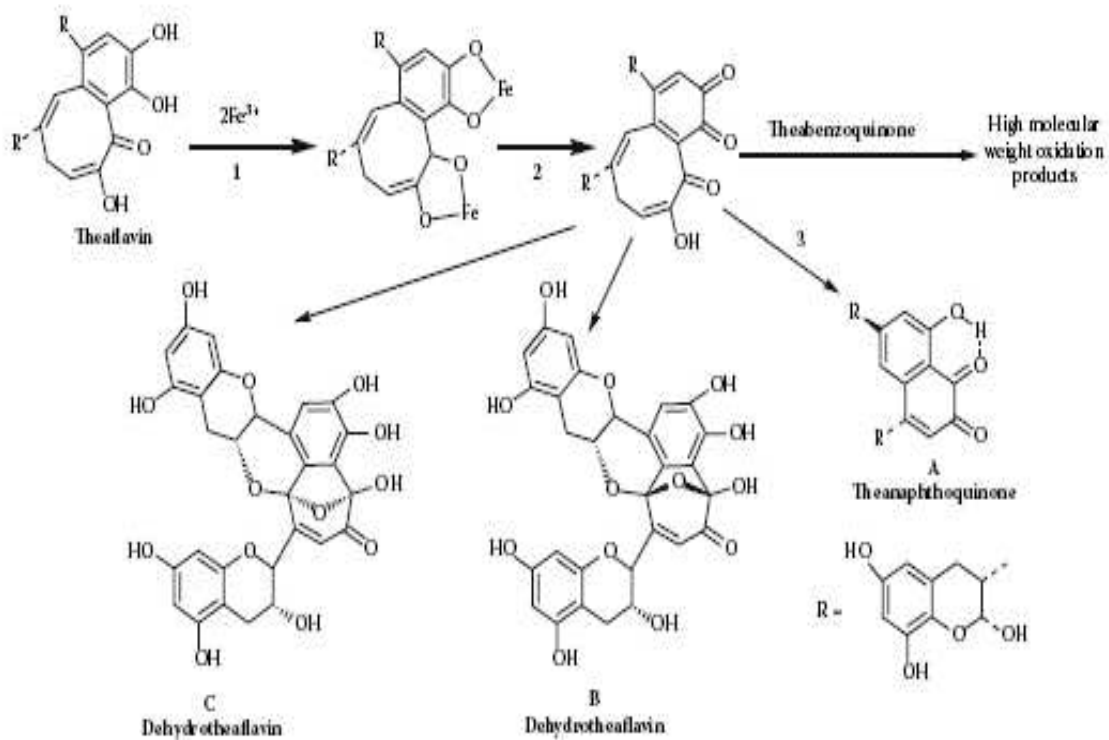


**Σχήμα 3.2. Παραγωγή αδρανών προϊόντων μετά την αντίδραση των κατεχινών EGCG και EGC με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Ho, Lin & Sahidi, 2009).**



**Σχήμα 3.3. Προτεινόμενος μηχανισμός δέσμευσης των υπεροξειδικών ριζών από τις θειοφλαβίνες (Ho, Lin & Sahidi, 2009).**

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού είναι η συμπλοκοποίηση διαφόρων ιόντων μετάλλων, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών εντός του οργανισμού. Η δομή των κατεχινών του πράσινου τσαγιού και των θειοφλαβινών του μαύρου επιτρέπει τη συμπλοκοποίηση του  $\text{Fe}^{+3}$  εξαιτίας της ύπαρξης των υδροξυλικών ομάδων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.4, οι θειοφλαβίνες αντιδρούν με το σίδηρο σχηματίζοντας σύμπλοκα τα οποία οξειδώνονται εύκολα προς κινόνες και εν συνεχεία μετατρέπονται σε διάφορα πολυμερή παράγωγα. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπονται οι οξειδωτικές δράσεις του σιδήρου εντός του οργανισμού, όπως αυτές περιγράφονται στην παράγραφο 3.1.2. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι κατεχίνες αποτρέπουν την εκ του  $\text{Fe}^{+3}$  προκληθείσα λιπιδική υπεροξείδωση, ενώ η EGC εμφανίζει μεγαλύτερη τάση συμπλοκοποίησης του σιδήρου από τις EGCG και EC (Frei & Higdon, 2003; Ho, Lin & Sahidi, 2009).



**Σχήμα 3.4.** Συμπλοκοποίηση του  $\text{Fe}^{+3}$  από τις θειοφλαβίνες και παραγωγή διαφόρων πολυμερών (Ho, Lin & Sahidi, 2009).

Τέλος, ένας μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων που έχει προταθεί τα τελευταία χρόνια αφορά την επίδραση τους επί των διαδικασιών ρύθμισης γονιδίων σχετικών με το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού (Ahmad & Mukhtar, 1999; Chen et al, 2000; Erba et al, 2004; Ho, Lin & Sahidi, 2009). Οι πολυφαινόλες του τσαγιού φαίνεται ότι προωθούν την έκφραση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης κ.α., ενισχύοντας την ενδογενή άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες. Επίσης, έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της ομάδας ενζύμων τύπου II glutathione-S transferases. Τα ένζυμα αυτά περιέχουν το στοιχείο αντιοξειδωτικής ανταπόκρισης (Antioxidant Response Element, ARE) και οι πολυφαινόλες, μέσω της εμπλοκής στα μεταβολικά μονοπάτια των πρωτεϊνικών κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), θεωρείται ότι ενεργοποιούν το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα εμφανίζοντας πολύπλοκη συνεργηστική δράση με τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και κυρίως με τη γλουταθειόνη (Ahmad & Mukhtar, 1999; Chen et al, 2000; Frei & Higdon, 2003). Οι Kuzuhara et al (2006) πρότειναν ότι η EGCG ίσως συνδέεται

άμεσα με την απλή έλικα του DNA ή με τα σημεία σύνδεσης των ζευγών βάσεων AG, CT της διπλής έλικας, αλλάζοντας την έκφραση των γονιδίων με άμεσο τρόπο. Το θέμα της επίδρασης των πολυφαινολών στα γονίδια αναλύεται εκτενώς στο Κεφάλαιο 4.

### **3.2.3. Αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού: Στοιχεία από μελέτες σε ζώα και ανθρώπους**

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες, τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους, με στόχο την διερεύνηση των μηχανισμών αντιοξειδωτικής δράσης του τσαγιού. Οι μελέτες αυτές επικεντρώθηκαν στον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα και τους ιστούς, στην εκτίμηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και στη μέτρηση διαφόρων προϊόντων οξείδωσης (Frei & Higdon, 2003; Rietveld & Wiseman, 2003). Τα μοντέλα ζώων προσφέρουν τη δυνατότητα αξιολόγησης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του τσαγιού ευρισκομένου υπό μορφή αφεψήματος εντός του νερού των ζώων ή υπό λυοφυλιωμένη μορφή εντός της τροφής, σε διαφορετικές περιπτώσεις οξειδωτικού στρες και εντός όλων των ιστών του οργανισμού. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει σε ιστούς πειραματικών ποντικών και αρουραίων ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού αναστέλλουν τη δράση προοξειδωτικών ενζύμων, ενώ αυξάνουν τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί σε κυτταροκαλλιέργειες ότι η EGCG ανέστειλε το σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσω της αναστολής του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης, η οποία καταλύει την οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ και υπεροξειδικές ρίζες (Frei & Higdon, 2003). *In vivo* μοντέλα ζώων που υπέστησαν οξειδωτικό στρες με διάφορους τρόπους (ακτινοβολία, χημικές ουσίες κ.α.) έδειξαν ότι η χορήγηση τσαγιού απέτρεψε τη μείωση της δραστηριότητας των ενδογενών αντιοξειδωτικών των ιστών, όπως η α-τοκοφερόλη, η γλουταθειόνη, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η υπεροξειδική δισμουτάση (Crepsy & Williamson, 2004; Rodrigo & Bosco, 2005). Άλλες μελέτες σε ζώα έχουν συμπεράνει ότι η κατανάλωση τσαγιού οδήγησε σε αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα και στους ιστούς, μετρούμενη με τις μεθόδους FRAP, TRAP και ORAC (Frei & Higdon, 2003; Crepsy & Williamson, 2004; Koutelidakis et al, 2009).

Μια άλλη προσέγγιση εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης του τσαγιού στους ιστούς πειραματικών ζώων αφορά τον προσδιορισμό των διαφόρων προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Μελέτες στο ήπαρ, τα νεφρά

και άλλους ιστούς αρουραίων έχουν δείξει με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) ότι η κατανάλωση τσαγιού μειώνει τα παραγόμενα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOO-), η μηλονική αλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυνονενάλη (4-HNE) (Sano et al, 1995; Crepsy & Williamson, 2004). Άλλες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση πολυφαινολών απομονωθέντων εκ του τσαγιού σε ζώα που είχαν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες προκάλεσε μειωμένη παραγωγή προϊόντων οξειδωσης των πρωτεϊνών (γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, καρβονύλια) και του DNA (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine-8-OHdG). Παραταύτα, οι διαφορετικές μεθοδολογίες των πειραμάτων με ζώα δύναται να εξηγήσει τα πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα και την ύπαρξη ορισμένων μελετών που δε δείχνουν επίδραση του τσαγιού στους μελετώμενους δείκτες αντιοξειδωσης (Frei & Higdon, 2003).

Αν και αρκετές μελέτες με ζώα έχουν δείξει σαφή στοιχεία επίδρασης του τσαγιού στην αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού, λιγότερες κλινικές μελέτες εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα (Frei & Higdon, 2003). Σε μια μελέτη ανασκόπησης οι Rietveld & Wiseman (2003) παρουσιάζουν κάποιες από τις σημαντικότερες κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με στόχο τη διερεύνηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του τσαγιού εντός του ανθρώπινου οργανισμού (Πίνακας 3.1). Στις μελέτες αυτές διερευνήθηκαν παρόμοιοι βιοδείκτες με αυτούς των μελετών με ζώα, ενώ χρησιμοποιήθηκαν αφεψήματα πράσινου ή μαύρου τσαγιού (συγκέντρωση 0,6 έως 2 g τσαγιού στα 100 ml) ή δισκία περιέχοντα πολυφαινόλες προερχόμενες από εκχύλιση φύλων τσαγιού. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος 30 min με 1-1,5 h μετά την κατανάλωση τσαγιού. Η αύξηση αυτή εμφανίστηκε μετά την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων (FRAP, ORAC, TRAP) και κυμαίνονταν από 2-4% σε κάποιες μελέτες έως και 40-50% σε κάποιες άλλες. Κάποιες κλινικές μελέτες αξιολόγησαν την επίδραση του τσαγιού στα προϊόντα οξειδωσης στο πλάσμα και στα ούρα, δείχνοντας τάση επίδρασης ιδίως στις F2-ισοπροστάνες και λιγότερο στα προϊόντα οξειδωσης MDA και TBARS (Rietveld & Wiseman, 2003).

Μεταγενέστερες κλινικές μελέτες συνέχισαν να εμφανίζουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα και να προτείνουν νέους μηχανισμούς δράσης των πολυφαινολών. Οι Erba et al. (2004) έδειξαν σε υγιείς εθελοντές ότι η επί 42 ημέρες κατανάλωση 2 φλιτζανιών πράσινου τσαγιού (250 mg κατεχίνες/ημέρα) οδήγησε σε αύξηση της



αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, αύξηση της συγκέντρωσης κατεχινών και μείωση των παραγόμενων υδροϋπεροξειδίων. Οι Henning et al. (2004) έδειξαν ότι οι κατεχίνες του τσαγιού εντός φαρμακευτικών δισκίων αύξησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα 8 h μετά την κατανάλωση τους, κάτι που δε συνέβη όταν καταναλώθηκε αφέψημα τσαγιού ίδιας περιεκτικότητας σε κατεχίνες. Άλλη μελέτη έδειξε σε υγιή άτομα ότι η κατανάλωση 5 φλιτζανιών τσαγιού για ένα μήνα αύξησε τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα, μετρούμενη με τη μέθοδο TRAP, αλλά δεν επηρέασε τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία του πλάσματος (Camargo, Daguer & Barbosa, 2006). Σε μια μεγάλη μελέτη που συμμετείχαν 142 καπνιστές παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση 4 φλιτζανιών πράσινου τσαγιού για 4 μήνες οδήγησε σε μείωση του βιοδείκτη οξείδωσης του DNA (8-OHdG) στα ούρα, δείχνοντας ότι τα αντιοξειδωτικά του τσαγιού αποτρέπουν τις εκτεταμένες οξειδώσεις που προκαλούνται από το εκ του καπνού προερχόμενο οξειδωτικό στρες (Hakim et al, 2003).

Οι περισσότερες κλινικές μελέτες που δείχνουν αύξηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης του πλάσματος μετά την κατανάλωση τσαγιού προτείνουν ως πιθανό μηχανισμό την άμεση αύξηση της συγκέντρωσης των κατεχινών και την προσκόλληση τους στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και σε διάφορα συστατικά του αίματος, στα οποία ασκούν αντιοξειδωτικές δράσεις (Manach et al, 2004). Τα τελευταία χρόνια όμως, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρατηρούμενη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα πιθανόν να οφείλεται όχι μόνο στις απορροφούμενες πολυφαινόλες του τσαγιού, αλλά και σε άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά του αίματος που αυξάνονται μετά την κατανάλωση ενός τροφίμου. Για παράδειγμα, οι μεθυλξανθίνες του τσαγιού καφεΐνη και θεοβρωμίνη δύναται να μεταβολιστούν ταχύτατα προς παράγωγα του ουρικού οξέος, τα οποία αυξάνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Επίσης, έχει δειχθεί ότι και άλλα συστατικά ενός γεύματος, όπως η φρουκτόζη, δύναται να αυξήσουν το ουρικό οξύ και κατά συνέπεια την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (Lee, 2000; Henning et al, 2005; Lotito & Frei, 2006; Modum et al, 2008). Το ουρικό οξύ δύναται σε καταστάσεις ασθενειών και έντονου στρες να αυξηθεί πολύ, με συνέπεια πιθανή υπερεκτίμηση της εις τα αντιοξειδωτικά οφειλόμενης παρατηρούμενης αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Ghiselli et al, 2000).

**Πίνακας 3.1. Στοιχεία σχεδιασμού και αποτελέσματα κάποιων εκ των σημαντικότερων κλινικών μελετών διερεύνησης της αντιοξειδωτικής δράσης του τσαγιού στο πλάσμα (Rietveld & Wiseman, 2003).**

Study	n	Design	Control	Tea	Dose		Time	Parameters <sup>1</sup>	Results
					g	ml			
Benzie, 1999	10	CO	W	GT	20	500	SI	Plasma FRAP Urine total phenolics Urine FRAP	>4% at t = 20-40' >45% at t = 60' >28% at t = 60-90'
Cherubini, 1999 Duffy, 2001	8	—	—	BTE	3.6	500	SI	CEOOH FMD Plasma ORAC Plasma FRAP Lipid profile Vitamin C Glucose	— >60% >11% (ns) >12% (ns) — — —
Freese, 1999	20	P10	NT	GTE	3/d	caps	4W	MDA Lipid profile Vitamin C Vitamin E GSH/GSSG Coagulation factors Urine NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> and NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Urine 8-iso-PGFα <sub>2</sub> Urine thromboxane	<21% — — — — — — —
Hodgson, 2000	20	CO	W	GT, BT	7.6	400	SI	ex vivo LDL oxidation TRAP Urine 4-OMGA	lag time > 3% >4% GT (ns), >3% BT (ns) >7-fold GT, >22-fold BT
Hodgson, 2001	22	P11	W	BT	10	1250/D	4W	FMD Lipid profile Urinary 4-OMGA	>40% — >18 fold
Ishikawa, 1997	22	P8/14	W	BT	11	750/D	4W	ex vivo LDL oxidation Vitamin E Lipid profile Apolipoprotein B LDL composition	lag time > 15% — — — —
Langley, 2000	8	CO	NT	BT	19.5	1200	1D	FRAP	>76%
Leenen, 2000	21	CO	W	GTE, BTE	2	300	SI	FRAP Uric acid Vitamin C Bilirubin Total catechins (t = 90')	+3% GT, +2% BT — — — — 1.8 μM GT, 0.4 μM BT
Maxwell, 1996	10	—	—	BT	5	500	SI	AOX capacity	—
McAnlis, 1997	5	—	—	BT	3.3	600	SI	ex vivo LDL oxidation AOX capacity	— —
	10	CO	Coffee	BT	20	1800	1D	Lipid profile ex vivo LDL oxidation AOX capacity	— — —
Miura, 2000	22	P11	?	GTP	0.6	?	1W	ex vivo LDL oxidation Lipid profile TBARS	lag time > 23% — —
Nakagawa, 1999	18	—	—	GTE	0.254	caps	SI	EGCG (after 1 week) EGCG (t = 60') PCOOH Lipid profile Carotenoids Tocopherols	56.0 ± 14.4 nM 267 ± 126 nM <40% — — —
Princen, 1998	64	P13-16	W	GTE, BTE GTP	3 3.6/d	900/D caps	2W 2W	ex vivo LDL oxidation Vitamin E Lipid profile Vitamin C β-carotene Uric acid	— <5% GTP — — — —

Serafini, 1996	15	P5	W	GT, BT	6	300	SI	TRAP	>34% GT, >29% BT
Serafini, 2000	5	CO	W	GT, BT	6	300	SI	TRAP	>40% GT, >52% BT
Van het Hof, 1997	45	P15	W	GTE, BTE	3	900	1D	ex vivo LDL oxidation	—
								AOX capacity	>3% GT, no effect BT
								Vitamins E and C	—
								$\beta$ -carotene	—
								AOX enzyme activity	—
								Lipid profile	—
								MDA	—
								Uric acid	—
Van het Hof, 1999	18	CO	W	GTE, BTE	4	1200/D	3D	ex vivo LDL oxidation	—
								Total catechins (t = 8 hrs)	1.0 $\mu$ M GT, 0.3 $\mu$ M BT
								LDL catechins	77 nM
								Urine catechins (mg/24 hrs)	24.3 GT, 3.3 BT, 3.4 BT Milk

\*Συντομογραφίες πίνακα: Dose: Η συνολική ποσότητα φύλλων τσαγιού που χρησιμοποιήθηκαν στο αφένημα ή το δισκίο, Time: Η διάρκεια της μελέτης, Ns: Μη σημαντικό, P: Παράλληλη μελέτη και αριθμός ατόμων ανά ομάδα, CO: Διασταυρούμενη μελέτη, DR: Δοσοεξαρτώμενη, SI: Απλή πρόσληψη, W: Νερό; NT: Καμία παρέμβαση, D: Ημέρες, W: Εβδομάδες, M: Μήνες, FRAP: ferric-reducing antioxidant power, C<sub>18</sub>: cholesterol ester hydroperoxide, FMD: flow mediated dilation, ORAC: oxygen radical absorbing capacity, MDA: malondialdehyde, GSH: reduced glutathione, GSSG: oxidized glutathione, TRAP: total radical trapping antioxidant parameter, AOX: antioxidant; GT: Green tea, BT: Black tea, GTE: Green tea extract, BTE: Black tea extract, GTP: Green tea polyphenols, 8-OMGA: 8-O-methylgallic acid.

### 3.2.4. Βιοδείκτες και μεθοδολογίες εκτίμησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης εντός του οργανισμού

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης του τσαγιού εντός του οργανισμού πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους που βασίζονται είτε στον προσδιορισμό των παραγόμενων προϊόντων οξείδωσης, είτε στη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας εντός των βιολογικών υγρών (αίμα, ούρα, ομογενοποιημένοι ιστοί) ανθρώπων και πειραματόζωων.

#### 3.2.4.1. Βιοδείκτες προϊόντων οξείδωσης στο πλάσμα

Πολλές *in vivo* μελέτες έχουν εφαρμόσει μεθοδολογίες προσδιορισμού διαφόρων βιοδεικτών που αποτυπώνουν το επίπεδο της οξείδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών. Εύρεση χαμηλών τιμών τέτοιων προϊόντων οξειδωτικού στρες μετά την κατανάλωση τσαγιού δύναται να συνδεθεί με αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού οφειλόμενη σε ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του. Μία εξ αυτών των μεθοδολογιών είναι η μέθοδος του θειοβαρβιτουρικού οξέος (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS assay). Έχει δειχθεί ότι η αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος (thiobarbitouric acid, TBA) με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών των κυττάρων και με τα εκ της οξείδωσης τους παραγόμενα λιπιδικά υπεροξειδία, οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων

οξειδωσης, όπως η μηλονική αλδεϋδη (malondialdehyde, MDA). Με χρήση διαφόρων φασματοφωτομετρικών τεχνικών είναι δυνατό να προσδιοριστούν αυτά τα προϊόντα οξειδωσης στο πλάσμα του ανθρώπου και των ζώων (Rietveld & Wiseman, 2003; Coimbra et al, 2006; Kapsokefalou et al, 2007).

Άλλοι βιοδείκτες οξειδωτικής κατάστασης στο πλάσμα είναι τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία και τα προϊόντα καταστροφής του DNA. Η μέτρηση των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων λαμβάνει χώρα στο πλάσμα με τη βοήθεια του d-ROMs τεστ, το οποίο βασίζεται στην αντίδραση των υπεροξειδίων με μέταλλα όπως ο σίδηρος, μέσω της αντίδρασης Fenton (Erba et al, 2004). Τα προϊόντα διάσπασης του DNA, όπως η 8-οξο-7,8-διυδροκινόνη, προσδιορίζεται με χρήση HPLC ή ενζυματικά με χρήση του ενζύμου DNA γλυκοζιδάση (Frei & Higdon, 2003). Επίσης, η αξιολόγηση της κατάστασης των ερυθροκυττάρων και της έκτασης της οξειδωσης τους μπορεί να οδηγήσει σε συμπεράσματα για την αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού. Ένας τρόπος αξιολόγησης της αντοχής των ερυθροκυττάρων στην οξειδωση είναι ο υπολογισμός της εις την μεμβράνη αυτών προσκολλημένης αιμογλοβίνης (membrane-band haemoglobin, MBH).

#### **3.2.4.2. Βιοδείκτες συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού**

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος ζώων και ανθρώπων και των ιστών ζώων αποτελεί μία διαδεδομένη μεθοδολογία εκτίμησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού μετά την κατανάλωση τσαγιού και άλλων τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική ικανότητα δίνει ένα στίγμα όχι μόνο για την αντιοξειδωτική κατάσταση, αλλά και για τη βιοδιαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών εντός του οργανισμού (Ghiselli et al, 2000). Παραταύτα, πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος και των ιστών, αν και αποτελεί ένα πολύτιμο μεθοδολογικό εργαλείο, δεν μπορεί από μόνος του να υποστηρίξει επαρκώς συσχέτιση με τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοδραστικότητα και την επίδραση τροφίμων στην πρόληψη ασθενειών. Η εφαρμογή και άλλων μεθοδολογιών, η εκτίμηση των επιπέδων των επιμέρους αντιοξειδωτικών στο πλάσμα και η χρήση τουλάχιστον δύο μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας θα μπορούσε να οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα για την επίδραση ενός τροφίμου στην αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού (Huang, Ou & Prior, 2005).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος δίνει μια συνολικότερη εικόνα των βιολογικών διαδικασιών αντιοξειδωσης, δεδομένου ότι είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πληθώρας παραγόντων και συστατικών, ενώ εξαρτάται από διάφορες μεταβολικές διαδικασίες. Η συνεργηστική δράση ανάμεσα στα ενδογενή αντιοξειδωτικά (τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ κ.α.) και η εμπλοκή των αντιοξειδωτικών της διατροφής στο πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωσης του κυττάρου αποτελούν βασικούς παράγοντες καθορισμού της τελικής τιμής της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Ghiselli et al, 2000; Blauz et al, 2008). Η αντιοξειδωτική κατάσταση των ιστών καθορίζεται περισσότερο από το ενδογενές αντιοξειδωτικό ενζυμικό σύστημα, ενώ στο πλάσμα η παρουσία διατροφικών αντιοξειδωτικών έχει μεγαλύτερη επίδραση (Ghiselli et al, 2000).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εντός του οργανισμού, οι οποίες χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες. Αυτές που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) και αυτές που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Electron Transfer, ET). Οι HAT μέθοδοι στηρίζονται σε ένα σχήμα ανταγωνιστικής δράσης, κατά το οποίο τα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με ένα υπόστρωμα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Βασικά παραδείγματα HAT μεθόδων είναι η ORAC και η TRAP. Οι μέθοδοι ET μετρούν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να ανάγουν ένα οξειδωτικό μέσο, το οποίο αλλάζει χρώμα. Ο βαθμός αλλαγής του χρώματος σχετίζεται με την περιεκτικότητα του δείγματος σε αντιοξειδωτικά. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι FRAP, TEAC και DPPH (Huang, Ou & Prior, 2005). Δεδομένου του διαφορετικού μηχανισμού δράσης οι μέθοδοι των δύο αυτών κατηγοριών δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα. Κάποια αντιοξειδωτικά, λόγω της δομής τους, προσδιορίζονται καλύτερα με συγκεκριμένες μεθόδους και κάποια άλλα με διαφορετικές μεθόδους (Sanchez-Moreno, 2002; Huang, Ou & Prior, 2005). Για παράδειγμα, η μέθοδος FRAP έχει βρεθεί ότι εμφανίζει συμπληρωματικότητα με τη μέθοδο ORAC. Συγκριτικά δεδομένα δείχνουν ότι η FRAP είναι πιο εύκολη μέθοδος, αλλά η ORAC εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση (Cao & Prior, 1998; Huang, Ou & Prior, 2005).

#### **3.2.4.2.1. Μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer)**

Η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) είναι μια φθορισμομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα και τους ιστούς. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του αντιοξειδωτικού με μία ελεύθερη ρίζα που οξειδώνει μια φθορισμομετρική ουσία. Η προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει αντιοξειδωτικά, όπως κάποιο τρόφιμο ή βιολογικό υγρό, οδηγεί σε αναστολή της φθοράς φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας, η οποία υπολογίζεται με χρήση φθορισμομέτρου. Οι δείκτες φθορισμού που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η φυκοερυθρίνη και η φλουορεσκίνη, ενώ για τη δημιουργία υδροξυλικών ριζών χρησιμοποιείται η ρίζα AAPH. Η ORAC συνδυάζει το χρόνο αναστολής και το ποσοστό αναστολής των ελεύθερων ριζών από τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιώντας την τεχνική μέτρησης της AUC (area under curve), δηλαδή τον υπολογισμό του εμβαδού των καμπυλών φθοράς του φθορισμού σε μια ορισμένη χρονική διάρκεια. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μονάδες ORAC ή ισοδύναμα Trolox (Huang et al, 2002; Huang, Ou & Prior, 2005; Prior, Wu & Schaich, 2005).

Η μέθοδος TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) τροποποιήθηκε πολλές φορές μέχρι να καταλήξει στη μορφή που χρησιμοποιείται σήμερα, αυτή των Ghiselli et al (2000). Σύμφωνα με την τελική μορφή χρησιμοποιείται η φυκοερυθρίνη (R-phycoerythrin, R-PE), μία φυκολιποπρωτεΐνη κόκκινου χρώματος, ενώ η μέθοδος βασίζεται στην προφύλαξη που παρέχουν τα αντιοξειδωτικά στη φθορά του φθορισμού της R-PE (lag-phase) κατά τη διάρκεια της ελεγχόμενης αντίδρασης υπεροξειδωσης. Η κινητική αντίδραση πραγματοποιείται στους 38 °C και καταγράφεται για περίπου 1 ώρα από ένα φθορισμόμετρο. Οι τιμές της TRAP (μM), υπολογίζονται από το μήκος της λανθάνουσας φάσης και εκφράζονται ως τα μόρια Trolox που έχουν την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα σε ένα λίτρο πλάσματος (Ghiselli et al, 2000; Sanchez-Moreno, 2002).

#### **3.2.4.2.2. Μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Electron Transfer)**

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) σχεδιάστηκε το 1996 από τους Benzie & Strain με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, ωστόσο σήμερα είναι διαδεδομένη όχι

μόνο για μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε βιολογικά υγρά *in vivo*, αλλά και για τη μέτρηση της *in vitro* σε τρόφιμα και ποτά. Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του συμπλόκου TPTZ-Fe<sup>+3</sup> σε TPTZ-Fe<sup>+2</sup>. Αυτή η αναγωγή οφείλεται στη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την αντιοξειδωτική ένωση, ενώ προσδιορίζεται μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 595nm. Όσο πιο μεγάλη είναι η διαφορά της απορρόφησης, τόσο πιο μεγάλη ικανότητα έχει το αντιοξειδωτικό να μετατρέπει το TPTZ-Fe<sup>+3</sup> σε TPTZ-Fe<sup>+2</sup>, συνεπώς τόσο πιο ισχυρό είναι. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μmol Fe<sup>+2</sup>/L, ενώ η απορρόφηση μετράται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Σε πολλές περιπτώσεις, όπου αναλύεται μεγάλος αριθμός δειγμάτων πλάσματος οι απορροφήσεις μετρώνται αυτοματοποιημένα με χρήση plate reader. (Benzie and Strain, 1996; Cao & Prior, 1998; Huang, Ou & Prior, 2005).

Η μέθοδος TEAC ή ABTS βασίζεται στην αναστολή από τα αντιοξειδωτικά, όπως οι φαινολικές ενώσεις, της απορρόφησης του 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS.+), το οποίο εμφανίζει χαρακτηριστική απορρόφηση στα 734nm. Το προσχηματισμένο κατιόν ABTS.+ είναι ένα πράσινο-μπλε χρωμοφόρο που με προσθήκη αντιοξειδωτικών ανάγεται σε ABTS. Το σταθερό διάλυμα ABTS.+ παρασκευάζεται με την αντίδραση υδατικού διαλύματος ABTS με διάλυμα potassium persulfate και παραμονή του μίγματος στο σκοτάδι για 12-16 h. Η αρχική μέθοδος βασίζεται στην ενεργοποίηση της μεταμυογλοβίνης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μέσω του σχηματισμού ριζών ferrymyoglobin, οι οποίες εν συνεχεία οξειδώνουν το ABTS σχηματίζοντας ABTS.+ Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, οι σχηματιζόμενες ρίζες ABTS.+ αναμειγνύονται με το δείγμα σε ένα μέσο αντίδρασης και υπολογίζεται το ποσοστό της αναστολής της απορρόφησης στα 734 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (mmol/L). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ενώ για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως ABTS με μεταμυογλοβίνη (Sanhez-Moreno, 2002; Huang, Ou & Prior, 2005; Prior, Wu & Schaich, 2005).

### **3.3. Αντικαρκινική δράση του τσαγιού**

#### **3.3.1. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράση των πολυφαινολών του τσαγιού**

Τα στάδια της έναρξης, της προαγωγής και της μετεξέλιξης της καρκινογένεσης επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων, όπως ο μεταβολισμός, η διατροφή και το

εξωτερικό περιβάλλον. Η συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα κύτταρα και η εξ αυτής προκύπτουσες τροποποιήσεις στα ένζυμα, τη δομή του DNA και τους μηχανισμούς άμυνας επιδρά άμεσα στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς πρόκλησης καρκίνου (Dufresne & Farnworth, 2001). Τα αντιοξειδωτικά της διατροφής, όπως οι πολυφαινόλες του τσαγιού φαίνεται ότι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην πρόληψη και τον έλεγχο της καρκινογένεσης. Ο ρόλος αυτός έγκειται κυρίως στους εξής μηχανισμούς: 1) Αντιοξειδωτική δράση και δέσμευση των ελευθέρων ριζών. 2) Δέσμευση των ενεργοποιημένων μεταβολιτών των καρκινογόνων ουσιών. 3) Επίδραση στα ένζυμα απομάκρυνσης καρκινογόνων ουσιών (detoxification enzymes). 4) Πρόληψη των μηχανισμών μετάλλαξης και 5) Αναστολή των πρώτου σταδίου των μηχανισμών ογκογένεσης (Ahmad & Mukhtar, 1999). Για τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού στην καρκινογένεση έχουν διεξαχθεί αρκετές *in vitro* μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες καθώς και *in vivo* έρευνες σε πειραματόζωα. Τα μειονεκτήματα των *in vitro* μελετών είναι ότι δε λαμβάνουν υπόψη όλα τα πολύπλοκα αλληλεπιδρώντα συστήματα του οργανισμού, ενώ σε κάποιες από αυτές χρησιμοποιούνται μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινολών (Lambert & Yang, 2003).

Κατά το στάδιο έναρξης της καρκινογένεσης, τα προκαρκινογόνα, τα οποία ενεργοποιούνται από τα ένζυμα φάσης I, όπως αυτά του κυτοχρώματος P450, είναι ικανά να τροποποιήσουν το γονιδιακό DNA και να προκαλέσουν ογκογένεση (Dufresne & Farnworth, 2001). Τα φλαβονοειδή έχειδειχθεί ότι δρουν άμεσα εξουδετερώνοντας τις προκαρκινογόνες ουσίες, εξαιτίας της ισχυρής τάσης να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες πριν λάβει χώρα καταστροφή του κυττάρου. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού αναστέλλουν το σχηματισμό τόσο των νιτροσαμίνων, καρκινογόνων ουσιών του καπνού των τσιγάρων, όσο και των ετροκυκλικών αμίνων, ουσιών που παράγονται κατά το μαγείρεμα του κρέατος, ενώ εμφανίζουν δράσεις εξουδετέρωσης και άλλων χημικών μεταλλαξιγόνων (Weisburger, 1999; Dufresne & Farnworth, 2001). Κατά τα στάδια της καρκινογένεσης οι πολλαπλές οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα και βασίζονται ιδίως στις υδροξυλικές ρίζες, επηρεάζουν τους μηχανισμούς απόπτωσης, τις ενζυμικές δραστηριότητες και τη δράση των καρκινογόνων ουσιών. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των πολυφαινολών του τσαγιού και κυρίως της EGCG φαίνεται ότι αποτρέπει αυτές τις διαδικασίες και απωθεί την εξέλιξη των σταδίων εμφάνισης καρκίνου. Επίσης, η EGCG έχειδειχθεί *in vitro* ότι απενεργοποιεί τις προκαρκινογόνες ουσίες, αφενός



μεν αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων φάσης I που τις παράγουν, αφετέρου δε αυξάνοντας τη δράση των ενζύμων φάσης II που τις απενεργοποιούν (Weisburger, 1999; Dufresne & Farnworth, 2001; Lambert & Yang, 2003). Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού ίσως ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων των ενζύμων φάσης II επηρεάζοντας τα εις τα ένζυμα αυτά περιεχόμενα AREs, μέσω της ενεργοποίησης κάποιων εκ των πρωτεϊνικών κινασών MAPK και των γονιδίων *c-jun*, *c-fos* (Ahmad & Mukhtar, 1999).

Κατά το στάδιο της προαγωγής της καρκινογένεσης, διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες και ενζυμικά συστήματα διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού EGCG και θειοφλαβίνη μπλοκάρουν τον παράγοντα AP-1 (Activator Protein-1), αναστέλλοντας τις μιτωτικές διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Ahmad & Mukhtar, 1999; Dufresne & Farnworth, 2001). Το γαλλικό οξύ, η EGCG και η EGC έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν την έκφραση της συνθάσης του NO, το οποίο εμφανίζει σημαντική εμπλοκή στους μηχανισμούς φλεγμονής και καρκινογένεσης. Η εκ των κατεχινών προκύπτουσα μειωμένη παραγωγή NO και η αναστολή του TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) συνδέονται με την αποτροπή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nuclear Factor kB (NF-kB). Η αυξημένη δραστηριότητα των παραγόντων AP-1 και NF-kB, η οποία οδηγεί εις την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών (MAPK) και της κινάσης της τυροσίνης. Οι κατεχίνες θεωρείται πιθανό ότι αναστέλλουν τη δραστηριότητα της κινάσης της τυροσίνης, μειώνουν την έκφραση του mRNA του γονιδίου *c-jun* και αναστέλλουν την ενεργοποίηση της MAP κινάσης JNK1, ενώ μερικές μελέτες αναφέρουν επίδραση και στην κινάση ERK1/2 (Ahmad & Mukhtar, 1999; Dufresne & Farnworth, 2001; Lambert & Yang, 2003). Επιπρόσθετα, κάποιες κατεχίνες έχουν μελετηθεί ως προς την δράση τους επί της αναστολής του ενζύμου τελομεράση, με συνέπεια τη μείωση του χρόνου ζωής των καρκινικών κυττάρων (Dufresne & Farnworth, 2001).

Κατά το στάδιο της εξέλιξης του καρκίνου έχει μελετηθεί αρκετά η επίδραση των πολυφαινολών επί των κυτταρικών κύκλων S και G1, επί των αυξητικών παραγόντων και επί της διαδικασίας της απόπτωσης. Οι αυξητικοί παράγοντες PDGF (Platelet Derived Growth Factor) και EGF (Endothelial Growth Factor) υπερεκφράζονται κατά την καρκινογένεση και οδηγούν στον άκραιο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού μπλοκάρουν τους παράγοντες αυτούς μέσω

της αναστολής της δραστηριότητας κάποιων κινασών, με συνέπεια την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την προαγωγή της απόπτωσης. Η απόπτωση αποτελεί ένα βασικό ομοιοστατικό μηχανισμό των κυττάρων. Κατά την καρκινογένεση, παράγοντες που αποτρέπουν την απόπτωση οδηγούν στην παραμονή και συνεπώς τον περεταίρω πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Οι πολυφαινόλες έχει δειχθεί ότι προωθούν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω της αύξησης της έκφρασης των γονιδίων *c-fos* και *c-myc*. Τέλος, η αναστολή του ενζύμου ουροκινάση από τις κατεχίνες έχει συνδεθεί με τη μείωση του ρυθμού μετάστασης σε διάφορους καρκίνους (Ahmad & Mukhtar, 1999; Dufresne & Farnworth, 2001; Lambert & Yang, 2003).

### **3.3.2. Επίδραση του τσαγιού σε διάφορους τύπους καρκίνου**

Εκτός από τις *in vitro* και *in vivo* μελέτες, αρκετές επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων ετών εξετάζουν τη συσχέτιση της κατανάλωσης τσαγιού με διάφορους τύπους καρκίνων. Προοπτική μελέτη δεκαετούς διάρκειας σε 8.500 άτομα της Ιαπωνίας έδειξε ότι οι εθελοντές που κατανάλωναν 10 φλιτζάνια τσάι ημερησίως εμφάνιζαν 3 χρόνια αργότερα καρκίνο, σε σχέση με αυτούς που κατανάλωναν 3 φλιτζάνια (Fujiki et al, 1997). Άλλες μελέτες ασθενών μαρτύρων παρατήρησαν ότι η αυξημένη κατανάλωση τσαγιού σχετιζόταν με μειωμένο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Lambert & Yang, 2003; Khan & Mukhtar, 2007). Οι τύποι καρκίνων που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι ο καρκίνος του στομάχου, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του δέρματος, του ήπατος, του προστάτη και του στήθους, ενώ οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε χώρες της Ασίας, όπου η κατανάλωση τσαγιού είναι μεγαλύτερη (Khan & Mukhtar, 2007).

Η επίδραση του τσαγιού στις μορφές καρκίνου του γαστρεντερικού σωλήνος έχει μελετηθεί κυρίως σε ζώα, αλλά και σε ανθρώπους. Έχει δειχθεί σε χάμστερς ότι η χορήγηση πράσινου τσαγιού περιεκτικότητας 1,5% σε πολυφαινόλες απέτρεψε την εκχημικών ουσιών προκληθείσα εξέλιξη του καρκίνου του στόματος, ενώ μείωσε τα επίπεδα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF (Khan & Mukhtar, 2007). Η χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης πολυφαινολών τσαγιού σε ποντίκια οδήγησε σε κάποιες περιπτώσεις στη μείωση του αριθμού και του μεγέθους των όγκων στον οισοφάγο, ενώ ανέστειλε την καρκινογένεση στο παχύ έντερο, συνοδευόμενη από μείωση των επιπέδων των nuclear-b-catenin, *c-myc*, και phospho-Act (Dufresne & Farnworth, 2001; Khan & Mukhtar, 2007). Προοπτικές μελέτες στην Ιαπωνία έχουν

δείξει ότι η κατανάλωση άνω των 10 φλιτζανιών τσαγιού συνδέεται με μείωση του κινδύνου για καρκίνο του στομάχου, ενώ πειράματα με ζώα έδειξαν αναστολή της καρκινογένεσης στο στομάχι παρουσία EGCG (Das, Takuria & Kanodia, 2008). Στο παχύ έντερο ποντικών που ελάμβαναν την καρκινογόνο ουσία αζομεθάνη η χορήγηση κατεχινών περιόρισε την ογκογένεση, ενώ η συνεργηστική δράση τους με το φυτικό οξύ ανέστειλε την εκ των ετεροκυκλικών αμινών προκύπτουσα καρκινογένεση. Η δέσμευση των ελευθέρων ριζών και των λιπιδικών υδρουπεροξειδίων και η μείωση της προσταγαδαλίνης E2 στα κύτταρα του παχέος εντέρου προβάλλει ως ο πιθανότερος μηχανισμός δράσης του τσαγιού κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου (Khan & Mukhtar, 2007; Das, Takuria & Kanodia, 2008). Η αντιμικροβιακή δράση του τσαγιού έναντι βλαπτικών μικροοργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και άλλα παθογόνα βακτήρια, φαίνεται ότι συμβάλλει στην πρόληψη των καρκίνων αυτού του τύπου και στη διατήρηση της φυσιολογικής ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδος (Dufresne & Farnworth, 2001; Ishihara et al, 2001).

Άλλες μορφές καρκίνου επί της ανάπτυξης των οποίων έχει μελετηθεί η επίδραση του τσαγιού είναι ο καρκίνος του ήπατος, του πνεύμονα και του δέρματος. Η χορήγηση εκχυλισμάτων τσαγιού σε αρουραίους έχει δείχθει ότι μείωσε σε μεγάλο βαθμό τους όγκους στο ήπαρ, ενώ προοπτικές μελέτες σε αλκοολικούς έχουν συμπεράνει σημαντική μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος μετά την κατανάλωση τσαγιού (Crespy & Williamson, 2004; Khan & Mukhtar, 2007). Ελπιδοφόρα, αν και μη διαπιστωμένα σε κλινικές μελέτες, είναι τα αποτελέσματα της διερεύνησης του ρόλου των πολυφαινόλων στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα σε πειραματόζωα. Η εκ του βενζοπυρενίου και άλλων χημικών ουσιών προκληθείσα καρκινογένεση εις τους πνεύμονες τρωκτικών φαίνεται να αναστέλλεται παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τσαγιού, ενώ θετικά στοιχεία έχουν δείξει και κάποιες επιδημιολογικές μελέτες (Crespy & Williamson, 2004; Khan & Mukhtar, 2007; Das, Takuria & Kanodia, 2008). Τέλος, οι πολυφαινόλες δύναται να εμποδίσουν την ανάπτυξη του καρκίνου του δέρματος μειώνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών και των ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων και εξουδετερώνοντας τις εκ της ακτινοβολίας και άλλων παραγόντων πρόκλησης καρκίνου του δέρματος παραγόμενες δραστικές μορφές οξυγόνου (Hsu, 2005).

### 3.4. Άλλες βιολογικές δράσεις του τσαγιού

Η αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού και η πιθανή επίδραση του σε γονίδια, μεταγραφικούς παράγοντες και μεταβολικά μονοπάτια δύναται να συνδέονται με τις ευεργετικές ιδιότητες που εμφανίζει εντός του οργανισμού. Σημαντικές βιολογικές δράσεις του τσαγιού έχουν μελετηθεί εκτενώς με έμφαση στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών και στην ανασταλτική εμπλοκή στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης τους. Εκτός από το ρόλο του τσαγιού στον καρκίνο, που αναπτύχθηκε παραπάνω και στις καρδιαγγειακές παθήσεις, που παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 5, αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί με στόχο την αξιολόγηση του ρόλου του και σε άλλες ασθένειες. Τέτοιες είναι η παχυσαρκία, οι νευρολογικές παθήσεις, ο διαβήτης, τα προβλήματα των οστών και οι παθήσεις των δοντιών.

Η παχυσαρκία αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα της σύγχρονης κοινωνίας, του οποίου η επιτακτική αντιμετώπιση έχει οδηγήσει στην διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων διατροφικών παραγόντων. Το τσάι έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια για τη δράση του στον έλεγχο του βάρους μέσω της διενέργειας τόσο πειραμάτων με ζώα, όσο και επιδημιολογικών μελετών. Αν και έχουν προκύψει κάποια ενδιαφέροντα συμπεράσματα, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Οι Ito et al (2008) παρατήρησαν τόσο σε παχύσαρκους, όσο και σε φυσιολογικού βάρους αρουραίους ότι η χορήγηση 0,5% κατεχινών μείωσε τη συσσώρευση λίπους στους ιστούς και περιόρισε τα επίπεδα της χοληστερόλης και των χολικών οξέων στον ορό, προτείνοντας πιθανή δράση των πολυφαινόλων στην απορρόφηση και το μεταβολισμό των λιπιδίων. Οι Shimotoyodome et al (2005) έδειξαν σε C57Bl/6J ποντίκια ότι η επί ένα μήνα ενίσχυση της διαίτας με εκχύλισμα τσαγιού σε συνδυασμό με άσκηση ενεργοποίησε τον καταβολισμό του λίπους στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες και εμπόδισε την εκ μιας λιπαρής διατροφής προκληθείσα παχυσαρκία. Οι μηχανισμοί επίδρασης του τσαγιού στην απώλεια βάρους που έχουν προταθεί αφορούν τη μείωση του πολλαπλασιασμού των λιποκυττάρων, την αναστολή της απορρόφησης του λίπους, την επίδραση επί της λεπτίνης καθώς και την αύξηση της θερμογένεσης (Wolfram et al, 2006). Μελέτες έχουν συμπεράνει ότι η επίδραση του τσαγιού στην οξείδωση του λίπους και τη θερμογένεση δύναται να οφείλεται τόσο στις κατεχίνες, όσο και στην καφεΐνη, με τη συνεργηστική δράση των οποίων προωθείται η εκ του συμπαθητικού συστήματος απελευθέρωση της ορμόνης νοραδρεναλίνης. Οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι

αναστέλλουν το ένζυμο κατεχολ-ο-μεθυλτρανσφεράση, που αποδομεί τη νοραδρεναλίνη, ενώ η καφεΐνη αναστέλλει τις φωσφοδιεστεράσες (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Wolfram, Wang & Thieleche, 2006; Khan & Mukhtar, 2007).

Οι νευρολογικές παθήσεις και η γήρανση σχετίζονται με επίταση του οξειδωτικού στρες και αύξηση των συγκεντρώσεων διαφόρων ιόντων στα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες και σε μοντέλα ζώων με νευρολογικές παθήσεις έχουν δείξει ότι οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις των πολυφαινολών του τσαγιού ενισχύουν την προστασία των νευρώνων του εγκεφάλου και αποτρέπουν τον κυτταρικό θάνατο. Η θειανίνη του τσαγιού έχειδειχθεί ότι δύναται να τροποποιεί τα επίπεδα σεροτονίνης και ντοπαμίνης βελτιώνοντας τις ικανότητες μνήμης και μάθησης, ενώ βελτιώνει τα επίπεδα των α-κυμάτων, ενός δείκτη χαλάρωσης και ορθής εγκεφαλικής λειτουργίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τσαγιού συνδέεται με τη βελτίωση των συμπτωμάτων νευρολογικών παθήσεων, όπως οι Alzheimer και Parkinson, κυρίως μέσω μηχανισμών δράσης στα κανάλια του ασβεστίου, το οξειδωτικό στρες και τον παράγοντα AGE (Advanced Glycation Endproducts) στους νευρώνες του εγκεφάλου (Weinberg et al, 2004; Khan & Mukhtar, 2007; Das, Takuria & Kanodia, 2008).

Ο διαβήτης τύπου II είναι μια ασθένεια που αφορά την αντίσταση των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη, με συνέπεια τον ανεπαρκή μεταβολισμό της γλυκόζης. Σε μοντέλα ζώων που προκλήθηκε διαβήτης με χημικές ουσίες (streptozotocin, alloxan) που καταστρέφουν τα β-κύτταρα του παγκρέατος και χορηγείτο μια δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες, οι κατεχίνες του τσαγιού οδήγησαν σε μείωση των επιπέδων της γλυκόζης και αύξηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης στον ορό (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Khan & Mukhtar, 2007). Οι Sabu et al (2002) έδειξαν ότι χορήγηση 100 mg/kg εκχυλίσματος τσαγιού περιόρισε τα υπεροξειδία και μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης κατά 17% στο αίμα διαβητικών αρουραίων. Εκτός από την αντιδιαβητική, έχει μελετηθεί και η αντισταμινική και αντιφλεγμονώδης δράση του τσαγιού σε διάφορους ιστούς. Το τσάι φαίνεται ότι αποτρέπει την εκ της ισταμίνης προκληθείσα φλεγμονώδη διαδικασία και εμπλέκεται στην αναστολή των αλλεργικών αντιδράσεων, μέσω της αναστολής της απελευθέρωσης της ισταμίνης και την απενεργοποίηση του ενζύμου της πρωτεϊνικής κινάσης. Επιπρόσθετα, οι κατεχίνες έχειδειχθεί ότι μειώνουν την επίπτωση της αρθρίτιδας μέσω επίδρασης στη δραστηριότητα των ενδοπεπτιδασών, ενώ επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση τσαγιού με αύξηση της οστικής πυκνότητας και βελτίωση της υγείας

των οστών και των δοντιών (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Khan & Mehta, 2007; Das, Takuria & Kanodia, 2008).

## **4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ**

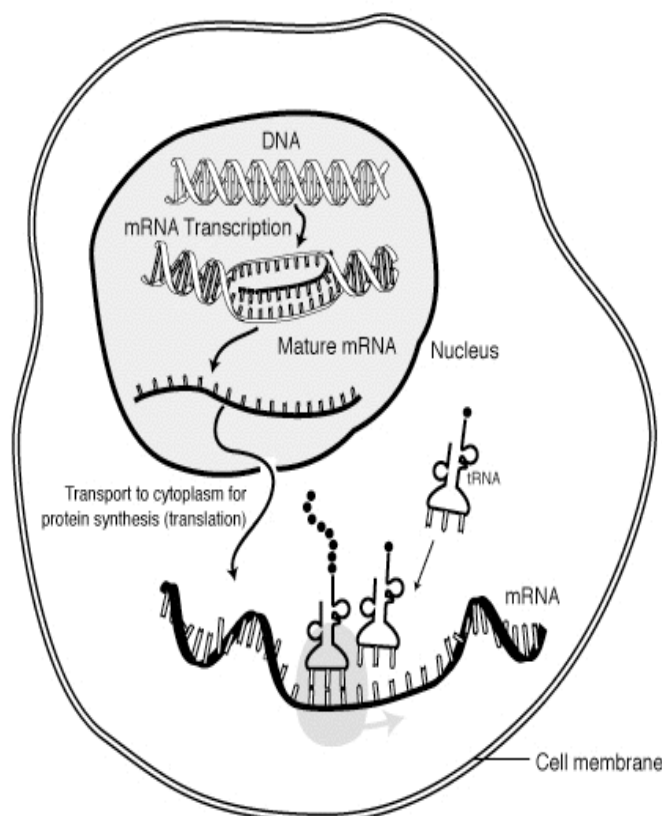
Τα τελευταία χρόνια, εκτός από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του τσαγιού, εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των συστατικών του σε γονίδια και μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου (Dreger et al, 2007; Li et al, 2007). Η επίδραση των πολυφαινόλων στη διαδικασία έκφρασης διαφόρων γονιδίων και στην μεταβολή της σύστασης των παραγόμενων πρωτεϊνών έχει αρχίσει να μελετάται στα πλαίσια ενός νέου ερευνητικού πεδίου γνωστό ως Πρωτεωμική (Proteomics). Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται ο κλάδος της Διατροφολογίας (Nutrigenomics) που ασχολείται με την επίδραση των διατροφικών συστατικών στο πρωτόμα του κυττάρου. Ο κλάδος αυτός διερευνά τις εκ των διατροφικών συστατικών ενεργοποιούμενες χημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα σε μοριακό επίπεδο και σχετίζονται με τη μεταγραφή και τη μετάφραση των γονιδίων, την παραγωγή των κυτταρικών πρωτεϊνών, την τροποποίηση των παραγόμενων πρωτεϊνών (φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) και τις διαφοροποιήσεις στα βιοχημικά και μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων του οργανισμού (Velazquez-Arellano & Encarnacion, 2008).

### **4.1. Διαδικασίες έκφρασης γονιδίων**

Εκτός της πλήρους κατανόησης των διαδικασιών της έκφρασης των γονιδίων, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί και προς την διερεύνηση των παραγόντων εκείνων, ενδογενών και εξωγενών, που ενδέχεται να τροποποιούν την έκφραση γονιδίων και να επηρεάζουν την τελική παραγωγή ενζύμων και πρωτεϊνών. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι και η διατροφή, της οποίας τα συστατικά δύναται να διαφοροποιούν βασικούς βιοδείκτες ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, μέσω της πολύπλοκης παρεμβολής τους στις διαδικασίες της μετάφρασης και της μεταγραφής και μέσω της εμπλοκής τους στα πολύπλοκα βιοχημικά μονοπάτια του κυττάρου (Velazquez-Arellano & Encarnacion, 2008).

Με τον όρο έκφραση γονιδίου εννοούμε τη διαδικασία με την οποία η πληροφορία που κωδικοποιεί ένα γονίδιο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ενός λειτουργικού προϊόντος, που είναι συνήθως μια πρωτεΐνη. Η έκφραση του γονιδίου περιλαμβάνει 3 βασικά βήματα, τη μεταγραφή, τη μετάφραση και την τροποποίηση της παραγόμενης

πρωτεΐνης. Η μεταγραφή (transcription) είναι η διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα του κυττάρου και κατά την οποία το ένζυμο RNA πολυμεράση αντιγράφει ένα τμήμα του DNA (γονίδιο) παράγοντας ένα συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο RNA (παράγεται με κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ ), γνωστό ως mRNA. Το mRNA (messenger RNA) μεταφέρει τη γενετική πληροφορία που κωδικοποιείται από το συγκεκριμένο γονίδιο και αφορά τη σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Κατά την πολύπλοκη φάση της μετάφρασης το mRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, συγκεκριμένα στα ριβοσωμάτια, όπου συνδέεται με το tRNA (transfer RNA), το οποίο μεταφέρει αμινοξέα. Έτσι αρχίζει μια πολύπλοκη διαδικασία παραγωγής πρωτεϊνών στα ριβοσωμάτια, η οποία ακολουθείται από διαδικασίες τροποποίησης μέχρι την επίτευξη της τελικής μορφής των πρωτεϊνών. Ο μηχανισμός έκφρασης των γονιδίων φαίνεται συνοπτικά στο Σχήμα 4.1. ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).



**Σχήμα 4.1.** Μηχανισμός έκφρασης γονιδίων εντός του κυττάρου (μεταγραφή-μετάφραση) (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:MRNA-interaction.png>).



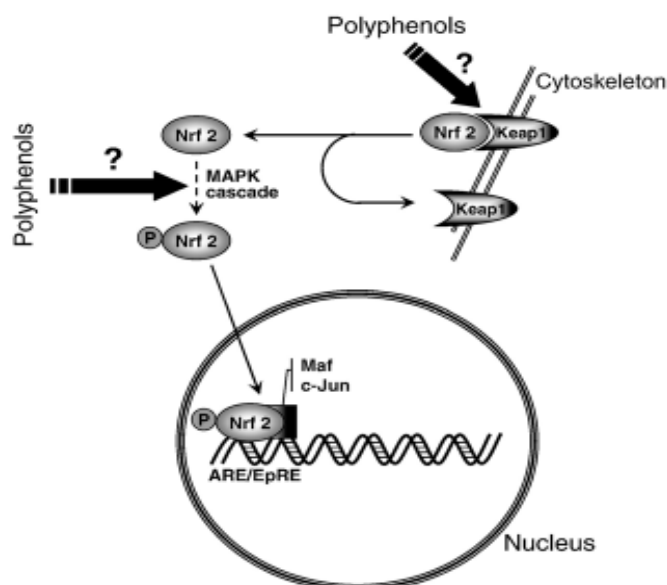
## **4.2. Επίδραση του τσαγιού στην έκφραση γονιδίων και εμπλοκή του σε σχετικά μεταβολικά μονοπάτια**

### **4.2.1. Επίδραση του τσαγιού σε γονίδια σχετιζόμενα με το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα**

Μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες που απομονώνονται από αφεψήματα τσαγιού δύνανται να αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων των αντιοξειδωτικών ενζύμων NADPH οξειδάση, οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase) και καταλάσης (catalase) (Masella et al, 2005; Oak, El Bedoui & Schini-Kerth, 2005). Οι Al-Awwadi et al (2005) και οι Delbosc et al (2005) έδειξαν ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων πλούσιων σε πολυφαινόλες σε αρουραίους οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου και σε ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης στην καρδιά και την αορτή, ενώ σχετίστηκε με μειωμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι Li et al (2007) παρατήρησαν με χρήση PCR σε πειραματόζωα δροσόφιλας ότι χορήγηση εκχυλίσματος τσαγιού συγκέντρωσης 10 mg πολυφαινόλες/ml οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης, με συνέπεια την ενίσχυση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος των κυττάρων. Σε ποντίκια που διατρέφονταν με 2,5% εκχύλισμα πράσινου τσαγιού παρατηρήθηκε ενίσχυση της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης και των ενζύμων φάσης II στο ήπαρ, ενώ αυξήθηκε η έκφραση της καταλάσης στην αορτή (Khan & Muchtar, 2007). Αντίθετα, οι Dreger et al (2007) παρατήρησαν σε καρδιακά κύτταρα ότι η EGCG δεν επέδρασε εις την έκφραση των γονιδίων της καταλάσης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, παρά μόνο στο γονίδιο της heme oxygenase (HO-1).

Επίσης, οι πολυφαινόλες του τσαγιού έχει δειχθεί ότι δύνανται να αλλάξουν την έκφραση των γονιδίων των εκ του ARE (Antioxidant-responsible enzyme) ρυθμιζόμενων ενζύμων φάσης II, τα οποία σχετίζονται με τον καρκίνο (Ahmad & Mukhtar, 1999). Η μεταγραφική ενεργοποίηση των ενζύμων φάσης II, αλλά και των αντιοξειδωτικών ενζύμων οξειδοοδουκτάση, GCS, GR, GPx σχετίζεται άμεσα με τα στοιχεία AREs, τα οποία έχουν cis δομή και βρίσκονται εις την προωθητική πλευρά των γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή αυτών των ενζύμων. Τα AREs φαίνεται ότι έχουν ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση του αμυντικού συστήματος του

κυττάρου, ρυθμιζόμενα από παράγοντες όπως οι Nrf1, Nrf2 και MAPK. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2, οι πολυφαινόλες έχει δειχθεί ότι ενισχύουν το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα ενεργοποιώντας τα AREs, μέσω τροποποίησης του εκ του Keap1 ρυθμιζόμενου παράγοντα Nrf2 και μέσω επίδρασης σε σουλφιδρυλικές ομάδες (Masella et al, 2005). Οι κατεχίνες του τσαγιού έχει παρατηρηθεί ότι προωθούν την ενεργοποίηση των AREs και μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών ERK, JNK και p38, με συνέπεια την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων του αμυντικού συστήματος και την ενίσχυση της απόπτωσης στην περίπτωση καρκινικών κυττάρων (Chen et al, 2000; Frei & Higdon, 2003).



**Σχήμα 4.2.** Μηχανισμός ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής δράσης των ενδογενών κυτταρικών ενζύμων, μέσω επίδρασης στα γονίδια (Masella et al.,2005).

#### 4.2.2. Επίδραση του τσαγιού σε γονίδια σχετιζόμενα με τον καρκίνο και την αθηρωμάτωση

Αν και σε κάποιες περιπτώσεις η ενεργοποίηση των κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) έχει ευεργετικό ρόλο, μελέτες έχουν δείξει ότι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της αθηροσκλήρυνσης και του καρκίνου συνοδεύονται με ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPK κινασών (Yin et al, 1997; Ahmad & Mukhtar, 1999). Το μονοπάτι των MAPK κινασών αποτελείται από σερίνη και θρεονίνη και διαδραματίζει σπουδαιότατο ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων, την απόπτωση και τη ρύθμιση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Οι βασικότερες εξ αυτών είναι οι ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase 1/2), η JNK (C-jun-N-Terminal kinase) και η p38 (Ahmad & Mukhtar, 1999; Lambert & Yang, 2003;

Pandya, Santani & Jain, 2005). Το γονίδιο *mark-1*, που κωδικοποιεί την παραγωγή των ERK κινασών, εμπλέκεται σε πληθώρα βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, του προστάτη και του παγκρέατος, την αθηρωμάτωση και τα νευρικά κύτταρα. Φωσφορυλιώνει το γονίδιο *rax* και αντιδρά με πολλά άλλα όπως τα *Rsk2* και *PTP-S1*, ενώ υπεισέρχεται σε μεταβολικά μονοπάτια όπως αυτά των VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και PDG-b (Platelet Derived Growth Factor-b) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>). Οι MAPK κινάσες είναι ευαίσθητες στο οξειδωτικό στρες και δύναται να ενεργοποιηθούν υπό διάφορες παθολογικές συνθήκες, όπως η έκθεση του κυττάρου σε υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών. Στα λεία μυϊκά κύτταρα των αρτηριών, ουσίες όπως τα υδροϋπεροξειδία, η ενδοθελίνη και η αγγειοτενσίνη ενεργοποιούν τις MAPK, οι οποίες ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, προωθούν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και επιτείνουν τις αθηρωματικές διαδικασίες (Pandya, Santani & Jain, 2005). Κατά την καρκινογένεση, η ενεργοποίηση των MAPK προωθεί την παραγωγή των παραγόντων AP-1 και NF-kB (Nuclear Factor kB). Η παραγωγή του NF-kB είναι αποτέλεσμα της εκ του αυξημένου NO υπερπαραγωγής ελευθέρων ριζών (Ahmad & Mukhtar, 1999; Lambert & Yang, 2003). Οι κατεχίνες έχει δειχθεί ότι αφενός μεν αλλάζουν την έκφραση της συνθάσης του NO, αναστέλλοντας τον NF-kB, αφετέρου δε αναστέλλουν την ενεργοποίηση των MAP κινασών, αποτρέποντας την ενεργοποίηση αυξητικών και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την καρκινογένεση και την αθηρωμάτωση (Ahmad & Mukhtar, 1999; Lambert & Yang, 2003; Pandya, Santani & Jain, 2005).

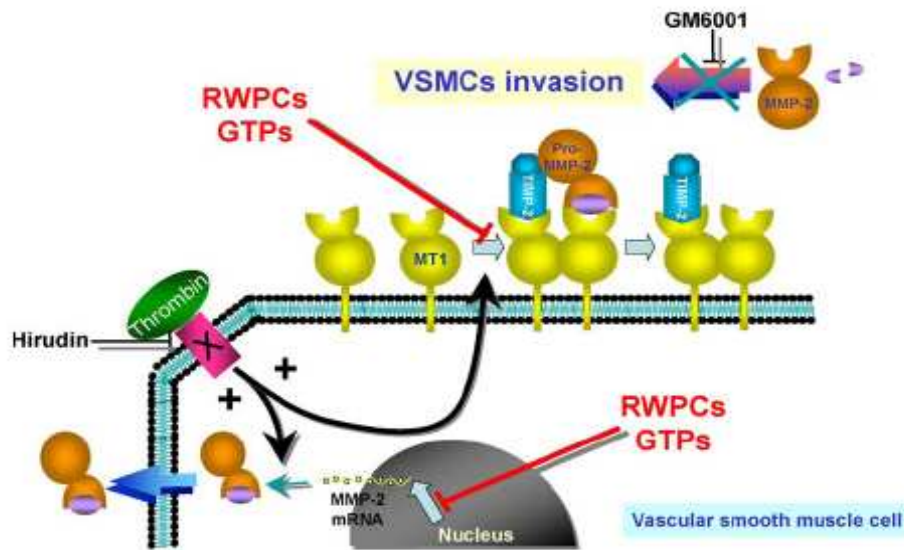
Τα γονίδια *c-jun* (ή AP-1) και *c-fos* έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και την αθηροσκλήρυνση, ιδίως μέσω της εμπλοκής του στο μεταβολικό μονοπάτι των MAPK κινασών, δεδομένης της φωσφορυλίωσης τους εκ της κινάσης JNK-1. Μελέτες δείχνουν ότι εκχυλίσματα βοτάνων, όπως το εκχύλισμα του αρωματικού φυτού *Magnolia sp.*, αποτρέπουν την ενεργοποίηση του γονιδίου *c-jun*. Το γονίδιο *c-myc* κωδικοποιεί πολυπαραγοντικού ρόλου πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και των κυτταρικό μετασχηματισμό, λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας σε άλλα γονίδια, οι μεταλλαγές και η υπερέκφραση του σχετίζονται με αιματολογικά προβλήματα, όγκους, λευχαιμίες και λεμφώματα, ενώ εμπλέκεται σε μεταβολικά μονοπάτια σχετιζόμενα με τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση, όπως το MAPK και το TGF-b (Transforming Growth Factor)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>). Τα γονίδια *c-fos*, *c-jun* και *c-myc* εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα και διαφοροποιήσεις στην έκφραση τους σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου (Yu et al, 1997). Πρόκειται για γονίδια κατά κύριο λόγο υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, που βρίσκονται στις αρτηρίες, την αορτή και την καρδιά. Μελέτη έδειξε ότι η επώαση των λείων μυϊκών κυττάρων με EGC οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων *c-jun*, *ERK1*, *ERK2*, αναστολή της ενεργοποίησης του μονοπατιού JNK1 και αναστολή της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης (protein tyrosine kinase), με συνέπεια τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Lu, Lee & Huang, 1998). Οι Yu et al (1997) έδειξαν με PCR σε ηπατικά κύτταρα ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού δύναται να επιδράσουν στα γονίδια *c-fos* και *c-jun* μέσω ενεργοποίησης των μεταβολικών μονοπατιών των πρωτεϊνικών κινάσων της κατηγορίας MAPK (p38, ERK2 και JNK1). Οι πολυφαινόλες του τσαγιού φαίνεται ότι ενεργοποιούν συγκεκριμένα μονοπάτια κινάσων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η κινάση p38, η 1/2 ERK1/2 και η PI3-Kinase/Akt μέσω της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης (Stoclet, Chataigneu & Ndiaye, 2004). Οι Ahn et al (1999) έδειξαν με western blot analysis σε λεία μυϊκά κύτταρα αορτής αρουραίων ότι η επίδραση του αυξητικού παράγοντα PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor) στην έκφραση του mRNA των γονιδίων *c-fos* και *erg-1* και στη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup> αναστάλη παρουσία 1-100 μM EGCG. Η EGCG φαίνεται ότι έδρασε ως αναστολέας της τυροσίνης, δείχνοντας ότι οι κατεχίνες του τσαγιού εμφανίζουν εκτός από αντιοξειδωτική δράση και δράση σε μεταβολικά μονοπάτια σχετιζόμενα με τον καρκίνο και την αθηρωμάτωση. Σε άλλη μελέτη, 30 μmol/L EGCG μείωσαν την έκφραση του γονιδίου *c-jun* και την ενεργοποίηση του παράγοντα AP-1 σε κύτταρα αορτής ποντικών στα οποία προστέθηκε ο παράγοντας TNF-α (Tumor Necrosis Factor) (Chyu et al, 2004). Οι Kaul, Sikand & Shukla (2004) συμπέραναν με χρήση RT-PCR ότι η επίδραση των πολυφαινολών του τσαγιού στην αθηροσκλήρυνση δύναται να εστιαστεί και στην μείωση της έκφρασης γονιδίων, όπως το *c-myc*.

Το γονίδιο του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) είναι μέλος της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων PDGF/VEGF. Δρα εις τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως μιτογόνο, προκαλώντας αγγειογένεση, ανάπτυξη του ενδοθηλίου, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των κυττάρων, αναστολή των μηχανισμών απόπτωσης τους κ.α. Σχετίζεται με την αθηρωμάτωση, τον καρκίνο και τα μονοπάτια

των κυτταροκινών (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db>). Ο παράγοντας VEGF διαδραματίζει σπουδαιότατο ρόλο εις τις διαδικασίες ενεργοποίησης του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Ο αυξητικός παράγοντας PDGF ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες p38 MAPK, ERK1/2, JNK και PI3-kinase/Akt, οι οποίες υπερρυθμίζουν τον VEGF. Αυτό έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης και προθρομβογόνων παραγόντων, όπως ο tPA (tissue Plasminogen Activator) και την υπερέκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με αυτούς τους παράγοντες, με συνέπεια την πυροδότηση της έναρξης των αθηρογόνων διαδικασιών στην αορτή. Οι κατεχίνες του τσαγιού και ειδικότερα η EGCG φαίνεται ότι δρουν προς την κατεύθυνση της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου VEGF, μέσω της αναστολής των σχετιζόμενων με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα μονοπατιών και μέσω της ενεργοποίησης των μεταβολικών μονοπατιών stat3 και NF-kB, αλλά όχι των μονοπατιών ERK1/2 Akt (Oak, El Bedoui & Schini-Kerth, 2005).

Το γονίδιο της MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2) εκφράζεται σε πολλά κύτταρα με κυριότερα τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους φιμπροβλάστες (fibroblasts) και σχετίζεται με την αθηρωμάτωση (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι ενδοπεπτιδάσες που συνεισφέρουν στην οργάνωση του αρτηριακού τοιχώματος και κατά την αθηροσκλήρυνση έχουν δομικό ρόλο εντός της αθηρωματικής πλάκας. Η MMP-2 είναι μια κολλαγενάση που προωθεί τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ η MT1-MMP προωθεί τη μετατροπή της MMP-2 σε MMP (Oak, El Bedoui & Schini-Kerth, 2005). Σε λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινης αορτής ευρέθη με PCR ότι οι κατεχίνες αλλάζουν την έκφραση του mRNA του γονιδίου της MMP-2 (El Bedoui et al, 2005). Οι πολυφαινόλες του τσαγιού και του κρασιού φαίνεται ότι αποτρέπουν τη δράση της MT1-MMP και αλλάζουν την έκφραση του γονιδίου της MMP-2. Στο Σχήμα 4.3 φαίνεται ο μηχανισμός δράσης πολυφαινολών που απομονώθηκαν από το τσάι στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η θρομβίνη ενεργοποιεί την έκφραση της pro-MMP-2 και τη δραστηριότητα της MT1-MMP με συνέπεια το σχηματισμό της ενεργής MMP-2 και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την έκφραση της MMP-2 και τη μετατροπή της pro-MMP-2 σε ενεργή MMP-2, μέσω άμεσης αναστολής της δραστηριότητας της MT1-MMP (Oak, El Bedoui & Schini-Kerth, 2005).



**Σχήμα 4.3.** Μηχανισμός αναστολής της έκφρασης του γονιδίου της MMP-2 και της δραστηριότητας της MT1-MMP από τις πολυφαινόλες του κρασιού (RWPCs) και του τσαγιού (GTPs) στα λεία μυϊκά κύτταρα (Oak, El Bedoui & Schini-Kerth, 2005).

Η αγγειογένεση αφορά τη διαδικασία σχηματισμού πολλών μικρών αγγείων στα κύτταρα και τους ιστούς του οργανισμού. Όταν αυτή λαμβάνει χώρα στην σχηματισθείσα αθηρωματική πλάκα των αρτηριών, τότε η πλάκα τροφοδοτείται ευκολότερα με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, με συνέπεια την επίταση της αθηρωμάτωσης. Όταν η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα εντός καρκινικών όγκων, τότε επιταχύνεται η ογκογένεση (Dulak, 2005; Oak, El Bedoui & Schini-Kerth, 2005). Οι πολυφαινόλες του τσαγιού φαίνεται ότι αποτρέπουν την αγγειογένεση μέσω αλλαγής της έκφρασης κάποιων γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με διαφοροποιήσεις στη λειτουργία διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών. Η αποτροπή της αγγειογένεσης βασίζεται κυρίως στην αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων των *VEGF*, *MMP-2*, αλλά και των *b-FGF* (Fibroblast Growth Factor), *a-FGF*, *c-fos*, *c-jun* και *Ets-1* (Dulak, 2005). Οι κατεχίνες του τσαγιού προλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω αναστολής της έκφρασης της δομικής μεταλλοπρωτεϊνάσης τύπου 2 (matrix metalloproteinase-2-MMP-2) (Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

### **4.3. Μεθοδολογίες διερεύνησης της έκφρασης των γονιδίων**

Η σημασία της μελέτης του mRNA για την κατανόηση των μηχανισμών έκφρασης των γονιδίων και των παραγόντων που την επηρεάζουν έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων μεθόδων. Τα επίπεδα του mRNA μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά με τη μέθοδο «Northern Blotting», κατά την οποία το δείγμα RNA απομονώνεται σε πήκτωμα αγαρόζης και υβριδοποιείται με ένα ραδιοσημασμένο νουκλεοτιδικό τμήμα που είναι συμπληρωματικό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας. Η μέθοδος αυτή έχει τα μειονεκτήματα της χρήσης ραδιοενεργών διαλυμάτων και τα χαμηλής ποιότητας δεδομένα. Τα επίπεδα των αντιγράφων πολλών γονιδίων μπορούν να προσδιοριστούν και με την μεθοδολογία «DNA microarray Technology», όπως η τεχνική SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), η οποία παρέχει σχετική μέτρηση των κυτταρικών συγκεντρώσεων του RNA. Τα τελευταία χρόνια, όμως, η μέθοδος που είναι ευρέως διαδεδομένη για τον προσδιορισμό του RNA είναι η RT-PCR.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των παραγόμενων πρωτεϊνών η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η «western blot analysis», η οποία βασίζεται στην απομόνωση ενός τμήματος του ιστού σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και τη σύνδεση ενός αντισώματος στην προς μελέτη πρωτεΐνη. Το αντίσωμα συνδέεται με μια φθορίζουσα υπεροξειδάση ώστε να επιτρέπεται η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται σε ιστούς ζώων και η θεωρία της πρωτεωμικής, με στόχο την διερεύνηση πιθανών αλλαγών στο συνολικό πρωτέωμα του κυττάρου έπειτα από μία διατροφική παρέμβαση (Weinberg, Amit & Youdim, 2007).

#### **4.3.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η μέθοδος αυτή είναι μία βιοχημική τεχνική που στοχεύει στην απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος που μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA, ενώ δύναται να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση πολλών μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η γνωστή αλληλουχία χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό και τη σύνθεση δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Το ένα είναι

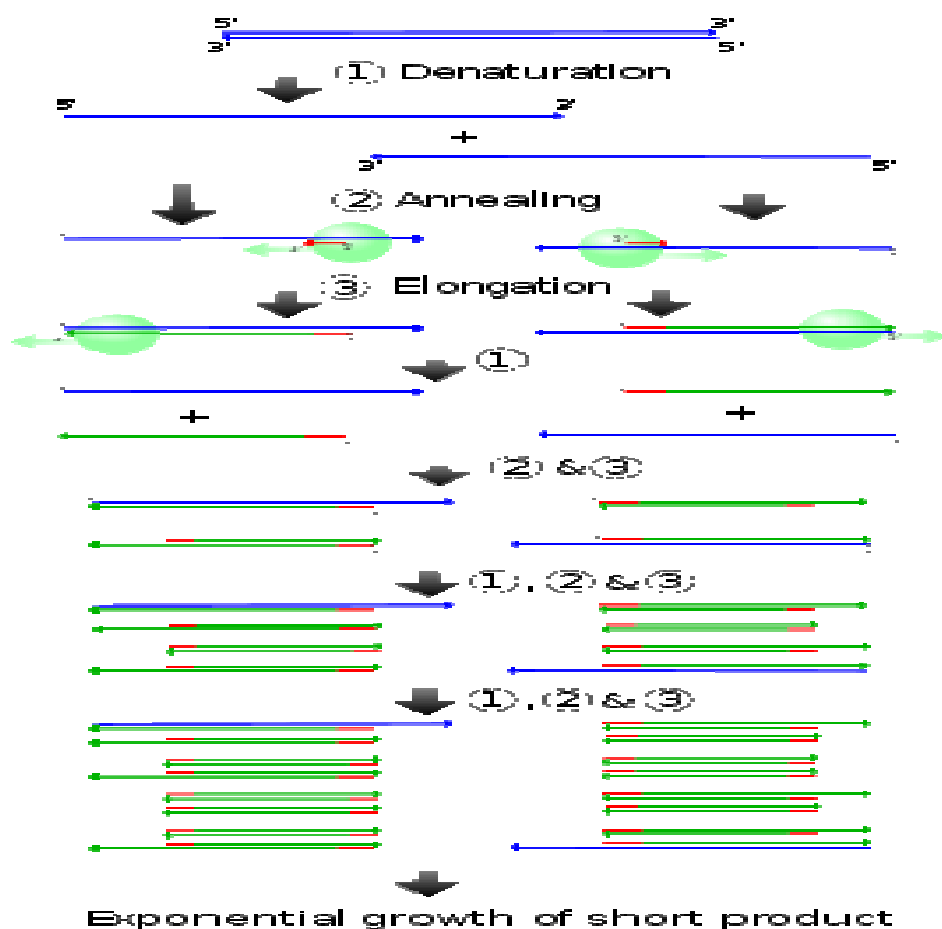
συμπληρωματικό ως προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας και το άλλο ως προς το 3' άκρο της άλλης. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χρησιμεύουν ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές, primers) για *in vitro* σύνθεση DNA που καταλύεται από μια DNA πολυμεράση, και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Αρχικά, περίσσεια των ολιγονουκλεοτιδίων, προστίθεται στο αποδιατεταγμένο (denatured) DNA το οποίο διατηρείται σε αυτή την κατάσταση στους 50-60 °C, ενώ η αποδιάταξη (denaturation) του DNA λαμβάνει χώρα στους 95°C. Το συνολικό δείγμα του χρωμοσωμικού DNA που βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση παραμένει αποδιατεταγμένο.

Υπάρχουν τρία κύρια στάδια σε έναν κύκλο PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται 30-40 φορές (Σχήμα 4.4). Η διαδικασία αυτή γίνεται σε ειδικό αυτόματο μηχάνημα το οποίο μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τους σωλήνες με το αντιδρών μίγμα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Κατά το πρώτο στάδιο (αποδιάταξη-denaturation στους 94°C) οι δίκλωνες αλυσίδες ανοίγουν και γίνονται μονόκλωνες. Όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις στη θερμοκρασία αυτή σταματούν. Κατά το δεύτερο στάδιο (αναδιάταξη-annealing στους 54°C) οι εκκινητές (primers) κινούνται άτακτα μέσα στο διάλυμα λόγω κίνησης Brown, ενώ ιονικοί δεσμοί σχηματίζονται και διασπώνται συνεχώς ανάμεσα στον μονόκλωνο εκκινητή και τη μονόκλωνη μήτρα. Οι πιο σταθεροί δεσμοί διαρκούν λίγο περισσότερο οπότε οι εκκινητές προσδένονται (υβριδοποιούνται) βάσει συμπληρωματικότητας στις σωστές θέσεις πάνω στο DNA. Μετά, προσδένεται η πολυμεράση και ξεκινά την αντιγραφή της μήτρας. Όσο προστίθενται νουκλεοτίδια στην συντιθέμενη αλυσίδα, τόσο περισσότερο ισχυροποιούνται οι ιοντικοί δεσμοί μεταξύ εκκινητή και μήτρας, οπότε στη θερμοκρασία αυτή ο διαχωρισμός τους είναι αδύνατος. Κατά το τρίτο στάδιο (επιμήκυνση-elongation στους 72°C) η πολυμεράση προσθέτει δεοξυνουκλεοτίδια με κατεύθυνση 5' → 3', «διαβάζοντας» ουσιαστικά τη μήτρα από το 3' άκρο με κατεύθυνση το 5' άκρο, ενώ οι βάσεις που προστίθενται είναι συμπληρωματικές των βάσεων που βρίσκονται στην αλυσίδα-μήτρα. Ουσιαστικά, οι εκκινητές χρησιμεύουν ως πλατφόρμα δράσης της DNA πολυμεράσης, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, για να είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες, και λέγεται Taq πολυμεράση. Τέλος, κατά το τέταρτο στάδιο η σύνθεση ολοκληρώνεται και προκειμένου να ξεκινήσει νέος κύκλος, ανεβαίνει η θερμοκρασία στους 95 °C οπότε οι διπλές αλυσίδες ανοίγουν.

Κάθε νέος κύκλος διπλασιάζει τις διπλές αλυσίδες του προηγούμενου. Επειδή και οι δύο αλυσίδες αντιγράφονται στην PCR, ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου



(δίκλωνο DNA) αυξάνει εκθετικά. Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος και έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα ([www.ivf.gr/developments](http://www.ivf.gr/developments)). Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από το ένζυμο ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR, reverse transcription PCR). Με τον τρόπο αυτό δύναται να εκτιμηθεί πιθανή αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου, μέσω του προσδιορισμού της τελικής ποσότητας του παραγόμενου συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA), το οποίο καθορίζει πιθανή τροποποίηση της ποσότητας του αρχικού mRNA. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR και της RT-PCR γίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide), το οποίο δεσμεύεται εντός του DNA και ανιχνεύεται με UV ακτινοβολία ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).



**Σχήμα 4.4.** Σχηματική παρουσίαση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. (1) Αποδιάταξη (Denaturing) στους 94–96 °C. (2) Αναδιάταξη (Annealing) στους ~65 °C. (3) Επιμήκυνση (Elongation) στους 72 °C. Οι μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν το DNA, οι κόκκινες τους εκκινήτες και οι πράσινες τα μικρότερα DNA, ενώ οι πράσινοι κύκλοι την πολυμεράση ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

#### **4.3.2. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης**

Η ηλεκτροφόρηση πήκτωμάτων είναι μία διαδικασία κατά την οποία μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και το RNA, δύναται να διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος τους και την ηλεκτρική δαπάνη, μετά την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού ρεύματος. Το ρεύμα αναγκάζει τα μόρια να κινούνται μέσω των πόρων του πηκτώματος πάνω σε ένα λεπτό στρώμα. Το πήκτωμα είναι έτσι δομημένο ώστε οι πόροι του να έχουν τις απαιτούμενες διαστάσεις για το διαχωρισμό των μορίων με μια συγκεκριμένη σειρά μεγεθών και μορφών. Η ηλεκτροφόρηση πήκτωμάτων αгарόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία ιδίως για το διαχωρισμό μορίων DNA ή RNA. Ο διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται με την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων νουκλεϊνικού οξέος μέσω μιας μήτρας αгарόζης εντός ενός ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα και μεταφέρονται σε μεγαλύτερη απόσταση από τα μεγαλύτερα. Το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς τον θετικό πόλο, ενώ με τη χρήση χρωστικής λαμβάνει χώρα η αντίχνευση αυτού ([www.molecularstation.com](http://www.molecularstation.com)).

#### **4.3.3. Πρωτεωμική ανάλυση**

Με τον όρο πρωτεωμική ανάλυση εννοούμε τη μελέτη και ταυτοποίηση των αλλαγών στο πρωτέωμα του κυττάρου. Το πρωτέωμα ενός κυττάρου παρέχει πληροφορίες σχετικά με το σύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών, υπό δεδομένες φυσιολογικές συνθήκες και σε συγκεκριμένο χρόνο. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα αποσαφήνισης βιοχημικών και φυσιολογικών μηχανισμών πολλών ασθενειών σε μοριακό επίπεδο. Οι πρωτεωμικές τεχνικές βασίζονται κυρίως στην ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων (two-dimensional gel electrophoresis, 2D-GE), κατά την οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) και το μοριακού τους βάρος. Η πρωτεωμική αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο με το οποίο δύναται να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται σε πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες προκύπτουσες εκ της επίδρασης των διατροφικών συστατικών. Ο μεταβολισμός των συστατικών των τροφίμων και η κατεύθυνσή τους εντός του σώματος μπορεί έμμεσα να μελετηθεί μέσω πιθανών αλλαγών στη σύνθεση των πρωτεϊνών του κυττάρου μετά από μία διατροφική παρέμβαση (Weinreb, Amit & Youdim, 2007).

Οι Weinberg et al (2007) εφάρμοσαν ένα συνδυασμό των μεθόδων PCR, Wester blotting και Proteomic analysis με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της EGCG σε

ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος (SH-SY5X). Με χρήση ηλεκτροφόρησης 2D-GE, φασματοσκοπίας μάζας και ειδικών χαρτών παρατήρησαν ότι η EGCG οδήγησε σε διαφοροποίηση του συνολικού πρωτεώματος και συγκεκριμένα διαφορές βρέθηκαν σε 60 πρωτεΐνες, οι οποίες προσδιορίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά. Οι διαφοροποιήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με western blotting σε συγκεκριμένα γονίδια, των οποίων η αλλαγή της έκφρασης του mRNA εδείχθη με χρήση RT-PCR.

## **5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ**

### **5.1. Εισαγωγή στις καρδιαγγειακές παθήσεις και τη στεφανιαία νόσο**

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι η σημαντικότερη αιτία θανάτου στους άνδρες 35-55 ετών και μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου στις γυναίκες στις χώρες του δυτικού κόσμου. Πρόκειται για πολυπαραγοντικής φύσεως νοσήματα που ο μόνος τρόπος να αντιμετωπιστούν επιτυχώς είναι να ληφθούν υπόψη όλοι οι παράγοντες κινδύνου αναπτύξεώς τους. Στα καρδιαγγειακά νοσήματα περιλαμβάνονται παθήσεις των στεφανιαίων και των αγγειακών αρτηριών καθώς επίσης και αρτηριών και φλεβών των ποδιών. Βασική αιτία της κλινικής εμφάνισης των καρδιαγγειακών παθήσεων είναι η αθηροσκλήρυνση των αρτηριών. Στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για το έτος 1998 έδειξαν ότι από τα καρδιαγγειακά νοσήματα στην Ελλάδα η στεφανιαία νόσος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τις ασθένειες του κυκλοφορικού συστήματος, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Ζαμπέλας, 2006).

#### **5.1.1. Παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων**

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων διακρίνονται σε τροποποιήσιμους (τρόπος ζωής, βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά) και σε μη τροποποιήσιμους (ηλικία, φύλο, ατομικό και οικογενειακό ιστορικό). Η διαίτα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων αφού επηρεάζει άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως τα λιπίδια, την αρτηριακή πίεση και το σωματικό βάρος. Το κάπνισμα αυξάνει σημαντικά την καρδιακή νοσηρότητα και θνησιμότητα, αφού έχει προταθεί ότι προκαλεί το 30% των θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα παγκοσμίως. Επιδημιολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η υπερβολική κατανάλωση οινοπνεύματος και ο καθιστικός τρόπος ζωής αυξάνουν τη συνολική καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Η μεμονωμένη συστολική υπέρταση θεωρείται επίσης ένας από τους βασικούς παράγοντες κινδύνου για την πρόκληση στεφανιαίας νόσου και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Πληθώρα μελετών καταδεικνύει ισχυρή θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ολικής και LDL (Low Density Lipoprotein) χοληστερόλης και στον κίνδυνο εμφάνισης

καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Επίσης, έχει δειχθεί ισχυρή αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα HDL (High Density Lipoprotein) χοληστερόλης και στον κίνδυνο εμφάνισης πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, η υπερινσουλιναιμία και η διαταραχή στην ανοχή της γλυκόζης είναι παράγοντες που προάγουν την αθηρωματική νόσο. Επιπλέον, ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με μια σημαντική αύξηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, της νόσου των εγκεφαλικών αγγείων και της περιφερειακής αγγειοπάθειας. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας κινδύνου είναι η παχυσαρκία, η οποία σχετίζεται με άλλους παράγοντες και δύναται να αυξήσει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Άλλοι παράγοντες κινδύνου που μελετώνται τελευταία είναι το οξειδωτικό στρες, η υπερομοκυστεϊναιμία, τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου, φλεγμονώδεις και λοιμώδεις παράγοντες (Πιτσαβός, Παναγιωτάκος & Στεφανιάδης, 2004; Ζαμπέλας, 2006).

### **5.1.2. Παθοφυσιολογία της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ)**

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί τη σοβαρότερη εκ των καρδιαγγειακών παθήσεων και είναι το κύριο αίτιο θνησιμότητας στην Ευρώπη, ευθυνόμενη για σχεδόν 2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως (Ζαμπέλας, 2006). Η στεφανιαία νόσος έχει ως βασική αιτία εμφάνισης την αθηροσκλήρυνση των στεφανιαίων αρτηριών της καρδιάς, αρτηριών με λειτουργικό ρόλο την αιμάτωση του μυοκαρδίου, και εκδηλώνεται κλινικά ως ανεπάρκεια ή ισχαιμία, στηθάγχη και έμφραγμα του μυοκαρδίου (Πλέσσας, 1994; Πλέσσας, 1998; Χανιώτης, 1998). Η στηθάγχη χαρακτηρίζεται από οπισθοστερνική δυσφορία που συνήθως εκδηλώνεται ως πόνος ή ως βάρος. Η σταθερή στηθάγχη χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ του προσφερόμενου οξυγόνου και των αναγκών του μυοκαρδίου σε οξυγόνο, χωρίς την παρουσία νέκρωσης του μυοκαρδίου. Η ασταθής στηθάγχη ή οξεία στεφανιαία ανεπάρκεια είναι μια κλινική κατάσταση που βρίσκεται στο όριο μεταξύ της σταθερής στηθάγχης και του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου αναφέρεται εις τη νέκρωση του μυοκαρδιακού ιστού λόγω ανεπαρκούς τροφοδοσίας του με αίμα (Χανιώτης, 1998).

Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί τη βασική αιτία εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Πρόκειται για παθολογο-ανατομική διεργασία κατά την οποία εμφανίζονται εστιακά στον έσω χιτώνα της αρτηρίας αθροίσεις από κύτταρα, λιπίδια, ινώδης ιστός,

σύμπλοκα πρωτεογλυκανών, ανόργανες ουσίες και προϊόντα αίματος. Καθώς εξελίσσεται η αθηροσκληρυντική αλλοίωση, εμφανίζεται στη βάση της νέκρωση, βλάβη στον έσω χιτώνα της αρτηρίας, εξέλκωση και θρόμβωση. Με την πάροδο του χρόνου η αρτηρία στενεύει συνεχώς και όταν συμβεί απόφραξη περίπου των 2/3 του αυλού της αυξάνεται ραγδαία η πιθανότητα δημιουργίας θρόμβου, απόφραξης της αρτηρίας και εκδήλωσης των κλινικών φαινομένων της στεφανιαίας νόσου (Πλέσσας, 1994; Πλέσσας, 1998; Χανιώτης, 1998; Dufresne & Farnworth, 2001).

Τα κυριότερα αίτια εμφάνισης αθηροσκλήρυνσης, είναι τα ακόλουθα: i) Αυξημένες συγκεντρώσεις ολικής και LDL χοληστερόλης στο αίμα και μειωμένες συγκεντρώσεις HDL, καθώς και αυξημένες συγκεντρώσεις κορεσμένων λιπών (Πλέσσας, 1994; Πλέσσας, 1998). Η LDL είναι μία λιποπρωτεΐνη που μεταφέρει τη χοληστερόλη στους ιστούς και είναι αθηρογόνος, διότι η κυκλοφορία της σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελεί χημικό αίτιο βλάβης του αρτηριακού ενδοθηλίου, ενώ εισερχόμενη εντός αυτού αποθέτει τη χοληστερόλη, προάγοντας την στένωση της αρτηρίας. Σε περιπτώσεις έλλειψης του γονιδίου δημιουργίας του υποδοχέα της LDL, αυτή δε μεταβολίζεται, οπότε αυξάνεται στο αίμα. Όταν η LDL οξειδώνεται προκαλεί τη συσσώρευση μακροφάγων, τα οποία μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, οδηγώντας σε αθηροσκλήρυνση των αρτηριών (Liu et al, 2004; Riemersma et al, 2005). ii) Αιμοδυναμικοί παράγοντες, δηλαδή παράγοντες σχετικοί με τη ροή του αίματος, και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων στις αρτηρίες. iii) Η αρτηριακή υπέρταση, η οποία προκαλεί μεταβολές της λειτουργικότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων, μεταβολές του έσω χιτώνα από συσσώρευση λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και ουδετερόφιλων, πάχυνση του έσω χιτώνα και υπερτροφία του μυοκαρδίου. iv) Το κάπνισμα, κατά το οποίο η παραγωγή CO και ομοκυστεΐνης προκαλεί βλάβες στο ενδοθήλιο. v) Γενετικοί παράγοντες προδιάθεσης (Πλέσσας, 1994; Πλέσσας, 1998).

Αναφορικά με την παθογένεση της νόσου, η αθηρωματογένεση είναι ένας βιοχημικός μηχανισμός που εκκινεί από τα αρχικά σημεία του τραυματισμού ή της βλάβης του ενδοθηλίου της αρτηρίας από αιτίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η πρώτη διεργασία αφορά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα σημεία της ενδοθηλιακής βλάβης με ταυτόχρονη απελευθέρωση β-θρομβογλοβουλίνης (β-TBG), του αιμοπεταλιακού παράγοντα 4 (PF-4) και του αυξητικού παράγοντα PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Ο PDGF είναι μια αυξητική ορμόνη που

παράγεται τοπικά από τα αιμοπετάλια, συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς των μυϊκών κυττάρων και διεγείρει τη φωσφορυλίωση και την παραγωγή DNA από τα κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αφενός μεν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την μετακίνησή τους προς την υπενδοθηλιακή στοιβάδα, αφετέρου δε την αύξηση του μικροσωμικού περιεχομένου των ινοβλαστών, η οποία συνοδεύεται από αύξηση του κολλαγόνου, της ελαστίνης και των βλενοπολυσακχαριτών. Με τον τρόπο αυτό, ο PDGF φαίνεται ότι πυροδοτεί τη διεργασία της αναπαραγωγής του συνδετικού ιστού. Η δεύτερη διεργασία του μηχανισμού αθηρωματογένεσης είναι η συσσώρευση λιπιδίων, που είναι το αποτέλεσμα αποκατάστασης ή μη ισορροπίας μεταξύ της πρόσληψης από το κύτταρο λιποπρωτεϊνών και της απομάκρυνσης εστέρων χοληστερόλης. Η πρόσληψη αυτή εξαρτάται από τη δραστηριότητα του υποδοχέα LDL στις λείες μυϊκές ίνες και στους ινοβλάστες. Η απομάκρυνση των εστέρων χοληστερόλης ρυθμίζεται από την απολιποπρωτεΐνη apo-AI (Πλέσσας, 1994; Πλέσσας, 1998; Liu et al, 2004; Riemersma et al, 2005, Khan & Muchtar, 2007).

### **5.1.3. Διατροφή και στεφανιαία νόσος**

Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων ετών έχουν αναδείξει πλήθος διατροφικών παραγόντων που επηρεάζουν το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας και συνεπώς την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (Dufresne & Farnworth, 2001; Khan & Muchtar, 2007). Η αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων από υδατάνθρακες προκαλεί μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης. Παραταύτα, η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση τόσο των επιπέδων τριγλυκεριδίων νηστείας, όσο και την τροποποίηση των μεγάλων LDL σε μικρές και πυκνές, που είναι πιο αθηρογόνες. Οι υδατοδιαλυτές φυτικές ίνες, που περιέχονται στα όσπρια και τα φρούτα, μειώνουν τα επίπεδα της ολικής και της LDL χοληστερόλης του ορού. Τα αποτελέσματα πληθυσμιακών μελετών συνηγορούν σε αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση αλκοόλ και στη συνολική θνησιμότητα από καρδιαγγειακή νόσο. Η υψηλή κατανάλωση καφέ προκαλεί μικρού βαθμού αύξηση της ολικής χοληστερόλης, ενώ η πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης δε φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (Πιτσαβός, Παναγιωτάκος & Στεφανάδης, 2004; Ζαμπέλας, 2006).

Η πρόσληψη του λίπους εκ της διατροφής αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους παράγοντες εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι το κυριότερο συστατικό της διατροφής που επηρεάζει την LDL. Τα κορεσμένα λιπαρά της διατροφής τείνουν να αυξάνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης, η οποία περιέχεται σε όλα τα επιμέρους κλάσματα λιποπρωτεϊνών. Όταν τα κορεσμένα λιπαρά αντικατασταθούν από ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά, τα επίπεδα της LDL και της HDL χοληστερόλης μειώνονται. Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που βρίσκονται κυρίως στα λιπαρά ψάρια, φαίνεται ότι μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στον ορό, αν και δεν επιδρούν στην ολική χοληστερόλη. Ο μηχανισμός δράσης τους εντοπίζεται στην αναστολή της ηπατικής σύνθεσης VLDL και τη μείωση της μεταγευματικής λιπαιμίας, λόγω του αυξημένου καταβολισμού των χυλομικρών μέσω αυξημένης δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Τέλος, το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ οδηγεί σε μείωση των επιπέδων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και LDL, όταν αντικαταστήσει τα κορεσμένα λιπαρά της διατροφής.

Δεδομένης της πιθανής σημασίας της οξειδωσης της LDL χοληστερόλης στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης, η πρόσληψη αντιοξειδωτικών συστατικών εκ της διατροφής έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια ως παράγοντας πρόληψης της στεφανιαίας νόσου. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που έχουν μελετηθεί είναι το ασκορβικό οξύ, η βιταμίνη E, το σελήνιο και τα φλαβονοειδή. Αρκετές μελέτες σε ζώα υποστηρίζουν την άποψη ότι τα αντιοξειδωτικά έχουν αντιαθηρογόνο δράση, ενώ επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι δίαιτες πλούσιες σε αντιοξειδωτικά μειώνουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα μεγάλων κλινικών μελετών είναι αντικρουόμενα, δεδομένου ότι αρκετές μελέτες δεν έχουν παρατηρήσει σημαντική επίδραση αντιοξειδωτικών, όπως οι τοκοφερόλες και το ασκορβικό οξύ, σε δείκτες καρδιαγγειακών παθήσεων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι σε κάποιες μελέτες οι ασθενείς ελάμβαναν παράλληλα και τη φαρμακευτική τους αγωγή ή και σε άλλους παράγοντες (Πιτσαβός, Παναγιωτάκος & Στεφανάδης, 2004; Ζαμπέλας 2006).



## **5.2. Μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων**

### **5.2.1. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί αθηρωμάτωσης**

Πληθώρα επιστημονικών δεδομένων δείχνουν ότι η φλεγμονώδης διαδικασία διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο εις την παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης, μέσω της συμμετοχής της στο μηχανισμό παραγωγής διαφόρων προφλεγμονώδων παραγόντων, όπως οι κυτταροκίνες (cytokines), οι χημιοκίνες (chemokines) και τα μόρια προσκόλλησης (Jiang & Dusting, 2003; Dell'Agli, Busciala & Bosisio, 2004; Zern & Fernandez, 2005). Μερικές φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη (interleukin, IL-1) και ο παράγοντας TNF (Tumor Necrosis Factor), δύναται να διεγείρουν το ενδοθήλιο, με συνέπεια την απορύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή μορίων προσκόλλησης. Αυτά οδηγούν στην προσκόλληση στο αρτηριακό ενδοθήλιο λευκοκυττάρων, όπως τα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα, γεγονός που αποτελεί το πρώιμο στάδιο της αθηροσκλήρυνσης. Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο ευνοείται από την αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως τα ICAM-1 (Interacellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), E-σελεκτίνη (E-Selectin), VLA-4 (Very Late Activation Antigen), LFA-1 (Lymphocyte Associated Function Antigen) και Mac-1. Από τις κυτταροκίνες σημαντικότερες είναι η ιντερλευκίνη IL-8, η οποία αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (Smooth Muscle Cells, SMC), η IL-6, η οποία δρα μιτωτικά αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των SMC και η MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), η οποία προσδίδει στα μονοκύτταρα την ικανότητα να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο, μέσω της έκφρασης της E-selectin, ενώ αυξάνει τη δράση των μακροφάγων (Liu et al, 2004). Η ενεργοποίηση των κυτταροκινών και των μορίων προσκόλλησης θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα και μέσω της συμμετοχής ενός μεταγραφικού παράγοντα, του NF-κB (Nuclear Factor-κB), ο οποίος ενεργοποιείται από κάποιες φλεγμονώδεις πρωτεΐνες, από την οξειδωμένη LDL, από ρίζες οξυγόνου και από τους παράγοντες IL-6, IL-8, MCP-1 και προωθεί την παραγωγή των ICAM-1, VCAM-1 και E-Selectin (Jiang & Dusting, 2003; Dell'Agli, Busciala & Bosisio, 2004; Zern & Fernandez, 2005).

Η παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης βασίζεται και σε πληθώρα παραγόντων σχετιζόμενων με την ενδοθηλιακή λειτουργία. Παράγοντες που μειώνουν την

αγγειοδιαστολή, συνδυαζόμενοι με παράγοντες φλεγμονής και αυξημένη αρτηριακή πίεση επιτείνουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση αφενός μεν της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών, αφετέρου δε της θρόμβωσης και της κλινικής εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Οι βασικές ουσίες που εκκρίνονται από το ενδοθήλιο και είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση φυσιολογικής ελαστικότητας των αρτηριών είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η προστακυκλίνη (prostacyclin) και ο παράγοντας EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor), ο οποίος έχει ενεργό ρόλο στη διατήρηση του αγγειακού τόνου και της πίεσης του αίματος. Αντίθετα, ουσίες υπεύθυνες για την μειωμένη διαστολή και τη σκλήρυνση των αρτηριών είναι οι ελεύθερες ρίζες και η ενδοθηλίνη-1 (endothelin-1), η οποία είναι προφλεγμονώδης και προωθεί τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. (Duthie G, Duthie S & Kyle, 2000; Stoclet, Chataigneu & Ndiaye, 2004; Manach, Mazur & Scalbert, 2005).

Η οξειδωμένη LDL θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες αθηροσκλήρυνσης, δεδομένου ότι προκαλεί διέγερση πολλαπλών και πολύπλοκων διαδικασιών πολλαπλασιασμού των αρτηριακών κυττάρων, μετατρέπει τα μακροφάγα σε αφρώδη κύτταρα και κινητοποιεί φλεγμονώδεις ουσίες. Η οξειδωμένη LDL προκαλεί την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως τα ICAM-1, VCAM-1 και E-Selectin, τα οποία λειτουργούν ως διεγερτικοί παράγοντες και προκαλούν τη δέσμευση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, την είσοδο τους εντός της αρτηρίας και το μετασχηματισμό τους σε μακροφάγα. Η απομάκρυνση των μακροφάγων εμποδίζεται από την LDL, οπότε συσσωρεύονται, αυξάνονται και μετασχηματίζονται εις αφρώδη κύτταρα, κύτταρα πλούσια σε λιπαρά οξέα και χοληστερόλη, υπεύθυνα για την διόγκωση της αθηρωματικής πλάκας (Miura et al, 2000; Yokozawa, Nakagawa & Kitani, 2002; Masella et al, 2004; Kurosawa et al, 2005; Riemersma et al, 2005; Kaliora, Dedousis & Schmid, 2005). Η οξειδωμένη LDL διεγείρει τα T-κύτταρα μέσω του MHC (Major Histocompatibility complex) και του υποδοχέα CD4, με συνέπεια την παραγωγή IL-1, που αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, IL-2, που ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και τα T-κύτταρα και IFN-γ, που προκαλεί την έκφραση του MHC. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από την LDL διεγείρει πληθώρα φλεγμονωδών παραγόντων (TNF-α, TNF-β, M-CSF, G-SCF, PDGF), που προωθούν την αθηρωματογένεση και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Miura et al, 2000; Kaliora, Dedousis & Schmid, 2005).

Τέλος, η αθηροσλήρυνση ευνοείται από την οξειδωμένη LDL, μέσω της έκφρασης της μονοκυτταρικής, χημικά εκλυόμενης πρωτεΐνης 1 και της μεταλλοπρωτεΐνάσης 1 (MMP-1), βασικών παραγόντων αγγειογένεσης (Riemersma et al, 2005).

### **5.2.2. Επίδραση των διαιτητικών πολυφαινολών στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηρωμάτωσης**

Η προστατευτική δράση τόσο των πολυφαινολών του τσαγιού, όσο και πολυφαινολών άλλων τροφίμων έναντι των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της αθηροσκήρυνσης έχει διερευνηθεί από πληθώρα μελετών και φαίνεται ότι αφορά την εμπλοκή τους στη φλεγμονώδη διαδικασία, την ενδοθηλιακή λειτουργία, την οξείδωση της LDL και το μεταβολισμό των λιπιδίων. Επιστημονικά δεδομένα συγκλίνουν στην προστατευτική δράση των φαινολικών συστατικών έναντι της αθηροσκήρυνσης, μέσω της καθυστέρησης ή της αποτροπής της φλεγμονώδους διαδικασίας. Συγκεκριμένα, τα φαινολικά συστατικά αναστέλλουν την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της ρύθμισης της παραγωγής κυτταροκινών, της αλλαγής της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και της απελευθέρωσης χημιοκινών (Liu et al, 2004). Οι πολυφαινόλες που απαντώνται στο κρασί έχει βρεθεί ότι μειώνουν τα μόρια προσκόλλησης στα μονοκύτταρα και στα T-λεμφοκύτταρα, μειώνουν τις συγκεντρώσεις των TNF-α, IL-6, ICAM-1, VCAM-1, αναστέλλουν τα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα και εμποδίζουν το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας (Zern & Fernandez, 2005). Μελέτη σε υγιείς άνδρες έδειξε ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού για 4 εβδομάδες μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των μορίων προσκόλλησης, όπως τα VLA-4, LFA-1, Mac-1, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 καθώς και τα επίπεδα του παράγοντα NF-kB (Zern & Fernandez, 2005). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι 5 mg/ml προανθοκυανιδίων κρασιού απορυθμίζουν την εκ του TNF-α προκληθείσα έκφραση του VCAM-1 στο ανθρώπινο ενδοθήλιο, οδηγώντας στην μείωση προσκόλλησης λευκοκυττάρων και T-κυττάρων, ενώ 100 mg/ημέρα για ένα μήνα μειώνουν τα επίπεδα των VCAM-1, ICAM-1 και E-Selectin σε ασθενείς με αθηροσκήρυνση (Jiang & Dusting, 2003; Dell'Agli, Busciala & Bosisio, 2004). Πειράματα σε ζώα που τρέφονταν με λίπος έδειξαν μείωση των μορίων προσκόλλησης, του MCP-1 και του MCP-1 mRNA παρουσία πολυφαινολών (Zern & Fernandez, 2005).

Εκτός της αντιφλεγμονώδους, ερευνητικά δεδομένα προτείνουν και την ενδοθηλιοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών. Πειράματα έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες προωθούν την αγγειοδιαστολή των στεφανιαίων αρτηριών, μέσω της παραγωγής του παράγοντα EDGF και την αύξηση της απελευθέρωσης προστακυκλίνης. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού φαίνεται ότι ενεργοποιούν συγκεκριμένα μονοπάτια κινασών στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως τις πρωτεϊνικές κινάσες p38, ERK1/2 και PI3-Kinase/Akt, με αποτέλεσμα την χαλάρωση των αρτηριών, μέσω της κινητοποίησης του EDHF και την εκκίνηση διαδικασιών φωσφορυλίωσης (Stoclet, Chataigneu & Ndiaye, 2004). Πειραματικές μελέτες στο αρτηριακό ενδοθήλιο έδειξαν ότι οι 3-φλαβονόλες σε συγκεντρώσεις μεταξύ 25 και 50 mM, αυξάνουν την απελευθέρωση προστακυκλίνης, μέσω της αύξησης του παράγοντα 6-keto-prostagdalin-F1α. Έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 50 mg/l αναστέλλουν την απελευθέρωση της αγγειοσυσταλτικής ενδοθηλίνης-1, μέσω της αλλαγής της έκφρασης του prepro-endothelin-1 γονιδίου και της τροποποίησης του μονοπατιού της κινάσης της τυροσίνης. Η σημαντικότερη δράση των φαινολικών συστατικών στην βελτίωση της ελαστικότητας των αρτηριών είναι η αύξηση της παραγωγής NO, μέσω της ενίσχυσης της δραστηριότητας του ενζύμου eNOS. Η ενεργοποίηση της eNOS από τις πολυφαινόλες λαμβάνει χώρα μέσω της εμπλοκής του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και της διέγερσης του μονοπατιού PI3-kinase/Akt. Οι πολυφαινόλες επιτυγχάνουν τη φωσφορυλίωση της Akt και της eNOS στην Ser1177 εντός των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την κατάργηση της παρεμπόδισης από τους αναστολείς και την ενεργοποίηση της eNOS, συνεπώς την παραγωγή NO και την χαλάρωση των αρτηριών (Ndiaye et al, 2003; Stoclet, Chataigneu & Ndiaye, 2004; Wallerath et al, 2005; Ndiaye et al, 2005). Το φλαβονοειδές του τσαγιού γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGC) προκάλεσε φωσφορυλίωση της eNOS, ενώ κατανάλωση κατεχίνης και πολυφαινολών τσαγιού από ποντίκια σχετίστηκε με αύξηση της παραγωγής NO (Stoclet, Chataigneu & Ndiaye, 2004). Για τον έλεγχο των πειραματικών δεδομένων και των υποθέσεων επίδρασης των πολυφαινολών στη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας πραγματοποιήθηκαν πολλές κλινικές δοκιμές και μελέτες ασθενών-μαρτύρων, οι περισσότερες από τις οποίες έδειξαν ευεργετική δράση. Οι Lekakis et al (2005) έδειξαν σε μια κλινική μελέτη αύξηση του παράγοντα ελαστικότητας των αρτηριών FMD (Flow Mediation Dilation), έπειτα από χορήγηση μίγματος πολυφαινολών σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Οι Hodgson et al (2005) έδειξαν ότι

κατανάλωση 5 φλιτζανιών μαύρου τσαγιού την ημέρα για 5 εβδομάδες βελτίωσε την FMD σε υγιή άτομα. Σε μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της συστολικής και της διαστολικής πίεσης σε άτομα που κατανάλωναν σοκολάτα και αύξηση της ελαστικότητας των αρτηριών σε άτομα που έπιναν ρόφημα κακάου (Stoclet, Chataigneu & Ndiaye, 2004).

Παρά τους προαναφερθέντες μηχανισμούς δράσης, ένας εκ των βασικών τρόπων που φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες δρουν στην αθηρωμάτωση είναι η αποτροπή της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης. Τα φλαβονοειδή, όπως οι κατεχίνες του τσαγιού, συνδέονται με την LDL και την προστατεύουν από την οξείδωση. Ο βαθμός προστασίας εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα, τον τύπο και την πολικότητα του φλαβονοειδούς. Οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες και οι ισοφλαβόνες έχουν την εντονότερη δράση κατά της οξείδωσης της LDL. Τρόφιμα που περιέχουν πολλά διαφορετικά φαινολικά συστατικά εμφανίζουν μεγαλύτερη δυνατότητα προστασίας της LDL από την οξείδωση, λόγω συνεργηστικής δράσης των φαινολικών, με αποτέλεσμα κάποια από αυτά να δεσμεύουν τα ιόντα χαλκού ή σιδήρου και κάποια άλλα τις ελεύθερες ρίζες, ενώ παράλληλα αποτρέπεται πιθανή προοξειδωτική δράση λόγω μηχανισμού αναγέννησης της  $\alpha$ -τοκοφερόλης (Miura et al, 2000; Fuhrman & Arivam, 2001). Εκτός από την δράση επί της LDL, οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι αποτρέπουν την οξείδωση των μακροφάγων, τα οποία μετατρέπόμενα εις αφρώδη κύτταρα ενισχύουν την αθηρωματική διαδικασία στον υποενδοθηλιακό χώρο. Οι βασικοί μηχανισμοί δράσης των φλαβονοειδών κατά της οξείδωσης των μακροφάγων είναι η αναστολή των κυτταρικών οξυγενασών και η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Fuhrman & Arivam, 2001). Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πληθώρα μελετών *in vitro* και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα σχετικές με τη δράση των φαινολικών συστατικών στην οξείδωση της LDL. Εκχυλίσματα κρασιού, ροδιών, σόγιας και τσαγιού έχειδειχθεί ότι μείωσαν την υπεροξειδωση των λιπιδίων σε μεμονωμένα ερυθροκύτταρα (Miura et al, 2000; Fuhrman & Arivam, 2001). Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν μείωση του επιπέδου οξείδωσης της LDL, ανάλογη της χορηγηθείσας ποσότητας πολυφαινολών και αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Άλλα πειράματα σε υπερχοληστερολαιμικά ποντίκια που τρέφονταν με πολυφαινόλες κακάου έδειξαν μείωση των ελευθέρων ριζών εντός της LDL (Yokozawa, Nakagawa & Kitani, 2001).

### 5.2.3. Συσχέτιση της κατανάλωσης τσαγιού με τις καρδιαγγειακές παθήσεις

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα επιδημιολογικών μελετών δείχνουν ότι η κατανάλωση τσαγιού σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (Dufresne & Farnworth, 2001; Khan & Mukhtar, 2007; Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Το 1989 μια μελέτη κοορτής στην Ιαπωνία διάρκειας 4 ετών έδειξε ότι η κατανάλωση πράσινου τσαγιού σχετίστηκε αντίστροφα με τη θνησιμότητα από αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Οι Sasazuki et al (2000) έδειξαν σε 512 στεφανιαίους ασθενείς πιθανή προστατευτική δράση του πράσινου τσαγιού έναντι της αθηροσκλήρυνσης (OR=0,4 για άνω των 4 φλιτζανιών τσάι την ημέρα, σε σχέση με ένα φλιτζάνι την ημέρα). Οι Nakacki et al (2000) παρατήρησαν σε μια προοπτική μελέτη 8522 ανδρών και γυναικών ότι κατανάλωση άνω των 10 φλιτζανιών τσαγιού την ημέρα σχετίστηκε με μείωση του σχετικού κινδύνου θανάτου από καρδιαγγειακές παθήσεις. Η Zutphen Study στην Ολλανδία έχοντας διάρκεια 10-15 έτη και χρησιμοποιώντας κοορτή 550-800 ανδρών έδειξε έντονη αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονολών και στη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο (Hertog, Feskens & Kromhout, 1997). Μια μελέτη ασθενών μαρτύρων έδειξε 44% μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε άτομα που ελάμβαναν άνω της μίας κούπας τσαγιού την ημέρα (Sesso et al, 1999). Οι Mukamal et al (2002) εξέτασαν την κατανάλωση τσαγιού σε 1900 άτομα με έμφραγμα του μυοκαρδίου και παρατήρησαν 31% μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου έπειτα από 3,8 έτη. Μεταanalύσεις έχουν δείξει ότι αύξηση της κατανάλωσης τσαγιού κατά 3 φλιτζάνια την ημέρα οδηγεί σε μείωση της επίπτωσης εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά 11% (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

Όπως έχει αναφερθεί, οι μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών στα στάδια εξέλιξης και εγκατάστασης της καρδιαγγειακής νόσου είναι πολύπλοκοι, πολυπαραγοντικοί και αλληλοεξαρτώμενοι. Εστιάζοντας στην επίδραση του τσαγιού και των πολυφαινολών του στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης, οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές, ενδοθηλιοπροστατευτικές και υπολιπιδαιμικές δράσεις (Khan & Mukhtar, 2007). Η αντιοξειδωτική δράση του τσαγιού έχει συσχετιστεί με καρδιοπροστατευτική δράση, ιδίως μέσω της αποτροπής της οξειδωσης της LDL χοληστερόλης. Ένα φλιτζάνι πράσινο τσάι φαίνεται ότι αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος, ενώ κατανάλωση 4 φλιτζανιών για ένα μήνα μείωσε τις συγκεντρώσεις της οξειδωμένης LDL σε υγιή άτομα (Jochman,

Bauman & Stangl, 2008). Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν καταδείξει τον αντιοξειδωτικό ρόλο των πολυφαινολών του τσαγιού έναντι της οξειδωσης τόσο της LDL, όσο και της VLDL λιποπρωτεΐνης. Σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής έχει βρεθεί ότι η κατεχίνη και η επικατεχίνη μειώνουν την παραγωγή λιπιδικών υδρουπεροξειδίων (Dufresne & Farnworth, 2001). Οι Hirano-Ohmori et al (2005) παρατήρησαν σε υγιείς εθελοντές ότι η κατανάλωση 7 φλιτζανιών πράσινο τσάι για 2 εβδομάδες μείωσε την οξειδωση της LDL, μετρούμενη μέσω της μηλονικής αλδεύδης (MDA-LDL). Οι Sung et al (2005) έδειξαν μείωση της οξειδωμένης LDL έπειτα από 4 εβδομάδες χορήγηση τσαγιού, ενώ οι Hodgson et al (2000) συμπέραναν αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών αμέσως μετά την κατανάλωση 4 φλιτζανιών μαύρου τσαγιού.

Η αντιφλεγμονώδης δράση του τσαγιού θεωρείται ένας εκ των πιο πρόσφατων μελετώμενων μηχανισμών επίδρασης επί της αθηρωμάτωσης. Η ρουτίνη και οι κατεχίνες του τσαγιού έχουν εμφανίσει αντιφλεγμονώδη δράση σε ιστούς ζώων με αθηρωμάτωση, αναστέλλοντας το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και της ισταμίνης, μέσω της μετανάστευσης των ουδετερόφιλων, τα οποία σχετίζονται με τις οξειδωτικές διαδικασίες (Dufresne & Farnworth, 2001). Η EGCG έχει δειχθεί ότι προλαμβάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, μειώνει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και προλαμβάνει την εκ του TNF- $\alpha$  προκαλούμενη έκφραση της χημιοτακτικής πρωτεΐνης 1 (MCP-1). Οι Steptoe et al (2006) παρατήρησαν σε μια διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη ότι η επί 6 μήνες χορήγηση μαύρου τσαγιού μείωσε τα επίπεδα της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), βασικού φλεγμονώδους παράγοντα. Αντίθετα, υπάρχουν μελέτες παρόμοιων σχεδιασμών που δεν έχουν βρει σημαντικές διαφορές στους φλεγμονώδεις παράγοντες μετά την κατανάλωση τσαγιού (Fukino et al, 2004; Widlansky et al, 2004; Mukamal et al, 2007). Οι Lee et al (2004) παρατήρησαν σε καπνιστές επίδραση της κατανάλωσης πράσινου τσαγιού για ένα μήνα στην P-Selectin, αλλά όχι στα μόρια προσκόλλησης VCAM-1, ICAM-1.

Επιπρόσθετα, οι κατεχίνες του τσαγιού εμφανίζουν σημαντική αντιθρομβωτική δράση, αφού φαίνεται ότι αναστέλλουν την εκ των ADP, κολλαγόνου και ασβεστίου προκληθείσα συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Η αντιθρομβωτική δράση των κατεχινών συνοψίζεται εις την αναστολή της φωσφολιπάσης c- $\gamma$ -2, την φωσφορυλίωση της τυροσίνης, την αύξηση των επιπέδων προσταγδαλίνης και τη διατήρηση της δραστηριότητας της Ca-ATPase. (Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρόνια κατανάλωση τσαγιού οδηγεί στη μείωση της τάσης

συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, αποτρέποντας τη θρόμβωση. Οι Hodgson et al (2001b) συμπέραναν ότι η χρόνια κατανάλωση τσαγιού μείωσε την εκ της P-σελεκτίνης προκληθείσα συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, ενώ οι Duffy et al (2001) δεν παρατήρησαν άμεση επίδραση του τσαγιού στην *ex vivo* συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων.

Μία άλλη ενδιαφέρουσα δράση τα των κατεχινών που έχει μελετηθεί είναι η ενδοθηλιοπροστατευτική. Οι Widlansky et al (2007) και οι Duffy et al (2001) παρατήρησαν ότι η χορήγηση κατεχινών και μαύρου τσαγιού σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο βελτίωσε σημαντικά την ενδοθηλιακή λειτουργία. Όπως έχει αναφερθεί για τις πολυφαινόλες γενικότερα, έτσι και οι πολυφαινόλες του τσαγιού έχει βρεθεί ότι προκαλούν την απελευθέρωση του NO στο ενδοθήλιο, μέσω αύξησης της δραστηριότητας του ενζύμου συνθάσης του NO. Η EGCG έχει δειχθεί ότι αφενός μεν μειώνει τη διμεθυλαργινίνη, ενδογενή αναστολέα της συνθάσης του NO, αφετέρου δε αυξάνει την παραγωγή της συνθάσης υπεισερχόμενη εις τα βιοχημικά μεταβολικά μονοπάτια της φωσφατιδοινοσιτόλης και της μονοφοσφορικής αδενοσίνης. Η ενδοθηλιακή αγγειοδιαστολή που προκαλείται εκ της κατανάλωσης τσαγιού έχει συσχετιστεί και με τη θετική επίδραση του τσαγιού στη μείωση της αρτηριακής υπέρτασης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τσαγιού για μεγάλο διάστημα μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

### **5.3. Ο ρόλος του τσαγιού στην απορρόφηση των λιπιδίων και το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών**

#### **5.3.1. Μηχανισμοί απορρόφησης λιπιδίων και μεταβολισμού λιποπρωτεϊνών**

Η απορρόφηση του λίπους της τροφής και η διαδικασία μεταβολισμού του εντός του οργανισμού αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση και την έκβαση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Το λίπος της τροφής περιλαμβάνει τα τριγλυκερίδια, τα μονο- και δι- γλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια και τη χοληστερόλη. Το λιπαρά συστατικά της τροφής υφίστανται μια πρώτη πέψη στο στομάχι από τη γαστρική λιπάση, αλλά η κύρια πέψη λαμβάνει χώρα στο δωδεκαδάκτυλο. Τα σταγονίδια του λίπους περιέχουν εσωτερικά μεγάλες ποσότητες τριγλυκεριδίων και εστέρων της χοληστερόλης, ενώ επιφανειακά μικρές ποσότητες



λιπαρών οξέων και φωσφολιποειδών. Κατά την πέψη εκκρίνονται από τη χολή τα χολικά οξέα τα οποία έχουν ως ρόλο τη γαλακτωματοποίηση των σταγονιδίων αυτών, μειώνοντας τη διάμετρο τους. Στη συνέχεια αναλαμβάνει δράση η παγκρεατική λιπάση, η οποία με την σύμπραξη της συνλιπάσης, προωθεί την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων προς παραγωγή 2-μονογλυκεριδίων και λιπαρών οξέων, ενώ παράλληλα άλλα ένζυμα διασπούν τους εστέρες της χοληστερόλης προς χοληστερόλη. Τα παραγόμενα προϊόντα, επειδή είναι υδρόφοβα, διαπερνούν την υδάτινη στοιβάδα που επικαλύπτει τον εντερικό βλεννογόνο (στοιβάδα του Nerst) αφού εισέρθουν εντός των μικελλών των χολικών οξέων. Μέσω των μικελλών φτάνουν στα σημεία απορρόφησης των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Εκεί, μέσω μηχανισμών απορρόφησης εισέρχονται εντός των κυττάρων και κατευθύνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου τα μεν λιπαρά οξέα και τα 2-μονογλυκερίδια μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια, μέσω των ενζύμων MGAT και DGAT, η δε χοληστερόλη εστεροποιείται από το ένζυμο ACAT (Ακέτυλο CoA ακυλοτρανσφεράση). Εν συνεχεία, τα τριγλυκερίδια και η χοληστερόλη μεταφέρονται στα οργανίδια Golgi και εισέρχονται μέσω των λεμφαγγείων εντός του υδάτινου περιβάλλοντος του αίματος. Η είσοδος των παραγόμενων από την πέψη λιπιδίων εντός των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου γίνεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως η παθητική διάχυση, η ενεργή μεταφορά, η διευκολυνόμενη διάχυση και η πινοκύτωση, με συχνότερα εμφανιζόμενους τους δύο πρώτους. Οι κυριότερες πρωτεΐνες που επιτελούν την ενεργή μεταφορά είναι η FABP (Fatty Acid Binding Protein), η SCP (Sterol Carrier Protein) και η GP330 (Schulthess & Hauser, 1995; Ros, 2000; Nordskog et al, 2001).

Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, τα λιπίδια μεταφέρονται στους διάφορους ιστούς διαμέσου του υδρόφιλου περιβάλλοντος του πλάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία μακρομοριακών συμπλεγμάτων που είναι γνωστά ως λιποπρωτεΐνες. Όλα τα λιπίδια του πλάσματος μεταφέρονται εντός των λιποπρωτεϊνών, εκτός από τα λιπαρά οξέα, τα οποία συνδέονται με την αλβουμίνη. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούνται από έναν υδρόφιλο πυρήνα που περιέχει τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης και ένα εξωτερικό φλοιό που περιέχει χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και απολιποπρωτεΐνες. Αμέσως μετά την κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιου σε λίπος, στο πλάσμα εμφανίζονται τα χυλομικρά, τα οποία μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια και τη χοληστερόλη της τροφής. Τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών υδρολύονται από την λιποπρωτεϊνική λιπάση και μεταφέρονται στο ήπαρ, όπου

αποικοδομούνται. Η VLDL (Very Low Density Lipoprotein) είναι η επόμενη λιποπρωτεΐνη που εμφανίζεται μετά τα χυλομικρά, και μεταφέρει τα τριγλυκερίδια και τη χοληστερόλη που βιοσυντίθεται στο ήπαρ. Οι VLDL υδρολύονται από την λιποπρωτεϊνική λιπάση και μετατρέπονται τελικά σε κατάλοιπα, γνωστά ως IDL. Οι LDL λιποπρωτεΐνες (Low Density Lipoproteins) σχηματίζονται στο πλάσμα εκ των VLDL και έχουν ως ρόλο τη μεταφορά της χοληστερόλης από το ήπαρ στους περιφερειακούς ιστούς. Οι LDL έχουν την ικανότητα να διέρχονται από τις συνδέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών και να προσλαμβάνονται από τα κύτταρα των ιστών διαμέσου ειδικών υποδοχέων. Οι λιποπρωτεΐνες HDL (High Density Lipoproteins) έχουν ως ρόλο την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, δηλαδή προσλαμβάνουν τη χοληστερόλη εκ των ιστών, την εστεροποιούν με το ένζυμο λεκιθινο-χολεστερολο-ακυλοτρανσφεράση και τη μεταφέρουν στο ήπαρ (Ζαμπέλας, 2006).

### **5.3.2. Μηχανισμοί επίδρασης των πολυφαινολών του τσαγιού στην απορρόφηση των λιπιδίων**

Επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση πράσινου τσαγιού σχετίζεται με ευεργετικές δράσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ, κυρίως μέσω μείωσης της εντερικής απορρόφησης των λιπιδίων. Η EGCG φαίνεται ότι είναι ο πιο σημαντικός αναστολέας της απορρόφησης των λιπιδίων, αφού σχηματίζει σύμπλοκα με τα λιπίδια και τα λιπολυτικά ένζυμα, παρεμβαίνοντας έτσι στις διαδικασίες γαλακτωματοποίησης και υδρόλυσης του λίπους και στους μηχανισμούς δημιουργίας μικελλών των χολικών οξέων (Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Οι κατεχίνες φαίνεται ότι αλλάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτώματος που δημιουργείται κατά την απορρόφηση του λίπους, αντιδρώντας με τις υδροξυλομάδες της φωσφατιδυλοχολίνης και δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου εις την εξωτερική επιφάνεια του γαλακτώματος (Koo & Noh, 2007). Έτσι, δημιουργούνται cross-links, ενώ διαφοροποιείται και αυξάνεται το μέγεθος των σωματιδίων του λίπους, με συνέπεια τη μειωμένη υδρόλυση και απορρόφηση αυτών (Unno et al, 2005; Koo & Noh, 2007).

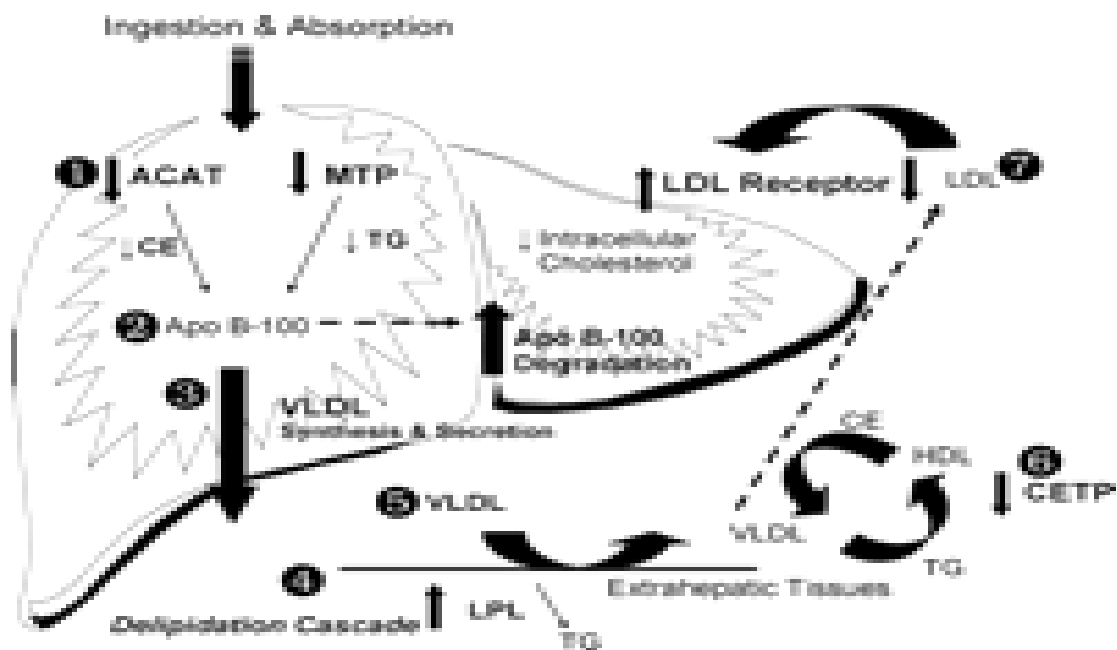
Ένας άλλος διερευνώμενος μηχανισμός είναι η επίδραση των πολυφαινολών του τσαγιού στις μεταφορικές πρωτεΐνες της ψυκτροειδούς παρυφής των εντερικών κυττάρων. Είναι πιθανό, οι πολυφαινόλες του τσαγιού και ιδίως οι κατεχίνες να αντιδρούν με αυτές τις πρωτεΐνες δημιουργώντας σύμπλοκα, μέσω υδρογονικών

δεσμών και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Με τον τρόπο αυτό δύναται να μειώνουν την απορρόφηση των λιπιδίων στα εντεροκύτταρα, όπως έχουν δείξει μελέτες παρεμβολής των κατεχινών στις μεταφορικές ουσίες ATP-binding proteins και Nieman Pick C1-like 1 protein (Koo & Noh, 2007). Αρκετά είναι τα δεδομένα που καταδεικνύουν επίδραση του τσαγιού και στα ένζυμα της πέψης (Frayn, 1998; Ikeda et al, 2004). Η γαστρική και η παγκρεατική λιπάση, οι οποίες εισάγονται εντός των μικελλών των χολικών αλάτων και υδρολύουν το λίπος, φαίνεται ότι αναστέλλονται παρουσία των κατεχινών του τσαγιού (Unno et al, 2005). Η παγκρεατική φωσφολιπάση A2 (PLA2) αναστέλλεται από την EGCG λόγω δημιουργίας συμπλόκων μεταξύ της κατεχίνης και της φωσφατιδυλοχολίνης στην επιφάνεια του γαλακτώματος. Αυτά τα σύμπλοκα αποτρέπουν την επαρκή προσκόλληση και δράση της λιπάσης (Koo & Noh, 2007).

Η δράση των πολυφαινολών του τσαγιού εις τους πολύπλοκους μηχανισμούς μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που σχετίζεται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Frayn, 1998). Όταν τα λιπίδια εισέρχονται στα εντεροκύτταρα το πράσινο τσάι προτείνεται ότι είναι ικανό μέχρι ένα βαθμό να αλλάξει τις ενδοκυτταρικές διαδικασίες των λιπιδίων, οδηγώντας σε ανακύκλωση και επανασύνθεση τους (Koo & Noh, 2007). Η EGCG του τσαγιού έχειδειχθεί ότι μείωσε την ολική και την LDL χοληστερόλη μετά την χορήγηση σε αρουραίους για 4 εβδομάδες (Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη έδειξε ότι κατανάλωση τσαγιού (375 mg πολυφαινόλες την ημέρα) για 12 εβδομάδες οδήγησε σε μείωση κατά 11% και 16% της ολικής και της LDL χοληστερόλης, αντίστοιχα (Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Άλλη μελέτη με υγιείς ενήλικες έδειξε θετική επίδραση του τσαγιού τόσο στα επίπεδα των λιπιδίων, όσο και σε κάποιες απολιποπρωτεΐνες (Coibra et al., 2006). Η μείωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος παρατηρήθηκε ότι οδηγεί στη μείωση της LDL, μέσω της μείωσης της πρωτεΐνης CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein). Πολλές μελέτες που αφορούν την κατανάλωση πολυφαινολών του κρασιού εμφανίζουν τη δράση ενός ειδικού μηχανισμού, σύμφωνα με τον οποίο οι πολυφαινόλες επιδρούν στα ηπατοκύτταρα Hep G-2, απορυθμίζοντας τη δραστηριότητα του υποδοχέα της LDL. Αυτή η απορύθμιση σχετίζεται με την ικανότητα των πολυφαινολών να αυξάνουν τις συγκεντρώσεις της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης στο ήπαρ, αφού μειώνουν την απορρόφηση της χοληστερόλης της τροφής, οπότε ενεργοποιείται διαδικασία μείωσης του υποδοχέα της LDL, άρα και της ίδιας της LDL χοληστερόλης (Zern &

Fernandez, 2005). Πειράματα σε ζώα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες μείωσαν τη VLDL από 50% σε 39%, ενώ σε ανθρώπους μείωσαν τα τριγλυκερίδια, την apoB, την apoE και την LDL. Οι πολυφαινόλες των σταφυλιών πιθανόν μειώνουν τις συγκεντρώσεις των apoA, apoB στο πλάσμα, τροποποιώντας το μεταβολισμό της VLDL και μειώνοντας τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων, μέσω της αναστολής της λιπολυτικής δραστηριότητας του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL). Επίσης, οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι αυξάνουν τη ρευστότητα των μεμβρανών των λιπιδίων της LDL, μειώνοντας την οξείδωση της, με αποτέλεσμα την αύξηση της HDL που κάνει αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, δεδομένου ότι στην οξειδωμένη μορφή HDL είναι ανενεργή (Manach, Mazur & Scalbert, 2005).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1 οι πολυφαινόλες πιθανόν να αλλάζουν το μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών με τους εξής μηχανισμούς: 1) Μειώνοντας τη δράση του ενζύμου ACAT. 2) Αυξάνοντας την αποδόμηση της απολιποπρωτεΐνης B100. 3) Μειώνοντας τη σύνθεση της VLDL. 4) Αλλάζοντας το προφίλ των λιπιδίων στην κυκλοφορία του αίματος. 5) Αλλάζοντας την VLDL, μέσω μείωσης της apoE, οπότε αυξάνεται η LPL δραστηριότητα και μειώνονται τα τριγλυκερίδια στο πλάσμα. 6) Μειώνοντας την LDL, μέσω της μείωσης της VLDL και της αλλαγής του μεταβολισμού της χοληστερόλης (Zern & Fernandez, 2005).



Σχήμα 5.1. Σχηματική παρουσίαση του πιθανού μηχανισμού επίδρασης των πολυφαινολών εις το μεταβολισμό των λιπιδίων (Zern & Fernandez, 2005).

## **5.4. Η σημασία της μεταγευματικής κατάστασης στις καρδιαγγειακές παθήσεις και ο ρόλος των αντιοξειδωτικών συστατικών της διατροφής**

### **5.4.1. Μεταγευματική κατάσταση και καρδιαγγειακές παθήσεις**

Στις δυτικές κοινωνίες, ένα σημαντικό τμήμα της ημέρας ο άνθρωπος βρίσκεται σε μεταγευματική κατάσταση (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Μετά την κατανάλωση ενός συνηθισμένου γεύματος, που περιέχει 100 g υδατάνθρακες και 50 g λίπος, παρατηρείται αύξηση της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα περίπου 8 και 10 φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα (Frayn, 1998). Δεδομένων των πολύπλοκων αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό μεταγευματικά, μια τέτοια απότομη αύξηση έχει σχετιστεί με επίταση των οξειδωτικών διαδικασιών και μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του ενδοθηλιακού NO, καταστάσεις που αυξάνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Kay & Holub, 2003). Η μεταγευματική αύξηση των λιπιδίων και της γλυκόζης συνδέεται άμεσα με την αθηρωμάτωση, αφού άτομα που βρίσκονται συνεχώς σε μεταγευματική κατάσταση έχουν συνεχώς αυξημένα επίπεδα χυλομικρών στο αίμα, άρα και τριγλυκεριδίων (Zilvermit et al, 1979; Kay & Holub, 2003). Συνεπώς, η μεταγευματική αύξηση των λιπιδίων αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακής νόσου (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η μεταγευματική κατάσταση είναι σημαντική τόσο για την πρωτογενή, όσο και για τη δευτερογενή πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Sies, Stahl & Sevanian, 2005).

Οι μηχανισμοί επίδρασης της μεταγευματικής κατάστασης στην παθοφυσιολογία της καρδιαγγειακής νόσου είναι πολύπλοκοι και δεν έχουν μελετηθεί ακόμη εκτενώς. Η απότομη αύξηση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος μετά από ένα γεύμα, γνωστή ως μεταγευματική λιπαιμία, θεωρείται πλέον ένας εκ των βασικών παραγόντων κινδύνου για στεφανιαία νόσο, δεδομένου ότι τα υπολείμματα χυλομικρών σχετίζονται με αθηρογόνο δράση και αύξηση της ινσουλινοανθεκτικότητας. Η ινσουλινοανθεκτικότητα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα για μεγάλο διάστημα, γεγονός που προωθεί της αθηρωματικές διαδικασίες (Frayn, 1998). Έπειτα από ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος, τα τριγλυκερίδια φτάνουν στις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε περίπου 3-5 ώρες, αν και απαιτούνται 8-12 ώρες για να επιστρέψουν στα επίπεδα νηστείας. Αυτό δείχνει ότι η πλειοψηφία του πληθυσμού

βρίσκεται συνεχώς σε μεταγευματικό στάδιο (Kay & Holub, 2003). Η μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαμία έχει συσχετιστεί με μειωμένη παραγωγή NO και μειωμένη αγγειοδιαστολή (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Ο ρυθμός αύξησης των τριγλυκεριδίων του πλάσματος καθορίζεται και από την ύπαρξη υδατανθράκων στο γεύμα, η σημασία των οποίων μεταγευματικά είναι εξίσου μεγάλη (Frayn, 1998; O'Keefe H, Gheewala & O'Keefe J, 2008). Επίσης, ο ρυθμός μεταφοράς των τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία, ο οποίος καθορίζει και τη μορφή της μεταγευματικής κατάστασης, εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως η εντερική απορρόφηση του λίπους και η σύνθεση των χυλομικρών στα εντεροκύτταρα (Frayn, 1998).

Ένας εκ των σημαντικότερων μηχανισμών επίδρασης της μεταγευματικής κατάστασης στην παθοφυσιολογία της καρδιαγγειακής νόσου είναι το μεταγευματικό ή διατροφικό οξειδωτικό στρες, το οποίο προκύπτει εκ της ανισορροπίας προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μετά το γεύμα. Μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος ή/και υδατάνθρακες, παρατηρείται αυξημένη ευαισθησία του οργανισμού στις οξειδωτικές καταστροφές. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αύξηση των λιπιδίων και της γλυκόζης σχετίζεται με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων και διαβήτη (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Η κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιου σε οξειδωμένα και ευοξειδωτά λιπίδια αυξάνει τα επίπεδα των λιπιδικών υδρουπεροξειδίων (LOO-) στο πλάσμα, επιτείνοντας την ευαισθησία της LDL στην οξείδωση. Τα οξειδωμένα λιπίδια της διατροφής εισέρχονται στην κυκλοφορία και από τα χυλομικρά περνάνε στις VLDL και στις LDL. Έτσι προωθούν την οξείδωση της LDL και την παραγωγή LOO-, τα οποία είναι προφλεγμονώδη και τροποποιούν τη σύνθεση των εικοσανοειδών. Τα LOO- και οι οξειδωμένες LDL αυξάνουν την έκφραση των φλεγμονώδων μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, ενώ ενεργοποιούν την προοξειδωτική λιποξυγενάση (Ursini et al., 1998; Tsai et al., 2004). Η επίταση της μεταγευματικής οξείδωσης οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων οξείδωσης, όπως οι οξυστερόλες, οι οποίες προωθούν περεταίρω οξειδώσεις, ευνοούν παράγοντες φλεγμονής και αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την αθηρωμάτωση (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Μελέτες έχουν δείξει σημαντική μεταγευματική αύξηση των επιπέδων της LDL και της VLDL, αυξημένη μεταφορά της χοληστερόλης και των εστέρων της από την HDL στην LDL (Shankar et al, 2008) και αύξηση των χυλομικρών και των λιπιδικών υδρουπεροξειδίων (Ursini et al, 1998).

Η μεταγευματική κατάσταση περιλαμβάνει και τη μεταγευματική γλυκαιμία, η οποία σχετίζεται άμεσα με την αθηρωμάτωση και το διαβήτη. Ένα γεύμα πλούσιο σε ταχύτατα απορροφούμενους υδατάνθρακες οδηγεί εις απότομη αύξηση της γλυκόζης στο αίμα. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης δύνανται να αποτελούν έναν τοξικό παράγοντα του ενδοθηλίου και ενισχυτή των οξειδωτικών διαδικασιών, ανεξαρτήτου της συνύπαρξης ή όχι υπερλιπιδαιμίας. Επίσης, η μεταγευματική γλυκαιμία, λόγω του οξειδωτικού στρες, προκαλεί απόπτωση των περιφερικών νευρώνων (primary sensory neurons), οδηγώντας σε περιφερική διαβητική νευροπάθεια (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Τα υψηλά μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης και λιπαρών οξέων οδηγούν μέσω του κύκλου του Krebs στην παραγωγή νουκλεοτιδίων (nicotinamide adenine dinucleotide), που προωθούν την οξειδωτική φωσφορύλιωση και την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι τελευταίες έχουν συσχετιστεί με μεταγευματική αύξηση των κυτταροκινών, της CRP και της ενδοθηλήνης-1 (Saxena et al, 2005; O'Keefe H, Gheewala & O'Keefe J, 2008).

#### **5.4.2. Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών και του τσαγιού στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες**

Τα τελευταία χρόνια, έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες οι οποίες διερευνούν την επίδραση των αντιοξειδωτικών της διατροφής στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες. Η μεταγευματική αύξηση των λιπιδίων και των υδροϋπεροξειδίων μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε οξειδωμένα λιπίδια παρατηρήθηκε ότι μειώθηκε όταν το γεύμα αυτό καταναλώνονταν μαζί με τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικά, όπως το κόκκινο κρασί, το κακάο, διάφορα φρούτα και το τσάι (Ursini et al, 1998; Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Η ποικιλία των αντιοξειδωτικών συστατικών φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερη επίδραση στους μεταγευματικούς παράγοντες σε σχέση με τα μεμονωμένα αντιοξειδωτικά, λόγω συνεργηστικής δράσης (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Οι Ceriello et al (2001) έδειξαν ότι οι προκυανιδίνες του κόκκινου κρασιού προστατεύσαν διαβητικούς ασθενείς από τις εκ του οξειδωτικού στρες προκύπτουσες συνέπειες ενός γεύματος, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Πολλές μελέτες παρέμβασης έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά επηρεάζει δείκτες καρδιαγγειακών παθήσεων που σχετίζονται με τη μεταγευματική κατάσταση. Αυτό φαίνεται ότι οφείλεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να τροποποιούν της μεταγευματικές αντιδράσεις που οδηγούν σε προαθηρωματικές

καταστάσεις, επηρεάζοντας τον χρόνο και τη μορφή μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης (Sies, Stahl & Sevanian, 2005).

Τα αντιοξειδωτικά της διατροφής μειώνουν τις αρνητικές συνέπειες της μεταγευματικής λιπαιμίας και της μεταγευματικής γλυκαιμίας, αποτρέποντας την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του ενδοθηλιακού NO και προλαμβάνοντας την αυτοοξειδωση της γλυκόζης (Kay & Holub, 2003). Διατροφές πλούσιες σε φυτικά προϊόντα, φρούτα, λαχανικά και αντιοξειδωτικά, όπως η μεσογειακή διατροφή, έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων (O'Keefe H, Gheewala & O'Keefe J, 2008). Οι Unno et al (2004) παρατήρησαν σε υπερτριγλυκεραιμικά άτομα ότι η κατανάλωση μέτριας και υψηλής δόσης κατεχινών τσαγιού παράλληλα με ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος οδήγησε σε περιορισμό της αύξησης των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα 2 ώρες μετά την παρέμβαση. Οι Esposito et al (2002) έδειξαν ότι ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος αύξησε τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, επηρέασε τους παράγοντες αιμόστασης και αύξησε τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, κάτι που δε συνέβη με ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες. Η ενίσχυση του γεύματος με αντιοξειδωτικά οδήγησε σε μικρότερη αύξηση των τριγλυκεριδίων και σε αποτροπή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων (Esposito et al, 2002). Αντίθετα, οι Hodgson et al (2001) δεν παρατήρησαν επίδραση του μαύρου τσαγιού στην εκ των ADP και κολλαγόνου *in vitro* συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, μετά την κατανάλωση ενός γεύματος με 50 g λίπος. Σε μια άλλη μελέτη, ο εμπλουτισμός κρέατος με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (GTE, 1,86 mg/d) και η κατανάλωση του επί 10 εβδομάδες, με παράλληλη αποφυγή φρούτων και λαχανικών, οδήγησε σε μείωση της οξειδωτικής καταστροφής του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, συνδυαζόμενη με μείωση των επιπέδων του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα και αλλαγές στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Young et al., 2002). Οι Hodgson, Burke & Puddey (2004) παρατήρησαν ότι η κατανάλωση ενός γεύματος μαζί με τσάι δύναται να αλλάξει της επιδράσεις του τσαγιού όταν αυτό καταναλώνεται μόνο του, ενώ οδηγεί στη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας και της συστολικής πίεσης σε σχέση με την κατανάλωση μόνο του γεύματος.

Η συσχέτιση των καρδιαγγειακών παθήσεων με τις επιπλοκές του διαβήτη καθιστά σημαντική την εξέταση της επίδρασης του τσαγιού στη μεταγευματική γλυκαιμία και στην παθοφυσιολογία του διαβήτη. Οι Bryans et al. (2007) μελέτησαν την επίδραση της κατανάλωσης μαύρου τσαγιού στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα



μετά από την λήψη μια δόσης 75 g γλυκόζης. Τα συμπεράσματα έδειξαν ότι 1 g τσαγιού μείωσε τα επίπεδα της γλυκόζης και αύξησε τις συγκεντρώσεις της ινσουλίνης, γεγονός που υποδηλώνει αναστολή της μεταγευματικής γλυκαιμίας μέσω της ενεργοποίησης των κυττάρων του παγκρέατος και την προώθηση της παραγωγής ινσουλίνης εκ των πολυφαινολών του τσαγιού (Bryans et al, 2007). Μελέτες έχουν δείξει επίδραση της EGCG του τσαγιού στους μηχανισμούς ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2, ανασταλτική δράση στην ηπατική γλυκονεογένεση και βελτίωση της ινσουλινοευαισθησίας (Khan & Mukhtar, 2007; Jochmann & Stangl, 2008).

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Αντικείμενο της μελέτης ήταν η διερεύνηση της βιοδραστικότητας του τσαγιού και της επίδρασης διατροφικών παραγόντων σε αυτήν. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων που είχε την παρακάτω σειρά:

*Πείραμα 1:* Αρχικά μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών επιλεγμένων αφεψημάτων τσαγιού *in vitro* (Κεφάλαιο 6: «Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού *in vitro*»).

*Πείραμα 2:* Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα και η εμφάνιση πολυφαινολών στο πλάσμα εθελοντών μετά την κατανάλωση τσαγιού παρουσία ή απουσία σιδήρου (Κεφάλαιο 7: «Κλινική μελέτη για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του πλάσματος σε φαινολικά συστατικά μετά την κατανάλωση τσαγιού ή μίγματος τσαγιού και σιδήρου»).

*Πείραμα 3:* Ακολούθησε διερεύνηση της βιοδραστικότητας του τσαγιού στο παχύ έντερο, μελετώντας την αντοχή στην οξείδωση που προκαλείται από σίδηρο σε συνθήκες γαστρεντερικής πέψης (Κεφάλαιο 8: «Μελέτη των αντιοξειδωτικής ικανότητας που προκύπτει από την κατανάλωση τσαγιού στο παχύ έντερο ζώων, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σιδήρου που προέκυψαν από *in vitro* πέψη»).

*Πείραμα 4:* Έπειτα μελετήθηκε σε ποντίκια η επίδραση της κατανάλωσης τσαγιού επί 37 ημέρες στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα και στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων των ιστών. Επιπλέον διερευνήθηκε η επίδραση δύο διατροφικών παραγόντων, του λίπους και του σιδήρου, στους παραπάνω δείκτες βιοδραστικότητας (Κεφάλαιο 9: «Μελέτη σε ζώα της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και σίδηρο στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων των ιστών»).

*Πείραμα 5:* Τέλος, διερευνήθηκε σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο η μεταγευματική επίδραση του τσαγιού, παρουσία λίπους και σιδήρου, σε βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Κεφάλαιο 10: «Κλινική μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και γεύματος που περιέχει λίπος και σίδηρο σε βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο»).

Η κάθε πειραματική ενότητα και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν περιγράφονται στα κεφάλαια 6 έως 10, ενώ στο κεφάλαιο 11 γίνεται συζήτηση των αποτελεσμάτων της κάθε πειραματικής ενότητας και στο κεφάλαιο 12 συνολικός σχολιασμός της μελέτης.

## **ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑΣ**

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση των ερευνητικών εργασιών που μελετούν τα αφεψημάτα τσαγιού και αρωματικών φυτών διαπιστώνεται ότι τα αφεψημάτα αυτά εμφανίζουν βιοδραστικότητα. Αυτή εντοπίζεται τόσο στην αντιοξειδωτική τους δράση, όσο και σε άλλες δράσεις που σχετίζονται με την πρόληψη διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις (επίδραση σε γονίδια και μεταβολικά μονοπάτια). Σε προηγούμενες μελέτες μας είδαμε ότι η πρόσληψη αφεψημάτων τσαγιού αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και ορισμένων ιστών οργάνων ζώων (Koutelidakis et al, 2009; Κουτελιδάκης, 2007 (μεταπτυχιακή μελέτη)) και του πλάσματος ανθρώπων (Καράμπελλα, 2007 (μεταπτυχιακή μελέτη)). Η βιοδραστικότητα των αφεψημάτων τσαγιού, όπως η αντιοξειδωτική δράση εντός του οργανισμού, φαίνεται ότι οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Για το λόγο αυτό ήταν σημαντικό να δούμε αν η κατανάλωση τσαγιού σχετίζεται με την εμφάνιση πολυφαινόλων στο πλάσμα (Πείραμα 2).

Από την ανασκόπηση διαπιστώνεται επίσης ότι η βιοδραστικότητα του τσαγιού καθορίζεται από τη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών του, η οποία επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Αν και έχουν πραγματοποιηθεί κάποιες μελέτες, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για το ρόλο διατροφικών παραγόντων, όπως ο σίδηρος και το λίπος στη βιοπροσβασιμότητα και συνεπώς στη βιοδραστικότητα του τσαγιού. Για το λόγο αυτό επελέγη η διερεύνηση της επίδρασης του σιδήρου (Πειράματα 2 έως 5) και του λίπους (Πειράματα 4 και 5) στην αντιοξειδωτική κατάσταση και σε άλλους δείκτες βιοδραστικότητας του τσαγιού. Παράλληλα, η σύγχρονη επιστημονική έρευνα απαιτεί τη διεξοδικότερη διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων φυτοχημικών ουσιών, όπως οι πολυφαινόλες του τσαγιού, στους μηχανισμούς έκφρασης διαφόρων γονιδίων και στη ρύθμιση κυτταρικών μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με συγκεκριμένους βιοδείκτες εκφυλιστικών ασθενειών. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση επιλεγμένων γονιδίων των ιστών μετά την κατανάλωση τσαγιού (*catalase*,

*c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, *mapk-1*, *NF-kB* και *NADPHoxidase*) (Πείραμα 4). Τέλος, υπάρχει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για την κατανόηση της σημασίας της μεταγευματικής κατανάλωσης τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά στον τομέα της δευτερογενούς πρόληψης των καρδιαγγειακών παθήσεων. Γι' αυτό έλαβε χώρα κλινική μελέτη της μεταγευματικής κατανάλωσης τσαγιού σε βιοδείκτες καρδιαγγειακών παθήσεων (λιπίδια, γλυκόζη, δείκτες φλεγμονής).

## 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΦΕΨΗΜΑΤΩΝ ΤΣΑΓΙΟΥ *IN VITRO*

### 6.1. Εισαγωγή-Στόχος

Πολλά τρόφιμα και ποτά, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, και τα εκχυλίσματα βοτάνων, ειδικότερα το τσάι (*Camellia sinensis*), έχουν μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες *in vitro*. Αυτές φαίνεται ότι συνδέονται, τουλάχιστον έως ένα βαθμό, με την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις (Heim et al, 2002; Pellegrini et al, 2003; Pellegrini et al, 2006; Proestos et al, 2006; Almajano et al, 2008; Bancirova, 2010). Το τσάι είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα ποτά παγκοσμίως και υπάρχουν τρία βασικά είδη ανάλογα με την έκταση της οξείδωσης κατά την κατεργασία: Το μη ζυμούμενο (πράσινο και λευκό), το ζυμούμενο (μαύρο) και το ημιζυμούμενο τσάι (οολόνγκ) (Koo & Cho, 2004; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Όλα τα είδη τσαγιού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και ειδικότερα φλαβονοειδή, όπως οι φλαβάν-3-ολες (κατεχίνες) στο πράσινο τσάι και τα προϊόντα πολυμερισμού τους θειοφλαβίνες και θειορουβικίνες στο μαύρο τσάι (Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Das, Thakuria & Kanodia, 2008). Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των αφεψημάτων τσαγιού και η σύσταση τους σε ολικές και επιμέρους πολυφαινόλες έχουν συγκριθεί και με αφεψήματα άλλων αρωματικών φυτών και βοτάνων και έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές (Rusak et al, 2008; Tsai et al, 2008).

Στόχος αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και του περιεχομένου σε ολικά φαινολικά τεσσάρων αντιπροσωπευτικών αφεψημάτων τσαγιού *in vitro*. Δύο είδη πράσινου τσαγιού (απλό και ενισχυμένο με κατεχίνες), ένα είδος ημιζυμούμενου τσαγιού (Yellow tea) και ένα είδος μαύρου τσαγιού (Early Grey tea) αξιολογήθηκαν ως προς την ολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) και Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) και ως προς τη σύσταση σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο FOLIN.

## 6.2. Υλικά και αντιδραστήρια

Τα είδη τσαγιού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: Green tea Linea, Green tea Clear, Yellow tea, Early Grey tea (Lipton, Unilever®, The Netherlands).

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις πειραματικές διαδικασίες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε διπλά απιονισμένο νερό, ενώ όλα τα γυαλικά πλύθηκαν και τοποθετήθηκαν για 12 ώρες σε διάλυμα 1 N HCl, πριν την έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικός ζυγός και χειροκίνητες πιπέτες των 10-100 μl και των 100-1000 μl. Οι αναλύσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης απορροφήσεων 96 δειγμάτων (plate reader, Elx808) για την εφαρμογή της μεθόδου FRAP και σε φθορισμόμετρο τύπου plate reader (Victor X, Antisel, Greece) για τη μέθοδο ORAC. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων των μεθόδων FRAP και ORAC ήταν τα ακόλουθα: διάλυμα EDTA, 0,5M, PH=8, υδροχλωρικό οξύ (HCl), οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH), οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa), χλωριούχος σίδηρος (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), TPTZ (2,4,6-Tri(2-Pirydil)-s-triazine), θειικός σίδηρος (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), όξινο φωσφορικό νάτριο (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fluorescein disodium salt, Trolox και 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) (ABAP). Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες, ποτήρια ζέσεως, πιπέτες και σιφόνια, το αντιδραστήριο Folin Cioalteau και το διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% w/v. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV-vis.

## 6.3. Μέθοδοι

### 6.3.1. *In vitro* προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφεψημάτων με τη μέθοδο FRAP

Η παρασκευή των αφεψημάτων έγινε με προσθήκη 4,5 g κάθε τσαγιού σε 330 ml ζεστό νερό, παραμονή για 2 λεπτά, διήθηση σε πτυχωτό ηθμό και παραλαβή του διηθήματος.

Στόχος της μεθόδου FRAP είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, η οποία καθορίζεται από την ικανότητα αναγωγής του συμπλόκου σιδήρου Fe<sup>+3</sup>-TPTZ (2,4,6-Tri(2-Pirydil)-s-triazine). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αναγωγή του άχρωμου συμπλόκου στη χρωματισμένη μορφή ενώσεως

δισθενούς σιδήρου παρουσία των αντιοξειδωτικών φαινολικών συστατικών του δείγματος. Η μέτρηση της διαφοράς της απορρόφησης μετά από κάποιο χρόνο δείχνει την ικανότητα αναγωγής του συμπλόκου, άρα και την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Benzie & Strain, 1996). Αναφορικά με την παρασκευή των διαλυμάτων της μεθόδου FRAP το ρυθμιστικό διάλυμα 0,3 M, pH=3,6 παρασκευάστηκε έπειτα από ανάμιξη 3,1 g οξικού νατρίου και 16 ml οξικού οξέος, ώστε να ετοιμαστεί 1 L ρυθμιστικού διαλύματος, ενώ ακολούθησε έλεγχος του pH με πεχάμετρο. Το διάλυμα TPTZ, 10 mM παρασκευάστηκε σε διάλυμα HCl 40 mM. Για την παρασκευή του διαλύματος TPTZ 10 mM διαλύθηκαν 23,4 mg από το TPTZ σε 2,5 ml από το διάλυμα HCl 40 mM. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται κάθε 2 μέρες και διατηρείται στο ψυγείο. Το διάλυμα  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM παρασκευάστηκε με διάλυση 1,3525 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  σε απεσταγμένο νερό και είχε τελικό όγκο 250 ml.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου FRAP αρχικά παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο FRAP έπειτα από ανάμιξη 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος, 2,5 ml διαλύματος TPTZ και 2,5 ml διαλύματος  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται καθημερινά, πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων και διατηρείται στους 37 °C εντός θερμοστατούμενου υδατόλουτρου, ενώ μετά το πέρας των πειραμάτων απορρίπτεται. Τα διηθήματα των τσαγιών αραιώθηκαν κατάλληλα. Στη συνέχεια, σε 96 well plate έγινε τοποθέτηση 20 μl διηθήματος και 100 μl HCl για τα τυφλά και 20 μl διηθήματος και 100 μl FRAP για το δείγμα. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε 30 min στα 595 nm σε φασματοφωτόμετρο (plate reader, Elx808). Οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν, εκτός από το τυφλό που έγινε μία φορά.

Για την ποσοτικοποίηση των απορροφήσεων που προκύπτουν εκ της μέτρησης εις το plate reader κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Η καμπύλη αυτή προέκυψε εκ των σημείων που ήταν αποτέλεσμα της μέτρησης των απορροφήσεων διαλυμάτων  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  διαφόρων συγκεντρώσεων (από 100 έως 1000 μM) 30 λεπτά μετά την προσθήκη αντιδραστηρίου FRAP (20 μl από το κάθε διάλυμα συν 100 μl FRAP ή HCl) και φαίνεται στο παράρτημα I. Από την καμπύλη αυτή, μέσω αντικατάστασης του Y με τη διαφορά απορρόφησης ( $\Delta A = A_{30} - A_{\text{HCl}}$ ) και επίλυσης ως προς X και έπειτα από τις κατάλληλες αναγωγές, εκφράστηκε ποσοτικά η αντιοξειδωτική ικανότητα ως  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$  αφειγήματος.



### 6.3.2. *In vitro* προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αφηνιμάτων με τη μέθοδο ORAC

Η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) βασίζεται στην ύπαρξη ενός φθορισμομετρικού δείκτη και μιας ένωσης που παράγει ελεύθερες ρίζες. Η προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει αντιοξειδωτικά, όπως κάποιο τρόφιμο ή βιολογικό υγρό, οδηγεί σε αναστολή της φθοράς φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας, η οποία υπολογίζεται με χρήση φθορισμομέτρου. Η εφαρμογή της μεθόδου και οι απαραίτητοι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με τους Huang et al (2002).

Αναφορικά με την παρασκευή των διαλυμάτων της μεθόδου ORAC αρχικά παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer, pH=7,4) με ανάμειξη 800 ml διαλύματος  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  75 mM με 200 ml διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  75 mM. Για την παρασκευή διαλύματος Trolox 1 mM προστέθηκαν 25 mg Trolox σε 100 ml phosphate buffer. Το τελικό διάλυμα της ουσίας φθορισμού (fluorescein) προέκυψε από ανάμειξη 800 μl fluorescein stock solution με 50 μl phosphate buffer και διατηρείτο στους 37 °C μέχρι τη χρήση. Το fluorescein stock solution παρασκευάστηκε με προσθήκη 22,5 mg fluorescein disodium salt σε 100 ml phosphate buffer και προσθήκη 50 μl αυτού του διαλύματος σε 10 ml phosphate buffer. Το διάλυμα ABAP παρασκευάζονταν ακριβώς πριν τη χρήση με προσθήκη 162 mg ABAP σε 5 ml phosphate buffer που είχε επωαστεί για 5 min στους 25 °C.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ORAC, μετά από αραιώση του κάθε δείγματος 1:50, προστέθηκαν 20 μl δείγματος ή 20 μl 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) σε 200 μl fluorescein ( $8,16 \cdot 10^{-5}$  mM) εντός 96-well plate. Μετά από επώαση για 20 min στους 37 °C, προστέθηκαν 20 μl ABAP (119,4 μmol/ml) και αμέσως το plate τοποθετήθηκε στο φθορισμόμετρο και μετρήθηκε ο φθορισμός 35 φορές στους 37 °C, με διαφορά ενός λεπτού ανά μέτρηση. Για την πρότυπη καμπύλη Trolox, σε άλλο plate τοποθετούνταν 20 μl 75 mM phosphate buffer σε κάποιες θέσεις και σε κάποιες άλλες διαλύματα Trolox διαφόρων συγκεντρώσεων (5, 12,5, 25 και 50 μM) εις τριπλούν και εφαρμόζονταν η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για τα δείγματα.

Για κάθε συγκέντρωση Trolox υπολογίζονταν η τιμή AUC (Area Under the Curve) εκ του τύπου:  $AUC = 0,5 + F_1/F_0 + \dots + F_i/F_0 + \dots + F_{34}/F_0 + 0,5(F_{35}/F_0)$ , όπου  $F_0$  η μέτρηση φθορισμού τη χρονική στιγμή 0 (αρχική μέτρηση) και  $F_i$  η μέτρηση φθορισμού τη χρονική στιγμή  $i$ . Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζονταν η τιμή AUC για το μέσο όρο των τιμών φθορισμού του ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer (blank). Για κάθε συγκέντρωση Trolox υπολογίζονταν το  $netAUC = AUC - AUC_{blank}$ . Έπειτα,

κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη που έχει εις τον άξονα X τις Trolox και εις τον Y τα netAUC. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παράρτημα I. Από την προκύπτουσα γραμμική εξίσωση της πρότυπης καμπύλης υπολογίζονταν οι τιμές ORAC (μmol ισοδύναμων Trolox ανά ml) του κάθε διηθήματος, βάζοντας όπου Y την αντίστοιχη τιμή netAUC=AUC-AUCblank κάθε δείγματος και λύνοντας ως προς X.

### **6.3.3. *In vitro* προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των αφεψημάτων τσαγιού με τη μέθοδο FOLIN**

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των διηθημάτων έγινε με τη μέθοδο Folin Ciocalteu (Spanos & Wrolstand, 1990). Η μέθοδος αυτή περιγράφει τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών. Τα ολικά φαινολικά προσδιορίζονται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (UV-vis) διπλής δέσμης, με το οποίο γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 765nm. Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος σε φωσφορομολυβδενικό/φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, μπλε-πράσινου χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 3 ml διηθήματος τσαγιού μετά από κατάλληλη αραιώση και ακολούθησε vortex για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,5 ml διαλύματος Folin Ciocalteu και 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. Το Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστέθηκε μετά από 1 min για να αποφευχθεί ο αφρισμός. Για την παρασκευή του διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% έγινε προσθήκη 7,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> σε φιάλη των 100 ml και συμπλήρωση με νερό μέχρι τη χαραγή. Εν συνεχεία, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 30 min και ακολούθησε παραλαβή του υπερκειμένου και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-Vis) με χρήση κιβετών 1 cm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε η υδατική ακετόνη 50%, με την οποία γίνεται μηδενισμός. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg γαλλικού οξέος ανά ml διηθήματος, μετά την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, η οποία φαίνεται στο παράρτημα I.

## **6.4. Στατιστική επεξεργασία**

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος SPSS (SPSS V13.0). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± τυπική απόκλιση, ενώ στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές με P<0,005. Οι διαφορές ανάμεσα στα είδη τσαγιού αξιολογήθηκαν με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA (One

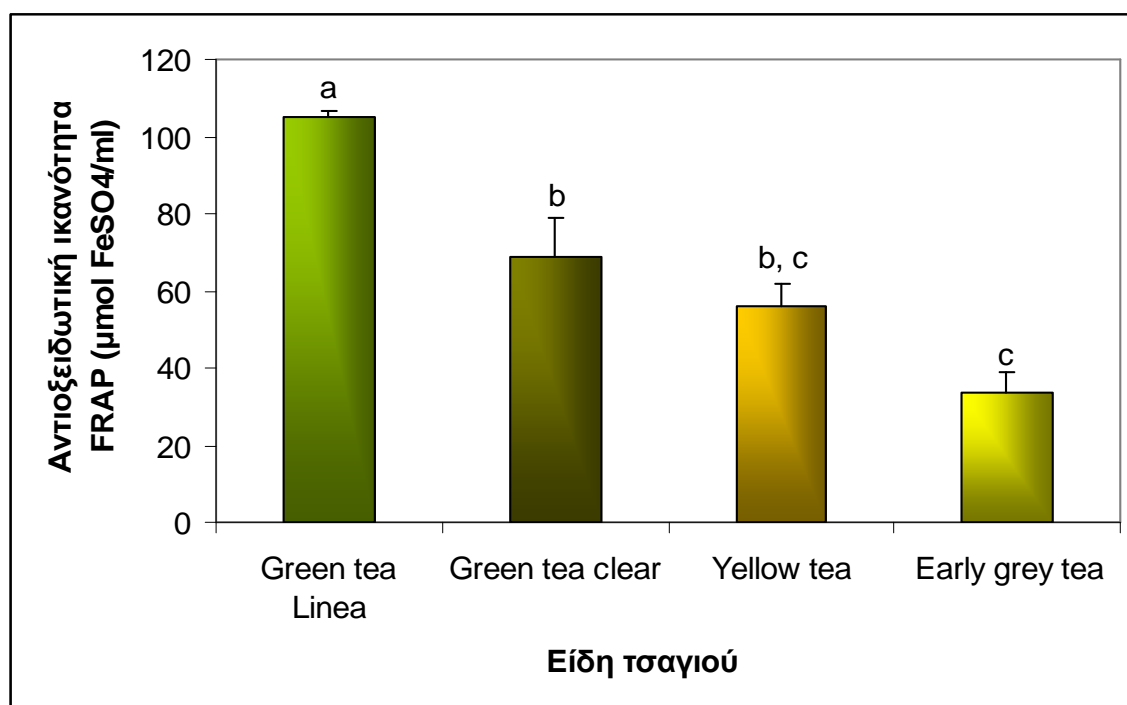
way Anova) και χρήση του Bonferroni posttest. Οι συσχετίσεις αξιολογήθηκαν με το Spearman test.

## 6.5. Αποτελέσματα

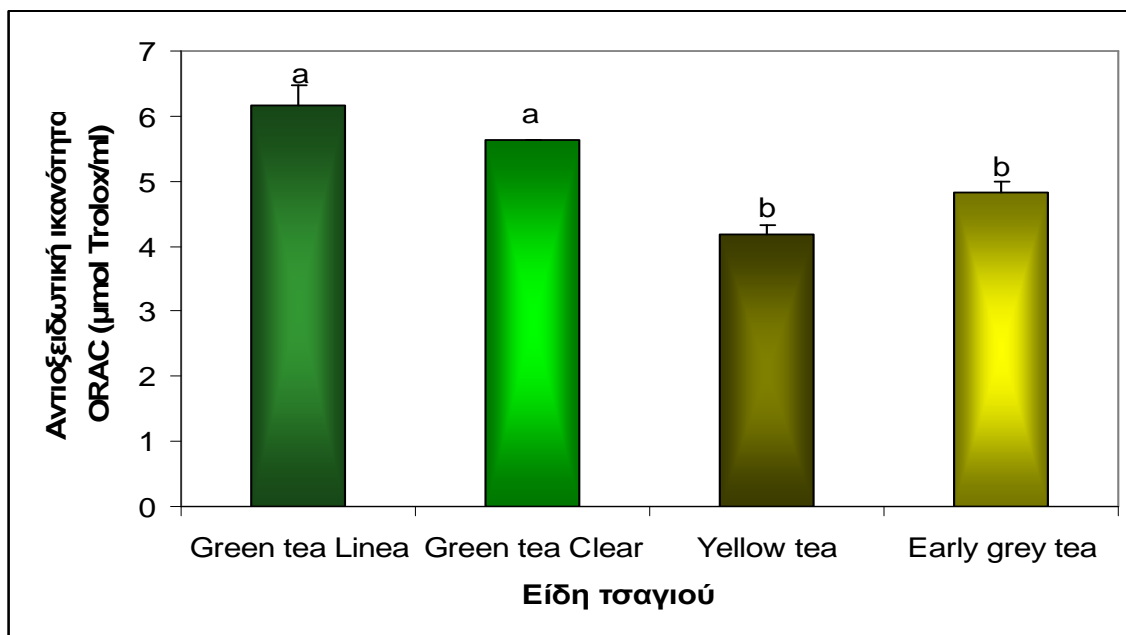
Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών των αφεψημάτων τσαγιού φαίνονται στον Πίνακα 6.1 και στα Σχήματα 6.1, 6.2. και 6.3. Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έδειξε ότι το ενισχυμένο με κατεχίνες πράσινο τσάι (Green tea Linea) εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το απλό πράσινο τσάι (Green tea clear) όταν αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP ( $P=0,006$ ), ενώ με τη μέθοδο ORAC οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $P=0,153$ ). Τόσο η μέθοδος FRAP, όσο και η μέθοδος ORAC έδειξαν ότι το ενισχυμένο πράσινο τσάι είχε σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο από το Yellow tea ( $P=0,02$  για FRAP και ORAC), όσο και από το μαύρο τσάι Early grey ( $P=0,01$  για τη FRAP και  $P=0,07$  για την ORAC). Το απλό πράσινο τσάι εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το Yellow και το Early grey ( $P<0,05$ ), ενώ τα δύο τελευταία εμφάνισαν διαφορές μόνο με τη μέθοδο FRAP ( $P=0,049$ ). Τέλος, το ενισχυμένο πράσινο τσάι είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά σε σχέση με τα άλλα τρία είδη. Το απλό πράσινο, το ημιζυμώμενο και το μαύρο δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές ως προς τη σύστασή τους σε ολικά φαινολικά συστατικά ( $P<0,05$ ). Οι μέθοδοι FRAP και ORAC εμφάνισαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ( $P=0,021$ , Correlation Coefficient=0,786), ενώ δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τη μέθοδο FOLIN ( $P=0,208$ , Correlation Coefficient=0,392 για τη FRAP και  $P=0,610$ , Correlation Coefficient=0,214 για την ORAC).

Πίνακας 6.1. Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδοι FRAP και ORAC) και ολικά φαινολικά συστατικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) των διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη υποδεικνύουν διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .

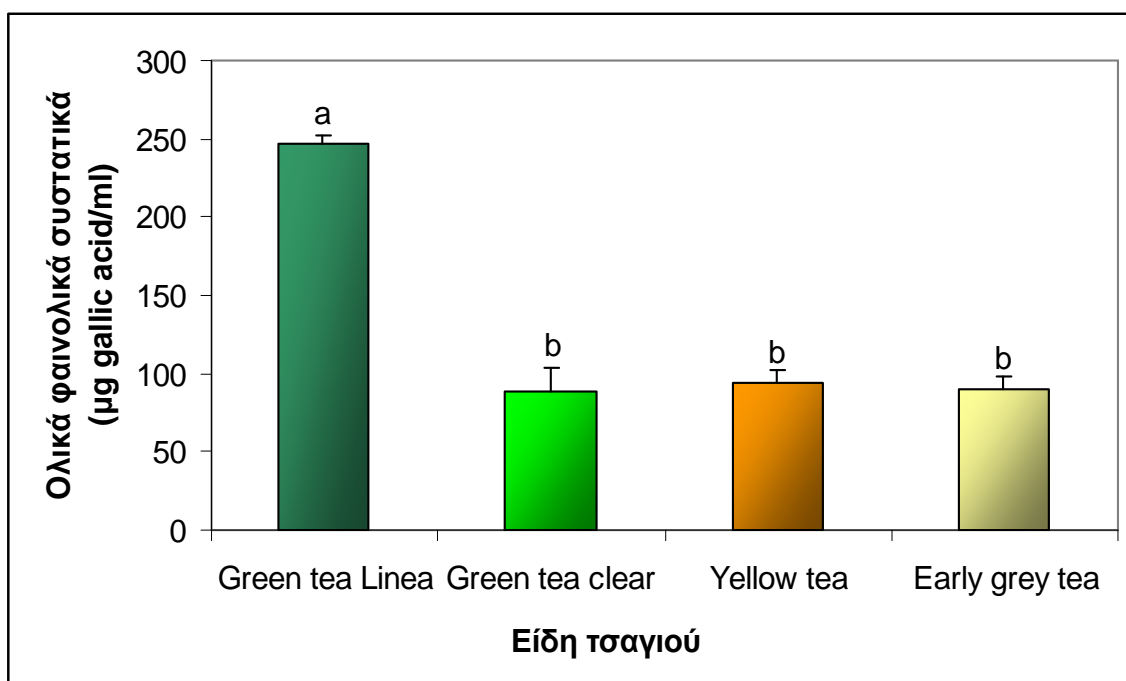
Είδη τσαγιού	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$ )	ORAC ( $\mu\text{mol Trolox}/\text{ml}$ )	FOLIN ( $\mu\text{g gallic acid}/\text{ml}$ )
Green tea Linea	104,98 $\pm$ 1,45a	6,15 $\pm$ 0,31a	246,57 $\pm$ 6,19a
Green tea Clear	68,65 $\pm$ 10,41b	5,63 $\pm$ 0,006a	88,88 $\pm$ 14,28b
Yellow tea	56,11 $\pm$ 5,65b,c	4,19 $\pm$ 0,12b	93,44 $\pm$ 8,96b
Early Grey tea	33,45 $\pm$ 5,48c	4,82 $\pm$ 0,1b	99,20 $\pm$ 7,88b



Σχήμα 6.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα των 4 ειδών τσαγιού μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$  αφεψήματος. Οι τιμές κάθε ράβδου αντιστοιχούν στο μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .



Σχήμα 6.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα των 4 ειδών τσαγιού μετρούμενη με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), εκφρασμένη σε μmol Trolox/ml αφεψήματος. Οι τιμές κάθε ράβδου αντιστοιχούν στο μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .



Σχήμα 6.3. Ολικά φαινολικά συστατικά των 4 ειδών τσαγιού μετρούμενα με τη μέθοδο FOLIN, εκφρασμένα σε μg γαλλικού οξέος/ml αφεψήματος. Οι τιμές κάθε ράβδου αντιστοιχούν στο μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .

## **7. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΣΑΓΙΟΥ Ή ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟΥ**

### **7.1. Εισαγωγή-Στόχος**

Η βιοδραστικότητα του τσαγιού φαίνεται ότι καθορίζεται από τη δυνατότητα των αντιοξειδωτικών του συστατικών να περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος και εν συνεχεία στους ιστούς (Scalbert et al, 2002). Η δυνατότητα αυτή, η οποία καθορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα τους, είναι πιθανό να επηρεάζεται από διατροφικούς παράγοντες όπως ο σίδηρος (Manach et al, 2004). Σε αυτή την πειραματική ενότητα διεξήχθη προκαταρκτικό πείραμα που είχε ως στόχο την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους φαινολικών συστατικών στο αίμα υγιών ατόμων που κατανάλωσαν τσάι παρουσία ή απουσία σιδήρου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος διασταυρούμενης, τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης στην οποία συμμετείχαν 10 υγιείς εθελόντριες που κατανάλωσαν λευκό τσάι με ή χωρίς παρουσία σιδήρου. Η υπόθεση που διερευνήθηκε ήταν εάν η κατανάλωση τσαγιού οδηγεί σε ταχεία εμφάνιση επιμέρους πολυφαινολών στο ανθρώπινο πλάσμα και εάν αυτή η εμφάνιση επηρεάζεται από την παρουσία σιδήρου λόγω πιθανής δημιουργίας συμπλοκών ανάμεσα στο σίδηρο και τις πολυφαινόλες. Η επιβεβαίωση μιας τέτοιας υπόθεσης, σε συνδυασμό με δεδομένα από τη βιβλιογραφία, θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρατηρείται μετά την κατανάλωση τσαγιού εντός του οργανισμού καθώς και τη μείωση αυτής παρουσία σιδήρου (Karabella, 2002).

### **7.2. Πειραματικός σχεδιασμός**

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής του νοσοκομείου «Ευαγγελισμός» και ήταν, εν συντομία, το εξής: 10 υγιείς εθελόντριες προσήλθαν στο νοσοκομείο μετά από ολονύχτια νηστεία, τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες των 5 ατόμων και έλαβαν 300 ml λευκό τσάι ή 300 ml λευκό τσάι με σίδηρο. Πριν την κατανάλωση του τσαγιού και 30 min, 60 min και 90 min μετά από αυτήν ελήφθησαν 4 ml αίματος εντός σωλήνα με EDTA. Μετά από μια εβδομάδα, οι εθελόντριες προσήλθαν ξανά και αυτές που είχαν λάβει το τσάι έλαβαν το τσάι με σίδηρο και

αντίστροφα, στα πλαίσια διασταυρούμενου σχεδιασμού (crossover design). Οι εθελόντριες είχαν ενημερωθεί ώστε να αποφύγουν για μια εβδομάδα πριν την κάθε παρέμβαση όλα τα πλούσια σε πολυφαινόλες τρόφιμα (μούρα, δαμάσκηνα, ρόδια, φράουλες, σοκολάτα, κόκκινο κρασί, τσάι κ.α.).

Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν και ακολούθησε ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους πολυφαινολών του πλάσματος με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

### **7.3. Υλικά και αντιδραστήρια**

Το εκχύλισμα λευκού τσαγιού παρασκευάστηκε με προσθήκη 6 g λευκού τσαγιού (White tea, Lipton, Unilever®, The Netherlands) σε 300 ml βραστού νερού για 5 min και ακολούθησε διήθηση. Το εκχύλισμα με σίδηρο παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο με διαφορά την προσθήκη 30 mg γαλακτικού σιδήρου (24% iron, Ferrous Lactate®, Jost Chemical, Namur, Belgium). Αυτή η ποσότητα αντιστοιχεί σε περίπου 7 mg σίδηρο, ποσό που προσομοιάζει με τη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (DRI) που είναι 15 mg.

Σε αυτή την πειραματική ενότητα χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο (acetonitrile, Merk), trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich), ειδικά φίλτρα milipore filters (Millex-HV, Merk) και πρότυπες φαινολικές ουσίες. Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: γαλλικό οξύ (gallic acid), π-κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid), βανιλικό οξύ (vanillic acid), καφεϊκό οξύ (caffeic acid), κατεχίνη ((+)-catechin), κερσετίνη (quercetin), πρωτοκατεχινικό οξύ (protocatechuic acid), επιγαλλοκατεχίνη (epigallocatechin), επικατεχίνη (epicatechin), π-υδροβενζοϊκό οξύ (p-hydrobenzoic acid), συριγικό οξύ (syringic acid) και φερουλικό οξύ (ferulic acid) (Sigma-Aldrich).

### **7.4. Μέθοδοι**

#### **7.4.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

Τα επιμέρους φαινολικά συστατικά του πλάσματος προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης. 1 ml κάθε δείγματος πλάσματος αναμίχθηκε με

5 ml ακετονουτρίλιο και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 min στις 6000xg. Το υπερκείμενο εισήλθε μέσω σύριγγας εντός φίλτρου διαμέτρου 0,25 μm (milipore filters, Millex-HV) και συλλέχθηκε σε φιαλίδιο. Στη συνέχεια, 20 μl δείγματος εισήλθαν στον υγρό χρωματογράφο. Το σύστημα HPLC αποτελούνταν από έναν υψηλής απόδοσης υγρό χρωματογράφο (JASCO LG-1580-02), ο οποίος αποτελούνταν από μια αντλία χαμηλής πίεσης και ένα σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της συστάσεως της κινητής φάσεως, ενώ είχε προσαρμοσμένο έναν φθορισμομετρικό ανιχνευτή (fluorescence detector Jasco FP-920). Τα δεδομένα της ανάλυσης αξιολογήθηκαν μέσω ενός λογισμικού προγράμματος JASCO Data system DP-L910/V. Ο διαχωρισμός έλαβε χώρα μέσω στήλης Waters Spherisorb® 5 μm ODS2 4.6 mmX250 mm. Η κινητή φάση αποτελούνταν από trifluoroacetic acid σε νερό (0.5 ml/L, διαλύτης A) και trifluoroacetic acid σε ακετονουτρίλιο (0.5 ml/L, διαλύτης B). Το πρόγραμμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 91% A, 9% B 0–10 min, 75% A, 25% B 10–20 min, 50% A, 50% B 20–30 min, 0% A, 100% B 30–40 min, 91% A, 9% B 40–60 min. Ο ρυθμός ροής ήταν 1 ml/min και η ενέσιμη ποσότητα ήταν 20 μl. Το μήκος κύματος ήταν 280 nm για τα φαινολικά οξέα, 320 nm για τις φλαβόνες και 370 nm για τις φλαβονόλες (Wollgast & Anklam, 2000).

#### **7.4.2. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών του πλάσματος (μέθοδος εξωτερικών προτύπων)**

Πρότυπα διαλύματα των φαινολικών ενώσεων γαλλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κατεχίνη, κερσετίνη, πρωτοκατεχινικό οξύ, επιγαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη, π-υδροβενζοϊκό οξύ, συριγγικό οξύ και φερουλικό οξύ παρασκευάστηκαν εντός υδατικής μεθανόλης 50% σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.5 έως 150 ppm. Στη συνέχεια, οι πρότυπες ουσίες διαφόρων συγκεντρώσεων περάστηκαν από το χρωματογράφο και σημειώθηκαν οι χρόνοι κατακράτησης (tR, retention time) και τα εμβαδά (area). Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη για κάθε φαινολική ένωση. Επίσης, το μίγμα των προτύπων ουσιών περάστηκε από το χρωματογράφο και προέκυψε χρωματογράφημα που δείχνει το χρόνο κατακράτησης και τη μορφή της κορυφής για κάθε φαινολική ένωση.

Η ανίχνευση κάθε φαινολικού συστατικού στα δείγματα πλάσματος των εθελοντριών βασίστηκε στη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης (tR) και του μήκους κύματος στο οποίο παρουσίασε το μέγιστο απορρόφησης με τα αντίστοιχα των



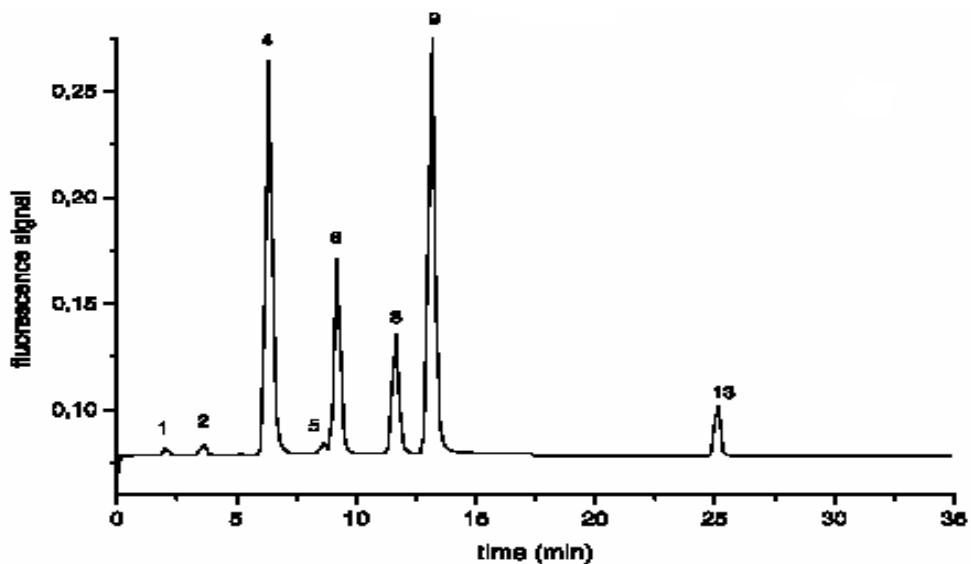
προτύπων ουσιών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο των εξωτερικών προτύπων (Hollman & Katan, 1997). Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης κάθε ουσίας και το εμβαδό του χρωματογραφήματος κάθε δείγματος έγινε η ποσοτικοποίηση των επιμέρους φαινολικών του πλάσματος κάθε ατόμου για κάθε χρονική στιγμή, βάζοντας όπου Y το εμβαδό (area) και λύνοντας ως προς X..

## 7.5. Αποτελέσματα

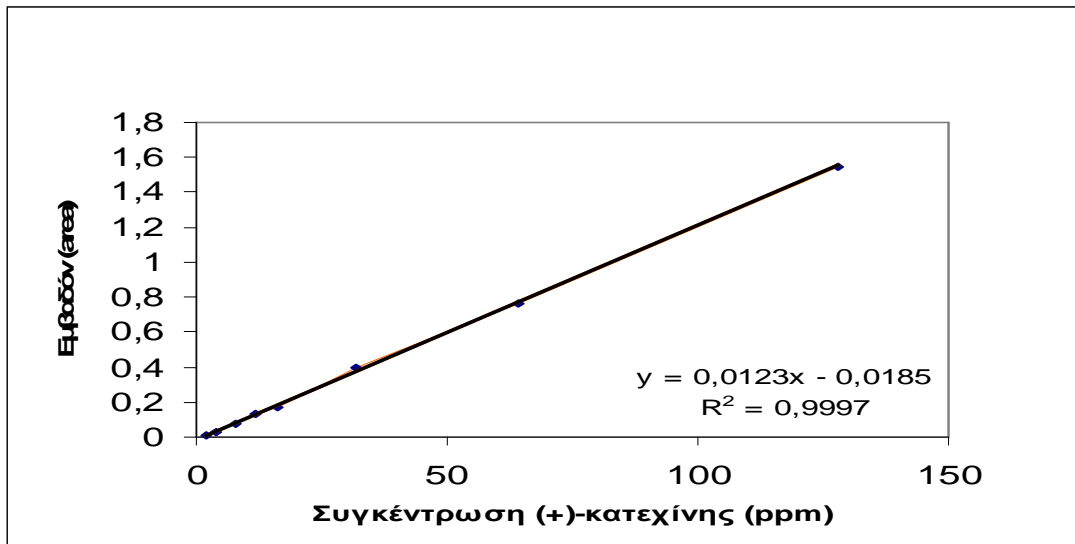
Στον Πίνακα 7.1 και στο Σχήμα 7.1 φαίνονται οι χρόνοι κατακράτησης και οι μορφές των κορυφών των χρωματογραφημάτων μετά την είσοδο των προτύπων ουσιών εντός του υγρού χρωματογράφου. Στο Σχήμα 7.2 φαίνεται ένα παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για την περίπτωση της (+)-κατεχίνης. Οι υπόλοιπες πρότυπες καμπύλες των φαινολικών ενώσεων φαίνονται στο Παράρτημα II.

**Πίνακας 7.1. Χρόνοι κατακράτησης και μήκη κύματος (excitation/emission) μετά την είσοδο των προτύπων πολυφαινολών εντός του χρωματογράφου.**

Πολυφαινόλες	$t_R$ (min)	Μήκη κύματος ( $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ )
Γαλλικό οξύ	2.4	280/360
Πρωτοκατεχινικό οξύ	3.3	280/360
Επιγαλλοκατεχίνη	7.3	280/360
π-υδροβενζοϊκό οξύ	7.9	280/360
(+)-κατεχίνη	8.5	280/360
Βανιλλικό οξύ	9.7	280/360
Καφεϊκό οξύ	9.9	260/420
Συριγγικό οξύ	11.6	280/360
(-)-επικατεχίνη	12.3	280/360
Π-κουμαρικό οξύ	12.8	260/420
Φερουλικό οξύ	13.9	260/420
Κερσετίνη	24.6	260/420



Σχήμα 7.1. Χρωματογράφημα ενός μίγματος προτύπων πολυφαινολών γνωστής συγκέντρωσης: 1.Γαλλικό οξύ, 2. Πρωτοκατεχινικό οξύ, 4. Κατεχίνη, 5. Βανιλλικό οξύ, 6. Καφεϊκό οξύ, 8. Συριγγικό οξύ, 9. Επικατεχίνη, 13. Κερσετίνη. Φαίνονται οι χρόνοι κατακράτησης και η μορφή του χρωματογραφήματος κάθε ουσίας.



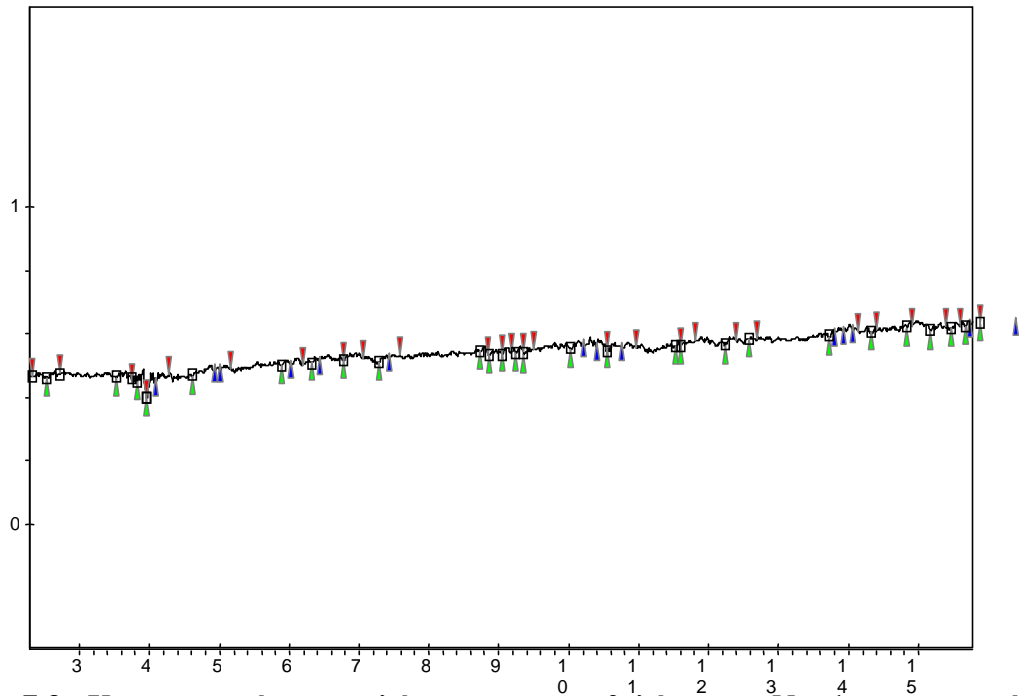
Σχήμα 7.2. Πρότυπη καμπύλη (+)-κατεχίνης

Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλες διακυμάνσεις ανάμεσα στο πλάσμα των ατόμων, τόσο στα ποιοτικά, όσο και στα ποσοτικά χαρακτηριστικά των χρωματογραφημάτων. Συνεπώς, ήταν δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Παραταύτα, κατέστη δυνατή η εξαγωγή κάποιων χρήσιμων συμπερασμάτων. Στα

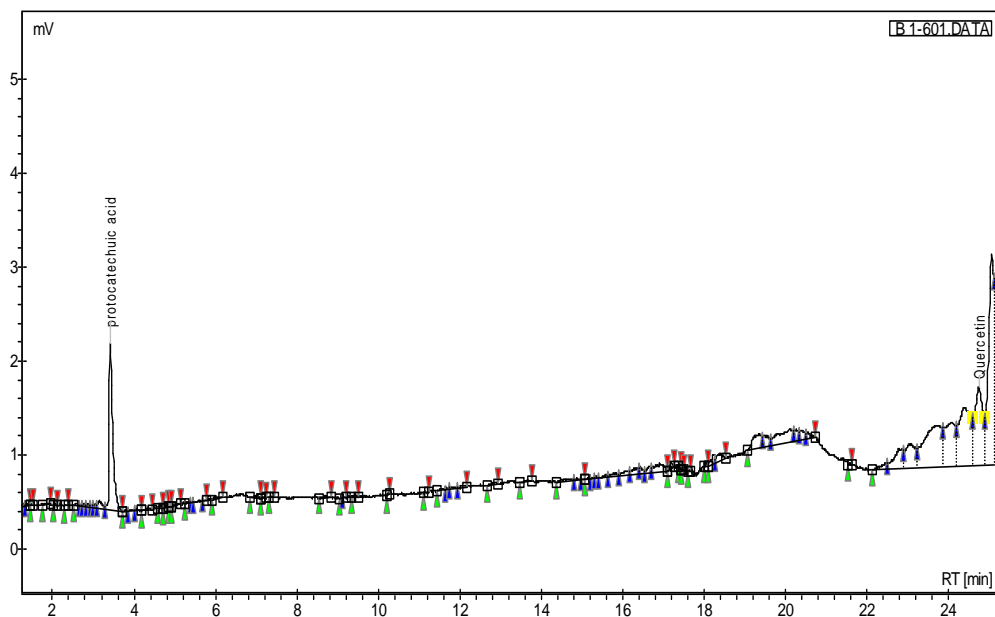
χρωματογραφήματα των δειγμάτων πλάσματος που προέκυψαν μετά την κατανάλωση του τσαγιού, ταυτοποιήθηκαν περισσότερα φαινολικά συστατικά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλες τις χρονικές στιγμές, σε σύγκριση με αυτά που προέκυψαν μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο. Οι φαινολικές ενώσεις πρωτοκατεχινικό οξύ, επιγαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη, π-υδροβενζοϊκό οξύ, συριγλικό οξύ και φερουλικό οξύ δεν προσδιορίστηκαν στο πλάσμα μετά την κατανάλωση του τσαγιού ή προσδιορίστηκαν σε ίχνη. Οι φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο πλάσμα των 7 από τα 10 άτομα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν η κερσετίνη, το βανιλλικό οξύ και η κατεχίνη. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανίστηκαν το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το π-κουμαρικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα μετά την κατανάλωση του τσαγιού κυμάνθηκαν από 8.53 μέχρι 26.00 ppm για την κερσετίνη, από 0.85 μέχρι 632.96 ppm για το βανιλλικό οξύ, από 2.72 μέχρι 3.94 ppm για την κατεχίνη, από 0.05 μέχρι 0.16 ppm για το καφεϊκό οξύ και από 0.16 μέχρι 0.26 ppm για το γαλλικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο ήταν χαμηλότερες σε σχέση με αυτές μετά την κατανάλωση του τσαγιού. Συγκεκριμένα, κυμάνθηκαν από 1.64 μέχρι 13.52 ppm για την κερσετίνη, από 1.54 μέχρι 289.40 ppm για το βανιλλικό οξύ, από 1.54 μέχρι 4.26 ppm για την κατεχίνη, από 0.15 μέχρι 5.02 ppm για το φερουλικό οξύ και από 0.16 μέχρι 1.16 ppm για το γαλλικό οξύ. Στον πίνακα 7.2 φαίνονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των πολυφαινολών για κάθε χρονική στιγμή. Στα σχήματα 7.3 με 7.5 φαίνονται μερικά χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα που προέκυψαν.

**Πίνακας 7.2. Συγκεντρώσεις των κυριότερων πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν έπειτα από την κατανάλωση τσαγιού παρουσία ή απουσία σιδήρου. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο των συγκεντρώσεων κάθε φαινολικής ένωσης των 10 ατόμων για κάθε χρονική στιγμή μετά από την κάθε παρέμβαση.**

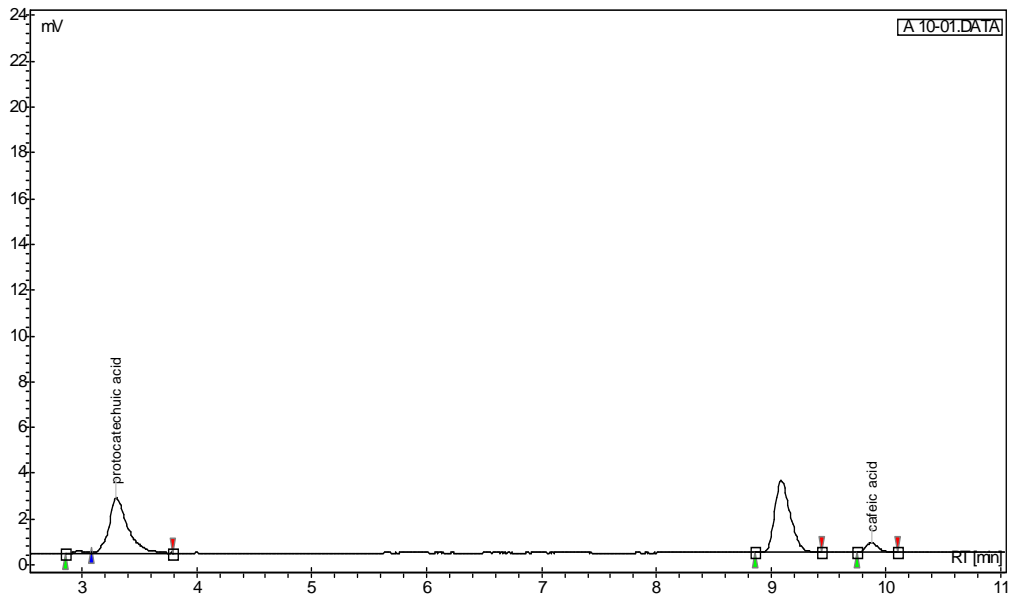
<i>ppm</i>	ΤΣΑΙ				ΤΣΑΙ+Fe			
	0min	30min	60min	90min	0min	30min	60min	90min
Κερσετίνη	-	15,82	7,36	11	-	8,14	7,82	6,05
Βανιλλικό οξύ	-	7,39	3,06	211,87	-	289,49	1,54	-
Γαλλικό οξύ	-	0,16	0,93	0,31	-	-	0,73	-
(+)-κατεχίνη	-	4,34	2,72	-	-	-	4,2	8
Καφεϊκό οξύ	0,12	0,15	0,15	-	-	1,29	-	5,02
Π-κουμαρικό οξύ	-	0,28	-	22,38	-	-	-	0,02



Σχήμα 7.3. Χρωματογράφημα πλάσματος της εθελόντριας No 1 τη χρονική στιγμή  $t=0$  (baseline) της πρώτης αιμοληψίας.



Σχήμα 7.4. Χρωματογράφημα πλάσματος εθελόντριας No 1 60 λεπτά μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο. Αριστερά διακρίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτοκατεχινικό οξύ και δεξιά η κορυφή που αντιστοιχεί στην κερσετίνη.



**Σχήμα 7.5.** Χρωματογράφημα πλάσματος εθελόντριας Νο 1 30 λεπτά μετά την κατανάλωση τσαγιού. Αριστερά διακρίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτοκατεχινικό οξύ και δεξιά η κορυφή που αντιστοιχεί στο καφεϊκό οξύ.

Κάνοντας μια πιο αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων για κάθε εθελόντρια δυνάμεθα να παρατηρήσουμε τα εξής:

- Η ουσία που ανιχνεύεται πιο συχνά από όλες και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι η κερσετίνη. Ακολουθεί το βανιλικό οξύ και μετά το γαλλικό, η κατεχίνη, το καφεϊκό και το κουμαρικό. Στις εθελόντριες 3, 5 και 7 η κερσετίνη εμφανίζεται στα 30 min μετά την κατανάλωση τσαγιού, ενώ στα 60 min φτάνει σε μία μέγιστη συγκέντρωση και στα 90 min δεν εμφανίζεται καθόλου (πχ εθελόντριες 3, 5 και 7).
- Η εθελόντρια 1 εμφανίζει στο πλάσμα κατεχίνη, κουμαρικό, κερσετίνη και βανιλικό μετά την κατανάλωση τσαγιού, ενώ μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο εμφανίζεται μόνο η κερσετίνη.
- Η εθελόντρια 2 εμφανίζει στο πλάσμα κερσετίνη και γαλλικό μετά την λήψη τσαγιού, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι εμφανίζει της ουσίες αυτές μετά τη λήψη τσαγιού με σίδηρο.
- Η εθελόντρια 5 εμφανίζει στο πλάσμα βανιλικό, καφεϊκό και γαλλικό πριν, ενώ δεν τα εμφανίζει μετά την προσθήκη σιδήρου εις το τσάι. Στο κουμαρικό η συγκέντρωση στα 90 min βρέθηκε πολύ μειωμένη μετά τη λήψη τσαγιού με σίδηρο, σε σχέση με πριν.

- Η εθελόντρια 7 εμφανίζει στο αίμα της γαλλικό και κερσετίνη σε επίπεδα μεγαλύτερα πριν την κατανάλωση του μίγματος σιδήρου με τσάι, σε σχέση με μετά.
- Στην εθελόντρια 8, με εξαίρεση την κερσετίνη, κάποιες φαινολικές ενώσεις που δεν ανιχνεύτηκαν μετά την κατανάλωση τσαγιού, ανιχνεύτηκαν μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο.
- Στην εθελόντρια 9 το καφεϊκό και η κατεχίνη που εμφανίζονται 60 min μετά την κατανάλωση τσαγιού, δεν εμφανίζονται καθόλου 60 min μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο, ενώ η κερσετίνη εμφανίζεται αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση.

## **8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΣΑΓΙΟΥ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ ΖΩΩΝ, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΨΗΛΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ *IN VITRO* ΠΕΨΗ**

### **8.1. Εισαγωγή-Στόχος**

Οι διατροφικοί παράγοντες και συγκεκριμένα ο διαιτητικός σίδηρος φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο παχύ έντερο. Ο σίδηρος που βρίσκεται σε πολλά εμπλουτισμένα τρόφιμα, όταν δεν απορροφάται επαρκώς και παραμένει στον εντερικό σωλήνα, δύναται να προωθήσει οξειδωτικές διαδικασίες στο παχύ έντερο, οι οποίες συνδέονται με διάφορες ασθένειες του γαστρεντερικού σωλήνα (Siegers et al, 1988; Babbs, 1990; Lund et al, 1999; Lund et al, 2001). Αν και υπάρχουν επαρκή επιστημονικά στοιχεία που δείχνουν ότι ο σίδηρος προωθεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss (Jakob, 1995; Βαλαβανίδης, 2003), τα δεδομένα για τις οξειδωτικές δράσεις των διαφόρων ενώσεων σιδήρου που χρησιμοποιούνται στον εμπλουτισμό των τροφίμων είναι περιορισμένα (Huma & Salim, 2007; Sun, Huang & Li, 2007). Παράλληλα, αρκετές μελέτες δείχνουν πιθανή προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών συστατικών της διατροφής έναντι των οξειδώσεων που λαμβάνουν χώρα στο παχύ έντερο (Serafini et al, 2002). Οι Lund et al (2001) έδειξαν σε ποντίκια ότι η επί μακρό έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου αύξησε τα λιπιδικά υδροπεροξειδία στο παχύ έντερο, ενώ το φυτικό οξύ εμφάνισε αντιοξειδωτική δράση στον εντερικό σωλήνα.

Αυτή η πειραματική ενότητα είχε ως στόχο τη διερεύνηση σε ποντίκια της επίδρασης μιας διατροφής ενισχυμένης με εκχυλίσματα τσαγιού και του αρωματικού φυτού Πελαργόνιο στις οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο παχύ έντερο. Η επιλογή της διεξαγωγής αυτού του πειράματος έγινε εξαιτίας του συνεχώς αυξανόμενου επιστημονικού ενδιαφέροντος για τις οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον εντερικό σωλήνα και τους παράγοντες που τις επηρεάζουν. Η υπόθεση που διερευνήθηκε ήταν εάν τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τα εκχυλίσματα βοτάνων μπορούν να αποτρέψουν τις οξειδωτικές διαδικασίες που δύναται να λάβουν χώρα στο παχύ έντερο λόγω του μη απορροφημένου σιδήρου της διατροφής. Για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης ιστοί παχέος εντέρου ποντικών που ελάμβαναν επί 5 ημέρες 3 εκχυλίσματα (πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού και

Πελαργόνιου) ή κατεχίνη ή νερό επώαστηκαν παρουσία διαφόρων μορφών σιδήρου προερχόμενων από διαδικασία *in vitro* πέψης. Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν τα προϊόντα οξειδωσης με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) και έγινε εκτίμηση της ευαισθησίας των ιστών στις οξειδωτικές διαδικασίες.

## 8.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Το πρωτόκολλο της μελέτης συντάχθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του Οργανισμού του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από αρμόδια επιτροπή της Νομαρχίας Αττικής. 25 αρσενικά ποντίκια, είδους C57/BL6, ηλικίας 3 μηνών και βάρους περίπου 20g έκαστο, αγοράστηκαν από το Ινστιτούτο Βιοιατρικών ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» (Βάρη, Αττική). Τα ποντίκια τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά κλουβιά εντός ειδικής αίθουσας ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας και με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12 ώρες, όπως ακριβώς περιγράφεται και για τα ζώα της πειραματικής ενότητας 9. Όλα τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και σε μία τυπική διατροφή για τρωκτικά υπό μορφή παλετών (Altromin 1324, Chr. Petersen, Ringsted, Denmark). Η δίαιτα αυτή περιείχε 40 g λίπος/kg, 190 g πρωτεΐνη/kg, 70 g ίνες/kg και 11.9 MJ ενέργεια/kg. Έπειτα από περίοδο 3 ημερών εγκλιματισμού, τα ποντίκια ζυγίστηκαν και χωρίστηκαν σε 5 ομάδες των 5 ζώων, έτσι ώστε κάθε ομάδα να έχει παρόμοιο μέσο όρο βάρους ( $21.6 \pm 0.1$  g). Οι 5 ομάδες τυχαιοποιήθηκαν ώστε να λαμβάνουν εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού ή λευκού τσαγιού ή Πελαργόνιου (*Pelargonium purpureum*) ή κατεχίνης ή νερού (ομάδα ελέγχου).

Το πείραμα διήρκεσε 5 συνεχείς ημέρες. Κάθε ζώο ελάμβανε καθημερινώς 0,1 ml κάθε εκχυλίσματος ή νερού με την τεχνική εναπόθεσης στον οισοφάγο με σύριγγα (by gavage). Το απόγευμα της τέταρτης ημέρας αφαιρέθηκε η τροφή από τα κλουβιά και περίπου 12 ώρες αργότερα, το πρωί της πέμπτης μέρας, τα ζώα έλαβαν την τελευταία δόση των εκχυλισμάτων, όπως τις προηγούμενες ημέρες. 30 λεπτά μετά την τελευταία δόση τα ζώα ζυγίστηκαν και ακολούθησε ευθανασία εντός ξηρού πάγου. Αμέσως μετά την ευθανασία ακολουθούσε νεκροψία κάθε ζώου και λήψη τμήματος του παχέος εντέρου (κόλον). Ο ιστός εκπλύνονταν σε διάλυμα PBS (phosphate buffer saline, Ph=6,8) και με σύριγγα αποβάλλονταν το εσωτερικού του εντέρου. Στη συνέχεια ζυγίζονταν και αμέσως καταψύχονταν εντός υγρού αζώτου. Περίπου 2 ώρες μετά τη νεκροψία, οι ιστοί ξεπαγώθηκαν και ομογενοποιήθηκαν



παρουσία τριπλάσιας ποσότητας PBS. Οι ομογενοποιημένοι ιστοί φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 13000 στροφές, στους 4 °C. Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι τις αναλύσεις με τις μεθόδους FRAP και TBARS.

Στη συνέχεια έλαβαν χώρα οι κάτωθι διαδικασίες:

1. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών του παχέος εντέρου με τη μέθοδο FRAP.
2. Επιτέλεση διαδικασίας *in vitro* πέψης για διάφορες μορφές σιδήρου χρησιμοποιούμενες στον εμπλουτισμό τροφίμων.
3. Επώαση του εκ της *in vitro* πέψης προκύπτοντα, μη απορροφημένου σιδήρου με τους ιστούς παχέος εντέρου και προσδιορισμός των προϊόντων οξείδωσης με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS).

### 8.3. Υλικά και αντιδραστήρια

Το πράσινο και το λευκό τσάι ήταν της εταιρείας Lipton (Green tea, Lipton, Unilever®, The Netherlands, White tea, Lipton, Unilever®, The Netherlands). Το *Pelargonium purpureum* (Πελαργόνιον) συλλέχθηκε από 4 διαφορετικά φυτά εκ της περιοχής της πεδιάδος Μεσαράς της νοτίου Κρήτης και χαρακτηρίστηκε βοτανικά στο εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα φύλλα του φυτού ξηράθηκαν σε ξηρό και σκοτεινό μέρος για 2 μήνες. Τα εκχυλίσματα του πράσινου τσαγιού, του λευκού τσαγιού και του Πελαργόνιου παρασκευάστηκαν με προσθήκη 8 g ξηρών φύλλων σε 100 ml βραστό νερό για 5 min και διήθηση από πτυχωτό ηθμό. Το διάλυμα κατεχίνης παρασκευάστηκε σε ζεστό νερό (0.01g/100 ml).

Οι ενώσεις σιδήρου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο γλυκονικός σίδηρος (ferrous gluconate, 12.5% iron, Gluconal Fe-G-USP®, Avebe, Veendam, The Netherlands), ο γαλακτικός σίδηρος (ferrous lactate, 24% iron, Ferrous Lactate®, Jost Chemical, Namur, Belgium), ο σίδηρος EDTA (NaFeEDTA, Ferazone®, AkzoNobel functional chemicals) και ο σουλφονικός σίδηρος (ferrous sulphate, Merck, Darmstadt, Germany). Τα διαλύματα σιδήρου αυτών των ενώσεων παρασκευάστηκαν εντός 0.01 N HCl, ώστε η να παρέχουν σίδηρο σε συγκέντρωση 1.78 mM. Τα χημικά και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* πέψη αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich και αναφέρονται στο αντίστοιχο κεφάλαιο των μεθόδων. Τα χημικά

που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP είναι αυτά που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 6. Πριν την επιτέλεση των πειραμάτων όλα τα γυαλικά πλύθηκαν και τοποθετήθηκαν για 12 ώρες σε διάλυμα 1 N HCl και ακολούθησε έκπλυση με απιονισμένο νερό.

## **8.4. Μέθοδοι**

### **8.4.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών παχέος εντέρου με τη μέθοδο FRAP**

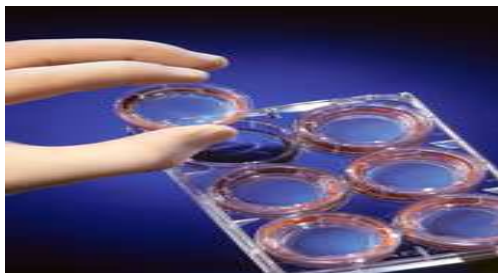
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ομογενοποιημένων ιστών παχέος εντέρου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Benzie and Strain (1996), με χρήση φασματοφωτομέτρου τύπου plate reader. 20 μl ομογενοποιημένου ιστού κάθε ομάδας ζώων τοποθετήθηκαν στις υποδοχές του φασματοφωτομέτρου τύπου plate reader και στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl HCl και αμέσως μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595nm, για τον υπολογισμό της απορρόφησης στα 0 min. Επιπλέον ποσότητα 20 μl από ομογενοποιημένο ιστό κάθε ομάδας ζώων τοποθετήθηκαν στις υποδοχές του φασματοφωτομέτρου τύπου plate reader και στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl αντιδραστήριο FRAP και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595nm μετά από 30 λεπτά. Το plate παρέμεινε στο plate reader (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA) στους 37 °C, πριν τη μέτρηση της απορρόφησης. Το αντιδραστήριο FRAP αποτελούνταν από 25 ml acetate buffer 0.3 M, pH=3.6, 2,5 ml FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mM και 2,5 ml 2,4,6-Tri(2-Pirydil)-s-triazine 10 mM. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε μmol FeSO<sub>4</sub>/L έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε με πρότυπα διαλύματα FeSO<sub>4</sub> εντός HCl 0.01 N σε συγκεντρώσεις κυμαινόμενες από 100 έως 1000 μM. Η παρασκευή των διαλυμάτων και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε όπως ακριβώς περιγράφεται και στην πειραματική ενότητα 6.

### **8.4.2. Διαδικασία *in vitro* πέψης**

Η διαδικασία της *in vitro* πέψης που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια πρόσφατη τροποποίηση (Argyri et al, 2008) της μεθόδου των Karsokefalou & Miller (1991). Ποσότητα 2 ml κάθε διαλύματος εκ των 5 ενώσεων σιδήρου μεταφέρθηκε σε ειδικό στατώ με 6 υποδοχές (6-well plate). 0,1 ml διαλύματος πεψίνης (η πεψίνη διαλύθηκε

σε 0,1 M HCl σε συγκέντρωση 0,4 g/10 ml) προστέθηκε σε κάθε υποδοχή και το στατώ καλύφθηκε με πλαστικό καπάκι. Τα στατώ τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο υδατόλουτρο στους 37 °C και επώαστηκαν για 2 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, ένας κυλινδρικό δακτυλίδι τοποθετήθηκε σε κάθε δακτύλιο αντίστοιχο κάθε υποδοχής, ώστε να συγκρατεί μία ελαστική μεμβράνη διάλυσης (Εικόνα 8.1). Η μεμβράνη τοποθετήθηκε ώστε να καλύπτει την κάτω επιφάνεια του κυλίνδρου και να είναι σε επαφή με τα πεπτόμενα συστατικά κάθε υποδοχής. Η μεμβράνη διάλυσης ήταν τύπου Spectrapore® I dialysis tubing (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), με μοριακό βάρος 6000-8000, κομμένη σε πλάτος 5 cm, τοποθετημένη σε νερό για τουλάχιστον 1 ώρα πριν τη χρήση και αποθηκευμένη σε διάλυμα 0.15 M PIPES (piperazine-N,N'-bis [2-ethane-sulfonic acid] disodium salt) μέχρι τη χρήση.

Σε κάθε δακτύλιο με μεμβράνη προστέθηκαν 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,15 M PIPES, pH=6,3, το οποίο επετεύχθη με προσθήκη HCl 37 % w/w. Το διάλυμα διαχύθηκε μέσω της μεμβράνης, ώστε σταδιακά το pH των δειγμάτων να μετατραπεί από 2,8 σε 6. Μετά από 30 λεπτά, ο δακτύλιος μετακινήθηκε και προστέθηκαν στα δείγματα 0,5 ml μίγματος παγκρεατίνης-χολικών αλάτων (0,02 g παγκρεατίνης και 0,12 g χολικά άλατα διαλύθηκαν σε 10 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>). Εν συνεχεία, το δακτυλίδι αντικαταστάθηκε και η επώαση συνεχίστηκε για 2 ακόμη ώρες. Στη συνέχεια, το δακτυλίδι που συγκρατούσε τη μεμβράνη διάλυσης αφαιρέθηκε και το εναπομείναν τμήμα συλλέχθηκε. Το εναπομείναν τμήμα (retentate), που ουσιαστικά αποτελούνταν από τον μη απορροφηθέντα σίδηρο κάθε δείγματος, περιείχε αδιάλυτα συστατικά και υψηλού μοριακού βάρους διαλυτά συστατικά (MB>6000). Τα εναπομείναντα της πέψης τμήματα καθενός εκ των 5 διαλυμάτων σιδήρου χρησιμοποιήθηκαν αμέσως για τη διερεύνηση της οξειδωσης των ιστών παχέος εντέρου.



**Εικόνα 8.1. Αναπαράσταση *in vitro* γαστρεντερικής πέψης σε 6 well plate.**

#### **8.4.3. Προσδιορισμός των προϊόντων οξειδωσης με τη μέθοδο λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)**

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αξιολογήθηκε σύμφωνα με τις μεθόδους της βιβλιογραφίας έπειτα από κάποιες τροποποιήσεις (Yamamoto et al, 1984; Matsingou et al, 2003). 0,1 ml ομογενοποιημένου ιστού παχέος εντέρου κάθε ποντικίου, κάθε ομάδας ξεπαγώθηκαν και αναμίχθηκαν. Η ανάμιξη ήταν απαραίτητη εξαιτίας της μικρής ποσότητας παχέος εντέρου κάθε ποντικίου. 30 ml ομογενοποιημένου ιστού κάθε ομάδας τοποθετήθηκαν εντός έπεντορφς και αναμίχθηκαν με 50 ml από το μη απορροφηθέν τμήμα κάθε διαλύματος σιδήρου της *in vitro* πέψης (retentates) ή με HCl 0,01 M ή με 1,78 mM FeCl<sub>3</sub> σε HCl 0,01 M. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε vortex για ένα λεπτό και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο, στους 37 °C για 3 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, τα δείγματα αναμίχθηκαν με 150 ml οξικό οξύ (glacial acetic acid 20 % w/v, pH=3,5) και 150 ml θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid, TBA, 0.8 % w/v), ομογενοποιήθηκαν για 1 λεπτό και τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο στους 90 °C για 15 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 500 ml βουτανόλης (1-butanol) και 50 ml νερό και έγινε ομογενοποίηση για 1 λεπτό. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 2,500xg, και η απορρόφηση της οργανικής στοιβάδας μετρήθηκε στα 532 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου plate reader (Elx808). Τα προϊόντα οξειδωσης προσδιορίστηκαν ως ισοδύναμα μαλονυλδιαλδεύδης (Malondialdehyde), (MDA equivalents), μέσω γραμμικής ανάλυσης βασισμένης σε πρότυπη καμπύλη 1,1,3,3-tetraethoxypropane, η οποία φαίνεται στο παράρτημα I.

#### **8.5. Στατιστική ανάλυση**

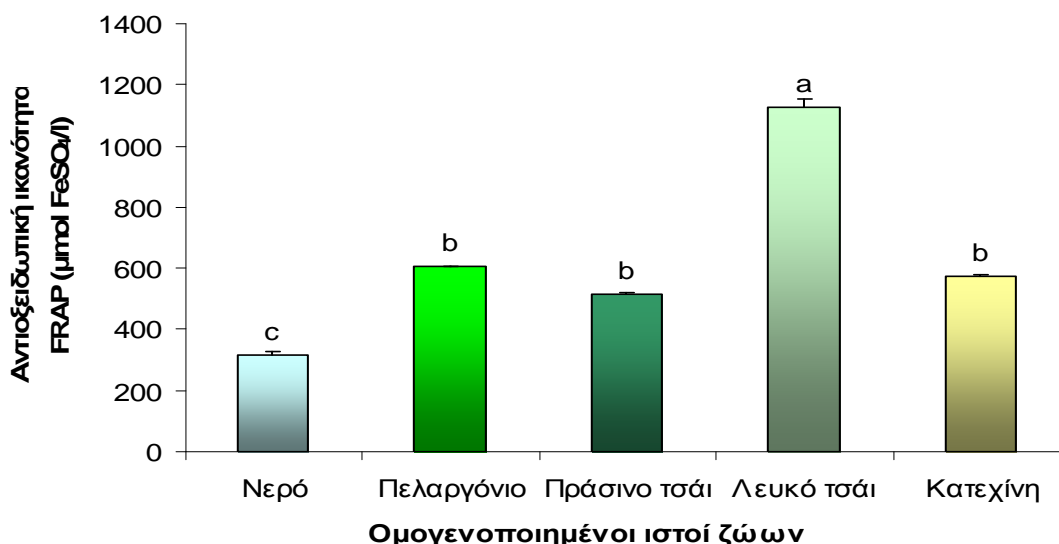
Οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες μελετήθηκαν με χρήση one-way ANOVA, LSD test με 95% επίπεδο εμπιστοσύνης (confidence interval), μετά από χρήση κανονικότητας (Zar, 1999). Τα δεδομένα, επιπρόσθετα, αναλύθηκαν σύμφωνα με ένα 5 x 4 παραγοντικό σχεδιασμό, με παράγοντες τις ομάδες ζώων και τα είδη του σιδήρου. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Statistica, version 5.1 (StatSoft, OK, USA).

## 8.6. Αποτελέσματα

Οι ιστοί παχέος εντέρου που προέρχονταν από τα ποντίκια που ελάμβαναν την κατεχίνη, τα εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού και Πελαργόνιου εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τους ιστούς που προέρχονταν από τα ζώα της ομάδας ελέγχου, όταν αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο FRAP (Πίνακας 8.1, Σχήμα 8.1) ( $P < 0.05$ ). Το παχύ έντερο των ποντικιών που ελάμβαναν το λευκό τσάι εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις άλλες ομάδες ( $P < 0.05$ ).

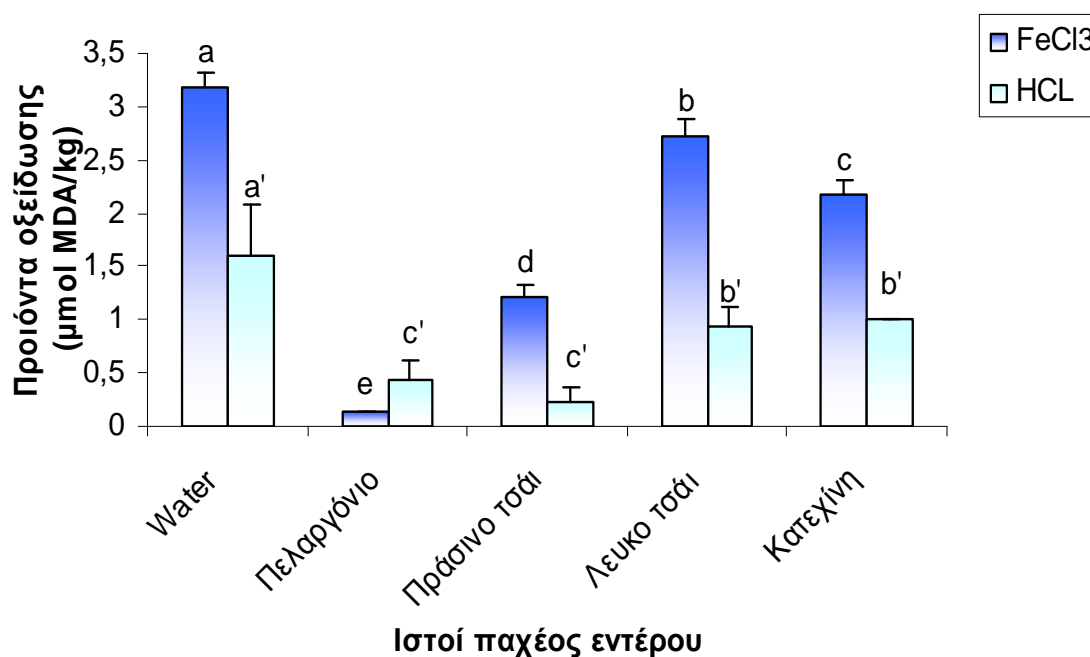
**Πίνακας 8.1.** Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στο παχύ έντερο των ζώων των 5 ομάδων, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$  ομογενοποιημένου ιστού. Οι τιμές εκφράζονται ως το μέσος όρος  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=5$ .

Ομάδες ζώων	$\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$
Νερό	$318,8 \pm 7,2c$
Πελαργόνιο	$603,8 \pm 2,1b$
Πράσινο τσάι	$515,5 \pm 5,5b$
Λευκό τσάι	$1127,1 \pm 24,7a$
Κατεχίνη	$574,6 \pm 2,7b$



**Σχήμα 8.1.** Επίδραση της κατανάλωσης των εκχυλισμάτων *Pelargonium purpureum*, πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού, κατεχίνης και του νερού στην αντιοξειδωτική ικανότητα του παχέος εντέρου ποντικιών, μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP (ferric-reducing antioxidant power). Οι τιμές εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=5$ .

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ιστών παχέος εντέρου αξιολογήθηκαν περαιτέρω μέσω της μέτρησης των προϊόντων οξείδωσης που παρήχθησαν λόγω της επώασης με σίδηρο ( $\text{FeCl}_3$ ). Σε όλους τους ιστούς, εκτός από αυτούς των ζώων που ελάμβαναν Πελαργόνιο, ο σίδηρος προκάλεσε οξείδωση παρόμοιας έκτασης με αυτή που προκλήθηκε στην ομάδα ελέγχου (Σχήμα 8.2). Τα επίπεδα της οξείδωσης ήταν διαφορετικά, ανάλογα με τη δίαιτα που ελάμβαναν τα ζώα. Η οξείδωση ήταν μεγαλύτερη στους ιστούς των ζώων που ελάμβαναν νερό και λευκό τσάι και ακολούθησαν οι ιστοί των ζώων που ελάμβαναν κατεχίνη και πράσινο τσάι. Οι ιστοί των ζώων που ελάμβαναν το Πελαργόνιο εμφάνισαν τη μικρότερη ευαισθησία στην οξείδωση από το σίδηρο.

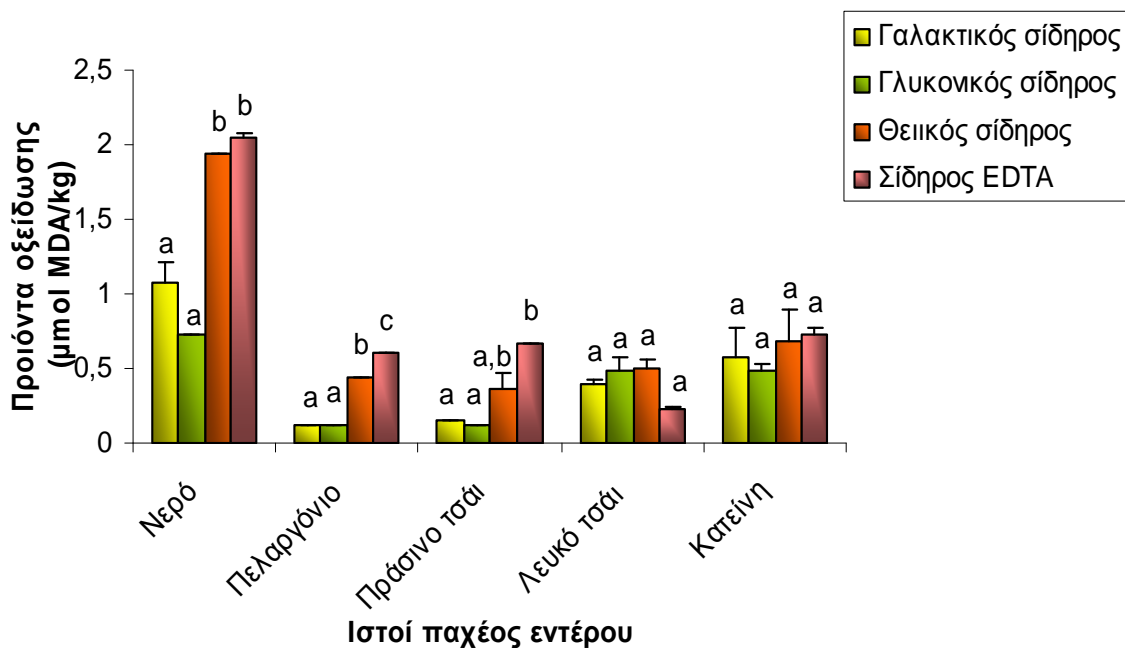


**Σχήμα 8.2.** Ευαισθησία των ιστών παχέος εντέρου στην οξείδωση που προκλήθηκε παρουσία  $\text{FeCl}_3$ , μετρούμενη με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances). Οι ιστοί προέρχονταν από ποντίκια που ελάμβαναν εκχυλίσματα *Pelargonium purpureum*, πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού και κατεχίνης ή νερού. Οι ιστοί προήλθαν από ανάμειξη των ιστών των 5 ζώων κάθε ομάδας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα μαλονυλδιαλδεύδης (MDA), ως ο μέσος  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .

Στη συνέχεια, οι ιστοί παχέος εντέρου αξιολογήθηκαν αναφορικά με την ευαισθησία τους στην οξείδωση που προκλήθηκε από τα μη απορροφηθέντα τμήματα σιδήρου της *in vitro* πέψης (retentates) διαφόρων ενώσεων σιδήρου που χρησιμοποιούνται στον εμπλουτισμό των τροφίμων (Πίνακας 8.2, Σχήμα 8.3). Παρατηρώντας την επίδραση των retentates κάθε ένωσης σιδήρου στους ιστούς παχέος εντέρου κάθε ομάδας, σημειώθηκαν κάποιες διαφορές στα επίπεδα οξείδωσης. Τα μη απορροφηθέντα τμήματα σιδήρου της *in vitro* πέψης (retentates) των NaFeEDTA και σουλφονικού σιδήρου (ferrous sulfate) έδειξαν τη μεγαλύτερη οξειδωτική δράση στους ιστούς των ζώων που ελάμβαναν Πελαργόνιο και πράσινο τσάι (P<0.05). Εντούτοις, στους ιστούς των ζώων που ελάμβαναν κατεχίνη και λευκό τσάι η οξείδωση ήταν παρόμοια για τα retentates όλων των ενώσεων σιδήρου.

**Πίνακας 8.2. Προϊόντα οξείδωσης των ιστών παχέος εντέρου των ζώων των 5 ομάδων μετά από επώαση με διάφορες μορφές σιδήρου προερχόμενες από *in vitro* πέψη. Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα μαλονυλδιαλδεύδης (MDA), ως ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί γράμματα ανά στήλη δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας P<0,05, n=3.**

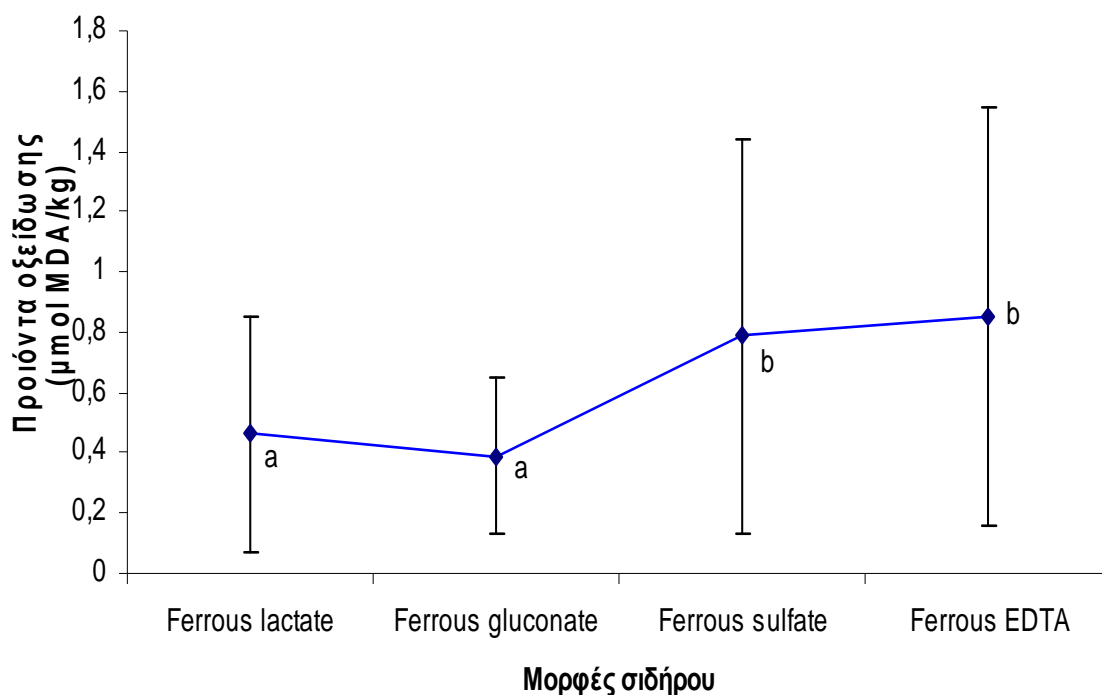
	Νερό	Πελαργόνιο	Πράσινο τσάι	Λευκό τσάι	Κατεχίνη
Γαλακτικός σίδηρος	1,07 ± 0,13a	0,12 ± 0a	0,15 ± 0a	0,38 ± 0,03a	0,57 ± 0,19a
Γλυκονικός σίδηρος	0,73 ± 0a	0,12 ± 0a	0,12 ± 0a	0,47 ± 0,09a	0,48 ± 0,04a
Θειικός σίδηρος	1,94 ± 0b	0,43 ± 0b	0,36 ± 0,1a,b	0,49 ± 0,06a	0,68 ± 0,2a
Σίδηρος EDTA	2,03 ± 0,04b	0,60 ± 0c	0,66 ± 0b	0,22 ± 0,01a	0,72 ± 0,04a



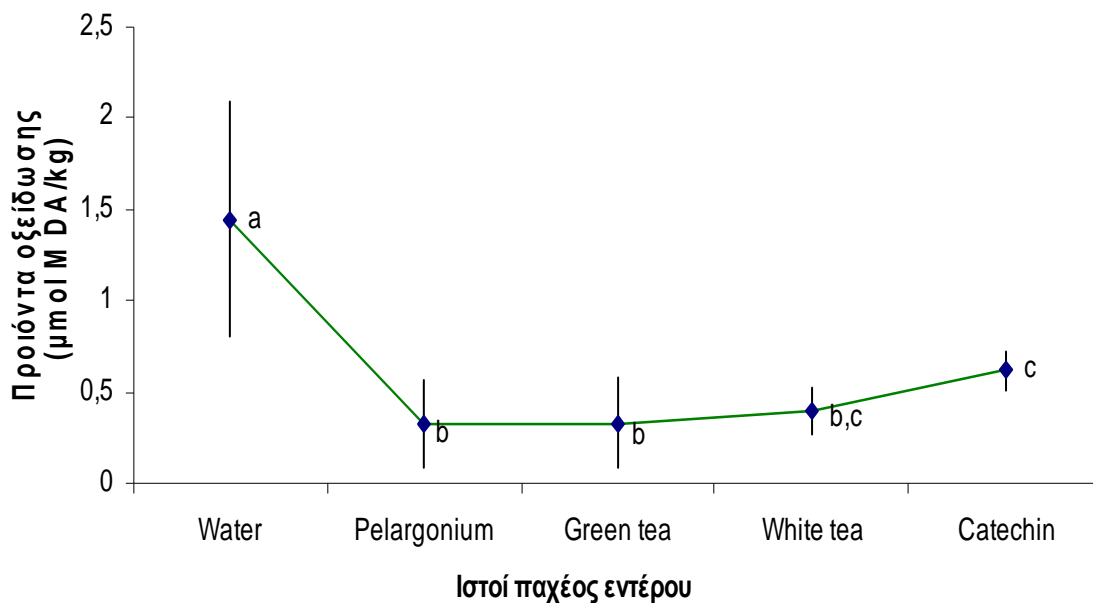
Σχ. 8.3. Οξείδωση των ιστών παχέος εντέρου κάθε ομάδας ζώων που προκλήθηκε από διαλύματα διαφόρων μορφών σιδήρου προερχόμενα από *in vitro* πέψη, μετρούμενη με τη μέθοδο TBARS. Οι ιστοί προέρχονταν από ποντίκια που ελάμβαναν εκχυλίσματα *Pelargonium purpureum*, πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού, κατεχίνης ή νερού. Οι ιστοί προήλθαν από ανάμειξη των ιστών των 5 ζώων κάθε ομάδας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα μαλονυλδιαλδεύδης (MDA), ως ο μέσος όρος  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n = 3$ .

Η παραγοντική ανάλυση των δεδομένων επέτρεψε συγκρίσεις των μέσων τιμών των επιπέδων της οξείδωσης: α) κάθε ένωσης σιδήρου στους ιστούς παχέος εντέρου όλων των ομάδων (Σχήμα 8.4) και β) όλων των ενώσεων σιδήρου στους ιστούς παχέος εντέρου κάθε ομάδας (Σχήμα 8.5). Οι ενώσεις σιδήρου που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν διαφορετική οξειδωτική δράση στους ιστούς παχέος εντέρου όταν πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δεδομένων σε όλες τις ομάδες ( $P = 0.001$ ). Συγκεκριμένα, τα retentates του σουλφονικού σιδήρου (ferrous sulfate) και του σιδήρου EDTA έδειξαν μεγαλύτερη οξειδωτική δράση στο παχύ έντερο σε σύγκριση με αυτά του γαλακτικού σιδήρου (ferrous lactate) και του γλυκονικού σιδήρου (ferrous gluconate) ( $P < 0.05$ ) (Σχήμα 8.4). Επίσης παρατηρήθηκε ότι το παχύ έντερο των ζώων που ελάμβαναν τα εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού και Πελαργόνιου ή το διάλυμα κατεχίνης, εμφάνιζαν μικρότερα επίπεδα οξείδωσης σε σχέση με τα ζώα που ελάμβαναν το νερό (Σχήμα 8.5.).





**Σχ. 8.4.** Ευαισθησία των ιστών παχέος εντέρου στην οξείδωση που προκλήθηκε παρουσία διαλυμάτων διαφόρων μορφών σιδήρου προερχόμενα από *in vitro* πέψη, μετρούμενη με τη μέθοδο TBARS. Οι ιστοί προέρχονται από ποντίκια που ελάμβαναν εκχυλίσματα *Pelargonium purpureum*, πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού, κατεχίνης ή νερού. Οι ιστοί προήλθαν από ανάμειξη των ιστών των 5 ζώων κάθε ομάδας. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τη σύγκριση των μέσων τιμών οξείδωσης όλων των ιστών των ομάδων προκληθείσα από κάθε είδος σιδήρου (παραγοντική ανάλυση). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα μαλονυλδιαλδεύδης (MDA), ως ο μέσος  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .



Σχ. 8.5. Ευαισθησία των ιστών παχέος εντέρου στην οξείδωση, μετρούμενη με τη μέθοδο TBARS. Οι ιστοί προέρχονταν από ποντίκια που ελάμβαναν εκχυλίσματα *Pelargonium purpureum*, πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού, κατεχίνης ή νερού. Οι ιστοί προήλθαν από ανάμειξη των ιστών των 5 ζώων κάθε ομάδας. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν τη σύγκριση των μέσων τιμών οξείδωσης των ιστών κάθε ομάδας προκληθείσα από όλα τα είδη σιδήρου (παραγοντική ανάλυση). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα μαλονυδιαλδεύδης (MDA), ως ο μέσος  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .

## **9. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΖΩΑ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΙΠΟΣ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ**

### **9.1. Εισαγωγή-Στόχος**

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον τόσο για τη διερεύνηση της βιοδραστικότητας του τσαγιού στους ιστούς του οργανισμού, όσο και για τους παράγοντες που την επηρεάζουν (Sies, Stahl & Sevanian, 2005; Wildansky et al, 2005). Επιδημιολογικά δεδομένα έχουν δείξει ότι μια διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών εκφυλιστικών ασθενειών (Fang, Yang & Wu, 2002; Esposito et al, 2003; Kaliora, Dedousis & Schmid, 2005). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του τσαγιού στο πλάσμα και στους ιστούς έχουν μελετηθεί εν μέρει και έχουν εξαχθεί ενδιαφέροντα συμπεράσματα (Kim et al, 2000; Leenen et al, 2000; Serafini et al, 2000; De Boer et al, 2005; Koutelidakis et al, 2009). Η βιοδιαθεσιμότητα και η βιοδραστικότητα των του τσαγιού φαίνεται ότι επηρεάζονται από διάφορους διατροφικούς παράγοντες, όπως ο σίδηρος, ο οποίος δημιουργεί σύμπλοκα με τις πολυφαινόλες, μειώνοντας την απορρόφηση τους (Kowabata et al, 1996; Manach et al, 2004; He, Lv & Yao, 2006). Εκτός από το σίδηρο ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι το λίπος της διατροφής, αφενός μεν εξαιτίας των οξειδωτικών διαδικασιών που φαίνεται ότι προωθεί μεταγευματικά (Ursini & Sevanian, 2002; Sies, Stahl & Sevanian, 2005), αλλά και εξαιτίας της πιθανής μείωσης της απορρόφησης του παρουσία των πολυφαινολών (Ikeda et al, 2005; Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Τέλος, τα τελευταία χρόνια έρευνες επεκτείνουν το ενδιαφέρον της μελέτης της βιοδραστικότητας του τσαγιού από το πεδίο της αντιοξειδωτικής δράσης στο πεδίο επίδρασης σε γονίδια και μεταβολικά μονοπάτια (Bauer et al, 2004; Sies, Stahl & Sevanian, 2005; Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

Δεδομένης της σημασίας της κατανάλωσης τσαγιού για την υγεία, διεξήχθη μια μελέτη διάρκειας 37 ημερών με πειραματικά ποντίκια με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της κατανάλωσης εκχυλίσματος τσαγιού λυοφυλιωμένης μορφής (Green Tea Extract, GTE), παρουσία ή απουσία σιδήρου, σε δείκτες οξειδωτικής κατάστασης και στην έκφραση του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων (*c-jun*, *c-fos*, *c-*

*myc, mark-1, catalase, NADPH oxidase, NF-kB*) σε επιλεγμένους ιστούς ποντικών (καρδιά, αορτή, πνεύμονες, εγκέφαλος, ήπαρ, κόλον, εγκέφαλος, σπλήνα, νεφρά) που διατρέφονταν με δίαιτα πλούσια ή πτωχή σε λίπος και χοληστερόλη. Οι υποθέσεις που διερευνήθηκαν σε αυτή την πειραματική ενότητα ήταν οι εξής: 1) Μια μακράς διάρκειας διατροφή ενισχυμένη με εκχύλισμα τσαγιού δύναται να αυξήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα των οργάνων, πιθανότατα λόγω μεταφοράς των κατεχινών ή άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών και των μεταβολιτών τους στους ιστούς. 2) Μια τέτοια διατροφή ενδέχεται να έχει επίδραση στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων των ιστών. 3) Διατροφικοί παράγοντες όπως το λίπος και ο σίδηρος δύναται να επηρεάσουν τη βιοδραστικότητα του τσαγιού.

## **9.2. Περιγραφή μονάδας πειραματόζωων και πειραματικών ποντικών**

Το πείραμα διεξήχθη στην ειδική μονάδα πειραματόζωων του κέντρου βιοϊατρικών ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Η μονάδα αυτή κατέχει υψηλής αυτοματοποίησης συστήματα που παρέχουν τις καλύτερες δυνατές συνθήκες για την αναπαραγωγή και την διατήρηση περίπου 15000 πειραματικών ποντικών διαφόρων ειδών. Η υγεία των ποντικών ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ ακολουθούνται συγκεκριμένοι κανόνες διασφάλισης της υγιεινής εντός της μονάδας. Οι κανόνες αυτοί αφορούν τη κατάλληλη ενδυμασία των ατόμων που δουλεύουν εντός της μονάδας (ειδική φόρμα, σκούφος, γάντια, μάσκα, ειδικά παπούτσια), τον καθημερινό καθαρισμό των χώρων, την απαγόρευση εισόδου οποιουδήποτε αντικειμένου χωρίς αποστείρωση ή ψεκασμό με μεθανόλη και αποτελούν εφαρμογή συγκεκριμένης νομοθεσίας της ΕΕ για μονάδες πειραματόζωων.

Τα ποντίκια βρίσκονται εντός της μονάδος τοποθετημένα σε ειδικά μεταλλικά κλουβιά που δύναται να είναι χωρητικότητας 335cm<sup>2</sup>, 530 cm<sup>2</sup>, ή 820cm<sup>2</sup> και να περιέχουν από 5-15 περίπου ζώα, ανάλογα με το μέγεθος. Τα κλουβιά αυτά βρίσκονται πάνω σε ράφια, περιέχουν την τροφή και το νερό των ζώων και έχουν ετικέτα που αναγράφει το είδος και την ημερομηνία γέννησης των ζώων, το σκοπό του πειράματος, τον κωδικό των ζώων και το όνομα του επιστήμονα που εκτελεί το πείραμα (Εικόνα 9.1). Οι συνθήκες του περιβάλλοντος χώρου της μονάδας ελέγχονται μέσω ενός κεντρικού υπολογιστή και είναι οι ακόλουθες: θερμοκρασία 21-24°C, υγρασία 50-60%, εξαερισμός ανά ώρα και εναλλαγή φωτός (12 ώρες φως,

12 ώρες σκοτάδι). Η μονάδα βρίσκεται υπό αρνητική πίεση, ώστε να μην εισέρχεται εντός αυτής εξωτερικός αέρας. Στη συγκεκριμένη μονάδα υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ασθενών και υγιών ζώων, που χρησιμοποιούνται σε πληθώρα πειραματικών μελετών. Τα ποντίκια αυτά έχουν χρόνο ζωής 2-3 έτη, ενώ δύναται να έχουν διάφορα χρώματα, με πιο συνηθισμένα το καφέ, το γκρι και το λευκό (Εικόνα 9.1). Μερικά χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των πειραματικών ποντικιών, η οποία επηρεάζει τις βιοϊατρικές έρευνες που γίνονται σε αυτά και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον άνθρωπο είναι τα ακόλουθα: Θερμοκρασία σώματος 37,4° C, καρδιακός παλμός 600 beats/min, ποσότητα ούρων 1-3ml/24h, ολική χοληστερόλη 95-200mg/d100 ml, ασβέστιο 4-5mg/100 ml, γλυκόζη στο αίμα 124-262mg/100 ml, αριθμός χρωμοσωμάτων 44, αιμογλοβίνη 11-15mg/100 ml, όγκος αίματος 76-80ml/kg, ευθροκύτταρα 9,000,000/mm<sup>3</sup>, λευκοκύτταρα 10.000/mm<sup>3</sup> (<http://www.fleming.gr/animalfacility/>).



**Εικόνα 9.1. Ποντίκια *Mus musculus* και τοποθέτηση αυτών εντός της μονάδας πειραματόζωων (<http://www.fleming.gr/animalfacility/>).**

Τα ποντίκια ευρισκόμενα εντός της μονάδας έχουν καθημερινή πρόσβαση σε νερό και διατρέφονται με μία ειδική δίαιτα για πειραματικά ποντίκια, η οποία έχει στερεή μορφή ή μορφή σκόνης και αποτελείται συνήθως από 19% πρωτεΐνες και 5% λίπος. Η μέση πρόσληψη τροφής υπολογίζεται σε 5 g ανά 30 g σωματικού βάρους την ημέρα ανά ζώο, ενώ νερού σε 5 ml ανά 30 g σωματικού βάρους. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υγιή ποντίκια, των οποίων ο έλεγχος της υγείας έλαβε χώρα στα εργαστήρια Charles River Laboratories Ltd, σύμφωνα με τις αρχές της FELASA. Αναλυτικά οι ασθένειες των ποντικιών της μελέτης, των οποίων η ύπαρξη

ελέγχθηκε πριν τη χορήγηση τους για το πείραμα, φαίνονται στον πίνακα 1 του παραρτήματος III.

### 9.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πειραματικής μελέτης χορηγήθηκαν από το τμήμα «Animal Facility» του κέντρου βιοϊατρικών ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» 30 υγιή, αρσενικά, χρώματος καφέ πειραματικά ποντίκια (*Mus Musculus*), ηλικίας περίπου 4,5 μηνών (γεννηθέντα 26/6/2008). Τα ποντίκια αυτά βρίσκονταν από τη γέννηση τους και μέχρι την παράδοση για το πείραμα εντός των εγκαταστάσεων της μονάδας σε δύο κλουβιά μεγάλων διαστάσεων, έχοντας ελεύθερη πρόσβαση σε μία τυπική δίαιτα για πειραματικά ποντίκια και σε νερό. Για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης ακολουθήθηκαν οι προβλεπόμενες από την ελληνική νομοθεσία διαδικασίες, σύμφωνα με τις οποίες απαιτείται η χορήγηση άδειας από την αρμόδια νομαρχία έπειτα από την έγκριση του πρωτοκόλλου της μελέτης. Η αίτηση για τη χορήγηση της άδειας φαίνεται στο παράρτημα III. Στην συγκεκριμένη μελέτη εχορηγήθη η αναγκαία άδεια διότι τηρούνταν οι παραπάνω προϋποθέσεις. Βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει μια μελέτη με ζώα ώστε να επιτραπεί η πραγματοποίηση της είναι τα ακόλουθα :

1. Να μην υπάρχει άλλη επιστημονική μέθοδος διερεύνησης της υπόθεσης.
2. Να γίνεται με απόλυτο σεβασμό των ζώων, χωρίς να τους προκαλείται πόνος.
3. Να χρησιμοποιούνται οι εγκεκριμένοι μέθοδοι αναισθησίας και ευθανασίας των ζώων.

Μετά την παραλαβή των 30 ποντικιών έλαβαν χώρα διαδικασίες ζύγισης, και ομαδοποίησης των ζώων. Τα ποντίκια εξέρχονταν ένα-ένα από τα αρχικά κλουβιά και ακολουθούσε ζύγιση τους σε ζυγό και τοποθέτηση τους σε έξι νέα μικρότερα κλουβιά των 5 ζώων. Η ομαδοποίηση έγινε με τυχαίο τρόπο, ώστε κάθε κλουβί να αντιστοιχεί σε μία εκ των 6 ομάδων της μελέτης, ενώ στα 6 κλουβιά τοποθετήθηκαν ετικέτες αναγραφής του ονόματος κάθε ομάδας. Οι 6 ομάδες ποντικιών που ελάμβαναν 6 διαφορετικές δίαιτες ήταν οι ακόλουθες:

1. **ΟΜΑΔΑ Α-Τυπική δίαιτα και τσάι**, είναι η ομάδα που περιλάμβανε πέντε ποντίκια τα οποία ελάμβαναν επί 37 ημέρες μια τυπική για ποντίκια δίαιτα ενισχυμένη με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού σε σκόνη (Green Tea Extract, GTE).

2. **ΟΜΑΔΑ Β-Τυπική διαίτα και τσάι και σίδηρος**, είναι η ομάδα που περιλάμβανε πέντε ποντίκια τα οποία ελάμβαναν επί 37 ημέρες μια τυπική για ποντίκια διαίτα ενισχυμένη με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού σε σκόνη και γαλακτικό σίδηρο.
3. **ΟΜΑΔΑ Γ-Τυπική διαίτα (control 1)**, είναι η ομάδα που περιλάμβανε πέντε ποντίκια τα οποία ελάμβαναν επί 37 ημέρες μια τυπική για ποντίκια διαίτα.
4. **ΟΜΑΔΑ Δ-Λιπαρή διαίτα και τσάι**, είναι η ομάδα που περιλάμβανε πέντε ποντίκια τα οποία ελάμβαναν επί 37 ημέρες μια διαίτα εμπλουτισμένη με λίπος και χοληστερόλη, ενισχυμένη με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού σε σκόνη.
5. **ΟΜΑΔΑ Ε-Λιπαρή διαίτα και τσάι και σίδηρος**, είναι η ομάδα που περιλάμβανε πέντε ποντίκια τα οποία ελάμβαναν επί 37 ημέρες μια διαίτα εμπλουτισμένη με λίπος και χοληστερόλη, ενισχυμένη με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού σε σκόνη και γαλακτικό σίδηρο.
6. **ΟΜΑΔΑ Ζ-Λιπαρή διαίτα (control 2)**, είναι η ομάδα που περιλάμβανε πέντε ποντίκια τα οποία ελάμβαναν επί 37 ημέρες μια διαίτα εμπλουτισμένη με λίπος και χοληστερόλη.

Κατά τη διάρκεια των 37 ημερών της μελέτης κάθε μέρα εχορηγείτο στις έξι ομάδες των ζώων η αντίστοιχη τροφή υπό μορφή σκόνης εντός τρυβλίων και έπειτα από βρέξιμο αυτής. Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση στην τροφή και το νερό. Η ποσότητα που τοποθετείτο ανά ημέρα ήταν διπλάσια της μέσης ημερήσιας πρόσληψης ανά ζώο. Η τροφή τοποθετούταν στα κλουβιά κάθε μέρα στις 12 το μεσημέρι. Την 15η ημέρα τα ζώα εξήλθαν ένα-ένα από το κάθε κλουβί, ζυγίστηκαν και επανατοποθετήθηκαν. Την προτελευταία ημέρα του πειράματος (36<sup>η</sup> ημέρα) η τροφή τοποθετήθηκε κανονικά το μεσημέρι στις 12, αλλά το απόγευμα στις 5 αφαιρέθηκαν τα υπολείμματα αυτής. Την τελευταία ημέρα του πειράματος (37<sup>η</sup> ημέρα) αφού έλαβε χώρα ξανά ζύγιση των ζώων, ακολούθησε ευθανασία εντός δοχείου με ξηρό πάγο και στη συνέχεια διαδικασία νεκροψίας κάθε ζώου.

Η διαδικασία νεκροψίας του ζώου με σκοπό τη λήψη αίματος από την καρδιά και την εξαγωγή των διαφόρων οργάνων αποτελούσε σημαντικό τμήμα του συγκεκριμένου πειράματος και είχε ως προϋπόθεση την πλήρη κατανόηση της ανατομίας του ζώου. Η διαδικασία είχε ως εξής: i) Αμέσως μετά την ευθανασία, το κάθε ποντίκι τοποθετείτο στο ειδικό χειρουργικό τραπέζι της ειδικής αίθουσας της μονάδας πειραματόζωων, ενώ το άτομο που επιτελούσε τη νεκροψία είχε στη διάθεση

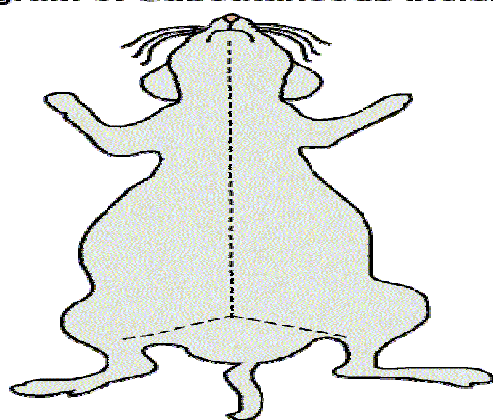
του χειρουργικά ψαλίδια και λαβίδες. Μετά τον ψεκασμό με αιθανόλη ώστε να αποφευχθεί η δυσκολία της διαδικασίας λόγω του τριχώματος, το κάθε ζώο ανοίγονταν με το ψαλίδι κατά μήκος των νοητών γραμμών σε σχήμα Y και από το σημείο της νοητής γωνίας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.2. ii) Εν συνεχεία ανοίγονταν με τον ίδιο τρόπο η περιτοναϊκή μεμβράνη που περικλείει τα κοιλιακά όργανα και τον θώρακα του ποντικού (Εικόνα 9.3.). iii) Εν συνεχεία με προσεκτικές κινήσεις, ώστε να αποφευχθεί αιμορραγία η οποία θα οδηγούσε σε απώλεια αίματος από την καρδιά, ανοίγονταν με το ψαλίδι το διάφραγμα, δηλαδή η μεμβράνη που χωρίζει την καρδιά και τους πνεύμονες από τα υπόλοιπα όργανα (Εικόνα 9.3.). iv) Στη συνέχεια αποκόπτονταν ο θώρακας από τη δεξιά και από την αριστερή μεριά με αποτέλεσμα να εμφανίζεται η καρδιά. Εάν η ευθανασία έχει γίνει ελάχιστα λεπτά πριν, τότε η καρδιά συνεχίζει ακόμα να πάλλεται. v) Μετά από σταθεροποίηση της καρδιάς με τη λαβίδα με το ένα χέρι, με το άλλο λαμβάνονταν αίμα με τη χρήση σύριγγας. Η σύριγγα βυθίζονταν προσεκτικά εντός του περικαρδίου τοιχώματος ώστε να μην εξέλθει από την άλλη πλευρά και με αργές περιστροφικές κινήσεις λαμβάνονταν αίμα, το οποίο έφτανε περίπου τα 0,8 ml ανά ποντίκι. vi) Μετά τη λήψη του αίματος, με χρήση του ψαλιδιού και της λαβίδας αφαιρούνταν τα διάφορα όργανα, ξεκινώντας από την καρδιά και τους πνεύμονες, που βρίσκονται υπό τον αφαιρεθέντα θώρακα και συνεχίζοντας με το ήπαρ, που βρίσκεται έμπροσθεν, δίπλα στο διάφραγμα, τη σπλήνα, που βρίσκεται πλησίον του ήπατος, τα έντερα (λεπτό και παχύ) και τα νεφρά, που βρίσκονται υπό των εντέρων (Εικόνα 9.3.). vii) Η αορτή είναι πολύ μικρή και εμφανίζει δυσκολία εις την εξαγωγή της. Βρίσκεται στη βάση του θώρακος, πίσω από την καρδιά και γίνονταν αρχικά εξαγωγή του συνόλου καρδιάς-πνευμόνων για να εντοπιστεί η αορτή στην πίσω πλευρά. viii) Το δωδεκαδάκτυλο είναι ένα μικρό τμήμα του εντέρου που ξεκινάει από το στομάχι. Το κόλον είναι το τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου που καταλήγει στο απευθυσμένο και έχει μεγαλύτερη διάμετρο από το δωδεκαδάκτυλο. Η εξαγωγή και των δύο έγινε μετά από ξεδίπλωμα του εντερικού σωλήνος και χρήση ως αφετηρίες το στομάχι και το απευθυσμένο, αντιστοίχως. x) Για τη αφαίρεση του εγκεφάλου ακολουθήθηκε διαδικασία που περιλαμβάνει οριζόντια τομή με ειδικό ψαλίδι κατά μήκος του άνωθεν τμήματος του κρανίου, αφαίρεση των οστών και εξαγωγή του εγκεφάλου με ειδική λαβίδα ([www.eulep.pdn.cam.ac.uk](http://www.eulep.pdn.cam.ac.uk)).

Το αίμα των ζώων εισέρχονταν σε έπεντορφ εντός δοχείου με πάγο. Τα εξαχθέντα όργανα των ζώων, ξεπλένονταν με PBS (Phosphate Buffer Saline), ζυγίζονταν και τα

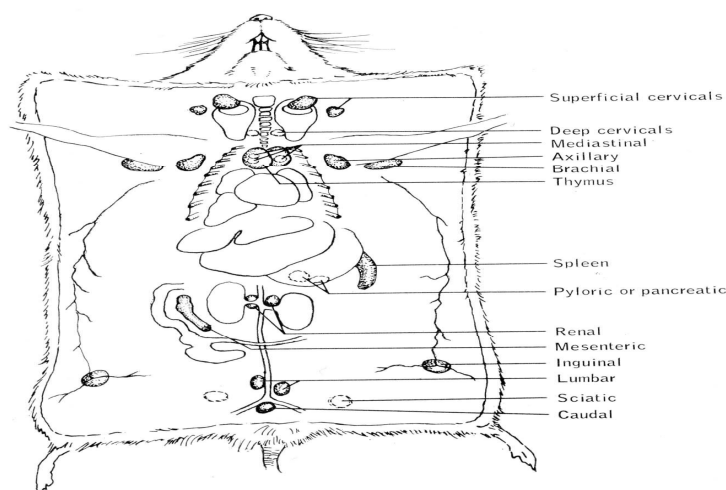


μεν προοριζόμενα για αντιοξειδωτικές αναλύσεις τοποθετούνταν σε έπεντορφς, τα δε προοριζόμενα για μοριακές αναλύσεις σε φάλκον με RNAlater. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε δοχείο με ξηρό πάγο και μεταφέρθηκαν στα εργαστήρια της Μονάδας Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου, όπου το μεν αίμα φυγοκεντρήθηκε και το προκύπτον πλάσμα αναλύθηκε με τη μέθοδο FRAP, τα δε όργανα αποθηκεύτηκαν στους -20 οC μέχρι τη διεξαγωγή των αναλύσεων προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους FRAP και ORAC και της διερεύνησης της έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο PCR.

**Diagram of Subcutaneous Incision**



**Εικόνα 9.2. Μορφή αρχικής τομής κατά την νεκροψία (eulep.pdn.cam.ac.uk).**



**Εικόνα 9.3. Αναπαράσταση οργάνων ποντικού μετά τη διάνοιξη της περιτοναϊκής μεμβράνης (www.eulep.pdn.cam.ac.uk).**

## 9.4. Υλικά και αντιδραστήρια

### 9.4.1. Δίαιτες ζώων

Όλα τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή, η οποία ήταν υπό μορφή σκόνης. Τα ζώα των ομάδων Α, Β και Γ ελάμβαναν μια τυπική δίαιτα ποντικών (Altromin 1324, Chr. Petersen, Ringsted, Denmark). Αυτή η δίαιτα περιείχε 190 g καθαρής πρωτεΐνη/kg, 40 g λίπος/kg, 70 g ίνες/kg και αντιστοιχούσε σε 11.9 MJ μεταβολίσιμη ενέργεια/kg. Τα ζώα των ομάδων Δ, Ε και Ζ ελάμβαναν μια λιπαρή δίαιτα, η οποία αποτελούνταν κατά 85,5% από την τυπική και κατά 14,5% από ένα μίγμα λιπαρών συστατικών. Συγκεκριμένα, η λιπαρή δίαιτα περιείχε 12,5% βούτυρο κακάου, 1,25% χοληστερόλη και 0,75% χολικά άλατα (Chr. Petersen, Ringsted, Denmark).

Οι ομάδες Α, Β, Δ και Ε ελάμβαναν εντός της τροφής εκχύλισμα τσαγιού (GTE), εμπορικής μορφής (green tea powdered extract, Plantestrakt, The nature network, USA), το οποίο περιείχε 15% πολυφαινόλες, 10% κατεχίνες και 3% καφεΐνη. Η ενίσχυση με GTE έγινε με τρόπο ώστε να αντιστοιχούν 4 mg ολικών πολυφαινολών ανά ζώο ημερησίως ή 200 mg/kg/d. Βάση της μέσης ημερήσιας πρόσληψης (5 g τροφής ανά ζώο) υπολογίστηκε ότι πρέπει να περιέχονται 4,8 g GTE ανά Kg τυπικής ή λιπαρής τροφής. Στις ομάδες Β και Ε προστέθηκε και γαλακτικός σίδηρος ώστε να αντιστοιχούν 20 mg σιδήρου σε 1 Kg τροφής. Ο σίδηρος και το GTE ζυγίζονταν σε αναλυτικό ζυγό και αναμειγνύονταν με τη τυπική (ομάδες Α, Β) και τη λιπαρή τροφή (ομάδες Δ, Ε).

### 9.4.2. Χημικές ουσίες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν γυαλικά και αντιδραστήρια, τόσο για την αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των 6 διατροφών, όσο και για τις αντιοξειδωτικές και τις μοριακές αναλύσεις των ιστών. Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις πειραματικές διαδικασίες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), εκτός ορισμένων περιπτώσεων που περιγράφονται κατά περίπτωση. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε διπλά απιονισμένο νερό, ενώ όλα τα γυαλικά πλύθηκαν και τοποθετήθηκαν για 12 ώρες σε διάλυμα 1 N HCl, πριν την έκπλυση με απιονισμένο νερό.

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών των 6 διατροφών και του εκχυλίσματος GTE χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Folin Ciocalteu και το

διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% w/v. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV-vis. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στους ιστούς χρησιμοποιήθηκαν ομογενοποιητές ιστών (ULTRA-TURAX T25, Basic, Germany), φυγόκεντρος ψυχόμενη (eppendorf certifuge 5417R, Hettich, Germany), αναλυτικός ζυγός και χειροκίνητες πιπέτες των 10-100  $\mu\text{l}$  και των 100-1000  $\mu\text{l}$ . Οι αναλύσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης απορροφήσεων 96 δειγμάτων (plate reader, Elx808) για την εφαρμογή της μεθόδου FRAP και σε φθορισμόμετρο τύπου plate reader (Victor X, Antisel, Greece) για τη μέθοδο ORAC. Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 6. Οι χημικές ουσίες χλωριούχο κάλιο (KCl), χλωριούχο νάτριο (NaCl), όξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος PBS, που ήταν σημαντικό για τη διατήρηση των ιστών.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής χημικά και ένζυμα: RNA later (Sigma), αγαρόζη (Agarose, DNAase-RNAase free, for routine use, molecular biology tested) (Ambion), Tris base (2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol) (Sigma), Glacial acetic acid (Panreac), HPLC  $\text{H}_2\text{O}$  (Merck), NaOH (Sigma), EDTA (Sigma), ένζυμο Deoxyribonuclease I (DNAase I, 10 units/ml) συνοδευόμενο από buffer EDTA και MgCl (Fermentas), βρωμιούχο αιθίδιο (BrEt) (Anticel) και 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Επίσης, αγοράστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κιτς: i) Κίτ απομόνωσης του RNA εκ του ιστού, RNAqueous Kit (Ambion). Αυτό περιλάμβανε α) Χρωστική φορμαλδεύδης (Formaldehyde load dye). β) Διάλυμα λύσης (Lysis/Binding Solution). γ) Αιθανόλη 64% (ethanol). δ) Διάλυμα έκπλυσης I (wash solution I). ε) Διάλυμα έκπλυσης II/III (wash solution II/III). στ) Διάλυμα έκλουσης (Elution Solution). ζ) Ειδικά φίλτρα (Filter cartridges). η) Σωληνάκια (collection tubes). ii) SuperScript First-Strand Synthesis system for RT-PCR (Reverse Transcription PCR kit, Invitrogen). Αυτό περιλάμβανε τα εξής: oligo(Dt)12 $\rightarrow$ 18(0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Random hexamers (50ng/ml), 10Xrt Buffer (200 mM Tris-HCL, 500 mM KCl), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M DTT, 10 mM dNTP Mix, SuperScript II RT (50 units/ $\mu\text{l}$ ), RNAaseOUT (40 units/ $\mu\text{l}$ ) και iii) Platinum PCR SuperMIX (Invitrogen). Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler-ep-eppendorf (Antisel, Greece), UV Transiluminator (Antisel, Greece), φωτογραφικό σύστημα Gel Doc XR, Quantity

One (Biorad), ομογενοποιητές χειρός και συσκευή ηλεκτροφόρησης Easycast B2 (Antisel, Greece).

## 9.5. Μέθοδοι

### 9.5.1. *In vitro* αξιολόγηση των ολικών φαινολικών συστατικών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των τροφών των ζώων και του GTE

Πριν την έναρξη της μελέτης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των 6 διατροφών και του GTE που δόθηκαν στα ποντίκια. Για την παραλαβή όσο γίνεται περισσότερων κατεχινών και άλλων πολυφαινολών, στις οποίες οφείλονται κατά κύριο λόγο οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των 6 μιγμάτων τροφών, έλαβε χώρα προεργασία αυτών. Κατά την προεργασία των τροφών 2 g από την τροφή κάθε ομάδας και 2 g Green Tea Extract τοποθετήθηκαν σε φιάλη που περιείχε 50 ml υδατική ακετόνη 50%. Μετά από παραμονή για 1,5 ώρα σε υδατόλουτρο υπερήχων, έλαβε χώρα διήθηση σε ηθμό και παραλαβή του κάθε διηθήματος.

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των διηθημάτων έγινε με τη μέθοδο Folin Ciocalteu (Spanos & Wrolstand, 1990), όπως περιγράφεται και στο Κεφάλαιο 6. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 3 ml διηθήματος τροφών ή GTE και ακολούθησε vortex για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,5 ml διαλύματος Folin Ciocalteu και 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. Εν συνεχεία, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 30 min και ακολούθησε παραλαβή του υπερκειμένου και μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-Vis). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg γαλλικού οξέος ανά ml διηθήματος, μετά την κατασκευή πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, η οποία φαίνεται στο παράρτημα I.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των τροφών μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP, όπως περιγράφεται και στο Κεφάλαιο 6. Σε 96 well plate έγινε τοποθέτηση 20 μl διηθήματος και 100 μl HCl για τα τυφλά και 20 μl διηθήματος και 100 μl FRAP για το δείγμα. Μετά από 30 min ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Οι μετρήσεις στο plate έγιναν εις διπλούν, εκτός από το τυφλό που μετρήθηκε μία φορά, ενώ το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μmol

FeSO<sub>4</sub>/ml διηθήματος, μετά την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, η οποία φαίνεται στο παράρτημα I.

### **9.5.2. Αναλύσεις προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα και τους ιστούς οργάνων των ποντικών**

Η μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα έγινε με τη μέθοδο FRAP (Ferric reducing Antioxidant Power assay) (Benzie & Strain, 1996). Η μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών των διαφόρων οργάνων των ποντικών έγινε με τις μεθόδους FRAP και ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

#### **6.5.2.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP**

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου FRAP στο πλάσμα, μετά τη συλλογή του αίματος από όλα τα ζώα, τα ερpedorfs εντός πάγου μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5min, στους 4oC, 3000g. Μετά τη φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε μεταφορά του προκύπτοντος υπερκείμενου πλάσματος κάθε ποντικίου σε άλλα αριθμημένα ερpedorfs. Ακολούθησε η παρασκευή των απαραίτητων για τη μέθοδο FRAP διαλυμάτων (ρυθμιστικό διάλυμα, TPTZ, FeCl<sub>3</sub>) ακριβώς όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 6. Το αντιδραστήριο FRAP παρασκευάστηκε έπειτα από ανάμιξη 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος, 2,5 ml διαλύματος TPTZ και 2,5 ml διαλύματος FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. Για την διεξαγωγή της μεθόδου FRAP η διαδικασία είχε ως εξής :Σε 96 well plate τοποθετήθηκαν 10 μl πλάσμα και 100 μl HCl για τα τυφλά και 10 μl πλάσμα και 100 μl αντιδραστήριο FRAP για τα δείγματα. Στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης έπειτα από 30 min, στα 595 nm. Οι μετρήσεις στο plate έγιναν εις διπλούν, εκτός από το τυφλό που μετρήθηκε μία φορά.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου FRAP στους ιστούς οι ιστοί αποψύχθηκαν εκ των -20 oC όπου είχαν αποθηκευτεί μετά τις νεκροψίες και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες ομογενοποίησης στους οποίους είχε προστεθεί ποσότητα PBS τριπλάσια από το βάρος του κάθε ιστού, εκτός ορισμένων ιστών (ιδίως κόλον και αορτής) οι οποίοι ομογενοποιήθηκαν με μεγαλύτερες ποσότητες PBS, λόγω μικρού μεγέθους. Η παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος PBS έγινε με την προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και συμπλήρωση με νερό, ώστε να προκύψει 1 L διαλύματος 10XPBS, με pH=6,8.

Εν συνεχεία, τα δείγματα των ιστών παρουσία PBS ομογενοποιήθηκαν ένα-ένα σε ειδικό ομογενοποιητή (ULTRA-TURAX T25, Basic, Germany) και τα ομογενοποιημένα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα eppendorfs και οδηγήθηκαν εις τη φυγόκεντρο, όπου έλαβε χώρα φυγοκέντρωση για 5 min, στους 4 °C, 13000g. Τα εκ της φυγοκέντρωσης προκύπτοντα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε άλλα αριθμημένα eppendorfs και ακολούθησε η διεξαγωγή της μεθόδου FRAP. Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου FRAP ακολούθηθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφονται παραπάνω. Για την διεξαγωγή της μεθόδου η διαδικασία είχε ως εξής : Σε 96 well plate τοποθέτηση 10 μl ομογενοποιημένου ιστού και 100 μl HCl για τα τυφλά και 10 μl ομογενοποιημένου ιστού και 100 μl FRAP για το δείγμα. Στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης έπειτα από 30min, στα 595 nm. Οι μετρήσεις στο plate έγιναν εις διπλούν, εκτός από το τυφλό που μετρήθηκε μία φορά.

Για την ποσοτικοποίηση των απορροφήσεων που προκύπτουν εκ της μέτρησης εις το plate reader κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Παράρτημα I), όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 6. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε ως  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$  αίματος και  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$  ιστού.

#### **9.5.2.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ORAC**

Μετά την εφαρμογή της μεθόδου FRAP τα ομογενοποιημένα δείγματα ιστών των ποντικών κάθε ομάδας αναμείχθηκαν, λόγω μικρών ποσοτήτων, και έλαβε χώρα η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ORAC στους ομογενοποιημένους ιστούς των ζώων αρχικά έγινε αραιώση κάθε δείγματος 1:100 με ρυθμιστικό διάλυμα phosphate buffer και καλή ανάδευση με χρήση vortex. Στη συνέχεια σε 96 well plate τοποθετούνταν 20 μl αραιωμένου δείγματος (εις τριπλούν) και 20 μl 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) σε 5-8 επιλεγμένες θέσεις. Ακολουθούσε προσθήκη 200 μl fluorescein ( $8,16 \cdot 10^{-5}$  mM) και ελάμβανε χώρα επώαση για 20 min στους 37 °C. Στη συνέχεια γίνονταν προσθήκη 20 μl ABAP (119,4  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ) και αμέσως το plate τοποθετούνταν στο φθορισμόμετρο και γίνονταν μέτρηση του φθορισμού 35 φορές στους 37 °C, με διαφορά ενός λεπτού ανά μέτρηση. Για την πρότυπη καμπύλη Trolox, σε άλλο plate τοποθετούνταν 20 μl 75 mM phosphate buffer σε κάποιες θέσεις και σε κάποιες άλλες διαλύματα Trolox διαφόρων συγκεντρώσεων (5, 12,5, 25 και 50  $\mu\text{M}$ ) εις τριπλούν και εφαρμόζονταν η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για τα δείγματα. Τα διαλύματα της μεθόδου ORAC παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται

στο Κεφάλαιο 6, ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως  $\mu\text{mol}$  ισοδύναμων Trolox ανά  $\text{ml}$  ή  $\text{g}$  μετά την κατασκευή πρότυπης καμπύλης Trolox (Παράρτημα I). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων περιγράφεται στο Κεφάλαιο 6.

### **9.5.3. Αναλύσεις διερεύνησης της επίδρασης του εκχυλίσματος τσαγιού στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στην καρδιά και το ήπαρ**

Σε αυτό το σκέλος αυτής της πειραματικής ενότητας έλαβε χώρα η μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης εκχυλίσματος τσαγιού (GTE) παρουσία ή απουσία σιδήρου στην έκφραση του mRNA των γονιδίων *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, *catalase*, *mapk-1* (*mitogen activated protein kinase-1*), *Nf-kB* και *NADPH oxidase* στην καρδιά και το ήπαρ ποντικών που διατρέφονταν με δίαιτα πλούσια ή πτωχή σε λίπος και χοληστερόλη. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).

Η επιλογή των εκκινητών (primers) έγινε αφού αρχικά επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία τα γονίδια των οποίων η έκφραση παρουσίαζε ενδιαφέρον για μελέτη. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων του pubmed (NCBI), εκ της οποίας ευρέθη η αλληλουχία βάσεων που αντιστοιχεί στο mRNA κάθε γονιδίου. Αυτή η αλληλουχία εισήχθη σε ειδική βάση δεδομένων ([www.biotools.edu-primer](http://www.biotools.edu-primer) 3), η οποία έδωσε τους αντίστοιχους για κάθε γονίδιο εκκινητές. Οι παραληφθέντες από την εταιρεία Antisel εκκινητές, όντας σε στερεά μορφή αραιώθηκαν αρχικά και σύμφωνα με τη δοθείσα από την εταιρεία συγκέντρωση στα  $100 \mu\text{M}$ . Από εκεί με αραιώση με υπερκίθαρο νερό διαμορφώθηκε η τελική προς χρήση συγκέντρωση, που ήταν  $10 \mu\text{M}$ . Όλοι οι παραληφθέντες εκκινητές ήταν στερεοί, αναμειγμένοι με άλας και είχαν μέγεθος 20 βάσεις. Στον Πίνακα 9.1 φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα.

**Πίνακας 9.1. Παρουσίαση της αλληλουχίας βάσεων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη (Στοιχεία εταιρείας Antisel).**

Αλληλουχία Βάσεων	Όνομα εκκινητή	Είδος εκκινητή
ctttatccccacggtgacag	c-fos f	mouse c-fos forward primer
gacacggtcttcaccattcc	c-fos r	mouse c-fos reverse primer
tcccctatcgacatggagtc	c-jun f	mouse c-jun forward primer
gcttaagctgtgccacctgt	c-jun r	mouse c-jun reverse primer
acacggaggaaaacgacaag	c-myc f	mouse c-myc forward primer
agaggtgagcttgctctgt	c-myc r	mouse c-myc reverse primer
atctgtgactttggccttgc	mapk1 F	mouse mapk1 forward primer
gctttcctgggaagataggc	mapk1 R	mouse mapk1 reverse primer
agtggcatcccttactctg	NADPH oxidase f	mouse NADPH oxidase forward primer
cccaaccagtagcaccactt	NADPH oxidase r	mouse NADPH oxidase reverse primer
cctgacatggtctgggactt	catalase f	mouse catalase forward primer
caagttttgatgccctggt	catalase r	mouse catalase reverse primer
ggggatgtgaagatgttct	NF KB f	mouse NF KB forward primer
ccaagtgcagaggtgtctga	NF KB r	mouse NF KB reverse primer
tgttaccactgggacgaca	beta-actin F	mouse beta actin forward primer
aaggaaggctggaaaagagc	beta-actin R	mouse beta actin reverse primer

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) παρασκευάζονταν κάποια διαλύματα με στόχο τη δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης. Για την παρασκευή του διαλύματος Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M, pH=8 γίνονταν προσθήκη 186,1 g ethylenediaminetetraacetate x 2H<sub>2</sub>O (EDTA) σε δοχείο με 800 ml H<sub>2</sub>O και ακολουθούσε ανάδευση με αναδευτήρα προσθέτοντας στερεά δισκία NaOH, έως ότου προκύψει τελικό pH=8. Για την παρασκευή διαλύματος TAE (Tris-acetate-EDTA) γίνονταν προσθήκη 242 g Tris base, 57,1 ml glacial acetic acid και 100 ml 0,5 M EDTA και ακολουθούσε συμπλήρωση με νερό έως τα 1000 ml. Για την παρασκευή του πηκτώματος (τζελ) αγαρόζης γίνονταν προσθήκη σε κωνική φιάλη 100 ml διαλύματος TAE και 1g αγαρόζης. Μετά από θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 min, αφήνονταν το διάλυμα να κρυώσει λίγο και προστίθετο ποσότητα 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr-Sigma). Μετά από ανάδευση το διάλυμα αποχύνονταν εις την υποδοχή της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου είχαν τοποθετηθεί οι κτένες, και αφήνονταν να πήξει.



Κατά τη διαδικασία νεκροψίας την τελευταία ημέρα (37<sup>η</sup>) του πειράματος, οι ιστοί καρδιάς και ήπατος των 3 ποντικών κάθε ομάδας τοποθετήθηκαν σε φάλκους που περιείχαν 4 ml RNAlater. Με τον τρόπο αυτό διατηρήθηκαν οι ιστοί στους -20 οC μέχρι τη διεξαγωγή των πειραμάτων PCR. Κατά τη διαδικασία των πειραμάτων PCR ακολουθήθηκε πρωτόκολλο που περιλάμβανε 3 βασικά στάδια: i) Στάδιο απομόνωσης του mRNA εκ των ιστών. ii) Στάδιο Αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-RT) και iii) Στάδιο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Κατά το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής το RNA μετατρέπονταν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο πολλαπλασιάζονταν στη συνέχεια με τη μέθοδο PCR και ο αριθμός των προϊόντων ανιχνεύονταν με χρήση πηκτώματος αγαρόζης. Αλλαγές της έντασης στις μπάντες του πηκτώματος υποδήλωναν διαφοροποιήσεις στην ποσότητα του αρχικού απομονωθέντος mRNA.

Πριν την έναρξη των διαδικασιών γίνονταν προσεκτικός καθαρισμός των πάγκων με αιθανόλη και διαχωρισμός αυτών, ώστε η απομόνωση του RNA να γίνεται πάντα σε ξεχωριστό χώρο από τις άλλες διαδικασίες. Όλα τα έπεντορφς, τα τύπς, οι ομογενοποιητές χειρός και το νερό ήταν πάντοτε αποστειρωμένα. Οι διαδικασίες έλαβαν χώρα πολύ προσεκτικά, ώστε να μην υπάρχουν επιμολύνσεις στα ευαίσθητα δείγματα, ενώ χρησιμοποιούνταν πάντοτε πάγος για τη διατήρηση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.

Κατά την επιτέλεση του σταδίου απομόνωσης του mRNA οι ιστοί εντός των φάλκων ξεπαγώνονταν ομαλά, εξέρχονταν εκ του δοχείου, στεγνώνονταν σε χαρτί και ζυγίζονταν. Εν συνεχεία, κάθε ιστός εισέρχονταν σε έπεντορφ που περιείχε 200 μl διάλυμα λύσης (lysis buffer). Με ειδικό ομογενοποιητή χειρός (Antisel, Greece) το δείγμα ιστού ομογενοποιούνταν μερικώς και έπειτα προστίθετο ποσότητα διαλύματος λύσης (lysis buffer) δέκα φορές μεγαλύτερη του βάρους του ιστού και ολοκληρώνονταν η ομογενοποίηση. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές, 30sec και το υπερκείμενο εισέρχονταν σε νέα έπεντορφς στα οποία προτίθετο ίση ποσότητα αιθανόλης 64%. Μετά από καλή ανάδευση, 750 μl από το δείγμα εισέρχονταν σε ειδική κολόνα διαχωρισμού, τοποθετημένη άνωθεν εντός νέου έπεντορφ. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 60 sec και έπειτα γίνονταν απόρριψη του υποκειμένου. Στην ίδια κολόνα ακολουθούσε προσθήκη 700 μl διαλύματος έκπλυσης I (wash solution I), φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 sec και απόρριψη του υποκειμένου. Μετά, γινόταν 2 φορές προσθήκη 500 μl διαλύματος έκπλυσης II (wash solution II), φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30

sec και απόρριψη του υποκειμένου. Μετά από μία φυγοκέντρηση μόνο της κολόνας, για να απομακρυνθεί η εναπομένουσα αιθανόλη, προστίθεται 50 μl διάλυμα έκλουσης (elution solution) που είχε τοποθετηθεί από πριν στους 65 °C. Μετά από μία φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 sec παραλαμβάνονται το RNA, το οποίο τοποθετούνται αμέσως στον πάγο. Στη συνέχεια, σε νέα έπεντορφ τοποθετούνται 6 μl buffer MgCl<sub>2</sub>, 4 μl DNAase και 50 μl RNA του κάθε ιστού. Μετά από επώαση στους 37 °C για 40 min, γίνονται προσθήκη 6 μl EDTA και ακολουθούσε επώαση στους 65 °C για 12 min. Τα προκύπτοντα δείγματα RNA τοποθετούνται στους -20 °C. Η χρήση της DNAase είχε ως στόχο την απομάκρυνση πιθανού γενοματικού DNA ώστε να γίνει παραλαβή καθαρού RNA.

Ακολουθούσε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription). Κατά τη διαδικασία αυτή σε μικρά έπεντορφ τοποθετούνται 1 μl dNTPs mix και 1 μl oligodT. Μετά, ακολουθούσε προσθήκη 8 μl δείγματος RNA, το οποίο περιείχε την ποσότητα του RNA που προέκυπτε από την εκ της απομονώσεως ποσοτικοποίηση, συμπληρωμένη με νερό έως τα 8 μl. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 sec τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή, στους 65 °C για 5 min. Στο διάστημα αυτό γίνονται παρασκευή του Master Mix, με τοποθέτηση σε έπεντορφ 2 μl buffer 10X, 4 μl buffer Mg, 2 μl DTT και 1 μl RNAaseOUT. Μετά τους 65 °C το πρόγραμμα του κυκλοποιητή μετέβαινε στους 4 °C για 5 min. Στο τέλος του χρόνου αυτού γίνονται προσθήκη 9 μl από το Master Mix σε όλα τα δείγματα και μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 sec τα δείγματα επανοτοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή στους 42 °C. Μετά από 2 min, επροστίθεται 1 μl από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase) σε όλα τα δείγματα. Το πρόγραμμα συνέχιζε με επώαση στους 42 °C για 50 min και μετά στους 72 °C για 15 min. Έπειτα τα προκύπτοντα cDNA (completed DNA, συμπληρωματικά DNA) τοποθετούνται στον πάγο ή στους -20 °C. Για τον έλεγχο πιθανής ύπαρξης γενοματικού DNA εντός του παραληφθέντος RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής επαναλαμβάνονταν για κάθε γονίδιο και χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

Εν συνεχεία, ακολουθούσε η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για συγκεκριμένα επιλεγμένα γονίδια. Σε μικρά έπεντορφ τοποθετούνται 45 μl Platinum Mix, 1,5 μl από το δεξιό εκκινητή (forward primer) και 1,5 μl από τον αριστερό εκκινητή (reverse primer) για το επιλεγμένο κάθε φορά γονίδιο και 2 μl από το αντίστοιχο για κάθε ομάδα και κάθε ιστό cDNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις

13000 στροφές για 30 sec τα δείγματα τοποθετούνταν στο θερμικό κυκλοποιητή. Το πρόγραμμα περιλάμβανε 45 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλάμβανε τις εξής εναλλαγές: 94 οC για 2 min, 94° C για 15 min, 55 οC για 15 min, 72 οC για 25 min, 72 οC για 7 min.

Έπειτα, στα προϊόντα της PCR προστίθετο 10 μl κυανής χρωστικής 6X και ακολουθούσε φόρτωση του μίγματος στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης, σημασμένου με βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθούσε τρέξιμο του πηκτώματος για περίπου 1 ώρα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, γίνονταν φωτογράφιση του πηκτώματος σε φωτογραφικό μηχάνημα UV (Biorad) και ακολουθούσε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με ειδικό πρόγραμμα (vilber lurmat photo-capt software), το οποίο υπολόγιζε την ένταση κάθε μπάντας επί του πηκτώματος.

## **9.6. Στατιστική επεξεργασία**

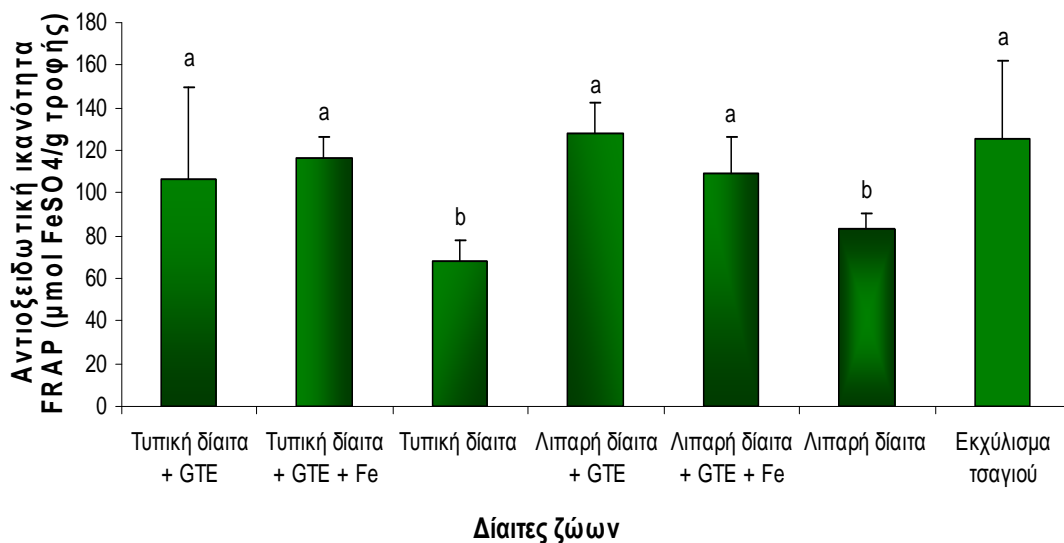
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Έλαβε χώρα σύγκριση των διαφορών ανάμεσα στην αντιοξειδωτική ικανότητα και τα ολικά φαινολικά των 6 διαιτών. Επίσης, συγκρίθηκαν τα βάρη των ζώων κάθε ομάδας πριν και μετά την παρέμβαση. Οι βιοδείκτες FRAP και ORAC στο πλάσμα και τους ιστούς των ζώων συγκρίθηκαν: 1) Για τις 6 ομάδες συνολικά (A, B, Γ, Δ, E, Z). 2) Για τις 3 ομάδες της κανονικής (A, B, Γ) και τις 3 ομάδες της λιπαρής δίαιτας (Δ, E, Z) ξεχωριστά και 3) Για τις ομάδες τσαγιού, τσαγιού με σίδηρο και ελέγχου ανεξαρτήτου αν η δίαιτα ήταν κανονική ή λιπαρή και 4) Ανάμεσα στην κανονική και τη λιπαρή δίαιτα συνολικά. Οι διαφορές αξιολογήθηκαν με χρήση παραμετρικής ανάλυσης (Kruskal-wallis test) και με ανάλυση one-way ANOVA, Turkey Post-hoc test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν  $P < 0.05$ . Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (SPSS v13.0).

## 9.7. Αποτελέσματα

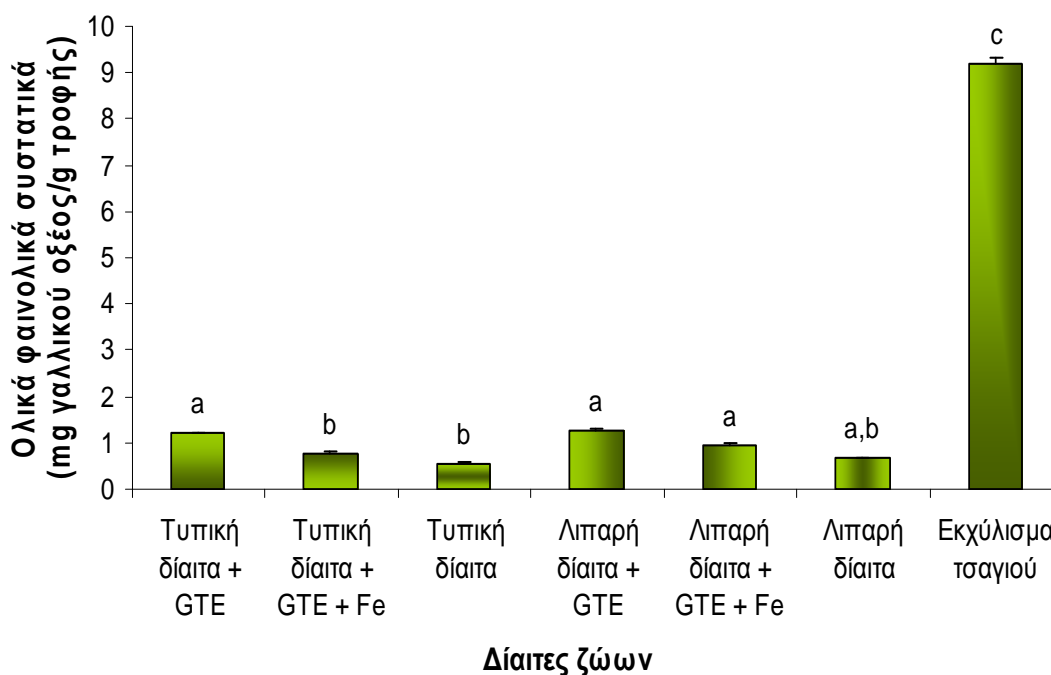
Η αξιολόγηση των 6 διαιτών των ζώων και του εκχυλίσματος GTE έδειξε ότι το εκχύλισμα πράσινου τσαγιού σε καθαρή μορφή (GTE) εμφάνισε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP, σε σχέση με τις δίαιτες των ομάδων ελέγχου (A, Z) ( $P=0,001$ ). Οι δίαιτες που ήταν ενισχυμένες με GTE (A, B, Δ, E) έδειξαν επίσης σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις δίαιτες ελέγχου (A, Z) ( $P<0,05$ ) (Πίνακας 9.2, Σχήμα 9.1). Επιπρόσθετα, οι δίαιτες που ήταν ενισχυμένες με GTE έδειξαν σημαντικά αυξημένη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά, μετρούμενα με τη μέθοδο FOLIN, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου ( $P<0,05$ ). Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά των διαιτών ελέγχου ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του καθαρού εκχυλίσματος τσαγιού GTE ( $P<0,05$ ). Οι δίαιτες που ενισχύθηκαν με GTE εμφάνισαν αυξημένα ολικά φαινολικά σε σχέση με τις δίαιτες ελέγχου GTE ( $P=0,001$ ) (Πίνακας 9.2, Σχήμα. 9.2).

**Πίνακας 9.2. Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) και ολικά φαινολικά συστατικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) του εκχυλίσματος τσαγιού (Green Tea Extract (GTE)) και των 6 διαιτών. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα στις 6 δίαιτες και το GTE. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P<0,05$ ,  $n=3$ .**

Εκχυλίσματα τροφών	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ )	FOLIN (mg gallic acid/g)
Τυπική διαίτα + GTE	106.73 $\pm$ 43.2a	1,21 $\pm$ 0,1a
Τυπική διαίτα + GTE + Fe	116.58 $\pm$ 9.97a	0,77 $\pm$ 0,2b
Τυπική διαίτα	68.25 $\pm$ 9.43b	0,55 $\pm$ 0,1b
Λιπαρή διαίτα + GTE	128.28 $\pm$ 14.21a	1,27 $\pm$ 0,3a
Λιπαρή διαίτα + GTE + Fe	109.20 $\pm$ 17.07a	0,95 $\pm$ 0,3a
Λιπαρή διαίτα	83.18 $\pm$ 6.92b	0,66 $\pm$ 0,2a,b
GTE	125.35 $\pm$ 36.59a	9,18 $\pm$ 0,14c



**Σχήμα 9.1.** Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) του εκχυλίσματος τσαγιού (GTE) και των 6 διαιτών εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ . Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .

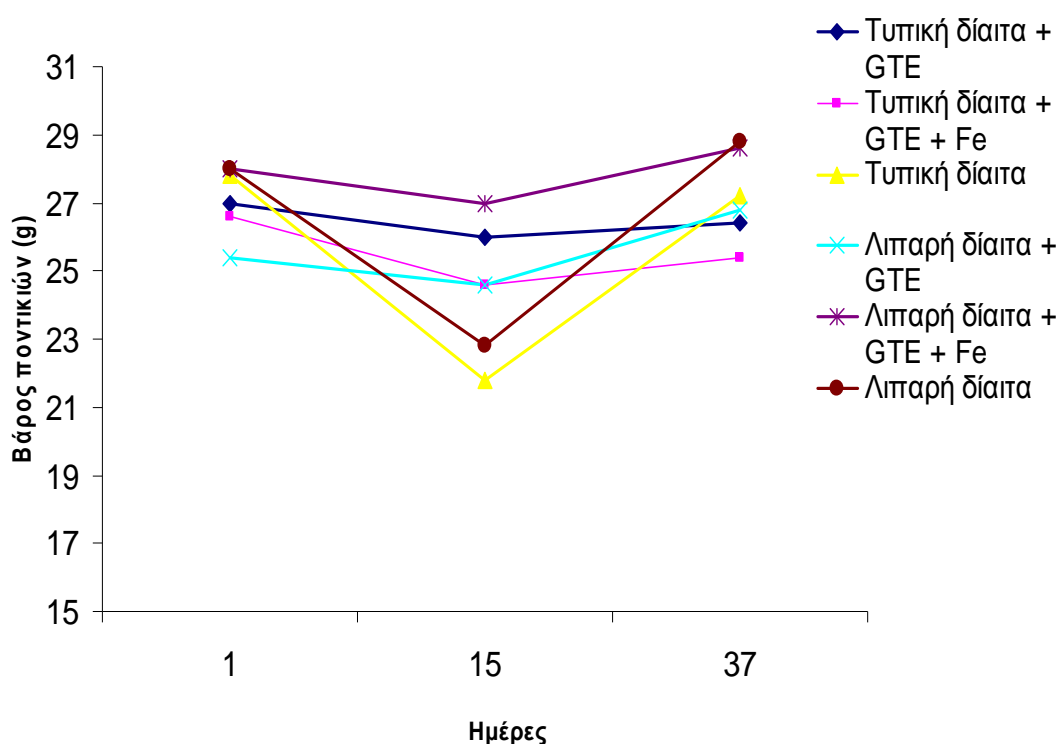


**Σχήμα 9.2.** Ολικά φαινολικά συστατικά (μέθοδος Folin) του εκχυλίσματος τσαγιού (GTE) και των 6 διαιτών, εκφρασμένη σε  $\text{mg}$  γαλλικού οξέος/g. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=3$ .

Όλα τα ζώα της μελέτης παρέμειναν υγιή κατά τη διάρκεια του πειράματος. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους μέσους όρους βάρους των ζώων κάθε ομάδας ανάμεσα στις 6 ομάδες στην αρχή και το τέλος της μελέτης ( $P=0,055$ , Kruskal test), ούτε ανάμεσα στην πρώτη και την τελευταία μέρα για κάθε ομάδα ξεχωριστά ( $P=0,25$ ) (Πίνακας 9.3, Σχήμα 9.3).

**Πίνακας 9.3.** Διακύμανση του βάρους των ζώων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι των βαρών των ζώων (g) κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν για κάθε ομάδα ξεχωριστά. Τα ίδια γράμματα σε κάθε στήλη δηλώνουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P<0,05$ ,  $n=5$ .

Ημέρες πειράματος	Τυπική δίαιτα + GTE	Τυπική δίαιτα + GTE + Fe	Τυπική δίαιτα	Λιπαρή δίαιτα + GTE	Λιπαρή δίαιτα + GTE + Fe	Λιπαρή δίαιτα
1 <sup>η</sup> ημέρα	27 $\pm$ 2.12a	26.6 $\pm$ 2.3a	27.8 $\pm$ 2.58a	25.4 $\pm$ 1.51a	28 $\pm$ 1.58a	28 $\pm$ 2a
15 <sup>η</sup> ημέρα	26 $\pm$ 1.41a	24.6 $\pm$ 1.81a	21.8 $\pm$ 1.09a	24.6 $\pm$ 1.81a	27 $\pm$ 2.12a	22.8 $\pm$ 1.09a
37 <sup>η</sup> ημέρα	26.4 $\pm$ 1.9a	25.4 $\pm$ 2.6a	27.2 $\pm$ 2.28a	26.8 $\pm$ 1.09a	28.6 $\pm$ 1.14a	28.8 $\pm$ 0.83a

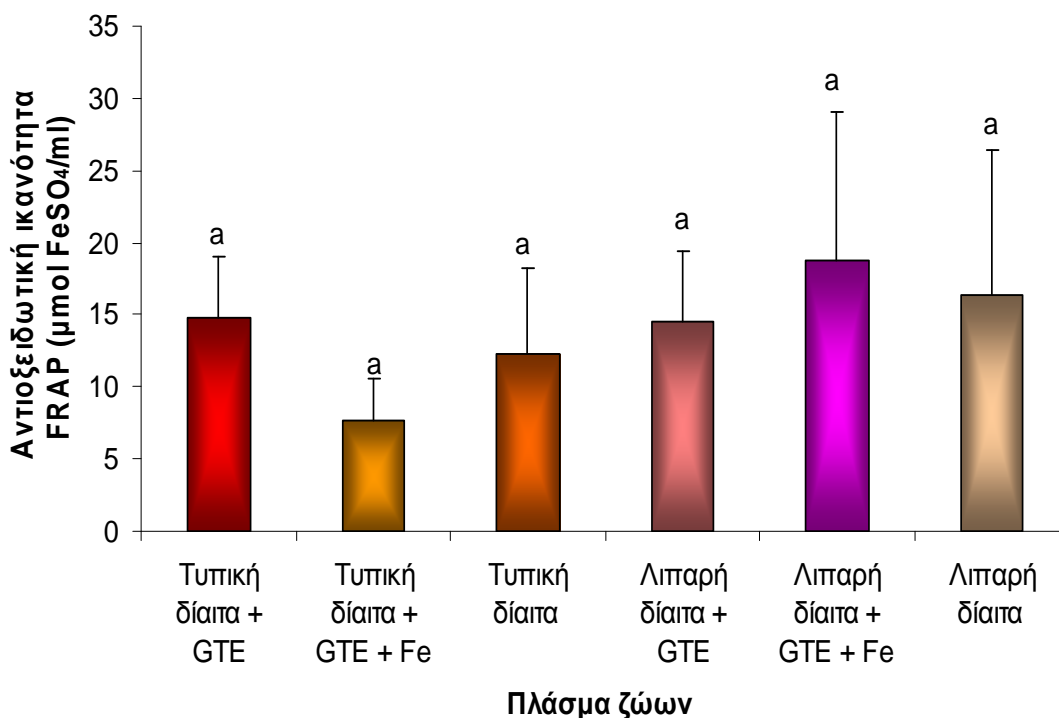


**Σχήμα 9.3.** Διακύμανση του βάρους των ζώων (g) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι των βαρών των ζώων κάθε ομάδας.

Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος των ποντικών των 6 ομάδων, όταν αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP ( $P=0,265$ ) (Πίνακας 9.4, Σχήμα 9.4). Στις τρεις ομάδες ποντικών που ελάμβαναν την τυπική για ποντίκια διατροφή η αντιοξειδωτική ικανότητα στους ιστούς πνευμόνων, σπλήνας, νεφρών και εγκεφάλου δεν επηρεάστηκε από την ενίσχυση με εκχύλισμα τσαγιού ( $P>0,05$ ). Αντίθετα, στο δωδεκαδάκτυλο των ζώων που ελάμβαναν το GTE η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των ποντικών της ομάδας ελέγχου ( $P=0,03$ ). Στο παχύ έντερο των ζώων που ελάμβαναν GTE με σίδηρο η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη από αυτήν της ομάδας ελέγχου ( $P=0,046$ ). Στην καρδιά και την αορτή των ζώων που η διατροφή τους ήταν ενισχυμένη με GTE η αντιοξειδωτική ικανότητα έδειξε σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $P=0,011$ ). Τέλος, στο ήπαρ, τα ποντίκια της διατροφής που περιείχε GTE με σίδηρο έδειξαν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις άλλες δύο ομάδες (GTE και ελέγχου) (Πίνακας 9.5, Σχήμα 9.5). Στα ποντίκια που ελάμβαναν την πλούσια σε λίπος και χοληστερόλη διατροφή η ενίσχυση με εκχύλισμα τσαγιού ή τσαγιού με σίδηρο δε φαίνεται να επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα κανενός ιστού, αφού δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στους ιστούς των 3 ομάδων ( $P>0,05$ ) (Πίνακας 9.5, Σχήμα 9.5). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι όλες οι ομάδες που ελάμβαναν τη λιπαρή διατροφή εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα συνολικά στο κόλον, σε σχέση με τις ομάδες που ελάμβαναν την κανονική διατροφή ( $P=0,017$ ), ενώ για τον εγκέφαλο υπήρχε τάση διαφοράς ( $P=0,063$ ) (Πίνακας 9.5).

**Πίνακας 9.4. Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στο πλάσμα των ζώων των 6 ομάδων, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$ . Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα στα δείγματα πλάσματος και των 6 ομάδων συνολικά. Τα ίδια γράμματα δηλώνουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P<0,05$ ,  $n=5$ .**

<b>Πλάσμα ζώων</b>	<b>Αντιοξειδωτική Ικανότητα (<math>\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}</math>)</b>
<b>Τυπική διαίτα + GTE</b>	14,8 $\pm$ 4,1a
<b>Τυπική διαίτα + GTE + Fe</b>	7,7 $\pm$ 2,9a
<b>Τυπική διαίτα</b>	12,3 $\pm$ 5,8a
<b>Λιπαρή διαίτα + GTE</b>	14,5 $\pm$ 4,8a
<b>Λιπαρή διαίτα + GTE + Fe</b>	18,7 $\pm$ 10,3a
<b>Λιπαρή διαίτα</b>	16,4 $\pm$ 9,9a

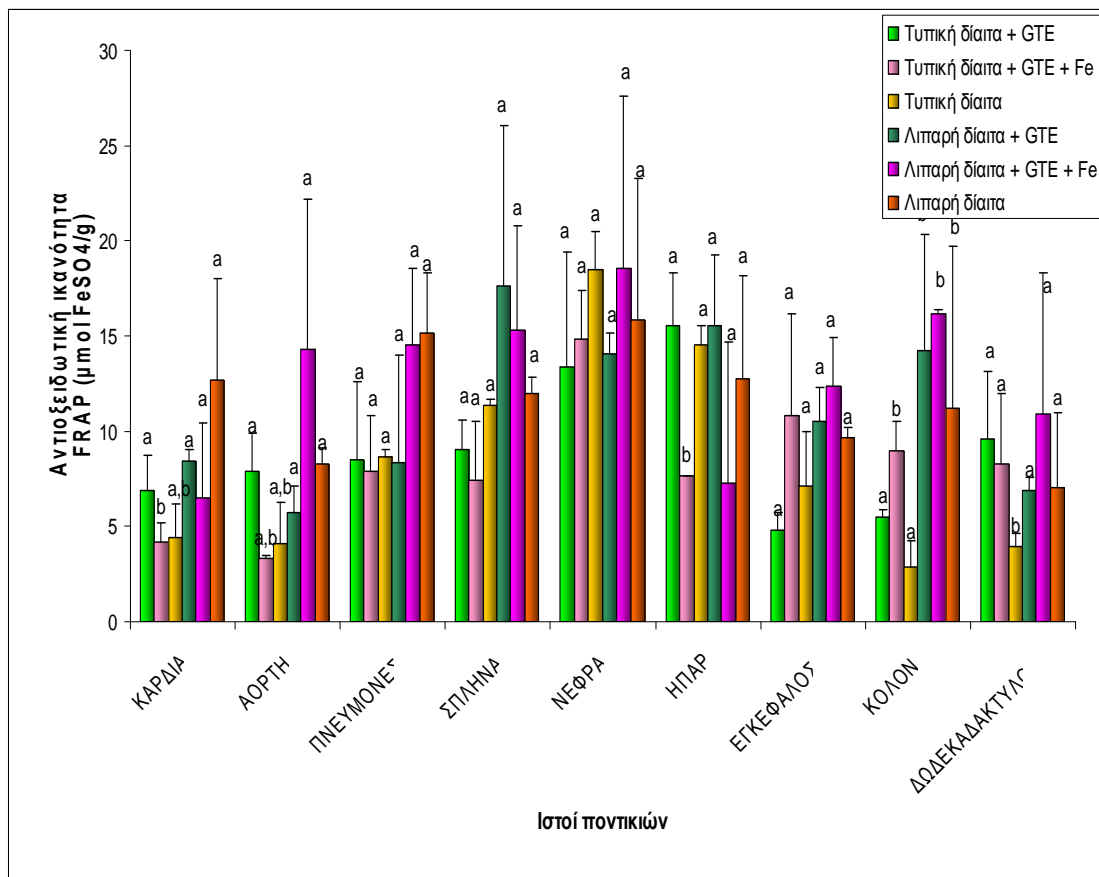


**Σχήμα 9.4.** Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στο πλάσμα των ζώων των 6 ομάδων, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$ . Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα στα δείγματα πλάσματος και των 6 ομάδων συνολικά. Οι ίδιοι εκθέτες δηλώνουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=5$ .

**Πίνακας 9.5.** Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στους ιστούς οργάνων των ζώων των 6 ομάδων εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ . Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα στις 6 ομάδες συνολικά και για κάθε ιστό ξεχωριστά. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=5$ .

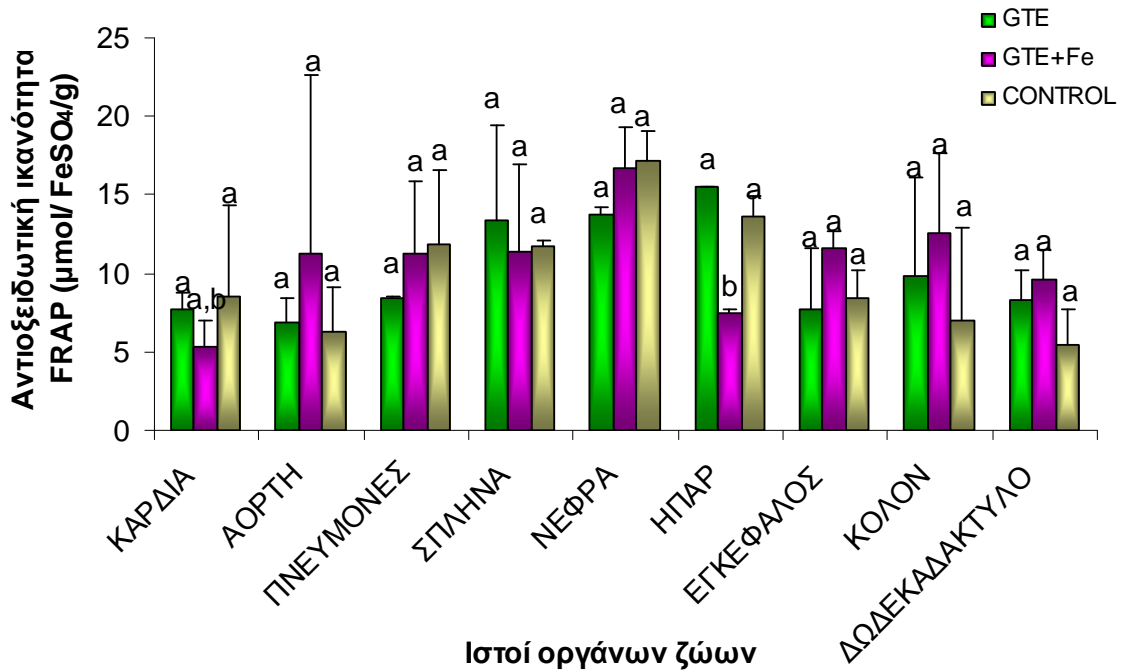
Αντιοξειδωτική Ικανότητα ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ )	Τυπική δίαιτα + GTE	Τυπική δίαιτα + GTE + Fe	Τυπική δίαιτα	Λιπαρή δίαιτα + GTE	Λιπαρή δίαιτα + GTE + Fe	Λιπαρή δίαιτα
ΚΑΡΔΙΑ	$6,8 \pm 1,8a$	$4,1 \pm 1,0b$	$4,3 \pm 1,7b$	$8,4 \pm 0,6a$	$6,4 \pm 3,9a$	$12,6 \pm 5,3a$
ΑΟΡΤΗ	$7,9 \pm 1,9a$	$3,2 \pm 0,2b$	$4,1 \pm 2,1a,b$	$5,7 \pm 1,3a$	$19,3 \pm 7,8a$	$8,3 \pm 0,8a$
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	$8,5 \pm 4,0a$	$7,9 \pm 2,9a$	$8,6 \pm 0,4a$	$8,3 \pm 5,6a$	$14,5 \pm 3,9a$	$15,1 \pm 3,1a$
ΣΠΛΗΝΑ	$9,0 \pm 1,5a$	$7,4 \pm 3,0a$	$11,3 \pm 0,2a$	$17,6 \pm 8,4a$	$15,3 \pm 5,4a$	$11,9 \pm 0,8a$
ΝΕΦΡΑ	$13,3 \pm 6,0a$	$14,8 \pm 2,5a$	$18,5 \pm 1,9a$	$14,0 \pm 1,1a$	$18,5 \pm 3,0a$	$15,8 \pm 7,4a$
ΗΠΑΡ	$15,5 \pm 2,8a$	$7,6 \pm 0,0b$	$14,5 \pm 0,9a$	$15,5 \pm 3,6a$	$7,2 \pm 7,4a$	$12,7 \pm 5,3a$
ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	$4,8 \pm 0,9a$	$10,8 \pm 5,2a$	$7,1 \pm 2,8a$	$10,4 \pm 1,7a$	$12,3 \pm 2,5a$	$9,6 \pm 0,5a$
ΚΟΛΟΝ	$5,4 \pm 0,3a$	$8,9 \pm 1,5b$	$2,8 \pm 1,3a$	$14,2 \pm 6,0b$	$16,1 \pm 0,2b$	$11,1 \pm 8,4b$
ΔΩΔΕΚΑΔΑΚΤΥΛΟ	$9,6 \pm 3,5a$	$8,2 \pm 3,7a$	$3,9 \pm 0,6b$	$6,8 \pm 0,7a$	$10,9 \pm 7,4a$	$7,0 \pm 3,9a$



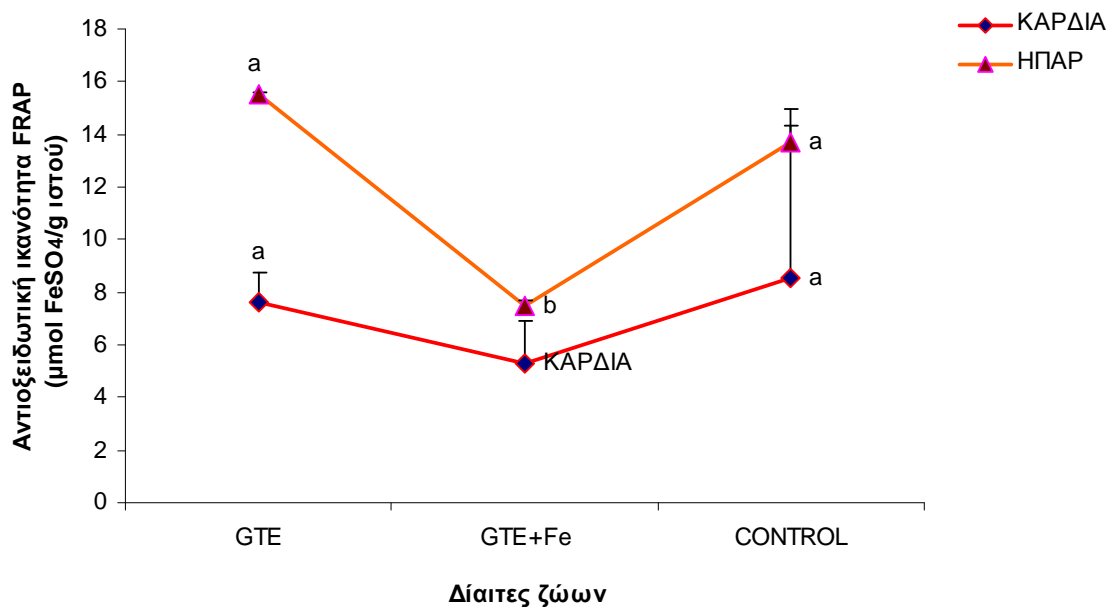


**Σχήμα 9.5.** Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στους ιστούς οργάνων των ζώων των 6 ομάδων, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ . Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα στις 6 ομάδες συνολικά και για κάθε ιστό ξεχωριστά. Διαφορετικοί εκθέτες ανά ιστό δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=5$ .

Όταν διερευνήθηκε η επίδραση της ενίσχυσης της διατροφής με εκχύλισμα τσαγιού ανεξάρτητα με το εάν η διατροφή ήταν τυπική ή λιπαρή, παρατηρήθηκε ότι στην καρδιά και το ήπαρ οι ομάδες που ελάμβαναν τσάι με σίδηρο εμφάνισαν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου και τσαγιού (Σχήματα 9.6, 9.7), ενώ στους άλλους ιστούς δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές (Σχήμα 9.6). Μετά από κατάλληλη στατιστική ανάλυση παρατηρήθηκε ότι η ενίσχυση με GTE εμφάνισε την ίδια επίδραση είτε η διαίτα ήταν τυπική είτε λιπαρή, σε όλους τους ιστούς.

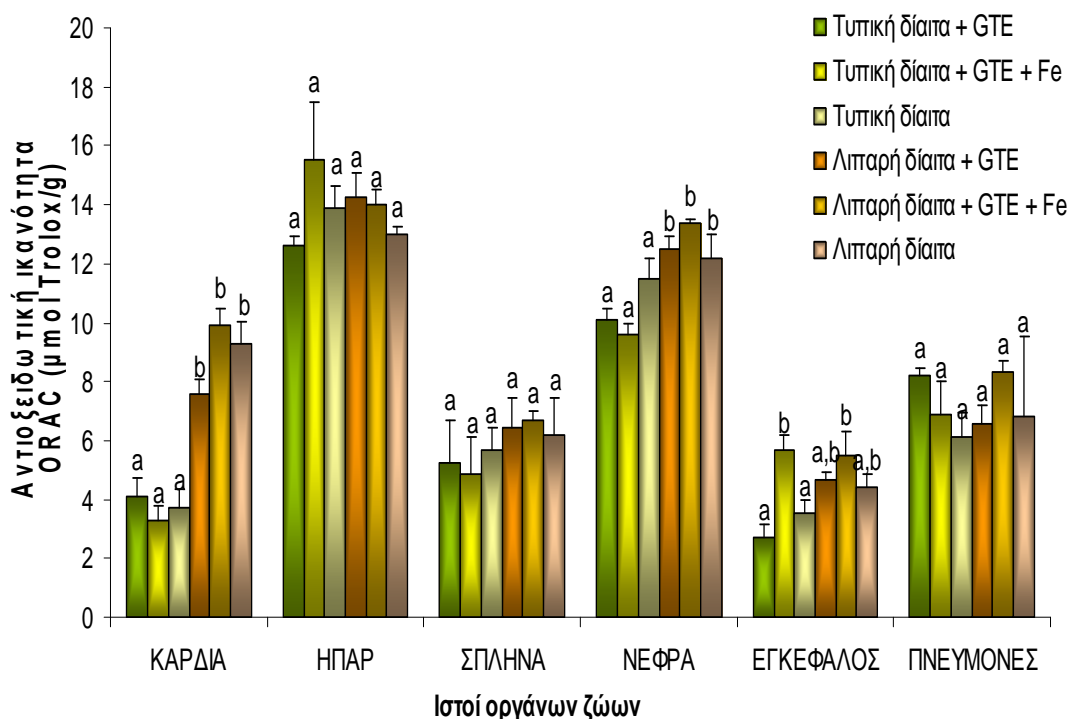


**Σχήμα 9.6.** Αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στους ιστούς οργάνων των ζώων μετά την ενίσχυση με GTE και GTE με σίδηρο, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ . Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί εκθέτες ανά ιστό δηλώνουν ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=15$ .



**Σχήμα 9.7.** Αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος FRAP) στην καρδιά και το ήπαρ των ζώων μετά την ενίσχυση με GTE και GTE με σίδηρο, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ . Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ ,  $n=15$  (Η στατιστική ανάλυση περιέλαβε και την τυπική και τη λιπαρή διαίτα).

Η μέθοδος ORAC δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα ούτε ανάμεσα στις ομάδες της τυπικής, ούτε ανάμεσα στις ομάδες της λιπαρής διαίτας στην καρδιά, το ήπαρ, τη σπλήνα, τους πνεύμονες και τα νεφρά ( $P>0,05$ ). Στον εγκέφαλο η ομάδα του τσαγιού με σίδηρο έδειξε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις άλλες ομάδες ( $P<0,05$ ). Στην καρδιά, τον εγκέφαλο και τα νεφρά διαφορές παρουσιάστηκαν μόνο ανάμεσα στην τυπική και τη λιπαρή διαίτα, ανεξαρτήτου της ενίσχυσης με GTE. Συγκεκριμένα, στη λιπαρή διαίτα η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη από ότι στην τυπική ( $P<0,05$ ) (Σχήμα 9.8).

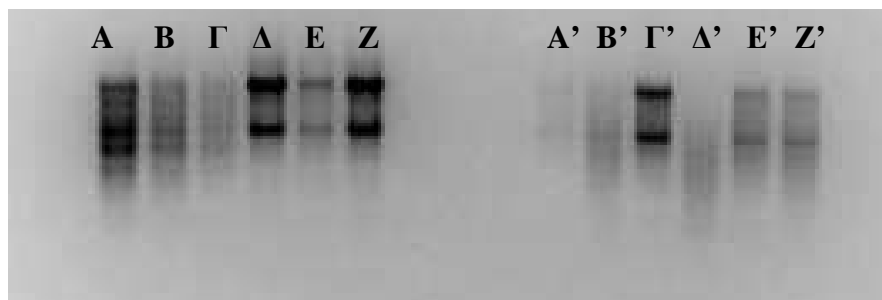


**Σχήμα 9.8.** Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (μέθοδος ORAC) στους ιστούς οργάνων των ζώων των 6 ομάδων, εκφρασμένη σε  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα στις 6 ομάδες για κάθε ιστό. Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων σε επίπεδο σημαντικότητας  $P<0,05$ ,  $n=3$ .

Η έκφραση των γονιδίων *mark-1*, *catalase*, *NF-kB*, *c-fos*, *c-myc*, *c-jun*, *NADPH-oxidase* και *b-actin* (εσωτερικό control) μελετήθηκε σε επίπεδο RNA με τη μέθοδο PCR αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR). Η έκφραση μελετήθηκε στους ιστούς της καρδιάς και του ήπατος. Το RNA που απομονώθηκε φαίνεται στην Εικόνα 9.4. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.5, στην καρδιά η έκφραση των γονιδίων *c-*

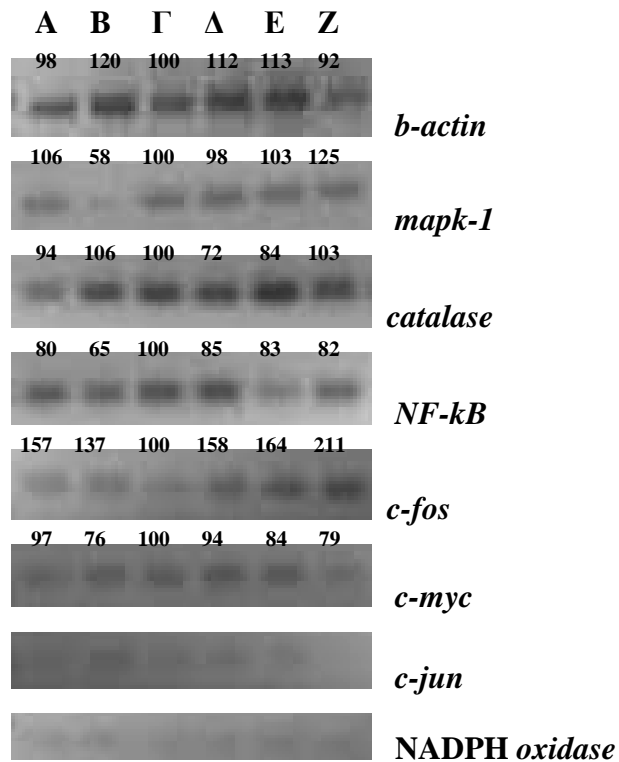
*jun* και *NADPH-oxidase* ήταν μικρή και ελάχιστα προσδιορίσιμη. Όλα τα υπόλοιπα γονίδια εκφράστηκαν σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα *c-jun* και *NADPH-oxidase*, σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν. Η *b-actin* είχε τη μεγαλύτερη έκφραση από όλα τα γονίδια και χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό control για να προσδιοριστεί η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου σε κάθε ιστό. Η σχετική έκφραση των γονιδίων *mark-1*, *catalase*, *NF-kB* και *c-myc* δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις διαφορετικές δίαιτες, δείχνοντας μια διακύμανση μικρότερη του 30% ανάμεσα στα δείγματα. Εντούτοις, μια σημαντική μείωση της έκφρασης παρατηρήθηκε στον ιστό της ομάδας Β για τα *mark-1* (58%) και *NF-kB* (65%). Αξιοσημείωτη μεταβολή στην έκφραση του *c-fos* παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλες τις ομάδες. Θεωρώντας ως control την ομάδα Γ, η έκφραση του γονιδίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις υπόλοιπες 5, δείχνοντας μια διακύμανση από 137% στην ομάδα Ε σε 211% στην ομάδα Ζ.

Στο ήπαρ μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *mark-1*, *catalase*, *c-fos*, *c-myc* και *b-actin*. Η έκφραση των *c-fos* και *c-myc* ήταν μικρότερη και ελάχιστα προσδιορίσιμη. Η έκφραση των *mark-1* και *catalase* δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις 6 δίαιτες. Και τα δύο γονίδια έδειξαν μικρές διαφορές στην έκφραση ανάμεσα στις 5 ομάδες και την ομάδα control, μικρότερες του 23%.

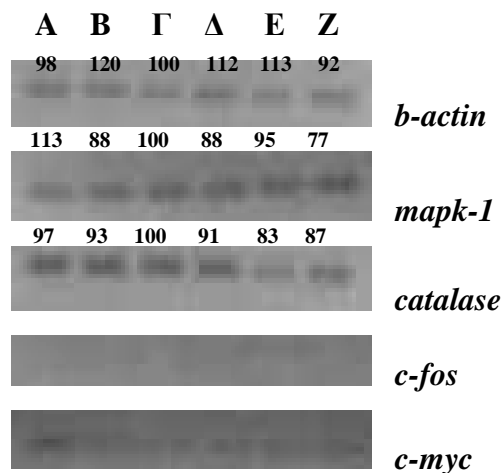


**Εικόνα 9.4.** RNA ιστού ήπατος (αριστερά) και καρδιάς (δεξιά) των ποντικών των 6 ομάδων. Δίαιτα Α=Τυπική δίαιτα ποντικών (Altromin 1324), ενισχυμένη με GTE, Δίαιτα Β=Altromin 1324, ενισχυμένη με GTE και σίδηρο, Δίαιτα Γ=Altromin 1324, Δίαιτα Δ=Λιπαρή δίαιτα ενισχυμένη με GTE, Δίαιτα Ε=Λιπαρή δίαιτα ενισχυμένη με GTE και σίδηρο και Δίαιτα Ζ=Λιπαρή δίαιτα.

## ΙΣΤΟΙ ΚΑΡΔΙΑΣ



## ΙΣΤΟΙ ΗΠΑΤΟΣ



Εικόνα 9.5. Επίπεδα μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων στο ήπαρ και στην καρδιά των ποντικών των 6 ομάδων, έπειτα από ημιποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής. Η ένταση μεταγραφής (volume) κάθε γονιδίου κανονικοποιήθηκε για κάθε ιστό έναντι των επιπέδων μεταγραφής της *b-actin*. Οι αριθμοί πάνω από κάθε εικόνα δείχνουν τη σχετική έκφραση (ποσοστό %) για κάθε γονίδιο του αντίστοιχου ιστού κάθε ποντικίου που ελάμβανε τη συγκεκριμένη διαίτα. Η μεταγραφή κάθε γονιδίου στο δείγμα Γ (κανονική διαίτα) ελήφθη ως μεταγραφή αναφοράς 100%, έπειτα από κανονικοποίηση με τη *b-actin*. Δίαιτα A=Τυπική διαίτα ποντικών (Altromin 1324), ενισχυμένη με GTE, Δίαιτα B=Altromin 1324, ενισχυμένη με GTE και σίδηρο, Δίαιτα Γ=Altromin 1324, Δίαιτα Δ=Λιπαρή διαίτα ενισχυμένη με GTE, Δίαιτα E=Λιπαρή διαίτα ενισχυμένη με GTE και σίδηρο και Δίαιτα Z=Λιπαρή διαίτα.

## **10. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΙΠΟΣ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟ ΣΕ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ**

### **10.1. Εισαγωγή-Στόχος**

Η κατανάλωση τσαγιού έχει συσχετιστεί με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, μέσω τις επίδρασης των συστατικών του σε διάφορους δείκτες, όπως η αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος, η αγγειοδιαστολή και οι παράγοντες αιμόστασης και φλεγμονής (Duffy et al, 2001; Hodgson et al, 2001b; Rietveld & Wiseman, 2003; Curin & Andriantsitohaina, 2005; Mukamal et al, 2007). Η κατανάλωση του γεύματος, ιδίως όταν αυτό περιέχει λίπος, φαίνεται να επηρεάζει άμεσα κάποιους από αυτούς τους δείκτες, οδηγώντας σε επιτάχυνση των οξειδωτικών διαδικασιών στο αίμα, κινητοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και προώθηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Blanco-Colio et al, 2000; Hodgson et al, 2001; Esposito et al, 2003; Hodgson et al, 2005; Ruano et al, 2007). Παράλληλα, μελέτες δείχνουν ότι η βιοδραστικότητα του τσαγιού επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση τους με τα συστατικά του γεύματος. Οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι αποτρέπουν την απορρόφηση του λίπους επηρεάζοντας τη δραστηριότητα της παγκρεατικής λιπάσης (Ikeda et al, 2005, Sung & Sang, 2007). Επίσης, η δημιουργία συμπλόκων ανάμεσα στο σίδηρο και τις πολυφαινόλες δύναται να οδηγήσει στη μείωση της απορρόφησης τους στο λεπτό έντερο, με συνέπεια τον περιορισμό της επίδρασης τους επί των διαφόρων δεικτών καρδιαγγειακών παθήσεων (Argyri, Komaitis & Kapsokefalou, 2005; Alexandropoulou, Komaitis & Kapsokefalou, 2004; He et al. 2006).

Σε αυτή την πειραματική ενότητα διεξήχθη μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη παράλληλου σχεδιασμού στο νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ». Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της μεταγευματικής επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Ο κύριος στόχος της κλινικής αυτής δοκιμής ήταν να διερευνηθούν δύο βασικές υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση ήταν ότι η μεταγευματική κατανάλωση τσαγιού δύναται να βελτιώνει παράγοντες καρδιαγγειακής λειτουργίας που πιθανόν

να επηρεάζονται από το γεύμα. Η δεύτερη υπόθεση ήταν ότι το λίπος και ο σίδηρος του γεύματος ίσως επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα του τσαγιού, αλληλεπιδρώντας με τα συστατικά του. Η βιοδραστικότητα του τσαγιού αξιολογήθηκε αφενός μεν μέσω του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, αφετέρου δε μέσω της μέτρησης των επιπέδων συγκεκριμένων βιοδεικτών που σχετίζονται με την καρδιαγγειακή υγεία (λιπίδια, γλυκόζη, C-Reactive Protein, CRP).

## **10.2. Πειραματικός σχεδιασμός**

### **10.2.1. Κριτήρια εισόδου στη μελέτη**

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 60 εθελοντές μετά από συνέντευξη και συμπλήρωση δήλωσης αποδοχής εθελοντών. Όλοι οι εθελοντές είχαν ιστορικό κλινικής εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, συμπεριλαμβανομένου εμφράγματος του μυοκαρδίου ή σταθερής στηθάγχης ή είχαν υποβληθεί σε εγχείριση στις στεφανιαίες αρτηρίες πάνω από 6 μήνες πριν την είσοδο στη μελέτη. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν, μετά από συνέντευξη και συμπλήρωση ερωτηματολογίου, άτομα άνω των 70 και κάτω των 45 ετών, άτομα που ελάμβαναν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα σε δόσεις μεγαλύτερες της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης, άτομα που εμφάνιζαν ιστορικό αρρυθμιών, ασταθούς στηθάγχης, διαβήτη, νεφροπαθειών και ασθενειών του ήπατος και άτομα με BMI>35. Επίσης αποκλείστηκαν οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που ελάμβαναν ορμονική αγωγή, οι βαρείς καπνιστές (>40 τσιγάρα την ημέρα) και τα άτομα που κατανάλωναν >40 g αλκοόλ την ημέρα. Με χρήση εβδομαδιαίου ερωτηματολογίου ελέγχθηκε η κατανάλωση κρασιού, τσαγιού, βοτάνων, καφέ και συγκεκριμένων φρούτων πλουσίων εις πολυφαινόλες (δαμάσκηνα, μούρα, φράουλες, ρόδια κ.α.), ώστε να αποκλειστούν τα άτομα που κατανάλωναν ημερησίως μεγάλες ποσότητες από τα παραπάνω τρόφιμα (άνω της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης) κατά την εβδομάδα πριν την παρέμβαση.

### **10.2.2. Πρωτόκολλο της κλινικής μελέτης**

Η παρούσα κλινική μελέτη διεξήχθη κατά το διάστημα από 1/2/2009 έως 20/9/2010 και έλαβε χώρα μετά από έγκριση του πρωτοκόλλου της από την επιτροπή ηθικής του νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ» και χορήγηση σχετικής άδειας (Παράρτημα IV). Η μελέτη ήταν τυχαιοποιημένη και παράλληλου σχεδιασμού με τρεις άξονες. Οι ασθενείς

τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες των 19-21 ατόμων με χρήση της μεθόδου τυχαίων αριθμών 0-1. Η πρώτη ομάδα κατανάλωσε 1 ψωμάκι των 80 g, επαλειμμένο με 20 g βούτυρο και εν συνεχεία ένα φλιτζάνι πράσινο τσάι (330 ml). Η δεύτερη ομάδα κατανάλωσε ένα ψωμάκι ενισχυμένο με σίδηρο, επαλειμμένο με βούτυρο και εν συνεχεία ένα φλιτζάνι πράσινο τσάι. Το τσάι καταναλώνονταν σκέτο, χωρίς ζάχαρη. Η τρίτη ομάδα κατανάλωσε ένα ψωμάκι, επαλειμμένο με βούτυρο και εν συνεχεία ένα φλιτζάνι κρύο νερό (330 ml). Η κατανάλωση του γεύματος έγινε εντός 15 λεπτών από όλους τους εθελοντές, ενώ η κατανάλωση του τσαγιού εντός 10 λεπτών. Πριν το γεύμα, και μετά από 12ωρη, ολονύχτια νηστεία, ελήφθη αίμα από περιφερική φλέβα από όλους τους εθελοντές (baseline). Οι επόμενες δειγματοληψίες αίματος πραγματοποιήθηκαν για τους εθελοντές και των τριών ομάδων: i) 1,5 ώρα μετά την κατανάλωση του τσαγιού (1,5 h), ii) Τρεις ώρες μετά την κατανάλωση του τσαγιού (3 h) και iii) Πέντε ώρες μετά την κατανάλωση του τσαγιού (5 h), όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.1.

**21 εθελοντές που ελάμβαναν γεύμα και τσάι**

<b>B</b>	<b>Γ</b>	<b>T -</b>	<b>1,5h</b>	<b>3h</b>	<b>5h</b>
<i>Baseline</i>	<i>Λήξη Γεύματος</i>	<i>Λήξη τσαγιού</i>		<i>Δειγματοληψίες αίματος</i>	
15 min γεύμα		10 min τσάι		(χρόνος μετά το τσάι)	

**19 εθελοντές που ελάμβαναν γεύμα που περιείχε σίδηρο και τσάι**

<b>B</b>	<b>Γ</b>	<b>T -</b>	<b>1,5h</b>	<b>3h</b>	<b>5h</b>
<i>Baseline</i>	<i>Λήξη Γεύματος</i>	<i>Λήξη τσαγιού</i>		<i>Δειγματοληψίες αίματος</i>	
15 min γεύμα		10 min τσάι		(χρόνος μετά το τσάι)	

**20 εθελοντές που ελάμβαναν γεύμα και νερό**

<b>B</b>	<b>Γ</b>	<b>T -</b>	<b>1,5h</b>	<b>3h</b>	<b>5h</b>
<i>Baseline</i>	<i>Λήξη Γεύματος</i>	<i>Λήξη νερού</i>		<i>Δειγματοληψίες αίματος</i>	
15 min γεύμα		10 min νερό		(χρόνος μετά το τσάι)	

**Σχήμα 10.1. Σχηματική παρουσίαση του σχεδιασμού της κλινικής μελέτης.**

Οι διατροφικές συνήθειες των συμμετεχόντων στη μελέτη καταγράφηκαν με χρήση ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, ενώ καταγράφηκε αναλυτικά και η συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων κατά την τελευταία εβδομάδα καθώς και η κατανάλωση των τροφίμων μία μέρα πριν από την παρέμβαση. Οι εθελοντές



ελάμβαναν κανονικά τη φαρμακευτική τους αγωγή την ημέρα της παρέμβασης. Το γεύμα με το τσάι ή το νερό σερβίρονταν κάθε φορά περίπου στις 9 το πρωί έπειτα από συζήτηση με τον ασθενή, υπογραφή της δήλωσης συμμετοχής στη μελέτη, συνέντευξη και συμπλήρωση των ερωτηματολογίων (Παράρτημα IV).

### **10.3. Υλικά και αντιδραστήρια**

Το γεύμα ήταν πρωινό και περιλάμβανε 1 ψωμάκι ενισχυμένο ή μη με σίδηρο (80 g το ένα), το οποίο καταναλώνονταν με 20 g βούτυρο (2 ατομικές συσκευασίες των 10 g, unsalted, President butter, France). Τα ενισχυμένα με σίδηρο ψωμάκια περιείχαν 10 mg γαλακτικό σίδηρο ανά 50 g. Το πράσινο τσάι ήταν τσάι με διπλές κατεχίνες της εταιρείας Lipton (Lipton, Linea, ανανάς-ιβίσκος, Unilever Hellas).

Στην παρούσα κλινική μελέτη έλαβαν χώρα αναλύσεις προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα με τις μεθόδους FRAP και ORAC. Οι συσκευές και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι διαδικασίες παρασκευής των διαλυμάτων κάθε μεθόδου είναι οι ίδιες που περιγράφονται στις αντίστοιχες αναλύσεις των προηγούμενων κεφαλαίων. Επίσης, προσδιορίστηκαν στον ορό τα τριγλυκερίδια, η ολική χοληστερόλη, η HDL, η LDL, η γλυκόζη, η παγκρεατική λιπάση, η CRP και το ουρικό οξύ με χρήση αυτόματου βιοχημικού αναλυτή (INTEGRA 400 PLUS, Roche Hellas) και χρήση των κατάλληλων αντιδραστηρίων (Roche Hellas).

### **10.4. Μέθοδοι**

#### **10.4.1. Σύσταση και παρασκευή γευμάτων και τσαγιού**

Το αφέψημα πράσινου τσαγιού που δίνονταν στους ασθενείς παρασκευάζονταν μετά από προσθήκη 2 συσκευασιών πράσινου τσαγιού ενισχυμένου με κατεχίνες (Lipton Linea, Unilever)(περίπου 4,5 g) σε 330 ml ζεστό νερό και παραμονή για 2 λεπτά. Το προκύπτον εκχύλισμα περιείχε περίπου 400 mg πολυφαινόλες.

Το ψωμί παρασκευάζονταν στο εργαστήριο Μηχανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η παρασκευή γίνονταν σε φόρμες του ενός κιλού και λάμβανε χώρα σταδιακά, ώστε το ψωμί να είναι φρέσκο κατά τη διάρκεια της μελέτης. Μετά την παρασκευή, το ψωμί κόβονταν σε φέτες 80 g και τοποθετείτο στην κατάψυξη. Στην περίπτωση του ψωμιού με σίδηρο προσαρμόστηκε στη συνταγή η

προσθήκη 20 mg γαλακτικού σιδήρου ανά 100 g ψωμί (ή 0,2 g/kg). Η προσθήκη έγινε αρχικά και σταδιακά στο αλεύρι. Στους 6 πρώτους ασθενείς, το ψωμί περιείχε αλεύρι σίτου, καβουρδισμένο καλαμποκάλευρο, αλάτι και ζύμη.

Η συνταγή παρασκευής του ψωμιού ήταν η εξής (Mantala et al, 2009): Για 1 κιλό αλεύρι χρειάστηκαν 20 g μαργαρίνη, 15 g ζάχαρη, 16 g αλάτι, 20 g ζύμη (μαγιά) και 540 g νερό. Όλα τα υλικά εκτός της μαγιάς τοποθετούνταν στο μίξερ και ακολουθούσε ανάδευση για 1 min. Σε ένα ποτήρι ζέσεως τοποθετούνταν το νερό στο οποίο επροστίθετο σταδιακά η μαγιά. Έπειτα επροστίθετο το νερό στα στερεά υλικά και συνεχίζονταν η ανάδευση για 12 λεπτά. Το ζυμάρι αφήνονταν για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 οC. Ακολουθούσε ψήσιμο στους 198 οC για 20 λεπτά.

Με χρήση πινάκων σύστασης τροφίμων (Τριχοπούλου, 2004) και των ετικετών των καταναλισκόμενων τροφίμων και μετά από απαραίτητους υπολογισμούς και αναγωγές προσδιορίστηκε η ακριβής σύσταση των γευμάτων των τριών ομάδων, η οποία φαίνεται στους πίνακες 10.1. και 10.2.

**Πίνακας 10.1. Σύσταση γεύματος ομάδων τσαγιού και τσαγιού με σίδηρο (330 ml τσάι, 80 g ψωμί και 20 g βούτυρο).**

	Θερμίδες (Kcal)	Νερό (g)	Υδατάνθρακες (g)	Λίπος (g)	Πρωτεΐνες (g)	Νάτριο (g)	Σίδηρος (mg)
<b>Τσάι</b>	13,2	324	0,3		1,4	0,066	-
<b>Βούτυρο</b>	174,7	3,12	-	16,34	0,1	-	-
<b>Ψωμί</b>	202,4	38,41	38,97	1,93	7,45	1,1	16
<b>Σύνολο</b>	390,3	365,53	39,27	18,27	8,95	1,166	16

**Πίνακας 10.2. Σύσταση γεύματος ομάδας νερού (330 ml νερό, 80 g ψωμί και 20 g βούτυρο).**

	Θερμίδες (Kcal)	Νερό (g)	Υδατάνθρακες (g)	Λίπος (g)	Πρωτεΐνες (g)	Νάτριο (g)	Σίδηρος (mg)
<b>Νερό</b>		330	-	-	-	-	-
<b>Βούτυρο</b>	174,7	3,12	-	16,34	0,1	-	-
<b>Ψωμί</b>	202,4	38,41	38,97	1,93	7,45	1,1	
<b>Σύνολο</b>	374,14	371,53	38,97	18,27	7,55	1,1	-

#### 10.4.2. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα των ασθενών

Για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα, μια ποσότητα αίματος που ελήφθη εκ των ασθενών τοποθετήθηκε σε σωληνάκια με EDTA. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 3500 g, μετά από 5 λεπτά

παραμονή σε ηρεμία. Το προκύπτων πλάσμα τοποθετήθηκε στους -80 °C μέχρι τις αναλύσεις. Οι αναλύσεις για την αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα έγιναν σε δύο φάσεις, με την εφαρμογή των μεθόδων FRAP και ORAC. Η πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε μετά τη συλλογή των μισών περίπου δειγμάτων πλάσματος, ενώ η δεύτερη φάση έλαβε χώρα μετά το τέλος της μελέτης.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου FRAP, σε 96 well plate τοποθετήθηκαν 10 μl πλάσμα και 100 μl HCl για τα τυφλά και 10 μl πλάσμα και 100 μl FRAP για το δείγμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 30 min στα 595 nm. Οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν, εκτός από το τυφλό που μετρήθηκε μία φορά. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ORAC, μετά από αραίωση του κάθε πλάσματος 1:100, προστέθηκαν 20 μl δείγματος ή 20 μl 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) σε 200 μl fluorescein ( $8,16 \cdot 10^{-5}$  mM) εντός 96-well plate. Μετά από επώαση για 20 min στους 37 °C, προστέθηκαν 20 μl ABAP (119,4 μmol/ml) και αμέσως το plate τοποθετήθηκε στο φθορισμόμετρο και μετρήθηκε ο φθορισμός 35 φορές ανά λεπτό στους 37 °C. Η παρασκευή των διαλυμάτων και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται σε προηγούμενες παραγράφους.

#### **10.4.3. Προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών στον ορό των ασθενών**

Για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της HDL, της LDL, της παγκρεατικής λιπάσης, της CRP, του ουρικού οξέος και της γλυκόζης, μια ποσότητα αίματος που ελήφθη εκ των ασθενών τοποθετήθηκε σε σωληνάκια πήγματος. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 3500 g, μετά από 5 λεπτά παραμονή σε ηρεμία. Ο προκύπτων ορός τοποθετήθηκε στους -80 °C μέχρι τις αναλύσεις. Ο INTEGRA 400 PLUS είναι αυτόματος νοσοκομειακός βιοχημικός αναλυτής με δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών δειγμάτων. Μετά από επιτέλεση ημερήσιων διαδικασιών συντήρησης του βιοχημικού αναλυτή (γέμισμα δοχείου νερού, άδειασμα δοχείου αποβλήτων, καθαρισμός φίλτρων και βελόνων κ.α.) τα προς ανάλυση δείγματα ορού ξεπαγώνονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν από το ψυγείο εντός του αναλυτή οι κασέτες-αντιδραστήρια των 7 αναλύσεων (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γλυκόζη, ουρικό οξύ, HDL, CRP, παγκρεατική λιπάση). Αυτές οι κασέτες περιείχαν το σύνολο των απαιτούμενων για κάθε ανάλυση αντιδραστηρίων. Έπειτα, στις κατάλληλες θέσεις του αναλυτή τοποθετούνταν τα αντίστοιχα για κάθε ανάλυση αντιδραστήρια c-fas και νερό και επιλέγονταν η λειτουργία «calibration» για να γίνει η κατάλληλη βαθμονόμηση.

Μετά, τοποθετούνταν τα αντίστοιχα για κάθε ανάλυση precipath και precipinorm (εργοστασιακά δείγματα ορού που έχουν το ρόλο θετικού και αρνητικού control) και επιλέγονταν η λειτουργία «control». Με τον τρόπο αυτό ο αναλυτής έκανε αυτόματα την πρότυπη καμπύλη και εμφάνιζε τα όρια αποδεκτών τιμών για κάθε ανάλυση, τα οποία ήταν σε όλες τις περιπτώσεις συγκεκριμένα. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στον αναλυτή 100 µl ορού κάθε δείγματος και επιλέγονταν η τελική ανάλυση για κάθε βιοδείκτη. Οι αναλύσεις γίνονταν μία φορά, λόγω της μεγάλης ακρίβειας του αναλυτή και του μεγάλου κόστους των κίτς. Οι προκύπτουσες τιμές για κάθε δείκτη ήταν αυτές του SI (mmol/L για χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γλυκόζη, ουρικό οξύ, HDL, U/L για τη λιπάση και mg/L για τη CRP).

Σύμφωνα με τις πληροφορίες που παρέχονται από την εταιρεία Roche Diagnostics για κάθε αντιδραστήριο, ο προσδιορισμός της χοληστερόλης βασίζεται σε μία ενζυμική χρωματομετρική μέθοδο. Οι εστέρες της χοληστερόλης διασπώνται μέσω της εστεράσης της χοληστερόλης και στη συνέχεια η οξειδάση της χοληστερόλης οδηγεί στην παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το οποίο μέσω οξειδωτικής σύζευξης παράγει την ερυθρή χρωστική κινουμίνη. Η ένταση του χρώματος αυτής της χρωστικής είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χοληστερόλης, η οποία προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 512 nm. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας, με χρήση ανθρώπινων δειγμάτων και προτύπων ελέγχου, και βρέθηκε CV=0,5% εντός σειράς και CV=1,9% μεταξύ σειρών, για n=21. Τα τριγλυκερίδια προσδιορίζονται με παρόμοια ενζυμική χρωματομετρική ανάλυση. Τα τελικά προϊόντα είναι η αμινοφαινοζάνη και η 4-χλωροφαινόλη, ενώ η απορρόφηση μετράται στα 512 nm. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας και βρέθηκε CV=1,6% εντός σειράς και CV=1,9% μεταξύ σειρών, για n=20. Η HDL χοληστερόλη προσδιορίζεται με παρόμοιο τρόπο με την ολική, μέσω χρωματομετρικής μεθόδου που βασίζεται στην τελική παραγωγή κυανής κινουμίνης, ενώ η απορρόφηση μετράται στα 538 nm. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας και βρέθηκε CV=1,13% εντός σειράς και CV=1% μεταξύ σειρών, για n=21. Η βαθμονόμηση και για τους 3 αυτούς βιοδείκτες ήταν γραμμική παλινδρόμηση. Η LDL προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:  $LDL = Total\ Cholesterol - (HDL + TG/5)$ , που ισχύει για τιμές TG < 400 mg/dl.

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης βασίζεται σε μία ενζυμική μέθοδο αναφοράς με εξοκινάση. Η εξοκινάση φωσφορυλιώνει τη γλυκόζη προς 6-φωσφορική γλυκόζη και

εν συνεχεία η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης καταλύει την οξείδωση αυτής προς NADP<sup>+</sup> και NADPH. Το NADPH έχει συγκέντρωση ανάλογη αυτής της γλυκόζης και προσδιορίζεται μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 340 nm. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας και βρέθηκε CV=4,48% εντός σειράς και CV=4,44% μεταξύ σειρών, για n=21. Ο δείκτης φλεγμονής CRP υπολογίζεται μέσω θολοσιμετρικής ανάλυσης. Η ανθρώπινη CRP συγκολλάται σε σωματίδια λάτεξ τα οποία είναι επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα. Το ίζημα προσδιορίζεται θολοσιμετρικά στα 552 nm. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας και βρέθηκε CV=0,9% εντός σειράς και CV=3,3% μεταξύ σειρών, για n=21. Η παγκρεατική λιπάση προσδιορίζεται χρωματομετρικά μέσω της μέτρησης της αύξησης της απορρόφησης στα 583 nm. Μέσω μιας σειράς αντιδράσεων τελικά προκύπτει γλουταρικό οξύ και η ερυθρή χρωστική μεθυλορεσορουφίνη. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας και βρέθηκε CV=1,2% εντός σειράς και CV=2,7% μεταξύ σειρών, για n=21. Το ουρικό οξύ μετράται με ενζυμική χρωματομετρική μέθοδο στα 552 nm. Η ουρική διασπά το ουρικό οξύ προς αλλαντοΐνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, παρουσία υπεροξειδάσης, παράγεται η χρωστική διμίνη της κινόνης. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε εσωτερικό πρωτόκολλο εκ της εταιρείας και βρέθηκε CV=1% εντός σειράς και CV=1,7% μεταξύ σειρών, για n=10. Η βαθμονόμηση και για τους βιοδείκτες αυτούς ήταν γραμμική παλινδρόμηση.

## **10.5. Στατιστικές αναλύσεις**

### **10.5.1. Ανάλυση ισχύος κλινικής δοκιμής**

Η ανάλυση ισχύος έλαβε χώρα με στόχο την επιλογή του αριθμού των συμμετεχόντων στη μελέτη. Οι κύριοι διερευνώμενοι παράγοντες της παρούσας κλινικής δοκιμής ήταν ο δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας FRAP και τα τριγλυκερίδια. Κύριος στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση πιθανών διαφορών σε αυτούς τους βιοχημικούς δείκτες μεταξύ των ομάδων παρέμβασης. Για τον λόγο αυτό ο στατιστικός έλεγχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ανάλυση διακύμανσης ANOVA. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για όλους του ελέγχους ορίστηκε το  $\alpha=0,05$  ενώ ως επιδιωκόμενη ισχύς των ελέγχων το  $\gamma=0,80$ . Στον παρακάτω πίνακα

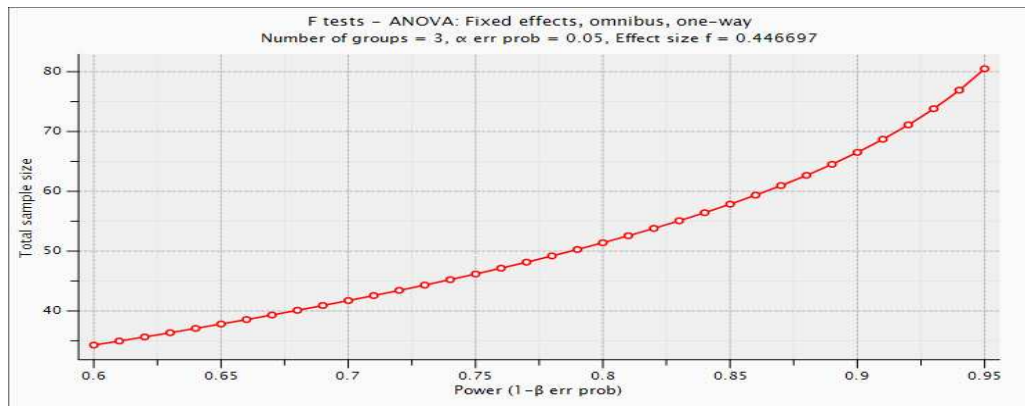
παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των βιοχημικών δεικτών πριν από την παρέμβαση καθώς και η επιδιωκόμενη μέση τιμή μετά την εφαρμογή καθεμίας από τις παρεμβάσεις.

**Πίνακας 10.3. Μέσες τιμές των βιοχημικών δεικτών πριν από την παρέμβαση και η επιδιωκόμενη μέση τιμή δύο ώρες μετά την εφαρμογή καθεμίας από τις παρεμβάσεις.**

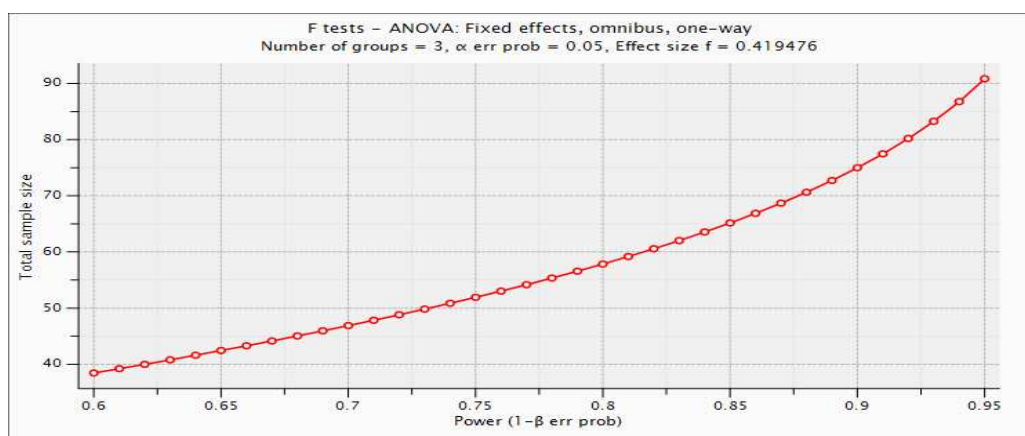
Βιοχημικός δείκτης	Πριν την παρέμβαση	Μετά την κατανάλωση γεύματος και τσαγιού	Μετά την κατανάλωση γεύματος, τσαγιού και σιδηρού	Μετά την κατανάλωση γεύματος και νερού
FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$ )	750 $\pm$ 230	1000 $\pm$ 230	850 $\pm$ 230	750 $\pm$ 230
TRIGL (mmol/L)	1,5 $\pm$ 0,15	1,7 $\pm$ 0,15	1,8 $\pm$ 0,15	1,9 $\pm$ 0,15

Η ανάλυση ισχύος για τον δείκτη FRAP έδειξε ότι το συνολικό απαιτούμενο δείγμα είναι 54 άτομα (18 άτομα ανά ομάδα παρέμβασης). Επιπλέον η ανάλυση ισχύος για τον δείκτη TRIGL έδειξε ότι το συνολικό απαιτούμενο δείγμα είναι 60 άτομα (20 άτομα ανά ομάδα παρέμβασης). Παρακάτω παρατίθενται νορμογράμματα τα οποία συσχετίζουν το ολικό μέγεθος δείγματος με την στατιστική ισχύ που επιτυγχάνουμε σε ελέγχους ANOVA για κάθε ένα από τους 2 βιοχημικούς δείκτες (Σχήματα 10.2, 10.3).

Από τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη μας πιθανή απώλεια δεδομένων (περίπου 15%) συμπεραίνουμε ότι το συνολικό απαιτούμενο δείγμα είναι 66 ασθενείς (22 ασθενείς ανά ομάδα παρέμβασης). Το μέγεθος αυτό επιτρέπει ελέγχους μέσω των τιμών πριν και μετά την παρέμβαση σε κάθε ομάδα ξεχωριστά με ισχύ  $\gamma > 0,80$  και σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα G.Power v3.0.10.



**Σχήμα 10.2. Νορμόγραμμα δείκτη FRAP**



**Σχήμα 10.3. Νορμόγραμμα δείκτη TRIGL**

### 10.5.2. Ανάλυση δεδομένων χαρακτηριστικών ασθενών

Τα στοιχεία που προέκυψαν εκ των ερωτηματολογίων για κάθε ασθενή εισήχθησαν σε βάση δεδομένων του SPSS (SPSS v13.0). Στη συνέχεια έλαβε χώρα υπολογισμός της συχνότητας κατανάλωσης διαφόρων τροφίμων (frequencies) ανά ομάδα. Επίσης, έλαβε χώρα σύγκριση των χαρακτηριστικών των ασθενών κάθε ομάδας (βάρος, ύψος, BMI, ηλικία) στο baseline. Οι διαφορές αξιολογήθηκαν με ανάλυση one-way ANOVA, Bonferoni Post-hoc test και θεωρήθηκαν σημαντικές όταν  $P < 0.05$ .

### 10.5.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Έλαβαν χώρα συγκρίσεις των μέσων τιμών για κάθε βιοδείκτη ανάμεσα στις 3 ομάδες και ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (SPSS v13.0). Οι διαφορές αξιολογήθηκαν με χρήση General Linear Model, Repeated Measurements και Bonferoni test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν  $P < 0.05$ .

## 10.6. Αποτελέσματα κλινικής μελέτης

### 10.6.1. Χαρακτηριστικά ασθενών

Τη μελέτη ολοκλήρωσαν 60 ασθενείς εκ των οποίων 21 τυχαιοποιήθηκαν στην ομάδα του τσαγιού, 19 στην ομάδα του τσαγιού με σίδηρο και 20 στην ομάδα του νερού. Όλοι οι ασθενείς είχαν εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο. Τα ποσοστά εμφάνισης κάθε παράγοντα κινδύνου φαίνονται στον Πίνακα 10.4. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις 3 ομάδες ως προς την ηλικία ( $P=0,882$ ), το βάρος ( $P=0,141$ ), το ύψος ( $P=0,078$ ) και τον BMI ( $P=0,621$ ) (Πίνακας 10.5). Οι συμμετέχοντες στη μελέτη κατανάλωναν τσάι, κόκκινο κρασί, φρούτα και λαχανικά σε ποσότητες που δεν υπερέβαιναν τις μέσες συνιστώμενες δόσεις (Πίνακες Παραρτήματος VI). Επίσης, μόλις το 3,1% κατανάλωνε περιστασιακά αντιοξειδωτικά συμπληρώματα (Πίνακας 10.4). 5 ασθενείς ξεκίνησαν τη μελέτη αλλά δεν την ολοκλήρωσαν λόγω άρνησης ή ανάγκης υποβολής σε εξετάσεις (Τα δεδομένα δεν περιλαμβάνονται στις αναλύσεις). Επίσης, σε 3-4 ασθενείς ανά ομάδα δεν έλαβε χώρα η τελευταία αιμοληψία (Τα δεδομένα περιλαμβάνονται στις αναλύσεις).

**Πίνακας 10.4. Συνολικά χαρακτηριστικά ασθενών κατά την έναρξη της μελέτης.**

<b>Αριθμός ατόμων</b>	60
<b>Άνδρες (%)</b>	91,7
<b>Γυναίκες (%)</b>	7,3
<b>Εγχείριση by pass (%)</b>	28,8
<b>Τοποθέτηση stent (%)</b>	51,7
<b>Υπερχολεστερολαιμία (%)</b>	70
<b>Διαβήτης (%)</b>	38,3
<b>Κάπνισμα (%)</b>	32,2
<b>Κληρονομικότητα (%)</b>	36,7
<b>Μετεμνηνοπαυσιακές γυν. (%)</b>	6,7
<b>Αντιοξειδωτικά συμπληρ. (%)</b>	3,3



**Πίνακας 10.5. Χαρακτηριστικά ασθενών ανά ομάδα κατά την έναρξη της μελέτης. Τα ίδια γράμματα ανά γραμμή δείχνουν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0,05$ ).**

	<b>Ομάδες παρέμβασης</b>		
	<b>Τσάι</b>	<b>Τσάι+Fe</b>	<b>Νερό</b>
<b>Αριθμός ατόμων</b>	21	19	20
<b>Ανδρες (%)</b>	90,5	94,7	90
<b>Γυναίκες (%)</b>	9,5	5,3	10
<b>Ηλικία (έτη)</b>	63,2±10,5a	63,4±10,2a	62±8,3a
<b>Βάρος (Kg)</b>	80,7±15,2a	86,2±10,8a	77,7±12a
<b>Ύψος (m)</b>	1,69±0,07a	1,73±0,08a	1,67±0,05a
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,9±4,8a	29±3,2a	27,8±4,3a

### 10.6.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού βιοδεικτών στο πλάσμα και τον ορό

Τα αποτελέσματα για τους 10 βιοδείκτες στις χρονικές στιγμές 0, 1,5, 3 και 5 h παρουσιάζονται στα σχήματα 10.4 έως 10.13 καθώς και στο Παράρτημα VI, όπου εμφανίζονται αναλυτικοί πίνακες και στοιχεία των στατιστικών αναλύσεων για κάθε εξεταζόμενο δείκτη.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,995$ ). Η καμπύλη εκ του baseline μέχρι την τελευταία μέτρηση ( $t=5$ ) εμφάνισε παραβολική μορφή ( $P=0,017$ ). Στην ομάδα του τσαγιού η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε σημαντικά 1,5 h μετά την παρέμβαση ( $P=0,01$ ), αλλά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές ( $t=3, t=5$  h). Στις άλλες δύο ομάδες δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές κατά την πορεία του χρόνου ( $P < 0,05$ ) (Σχ. 10.4).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρούμενη με τη μέθοδο ORAC δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ούτε ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,305$ ), ούτε ανάμεσα στις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ) (Σχ. 10.5).

Το ουρικό οξύ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ( $P=0,706$ ). Η καμπύλες εκ του baseline μέχρι την τελευταία μέτρηση ( $t=5$ ) εμφάνισαν παραβολική μορφή ( $P=0,039$ ). Σε κάθε ομάδα δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές ( $P < 0,05$ ). Στην ομάδα του τσαγιού το ουρικό οξύ μειώθηκε 1,5 h μετά το γεύμα με  $P=0,052$  (Σχ. 10.6).

Η ολική χοληστερόλη δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ούτε ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,880$ ), ούτε ανάμεσα στις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ) (Σχ. 10.7).

Τα τριγλυκερίδια εμφάνισαν παραβολικές καμπύλες ( $P=0,04$ ), ενώ δε υπήρξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,716$ ). Αν και στις ομάδες του τσαγιού και του τσαγιού με σίδηρο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές με την πάροδο του χρόνου ( $P<0,05$ ), εις την ομάδα του νερού ευρέθη σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων 3 ώρες μετά το γεύμα ( $P=0,048$ ) (Σχ. 10.8).

Η HDL χοληστερόλη δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές ούτε ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,962$ ), ούτε ανάμεσα στις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα ( $P<0,05$ ) (Σχ. 10.9).

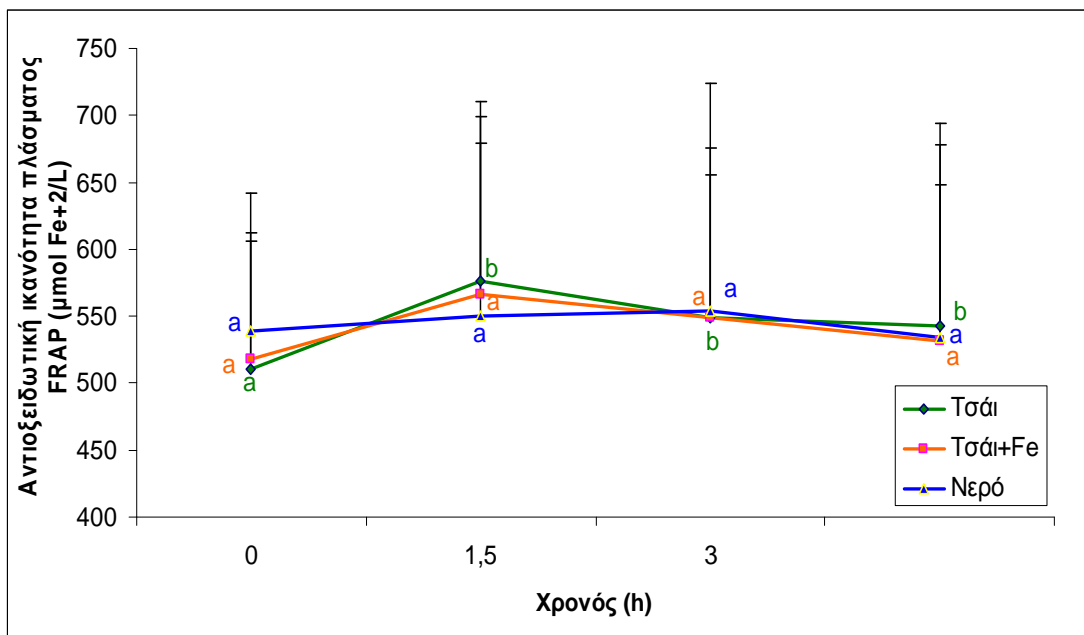
Η LDL χοληστερόλη δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ( $P=0,270$ ). Επίσης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα ( $P<0,05$ ) (Σχ. 10.10).

Η παγκρεατική λιπάση δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ( $P=0,450$ ). Επίσης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα ( $P<0,05$ ) (Σχ. 10.11).

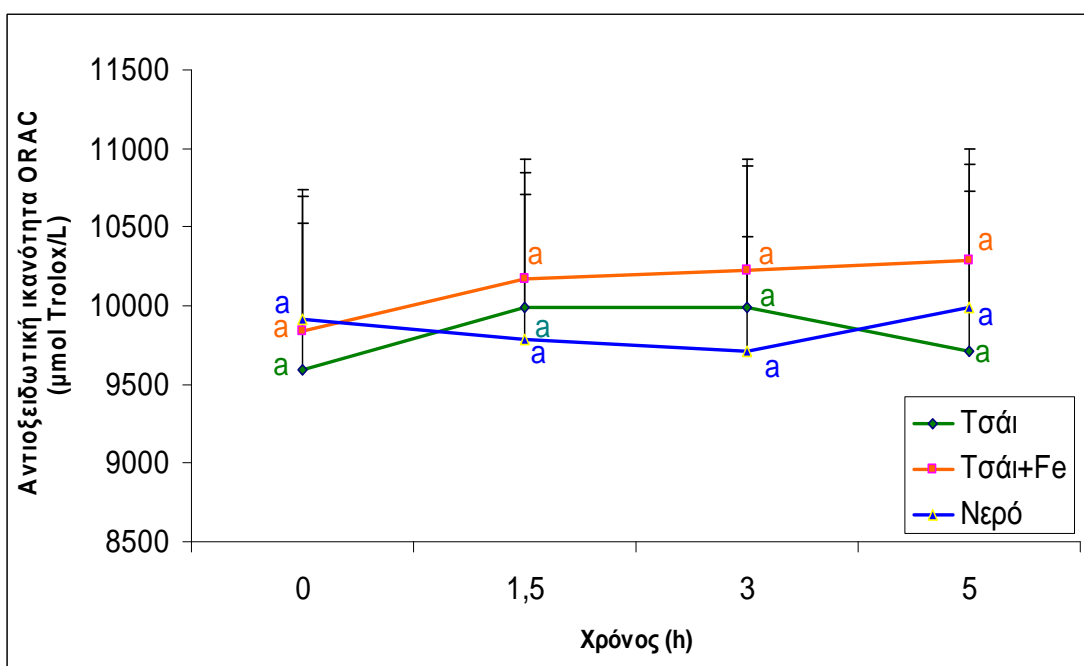
Η γλυκόζη εμφάνισε παραβολικές καμπύλες ( $P=0,001$ ), ενώ δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,390$ ). Στην ομάδα του τσαγιού παρατηρήθηκε αύξηση της γλυκόζης 1,5 h μετά την παρέμβαση ( $P=0,0001$ ), διατήρηση στις 3h και μείωση στις 5 h ( $P=0,01$ ). Στην ομάδα του νερού παρατηρήθηκε αύξηση της γλυκόζης 1,5 h μετά το γεύμα ( $P=0,001$ ), διατήρηση στις 3 h και επιστροφή στα αρχικά επίπεδα στις 5 h ( $P=0,0001$ ). Στην ομάδα τσαγιού με σίδηρο η γλυκόζη αυξήθηκε 1,5 h μετά την παρέμβαση και διατηρήθηκε στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές ( $P=0,0001$ ) (Σχ. 10.12).

Η CRP δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ( $P=0,378$ ), αν και υπήρξε μια τάση αύξησης στην ομάδα του νερού και μείωσης στην ομάδα του τσαγιού. Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με την πάροδο του χρόνου σε κάθε ομάδα ( $P<0,05$ ) (Σχ. 10.13).

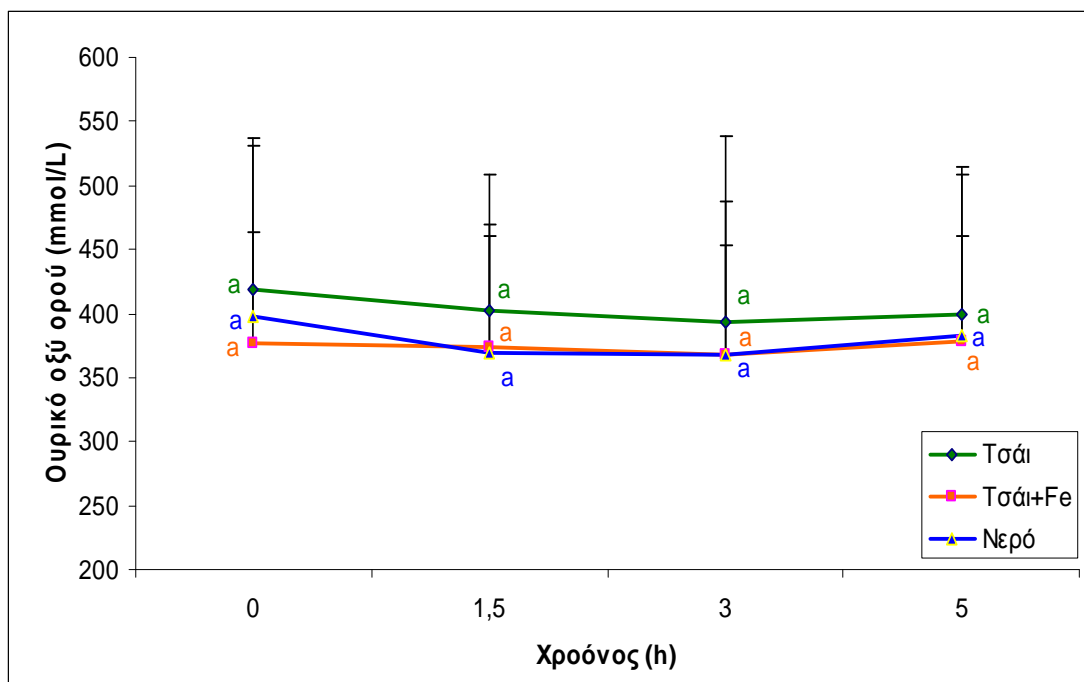
Πρέπει, τέλος, να σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις μη στατιστικά σημαντικών διαφορών η στατιστική ισχύ ήταν χαμηλή ( $Power<0,8$ ).



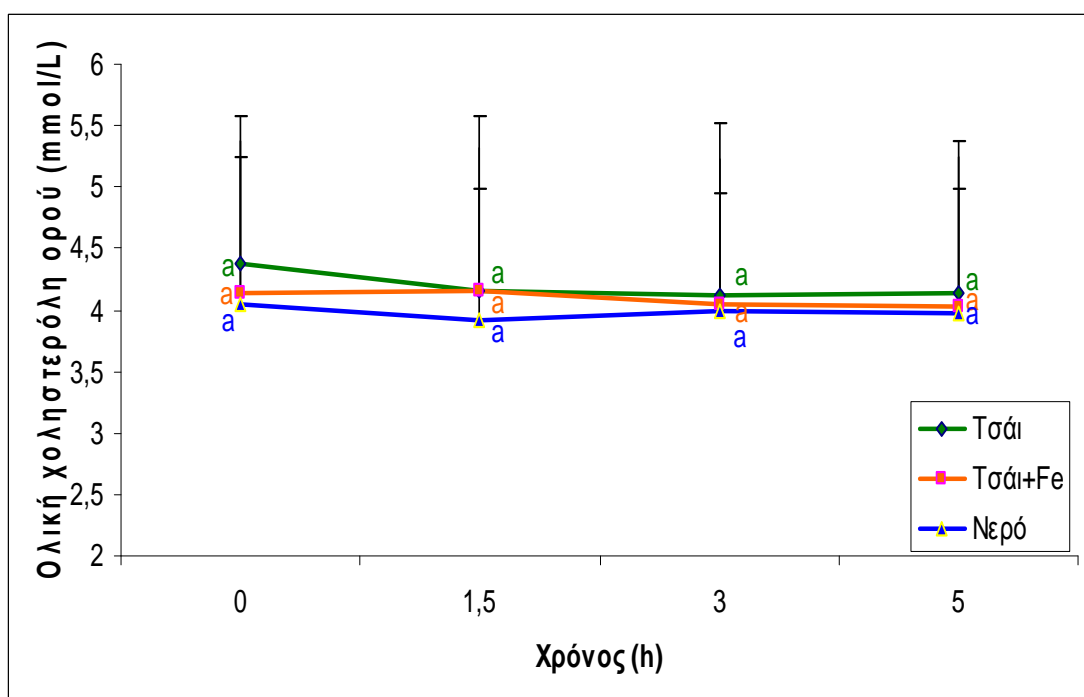
**Σχήμα 10.4.** Αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή, μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας ± την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



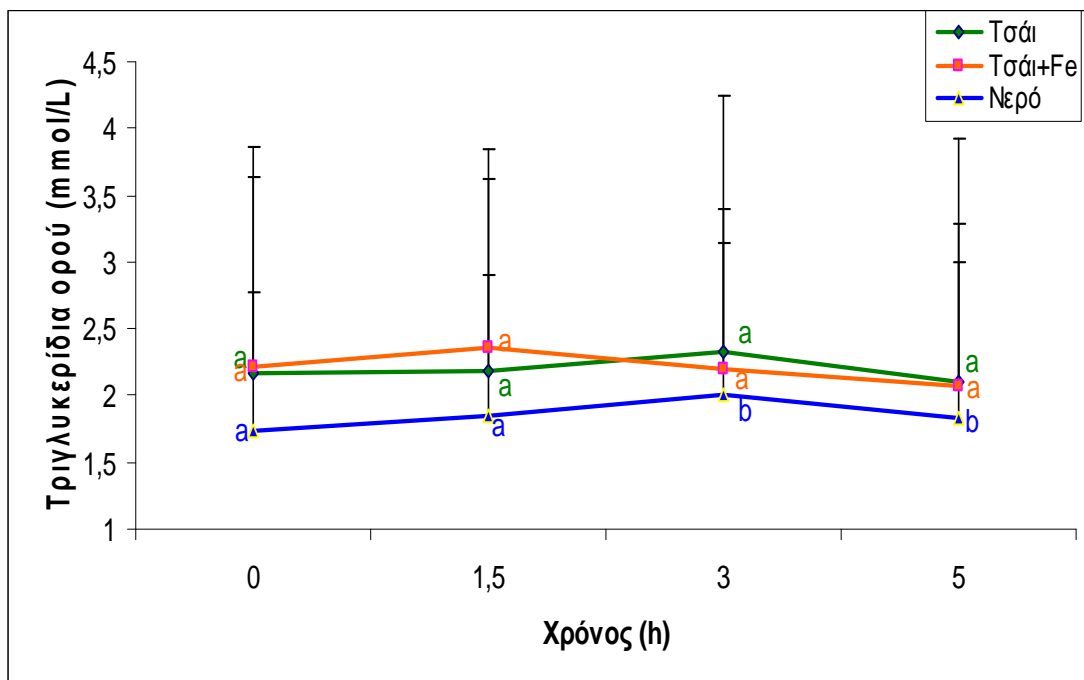
**Σχήμα 10.5.** Αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή, μετρούμενη με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας ± την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



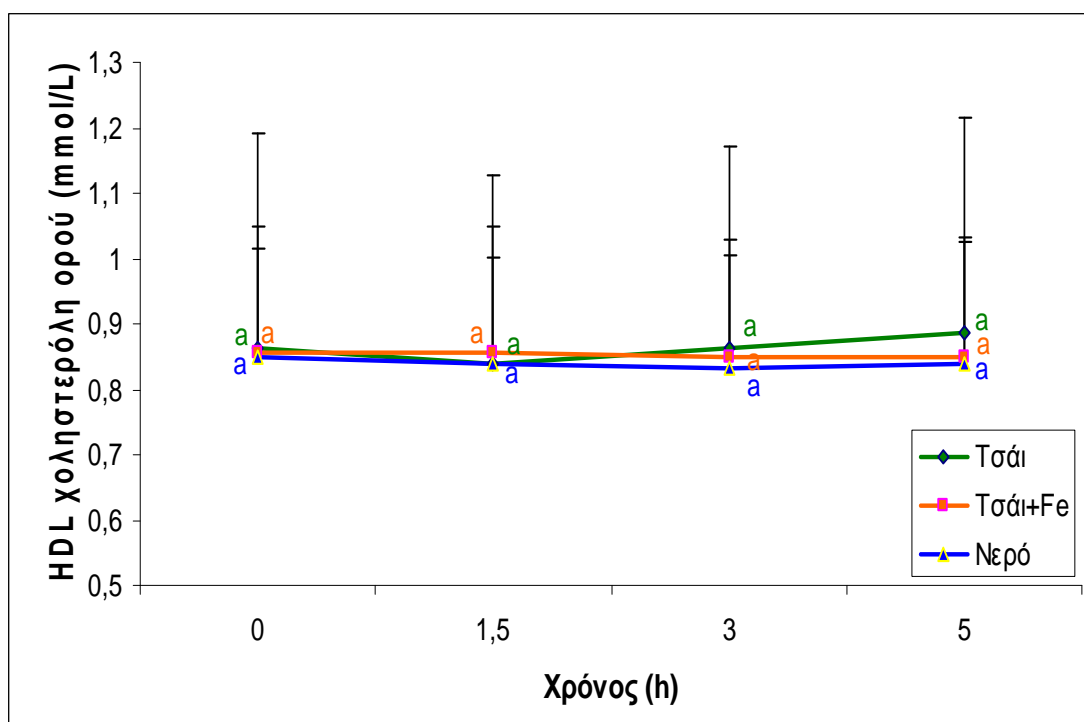
**Σχήμα 10.6.** Επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



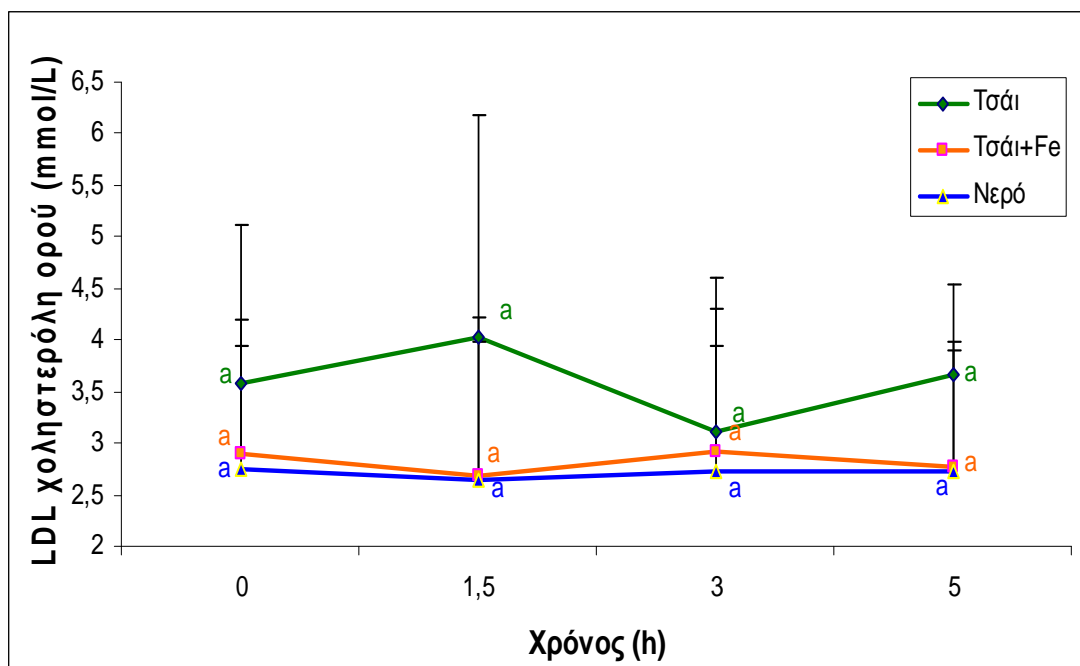
**Σχήμα 10.7.** Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



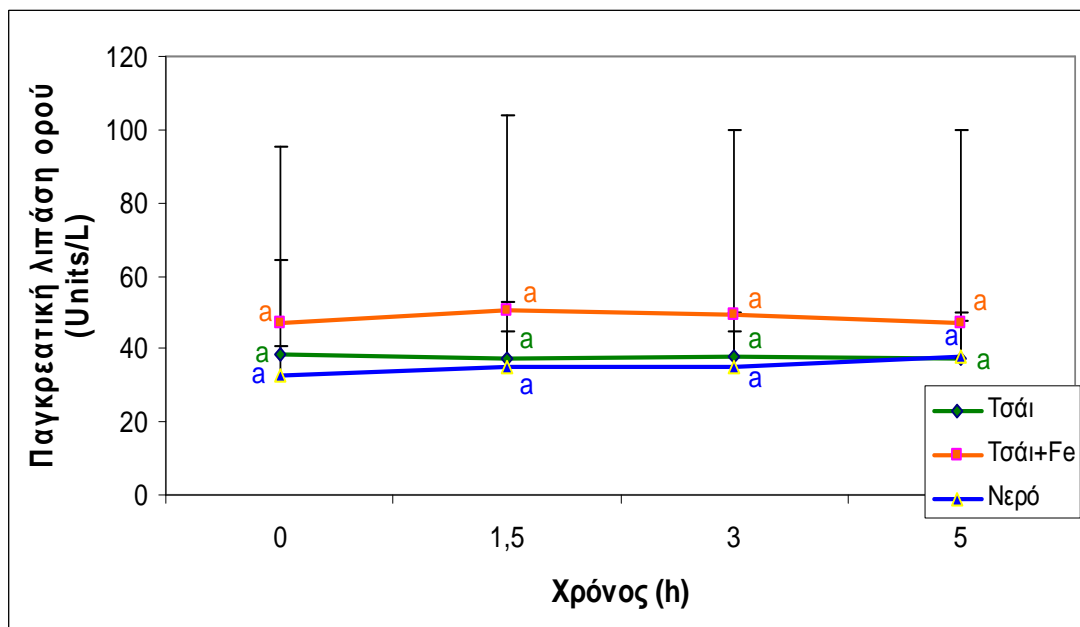
Σχήμα 10.8. Επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



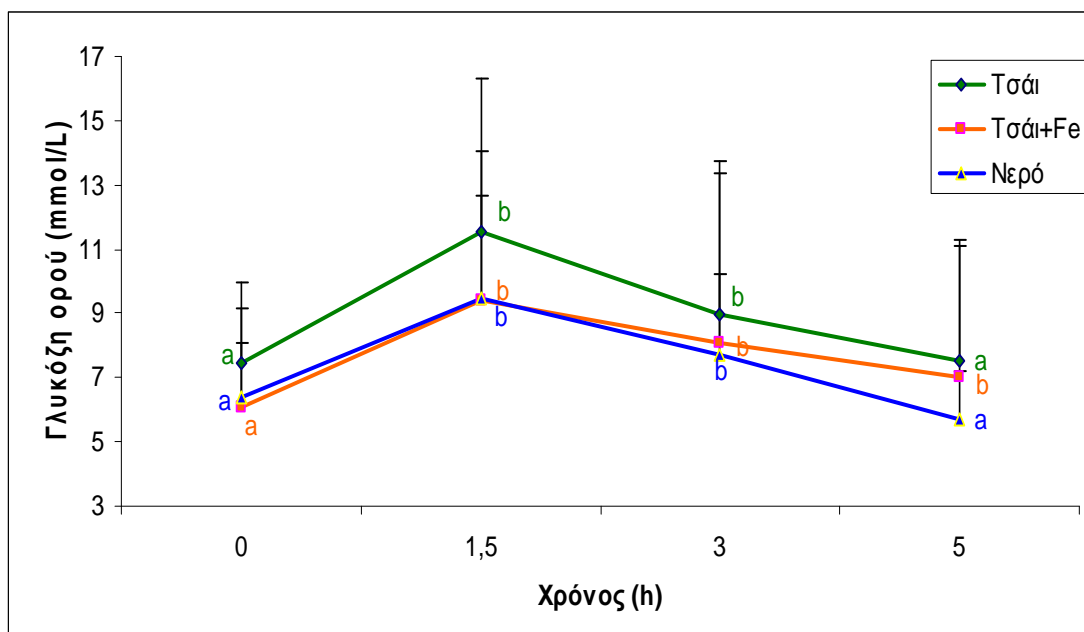
Σχήμα 10.9. Επίπεδα HDL χοληστερόλης στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



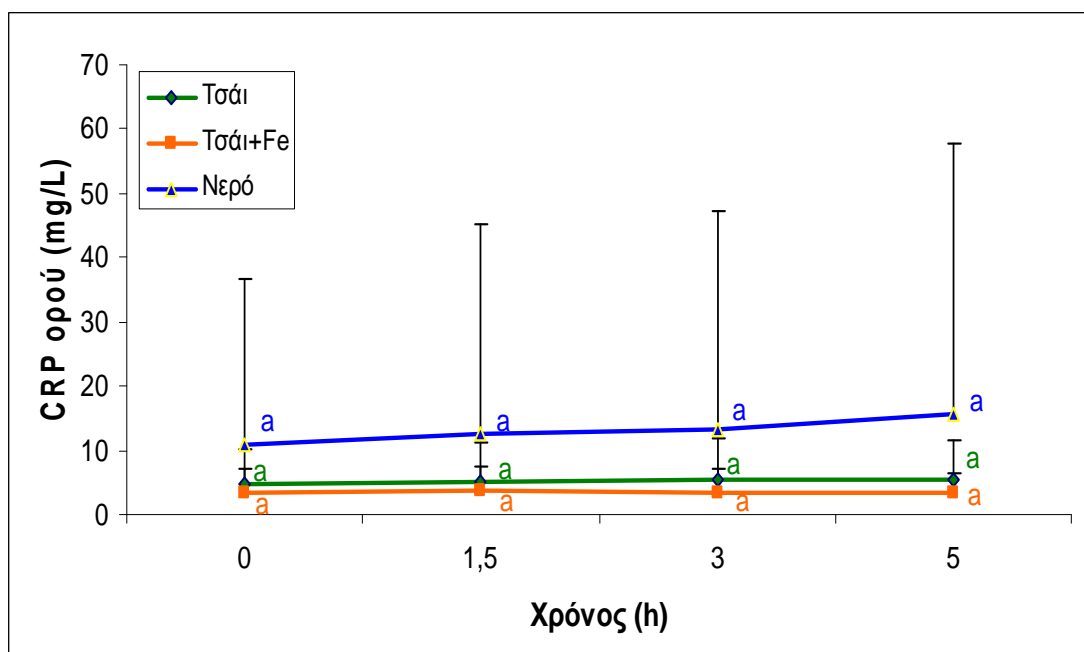
**Σχήμα 10.10.** Επίπεδα LDL χοληστερόλης στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



**Σχήμα 10.11.** Επίπεδα παγκρεατικής λιπάσης στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



Σχήμα 10.12. Επίπεδα γλυκόζης στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).



Σχήμα 10.13. Επίπεδα CRP στον ορό των ασθενών των 3 ομάδων, για κάθε χρονική στιγμή. Η τιμή κάθε χρονικής στιγμής αφορά το μέσο όρο των τιμών των ασθενών κάθε ομάδας  $\pm$  την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις χρονικές στιγμές για κάθε ομάδα ( $P < 0,05$ ).

# **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## 11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΟΤΗΤΩΝ

### 11.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού *in vitro*

Σε αυτή την πειραματική ενότητα στόχος ήταν η αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και του περιεχομένου σε ολικά φαινολικά διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού σε συγκέντρωση παρεμφερή με τη συνήθως καταναλισκόμενη (2,5 g σε 250 ml). Για το σκοπό αυτό επελέγησαν δύο ήδη πράσινου τσαγιού (απλό και ενισχυμένο), ένα είδος ημιζυμούμενου τσαγιού (Yellow tea) και ένα είδος μαύρου τσαγιού (Early grey). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα ήδη τσαγιού εμφάνισαν υψηλές τιμές ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και μεγάλη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (Rusak et al, 2008; Tsai et al, 2008; Horzic et al, 2009; Spigno & Faveri, 2009). Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αφεψήματα τσαγιού εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικών φαινολικών σε σύγκριση με διάφορα φρούτα και λαχανικά, όπως το σκόρδο, το σπανάκι, το λάχανο κ.α. (Cao, Soflic & Prior, 1996; Pellegrini et al, 2003).

Το πρώτο ενδιαφέρον συμπέρασμα της ενότητας αυτής ήταν ότι το πράσινο τσάι εμφάνισε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά από τα άλλα είδη τσαγιού. Συγκεκριμένα, τόσο το ενισχυμένο με κατεχίνες πράσινο τσάι, όσο και το απλό πράσινο τσάι έδειξαν μεγαλύτερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας από το Yellow και το μαύρο, ενώ το ενισχυμένο πράσινο τσάι εμφάνισε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά από τα άλλα είδη. Αυτό δύναται να εξηγηθεί λόγω της διαφορετικής κατεργασίας των φύλλων του φυτού *Camellia Sinensis* κατά την παραγωγή των διαφόρων ειδών τσαγιού. Το πράσινο τσάι προκύπτει μετά από την απενεργοποίηση των φαινολοξειδασών με συνέπεια την αποτροπή της οξείδωσης των πολυφαινολών. Έτσι, το εκχύλισμα του πράσινου τσαγιού περιέχει περισσότερα απλά φλαβονοειδή, όπως οι κατεχίνες, τα οποία έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη αντιοξειδωτική δράση λόγω των κατεχολομάδων (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Το μαύρο τσάι προκύπτει έπειτα από τη δράση των φαινολοξειδασών, οι οποίες οξειδώνουν τις απλές πολυφαινόλες μετατρέποντας τις σε πολυμερισμένες μορφές, με κύριους αντιπροσώπους τις θειοφλαβίνες και τις θειορουβικίνες (Ho, Lin

& Shahidi, 2009). Αυτές εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, η οποία σε κάποιες μελέτες φαίνεται να είναι μικρότερη αυτής του πράσινου τσαγιού. Το Yellow tea είναι ένα είδος τσαγιού που έχει υποστεί μικρής έκτασης ζύμωση. Αυτό δύναται να εξηγεί τις ενδιάμεσες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρατηρήθηκαν με τη μέθοδο FRAP.

Στην παρούσα μελέτη τα ολικά φαινολικά στο πράσινο τσάι (απλό ή ενισχυμένο) κυμάνθηκαν από  $88,88 \pm 14,28$  έως  $246,57 \pm 6,19$   $\mu\text{g gallic acid/ml}$ , ενώ στο μαύρο ήταν  $99,20 \pm 7,88$   $\mu\text{g gallic acid/ml}$ . Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πράσινου τσαγιού κυμάνθηκε από  $68,65 \pm 10,41$  μέχρι  $104,98 \pm 1,45$   $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$  με τη μέθοδο FRAP και από  $5,63 \pm 0,006$  μέχρι  $6,15 \pm 0,31$   $\mu\text{mol Trolox/ml}$  με τη μέθοδο ORAC. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του μαύρου τσαγιού ήταν  $33,45 \pm 5,48$   $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{ml}$  με τη μέθοδο FRAP και  $4,82 \pm 0,1$   $\mu\text{mol Trolox/ml}$  με τη μέθοδο ORAC. Οι Pellegrini et al (2003) μελετώντας την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων τροφίμων εκτίμησαν την τιμή FRAP εκχυλίσματος τσαγιού προκύπτων εκ 2 g τσαγιού σε 250 ml ζεστό νερό για 5 min σε 19  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{ml}$ . Οι Almajano et al (2008) συμπέραναν ότι το πράσινο τσάι σε συγκέντρωση παρόμοια με αυτήν της παρούσας μελέτης (1,5 g/100 ml) εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά ( $2083 \pm 51,3$  mg gallic acid/L) και σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο TEAC ( $6344 \pm 72,8$  ισοδύναμα Trolox) σε σχέση με το μαύρο τσάι. Η Bancirova (2010) μελετώντας διάφορα αφεψημάτα τσαγιού έδειξε με τη μέθοδο TEAC ότι το μαύρο τσάι Early Grey εμφανίζει σημαντικά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα άλλα είδη, γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής. Ωστόσο, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι το μαύρο τσάι εμφανίζει εξίσου σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα, συγκρίσιμη με αυτή του πράσινου (Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Οι Alarcon et al (2008) προσδιόρισαν τα ολικά φαινολικά εκχυλισμάτων πράσινου, μαύρου και λευκού τσαγιού σε 517, 553, 445 mg gallic acid/L, αντίστοιχα, ενώ παρατήρησαν ότι το πράσινο και το μαύρο τσάι δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο ORAC.

Το δεύτερο ενδιαφέρον συμπέρασμα αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν ότι η σύγκριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των διαφόρων αφεψημάτων εμφάνισε διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις μεθόδους FRAP και ORAC, αν και αυτές έδειξαν συσχέτιση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, η FRAP έδειξε διαφορές ανάμεσα στα δύο ήδη πράσινου τσαγιού και ανάμεσα στο ημιζυμώμενο και το μαύρο, κάτι που δεν

παρατηρήθηκε με τη μέθοδο ORAC. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί μέσω των διαφορετικών μηχανισμών με τους οποίους προσδιορίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα οι δύο μέθοδοι. Η μέθοδος FRAP είναι φασματοφωτομετρική, βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και μετράει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μετατρέπουν το σίδηρο από τρισθενή σε δισθενή. Η μέθοδος ORAC είναι φθορισμομετρική, βασίζεται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου και μετράει τη μείωση της φθορά του φθορισμού μιας φθορίζουσας ουσίας στην οποία προστέθηκε μια ρίζα, παρουσία του αντιοξειδωτικού. Αυτοί οι διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν ως συνέπεια η κάθε μέθοδος να προσδιορίζει καλύτερα συγκεκριμένες κατηγορίες αντιοξειδωτικών συστατικών, γεγονός που ίσως εξηγεί τις διαφοροποιήσεις στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη. Για παράδειγμα, η μέθοδος FRAP ανιχνεύει μόνο τα αντιοξειδωτικά συστατικά που μετατρέπουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, και όχι αυτά που δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών, τα οποία ανιχνεύει η μέθοδος ORAC (Prior & Cao, 1999; Huang, Ou & Prior, 2005; Niki et al, 2010).

Το τρίτο ενδιαφέρον συμπέρασμα αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα συσχετίστηκε με την περιεκτικότητα των αφεψημάτων σε ολικά φαινολικά, αν και η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ειδικότερα, τα είδη τσαγιού που είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα άλλα, όπως το πράσινο τσάι, είχαν και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά. Οι Das, Thakuria & Kanodia (2008) αναφέρουν ότι εκτός από τις πολυφαινόλες το τσάι περιέχει και άλλες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, όπως οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή και το σελήνιο. Πραταύτα, στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων τσαγιού συνδέεται άμεσα με την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Σε άλλες μελέτες (Almajano et al, 2008; Rusak et al, 2008) η αντιοξειδωτική ικανότητα του τσαγιού έχει επίσης συσχετιστεί με την περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά. Σε αυτή τη μελέτη τα αφεψήματα τσαγιού προέκυψαν έπειτα από μικρής διάρκειας εκχύλιση με ζεστό νερό, ώστε να προσομοιάζουν με τα καθημερινώς καταναλισκόμενα. Εντούτοις, μελέτες δείχνουν ότι ο χρόνος και η θερμοκρασία της εκχύλισης σε συνδυασμό με την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, όπως μίγμα νερού με οργανική ουσία, δύναται οδηγήσει σε πολύ μεγαλύτερη παραλαβή αντιοξειδωτικών συστατικών εντός των αφεψημάτων τσαγιού (Rusak et al, 2008; Horzic et al, 2009; Spigno & Faveri, 2009).

Αν και σε αυτή την πειραματική ενότητα δε μελετήθηκε το λευκό τσάι, αυτό αποτελεί ένα ενδιαφέρον είδος τσαγιού που παράγεται από νεαρά φύλλα και άνθη του

φυτού και εμφανίζει εκλεπτυσμένο άρωμα και ξεχωριστή γεύση. Οι λίγες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το λευκό τσάι δείχνουν ότι εμφανίζει μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ενώ έχει αντιοξειδωτική ικανότητα συγκρίσιμη με αυτή του πράσινου τσαγιού (Alarcon et al, 2008; Rusak et al, 2008; Koutelidakis et al, 2009). Το συμπέρασμα που προκύπτει εξ αυτής της πειραματικής ενότητας είναι ότι το πράσινο τσάι εμφανίζει μεγαλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro* από το μαύρο, γεγονός που δείχνει ότι θα μπορούσε να επιλεγεί σε πειράματα με ζώα και ανθρώπους για τη μελέτη της βιοδραστηριότητας του τσαγιού.

## **11.2. Κλινική μελέτη για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του πλάσματος σε φαινολικά συστατικά μετά την κατανάλωση τσαγιού ή μίγματος τσαγιού και σιδήρου**

Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής ενότητας έδειξαν ότι η κατανάλωση λευκού τσαγιού από υγιείς εθελόντριες οδήγησε σε εμφάνιση επιμέρους φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα μετά από 30, 60 και 90 λεπτά, όπως φάνηκε από την ύπαρξη κορυφών στα χρωματογραφήματα οι οποίες δεν υπήρχαν πριν την κατανάλωση τσαγιού (baseline). Οι φαινολικές ενώσεις εμφανίστηκαν πολλές φορές σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (μικρές κορυφές), αλλά η ύπαρξη τους εξηγήθηκε από την εμφάνιση των κορυφών στους χρόνους εμφάνισης των αντίστοιχων προτύπων ουσιών. Επίσης, διαπιστώθηκε ποικιλομορφία στην εμφάνιση των φαινολικών ενώσεων, δηλαδή ουσίες που εμφανίστηκαν τη μία χρονική στιγμή σε κάποιες περιπτώσεις δεν εμφανίστηκαν την επόμενη χρονική στιγμή, αλλά εμφανίστηκαν άλλες. Ανάμεσα στις 10 εθελόντριες παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στον αριθμό και τη συγκέντρωση των εμφανιζόμενων πολυφαινολών. Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο οι κορυφές που εμφανίστηκαν στο πλάσμα κάθε εθελόντριας ήταν λιγότερες και μικρότερες από αυτές που εμφανίστηκαν όταν οι εθελόντριες έλαβαν το τσάι, γεγονός που υποδηλώνει μειωμένη εμφάνιση πολυφαινολών. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις της κερσετίνης, του βανιλικού οξέος, της κατεχίνης, του καφεϊκού οξέος και του γαλλικού οξέος μειώθηκαν στο πλάσμα μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο.

Η μειωμένη παρουσία των επιμέρους πολυφαινολών στο πλάσμα των ατόμων που έλαβαν τσάι με σίδηρο ενισχύει την υπόθεση που διερευνήθηκε και στα πειράματα με τα ζώα, σύμφωνα με την οποία ο σίδηρος φαίνεται να εμποδίζει την απορρόφηση των

πολυφαινολών δημιουργώντας σύμπλοκα με αυτές. Η χημική συγγένεια που υπάρχει μεταξύ των πολυφαινολών και του σιδήρου πιθανότατα εξηγεί τη δημιουργία συμπλόκων εντός του εντερικού σωλήνα, όταν ο σίδηρος συνυπάρχει σε ένα γεύμα με πολυφαινόλες του τσαγιού ή άλλων τροφίμων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη δημιουργία τέτοιων συμπλόκων, τα οποία φαίνεται ότι σχηματίζονται από τα οξυγόνα των πολυφαινολών και τον σίδηρο (Jovanovic et al, 1998; Hurrell, Reddy & Cook, 1999; Zijp et al, 2000; Wollgast & Anklam, 2000; Samman et al, 2001; Kapsokefalou, Zhu & Miller, 2006). Αν και κάποιες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση των πολυφαινολών στην απορρόφηση του σιδήρου, λίγες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση του σιδήρου στην απορρόφηση των πολυφαινολών. Στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι τα σύμπλοκα σιδήρου-πολυφαινολών δημιουργούνται στον εντερικό σωλήνα κατά τη διαδικασία της πέψης και οδηγούν στην αναστολή της πλήρους απορρόφησης των φαινολικών ενώσεων. Η επίδραση του σιδήρου στην εμφάνιση των πολυφαινολών στο πλάσμα ήταν διαφορετική από άτομο σε άτομο, πιθανότατα εξαιτίας υπαρχόντων γενετικών διαφορών.

Το συγκεκριμένο πείραμα είχε επίσης ως στόχο τη μελέτη της φαρμακοκινητικής των πολυφαινολών του τσαγιού. Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι υπήρξε μεγάλη ποικιλομορφία στην εμφάνιση των φαινολικών ενώσεων 30, 60 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωση του τσαγιού, ώστε κάποιες πολυφαινόλες που εμφανίζονται τη μία χρονική στιγμή να μην εμφανίζονται την άλλη. Αυτή η ποικιλομορφία πιθανότατα εξηγείται λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας του μεταβολισμού των πολυφαινολών εντός του οργανισμού. Οι πολυφαινόλες απορροφώνται με παθητική διάχυση στα εντεροκύτταρα παρουσία μεταφορικών πρωτεϊνών, αφού πρώτα διασπαστούν οι γλυκοζιδικοί δεσμοί από ένζυμα όπως οι υδρολάσες. Στη συνέχεια, εισέρχονται στην κυκλοφορία έπειτα από διαδικασίες σύζευξης (γλουκορονιδίωση, μεθυλίωση και σουλφυλίωση) στα εντεροκύτταρα. Εντός της κυκλοφορίας του αίματος, κάποιες πολυφαινόλες παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ενώ κάποιες άλλες συνεχίζουν το βιομετασχηματισμό τους στο ήπαρ και στο κόλον, όπου υφίστανται περαιτέρω μεθυλιώσεις και μετατροπές της δομής (Scalbert et al, 2002; Manach et al, 2004). Για παράδειγμα, οι κατεχίνες του τσαγιού αμέσως μετά την απορρόφηση μεταβολίζονται εκτενώς μετατρέπόμενες σε μεθυλιωμένες και γλυκοζυλιωμένες μορφές, όπως οι 4',4''-DiMeEGCG, EGCG-sulfate, EGCG-glucoronide, EGCG-cysteine (Soobrattee et al, 2005; Lambert, Sang & Yang, 2007; Jochmann, Bauman & Stangl, 2008). Αυτή η

συνεχής διαδικασία μετασχηματισμού πιθανότατα εξηγεί την ποικιλομορφία εμφάνισης πολυφαινολών στην παρούσα μελέτη, λόγω της μετατροπής τους σε πληθώρα μεταβολιτών. Η μεθοδολογία της υγρής χρωματογραφίας που αναπτύχθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα δεν επέτρεπε τον προσδιορισμό τέτοιου είδους μεταβολιτών παρά μόνο των αγλυκόνων των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες εμφανίστηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις σε ορισμένες μόνο χρονικές στιγμές.

Στην παρούσα πειραματική ενότητα οι φαινολικές ενώσεις που επελέγησαν για την κατασκευή των πρότυπων καμπύλων με στόχο την ανίχνευση τους στο πλάσμα ήταν το πρωτοκατεχινικό οξύ, η επιγαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη, το π-υδροβενζοϊκό οξύ, το συριγκικό οξύ, το φερουλικό οξύ, η κερσετίνη, το βανιλλικό οξύ, η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το p-κουμαρικό οξύ. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση στο πλάσμα μόνο των αγλυκόνων τους. Αυτό έγινε δεδομένου ότι πληθώρα ερευνητικών μελετών υποστηρίζει ότι η βιοδραστικότητα των πολυφαινολών του τσαγιού καθορίζεται περισσότερο από τις αγλυκόνες παρά από τους μεταβολίτες τους. Ο βιομετασχηματισμός των κατεχινών από τα ένζυμα φάσης I και φάσης II αλλάζει τη δομή των κατεχολομάδων με συνέπεια τη μικρότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα των προκύπτοντων μεταβολιτών (Soobrattee et al, 2005; Lotito & Frei, 2006). Οι Soobrattee et al (2005) εξηγούν ότι η αντικατάσταση της υδροξυλομάδας 3-OH των πολυφαινολών από μεθυλομάδες ή άλλα μόρια οδηγεί στη μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Άλλες μελέτες προτείνουν ότι αν και ο βιομετασχηματισμός των πολυφαινολών τροποποιεί την αντιοξειδωτική τους δράση, οι μεταβολίτες τους ενδέχεται να εμφανίζουν πολυσήμαντο βιολογικό ρόλο σε επίπεδο δράσης επί γονιδίων και μεταβολικών μονοπατιών (Lambert, Sang & Yang, 2007). Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα πλάσματος αναμίχθηκαν με ακετονουτρίλιο για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες, οι οποίες θα προκαλούσαν πρόβλημα στον υγρό χρωματογράφο. Επιπρόσθετα, δεν έλαβε χώρα διαδικασία όξινης ή βασικής υδρόλυσης, λόγω της περίπλοκης μορφής των μεταβολιτών στο πλάσμα. Στο σύστημα HPLC χρησιμοποιήθηκε το τριφλοροξικό οξύ ως διαλύτης, διότι αποτελεί καλό μέσο διάλυσης για τις πολυφαινόλες του τσαγιού (Merken & Beecher, 2000). Τα χαρακτηριστικά του συστήματος HPLC βασίστηκαν στη βιβλιογραφία (Merken & Beecher, 2000; Proestos et al, 2003) με μικρές τροποποιήσεις ώστε να επιτευχθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αγλυκόνων στο πλάσμα.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα αυτού του πειράματος είναι ότι όλες οι πολυφαινόλες προσδιορίστηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις στο πλάσμα, ενώ κάποιες δεν προσδιορίστηκαν καθόλου. Συγκεκριμένα, το πρωτοκατεχινικό οξύ, η επιγαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη, το π-υδροβενζοϊκό οξύ, το συριγικό οξύ και το φερουλικό οξύ δεν ανιχνεύτηκαν στο πλάσμα, ενώ η κερσετίνη, το βανιλλικό οξύ, η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το p-κουμαρικό οξύ βρέθηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι από τις κατεχίνες, που αποτελούν την κύρια κατηγορία φλαβονοειδών του τσαγιού, μόνο η κατεχίνη ανιχνεύτηκε στο πλάσμα, ενώ η επικατεχίνη, η γαλλική επικατεχίνη και η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη δεν ανιχνεύτηκαν. Αυτό δύναται να εξηγηθεί αφενός μεν εκ του ότι οι κατεχίνες βρίσκονται στο πλάσμα κυρίως υπό συζευγμένες μορφές και λιγότερο ως αγλυκόνες (Ho, Lin & Shahidi, 2009), αφετέρου δε εκ του πολύπλοκου βιομετασχηματισμού τους. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι κατεχίνες του τσαγιού μεταβολίζονται εκτενώς και ταχύτατα και μετατρέπονται σε μεταβολίτες που πολλές φορές εμφανίζονται σε μικρές και δύσκολα ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις στο πλάσμα (Frei & Higdon, 2003; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006; Lambert, Sang & Yang, 2007). Οι Ho, Lin & Shahidi (2009) αναφέρουν ότι μέγιστες συγκεντρώσεις των κατεχινών στο πλάσμα κυμαίνονται μεταξύ 2-3  $\mu\text{M}$  και είναι πού μικρότερες με τις αρχικές συγκεντρώσεις τους στο καταναλισκόμενο τρόφιμο. Εκ των υπολοίπων φαινολικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν, τόσο η φλαβονόλη κερσετίνη, όσο και τα φαινολικά οξέα γαλλικό, φερουλικό και καφεϊκό αποτελούν σημαντικά συστατικά του τσαγιού με αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Αν και αυτές βιομετασχηματίζονται ταχύτατα εντός του οργανισμού φαίνεται ότι εμφανίζονται συχνότερα υπό μορφή αγλυκόνων εντός του πλάσματος (Lambert, Sang & Yang, 2007). Αναφορικά με τα φαινολικά που δεν ανιχνεύτηκαν, φαίνεται ότι είτε οι αρχικές συγκεντρώσεις τους στο τσάι ήταν χαμηλές, είτε η εκτενής τροποποίηση τους δεν επέτρεψε τη μεταφορά τους στο πλάσμα.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε η εμφάνιση κάποιων πολυφαινολών στο πλάσμα στις χρονικές στιγμές 30, 60 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωση του λευκού τσαγιού. Η εμφάνιση των φαινολικών ενώσεων 1,5 με 2 ώρες μετά την κατανάλωση του τροφίμου επιβεβαιώνεται και από πολλές μελέτες. Οι Luczaj & Skrzydlewska (2005) βρήκαν την υψηλότερη συγκέντρωση κατεχινών στο πλάσμα 1,6 με 2,6 ώρες μετά την κατανάλωση ενός φλιτζανιού τσαγιού, ενώ οι τιμές επανήλθαν εις

φυσιολογικά επίπεδα 24 ώρες μετά. Οι Hollman et al (1997) βρήκαν τις μέγιστες συγκεντρώσεις κερσετίνης 0.7 h μετά την κατανάλωση κρεμμυδιών, ενώ οι Wollgast & Anklam (2000) προσδιόρισαν τις μέγιστες συγκεντρώσεις κατεχίνης 1-1.5 h μετά την κατανάλωση σοκολάτας. Οι Shahrzad et al (2001) βρήκαν τη μέγιστη συγκέντρωση γαλλικού οξέος  $1.39 \pm 0.2$  h μετά την κατανάλωση μαύρου τσαγιού. Επίσης, παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στους εθελοντές. Δηλαδή κάποιες φαινολικές ενώσεις που εμφανίστηκαν στο πλάσμα ενός ατόμου δεν εμφανίστηκαν σε ένα άλλο ή εμφανίστηκαν αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αυτό δύναται εν μέρει να εξηγηθεί λόγω των γενετικών διαφορών ανάμεσα στα άτομα. Κάθε άτομο έχει διαφορετικό γονιδίωμα με συνέπεια κάποια ένζυμα και μεταφορικές πρωτεΐνες που ευθύνονται για την πέψη των πολυφαινολών να εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο από άτομο σε άτομο. Για παράδειγμα εάν κάποιος έχει υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την παραγωγή της μεταφορικής ουσίας Multidrug Resistance-Associated Protein-2 (MRP-2) θα εμφανίζει μικρότερη απορρόφηση των κατεχινών, διότι αυτή η μεταφορική πρωτεΐνη βρίσκεται στα εντεροκύτταρα και κάνει αντίστροφη μεταφορά των κατεχινών εξωθώντας τις προς τον εντεροσωλήνα (Lambert, Sang & Yang, 2007).

Κάποιοι περιορισμοί της μελέτης αυτής είναι ότι δεν μετρήθηκαν οι επιμέρους πολυφαινόλες του λευκού τσαγιού *in vitro* ώστε να συγκριθούν με αυτές που ανιχνεύτηκαν στο πλάσμα, δεν προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες των πολυφαινολών στο πλάσμα και δεν μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις σιδήρου στο πλάσμα. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στα αποτελέσματα της παρούσας και άλλων μελετών θα μπορούσαν να εξηγηθούν μέσω των διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών και της παρουσίας σιδήρου. Το συμπέρασμα της μελέτης αυτής είναι ότι η κατανάλωση λευκού τσαγιού οδηγεί στην εμφάνιση κάποιων φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα, οι οποίες είναι λιγότερες όταν το τσάι καταναλώνεται παρουσία σιδήρου.

### **11.3. Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας που προκύπτει από την κατανάλωση τσαγιού στο παχύ έντερο ζώων, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σιδήρου που προέκυψαν από *in vitro* πέψη**

Οι οξειδώσεις που λαμβάνουν χώρα στο παχύ έντερο από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και με φλεγμονώδεις



παθήσεις, όπως η νόσος του Crohn's και η κολίτιδα (Lund et al, 2001; Kruidenier & Verspaget, 2002). Η παρουσία μη απορροφηθέντων θρεπτικών συστατικών δύναται να επηρεάζει τις οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο κόλον. Οι μη απορροφημένες πολυφαινόλες μεταφέρονται στο κόλον, όπου αποδομούνται εκ της εντερικής μικροχλωρίδας (Yamamoto et al, 2006). Στα κύτταρα του παχέος εντέρου, οι πολυφαινόλες του τσαγιού φαίνεται ότι προλαμβάνουν τις οξειδωτικές διαδικασίες, μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης και της ρύθμισης συγκεκριμένων βιοχημικών μονοπατιών, ενώ πιθανότατα μειώνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου (Ishihara et al, 2001; Koo & Cho, 2004). Ένα άλλο θρεπτικό συστατικό που εμπλέκεται στις οξειδωτικές διαδικασίες στο παχύ έντερο είναι ο σίδηρος, ο οποίος σχετίζεται με τις εκ της αντιδράσεως Fenton παραγόμενες ελεύθερες ρίζες (Duthie G, Duthie S & Kyle, 2000; Rahman, Biswas & Kirkham, 2006).

Το πρώτο σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει εκ της παρούσας πειραματικής ενότητας είναι ότι διάφορες ενώσεις σιδήρου, που χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό των τροφίμων, εμφάνισαν οξειδωτική δράση σε ιστούς παχέος εντέρου. Ο σουλφονικός σίδηρος και ο σίδηρος EDTA εμφάνισε μεγαλύτερη οξειδωτική δράση από ότι ο γλυκονικός και ο γαλακτικός σίδηρος έπειτα από την *in vitro* πέψη των ενώσεων σιδήρου. Αυτή η διαδικασία μας επέτρεψε να προσομοιάσουμε τις εντερικές συνθήκες και να παραλάβουμε το μη απορροφηθέν τμήμα, το οποίο περιέχει διαλυτό και αδιάλυτο σίδηρο, που βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκων μοριακού βάρους άνω των 6000. Το τμήμα αυτό προσομοιάζει με το μη απορροφημένο μέρος του εντερικού σωλήνα, δεδομένου ότι έχει παρόμοια με αυτό φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Kapsokefalou & Miller, 1994). Το τμήμα αυτό του μη απορροφούμενου σιδήρου, ο οποίος φαίνεται ότι παραμένει για ένα διάστημα στο παχύ έντερο πριν αποβληθεί, εξετάστηκε για την οξειδωτική του δράση *ex vivo*. Η συγκέντρωση του σιδήρου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 6 φορές μεγαλύτερη από την συνηθισμένη σε πειράματα *in vitro* πέψης (Argyri et al, 2008), λόγω της στόχευσης της εξέτασης των οξειδωτικών διαδικασιών παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου.

Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο σίδηρος δύναται να αποτελεί έναν σημαντικό οξειδωτικό παράγοντα εντός του οργανισμού. Οι Fang, Yang & Wu (2002) αναφέρουν ότι αύξηση της ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής συγκέντρωσης σιδήρου μπορεί να οδηγήσει στην υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών, τη λιπιδική υπεροξείδωση, το οξειδωτικό στρες και την κυτταρική καταστροφή, ενώ σχετίζεται

και με την αλλαγή της έκφρασης της συνθάσης NO στα μακροφάγα. Στον εντερικό σωλήνα, η μεταγευματική κατάσταση ενεργοποιεί τα φαγοκύτταρα στο στομάχι αυξάνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών, ενώ τα γαστρικά υγρά προωθούν τη λιπιδική υπεροξειδωση, η οποία ενισχύεται και από τη δράση διαφόρων μικροοργανισμών (Niki, 2010). Ο σίδηρος, όταν εμφανίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντός του εντεροσωλήνος, δύναται να ενσωματωθεί εντός των επιθηλιακών εντεροκυττάρων επιτείνοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση αυτών (Lund et al, 2001) και αυξάνοντας τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου, μέσω εμπλοκής στη δράση της κυκλοξυγενάσης και της κινάσης της τυροσίνης (Soobrattee et al, 2005). Προηγούμενες μελέτες δείχνουν διαφορές στην οξειδωτική δράση διαφόρων μορφών σιδήρου, δεδομένου ότι η φυσικοχημική δομή του σιδήρου επηρεάζει την καταλυτική του δράση στις οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον εντερικό σωλήνα (Kapsokefalou, Zhu & Miller, 2006). Ο σίδηρος προωθεί τις οξειδωτικές διαδικασίες στη μορφή  $Fe^{2+}$  ή  $Fe^{3+}$  (Aguoma et al, 1989), ενώ όταν ο σίδηρος δε βρίσκεται υπό τη μορφή ιόντων, τότε δε φαίνεται να καταλύει οξειδωτικές αντιδράσεις (Jovanovic et al, 1998; Kapsokefalou & Miller, 2001; Khokhar & Owusu Arpenten, 2003). Στην παρούσα μελέτη, οι διαφορετικές ενώσεις σιδήρου παρέχουν το σίδηρο με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (μοριακό βάρος, συγκέντρωση κ.α.), γεγονός που συνεπάγεται διαφορετική οξειδωτική δράση (Kapsokefalou et al, 2005).

Το δεύτερο σημαντικό συμπέρασμα που προέκυψε από το πείραμα αυτό ήταν ότι οι ιστοί παχέος εντέρου έδειξαν διαφορετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες ανάλογα με το εκχύλισμα που ελάμβαναν τα ζώα εντός της διατροφής τους. Συγκεκριμένα, τα ζώα που ελάμβαναν τα εκχυλίσματα τσαγιού εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στο παχύ έντερο. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των τριών εκχυλισμάτων και της κατεχίνης είχε αξιολογηθεί *in vitro* σε προηγούμενη μελέτη και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το λευκό τσάι, το πράσινο τσάι, το αρωματικό φυτό Πελαργόνιο και η κατεχίνη είχαν αντιοξειδωτική ικανότητα  $2311 \pm 454$ ,  $2519 \pm 162$ ,  $487 \pm 89$ , και  $1663 \pm 327 \mu M Fe^{+2}$ , αντίστοιχα, με χρήση της μεθόδου FRAP. (Koutelidakis et al, 2009). Η κατεχίνη χρησιμοποιήθηκε ως ουσία ελέγχου (control), δεδομένου ότι είναι ένα βασικό συστατικό του τσαγιού (Cabrera Artacho & Gimenez, 2006) και έδειξε αντιοξειδωτικές δράσεις, αν και μικρότερες από αυτές των εκχυλισμάτων. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την πιθανή συνεργηστική δράση που εμφανίζει η πληθώρα των αντιοξειδωτικών ουσιών που βρίσκονται εντός των

εκχυλισμάτων. Κατά την παρασκευή των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση των βοτάνων, περίπου τετραπλάσια της καθημερινώς καταναλισκόμενης. Η επιλογή έγινε σύμφωνα με τη μέγιστη προτεινόμενη δόση εκ του de Boer et al. (2005) με στόχο τη δυνατότητα προσδιορισμού φαινολικών στους ιστούς. Εντούτοις, αυτή η υψηλή συγκέντρωση αποτελεί ένα εκ των περιορισμών της μελέτης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το συμπέρασμα ότι το διάλυμα κατεχίνης εμφάνισε αντιοξειδωτική δράση, αλλά μικρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων. Φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους των κατεχινών όταν αυτές καταναλώνονται σε καθαρή μορφή, σε σχέση με την κατανάλωση υπό μορφή λυοφυλιωμένου εκχυλίσματος ή ως αφέψημα τσαγιού. Μελέτες δείχνουν ότι μετά από λήψη 1,050 mg EC σε καθαρή μορφή η C<sub>max</sub> στο πλάσμα έφτασε τα 1,53 μM, ενώ μετά τη λήψη 75 mg EC έφτασε τα 0,11 μM. Όταν, όμως, η EC (75 mg) χορηγήθηκε υπό μορφή λυοφυλιωμένου εκχυλίσματος τσαγιού (Green Tea Extract) η C<sub>max</sub> ήταν μεγαλύτερη και έφτασε τα 0,65 μM (Ho, Lin & Shahidi, 2009). Οι Henning et al (2004) έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες που χορηγήθηκαν σε ανθρώπους υπό μορφή συμπληρώματος σε κάψουλες ζελατίνης απορροφήθηκαν πιο αργά, αλλά πιο εκτεταμένα από αυτές που δόθηκαν σε μορφή πράσινου και μαύρου τσαγιού. Οι Koutelidakis et al (2009) παρατήρησαν ότι η χορηγηθείσα σε ποντίκια καθαρή κατεχίνη αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και κάποιων ιστών σε μικρότερο βαθμό από ότι το λευκό τσάι. Η αξιοποίηση των πολυφαινολών του τσαγιού από τον οργανισμό φαίνεται ότι εξαρτάται από τη μορφή με την οποία αυτές χορηγούνται, σε συνδυασμό με το γενετικό υπόβαθρο που καθορίζει το μεταβολισμό κάθε ατόμου (Ho, Lin & Shahidi, 2009).

Μια σημαντική παρατήρηση που προκύπτει εξ αυτής της ενότητας είναι ότι το παχύ έντερο των ζώων που ελάμβαναν το Πελαργόνιο εμφάνισε τη μικρότερη ευαισθησία στην οξείδωση, ενώ το εκχύλισμα αυτού του αρωματικού φυτού είχε δείξει *in vitro* μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το τσάι. Αυτή η διαφοροποίηση θα μπορούσε να εξηγηθεί δεδομένης της διαφορετικής βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών που βρίσκονται στα διάφορα εκχυλίσματα. Οι πολυφαινόλες του Πελαργόνιου μπορεί να εμφανίζουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτές του πράσινου τσαγιού, αλλά εντός του οργανισμού να απορροφώνται καλύτερα ή να παράγουν μεταβολίτες με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στους ιστούς. Σε προηγούμενη μελέτη παρόμοιου σχεδιασμού είχε δειχθεί σε

ποντίκια ότι η χορήγηση εκχυλισμάτων πράσινου τσαγιού, λευκού τσαγιού και Πελαργόνιου αύξησε τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα, την καρδιά και τους πνεύμονες, αλλά όχι στη σπλήνα, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τα νεφρά. Η επίδραση του αρωματικού φυτού Πελαργόνιο στην αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος και των πνευμόνων ήταν παρόμοια με αυτήν του πράσινου τσαγιού, ενώ η κατεχίνη δεν επηρέασε την αντιοξειδωτική κατάσταση ούτε του πλάσματος, ούτε των οργάνων (Koutelidakis et al, 2009). Σε άλλες μελέτες, τα εκχυλίσματα πράσινου και λευκού τσαγιού και η κατεχίνη εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro* συγκρινόμενα με ποικιλία φρούτων και λαχανικών (Pellegrini et al, 2003; Pellegrini et al, 2006; Saffari & Sadrzadeh, 2004). Διάφορα αρωματικά φυτά και βότανα, όπως το Πελαργόνιο, ο Δίκταμος, η Λεβάντα, το Τεύκριο κ.α. έχουν επίσης μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ενώ έχουν δείξει αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις πολυφαινόλων (Proestos, Sereli & Komaitis, 2003; Sokmen et al, 2005; Peng Wong, Peng Leong & Koh, 2006). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση τσαγιού και βοτάνων αυξάνει την αντιοξειδωτική κατάσταση στο πλάσμα (Paganga & Rice-Evans, 1997; Serafini et al, 2000; Kim et al., 2000; Kapsokefalou, Zhu & Miller, 2006; Koutelidakis et al, 2009). Ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να δείχνουν επίδραση στο παχύ έντερο (Chen et al, 1997; Kim et al., 2000; Scalbert et al, 2002), γεγονός που καθιστά σημαντικά τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής ενότητας.

Σε αυτή την πειραματική ενότητα παρατηρήθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών παχέος εντέρου των ποντικών συνδέονταν με το είδος του εκχυλίσματος που αυτά ελάμβαναν στη διατροφή τους. Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα στους ιστούς των 5 διαφορετικών ομάδων μπορεί να οφείλονται σε πληθώρα παραγόντων. Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στα εκχυλίσματα, η βιοδιαθεσιμότητα τους και οι αλληλεπιδράσεις τους με διατροφικούς παράγοντες θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτές τις διαφορές. Η υπόθεση που διερευνήθηκε στην μελέτη αυτή ήταν ότι τα αντιοξειδωτικά συστατικά των εκχυλισμάτων πιθανότατα προστατεύουν το παχύ έντερο από οξειδώσεις που προκαλούνται από τον σίδηρο που δεν απορροφάται. Ο μηχανισμός που θα μπορούσε να προταθεί είναι ο κάτωθι: Μετά την απορρόφηση, τα αντιοξειδωτικά συστατικά των εκχυλισμάτων ή οι μεταβολίτες τους μεταφέρονται στο παχύ έντερο, όπου εμφανίζουν συγκεκριμένη αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν τα κύτταρα του ιστού από ενδεχόμενη οξειδωτική καταστροφή. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση, αφού δείχνουν

αφενός μεν αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του παχέος εντέρου, αφετέρου δε μειωμένη ευαισθησία στην οξειδωση. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών μετά την κατανάλωση των εκχυλισμάτων σχετίζεται με τα απορροφηθέντα φαινολικά συστατικά (Manach et al, 2004; Koutelidakis et al, 2009). Παραταύτα, ο συγκεκριμένος πειραματικός σχεδιασμός δεν επιτρέπει την άμεση συσχέτιση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του παχέος εντέρου με τα απορροφηθέντα αντιοξειδωτικά συστατικά. Αν και οι ιστοί παχέος εντέρου εκπλύθηκαν καλώς πριν τα πειράματα, δε δυνάμεθα να αποκλείσουμε την πιθανότητα οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ιστών να οφείλονται σε μη απορροφηθέντα φαινολικά συστατικά που προσκολλήθηκαν στη μεμβράνη των εντεροκυττάρων.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα αυτού του πειράματος είναι ότι οι ιστοί παχέος εντέρου των ζώων που ελάμβαναν το λευκό τσάι έδειξαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, ενώ η χαμηλότερη ευαισθησία στην οξειδωση εμφανίστηκε στο παχύ έντερο των ζώων που ελάμβαναν το Πελαργόνιο. Η διαφοροποίηση αυτή είναι δύσκολο να εξηγηθεί, αν και θα μπορούσαμε να πούμε ότι οφείλεται στους διαφορετικούς μηχανισμούς με τους οποίους λειτουργούν οι δύο διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιήσαμε. Συγκεκριμένα, η μέθοδος FRAP προσδιορίζει την παρουσία αντιοξειδωτικών που έχουν την τάση να δίνουν ηλεκτρόνια, ενώ η μέθοδος TBARS μετράει την μαλονυλδιαλδεύδη, ένα εκ των προϊόντων της οξειδωσης. Συνεπώς, τα εκχυλίσματα του πράσινου τσαγιού, του λευκού τσαγιού και του Πελαργόνιου παρέχουν αντιοξειδωτικά με διαφορετικά χημικά χαρακτηριστικά και διαφορετική βιοδραστηριότητα, που εκλαμβάνεται διαφορετικά όταν αξιολογείται με διαφορετικές μεθόδους.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ιστοί παχέος εντέρου εμφάνισαν διαφορετική ευαισθησία στην οξειδωση, όταν αυτή προκλήθηκε από το μη απορροφηθέν τμήμα διαφόρων μορφών σιδήρου. Η ευαισθησία των ιστών στην οξειδωση αξιολογήθηκε αρχικά με διάλυμα  $FeCl_3$  και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο σίδηρος προκάλεσε οξειδώσεις οι οποίες ήταν μικρότερες στο παχύ έντερο των ζώων που ελάμβαναν τα εκχυλίσματα σε σχέση με αυτά που ελάμβαναν το νερό. Το παχύ έντερο των ζώων με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφάνισε και τη μικρότερη ευαισθησία στην οξειδωση. Φαίνεται ότι ανάλογα με τι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της διατροφής που ελάμβαναν τα ζώα πριν το πείραμα, οι ιστοί παχέος εντέρου εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στην εκ του σιδήρου προκληθείσα

οξειδωση. Όταν διάφορες μορφές σιδήρου υπεβλήθησαν σε διαδικασίες *in vitro* πέψης, τα προκύπτοντα μη απορροφηθέντα τμήματα σιδήρου προκάλεσαν διαφορετικής μορφής οξειδώσεις στο παχύ έντερο των ζώων, ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος που αυτά ελάμβαναν. Τα διαφορετικά είδη σιδήρου και οι φυσικοχημικές μεταβολές που αυτά υπέστησαν κατά την *in vitro* πέψη εξηγούν τη διαφορετική οξειδωτική τους συμπεριφορά σε σχέση με το απλό διάλυμα FeCl<sub>3</sub>.

Το βασικό συμπέρασμα που εξάγεται από αυτό το πείραμα με ζώα είναι ότι μια διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά φαίνεται ότι παρέχει προστασία στο παχύ έντερο και μειώνει την ευαισθησία του σε πιθανές οξειδώσεις που προκαλούνται από συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων σιδήρου. Οι κυριότεροι περιορισμοί της μελέτης (limitations) είναι η υψηλή συγκέντρωση των εκχυλισμάτων, η απουσία μέτρησης των πολυφαινόλων στο παχύ έντερο και η μη μέτρηση των επιπέδων σιδήρου.

#### **11.4. Μελέτη σε ζώα της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και σίδηρο στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων των ιστών**

Σε αυτή την πειραματική ενότητα διερευνήθηκε σε ιστούς πειραματικών ποντικών η υπόθεση ότι η βιοδραστικότητα του τσαγιού επηρεάζεται από τη σύσταση της επί μακρόν χορηγηθείσας διατροφής. Το πρώτο σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από αυτή την πειραματική ενότητα είναι ότι η ενίσχυση μιας τυπικής δίαιτας ποντικών με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (GTE) αύξησε τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP στην καρδιά, την αορτή και το δωδεκαδάκτυλο, ενώ οι πνεύμονες, η σπλήνα, τα νεφρά και ο εγκέφαλος δεν επηρεάστηκαν. Η *in vitro* αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και των ολικών φαινολικών συστατικών των 6 διαιτών έδειξε ότι η προσθήκη GTE στις δίαιτες αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα και τις ολικές πολυφαινόλες σε σύγκριση με τις δίαιτες ελέγχου. Επίσης, οι δίαιτες που είχαν ενισχυθεί με GTE και γαλακτικό σίδηρο εμφάνισαν ενδιάμεσες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικών φαινολικών. Αυτά τα *in vitro* αποτελέσματα εμφανίζουν σε ένα βαθμό

συμφωνία με τα *in vivo* στοιχεία που έδειξαν αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ιστούς των ζώων που ελάμβαναν τις ενισχυμένες με GTE δίαιτες.

Η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP) σε κάποιους ιστούς οργάνων δείχνει ότι πιθανότατα μετά την απορρόφηση, οι ευρισκόμενες στις δίαιτες πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού ή οι μεταβολίτες τους μεταφέρονται στα όργανα, όπου εμφανίζουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα προστατεύοντας τους ιστούς από ενδεχόμενη οξειδωτική καταστροφή. Σε μια πρόσφατη μελέτη με ποντίκια η επί 5 ημέρες χορήγηση εκχυλίσματος τσαγιού αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, της καρδιάς και των πνευμόνων (Koutelidakis et al, 2009). Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η διερεύνηση της μακράς διάρκειας επίδρασης εκχυλίσματος τσαγιού (37 ημέρες) και παρατηρήθηκαν αντιοξειδωτικές δράσεις σε διαφορετικούς ιστούς και καμιά επίδραση στο πλάσμα. Σε μια παρόμοια μελέτη οι Kim et al (2000) παρατήρησαν σε αρουραίους που ελάμβαναν πολυφαινόλες τσαγιού για 30 ημέρες ότι τα επίπεδα των κατεχινών στους ιστούς εμφάνισαν σημαντικές διακυμάνσεις στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της μελέτης και τελικά δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην πρώτη και την τελευταία ημέρα. Παρατήρησαν, επίσης, υψηλότερες συγκεντρώσεις κατεχινών στο λεπτό και το παχύ έντερο και χαμηλότερες στην καρδιά και το ήπαρ. Οι Kurihara et al (2004) έδειξαν ότι η χορήγηση οολόνγκ τσαγιού σε ποντίκια με οξειδωτικό στρες οδήγησε σε αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος από 1390 σε 1929 mM Trolox, μετρούμενη με τη μέθοδο ORAC. Οι Babu, Sabitha & Shyamaladevi (2006) έδειξαν μείωση των λιπιδικών υπεροξειδίων στην καρδιά και την αορτή διαβητικών αρουραίων που ελάμβαναν εκχύλισμα πράσινου τσαγιού για 28 ημέρες. Οι Sano et al (1995) παρατήρησαν σε ποντίκια μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης στα νεφρά και το ήπαρ 50 μέρες μετά την κατανάλωση τσαγιού. Στην παρούσα μελέτη η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στην καρδιά και την αορτή δύναται να εξηγηθεί μέσω της ύπαρξης πληθώρας αγγείων εις τους συγκεκριμένους ιστούς, τα οποία συνεισφέρουν στην ταχύτερη μεταφορά των αντιοξειδωτικών συστατικών της διατροφής μέσω του αίματος στα όργανα. Η αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα του δωδεκαδακτύλου πιθανότατα εξηγείται από την σημαντική εμπλοκή αυτού του οργάνου στις διαδικασίες απορρόφησης και μεταβολισμού των πολυφαινολών του τσαγιού. Η μη εύρεση επίδρασης του GTE σε όλα τα όργανα και στο πλάσμα θα μπορούσε να οφείλεται εις την πολύπλοκη φυσιολογία των διαφόρων οργάνων και στα πολυπαραγοντικά μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν οι πολυφαινόλες κατά

την απορρόφηση και το μεταβολισμό τους. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει ότι σε κάποιες περιπτώσεις οι πολυφαινόλες του τσαγιού μεταβολίζονται τόσο εκτενώς που οι μεταβολίτες τους σε ορισμένους ιστούς χάνουν την απαιτούμενη δομή άσκησης αντιοξειδωτικής δράσης, λόγω τροποποιήσεων στις κατεχολομάδες (Lotito & Frei, 2006).

Αν και στη μελέτη αυτή δε μετρήθηκαν οι πολυφαινόλες στους ιστούς των ποντικών, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρατηρηθείσα αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάποιων ιστών είναι αποτέλεσμα του αυξημένου περιεχομένου ολικών φαινολικών συστατικών στις ενισχυμένες με GTE δίαιτες. Η ενίσχυση με GTE των διαιτών Α, Β, Δ και Ε παρείχε 200 mg ολικών πολυφαινολών ανά Kg ζώου ανά ημέρα. Η επιλογή αυτή έγινε σύμφωνα με τους De Boer et al (2005), οι οποίοι αναφέρουν ότι σε μελέτες με ποντίκια ποσότητα 50-500 mg/Kg/d δύναται να αντιστοιχεί στο σύννηθες εύρος κατανάλωσης τσαγιού εκ του ανθρώπου. Η χορήγηση του GTE εντός στερεού μέσου, όπως είναι οι δίαιτες, φαίνεται ότι αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών σε σύγκριση με το υγρό μέσο, όπως το νερό (Barsill, Abbey & Roach, 2007). Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την παρατηρούμενη αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών με την αυξημένη περιεκτικότητα του τσαγιού σε πολυφαινόλες (Frei & Hidgon, 2003; Manach et al, 2004; De Boer et al, 2005, Henning et al, 2005; Koutelidakis et al, 2009). Οι πολυφαινόλες του τσαγιού, αμέσως μετά την απορρόφηση στο λεπτό έντερο και στο κόλον, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος υπό μορφή γλυκοζιτών και κινούνται προς τους διάφορους ιστούς οργάνων (Kowabata et al, 1996; Yoshino & Mukamari, 1998; Holman & Katan, 1997; Carbonaro et al, 2001; Manach et al, 2004; Cabrera, Artacho & Gimenez, 2006). Το ήπαρ αποτελεί ένα εκ των κυριότερων μεταβολικών οργάνων, εντός του οποίου οι πολυφαινόλες του τσαγιού μετατρέπονται σε μεταβολίτες και πολλές φορές επιστρέφουν εις την κυκλοφορία του αίματος και επαναπορροφούνται στο κόλον. Αυτή η επαναπορρόφηση εξηγεί την παρουσία των πολυφαινολών εντός του οργανισμού για μεγάλο διάστημα μετά την επί μακρό χορήγηση τσαγιού (Scalbert et al, 2002). Η συνεχής κατανάλωση τσαγιού φαίνεται ότι οδηγεί σε μια σταθερή συγκέντρωση πολυφαινολών στο πλάσμα, η οποία παραμένει για περίπου 12 ώρες μετά την τελευταία λήψη τσαγιού (Erba et al, 2004). Σε αυτή την ενότητα επελέγη ένα πείραμα διάρκειας 37 ημερών ώστε να επιτευχθεί μια σταθερή συγκέντρωση κατεχινών εντός του πλάσματος των ζώων, με συνέπεια να



ενισχυθεί η κίνηση τους προς τους ιστούς και η επίδραση επί της αντιοξειδωτικής κατάστασης αυτών.

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού καθορίζεται από πληθώρα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά την κατανάλωση ενός τροφίμου πλούσιου σε αντιοξειδωτικά, όπως οι πολυφαινόλες, μπορεί να είναι αποτέλεσμα, όχι μόνο των εις το τρόφιμο περιεχόμενων αντιοξειδωτικών αλλά και της επίδρασης άλλων συστατικών του τροφίμου στο ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα. (Lotito & Frei, 2006; Modum et al, 2008). Με τον όρο συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα δεν εννοούμε το σύνολο των ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών, αλλά την ικανότητα αυτών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που βρίσκονται στο δείγμα (Niki, 2010). Η ικανότητα αυτή καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η δομή των αντιοξειδωτικών, το περιβάλλον μέγιστης δράσης τους και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Blauz et al, 2008; Niki, 2010). Οι Blauz et al (2008) αναφέρουν ότι οι κατεχόλες των πολυφαινολών δύναται να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος με συνέπεια τη μείωση της αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα αντιοξειδωτικά οδηγούν σε δράση που δεν είναι προσθετική, αλλά συνεργηστική. Οι Masella et al (2005) σε μία μελέτη ανασκόπησης αναφέρουν πιθανή επίδραση των διαιτητικών πολυφαινολών στη δραστηριότητα των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων φάσης I, όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση, καθώς και στα ένζυμα φάσης II, όπως η τρανσφεράση και η ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης. Η Niki (2010) καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά δε σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, συνεπώς η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι μόνο μια ένδειξη του βιολογικού τους ρόλου. Από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά το ουρικό οξύ συνεισφέρει κατά το πλείστον (58%) στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, έναντι 21% των πρωτεϊνών, 14% του ασκορβικού οξέος και 7% της βιταμίνης E (Niki, 2010). Οι Lotito & Frei (2006) προτείνουν ότι διάφορα συστατικά των τροφίμων, όπως η φρουκτόζη, η καφεΐνη και οι μεθυλξανθίνες προκαλούν ταχεία αύξηση του ουρικού οξέος στο πλάσμα, η οποία δύναται να εξηγεί και την αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού δεν είναι η μοναδική αιτία αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, η οποία καθορίζεται και

από άλλους μεταγευματικούς παράγοντες. Ένας βασικός περιορισμός της παρούσας πειραματικής ενότητας είναι ότι δεν έλαβε χώρα προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών, του ουρικού οξέος και των ενδογενών αντιοξειδωτικών στο πλάσμα και τους ιστούς, ώστε να γίνει συσχέτιση των διαφοροποιήσεων τους με αυτές της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Το δεύτερο σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από αυτό το πείραμα είναι ότι η ενίσχυση των διαιτών των ποντικών με GTE και σίδηρο μείωσε την αντιοξειδωτική ικανότητα του ήπατος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στο ήπαρ και στην καρδιά όταν διερευνήθηκε η επίδραση της ενίσχυσης με GTE και σίδηρο, ανεξάρτητα του εάν η δίαιτα ήταν τυπική ή λιπαρή. Η χημική συγγένεια που υπάρχει ανάμεσα στο σίδηρο και τις πολυφαινόλες θα μπορούσε να αποτελεί μια πιθανή εξήγηση των παραπάνω παρατηρήσεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν το τσάι καταναλώνεται παράλληλα με γεύματα πλούσια σε σίδηρο δημιουργούνται σύμπλοκα ανάμεσα στο σίδηρο και τις πολυφαινόλες με συνέπεια τη μείωση της απορρόφησης του σιδήρου (Zip, Korver & Tijburg, 2000; Samman et al, 2001). Τα σύμπλοκα αυτά φαίνεται ότι δημιουργούνται ανάμεσα στο σίδηρο και στα οξυγόνα των πολυφαινολών (Kapsokefalou, Zhu & Miller, 2006). Άλλες μελέτες *in vitro* και *in vivo* εμφανίζουν επίδραση του σιδήρου στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα του πράσινου τσαγιού (Argiri, Komaitis & Kapsokefalou, 1996; Alexandropoulou, Komaitis & Kapsokefalou, 2005). Στην παρούσα μελέτη η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα κάποιων ιστών ίσως οφείλεται στη μειωμένη απορρόφηση των πολυφαινολών λόγω της δημιουργίας συμπλόκων με το σίδηρο κατά την πέψη ή στη δημιουργία συμπλόκων μετά την πέψη και κατά το μεταβολισμό. Η ποσότητα σιδήρου που χρησιμοποιήσαμε (20 mg/kg) είναι ανάλογη των ποσοτήτων που έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες (Kapsokefalou, Zhu & Miller, 2006).

Το τρίτο ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης αυτής είναι ότι η ενίσχυση με GTE ή GTE και σίδηρο δεν είχε καμία επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών όλων των οργάνων των ποντικών όταν έγινε εντός μιας δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά συστατικά. Αν και όταν το GTE και το GTE με σίδηρο ενσωματώθηκε εντός μιας τυπικής δίαιτας (ομάδες Α, Β, Γ) παρουσιάστηκαν διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα ορισμένων ιστών, όταν ενσωματώθηκαν εντός μιας λιπαρής δίαιτας (ομάδες Δ, Ε, Ζ) δεν εμφανίστηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες σε κανένα ιστό. Εντούτοις, όταν διερευνήθηκε η επίδραση του GTE με ή χωρίς σίδηρο

σε όλους τους ιστούς ανεξάρτητα του αν η διαίτα ήταν τυπική ή λιπαρή, παρατηρήθηκαν διαφορές μόνο στην καρδιά και το ήπαρ. Παραταύτα, παρατηρήθηκε τόσο με τη μέθοδο FRAP, όσο και με τη μέθοδο ORAC ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα κάποιων ιστών των ζώων που ελάμβαναν τη λιπαρή διαίτα ήταν σημαντικά αυξημένη συνολικά σε σχέση με αυτή των ζώων που ελάμβαναν την τυπική διαίτα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε αύξηση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού ως αποτέλεσμα της χρόνιας έκθεσης στο εκ του λίπους προερχόμενο οξειδωτικό στρες. Η διερεύνηση της επίδρασης του τσαγιού εντός μιας λιπαρής διαίτας επελέγη αφενός μεν εξαιτίας του ενδιαφέροντος για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυφαινολών και του λίπους της διατροφής, αφετέρου δε λόγω των πιθανών οξειδώσεων που προκαλεί μια λιπαρή διατροφή, οι οποίες δύναται να μειώνονται παρουσία των αντιοξειδωτικών πολυφαινολών. Η ενίσχυση της διαίτας με λιπαρά συστατικά (χοληστερόλη, βούτυρο κακάου και χολικά άλατα) έγινε με βάση τα δεδομένα από μελέτες επίδρασης αθηρογόνου διαίτας σε ποντίκια με στόχο την επίταση του οξειδωτικού στρες (Yamaguchi et al, 1991; Yukozawa, Nakagawa & Kitani, 2002; Fujita & Yamagami, 2008).

Οι Sies, Stahl & Sevanian (2005) μελετώντας τη σημασία του διατροφικού οξειδωτικού στρες αναφέρουν ότι η κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιου σε οξειδώσιμα και οξειδωμένα λιπίδια αυξάνει τα επίπεδα των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων στον οργανισμό προωθώντας τις οξειδωτικές διαδικασίες, που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τον καρκίνο. Οι Fang, Yang & Wu (2002) αναφέρουν ότι η χορήγηση μιας διαίτας πλούσιας σε λίπος σε τρωκτικά αυξάνει τη δραστηριότητα της συνθάσης του NO στο ήπαρ και το παχύ έντερο και ενεργοποιεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια, δεδομένου ότι το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια είναι βασική πηγή ελευθέρων ριζών. Λόγω του ότι τα NADH, NADPH και FADH<sub>2</sub> παράγονται μέσω του αερόβιου μεταβολισμού του λίπους, των πρωτεϊνών και της γλυκόζης, η αύξηση της διαιτητικής πρόσληψης ενέργειας επιτείνει το εκ των μιτοχονδρίων προκύπτον οξειδωτικό στρες (Fang, Yang & Wu, 2002). Αρκετές μελέτες προτείνουν μηχανισμούς με τους οποίους οι πολυφαινόλες της διατροφής μειώνουν την ευαισθησία των ιστών του οργανισμού στις εκ της διατροφής προκύπτουσες οξειδώσεις (Ursini & Sevanian, 2002; Tsai et al, 2004; Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Οι Yukozawa, Nakagawa & Kitani (2002) έδειξαν σε αρουραίους που ελάμβαναν

δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη ότι η χορήγηση πράσινου τσαγιού μείωσε την οξείδωση της LDL και αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP) των ιστών ανάμεσα στις ομάδες Δ, Ε και Ζ της λιπαρής διατροφής. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η ενίσχυση με GTE δεν ήταν ικανή να αλλάξει τις ενδεχόμενες οξειδωτικές διαδικασίες που προκάλεσε η λιπαρή διατροφή εντός του οργανισμού. Ωστόσο, η μη μέτρηση των λιπιδικών υπεροξειδίων αποτελεί έναν περιορισμό της μελέτης, δεδομένων των συμπερασμάτων που θα προέκυπταν σχετικά με τις οξειδώσεις που προκάλεσε το λίπος.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι όταν οι πολυφαινόλες πέπτονται μαζί με λίπος, προκαλούνται αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μικελλών των χολικών οξέων και ίσως επηρεάζεται η δραστηριότητα της γαστρικής και της παγκρεατικής λιπάσης, με συνέπεια τη μειωμένη απορρόφηση τόσο των λιπιδίων, όσο και των πολυφαινολών στα εντεροκύτταρα (Ikeda et al, 2005; Koo & Noh, 2007; Jochman, Bauman & Stangl, 2008). Συνεπώς, είναι πιθανόν να μην παρατηρήθηκαν αλλαγές στην αντιοξειδωτική ικανότητα λόγω μειωμένης απορρόφησης των πολυφαινολών και του λίπους. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση τσαγιού σε ποντίκια που λαμβάνουν μια λιπαρή δίαιτα οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα και σε κάποιους ιστούς, όπως το ήπαρ και η αορτή (Yamaguchi et al, 1991; Shirai & Suzuki, 2008). Άλλες μελέτες παρατήρησαν μείωση του βάρους των ζώων, του βάρους ορισμένων ιστών και της λεπτίνης του πλάσματος μετά τη χορήγηση τσαγιού (Sayama et al, 2000; Fujita & Yamagami, 2008). Παραταύτα, στην παρούσα πειραματική ενότητα, αν και υπήρξε μια τάση, δεν εμφανίστηκαν διαφορές ανάμεσα στα βάρη των ζώων της κανονικής και της λιπαρής διαίτας. Αν και εμπειρικά παρατηρήθηκε αύξηση της λιπαρότητας κάποιων ιστών, όπως το ήπαρ, με τη χορήγηση της λιπαρής διαίτας, ωστόσο δε μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις χοληστερόλης και λιπιδίων στα όργανα. Συμπερασματικά δυνάμεθα να πούμε ότι οι πολυφαινόλες του εκχυλίσματος τσαγιού φαίνεται ή ότι δεν απορροφήθηκαν επαρκώς λόγω της παρουσίας του λίπους με συνέπεια να μην αυξήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ιστών ή ότι δεν κατάφεραν να δεσμεύσουν τις υπεροξειδικές ρίζες που παράγονταν σε μεγάλες συγκεντρώσεις μετά από μια επί μακρό λιπαρή διατροφή. Εντούτοις, η τεράστια πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων της πληθώρας των

συστατικών της διαίτας συνδυαζόμενη με την πολυπαραγοντικότητα του μεταβολισμού δεν επιτρέπουν ασφαλή συμπεράσματα, παρά μόνο υποθέσεις.

Στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα κάποιων ιστών ανάμεσα στις ομάδες των ζώων που ελάμβαναν τις διαφορετικές τυπικές δίαιτες, όταν η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Όταν, όμως, μετρήθηκε με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Antioxidant Capacity) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους περισσότερους ιστούς, ούτε ανάμεσα στις ομάδες της τυπικής, ούτε της λιπαρής διαίτας. Αυτή η διαφοροποίηση ανάμεσα στις μεθόδους θα μπορούσε να εξηγηθεί αφενός μεν μέσω των διαφορετικών μηχανισμών με τους οποίους προσδιορίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα, αφετέρου δε μέσω του διαφορετικού τρόπου προετοιμασίας των δειγμάτων. Η μέθοδος FRAP είναι φασματοφωτομετρική, βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και μετράει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν ένα οξειδωτικό μέσο. Η μέθοδος ORAC είναι φθορισμομετρική, βασίζεται στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου και μετράει τη μείωση της φθορά του φθορισμού μιας φθορίζουσας ουσίας στην οποία προστέθηκε μια ρίζα, παρουσία του αντιοξειδωτικού. Αυτοί οι διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν ως συνέπεια η κάθε μέθοδος να προσδιορίζει καλύτερα συγκεκριμένες κατηγορίες αντιοξειδωτικών συστατικών, γεγονός που ίσως εξηγεί τις διαφοροποιήσεις στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη (Prior & Cao, 1999; Huang, Ou & Prior, 2005). Μια άλλη εξήγηση αυτών των διαφοροποιήσεων θα μπορούσε να δοθεί βάσει του ότι η μέθοδος ORAC πραγματοποιήθηκε έπειτα από ανάμειξη των δειγμάτων ιστών των 5 ποντικών κάθε ομάδας, ενώ κατά τη FRAP αναλύθηκαν όλοι οι ιστοί και των 30 ποντικών ξεχωριστά. Αυτό έγινε λόγω της μικρής ποσότητας των εναπομεινάντων δειγμάτων και ίσως οδήγησε σε αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών με συνέπεια την αλλαγή του τελικού αποτελέσματος της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Το τέταρτο ενδιαφέρον συμπέρασμα αυτής της ενότητας αφορά τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων, σχετικά με την αλλαγή στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στην καρδιά και το ήπαρ των ζώων που ελάμβαναν την ενισχυμένη με τσάι διατροφή. Τα τελευταία χρόνια οι κλάδοι της βιολογίας «nutrigenomics» και «proteomics» προσφέρουν χρήσιμα μεθοδολογικά εργαλεία για τη διερεύνηση των πιθανών επιδράσεων των αντιοξειδωτικών συστατικών της διατροφής στα μεταβολικά μονοπάτια, την έκφραση των γονιδίων και στο τελικό πρωτέωμα του κυττάρου (Li et al, 2007; Dreger et al, 2008). Πολλές μελέτες προτείνουν ότι τα

αντιοξειδωτικά της διατροφής, όπως οι πολυφαινόλες, δεν δρουν μόνο ως παράγοντες δέσμευσης των ελευθέρων ριζών εντός του οργανισμού, αλλά μετέχουν σε πολύπλοκα μεταβολικά μονοπάτια και επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που κωδικοποιούν την υπερπαραγωγή ή την υποπαραγωγή διαφόρων κυτταρικών ουσιών (Masella et al, 2005; Lotito & Frei, 2006). Έτσι, εμφανίζουν βιοδραστικότητα που δε σχετίζεται μόνο με άμεσες αντιοξειδωτικές, αλλά και με έμμεσες αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και άλλες δράσεις. Για παράδειγμα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει σε ποντίκια ότι η επί μακρό χορήγηση αντιοξειδωτικών αύξησε τη δραστηριότητα και την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα, όπως τα γονίδια της NADPH οξειδάσης, της καταλάσης, της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της γλουταθειόνης (Chyu et al, 2004; Al-Awwadi et al, 2005; El Bedoui et al, 2005). Άλλες μελέτες έχουν διερευνήσει στην καρδιά και την αορτή την επίδραση των πολυφαινολών του τσαγιού σε γονίδια που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως τα *MMP*, *VEGF*, *c-fos*, *c-myc* και *c-jun* (Lu et al, 1998; Chyu et al, 2004; El Bedoui et al, 2005; Jochman, Bauman & Stangl, 2008).

Ένα σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι που συνδέεται με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς διαφόρων ασθενειών είναι το Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) pathway. Οι JNK, ERK, *mapk-1* και *p38* είναι κάποιες από τις κυριότερες MAP κινάσες που έχει παρατηρηθεί ότι προωθούν τους μηχανισμούς αθηρωμάτωσης. Οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν τις κινάσες αυτές, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην προαγωγή φλεγμονωδών διαδικασιών (Pandya, Santani & Jain, 2005). Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι το πράσινο τσάι δύναται να επηρεάζει την ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAP κινασών. Οι Yu et al (1999) και οι Chen et al (2000) έδειξαν σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (heptoma HepG2 cells) ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού ενεργοποιούν τις κινάσες JNK και ERK2. Εκτός από το εκχύλισμα τσαγιού και ο σίδηρος φαίνεται ότι επηρεάζει τις συγκεκριμένες κινάσες. Οι Cornejo et al (2005) έδειξαν σε ήπαρ αρουραίων ότι η χρόνια έκθεση σε σίδηρο αύξησε την ενεργοποίηση της JNK αλλά και του παράγοντα NF-kB, ενώ οι Lee et al (2006) παρατήρησαν ότι οι συμπλοκοποιητές σιδήρου ενεργοποίησαν τις MAP κινάσες *p38* και ERK. Σχετικά με την έκφραση του γονιδίου *c-fos* μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού προωθούν την αύξηση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου αυτού, ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι οι κατεχίνες οδηγούν στην υποέκφραση του γονιδίου (Dulak, 2005).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η παρουσία GTE και γαλακτικού σιδήρου εντός μιας τυπικής διαίτας ποντικών σχετίστηκε με μείωση της έκφρασης του γονιδίου *mark-1* στην καρδιά κατά 42% και μείωση της έκφρασης του γονιδίου *NF-kB* κατά 35% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό ίσως αποτελεί το αποτέλεσμα των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων και των πολυπαραγοντικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα μετά από την επί μακρό χρονικό διάστημα χορήγηση μιας τέτοιας διαίτας και που δύναται να οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση του mRNA. Η διάρκεια του πειράματος (37 ημέρες) θεωρείται μια μεγάλη περίοδος για τα ποντίκια, ώστε να μπορεί να δικαιολογήσει επίδραση της διατροφής σε μοριακό επίπεδο και σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων. Οι Bellido et al (2004) παρατήρησαν ότι η χορήγηση βουτύρου σε υγιή άτομα ενεργοποίησε τον παράγοντα NF-kB στα μονοκύτταρα της περιφερικής κυκλοφορίας, γεγονός που απετράπη παρουσία των αντιοξειδωτικών του ελαιολάδου. Ο παράγοντας NF-kB φαίνεται ότι προωθεί τη φλεγμονώδη διαδικασία και το οξειδωτικό στρες, ενώ οι πολυφαινόλες αποτελούν δυναμικό παράγοντα αναστολής του (Bellido et al, 2004; Soobrattee et al, 2005). Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στον παράγοντα NF-kB με τη χορήγηση της λιπαρής διαίτας, αλλά με την ενίσχυση της τυπικής διαίτας με τσάι και σίδηρο. Αν και οι πολυφαινόλες του τσαγιού θα μπορούσαν να αναστείλουν τον παράγοντα, όπως δείχνει η βιβλιογραφία, η παρουσία του σιδήρου θα μπορούσε να εντείνει τη δράση του. Συνεπώς, η παρατηρηθείσα μεταβολή δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί. Η μείωση της έκφρασης του γονιδίου *mark-1* στην καρδιά, το οποίο θεωρείται βασικός αντιπρόσωπος των πρωτεϊνικών κινασών, αποτελεί ενδιαφέρον εύρημα δεδομένου του ρόλου αυτών των κινασών στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Ωστόσο, η επίδραση εμφανίστηκε παρουσία σιδήρου, κάτι το οποίο είναι επίσης δύσκολο να εξηγηθεί. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *c-fos* στην καρδιά μετά τη χορήγηση της λιπαρής διαίτας σε σχέση με την τυπική, χωρίς όμως να φαίνεται να επηρέασε η ενίσχυση με τσάι, ενώ στο ήπαρ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων. Τέλος, η χορήγηση των 6 διαιτών δεν έδειξε διαφορές στην έκφραση των γονιδίων καταλάση και NADPH-oxidase στην καρδιά και το ήπαρ. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα και άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού δύναται να αυξήσουν την έκφραση τους (Masella et al, 2005).

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος με ποντίκια δύναται να έχουν επηρεαστεί από τις αλληλεπιδράσεις των διαφόρων

συστατικών των 6 διαιτών, τα οποία είναι δύσκολο να απομονωθούν και να αποσαφηνιστούν. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να έλαβαν χώρα πριν την κατανάλωση της τροφής από τα ζώα ή μετά την πέψη, εντός του εντερικού σωλήνα και να άλλαξαν τις πιθανές επιδράσεις που θα είχε το εκχύλισμα τσαγιού χορηγηθέν ως μεμονωμένο συστατικό υπό νηστεία (Fang, Yang & Wu, 2002). Επίσης, όπως έχει αναφερθεί σε αυτή την ενότητα δυνάμεθα να παρατηρήσουμε ορισμένους περιορισμούς (limitations). Ένας από αυτούς είναι η έλλειψη προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών και του σιδήρου εντός των ιστών, λόγω των δυσκολιών εφαρμογής των κατάλληλων μεθόδων. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι δεν υπήρχε τρόπος ελέγχου του ποσού τροφής που ελάμβανε κάθε ζώο ή κάθε ομάδα κάθε ημέρα. Έτσι, κάποιες ομάδες ίσως ελάμβαναν περισσότερη τροφή από άλλες, γεγονός που πιθανότατα εξηγεί την αδυναμία της λιπαρής διατροφής να αυξήσει το βάρος των ζώων. Σχετικά με τη χορήγηση της τροφής και τις αναλύσεις, κάποια μικρά προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Η τροφή εχορηγείτο εντός τρυβλίων μετά από επιφανειακό βρέξιμο, ώστε να μην την ρίχνουν τα ζώα εύκολα εκτός τρυβλίου. Εντούτοις, κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε συχνή πτώση της τροφής εκτός του τρυβλίου από τα ζώα ή μεταφορά στρωμνής και ακαθαρσιών εντός του τρυβλίου με την τροφή.
- Τα ζώα που λάμβαναν τη λιπαρή δίαιτα παρατηρήθηκε ότι δεν κατανάλωναν όλη την τροφή που τοποθετείτο, ενώ τα ζώα που λάμβαναν την τυπική δίαιτα την κατανάλωναν. Συγκεκριμένα, συχνά εκαταγράφη ποσότητα ανέπαφης τροφής στις ομάδες Δ, Ε, Ζ.
- Αναφορικά με το νερό, τα ζώα των ομάδων Α και Β φαίνεται πως έπιναν παραπάνω νερό από αυτά της ομάδας Γ (εμπειρική παρατήρηση).
- Εμπειρικά παρατηρήθηκε ότι ίσως τα ζώα έπρεπε να έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή, διότι ιδίως τις πρώτες μέρες, οπότε τοποθετείτο λιγότερη, τα ζώα την κατανάλωναν γρήγορα και εμφάνισαν μικρή απώλεια βάρους. Κατά τις πρώτες 15 ημέρες τα ζώα ελάμβαναν περίπου 35 g τροφής ανά ομάδα (5 ζώα) την ημέρα. Δηλαδή 10 g μόνο παραπάνω από τη μέση πρόσληψη ανά 5 ζώα. Αυτή την περίοδο τα ζώα είχαν μικρή απώλεια βάρους. Τις επόμενες 22 ημέρες τα ζώα ελάμβαναν 50-60 g τροφής ανά ομάδα (5 ζώα) την ημέρα. Δηλαδή διπλάσια ποσότητα από τη



μέση πρόσληψη ανά 5 ζώα. Αυτή την περίοδο τα ζώα εμφάνισαν επανάκτηση του αρχικού τους βάρους.

- Κατά τις νεκροψίες, παρατηρήθη ότι τα όργανα των ζώων που ελάμβαναν την λιπαρή δίαιτα είχαν χρώμα πιο ανοιχτό και υφή λιπαρή και λιγότερο συνεκτική σε σχέση με τα ζώα της τυπικής διαίτας.
- Κατά τις ομογενοποιήσεις, κάποιοι ιστοί ήταν δύσκολο να ομογενοποιηθούν πλήρως, ενώ κάποιοι άλλοι ήταν σε τόσο μικρή ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε 10, 15, 30 ή και 100 φορές μεγαλύτερη ποσότητα PBS για την ομογενοποίηση.
- Κατά τις φυγοκεντρήσεις, σε κάποιες περιπτώσεις ήταν αδύνατος ο πλήρης διαχωρισμός. Αυτό παρατηρήθη ιδίως σε λιπαρούς ιστούς, όπως το ήπαρ, η σπλήνα κ.α. των ζώων της λιπαρής διαίτης.

Το πείραμα αυτό έδωσε τη δυνατότητα μελέτης της βιοδραστικότητας του εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού και κάποιων διατροφικών παραγόντων που την επηρεάζουν. Η βιοδραστικότητα ελέγχθηκε μέσω προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών με δύο μεθόδους και μέσω της διερεύνησης της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα τσαγιού εμφάνισε βιοδραστικότητα σε κάποιους ιστούς και ότι αυτή ίσως επηρεάστηκε από διατροφικούς παράγοντες, όπως ο σίδηρος και το λίπος.

### **11.5. Κλινική μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και γεύματος που περιέχει λίπος και σίδηρο σε βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο**

Στόχος αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν η μελέτη της μεταγευματικής κατανάλωσης πράσινου τσαγιού στην αντιοξειδωτική κατάσταση και σε δείκτες καρδιαγγειακών παθήσεων σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Στις δυτικές κοινωνίες ένα μεγάλο τμήμα της ημέρας αντιστοιχεί σε μεταγευματική κατάσταση. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η μεταγευματική αύξηση των λιπιδίων και της γλυκόζης του αίματος προωθεί το οξειδωτικό στρες ενισχύοντας την εμφάνιση διαδικασιών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρυνση (Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Η κατανάλωση του γεύματος, ιδίως όταν αυτό περιέχει λίπος, φαίνεται να επηρεάζει άμεσα κάποιους δείκτες καρδιαγγειακών, οδηγώντας σε επιτάχυνση των οξειδωτικών διαδικασιών στο

αίμα, κινητοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και προώθηση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Ruano et al, 2007; Hodgson et al, 2001; Esposito et al, 2003; Hodgson et al. 2005; Blanco-Colio et al, 2000). Η μεταγευματική λιπαιμία σχετίζεται με απότομη αύξηση των τριγλυκεριδίων και των χυλομικρών, αύξηση της συγκέντρωσης των μικρών και πυκνών LDL, επίταση της παραγωγής λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων και προώθηση του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα (Ursini et al, 1998; Tsai et al, 2004; Kolovou et al, 2005; Sies, Stahl & Sevanian, 2005). Οι συνέπειες της μεταγευματικής κατάστασης είναι μεγαλύτερες σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, δεδομένης της υπάρχουσας επιβάρυνσης των βιοδεικτών καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως τα ήδη αυξημένα λιπίδια και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Shankar et al, 2008). Οι O'Keefe et al (2008) τονίζοντας τη σημασία της μεταγευματικής λιπαιμίας και γλυκαιμίας προτείνουν μια σειρά από διατροφικές επιλογές που θα μπορούσαν αφενός μεν να αποτρέψουν το μεταγευματικές οξειδωτικές διαδικασίες, αφετέρου δε να μειώσουν τα επίπεδα των λιπιδίων και της γλυκόζης στο αίμα αμέσως μετά το γεύμα. Η κατανάλωση τροφίμων και ποτών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά συστατικά, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, το κόκκινο κρασί και το τσάι προβάλλει ως μία εκ των βασικών διατροφικών επιλογών για την επίτευξη αυτού του στόχου. Αυτές οι επιλογές έχουν ιδιαίτερη σημασία στους στεφανιαίους ασθενείς στον τομέα της δευτερογενούς πρόληψης. Αν και έχει μελετηθεί η μεταγευματική επίδραση αρκετών τροφίμων πλουσίων σε πολυφαινόλες, η μεταγευματική επίδραση του τσαγιού δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς, κενό που προσπαθήσαμε να καλύψουμε με αυτή τη μελέτη.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν κάποια δεδομένα σχετικά με τη μεταγευματική επίδραση των αντιοξειδωτικών συστατικών μετά την κατανάλωση γεύματος πλούσιου σε λίπος ή υδατάνθρακες, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της μελέτης. Η επιλογή των χρονικών στιγμών των αιμοληψιών έγινε δεδομένου ότι ερευνητικά δεδομένα προτείνουν μέγιστη αύξηση των βιοδεικτών που σχετίζονται με το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες και την αθηροσκλήρυνση 2-4 h μετά το γεύμα (Denniss et al, 2008). Τα γεύματα που συνήθως χρησιμοποιούνται περιέχουν ψωμί, κρέας (μπέικον ή μπιφτέκι), αυγό, τηγανητές πατάτες και βούτυρο (Ursini et al, 1997; Natella et al, 2002; Unno et al, 2005; Denniss et al, 2008). Με βάση το σχεδιασμό της μελέτης επελέγη γεύμα που περιείχε 80 g ψωμί και 20 g βούτυρο (Unno et al, 2005), ενώ η παρέμβαση περιλάμβανε 330 ml πράσινου τσαγιού (περίπου 400 mg πολυφαινόλες). Η ποσότητα τσαγιού που εδόθη στους ασθενείς προέκυψε εκ της

προσθήκης 3,48 g τσάι σε 250 ml νερό και αντιστοιχούσε σε περίπου 400 mg κατεχίνες, δηλαδή ήταν σύμφωνη με τη βιβλιογραφία, που προτείνει περίπου 3 g σε 250 ml νερό ή 300-400 mg κατεχίνες ανά παρέμβαση (Hodgson et al, 2005). Ο αριθμός των ατόμων ανά ομάδα (19-21) προέκυψε έπειτα από ανάλυση ισχύος βασισμένη στους δείκτες αντιοξειδωσης και τριγλυκεριδίων και με βάση τη βιβλιογραφία (Naissides et al, 2004; Erba et al, 2005).

Το πρώτο ενδιαφέρον συμπέρασμα της μελέτης αυτής αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ. Στην ομάδα του νερού παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων 3 ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος και διατήρηση έως τις 5 ώρες, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα του τσαγιού. Αυτό θα μπορούσε να δείχνει πιθανή αλληλεπίδραση των λιπιδίων με τα συστατικά του τσαγιού κατά την απορρόφηση. Ωστόσο, αφενός μεν η μη ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στις ομάδες συνολικά, αφετέρου δε η παρατηρούμενη χαμηλή στατιστική ισχύς ( $Power < 0,8$ ) δε δίνουν τη δυνατότητα εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων. Σε μια μελέτη παρόμοιου σχεδιασμού οι Unno et al (2005) έδειξαν αύξηση των τριγλυκεριδίων 3 h μετά το γεύμα και μη επιστροφή στα αρχικά επίπεδα 6 h μετά. Η χορήγηση 674 mg κατεχινών τσαγιού μείωσε τα τριγλυκερίδια σε όλες τις χρονικές στιγμές, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ολική χοληστερόλη, η HDL και η LDL χοληστερόλη δεν εμφάνισαν διαφορές ούτε ανάμεσα στις ομάδες, ούτε ανάμεσα στις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα, αν και η στατιστική ισχύς ήταν χαμηλή. Οι Fujita & Yamagami (2008) αναφέρουν μείωση της χοληστερόλης σε αρουραίους 6 h μεταγευματικά παρουσία τσαγιού, αλλά τα δεδομένα για τη μεταγευματική επίδραση του τσαγιού στην LDL είναι ελλιπή. Η αναστολή της παγκρεατικής λιπάσης στον εντεροσωλήνα προβάλλει ως βασικός μηχανισμός επίδρασης των πολυφαινολών του τσαγιού επί της απορρόφησης των λιπιδίων (Koo & Noh, 2007). Παραταύτα, στην παρούσα μελέτη αν και η παγκρεατική λιπάση εμφάνισε μια τάση αύξησης στην ομάδα του νερού και μια τάση μείωσης στις ομάδες του τσαγιού, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες και εν τη πορεία του χρόνου.

Το δεύτερο ενδιαφέρον συμπέρασμα αφορά τη γλυκόζη. Η γλυκόζη δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Αν και η καμπύλες ήταν παραβολικές, δεν παρουσίασαν διαφοροποιήσεις ως προς το ύψος και το πλάτος. Ένα εύρημα που δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί είναι ότι αν και στις ομάδες του τσαγιού και του νερού η γλυκόζη αυξήθηκε στη 1,5 h και στις 3 h άρχισε να πέφτει επανερχόμενη στα αρχικά επίπεδα στις 5h, στην ομάδα του τσαγιού με σίδηρο συνέχισε να είναι

αυξημένη μέχρι και τις 5 h. Αν και κάποιες μελέτες έχουν δείξει αποτροπή των αρνητικών συνεπειών της μεταγευματικής γλυκαιμίας όταν το γεύμα περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά (O'Keefe et al, 2008), οι περισσότερες δεν παρατήρησαν επίδραση. Οι Ceriello et al (2001) δε βρήκαν σημαντική επίδραση στη γλυκόζη, 3 ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος. Η κατανάλωση μαύρου τσαγιού μετά την λήψη 75 g γλυκόζης μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης και αύξησε τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα (Bryans et al. 2007). Οι Denniss et al (2008) δεν παρατήρησαν επίδραση της χορήγησης λυκοπενίου στα επίπεδα ινσουλίνης και γλυκόζης.

Η επίδραση του τσαγιού στη μεταγευματική κατάσταση βασίζεται όχι μόνο στην αποτροπή του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες, αλλά και στην επίτευξη ομαλότερης αύξησης των λιπιδίων και της γλυκόζης αμέσως μετά το γεύμα (Vinson, Karolyn & Wu, 2004; Sies et al, 2005; O'Keefe et al, 2008). Στην Ιαπωνία, το τσάι κατατάσσεται στα λειτουργικά τρόφιμα (FOSHU) που χρησιμοποιούνται για τη μείωση των λιπιδίων (Fujita & Yamagami, 2008). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει υπολιπιδαιμική δράση του τσαγιού υπό χρόνια κατανάλωση αθηρογόνων διατροφών. Οι Shirai & Suzuki (2008) έδειξαν σε αρουραίους που ελάμβαναν μια αθηρογόνο δίαιτα για 3 μήνες ότι η κατανάλωση εκχυλίσματος τσαγιού μείωσε τη συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα και στο ήπαρ, ενώ οι Yamaguchi et al (1991) έδειξαν μείωση των λιπιδίων και στην αορτή. Οι Fujita & Yamagami (2008) παρατήρησαν μείωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης σε αρουραίους που κατανάλωναν μαύρο τσάι για 3 εβδομάδες, ενώ οι Brusill, Abbey & Roach (2007) έδειξαν μείωση της ολικής, VLDL και LDL χοληστερόλης στο ήπαρ και την αορτή κουνελιών που ελάμβαναν κατεχίνη. Αναφορικά με την επίδραση του τσαγιού στη μεταγευματική λιπαιμία πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά αναίρεσαν την ταχεία αύξηση των λιπιδίων 3, 4 ή το πολύ 6 h μεταγευματικά. Μελέτες με ποντίκια και αρουραίους έχουν παρατηρήσει μείωση της μεταγευματικής αύξησης της χοληστερόλης 6 h μετά την κατανάλωση τσαγιού (0,3 g/Kg) (Fujita & Yamagami, 2008) και μείωση του ρυθμού αύξησης των τριγλυκεριδίων τις πρώτες 5 h μετά το γεύμα που περιείχε οολόνγκ τσάι (Toyoda-Ono, 2007), με προτεινόμενους μηχανισμούς την εκ των κατεχινών προκληθείσας αποσύνθεση των χολικών αλάτων και αναστολή της παγκρεατικής λιπάσης με συνέπεια τη μειωμένη απορρόφηση του λίπους. Οι Unno et al (2005) έδειξαν ότι η κατανάλωση τσαγιού μείωσε τα τριγλυκερίδια και τα κατάλοιπα χοληστερόλης 1, 2, 3, 4 και 6 ώρες μετά την κατανάλωση 100g ψωμιού με 20g

βούτυρο. Οι Natella et al (2003) και Esposito et al (2003) έδειξαν ότι τα τριγλυκερίδια μειώθηκαν σημαντικά ενώ η γλυκόζη δεν επηρεάστηκε 3 και 4 ώρες μετά από γεύμα πλούσιο σε πολυφαινόλες σταφυλιού ή λαχανικών σε σχέση με ένα γεύμα χωρίς πολυφαινόλες. Οι Koo & Noh (2007) σε ένα άρθρο ανασκόπησης υποστηρίζουν ότι το τσάι δύναται να μειώσει τα λιπίδια του αίματος μειώνοντας την απορρόφηση του λίπους στο έντερο. Οι κυριότεροι μηχανισμοί που προτείνονται είναι: α) Αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του γαλακτώματος και μείωση του μεγέθους των σωματιδίων λίπους β) Επίδραση επί της σύνθεσης και της δράσης των μικελλών των χολικών αλάτων γ) Μείωση της δραστηριότητας της παγκρεατικής λιπάσης που ευνοεί την απορρόφηση του λίπους υδρολύοντας το δ) Αναστολή της δράσης μεταφορικών ουσιών της χοληστερόλης στην ψυκτροειδή παρυφή των εντεροκυττάρων (Yamaguchi et al, 1991; Unno et al, 2005; Koo & Noh, 2007; Fujita & Yamagami, 2008)

Εντούτοις, υπάρχουν κάποιες κλινικές μελέτες που δεν έδειξαν επίδραση των αντιοξειδωτικών της διατροφής στη μεταγευματική αύξηση των λιπιδίων. Οι Naissides et al (2004) δε βρήκαν επίδραση της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού στις συγκεντρώσεις των τριγλυκεριδίων, των χυλομικρών και της apoB48 6 h μετά την κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιου σε λίπος και χοληστερόλη εκ υπερχολεστερολαιμικών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Οι Hodson et al (2001) δεν παρατήρησαν αλλαγή στα τριγλυκερίδια μετά την κατανάλωση 50 g λίπους παρουσία τσαγιού. Οι Denniss et al (2008) δεν παρατήρησαν επίδραση της χορήγησης λυκοπενίου στα τριγλυκερίδια του πλάσματος 3 h μετά την κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιου σε λίπος. Οι Chow et al (2005) συμπεραίνουν ότι η χορήγηση συμπληρώματος πολυφαινολών τσαγιού σε ανθρώπους οδήγησε σε τετραπλάσιες συγκεντρώσεις κατεχινών στο πλάσμα όταν αυτό εδόθη υπό νηστεία, σε σχέση με όταν εδόθη μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος και υδατάνθρακες. Οι ίδιοι συγγραφείς εξηγούν ότι το γεύμα δύναται να μειώνει την απορρόφηση των πολυφαινολών, δεδομένου ότι αυτές εμφανίζουν σταθερότητα σε όξινο pH (1,1-1,6), ενώ αποδομούνται εύκολα σε pH άνω του 6. Μετά την κατανάλωση του γεύματος το pH στο στομάχι μετατρέπεται από όξινο σε βασικό, κάτι που σε συνδυασμό με την καθυστέρηση της εκκένωσης του στομάχου δύναται να καθυστερεί την δυναμική επίδραση των πολυφαινολών επί της απορρόφησης των λιπιδίων, αλλά και επί της αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Στην παρούσα μελέτη η αύξηση των τριγλυκεριδίων με την πάροδο του χρόνου στην ομάδα του νερού, σε

συνδυασμό με τη μη μεταβολή τους στην ομάδα του τσαγιού θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα δυνητικής παρεμβολής του τσαγιού στην απορρόφηση και το μεταβολισμό των λιπιδίων.

Το τρίτο ενδιαφέρον εύρημα αυτής της πειραματικής ενότητας αφορά τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτή μετρήθηκε 1,5, 3 και 5 ώρες μετά το γεύμα με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων φαρμακοκινητικής του τσαγιού, εφόσον αποτελεί έμμεσο δείκτη βιοδιαθεσιμότητας. Επίσης, η μεταγευματική αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρουσιάζει ενδιαφέρον για την επίδραση διατροφικών παραγόντων, όπως το λίπος και οι υδατάνθρακες, στη βιοδραστικότητα του τσαγιού. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αξιολογήθηκε στην παρούσα μελέτη με τις μεθόδους FRAP και ORAC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην ομάδα του τσαγιού η αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP αυξήθηκε σημαντικά 1,5 ώρα μετά την παρέμβαση και διατηρήθηκε σε αυτά τα επίπεδα, ενώ στην ομάδα του νερού δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με πριν την παρέμβαση. Εντούτοις, η αντιοξειδωτική ικανότητα ORAC δεν παρουσίασε διαφορές από το baseline σε καμία ομάδα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα βασίζεται σε πολύπλοκους ομοιοστατικούς μηχανισμούς και καθορίζεται από τη συνεργηστική δράση πολλών αντιοξειδωτικών ουσιών (Jacob, 1995; Blauz, 2008). Συνεπώς, συνίσταται η εφαρμογή τουλάχιστον δύο διαφορετικών μεθόδων μέτρησης, οι οποίες να παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα ή ανταγωνιστικότητα. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενης σε διαφορετικά αντιοξειδωτικά που δύναται να ανιχνεύει καλύτερα η μία μέθοδος σε σχέση με την άλλη, λόγω διαφορετικών μηχανισμών (Cao & Prior, 1998; Huang, Ou & Prior, 2005; Niki, 2010). Για παράδειγμα, η μέθοδος ORAC είναι μια ανασταλτική μέθοδος που βασίζεται στη μείωση της φθοράς ασταθούς ένωσης που φθορίζει από τα αντιοξειδωτικά, ενώ η FRAP στηρίζεται στην αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή παρουσία αντιοξειδωτικών (Niki, 2010). Αν και κάποιες μελέτες έχουν δείξει μια μικρή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων (Cao & Prior, 1998), άλλες αναφέρουν ότι δεν υπάρχουν δεδομένα απόλυτης συσχέτισης των δύο μεθόδων (Niki, 2010). Η FRAP μετράει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να ανάγουν το σίδηρο και όχι τη δυνατότητα τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Γι' αυτό δεν ανιχνεύει αντιοξειδωτικά, όπως κάποιες πρωτεΐνες και ένζυμα, που δεν αντιδρούν με το σίδηρο (Cao & Prior, 1998). Η μέθοδος ORAC δεν προσδιορίζει ακριβώς το ποσοστό και την ποσότητα των δεσμευόμενων ελεύθερων ριζών εκ του αντιοξειδωτικού, ενώ η τιμή

της δε δείχνει την ικανότητα αναστολής της οξειδωσης, όπως η μέθοδος της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Niki, 2010). Αυτή η διαφορετικότητα των δύο μεθόδων φαίνεται να εξηγεί τα διαφορετικά αποτελέσματα που έδειξαν στην παρούσα μελέτη.

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα αποτελεί ένα σημαντικό βιοδείκτη που χρησιμοποιείται αφενός μεν για την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του τσαγιού, αφετέρου δε για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών του. Δεδομένης της δυσκολίας προσδιορισμού των επιμέρους αντιοξειδωτικών συστατικών του πλάσματος και των ιστών πολλές μελέτες αξιολογούν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού μετά από την άμεση ή τη χρόνια κατανάλωση τσαγιού από ζώα και ανθρώπους (Yokozawa, Nakagawa & Kitani, 2002; Vos & Schrijver, 2003; Erba et al, 2005; Camargo et al, 2006), με τις περισσότερες να δείχνουν θετική επίδραση. Οι Rievelde & Wiseman (2003) σε μια εργασία ανασκόπησης κατέγραψαν 15 κλινικές μελέτες που δείχνουν σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος περίπου 1 h μετά την κατανάλωση τσαγιού, κυρίως πράσινου ή μαύρου, χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους (FRAP, TRAP, ORAC, TEAC). Οι μελέτες αυτές αφορούν την κατανάλωση 1-6 φλιτζανιών τσαγιού, παρουσιάζουν μέγιστες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας στα 60, 90 και 120 min μετά τη λήψη του τσαγιού και εμφανίζουν αυξήσεις από το baseline κυμαινόμενες μέχρι και 40%. Οι Erba et al (2005) έδειξαν ότι η επί 42 ημέρες χορήγηση τσαγιού αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα, μείωσε τα λιπιδικά υπεροξειδία και ανέστειλε τους δείκτες οξειδωσης του DNA. Αντίθετα, οι Camargo et al (2006) δεν παρατήρησαν αλλαγές στην αντιοξειδωτική ικανότητα (TRAP) και στα υδροϋπεροξειδία 1 μήνα μετά την κατανάλωση τσαγιού, συμπεραίνοντας ότι ίσως απαιτείται κατανάλωση μεγάλης ποσότητας τσαγιού (8-10 φλιτζάνια) για να εμφανιστεί βιοδραστικότητα. Παραταύτα, λίγες μελέτες έχουν εκτιμήσει την αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος μετά την κατανάλωση ενός γεύματος παρουσία αντιοξειδωτικών συστατικών. Οι Young et al (2002) έδειξαν ότι το πράσινο τσάι αύξησε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα 2-4 h μεταγευματικά, ενώ δεν επηρέασε αντιοξειδωτικές βιταμίνες και λιπίδια. Το κόκκινο κρασί μείωσε τα μεταγευματικά λιπιδικά υδροϋπεροξειδία 4 h μετά το γεύμα (Ursini et al, 1997). Ενίσχυση του γεύματος με λυκοπένιο αύξησε τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος 3 h μετά το γεύμα (Denniss et al, 2008). Το ίδιο συνέβη και με την μεταγευματική κατανάλωση πολυφαινολών σταφυλιών (Natella et al. 2002; Ceriella et al. 2001).

Το τέταρτο ενδιαφέρον συμπέρασμα της μελέτης αφορά τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Τα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό δε μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά την κατανάλωση του γεύματος σε όλες τις ομάδες. Αυτό ενισχύει την πιθανότητα η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρατηρήθηκε να οφείλεται, τουλάχιστον σε ένα βαθμό, στα αντιοξειδωτικά του τσαγιού και του γεύματος. Το ουρικό οξύ θεωρείται ένα εκ των σημαντικότερων υδρόφιλων, ενδογενών αντιοξειδωτικών του πλάσματος συνεισφέροντας κατά 58% στην ολική αντιοξειδωτική του ικανότητα (Niki, 2010). Οι Rieveld & Wiseman (2003) παρατήρησαν ότι μετά την κατανάλωση τσαγιού αυξάνονταν η αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά οι συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος έμεναν σταθερές, συσχετίζοντας την αύξηση με την παρουσία των κατεχινών. Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι σε πολλές περιπτώσεις η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας οφείλεται κυρίως στην εκ διατροφικών παραγόντων προκύπτουσα αύξηση του ουρικού και του ασκορβικού οξέος, παρά στα αντιοξειδωτικά της διατροφής (Henning et al, 2005; Lotito & Frei, 2006). Είναι ερευνητικά τεκμηριωμένο ότι οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται εκτενώς και φτάνουν στο αίμα σε μικρές συγκεντρώσεις (Lambert, Sang & Yang, 2007; Niki et al, 2010). Συνεπώς, αυτές οι μικρές συγκεντρώσεις από μόνες ίσως δεν εξηγούν τις μεγάλες αυξήσεις στην αντιοξειδωτική ικανότητα που εμφανίζονται σε κάποιες μελέτες. Οι Lotito & Frei (2006) υποστηρίζουν ότι οι μεθυλξανθίνες και η καφεΐνη του τσαγιού έχουν καλή βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολίζονται ταχύτατα προς παράγωγα του ουρικού οξέος (1-μεθυλξανθίνη, μεθυλουρικό οξύ κ.α.), συμβάλλοντας στην αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος μετά την κατανάλωση τσαγιού. Επίσης, αναφέρουν ότι ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος και υδατάνθρακες δύναται να αυξήσει την αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος μέσω μεταβολών στις συγκεντρώσεις του ATP και του ουρικού οξέος. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η φρουκτόζη αυξάνει το ουρικό οξύ, μέσω της αποδόμησης του νεκλεοτιδίου της αδενίνης και του μεταβολισμού της φρουκτοκινάσης, συντελώντας στην αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα. Οι Henning et al (2005) παρατήρησαν ότι η μεταγευματική χορήγηση κατεχινών μείωσε την αντιοξειδωτική ικανότητα και το ουρικό οξύ στο πλάσμα, υποστηρίζοντας ότι η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας οφείλεται στην εκ της μικρής περιεκτικότητας υδατανθράκων γεύματος οφειλόμενη μείωση του ουρικού οξέος. Επίσης, άλλες μελέτες σχετίζουν την αύξηση της αντιοξειδωτικής



ικανότητας με την παρουσία αντιοξειδωτικών στους υδατάνθρακες του γεύματος (Seidel et al, 2006).

Το πέμπτο σημαντικό εύρημα αφορά το σίδηρο. Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια ο σίδηρος αποτελεί διατροφικό παράγοντα που δύναται να αλληλεπιδράσει με τα συστατικά του τσαγιού μειώνοντας την έκταση της απορρόφησης τους. Στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP δεν αυξήθηκε στην ομάδα του τσαγιού με σίδηρο, όπως στην ομάδα του τσαγιού. Αυτό υποδεικνύει πιθανή αλληλεπίδραση του σιδήρου με το τσάι. Ωστόσο, αν και στην ομάδα ελέγχου υπήρξε αύξηση των τριγλυκεριδίων, αυτή δεν παρατηρήθηκε στις ομάδες του τσαγιού και του τσαγιού με σίδηρο. Αυτό προτάσσει ως πιθανότητα την επίδραση του τσαγιού με ή χωρίς σίδηρο στην απορρόφηση των λιπιδίων. Η μικρή ποσότητα σιδήρου που ενσωματώθηκε στο ψωμί σε συνδυασμό με τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ όλων των διατροφικών συστατικών του γεύματος και τη χαμηλή στατιστική ισχύ, δε μας επιτρέπουν να προβούμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του σιδήρου σε όλους τους μελετώμενους βιοδείκτες.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η CRP δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες, αν και παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης στην ομάδα του νερού και μείωσης στην ομάδα του τσαγιού. Οι παράγοντες φλεγμονής φαίνεται ότι επηρεάζονται από την χρόνια χορήγηση αντιοξειδωτικών συστατικών, αν και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Ελάχιστες μελέτες, όπως αυτή των Nappo et al (2002), υποστηρίζουν ότι ένα πλούσιο σε λίπος γεύμα αυξάνει σημαντικά τους δείκτες φλεγμονής. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε σε διαβητικούς ότι ένα γεύμα με μπέικον και αυγά αύξησε τα μόρια προσκόλλησης και τις κυτταροκίνες εντός 4 ωρών και ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινών είχε μια μικρή ευεργετική επίδραση. Οι Bellido et al (2004) παρατήρησαν μεταγευματική αύξηση του φλεγμονώδους παράγοντα NF-kB η οποία αναιρέθηκε παρουσία αντιοξειδωτικών. Τέλος, ο Hamer, (2007) ανασκοπώντας την επίδραση του τσαγιού στη φλεγμονώδη διαδικασία σημειώνει ότι εκ των λίγων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες έχουν δείξει επίδραση του τσαγιού στη CRP *in vivo*, θεωρώντας ότι μάλλον απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τσαγιού για να φανεί αποτέλεσμα.

Τα συμπεράσματα αυτής της πειραματικής ενότητας είναι ότι η κατανάλωση τσαγιού παρουσία ενός γεύματος πλούσιου σε λίπος από ασθενείς με στεφανιαία νόσο είναι πιθανό να αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και να

επηρεάζει τη μεταγευματική αύξηση ορισμένων βιοδεικτών καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως τα τριγλυκερίδια του ορού.

## 12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Το τσάι αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο ρόφημα που έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αντιοξειδωτικές του δράσεις *in vitro*. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα τσαγιού εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία συνδέεται με αυξημένη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά (*Πείραμα 1*). Η βιοδραστικότητα του τσαγιού παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και εστιάζεται αφενός μεν στην ενδεχόμενη αντιοξειδωτική του δράση εντός του οργανισμού, αφετέρου δε στη δυναμική εμπλοκή του σε γονίδια και μεταβολικά μονοπάτια που καθορίζουν βιοδείκτες σχετιζόμενους με εκφυλιστικές ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών που καθορίζουν τη βιοδραστικότητα του τσαγιού, σε συνδυασμό με την αποσαφήνιση των διατροφικών παραγόντων που την επηρεάζουν θα συνέβαλε στην προώθηση της κατανάλωσης αυτού του ροφήματος ως βασική πηγή βιοδραστικών συστατικών που προάγουν την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης του λίπους και του σιδήρου στη βιοδραστικότητα του τσαγιού. Η βιοδραστικότητα του τσαγιού αξιολογήθηκε τόσο σε επίπεδο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *in vivo*, όσο και σε επίπεδο επίδρασης επί της έκφρασης γονιδίων και επί της μεταβολής συγκεκριμένων βιοδεικτών που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν τα παρακάτω πειράματα:

*Πείραμα 1:* Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά διαφόρων αφεψημάτων τσαγιού *in vitro*.

*Πείραμα 2:* Κλινική μελέτη για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του πλάσματος σε φαινολικά συστατικά μετά την κατανάλωση τσαγιού ή μίγματος τσαγιού και σιδήρου.

*Πείραμα 3:* Μελέτη των αντιοξειδωτικής ικανότητας που προκύπτει από την κατανάλωση τσαγιού στο παχύ έντερο ζώων, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σιδήρου που προέκυψαν από *in vitro* πέψη.

*Πείραμα 4:* Μελέτη σε ζώα της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και σίδηρο στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων των ιστών.

*Πείραμα 5:* Κλινική μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού και γεύματος που περιέχει λίπος και σίδηρο σε βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

Τα δύο κύρια συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη αυτή είναι τα εξής: 1) Η βιοδραστικότητα του τσαγιού δεν εντοπίζεται μόνο στην αντιοξειδωτική του δράση, αλλά και σε άλλες δράσεις. 2) Διατροφικοί παράγοντες, όπως το λίπος και ο σίδηρος, επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα του τσαγιού.

Τα επιμέρους συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα κάτωθι:

1) Η κατανάλωση του τσαγιού είναι δυνατό να αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, συγκεκριμένα του πλάσματος και των ιστών. Η χορήγηση εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού σε ποντίκια αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα στην καρδιά, την αορτή και το δωδεκαδάκτυλο, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (*Πείραμα 4*) και του παχέος εντέρου (*Πείραμα 3*). Επιπλέον εδείχθη ότι η κατανάλωση τσαγιού προστατεύει το παχύ έντερο από οξειδώσεις που μπορούν να συμβαίνουν κατά την πέψη από το μη απορροφούμενο κλάσμα (*Πείραμα 3*). Αυτό υποδηλώνει ότι συστατικά του τσαγιού μετά την απορρόφηση μεταβολίζονται και μεταφέρονται στους διάφορους ιστούς του οργανισμού, όπου ασκούν αντιοξειδωτικές δράσεις. Στην κλινική μελέτη παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση τσαγιού μαζί με ψωμί και βούτυρο αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος 1,5 ώρα μετά την παρέμβαση (*Πείραμα 5*). Η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος πιθανόν σχετίζεται με την παρουσία βιοδιαθέσιμων πολυφαινολών στο τσάι (*Πείραμα 2*). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού, το οποίο καθορίζεται από πληθώρα αλληλεπιδράσεων και συνεργηστικών διαδικασιών, καθιστά την αντιοξειδωτική ικανότητα ως μία απλή ένδειξη βιοδραστικότητας του τσαγιού, η οποία είναι χρήσιμο να επεκταθεί και με αξιολόγηση άλλων βιοδεικτών.

2) Η κατανάλωση του τσαγιού μαζί με σίδηρο είναι πιθανό να σχετίζεται με μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και συνεπώς μειωμένη βιοδραστικότητα των πολυφαινολών του. Παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός και συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα των εθελοντριών που έλαβαν τσάι παρουσία σίδηρο, σε σχέση με το σκέτο τσάι (*Πείραμα 2*). Επιπλέον, η ενίσχυση της διαίτας των ζώων με σίδηρο, είτε αυτή ήταν κανονική είτε λιπαρή, συσχετίστηκε με μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο ήπαρ και στην καρδιά σε σχέση με τις άλλες ομάδες (*Πείραμα 4*). Επιπρόσθετα,

παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος 1,5 ώρα μετά την κατανάλωση τσαγιού, αλλά όχι μετά την κατανάλωση τσαγιού με σίδηρο ή νερού από ασθενείς με στεφανιαία νόσο (*Πείραμα 5*). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την αρχική μας υπόθεση.

3) Εκτός από το σίδηρο, το λίπος αποτελεί έναν ακόμη διατροφικό παράγοντα που είναι πιθανό να επηρεάζει τη βιοδραστικότητα του τσαγιού αλληλεπιδρώντας με τα συστατικά του. Παρατηρήθηκε ότι όταν τα ζώα ελάμβαναν διατροφή ενισχυμένη με λίπος και χοληστερόλη η παράλληλη χορήγηση τσαγιού δεν μετέβαλε την αντιοξειδωτική ικανότητα σε κανένα όργανο, ενώ όταν ελάμβαναν την τυπική δίαιτα η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε σε κάποιους ιστούς (*Πείραμα 4*). Ωστόσο, στην κλινική μελέτη (*Πείραμα 5*) η κατανάλωση τσαγιού παρουσία 20 g λίπους αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος 1,5 ώρα μετά. Αυτό επισημαίνει ότι διατροφικοί παράγοντες είναι πιθανόν να επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα του τσαγιού.

4) Η επί μακρόν χορήγηση σε ποντίκια εκχυλίσματος τσαγιού σχετίστηκε με μείωση της έκφρασης των γονιδίων *mark-1* και *NF-kB* στην καρδιά (*Πείραμα 4*). Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την κινητοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων, την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και την επίταση των διαδικασιών εμφάνισης αθηρωματικής πλάκας. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύει την άποψη ότι η μελέτη της βιοδραστικότητας του τσαγιού πρέπει να εστιαστεί, εκτός από το πεδίο αντιοξειδωτικής δράσης, και στο πεδίο εμπλοκής των συστατικών του εντός των βιοχημικών μονοπατιών του κυττάρου και των πολύπλοκων διαδικασιών μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων. Αν και η αλλαγή στην έκφραση που παρατηρήθηκε στα δύο γονίδια εμφανίστηκε στην ομάδα των ζώων που ελάμβαναν δίαιτα ενισχυμένη με τσάι και σίδηρο, οι μηχανισμοί δυνητικής συμμετοχής του σιδήρου στην έκφραση των γονιδίων δεν είναι εύκολο να αποσαφηνιστεί και να εξηγηθεί.

5) Η μεταγευματική κατανάλωση πράσινου τσαγιού από ασθενείς με εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο επέδρασε σε ορισμένους βιοδείκτες που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, πλέον αυτών που συνδέονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα όπως διατυπώνεται στο επιμέρους πρώτο συμπέρασμα. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς που ελάμβαναν νερό μαζί με το γεύμα διαπιστώθηκε σημαντική μεταγευματική αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων, κάτι που δε συνέβη στους ασθενείς που ελάμβαναν τσάι. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ενδεχόμενη

συμβολή της κατανάλωσης τσαγιού στον έλεγχο της μεταγευματικής λιπαιμίας. Αυτή η συμβολή εμφανίζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο στον τομέα της δευτερογενούς πρόληψης, μέσω της σταθεροποίησης συγκεκριμένων μεταγευματικών βιοδεικτών.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προκύπτουν ερωτήματα που υποδεικνύουν περαιτέρω έρευνα. Ένα βασικό ερώτημα που προκύπτει αφορά το βαθμό που η απορρόφηση, η βιοδιαθεσιμότητα και ο μεταβολισμός των συστατικών του τσαγιού μπορούν να καθορίσουν τη βιοδραστικότητα του τσαγιού. Ο εκτενής βιομετασχηματισμός των βιοδραστικών συστατικών του τσαγιού εντός του οργανισμού καθιστά αναγκαία τη διεξοδική μελέτη της δομής, της μορφής και της δράσης των μεταβολιτών του. Τα λίγα έως τώρα δεδομένα σχετικά με τον ρόλο των πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους στα γονίδια και τα μεταβολικά μονοπάτια, καθιστούν απαραίτητη τη διεξαγωγή περισσότερων *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων με στόχο την αποσαφήνιση της επίδρασης του τσαγιού στις πολύπλοκες μεταβολικές, βιοχημικές διαδικασίες των κυττάρων διαφόρων οργάνων. Η αξιολόγηση της επίδρασης του τσαγιού σε συγκεκριμένους βιοδείκτες ασθενειών μέσω κλινικών μελετών και η διεξαγωγή μεγάλων επιδημιολογικών μελετών για τη συσχέτιση της κατανάλωσης τσαγιού με συγκεκριμένες ασθένειες αποτελούν βασικά και αναγκαία βήματα για την απάντηση πολλών εκκρεμούντων ερωτημάτων σχετικά με τη βιοδραστικότητα του τσαγιού. Οι αλληλεπιδράσεις των συστατικών του τσαγιού με διατροφικούς παράγοντες, όπως ο σίδηρος και το λίπος, αποτελούν πολύπλοκο ερευνητικό πεδίο που απαιτεί περαιτέρω έρευνα για την αποσαφηνιστεί. Η αποσαφήνιση αυτών των αλληλεπιδράσεων θα ξεκαθαρίσει τις απαραίτητες συνθήκες για την επίτευξη της μέγιστης βιοδραστικότητας του τσαγιού και αφενός μεν θα εντείνει τη χρήση των συστατικών του ως ενισχυτικούς παράγοντες νεοφανών τροφίμων, αφετέρου δε θα ενθαρρύνει τους επιστήμονες υγείας να συστήνουν την κατανάλωση τσαγιού ως ρόφημα που συμβάλει στην διατήρηση και τη βελτίωση της υγείας.

Η παρούσα μελέτη απέδωσε αποτελέσματα που υποστηρίζουν την αρχική υπόθεση, δηλαδή ότι το τσάι εμφανίζει βιοδραστικότητα *in vivo*, η οποία είναι πιθανόν να επηρεάζεται από διατροφικούς παράγοντες όπως το λίπος και ο σίδηρος. Περαιτέρω έρευνα που θα διασαφηνίσει θέματα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα και το

μεταβολισμό των πολυφαινολών του τσαγιού είναι απαραίτητη για την πλήρη κατανόηση της βιοδραστικότητας του ροφήματος αυτού.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Ahmad, N. & Mukhtar, H. (1999). Green tea polyphenols and cancer: biological mechanisms and practical implications. *Nutrition Reviews*, 57(3), 78-83.
- Ahn, H-Y., Hadizadeh, K. R., Seul, K., Yun, Y-P., Vetter, H., Sachinidis, A. (1999). Epigallocatechin--gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1093-1104.
- Al-Awwadi, N. A., Araiz, C., Bornet, A., Delbosc, S., Cristol, J. P., Linck, N., Azay, J., Teissedre, P. L., Cros, G. (2005). Extracts enriched in different polyphenolic families normalize inversed cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 151-57.
- Alexandropoulou, I., Komaitis, M. & Kapsokefalou, M. (2005). Effect of iron, ascorbate, meat and casein on the antioxidant capacity of green tea under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 94, 359-365.
- Almajano, M. P., Carbo, R., Jimenez, A. L., Gordon, M. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.
- Argyri, K., Komaitis, M. & Kapsokefalou M. (1996). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96, 281-289.
- Argyri, K., Proestos, C., Komaitis, M., Kapsokefalou, M. (2005). Phenolic compounds in red wine digested in vitro in the presence of iron and other dietary factors. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(3), 213-222.
- Argyri, K., Birba, A., Miller, D. D., Komaitis, M., Kapsokefalou, M. (2008). Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: new developments. *Food Chemistry*, 113(2), 602-607.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., Gutteridge, J. M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochemical Journal*, 258(2), 617-620.
- Auger, C., Al-Awwadi, N., Bornet, A., Rouanet, J-M., Casc, F., Cros, G., Teissedre, P-L. (2004). Catechins and procyanidins in mediterranean diets. *Food Research International*, 37, 233-245.
- Babbs, C. F. (1990). Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 8, 191-200.



- Babu, P. V. A., Sabitha, K. E. & Shyamaladevi, C. S. (2006). Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 162, 114-120.
- Bancirova, M. (2010). Comparison of the antioxidant capacity and antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43, 1379-1382.
- Bauer, M., Hamm, A. & Pankratz, M. J. (2004). Linking nutrition to genomics. *Biological Chemistry*, 385, 593–596.
- Bellido, C. B., Lopez-Miranda, J., Blanco-Colio, L. M., Perez-Martinez P., Muriana, F. J., Martin-Ventura, J. L., Marin, C., Gomez, P., Fuentes, F., Egido, J., Perez-Gimenez F. (2004). Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor B in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), 1487-1491.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Blanco-Colio, L., Valderrama, M., Alvarez-Sala, L. A., Bustow, C., Ortego, M., Hermadez–Presa A. (2000). Red wine intake prevents Nuclear Factor-kB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*, 102, 1020-1026.
- Blauz, A., Pilaszek, T., Grzelak, A., Dragan, A, Bartosz, G. (2008). Interaction between antioxidants in assays of total antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2365-2368.
- Bourassa, M. J. & Tardif, J-C. (2006). Antioxidants and cardiovascular diseases. Springer, U.S.A. p. 87-97.
- Bryans, J. A., Judd, P. A. & Ellis, P. R. (2007). The effect of consumption instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(5), 471-477.
- Bursill, C. A., Abbey, M. & Roach, P. D. (2007). A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*, 193, 86-93.
- Cabrera, A., Artacho, R. & Gimenez., R. (2006). Beneficial Effects of Green Tea-A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79–99.
- Camargo, A. E., Dagher, D. A. & Barbosa, D. S. (2006). Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. *Nutrition Research*, 26, 626-631.
- Cao, G., Soflic, E. & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.

- Cao, G. & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44(6), 1309-1315.
- Carbonaro, M., Grant, G. & Pusztai, A. (2001). Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *European Journal of Nutrition*, 40(2), 84-90.
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Motz, S., Lizzio, S., Catone, B., Assaloni, R., Tonutti, L., Taboga, C. (2001). Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation. A pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 31, 322-328.
- Chen, L., Lee, M. J., Li, H., Yang, C. S. (1997). Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(9), 1045-1050.
- Chen, C., Yu, R., Owuor, R., Kong, A. N. (2000). Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Archives of Pharmacal Research*, 23(6), 605-612.
- Chow, H. H., Cai, Y. & Alberts, D. S. (2001). Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 10, 53-58.
- Chow, H. H., Hakim, I. A., Vining, D. R., Crowell, J. A., Ranger-Moor, J., Chew, W. M., Celaya, C. A., Rondey, S. R., Hara, Y., Alberts, D. S. (2005). Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research*, 11, 4627-4633.
- Chyu, K. Y., Babbidge, S. M., Zhao, X., Dandillaya, R., Rietveld, A. G., Yano, J., Dimayuga, P., Cercek, B., Shah, P. K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 109, 2448-2453.
- Coimbra, S., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Rebelo, I., Rocha, S., Santos-Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25(5), 790-796.
- Coimbra, S., Santos-Silva, A., Rocha-Pereira, P., Rocha, S., Castro, E. (2006). Green tea consumption improves plasma lipid profiles in adults. *Nutrition Research*, 26, 604-607.
- Cornejo, P., Varela, P., Videla, L. A., Fernandez, V. (2005). Chronic iron overload enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat liver. *Nitric oxide*, 13(1), 54-61.

- Crespy, V. & Williamson, G. (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *Journal of Nutrition*, 134, 3431-3440.
- Das, S., Takuria, N. & Kanodia, L. (2008). Biological actions and medical applications of tea (*Camelia Sinensis*). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2, 1215-1225.
- De Boer, V. C., Dihal, A. A., van der Woude, H., Arts, I. C., Wolfram, S., Alink, G. M., Rietjens, I. M., Keijer, J., Hollman, P. C. (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *Journal of Nutrition*, 135(7), 1617-1618.
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, S., Dimo, T., Cristol, J. P., Cros, J., Azay, J. (2005). Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis*, 179(1), 43-49.
- Dell'Agli, M., Busciala, A., Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63, 593-602.
- Denniss, S., Hafner, T., Kroetsch, S., Davidson, S., Rush, G., Hughson, R. (2008). Effect of short term lycopene supplementation and postprandial dyslipidemia on plasma antioxidants and biomarkers of endothelial health in young, healthy individuals. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 213-222.
- De Vos, S. & De Schrijver R. (2003). Lipid metabolism, intestinal fermentation and mineral absorption in rats consuming black tea. *Nutrition Research*, 23, 527-537.
- Donovan, J. L., Devane, C. L., Chavin, K. D., Oates, J. C., Njoku, C., Patrick, K. S., Fiorini, R. N., Markowitz, J. S. (2005). Oral administration of decaffeinated green tea extract did not alter urinary 8-epi-prostaglandin F2a, a biomarker of in vivo lipid peroxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, 1365-1369.
- Dreger, H., Lorenz, M., Kehrer, A., Bauman, G., Stangl, K., Stangl, V. (2008). Characteristics of catechin- and thiaflavin- mediated cardioprotection. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 427-433.
- Duffy, S. J., Vita, J. A., Holbrook, M., Swerdloff, P. L., Keaney, J. L. (2001). Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 21, 1084-1089.
- Duffy, S. J., Keaney, J. L., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B., Vita, J. A., (2001b). Short- and long- term tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104, 151-156.
- Dufresne, C. J. & Farnworth, E. R. (2001). A review at latest findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 404-421.

- Dulak J. (2005). Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *Journal of physiology and pharmacology*, 1, 51-69.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, A. M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13(1), 340-357.
- Egelman, R. W., Noorbibi, K. D. & Good, R. A. (1994). Calorie intake during mammary tumor development influence cancer risk: lasting inhibition of C3H/HeOu mammary tumorigenesis by peripubertal calorie restriction. *Cancer Research*, 54, 5724-5730.
- El Bedoui, J., Oak, M. H., Anglard, P., Schini-Kerth, V. B. (2005). Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovascular Research*, 67, 317-325.
- Erba, D., Grass, L., Josephy, D., Goldberg, D. M., Diamandis, E. P. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35, 119-124.
- Erba, D., Riso, P., Bordoni, A., Foti, P., Biagi, P. L., Testolin, G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 144-149.
- Esposito, K., Nappo, F., Giugliano, F., Marfella, R., Giugliano, D. (2003). Effect of dietary antioxidants on postprandial endothelial dysfunction induced by a high-fat meal in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 139-143.
- Fang, Y-Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475, 89-111.
- Frayn, K. N. (1998). Dietary factors and postprandial lipaemia. *British Journal of Nutrition*, 80, 409-410.
- Frei, B., Hidgon, J. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo. Evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*, 133, 3275S-3284S.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., Tomoko, K., Tada, Y., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K. (1997). Cancer inhibition by green tea. *Mutation Research*, 402, 307-310.
- Fujita H. & Yamagani, T. (2008). Extract of black tea (Pu-Ehr) inhibits postprandial rise in serum cholesterol in mice, and with long term use reduces serum cholesterol and Low Density Lipoprotein levels and renal fat weight in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 1275-1281.

Fuhrman, B. & Arivam, M. (2001). Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 12, 41-48.

Fukino, Y., Shimbo, M., Aoki, N., Okubo, T., Iso, H. (2005). Randomized controlled trial for effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *Journal of Nutrition Science & Vitaminology*, 51, 335-342.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(11), 1106-1114.

Glahn, R. P., Wien, E. M., Van Campen, D. R., Miller, D. D. (1996). Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels *in vivo* studies: use of a novel *in vitro* method for rapid estimation of iron bioavailability. *Journal of Nutrition*, 126, 332-339.

Glei, M. & Gladys, O. (2002). Iron –overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. *Mutation Research*, 519, 151-161.

Hakim, I. A., Harris, R. B., Brown, S., Chow, H-H. S., Wiseman, S., Agarwal, S., Talbot, W. (2003). Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *Journal of Nutrition*, 133, 3303S-3309S.

Hamer, M. (2007). The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from *in vitro*, animal and human research. *Nutrition Research*, 27, 373-379.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advancements in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

He, Q., Lv, Y. & Yao, K. (2006). Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101, 1178-1182.

Heim, K. E., Tagliafero, A. R., Bobiyla, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.

Henning, S. M., Niu, Y., Lee, N. H., Thames, G. D., Minutti, R. R., Wang, H., Heber, D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1558-1564.

Henning, S. M., Niu, Y., Liu, Y., Lee, N. H., Hara, Y., Thames, G. D., Minutti, R. R., Carpenter, C. L., Wang, H., Heber, D. (2005). Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 610-616.

- Henning, S. M., Niu, Y., Liu, Y., Lee, N. H., Hara, Y., Thames, G. D., Minutti, R. R., Carpenter, C. L., Wang, H., Heber, D. (2005). Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 610-616.
- Henning, S. A., Aronson, W., Liu, Y., Conde, F., Lee, N. H., Seeram, N. P., Lee, R. P., Lu, J., Harris, D. M., Moro, A., Hong, J., Pak-Shan, L., Barnard, R. J., Ziaee, H. G., Csathy, G., Go, V. L., Wang, H., Herber, D. (2006). Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *Journal of Nutrition*, 136, 1839–1843.
- Hertog, M. G., Feskens, E. & Kromhout, D. (1997). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 349(9053), 699.
- Hirano-Ohmori, R., Takahashi, R., Momiyama, Y., Taniguchi, H., Yomemura, A., Tamai, S., Umegaki, K., Nakamura, H., Kondo, K., Ohsuzu, F. (2005). Green tea Consumption and serum malondialdehyde-modified LDL concentrations in healthy subjects. *American College of Nutrition*, 24(5), 342-346.
- Ho, C-T., Lin, J-K. & Shahidi, F. (2009). Tea and tea products. Chemistry and health-promoting properties. *CRC press, U.S.A. p. 1-20, 111-167.*
- Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Croft, K. D., Burke, V., Burke, V., Mori, T. A., Caccetta, R. A-A., Beilin, L. J. (2000). Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1103-1107.
- Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Mori, T. A., Burke, V., Baker, R. I., Beilin, L. J. (2001). Effects of regular ingestion of black tea on haemostasis and cell adhesion molecules in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55, 881-886.
- Hodgson, J., Puddey, I., Burke, V., Beilin, L., Mori, T., Chan, S. (2001b). Acute effects of ingestion of black tea on postprandial platelet aggregation in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 87, 141-145.
- Hodgson, J., Burke, V. & Puddey, I. (2005). Acute effects of tea on fasting and postprandial vascular function and blood pressure in humans. *Journal of Hypertension*, 23, 47-54.
- Hollman, P. C. & Katan, M.B. (1999). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 51, 305-310.
- Holst, B. & Williamson, G. (2004). Methods to study bioavailability of phytochemicals. Phytochemicals in health and disease. *Marcel Dekker, New York. p. 25–56.*
- Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Kovacevic-Ganic, K., Ivekovic, D., Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441-448.

- Hsu, S. (2005). Green tea and the skin. *Journal of American Academy of Dermatology*, 52, 1049-1059.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L. (2002). High-Throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50, 4437-4444.
- Huang, D., Ou, B. & Prior R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huma, N. & Salim, U. R. (2007). Food fortification strategy preventing iron deficiency anemia: a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 47(3), 259-265.
- Hurrell, R. F., Reddy, M. & Cook, J. D. (1999). Inhibition of non-haeme iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *British Journal of Nutrition*, 81, 289-295.
- Hurrell, R. F. (2002). Fortification: Overcoming technical and practical barriers. *Journal of Nutrition*, 132, 806S-8012S.
- Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, U., Kobayasi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K., Nozawa, A., Kakuda, T. (2005). Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fats in rats. *Journal of Nutrition*, 135, 155-159.
- Ishihara, N., Chu, D-C., Akachi, S., Juneja, L. R. (2001). Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts. *Livestock Production Science*, 68, 217-229.
- Ito, Y., Ichikawa, T., Morochosi, Y., Nakamura, T., Seagusa, Y., Ishihara, K. (2008). Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomedical Research*, 29(1), 27-32.
- Jacob, R. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15(5), 755-766.
- Jiang, F. & Dusting, G. J. (2003). Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current Vascular Pharmacology*, 1, 135-156.
- Jochman, N., Bauman, G. & Stangl, V. (2008). Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11, 758-765.
- Jovanovic, S. V., Simic, M. G., Steenken, S., Hara, Y. (1998). Iron complexes of gallocatechins. Antioxidant action or iron regulation? *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2, 2365-2370.

- Kaliora, A.C., Dedousis, G. V. Z. & Schmid, H. (2005). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187(1), 1-17.
- Kapsokefalou, M. & Miller, D. D. (1991). Effects of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during *in vitro* digestion. *Journal of Food Science*, 56, 352-355 & 358.
- Kapsokefalou, M., & Miller, D.D. (1994). Iron speciation in intestinal contents of rats fed meals composed of meat and nonmeat sources of protein and fat. *Food Chemistry*, 52(1), 47-56.
- Kapsokefalou, M., & Miller, D.D. (2001). Iron loading and intravenous ascorbic acid promote lipid peroxidation in whole serum in guinea pigs. *British Journal of Nutrition*, 85, 681-687.
- Kapsokefalou, M., Alexandropoulou, I., Komaitis, M., Politis, I. (2005). *In vitro* evaluation of iron solubility and dialyzability of various iron-fortified milk products targeted for infants and toddlers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 293-302.
- Kapsokefalou, M., Zhu, L., Miller, D., D. (2006). Adding iron to green tea modifies the antioxidant capacity in rats. *Nutrition Research*, 26(9), 480-485.
- Kapsokefalou, M., Kakouris, V., Makris, K., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. (2007). Oxidative activity and dialyzability of some iron compounds under conditions of a simulated gastrointestinal digestion in the presence of phytate. *Food Chemistry* 101(1), 419-427.
- Kaul, D., Sikand, K. & Shukla, A. R. (2004). Effect of green tea polyphenols on the genes with atherosclerotic potential. *Phytotherapy Research*, 18, 177-179.
- Kay, C. D. & Holub, B. J. (2003). The postprandial effects of dietary antioxidants in humans. *Current Atherosclerosis Reports*, 5, 452-458.
- Khan, N. & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519-533.
- Khokhar, S., & Owusu-Apenten, R. K. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chemistry*, 81, 133-140.
- Kim, S., Lee, M. J., Hong, J., Li, C., Smith, T. J., Yang, G. Y., Seril, D. N., Yang, C. S. (2000). Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutrition and Cancer*, 37(1), 41-48.
- Kolovou, G. D., Anagnostopoulou, K. K., Pavlidis, A. N., Salpea, K. D., Iraklianiou, S. A., Tsarpalis, K., Damaskos, D., Manolis, A., Cokkinos, D. V. (2005). Postprandial lipemia in men with metabolic syndrome, hypertensive and healthy subjects. *Lipids in Health and Disease*, 4(21), 1-8.



Koo, M. W. L., & Cho, C. H. (2004). Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology*, *500*, 177-185.

Koo, S. & Noh, S. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids. Potential mechanism for its lipid-lower effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *18*, 179-183.

Koutelidakis, A. E., Argyri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., & Kapsokefalou, M. (2009). Green tea, white tea and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs of mice. *Basic Nutritional Investigation*, *25*, 453-458.

Kowabata, T., Schelom, V., Haramaki, N., Phadke, R. S., Packer, L. (1996). Iron coordination by catechol derivative antioxidants. *Biochemical Pharmacology*, *51*, 1569-1577.

Koyanagi, S., Hiyamuta, K., Nii, K., Shirai, K., Ideishi, M., Mohri, M., Takeshita, A. (2000). A relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Annual Epidemiology*, *10*, 401-408.

Kruidenier, L., & Verspaget, W. (2002). Review article: Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radical or ridiculous? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *16*, 1997-2015.

Kurihara, H., Fukami, H., Asami, S., Toyoda, Y., Nakai, M., Shibata, H., Yao, X-S. (2004). Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *27*(7), 1093-1098.

Kurosawa, T., Itoh, F., Nozaki, A., Nakano, Y., Katsuda, S., Osakabe, N., Tsubone, H., Kondo, K., Itakura, H. (2005). Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, *179*, 237-246.

Kuzuhara, T., Sei, Y., Yamaguchi, K., Suganuma, M., Fujiki, H. (2006). DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 17446-17456.

Kyle, J. A., Morrisc, P. C., McNeill, G., Duthie, G. (2007). Effects of infusion time and addition of milk on content and absorption of polyphenols from black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4889-4894.

Lambert, J. D. & Yang, S. C. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *Journal of Nutrition*, *133*, 3262S-3267S.

- Lambert, J. D., Sang, S. & Yang, C. S. (2007). Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 819-825.
- Langey-Evans, S. (2000). Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing powder (FRAP) assay. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 51, 181-188.
- Leaderson, P. & Tagesson, C. (1996). Iron bound to the lipophilic iron chelator, 8-hydroxyquionoline, causes DNA strand breakage in cultured lung cells. *Carcinogenesis*, 17, 545-550.
- Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295, 141-154.
- Lee, W., Min, W-K., Chun, S., Lee, Y-W., Park, H., Lee, D. H., Lee, Y. K., Son, J. I. (2005). Long-term effects of green tea ingestion on atherosclerotic biological biomarkers in smokers. *Clinical Biochemistry*, 38(1), 84-87.
- Lee, S. K., Jankj, H. J., Lee, H. J., Jeon, B. H., Jun, C. D., Lee, S. K., Kim, E. C. (2006). p38 and ERK MAP kinase mediates iron chelator-induced apoptosis and-suppressed differentiation of immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Life Sciences*, 79, 1419-1427.
- Leenen, R., Roodenburg, A. J., Tijburgk L. B., Wiseman, S. A. (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 87-92.
- Lekakis, J., Rallidis, L. S., Andreadou, I. Vamvakou, G., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Skaltsounis, A-L., Kremastinos, D. T. (2005). Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 12(6), 596-600.
- Li, Y. M., Chan, H. Y., Huang, Y., Chen, Z. Y. (2007). Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 546-554.
- Liu, L., Zubik, L., Colins, F. W, Marko, M., Meydani, M. (2004). The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis*, 175, 39-49.
- Lottio, S. & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenona ? *Free Radical Biology & Medecine*, 41, 1727-1746.

- Lu, L. H., Lee, S. S. & Huang, H. C. (1998). Epigallocatechin suppression of proliferation of vascular smooth muscle cells: correlation with c-jun and JNK. *British Journal Pharmacology*, 124, 1227-1237.
- Luczaj, W. & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of tea. *Preventive Medicine*, 40, 910-918.
- Lund, E. K., Wharf, S. G., Fairweather-Tait, S. J., Johnson, I. T. (1999). Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(2), 250-255.
- Lund, E. K., Fairweather-Tait, S. J., Wharf, S. G., Johnson, I. T. (2001). Chronic exposure to high levels of dietary iron fortification increases lipid peroxidation in the mucosa of the rat large intestine. *Journal of Nutrition*, 131, 2928-2931.
- Lynch, S. R., & Stoltzfus, R. J. (2003). Iron and ascorbic acid: proposed fortification levels and recommended iron compounds. *Journal of Nutrition*, 133, 2978S-2984S.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 724-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230-242.
- Manach, C., Mazur, A. & Scalbert, A. (2005b). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 77-84.
- Mantala, I., Polaki, A. & Yanniotis, S. (2009). Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients. *Journal of Food Engineering*, 92(2), 137-145.
- Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M. Di Benedetto, R., Matarrese, P., Malorni, M., Scazzocchio, B., Giovannini, C. (2004). Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *Journal of Nutrition*, 134, 785-791.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577-586.
- Matsingou, T. C., Petrakis, N., Kapsokefalou, M., Salifoglou A. (2003). Antioxidant activity of organic extracts from aqueous infusions of sage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6696-6701.

- Mennen, L., Hirvonen, T., Arnault, N., Bertais, S., Galan, P., Hercberg, S. (2007). Consumption of black, green and herbal tea and iron status in French adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(10), 1174-1179.
- Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48(3), 578-599.
- Miller, D. D., & Berner, L. A. (1989). Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? *Biological Trace Element Research*, 19(1-2), 11-24.
- Miura, Y., Chiba, T., Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara Y., Tomita, I. (2000). Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 216-222.
- Miura, Y., Chiba, T., Tomita, I., Koizumi, H., Miura, S., Umegaki, K., Hara, Y., Ikeda, M., Tomita, T. (2001). Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Nutrition*, 131, 27-32.
- Miyamoto, S., Kuwata, G., Imai, M., Nagao, A., Terao, J. (2000). Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. *Lipids*, 35(12), 1411-1413.
- Modun, D., Music, I., Vucovik, J., Brizic, I., Katalinic, V., Obad, A., Palada, I., Dujic, J., Boban, M. (2008). The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis*, 197(1), 250-256.
- Mukamal, K. J., Maclure, M., Muller, J. E., Sherwood, J. B., Mittleman, M. A. (2002). Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*, 105(21), 2476-2481.
- Mukamal, K. J., McDermott, M. A., Vinson, J. A., Oyaman N., Manning, W. J., Mittleman, M. A. (2007). A 6-month randomized pilot study of black tea and cardiovascular risk factors. *American Heart Journal*, 154, 1-6.
- Mulder, T. P., Rietveld, A. G. & vanAmelsvoort J. M. (2005). Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *Journal of Clinical Nutrition*, 81, 256S-260S.
- Naassides, M., Mano, J. C. L., James, A. P., Pal, S. (2004). The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 177, 401-408.
- Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M., Imai, K. (2000). Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors*, 13, 49-54.

Nappo, F., Esposito, K., Cloffi, M., Glugliano, G., Molinari, A., Paolliso, G., Glugliano, D. (2002). Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic subjects. Role of fat and carbohydrate meals. *Journal of American College of Cardiology*, 39, 1145-50.

Natella, F., Belleli, F., Gentili, V., Ursini, F., Scaccini, C. (2005). Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *Journal Agricultural & Food Chemistry*, 50, 7720-7725.

Ndiaye, M., Chataigneau, T., Andriantsitohaina, R., Stoclet, J. C., Schimi-Kerth, V. B. (2003). Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 310, 371-377.

Ndiaye, M., Chataigneau, M., Lobysheva, I., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V. B. (2005). Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 455-457.

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*. Article in press.

Nordskog, B., Phan, C., Nutting, D., Tso, P. (2001). An examination of the factors affecting intestinal lymphatic transport of dietary lipids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(1-2), 21-44.

Oak, M-H., El Bedoui, J. & Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 1-8.

O'Keefe, H. J., Gheewala, M. & O'Keefe, O. J. (2008). Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *Journal of American College of Cardiology*, 51, 249-255.

Osawa, T. (1999). Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111, 133-139.

Pandya, N., Santani, D. & Jain, S. (2005). Role of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Drug Reviews*, 23, 247-254.

Paganga, G., & Rice-Evans, C. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401(1), 78-82.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils

consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819.

Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2006). Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(11), 1030-1038.

Peng Wong, S., Peng Leong, L., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activity of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4), 775-783.

Prior, R.L. & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.

Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

Proestos, C., Sereli D., & Komaitis M. (2003). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51(1), 44-52.

Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1439-1452.

Rauno, J., Lopez, J., de la Torre, R., Fernandez, J., Caballero, J., Covas, M., Jimenez, I., Perer-Martinez, P., Marin, C. (2007). Intake of polyphenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesteremic patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 341-346.

Rebrin, I., Zicker, S., Wedekind, K. J., Paetau-Robinson I., Packer, L., Sohal, R. S. (2005). Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 549-557.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 153-159.

Riemersma, R. A., Rice-Evans, C. A., Tyrrell, R. M., Clifford, M. N., Lean, M.E. (2005). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Quarterly Journal of Medicine*, 94, 277-282.

Rietveld, A. & Wiseman, S. (2003). Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *Journal of Nutrition*, 133, 3285S-3292S.

Rodrigo, R., & Bosco, C. (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142, 317-327.

- Ros, E. (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, *151*, 357-379.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horziv, D., Kovac, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, *110*, 852-858.
- Ryan, P. & Hynes, M. J. (2007). The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCG and ECG with iron(III). *Journal of Inorganic Biochemistry*, *101*, 585-593.
- Sabu, M. C., Smitha, K. & Kuttan, R. (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, *83*, 109-116.
- Saffari, Y., & Sadrzadeh, S. M. H. (2004). Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sciences*, *74*, 1513-1518.
- Samman, S., Sandstrom, B., Toft, M. B., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S. S., Hansen, M. (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*, 607-612.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science & Technology International*, *8*(3), 121-137.
- Sandberg, A. S., Brune, M., Carlsson, N. G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthen, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, *70*, 240-246.
- Sano, M., Takahashi, Y., Yoshino, K., Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Oguni, I., Konomoto, H. (1995). Effect of tea on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. *Biological Pharmacology*, *18*(7), 1006-1008.
- Sasazuki, S., Kodama, H., Yoshimashu, K., Liu, K., Washio, M., Tanaka, K., Togunaga, S., Kono, S., Arai, H., Doy, Y., Kawano, T., Nakagaki, O., Takada, K., Koyanagi, S., Hiyamuta, K., Nii, T., Shirai, K., Ideishi, M., Arakawa, K., Mohri, M., Takeshita, A. (2000). Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Annual Epidemiology*, *10*(6), 401-408.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*, 492-501.
- Saxena, R., Madhu, S. V., Shukla, R., Prabhu, K. M., Gambhir, J. K. (2005). Postprandial hypertriglyceridemia and oxidative stress in patients of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Clinica Chimica Acta*, *359*, 101-108.

- Sayama, K., Lin, S., Zheng, G., Oguni, I. (2000). Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice. *In vivo* 14(4), 481-484.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Remesy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedical Pharmacotherapy*, 56, 276-282.
- Schulthess, G. & Hauser H. (1995). A unique feature of lipid dynamics in small intestinal brush border membrane, *Molecular Membrane Biology*, 12, 105-112.
- Schulthess, G., Compassi, S., Boffelli, D., Werder, M., Weber, F., Hauser, H. (1996). A comparative study of sterol absorption in different small-intestinal brush border membrane models. *Journal of Lipid Research* 37, 2405-2419.
- Seidel, C., Boehm, V., Vogelsang, H., Wagner, A., Persin, C., Gleib, M., Pool-Zobel, B. L., Jahreis, G. (2007). Influence of prebiotics and antioxidants in bred on the immune system, antioxidative status and antioxidative capacity in male smokers and non-smokers. *British Journal of Nutrition*, 97, 349-356.
- Serafini, M., Ghiselli, A., & Ferro-Luzzi, A. (1996). In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50(1), 28-32.
- Serafini, M., João, A., Laranjinha, N., Leonor, M., Almeida, M., Maiani, G. (2000). Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11-12, 585-590.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., Ekstrom, A. M. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123(4), 985-991.
- Sesink, L., Termont, D. S, & Kleibeuker, J. H. (1999). Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer research*, 59, 5704-5709.
- Sesso, H. D., Gaziano, J. M., Buring, J. A., Hennekens, C. H. (1999). Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *American Journal of Epidemiology*, 149(2), 162-167.
- Shahidi, F. & Alexander, M. (1998). Green tea catechins as inhibitors of oxidation of meat lipids. *Journal of Food Lipids*, 5(2), 125-133.
- Shahzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 131, 1207-1210.
- Shankar, V., Kaur, H., Dahiya, K., Gupta, M. S. (2008). Comparison of fasting and postprandial lipid profile in patients of coronary heart disease. *Bombay Hospital Journal*, 50(3), 445-449.



- Shimizu, M., Shirakami, Y. & Moriwaki, H. (2008). Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG. *International Journal of Molecular Science*, 9, 1034-1049.
- Shimotiyodome, A., Haramizu, S., Inaba, M., Murase, T., Tokimitsu, I. (2005). Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice. *Medicine and Science in Sports & Exercise*, 37(11), 1884-1892.
- Shirai, N. & Suzuki, H. (2008). Effects of simultaneous intakes of fish oil and green tea extracts on plasma, glucose, insulin, C-peptide and adiponectin and on liver lipid concentrations in mice fed low- and high-fat diets. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 52, 241-249.
- Siegers, C. P., Bumann, D., Baretton, G., Younes, M. (1988). Dietary iron enhances the tumor rate in dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Letters*, 41, 251-256.
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *Journal of Nutrition*, 135, 969-972.
- Silberg, M., Gil-Izquierdo, Combaret, L., Remesy, C., Scalbert, A., Morand, C. (2006). Flavonone metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 529-535.
- Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, S., Ivancheva, S., Sokmen, A., Serkedjieva, J. (2005). In vitro antioxidant activity of polyphenols extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum*. *Life Sciences*, 76(25), 2981-2993.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213.
- Spanos, G. A. & Wrolstad, R. E. (1990). Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenol composition of pear juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38, 817-824.
- Spigno, G. & De Faveri, D. M. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93, 210-217.
- Stahl, C. H., Han, Y. M., Roneker, K. R., House, W. A., Lei, X. G. (1999). Phytase improves iron bioavailability for hemoglobin synthesis in young pigs. *Journal of Animal Science*, 77(8), 2135-2142.
- Steptoe, A., Gibson, E. L., Vuononvirta, R., Hamer, M., Wardle, J., Rycroft J. A., Martin, J. F., Erusalimsky, J. D. (2007). The effects of chronic tea intake on platelet activation and inflammation: a double-blind placebo controlled trial. *Atherosclerosis*, 193, 277-282.
- Stoclet, J. C., Chataigneu, T. & Ndiaye, M. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500, 299-313.

- Sun, J., Huang, J. & Li, W. (2007). Effects of wheat flour fortified with different iron fortificants on iron status and anemia prevalence in iron deficient anemic students in Northern China. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(1), 116-121.
- Sung, H., Min, W. K., Lee, W., Chun, S., Park, H., Lee, Y. W., Jank, S., Lee, D. H. (2005). The effect of green tea ingestion over four weeks on atherosclerotic markers. *Clinical Biochemistry*, 42(4), 292-297.
- Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen Ba, G., Mathe, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical Pharmacotherapy*, 56, 200-207.
- Toyoda-Ono, Y., Yoshimura, M., Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y., Ikeda, I. (2007). Suppression of postprandial hypertriglyceridemia in rats and mice by oolong tea polymerized polyphenols. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 71(4), 971-976.
- Tsai, W. C., Li, Y. H., Lin, C. C., Chao, T. H., Chen, J. H. (2004). Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clinical Science*, 106, 315-319.
- Tsai, T-H., Tsai, T-H., Chien, Y-C., Lee, C-W., Tsai, P-J. (2008). In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*, 110, 859-864.
- Tuntawiroon, M., Sritongkul, N., Brune, M., Rossander-Hulten, L. (1991). Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in foods on nonheme-iron absorption in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 554-557.
- Ullman, U., Haller, J., Bakker, G. C., Brink, E. J., Weber, P. (2005). Epigallocatechin gallate (EGCG) (TEAVIGO) does not impair nonheme-iron absorption in man. *Phytomedicine*, 12(6-7), 410-415.
- Unno, T., Tago, M., Suzuki, Y., Nozawa, A., Sagesaka, M., Kakuda, T., Egawa, K., Kondo, K. (2005). Effect of tea catechins on postprandial plasma lipid responses in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 93, 543-47.
- Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., Bon, G., Sevanian, A. (1998). Postprandial plasma lipid hydroperoxides. A possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 2, 250-252.
- Ursini, F. & Sevanian, A. (2002) Postprandial oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383, 599-605.
- Valazquez-Arellano, A. & Encarnation, S. (2008). Role of proteomics in the study of nutrition. *Journal of Nutrigenetics & Nutrigenomics*, 1, 55-58.
- VanhetHof, K. H., Kivits, G. A., Weststrate, J. A., Tijburg, L. B. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 356-359.

Vinson, J. A., Teufel, K. & Wu, N. (2004). Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 52, 3661-3665.

Wallerath, T., Li, H., Godtel-Ambrust, U., Schwarz, P. M., Forstermann, U. (2005). A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide*, 12, 97-104.

Wan, X. C., Huang, J. Z. & Shen, S. R. (2003). Tea Biochemistry. *Beijing: China Agriculture Press*. p. 9–20.

Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., Youdim, M. B. H. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 506-516.

Weinberg, O., Amit, T. & Youdim, M. (2007). A novel approach of proteomics and transcriptomics to study the mechanism of action of the antioxidant-iron chelator green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 546-556.

Weisburger, J. H. (1999). Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food & Chemical Toxicology*, 37, 943-948.

Widlansky, M. E., Duffy, S. J., Hamburg, N. M., Gokse, N., Warden, B. A., Wiseman, S., Keaney, J. F., Frei, B., Vita, J. A. (2005). Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 499-506.

Widlansky, M. E., Hamburg, N. M., Anter, E., Holbrook, M., Kahn, D. F., Elliot, J. G., Keaney, J. F., Vita, J. A. (2007). Acute EGCG reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Journal of American College of Nutrition*, 26(2), 95-102.

Wolfram, S., Wang, Y. & Thieleche, F. (2006). Anti-obesity effects of green tea: from beside to bench. *Molecular Nutrition Food Research*, 50, 176-187.

Wollgast, J. & Anklam, E. (2000). Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, 33, 449-459.

Wu, C. D. & Wei, G. X. (2002). Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*, 18, 443-444.

Yamaguchi, Y., Hayashi, M., Yamazoe, H., Kunitomo, M. (1991). Preventive effects of green tea extract on lipid abnormalities in serum, liver and aorta of mice fed a atherogenic diet. *Journal of the Chemical Society of Japan*, 97(6), 329-337.

- Yamamoto, V., Niki, E., Kamyia, Y., Shimasaki, H. (1984). Oxidation of lipids. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion. *Biochimica & Biophysica Acta*, 795, 332-340.
- Yamamoto, M., Miyamoto, S. & Moons, J. (2006). Effect of dietary green tea catechin preparation on oxidative stress parameters in large intestinal mucosa of rats. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 70(1), 286-289.
- Yang, X., Sheng, S., Hou, J., Zhao, B., Xin, W. (1994). Mechanism of scavenging effects of (-)-epigallocatechin gallate on active oxygen free radicals. *Acta Pharmacologica Sinica*, 15, 350-353.
- Yokozawa, T., Nakagawa, T. & Kitani, K. (2002). Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50, 3549-3552.
- Yin, T., Sandhu, G., Wolfgang, C. D., Burrier, A., Webb, R. L., Rigel, D. F., Hai, T., Whelan, J. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19943-19950.
- Yokozawa, T., Nakagawa, T. & Kitani, K. (2002). Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50(12), 3549-3552.
- Yoshino, M. & Murakami, K. (1998). Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Analytical Biochemistry*, 257, 40-44.
- Young, J. F., Dragsted, L. O., Haraldsdottir, J., Daneshvar, B., Kall, M. A., Loft, S., Nilsson, L., Nielsen, S. E., Mayer, B., Skibsted, L. H., Huynh-Ba, T., Hermetter, A., Sandstrom, B. (2007). Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. *British Journal of Nutrition*, 87, 343-355.
- Yu, R., Jiao, J. J., Duh, J. L., Gudehidhlu, K., Tan, T. H., Kong, A. N. (1997). Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signalling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis*, 18(2):451-456.
- Zar, J. H. (1999). Multiple comparisons. In: *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, Inc. p 208-230.
- Zern, T. L. & Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective effect of dietary polyphenols. *Journal of Nutrition*, 135, 2291-2294.
- Zhang, L., Chow, M. S. & Zuo, Z. (2006). Effect of the co-occurring components from green tea on the intestinal absorption and disposition of green tea polyphenols in

Caco-2 monolayer model. *Journal of Pharmacology*, 58, 37–44.

Zijp, I. M, Korver, O. & Tijburg, L. B. (2000). Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 40, 371-98.

Zilversmit, D. B. (1979). Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*, 60, 473-485.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Βαλαβανίδης, Α. (2003). Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί καρκινογένεσης. ΒΗΓΑ Ιατρικές εκδόσεις. σελ. 8-15, 25-28, 53-54, 85-95, 139-145.

Ζαμπέλας, Α. (2006). Κλινική Διατροφή και Διαιτολογία, με έμφαση στην παθολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη. σελ. 240-260.

Πλέσσας, Σ. (1998). Διαιτητική του ανθρώπου. Εκδόσεις Φάρμακον-Τύπος, Αθήνα. σελ. 65-94.

Πλέσσας, Σ. (1994). Ειδικές δίαιτες. Εκδόσεις Φάρμακον-Τύπος, Αθήνα. σελ. 123-130, 150-162.

Πιτσαβός, Χ., Παναγιωτάκος, Δ. & Στεφανάδης, Χ. (2004). Η επιδημιολογία της στεφανιαίας νόσου στην Ελλάδα. Εκδόσεις Κωστάκη, Αθήνα. σελ. 27-37.

Σκουμπής, Β. (1996). Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια. Σελ. 64-68.

Τριχοπούλου, Α. (2004). Πίνακες σύνθεσης τροφίμων και ελληνικών φαγητών. Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα. σελ. 10,51.

Χανιώτης, Φ. (1998). Παθολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα. σελ. 89-94, 98-109.

Χατζιωάννου, Θ.Π., Κουπάρης, Μ.Α. (1990). Ενόργανη ανάλυση. Εκδόσεις Μαυρομάτη, Αθήνα. σελ. 334-364, 439-466.

## ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

[www.biotoools.edu-primer 3/](http://www.biotoools.edu-primer 3/)

[www.campus.ncl.ac.uk/databases/history/chocs/tea.gif](http://www.campus.ncl.ac.uk/databases/history/chocs/tea.gif)

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:MRNA-interaction.png>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Gene\\_expression](http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_expression)

[www.eulep.pdn.cam.ac.uk](http://www.eulep.pdn.cam.ac.uk)

[www.foodinfo.net](http://www.foodinfo.net)

<http://www.fleming.gr/animalfacility/>

[www.hipernatural.com](http://www.hipernatural.com)

[www.ivf.gr/developments](http://www.ivf.gr/developments)

[www.molecularstation.com/el/molecular-biology-techniques/gel-lectrophoresis/](http://www.molecularstation.com/el/molecular-biology-techniques/gel-lectrophoresis/)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db>

[www.niaid.nih.gov/dir/services/animalcare/Mousenecropsy/necropsy.ht](http://www.niaid.nih.gov/dir/services/animalcare/Mousenecropsy/necropsy.ht)

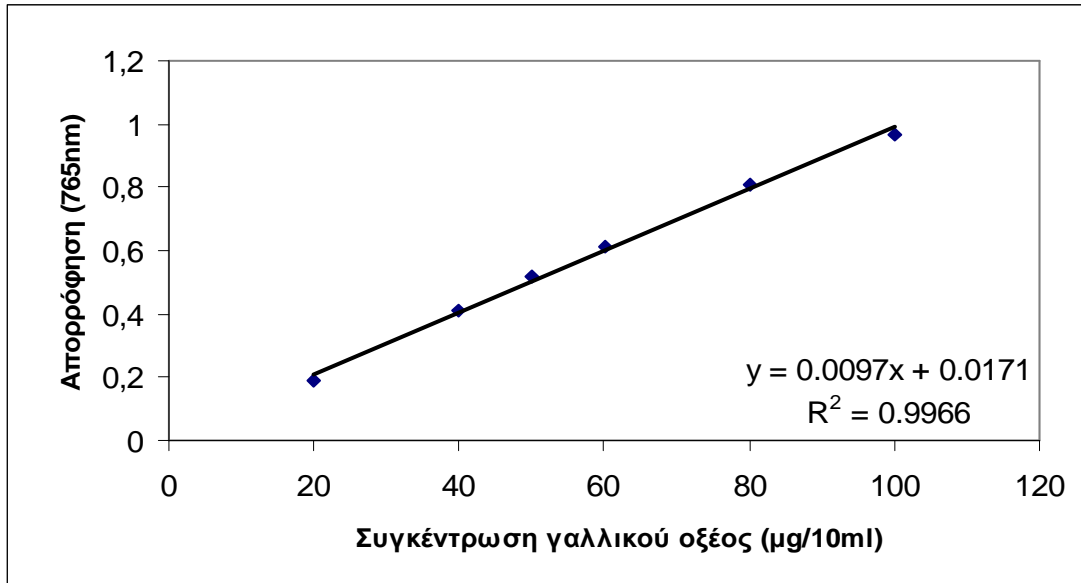
[www.niaid.nih.gov/dir/services/animalcare/Mousenecropsy/necropsy.ht](http://www.niaid.nih.gov/dir/services/animalcare/Mousenecropsy/necropsy.ht)

[www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

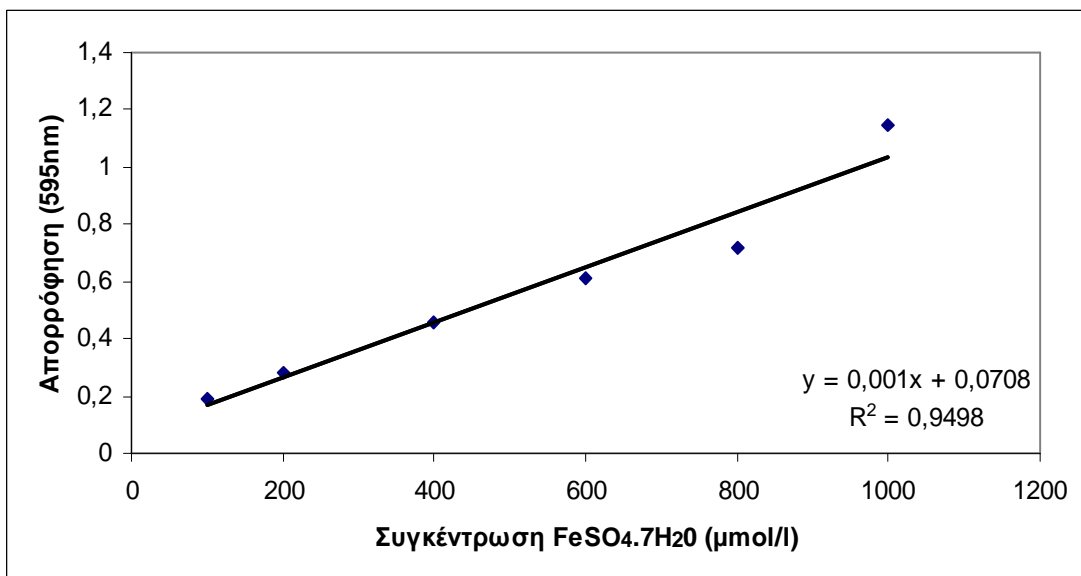
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

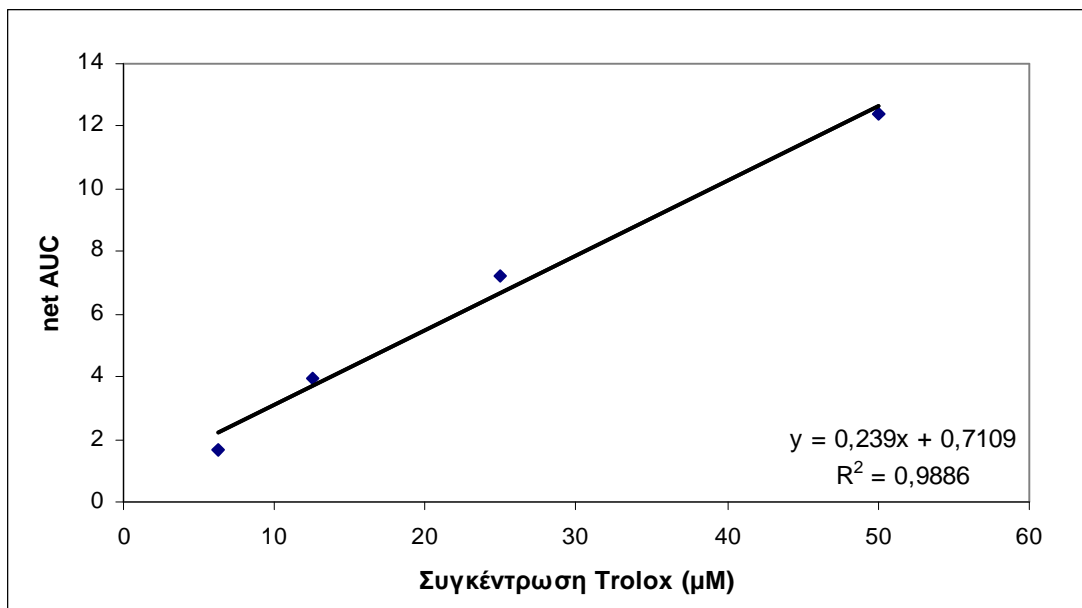
Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των μεθόδων FRAP, FOLIN, ORAC, TBARS.



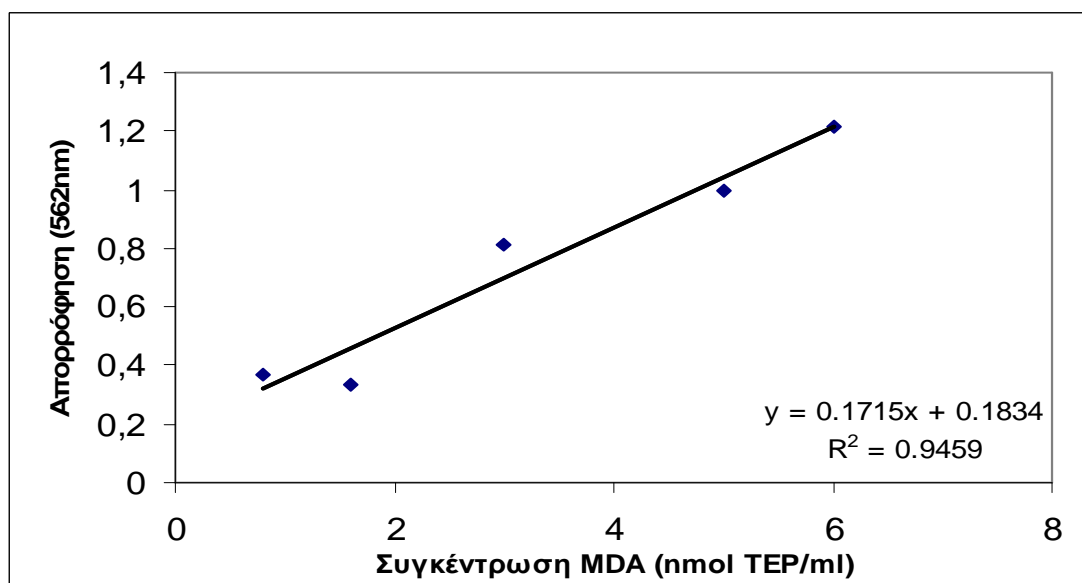
Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.



Γράφημα 2. Πρότυπη καμπύλη FeSO4.7H2O για τη μέθοδο FRAP.



Γράφημα 3. Πρότυπη καμπύλη Trolox για τη μέθοδο ORAC.

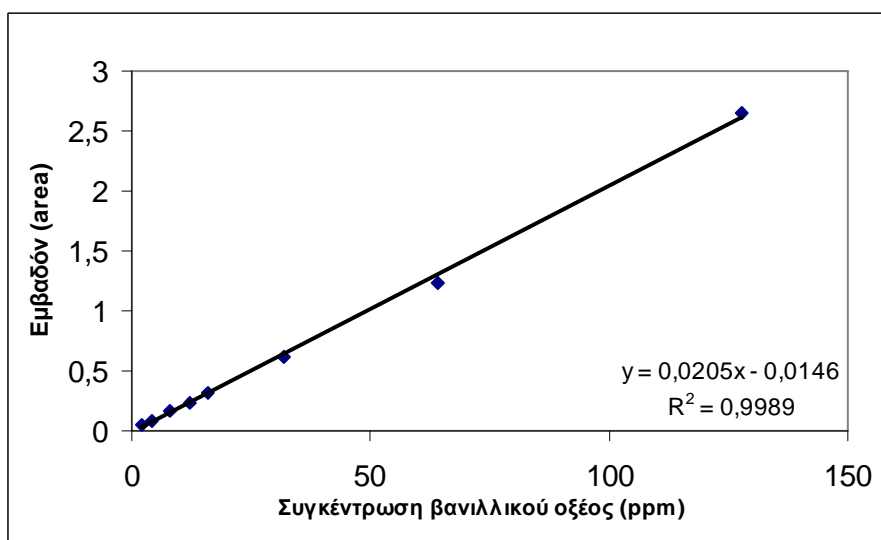
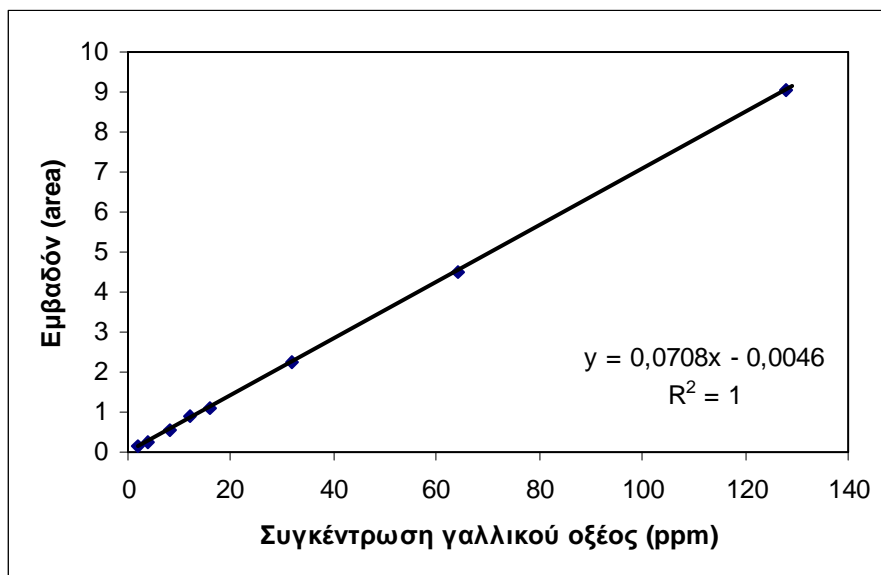


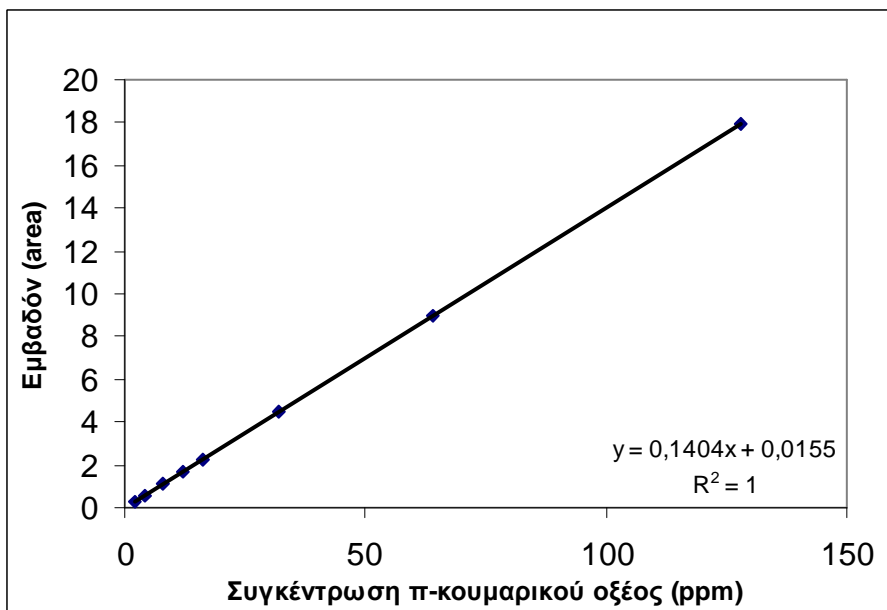
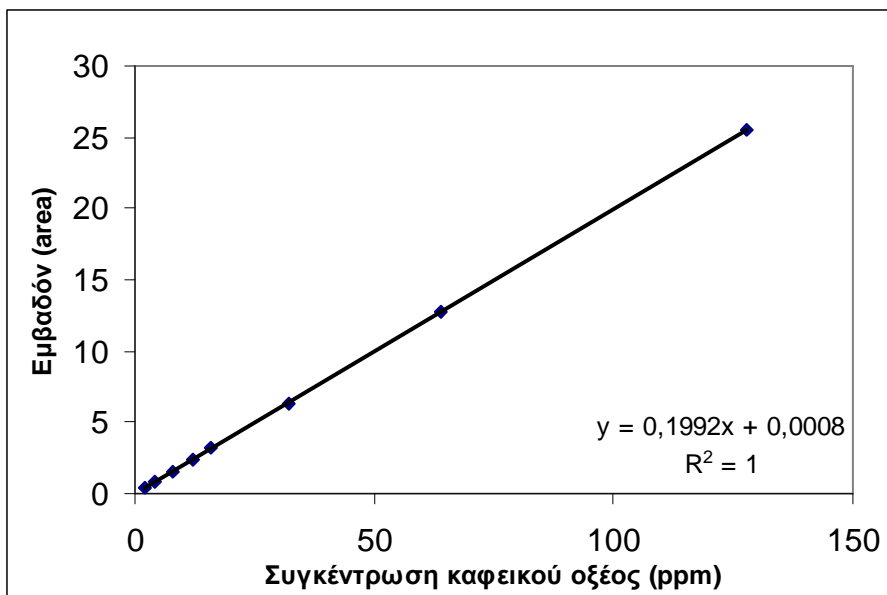
Γράφημα 4. Πρότυπη καμπύλη μαλονυλδιαδεύδης (MDA).

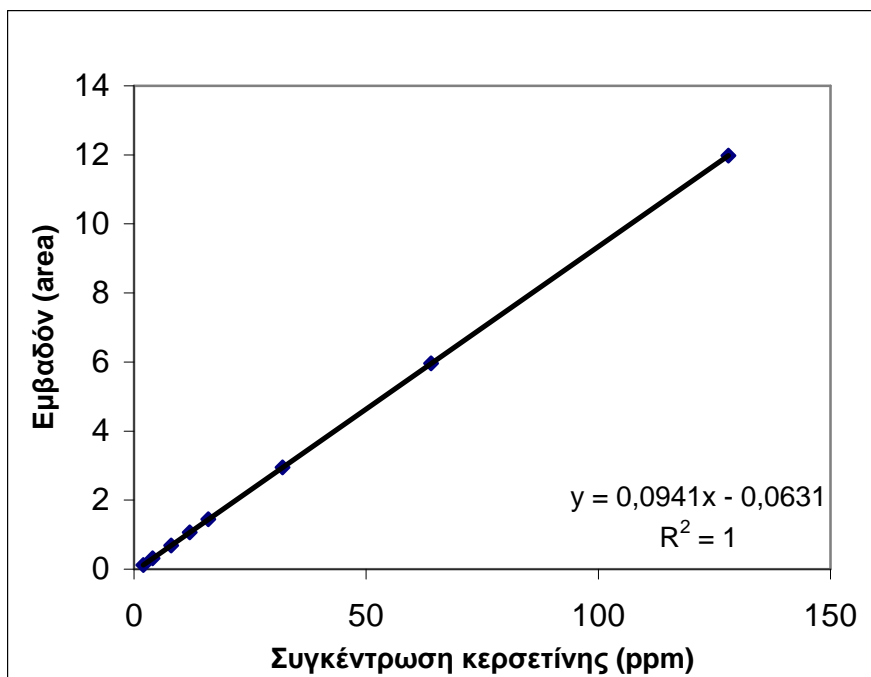


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται οι καμπύλες των προτύπων φαινολικών ενώσεων της μεθόδου HPLC της πειραματικής ενότητας 7.







### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται στοιχεία που αφορούν την κατάσταση της υγείας των ζώων της πειραματικής ενότητας 9 καθώς και τα έντυπα χορήγησης άδειας της μελέτης με ζώα.

**Πίνακας 1. Αναφορά επιπέδου υγείας ποντικών μονάδας Fleming (by Charles River Laboratories Ltd, November 2007).**

#### ΕΝΤΥΠΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΔΕΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΖΩΑ

	Mice		Mice
<b>SEROLOGY</b>	<b>Pos/tested</b>	<b>PARASITOLOGY</b>	
	0/11		0/11
<b><u>Mouse Annually</u></b>	0/11	Ectoparasite Direct	
Minute Virus of mice	0/11	Ectoparasites	0/11
Mouse Hepatitis Virus	0/11		
Pneumonia Virus of mice	0/11	Endoparasite Direct	0/11
Reovirus Type III	0/11	Adult Helminths	
Mouse Encephalomyelitis Virus	11/11		0/11
Sendai Virus	0/11	Endoparas. Float-OVA	0/11
Epizootic Diarrhea of Infant mice+	0/11	OVA	
Mouse Parvovirus	0/11		
Lymphocytic Choriomeningitis Virus	0/11	Enteric Protozoa	
Hantaan Virus	0/11	Protozoa	0/11
Ectromelia Virus	0/11	Arthropods	0/11
Mouse Cytomegalovirus	0/11		0/10
Mouse Adenovirus 1	0/11		2/2
Mouse Adenovirus 2	0/11	<b>BACTERIOLOGY</b>	1/2
Polyoma Virus	0/11		0/2
K Virus		Campylobacter spp.	0/11
Lactate Dehydrogenase Virus		Citrobacter rodentium	0/11
	0/11	Clostridium piliforme	0/11
	0/11	Corynebacterium kutscheri	0/11
<b>PATHOLOGY</b>	0/11	Helicobacter spp.	0/11
	0/11	Helicobacter hepaticus	0/11
Routine Exam	0/11	Helicobacter bilis	0/11
Heart	0/11	Mycoplasma pulmonis	
Lung	0/11	Pasterella pneumotropica	0/11
Spleen		Salmonella spp.	
Kidney		Streptobacillus moniliformis	2/11
Eyes		Streptococcus pneumoniae	
Other		B-haemolytic Streptococci	1/11
		Yersinia pseudotuberculosis	
		Staphylococcus aureus	7/11
		Klebsiella spp.	
		Proteus mirabilis	
		Pseudomonas aeruginosa	

## **ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ**

**1- Τίτλος πειράματος.**

**2- Περιγραφή του πειράματος.**

*Περιγράφονται στο Κεφάλαιο 9.*

**3- Δικαιολόγηση, βάσει επιστημονικών αποδείξεων, ότι στο υπό έγκριση πείραμα τηρούνται οι όροι των άρθρων 3,4 του Π.Δ. 160/91, που αναφέρονται στον σκοπό του πειραματισμού και τους περιορισμούς αντίστοιχα για τη χρήση, σαν πειραματόζωα, ζώων της άγριας πανίδας που απειλούνται με αφανισμό.**

Τηρούνται οι όροι των προαναφερθέντων άρθρων καθόσον πρόκειται για μελέτες που έχουν σαν σκοπό την αξιολόγηση, πρόληψη και ρύθμιση της αλλαγής φυσιολογικών χαρακτηριστικών του ανθρώπου. Δεν χρησιμοποιούνται ζώα της άγριας πανίδας, αλλά πειραματόζωα εκτρεφόμενα, για τον σκοπό αυτό στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ. Φλέμιγκ»

**4- Προκειμένου για επαναλαμβανόμενο πείραμα, να γίνει παράθεση επιστημονικών αποδείξεων ότι αυτό είναι απαραίτητο για την επιβεβαίωση αποτελέσματος για το οποίο δεν είναι γνωστά αρκετά στοιχεία, αν και έχει γίνει εξαντλητική έρευνα στις κατάλληλες επιστημονικές πηγές.**

Τα πειράματα είναι πρωτότυπα και γίνονται πάντα με σκοπό την συλλογή νέων πληροφοριών για την πραγματοποίηση των προαναφερθέντων μελετών.

**5- Να αιτιολογηθεί ανάλογα η χρήση ή όχι αναισθησίας στα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και η χρησιμοποίηση αναλγητικών ουσιών ή άλλων κατάλληλων μεθόδων, ώστε να περιορίζεται κατά το δυνατό ο πόνος, η ταλαιπωρία και η αγωνία του ζώου.**

Το πείραμα δεν περιλαμβάνει διαδικασίες που να προκαλούν πόνο. Δεν θα χρησιμοποιηθεί αναισθησία.

**6- Υπάρχει η δυνατότητα πραγματοποίησης του ιδίου πειράματος με άλλη μέθοδο επίτευξης των επιδιωκόμενων αποτελεσμάτων, χωρίς την χρήση πειραματοζώων; Αιτιολογείστε βάσει επιστημονικών δεδομένων.**

Αυτή η δυνατότητα έχει εξαντληθεί. Έχουν προηγηθεί πειράματα με μεθοδολογίες in vitro, τα οποία υποστηρίζουν την υπόθεση αλλά δεν μπορούν να αποδείξουν για τους μηχανισμούς του παρατηρούμενου φαινομένου. Το πείραμα θα ακολουθήσει την προσέγγιση της μέλετης των de Boer et al. ώστε να μελετηθεί η κατανομή των φαινολικών συστατικών σε ιστούς του ζώου.(de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IM, Keijer J, Hollman PC. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr.* 2005;135(7):1718-25.). Επίσης, θα ελέγχουν πιθανές τροποποιήσεις στην έκφραση των πρωτεϊνών διαφόρων ιστών και ιδίως της αορτής και της καρδιάς, ενώ θα αξιολογηθούν παράγοντες αθηρωμάτωσης στους ιστούς αυτούς. (Liang-Huei Lu, Shoei-Sheng Lee & Huei-Chen Huang Epigallocatechin suppression of proliferation of vascular smoothmuscle cells: correlation with c-jun and JNK, *British Journal of Pharmacology* (1998) 124, 1227 ± 1237, Al-Awwadi et al., 2005. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *J Agr Food Chem* 53, 151-7.).

**7- Παράθεση επιστημονικών αποδείξεων ότι έχει γίνει η επιλογή του πειράματος, που απαιτεί τη χρήση του μικρότερου δυνατού αριθμού πειραματοζώων, που διαθέτουν τον κατώτερο βαθμό νευροφυσιολογικής ευαισθησίας, που προκαλεί τον μικρότερο βαθμό**

**πόνο, ταλαιπωρία, αγωνία ή μόνιμη βλάβη και που αναμένεται να δώσει τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα.**

Ο μικρότερος δυνατός αριθμός πειραματοζώων υπολογίστηκε με βάση την αναμενόμενη διασπορά τιμών και σύμφωνα με την μεθοδολογία των de Boer et al.

**8- Γνώμη του υπεύθυνου για τα πειραματόζωα κτηνιάτρου, για το υπό έγκριση πείραμα.**

Στο προτεινόμενο πείραμα εξασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή αντιμετώπιση των πειραματοζώων. Ανταποκρίνεται στα διεθνή πρότυπα και στις σχετικές κοινοτικές οδηγίες.

## **ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΕΙΤΑΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ ΣΤΟ ΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑ**

**1- Είδος, αριθμός και ηλικία πειραματοζώων που θα χρησιμοποιηθούν στον πειραματισμό. Αιτιολογείστε την επιλογή σας.**

Χρήση του *Mus musculus* ποντικού, ηλικίας 8-12 εβδομάδων. Συνήθως γίνεται χρήση έως 5 ποντικών ανά εξεταζόμενη ομάδα.

**2- Ονοματεπώνυμο και διεύθυνση προμηθευτή**

Ε.ΚΕ.Β.Ε. “ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΓΚ”

Αλ. Φλέμιγκ 34, Βάρη 1667

**3- Υπάρχει η πιθανότητα να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα αδέσποτα ζώα, ΠΛΗΝ σκύλου ή γάτας;**

OXI

**4- Προκειμένου για χρήση ζώων, που προηγουμένως ήταν ελεύθερα στη φύση, να αποδεικνύεται ότι η χρησιμοποίηση άλλων ειδών ζώων δεν επαρκεί για τους σκοπούς του πειράματος.**

Χρησιμοποιούνται μόνον ζώα από το εκτροφείο.

**5- Τηρούνται τα στοιχεία των χρησιμοποιουμένων πειραματοζώων, έτσι όπως προβλέπεται από το άρθρο 17 παρ. 6; (αριθμός και είδος αποκτηθέντων ζώων, εγκαταστάσεις από τις οποίες αποκτήθηκαν, ημερομηνία άφιξης στην εγκατάσταση, προορισμός τους μετά την ολοκλήρωση του πειράματος)**

Ναι.

**6- Στην περίπτωση που τα πειραματόζωα εκτρέφονται στις εγκαταστάσεις πειραματισμού, τηρούνται οι διατάξεις που προβλέπονται στο Π.Δ. 160/91 για τις εγκαταστάσεις εκτροφής; (άρθρα 14, 15)**

Ναι

**7- Προβλέπεται η χρησιμοποίηση πειραματοζώων για περισσότερες από μία φορές στο υπό έγκριση πείραμα, εφόσον μάλιστα προκαλείται σε αυτά έντονος πόνος, αγωνία ή ισοδύναμη ταλαιπωρία;**

OXI

**8- Προβλέπεται, κατά τη διάρκεια του πειράματος, το ή τα πειραματόζωα να υποστούν ή να κινδυνεύσουν να υποστούν δυνατούς πόνους, που μπορεί μάλιστα να είναι και παρατεταμένοι; Αιτιολογείστε με ακρίβεια.**

Όχι. Τα ζώα προβλέπεται να έχουν ελεύθερη πρόσβαση στο νερό και στα διάφορα είδη διαίτας. Μετά το πέρας τριών εβδομάδων θα λάβει χώρα ευθανασία.

**9- Ποια θα είναι η τύχη του πειραματόζωου μετά το πείραμα;**

**α. Θα διατηρηθεί στη ζωή και αν ναι, υπό ποιες συνθήκες ή**

**β. Θα θυσιασθεί με κάποιο συγκεκριμένο τρόπο; Αναφέρατε με ακρίβεια.**

Θα θυσιασθεί με έκθεση σε θάλαμο κορεσμένο με διοξείδιο του άνθρακα (UFAW 1968, AVMA 1986, CEC 1992).

**10- Υπάρχει πιθανότητα για απελευθέρωση του ή των πειραματόζωων μετά το πέρας του πειραματισμού και εφόσον το επιτρέπει η κατάσταση της υγείας τους και δεν υπάρχει κίνδυνος για τη Δημόσια Υγεία και το περιβάλλον; (σύμφωνα με το άρθρο 11).**

ΟΧΙ. Όλα τα ζώα θυσιάζονται και ακολουθεί ιστολογική μελέτη. Τα πειράματα είναι περιορισμένου αριθμού, γίνονται σε οργανωμένες εγκαταστάσεις και επομένως δεν υπάρχει σοβαρή πιθανότητα κινδύνου απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον. Επίσης, λόγω στείρων συνθηκών διαβίωσής τους και κατά την πειραματική διαδικασία δεν υπάρχει κίνδυνος για την Δημόσια Υγεία και το περιβάλλον.

## **ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

**1- Αριθμός καταχώρησης της εγκατάστασης πειραματισμού.**

05-1-Ε.Ε.Π-02

**2- Περιγραφή του τόπου και του τρόπου διατήρησης των πειραματόζωων κατά την διάρκεια του πειράματος, σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 5 του Π.Δ. 160/91**

Στο Ε.ΚΕ.Β.Ε “Αλ. Φλέμιγκ” όπου θα γίνει το πείραμα υπάρχει ειδικά διαμορφωμένος αεριζόμενος και κλιματιζόμενος χώρος, με προθαλάμους και ασφαλιστικές μπάρες για να αποτρέπεται διαφυγή των πειραματόζωων στο περιβάλλον. Τα ποντίκια της μελέτης διατρέφονται και ποτίζονται *ad libitum* καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος.

**3- Ο εσωτερικός εξοπλισμός των εγκαταστάσεων πειραματισμού είναι ο κατάλληλος για τη πραγματοποίηση του πειράματος; Περιγράψτε σχετικά.**

Υπάρχουν ειδικοί χώροι εργασίας, με κατάλληλες διατάξεις, για την ασφαλή χορήγηση των φαρμάκων, καθώς και για τη φύλαξη, τη θανάτωση και την ανατομική μελέτη των πειραματόζωων.

**4- Ο σχεδιασμός, η κατασκευή και η λειτουργία των εγκαταστάσεων επιτρέπουν την αποτελεσματικότερη διεξαγωγή του πειράματος, έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται τα λιγότερα κατά το δυνατόν ζώα, με τη λιγότερη κατά το δυνατόν ταλαιπωρία, πόνο, αγωνία ή και μόνιμα προκαλούμενη βλάβη;**

Ναι.

**5- Υπάρχει πιθανότητα το πείραμα ή μέρος του πειράματος να πραγματοποιηθεί εκτός των εγκαταστάσεων πειραματισμού;**

Όχι.

**6- Ορισμός διοικητικά υπεύθυνου ή υπεύθυνων προσώπων, για τις εγκαταστάσεις πειραματισμού.**

Μαρία Κάμπερ, Κτηνίατρος

**7- Άλλο ειδικευμένο προσωπικό**

Αντώνης Κουτελιδάκης

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται η δήλωση συγκατάθεσης εθελοντών, τα ερωτηματολόγια της κλινικής μελέτης της ενότητας 10, πίνακες χαρακτηριστικών των ασθενών, αναλυτικά αποτελέσματα και στοιχεία στατιστικής επεξεργασίας καθώς και η άδεια της μελέτης.

### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-ΜΟΝΑΔΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΤΤΙΚΟΝ»  
Β' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Δ/ΤΗΣ : ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Θ. ΚΡΕΜΑΣΤΙΝΟΣ

#### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ

Δηλώνω ότι ενημερώθηκα από τον ιατρό Λ. Ραλλίδη (Λέκτορας Καρδιολογίας), όσον αφορά τη λήψη αίματος από εμένα για τη μέτρηση της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης, παραγόντων φλεγμονής (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) και δεικτών οξειδωσης (Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα κ.α.) για τη διερεύνηση της μεταγευματικής επίδρασης του πράσινου τσαγιού. Όπως ενημερώθηκα υπάρχουν επιστημονικά στοιχεία που δείχνουν ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και υπολιπιδαιμική δράση. Οι ιδιότητες αυτές έχουν ιδιαίτερη σημασία μεταγευματικά, δεδομένης της ενεργοποίησης πληθώρας παραγόντων μετά το γεύμα.

Για να μελετηθεί η πιθανή ευεργετική επίδραση του πράσινου τσαγιού μεταγευματικά θα μου χορηγηθεί γεύμα αποτελούμενο από 100 g ψωμί και 20 g βιτάμ και αμέσως μετά θα καταναλώσω 250 ml πράσινο τσάι. Πριν τη χορήγηση, μιάμιση, τρεις και πέντε ώρες μετά θα γίνει λήψη αίματος.

**Ο ασθενής**

**Όνοματεπώνυμο :**

**Υπογραφή :**

**Ημερομηνία :**

**Ο ιατρός**

**Όνοματεπώνυμο : Λουκιανός Ραλλίδης**

**Υπογραφή**

**Τηλ επικοινωνίας : 210-5832091**

**Ημερομηνία :**



## ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΣΥΝΗΘΕΙΩΝ

Όνοματεπώνυμο:

Ημερομηνία :

### 1. Γενικά στοιχεία

Ηλικία :

Φύλο :

Βάρος (Kg) :

Ύψος (cm):

BMI (Kg/m<sup>2</sup>):

Περιφέρεια μέσης (cm):

ΑΠ:

### 2. Ιστορικό στεφανιαίας νόσου

i) Έχετε ιστορικό κλινικής εμφάνισης στεφανιαίας νόσου? NAI-OXI

ii) Η εμφάνιση έγινε υπό τη μορφή:

α) ΕΜ

β) Σταθερούς στηθάγχης

γ) Ασταθούς στηθάγχης

iii) Έχετε υποβληθεί σε by pass? NAI-OXI

Αν ναι, πότε

iv) Έχετε υποβληθεί σε αγγειοπλαστική? NAI-OXI

Αν ναι, πότε

### 3. Άλλες πληροφορίες ιατρικού ιστορικού

i) Παράγοντες κινδύνου ΣΝ

ΑΥ: NAI-OXI

ΣΔ: NAI-OXI

Κάπνισμα: NAI-OXI

Υπερχολ/μία: NAI-OXI

Κληρονομικό ιστορικό για ΣΝ: NAI-OXI

ii) Αν είστε γυναίκα, έχετε εισέλθει στην περίοδο εμμηνοπαύσεως? NAI-OXI

Αν ναι, λαμβάνετε ορμονική αγωγή?.....

iii) Περιγράψτε οποιαδήποτε χρόνια ασθένεια έχετε εμφανίσει και δεν αναγράφεται παραπάνω.....

iv) Παρούσα φαρμακευτική αγωγή

vi) Λαμβάνετε αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής? NAI-OXI

Αν ναι, περιγράψτε το είδος των συμπληρωμάτων, τη συχνότητα που τα λαμβάνετε και τη δοσολογία (π.χ κάθε μέρα ή 1-2 φορές εβδομαδιαίως κτλ).....

### 4. Γενικές πληροφορίες διατροφικών και άλλων συνηθειών

i) Είστε καπνιστής/καπνίστρια? NAI-OXI

Αν ναι αναγράψτε το μέσο αριθμό τσιγάρων που καπνίζετε ανά ημέρα.....

ii) Καταναλώνετε αλκοολούχα ποτά?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 2-3 φορές το μήνα ε) Πολύ σπάνια

• Αναγράψτε πόσο συχνά καταναλώνετε κόκκινο κρασί.....

• Αν καταναλώνετε αλκοόλ κάθε μέρα αναγράψτε πόσες μερίδες αλκοόλ (1 μερίδα=1 ποτήρι) καταναλώνετε ημερησίως.....

iii) Πόσο συχνά καταναλώνετε φρούτα?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 1-2 φορές το μήνα ε) 2-3 φορές το μήνα

• Πόσα φρούτα καταναλώνετε κάθε φορά?.....

• Περιγράψτε τα είδη φρούτων που καταναλώνετε πιο συχνά.....

iv) Πόσο συχνά καταναλώνετε λαχανικά?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 1-2 φορές το μήνα ε) 2-3 φορές το μήνα

• Πόσα λαχανικά καταναλώνετε κάθε φορά?.....

• Περιγράψτε τα είδη λαχανικών που καταναλώνετε πιο συχνά.....

v) Πόσο συχνά καταναλώνετε τσάι?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 1-2 φορές το μήνα ε) 2-3 φορές το μήνα στ) Σπανίως ή καθόλου

- Πόσα φλιτζάνια τσάι καταναλώνετε κάθε φορά?.....
- Περιγράψτε τα είδη τσαγιού που καταναλώνετε πιο συχνά (πχ πράσινο, μαύρο, με φρούτα κτλ).....

vi) Καταναλώνετε εκχυλίσματα αρωματικών φυτών (π.χ. χαμόμηλο, φασκόμηλο, τίλιο κτλ)? ΝΑΙ-ΟΧΙ

Αν ναι, περιγράψτε πόσο συχνά και ποια είδη προτιμάτε.....

vii) Πόσο συχνά καταναλώνετε κρέας ή προϊόντα κρέατος?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 1-2 φορές το μήνα

viii) Πόσο συχνά καταναλώνετε όσπρια, μακαρόνια, δημητριακά και ψωμί?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 1-2 φορές το μήνα

x) Πόσο συχνά καταναλώνετε θαλασσινά (ψάρια, οστρακοειδή, μαλάκια)?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) 1-2 φορές το μήνα ε) Σπανίως

xi) Πόσο συχνά αθλείστε?

α) Κάθε μέρα β) 1-2 φορές τη βδομάδα γ) 3-4 φορές τη βδομάδα δ) Σπανίως

Περιγράψτε το είδος της άσκησης που κάνετε συνήθως.....

## ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΕΒΔΟΜΑΔΑ

**Ημερομηνία :**

**Όνοματεπώνυμο:**

**Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών από σήμερα καταγράψτε τη συχνότητα και την ποσότητα κατανάλωσης συγκεκριμένων κατηγοριών τροφίμων.**

**1. i) Πόσο συχνά καταναλώσατε φρούτα τις τελευταίες 7 ημέρες?**

α) Κάθε μέρα β) 1 ή 2 ημέρες γ) 3 ή 4 ημέρες δ) 5 ή 6 ημέρες ε) καθόλου

ii) Πόσες μερίδες φρούτων καταναλώσατε περίπου κάθε μέρα? (1 μερίδα=1 φρούτο)

α) 1-2 φρούτα β) 3-4 φρούτα γ) 5-6 φρούτα δ) καθόλου

iii) Καταγράψτε ακριβώς τα φρούτα που καταναλώσατε.....

iv) Καταναλώσατε κάποια από τα παρακάτω φρούτα: «μούρα, μήλο, αχλάδι, σταφύλι, δαμάσκηνο, ροδάκινο, πορτοκάλι, μανταρίνι»? ΝΑΙ-ΟΧΙ

Αν ναι, αναγράψτε την ποσότητα.....

**2.i) Πόσο συχνά καταναλώσατε λαχανικά τις τελευταίες 7 ημέρες ?**

α) Κάθε μέρα β) 1 ή 2 ημέρες γ) 3 ή 4 ημέρες δ) 5 ή 6 ημέρες ε) καθόλου

ii) Πόσες μερίδες λαχανικών καταναλώσατε περίπου κάθε μέρα? (1 μερίδα=1 φλιτζάνι ωμά λαχανικά) α) 1-2 μερίδες β) 3-4 μερίδες γ) 5-6 μερίδες

iii) Καταγράψτε ακριβώς τα λαχανικά που καταναλώσατε.....

**3. i) Πόσο συχνά καταναλώσατε καφέ τις τελευταίες 7 ημέρες?**

α) Κάθε μέρα β) 1 ή 2 ημέρες γ) 3 ή 4 ημέρες δ) 5 ή 6 ημέρες ε) καθόλου

ii) Πόσα φλιτζάνια καφέ καταναλώσατε την ημέρα?

α) 1-2 φλιτζάνια β) 3-4 φλιτζάνια γ) 5-6 φλιτζάνια δ) καθόλου

**4. i) Πόσο συχνά καταναλώσατε τσάι τις τελευταίες 7 ημέρες?**

α) Κάθε μέρα β) 1 ή 2 ημέρες γ) 3 ή 4 ημέρες δ) 5 ή 6 ημέρες ε) καθόλου

ii) Πόσα φλιτζάνια τσάι καταναλώσατε την ημέρα?

α) 1-2 φλιτζάνια β) 3-4 φλιτζάνια γ) 5-6 φλιτζάνια δ) καθόλου

5. i) Πόσο συχνά καταναλώσατε κόκκινο κρασί τις τελευταίες 7 ημέρες?  
 α) Κάθε μέρα β) 1 ή 2 ημέρες γ) 3 ή 4 ημέρες δ) 5 ή 6 ημέρες ε) καθόλου  
 ii) Πόσα ποτήρια καταναλώσατε την ημέρα?  
 α) 1-2 ποτήρια β) 3-4 ποτήρια γ) Άνω των 4 ποτήρια
6. Χρησιμοποίησατε ελαιόλαδο στη διατροφή σας κατά τις τελευταίες 7 ημέρες?  
 ΝΑΙ-ΟΧΙ
7. Καταναλώσατε αφεψήματα αρωματικών φυτών, όπως χαμομήλι, μέντα, τίλιο, φασκόμηλο κτλ κατά τις τελευταίες 7 ημέρες? ΝΑΙ-ΟΧΙ  
 Αν ναι, αναγράψτε πόσες φορές και πόσα φλιτζάνια.....
8. Καταναλώσατε κάποια εκ των παρακάτω τροφίμων τις τελευταίες 7 ημέρες :  
 «σοκολάτα, κουκουνάρι, ξηρούς καρπούς, δημητριακά ολικής αλέσεως, κόκκινο πιπέρι» ΝΑΙ-ΟΧΙ  
 Αν ναι, αναγράψτε πόσες φορές και σε ποια ποσότητα.....
9. Λάβατε καθόλου αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής κατά τις τελευταίες 7 ημέρες? ΝΑΙ-ΟΧΙ  
 Αν ναι, αναγράψτε πόσες φορές, σε ποια ποσότητα και το είδος των συμπληρωμάτων.....

#### **ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΤΑ ΤΟ ΤΕΛΕΥΤΑΙΟ 24ΩΡΟ**

**Περιγράψτε τα τρόφιμα και τις ποσότητες στις οποίες τα καταναλώσατε κατά τις τελευταίες 24 ώρες**

##### **Προηγούμενη ημέρα :**

Πρωινό :.....  
 Μεσημεριανό :.....  
 Βραδινό :.....  
 Ενδιάμεσα γεύματα :.....

##### **Σήμερα :**

Πρωινό :.....  
 Άλλα γεύματα :.....

ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΕΚ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πίνακας 1. Συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων εκφρασμένη σε ποσοστό (%) ανά ομάδα.

	Ομάδες παρέμβασης		Νερό
	Τσάι	Τσάι+Fe	
<b>Κατανάλωση τσαγιού</b>			
Κάθε μέρα	4,8	5,3	0
1-2 φορές την εβδομάδα	0	5,3	10
3-4 φορές την εβδομάδα	14,3	0	20
1-2 φορές το μήνα	9,5	15,8	25
3-4 φορές το μήνα	4,8	5,3	5
Σπάνια ή ποτέ	66,7	68,4	40
<b>Κατανάλωση βοτάνων</b>			
Κάθε μέρα	0	5,3	0
1-2 φορές την εβδομάδα	0	5,3	5,3
3-4 φορές την εβδομάδα	4,8	0	5,3
1-2 φορές το μήνα	0	5,3	5,3
3-4 φορές το μήνα	0	0	0
Σπάνια ή ποτέ	95,2	84,2	84,2
<b>Κατανάλωση αλκοόλ</b>			
Κάθε μέρα	23,8	16,7	15
1-2 φορές την εβδομάδα	23,8	33,3	20
3-4 φορές την εβδομάδα	14,3	16,7	5
1-2 φορές το μήνα	0	5,6	5
3-4 φορές το μήνα	9,5	5,6	35
Σπάνια ή ποτέ	28,6	22,2	20
<b>Κατανάλωση κόκκινου κρασιού</b>			
Κάθε μέρα	10	5,6	0
1-2 φορές την εβδομάδα	25	33,3	25
3-4 φορές την εβδομάδα	20	0	0
1-2 φορές το μήνα	5	5,6	30
3-4 φορές το μήνα	5	5,6	5
Σπάνια ή ποτέ	35	50	40
<b>Κατανάλωση φρούτων</b>			
Κάθε μέρα			
1-2 φορές την εβδομάδα	33,3	36,8	35
3-4 φορές την εβδομάδα	23,8	26,3	30
1-2 φορές το μήνα	33,3	26,3	20
3-4 φορές το μήνα	4,8	5,3	15
Σπάνια ή ποτέ	4,8	5,3	0
<b>Κατανάλωση λαχανικών</b>			
Κάθε μέρα	38,1	50	40
1-2 φορές την εβδομάδα	28,6	22,2	25
3-4 φορές την εβδομάδα	33,3	11,1	30
1-2 φορές το μήνα	0	11,1	5
3-4 φορές το μήνα	0	0	0
Σπάνια ή ποτέ	0	5,6	0
<b>Κατανάλωση κρέατος</b>			
Κάθε μέρα	5	15,8	10

1-2 φορές την εβδομάδα	25	31,6	45
3-4 φορές την εβδομάδα	60	52,6	30
2-3 φορές το μήνα	10	0	10
Σπάνια ή ποτέ	0	0	5
<b>Κατανάλωση ιχθυρών</b>			
Κάθε μέρα			
1-2 φορές την εβδομάδα	81	55,6	60
3-4 φορές την εβδομάδα	9,5	27,8	15
2-3 φορές το μήνα	4,8	11,1	20
Σπάνια ή ποτέ	4,8	5,6	5
<b>Κατανάλωση δημητριακών</b>			
Κάθε μέρα			
1-2 φορές την εβδομάδα	38,1	47,4	40
3-4 φορές την εβδομάδα	52,4	42,1	50
2-3 φορές το μήνα	4,8	0	0
Σπάνια ή ποτέ	0	5,3	0
<b>Κατανάλωση γαλακτοκομικών</b>			
Κάθε μέρα			
1-2 φορές την εβδομάδα	52,4	42,1	30
3-4 φορές την εβδομάδα	19	15,8	30
2-3 φορές το μήνα	0	10,5	5
Σπάνια ή ποτέ	0	0	0

**Πίνακας 2. Συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων την τελευταία εβδομάδα πριν τη συμμετοχή στη μελέτη εκφρασμένη σε ποσοστό (%) ανά ομάδα.**

	Ομάδες παρέμβασης		
	Τσάι	Τσάι+Fe	Νερό
<b>Κατανάλωση τσαγιού</b>			
Κάθε μέρα	4,8		5
1-2 φορές	23,8	44,4	55
3-4 φορές	9,5	11,1	15
5-6 φορές	0	0	0
Καθόλου	61,9	44,4	25
<b>Κατανάλωση βοτάνων</b>			
Κάθε μέρα	0	0	0
1-2 φορές	0	0	0
3-4 φορές	0	0	0
5-6 φορές	0	0	0
Καθόλου	100	100	100
<b>Κατανάλωση κόκκινου κρασιού</b>			
Κάθε μέρα	4,8	0	0
1-2 φορές	9,5	0	15
3-4 φορές	0	5,6	0
5-6 φορές	4,8	0	0
Καθόλου	81	94,4	85
<b>Κατανάλωση φρούτων</b>			
Κάθε μέρα	23,8	29,4	30
1-2 φορές	23,8	23,5	20
3-4 φορές	33,3	47,1	40
5-6 φορές	9,5	0	10
Καθόλου	9,5	0	0
<b>Κατανάλωση λαχανικών</b>			

Κάθε μέρα	23,8	27,8	25
1-2 φορές	28,6	33,3	15
3-4 φορές	47,6	33,3	45
5-6 φορές	0	5,6	10
Καθόλου	0	0	0
<i>Κατανάλωση καφέ</i>			
Κάθε μέρα	9,5	22,2	30
1-2 φορές	9,5	5,6	20
3-4 φορές	9,5	5,6	0
5-6 φορές	0	0	0
Καθόλου	71,4	66,7	50
<i>Αντιοξειδωτικά συμπληρώματα</i>			
Κάθε μέρα	0	0	0
1-2 φορές	4,8	0	0
3-4 φορές	0	0	0
5-6 φορές	0	0	0
Καθόλου	95,2	100	100

# ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

## 1. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ FRAP

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

frap	Dependent Variable
1	FRAP_0
2	FRAP_1.5
3	FRAP_3
4	FRAP_5

### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Type of Intervention	1 tea with meal	16
	2 tea with meal plus iron	17
	3 water with meal	19

### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
FRAP t=0	tea with meal	509,8875	102,23337	16
	tea with meal plus iron	517,9941	87,46733	17
	water with meal	538,9632	103,13763	19
	Total	523,1615	96,88010	52
FRAP t=1.5	tea with meal	576,3563	133,41910	16
	tea with meal plus iron	565,8471	133,03498	17
	water with meal	549,7263	129,76629	19
	Total	563,1904	129,82853	52
FRAP t=3	tea with meal	549,2625	125,91967	16
	tea with meal plus iron	548,8176	107,04621	17
	water with meal	553,3053	170,62374	19
	Total	550,5942	136,15336	52
FRAP t=5	tea with meal	542,6688	151,16552	16
	tea with meal plus iron	532,0824	116,05030	17
	water with meal	534,2789	143,76971	19
	Total	536,1423	135,13471	52

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Source	frap	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
frap	Linear	2126,410	1	2126,410	,266	,608	,266	,080
	Quadratic	40292,326	1	40292,326	6,107	,017	6,107	,678
	Cubic	7713,573	1	7713,573	1,064	,307	1,064	,173
frap * Interv	Linear	2902,049	2	1451,024	,182	,834	,363	,077
	Quadratic	4711,192	2	2355,596	,357	,702	,714	,104
	Cubic	7543,360	2	3771,680	,520	,598	1,040	,131
Error(frapp)	Linear	391380,315	49	7987,353				
	Quadratic	323268,428	49	6597,315				
	Cubic	355338,777	49	7251,812				

a Computed using alpha = ,05

**Tests of Between-Subjects Effects**

Measure: MEASURE\_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
Intercept	61078741,580	1	61078741,580	1405,451	,000	1405,451	1,000
Interv	447,811	2	223,906	,005	,995	,010	,051
Error	2129464,732	49	43458,464				

a Computed using alpha = ,05

**Parameter Estimates**

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
FRAP t=0	Intercept	538,963	22,484	,000	493,780	584,147	23,971	1,000
	[Interv=1]	-29,076	33,255	,386	-95,903	37,752	,874	,138
	[Interv=2]	-20,969	32,719	,525	-86,721	44,783	,641	,096
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
FRAP t=1.5	Intercept	549,726	30,274	,000	488,888	610,565	18,158	1,000
	[Interv=1]	26,630	44,776	,555	-63,351	116,611	,595	,090
	[Interv=2]	16,121	44,056	,716	-72,412	104,654	,366	,065
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
FRAP t=3	Intercept	553,305	31,863	,000	489,274	617,337	17,365	1,000
	[Interv=1]	-4,043	47,126	,932	-98,746	90,661	,086	,051
	[Interv=2]	-4,488	46,368	,923	-97,667	88,692	,097	,051
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
FRAP t=5	Intercept	534,279	31,611	,000	470,754	597,804	16,902	1,000
	[Interv=1]	8,390	46,753	,858	-85,564	102,344	,179	,054
	[Interv=2]	-2,197	46,001	,962	-94,638	90,245	,048	,050
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.



**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	544,544	26,058	492,178	596,910
tea with meal plus iron	541,185	25,280	490,383	591,988
water with meal	544,068	23,913	496,014	592,123

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)
tea with meal	tea with meal plus iron	3,358	36,306	1,000
	water with meal	,475	35,368	1,000
tea with meal plus iron	tea with meal	-3,358	36,306	1,000
	water with meal	-2,883	34,798	1,000
water with meal	tea with meal	-,475	35,368	1,000
	tea with meal plus iron	2,883	34,798	1,000

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	frap	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	frap	Level 2 vs. Level 1	70689,516	,001	16,465	,966
		Level 3 vs. Previous	603,316	,718	,136	,064
		Level 4 vs. Previous	100,000	,939	,006	,051
	frap * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(frap)	Level 2 vs. Level 1	4293,249			
		Level 3 vs. Previous	4447,900			
		Level 4 vs. Previous	16433,426			
tea with meal plus iron	frap	Level 2 vs. Level 1	38928,368	,115	2,780	,348
		Level 3 vs. Previous	808,680	,768	,090	,059
		Level 4 vs. Previous	2504,320	,511	,452	,097
	frap * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(frap)	Level 2 vs. Level 1	14002,555			
		Level 3 vs. Previous	9021,836			
		Level 4 vs. Previous	5544,977			
water with meal	frap	Level 2 vs. Level 1	2201,066	,596	,292	,081
		Level 3 vs. Previous	1525,530	,793	,071	,057
		Level 4 vs. Previous	3237,053	,652	,210	,072
	frap * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(frap)	Level 2 vs. Level 1	7538,871			
		Level 3 vs. Previous	21495,759			

a Computed using alpha = ,0

**2. ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ORAC****Within-Subjects Factors**

Measure: MEASURE\_1

orac	Dependent Variable
1	ORAC_0
2	ORAC_1.5
3	ORAC_3
4	ORAC_5

**Between-Subjects Factors**

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	16
2	tea with meal plus iron	19
3	water with meal	16

**Descriptive Statistics**

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	NI
ORAC baseline (micromol Trolox/L)	tea with meal	9597,5206	926,47113	16
	tea with meal plus iron	9836,9624	858,57518	19
	water with meal	9912,2143	831,66193	16
	Total	9785,4518	864,77144	51
ORAC t=1.5	tea with meal	9993,9254	847,75991	16
	tea with meal plus iron	10172,1384	756,96165	19
	water with meal	9788,7389	920,91962	16
	Total	9995,9462	837,76533	51
ORAC t=3	tea with meal	9987,4664	902,77876	16
	tea with meal plus iron	10223,5771	703,69441	19
	water with meal	9713,7278	726,12609	16
	Total	9989,5504	791,26853	51
ORAC t=5	tea with meal	9707,2865	1025,28905	16
	tea with meal plus iron	10285,4984	611,72373	19
	water with meal	9984,8581	1007,29648	16
	Total	10009,7801	901,57675	51

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Source	orac	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
orac	Linear	976753,820	1	976753,820	1,809	,185	1,809	,261
	Quadratic	433881,787	1	433881,787	1,033	,315	1,033	,169
	Cubic	146341,822	1	146341,822	,755	,389	,755	,136
orac * Interv	Linear	820804,965	2	410402,482	,760	,473	1,520	,172
	Quadratic	2347037,076	2	1173518,538	2,794	,071	5,587	,524
	Cubic	15254,072	2	7627,036	,039	,961	,079	,056
Error(orac)	Linear	25922248,630	48	540046,846				
	Quadratic	20163906,372	48	420081,383				
	Cubic	9302397,645	48	193799,951				

a Computed using alpha = ,05

### Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
ORAC baseline (micromol Trolox/L)	Intercept	9912,214	218,061	,000	9473,773	10350,655	45,456	1,000
	[Interv=1]	-314,694	308,385	,313	-934,743	305,356	1,020	,170
	[Interv=2]	-75,252	295,962	,800	-670,323	519,819	,254	,057
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
ORAC t=1.5	Intercept	9788,739	209,835	,000	9366,837	10210,641	46,650	1,000
	[Interv=1]	205,186	296,752	,493	-391,473	801,846	,691	,104
	[Interv=2]	383,399	284,797	,185	-189,224	956,023	1,346	,261
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
ORAC t=3	Intercept	9713,728	194,479	,000	9322,701	10104,754	49,947	1,000
	[Interv=1]	273,739	275,035	,325	-279,256	826,733	,995	,164
	[Interv=2]	509,849	263,955	,059	-20,868	1040,567	1,932	,473
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
ORAC t=5	Intercept	9984,858	221,629	,000	9539,243	10430,473	45,052	1,000
	[Interv=1]	-277,572	313,431	,380	-907,766	352,623	,886	,140
	[Interv=2]	300,640	300,804	,323	-304,167	905,447	,999	,165
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

### Estimates

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	9821,550	163,097	9493,621	10149,478
tea with meal plus iron	10129,544	149,668	9828,616	10430,472
water with meal	9849,885	163,097	9521,956	10177,813

**Pairwise Comparisons**

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	-307,994	221,362	,512	-857,145	241,157
	water with meal	-28,335	230,654	1,000	-600,537	543,867
tea with meal plus iron	tea with meal	307,994	221,362	,512	-241,157	857,145
	water with meal	279,659	221,362	,638	-269,492	828,810
water with meal	tea with meal	28,335	230,654	1,000	-543,867	600,537
	tea with meal plus iron	-279,659	221,362	,638	-828,810	269,492

Measure: MEASURE\_1

Based on estimated marginal means

a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	orac	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	orac	Level 2 vs. Level 1	2514187,950	,057	4,253	,488
		Level 3 vs. Previous	588248,513	,210	1,715	,232
		Level 4 vs. Previous	371373,271	,591	,301	,081
	orac * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(orac)	Level 2 vs. Level 1	591138,904			
		Level 3 vs. Previous	343013,418			
		Level 4 vs. Previous	1234423,655			
tea with meal plus iron	orac	Level 2 vs. Level 1	2134516,047	,152	2,236	,294
		Level 3 vs. Previous	911481,697	,073	3,613	,436
		Level 4 vs. Previous	821535,299	,124	2,603	,333
	orac * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(orac)	Level 2 vs. Level 1	954556,708			
		Level 3 vs. Previous	252286,245			
		Level 4 vs. Previous	315645,987			
water with meal	orac	Level 2 vs. Level 1	243938,582	,463	,566	,109
		Level 3 vs. Previous	299203,825	,422	,682	,121
		Level 4 vs. Previous	518195,466	,460	,575	,110
	orac * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(orac)	Level 2 vs. Level 1	430823,085			
		Level 3 vs. Previous	438911,845			
		Level 4 vs. Previous	901124,697			

a Computed using alpha = ,05

### 3. ΟΥΠΙΚΟ ΟΞΥ

#### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

factor1	Dependent Variable
1	UR_0
2	UR_1.5
3	UR_3
4	UR_5

#### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Type of Intervention	1 tea with meal	16
	2 tea with meal plus iron	16
	3 water with meal	16

#### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
uric acid baseline (mmol/L)	tea with meal	419,4663	118,13820	16
	tea with meal plus iron	376,8638	87,20389	16
	water with meal	398,2263	132,86362	16
	Total	398,1854	113,24312	48
uric acid t=1,5	tea with meal	401,8006	107,55087	16
	tea with meal plus iron	374,3456	86,66839	16
	water with meal	369,6600	100,22743	16
	Total	381,9354	97,46890	48
uric acid t=3	tea with meal	393,7794	94,39565	16
	tea with meal plus iron	367,7325	84,70520	16
	water with meal	367,5563	170,62674	16
	Total	376,3560	120,74863	48
uric acid t=5	tea with meal	398,7144	109,84586	16
	tea with meal plus iron	378,7850	82,19588	16
	water with meal	383,0363	132,24594	16
	Total	386,8452	107,99868	48

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Source	factor1	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
factor1	Linear	3763,584	1	3763,584	2,696	,108	2,696	,362
	Quadratic	8579,796	1	8579,796	4,502	,039	4,502	,546
	Cubic	69,930	1	69,930	,024	,878	,024	,053
factor1 * Interv	Linear	2006,294	2	1003,147	,719	,493	1,437	,164
	Quadratic	1960,293	2	980,146	,514	,601	1,029	,129
	Cubic	380,730	2	190,365	,065	,937	,129	,059
Error(factor1)	Linear	62813,337	45	1395,852				
	Quadratic	85754,882	45	1905,664				
	Cubic	132520,762	45	2944,906				

a Computed using alpha = ,05

**Parameter Estimates**

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
uric acid baseline (mmol/L)	Intercept	398,226	28,582	,000	340,658	455,794	13,933	1,000
	[Interv=1]	21,240	40,422	,602	-60,173	102,653	,525	,081
	[Interv=2]	-21,363	40,422	,600	-102,776	60,051	,528	,081
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
uric acid t=1,5	Intercept	369,660	24,632	,000	320,048	419,272	15,007	1,000
	[Interv=1]	32,141	34,835	,361	-38,021	102,303	,923	,147
	[Interv=2]	4,686	34,835	,894	-65,476	74,848	,135	,052
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
uric acid t=3	Intercept	367,556	30,686	,000	305,751	429,362	11,978	1,000
	[Interv=1]	26,223	43,397	,549	-61,183	113,629	,604	,091
	[Interv=2]	,176	43,397	,997	-87,230	87,582	,004	,050
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
uric acid t=5	Intercept	383,036	27,504	,000	327,640	438,433	13,926	1,000
	[Interv=1]	15,678	38,897	,689	-62,664	94,021	,403	,068
	[Interv=2]	-4,251	38,897	,913	-82,594	74,091	,109	,051
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	403,440	26,132	350,808	456,072
tea with meal plus iron	374,432	26,132	321,800	427,063
water with meal	379,620	26,132	326,988	432,251

### Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	29,008	36,956	1,000	-62,892	120,909
	water with meal	23,820	36,956	1,000	-68,080	115,721
tea with meal plus iron	tea with meal	-29,008	36,956	1,000	-120,909	62,892
	water with meal	-5,188	36,956	1,000	-97,089	86,713
water with meal	tea with meal	-23,820	36,956	1,000	-115,721	68,080
	tea with meal plus iron	5,188	36,956	1,000	-86,713	97,089

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	uricacid	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	uricacid	Level 2 vs. Level 1	4993,189	,052	4,452	,506
		Level 3 vs. Previous	4544,951	,284	1,233	,180
		Level 4 vs. Previous	635,250	,631	,241	,075
	uricacid * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(uricacid)	Level 2 vs. Level 1	1121,523			
		Level 3 vs. Previous	3685,602			
		Level 4 vs. Previous	2635,920			
tea with meal plus iron	uricacid	Level 2 vs. Level 1	101,455	,790	,073	,057
		Level 3 vs. Previous	991,541	,134	2,507	,317
		Level 4 vs. Previous	539,052	,425	,673	,120
	uricacid * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(uricacid)	Level 2 vs. Level 1	1381,347			
		Level 3 vs. Previous	395,433			
		Level 4 vs. Previous	800,402			
water with meal	uricacid	Level 2 vs. Level 1	13056,490	,150	2,305	,296
		Level 3 vs. Previous	4296,475	,555	,364	,087
		Level 4 vs. Previous	332,029	,689	,167	,067
	uricacid * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(uricacid)	Level 2 vs. Level 1	5665,378			
		Level 3 vs. Previous	11796,371			
		Level 4 vs. Previous	1990,618			

a Computed using alpha = ,05

#### 4. ΟΛΙΚΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

##### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

lipase	Dependent Variable
1	CHOL_0
2	CHOL_1.5
3	CHOL_3
4	CHOL_5

##### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	16
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	16

##### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
cholesterol baseline (mmol/L)	tea with meal	4,3688	,87589	16
	tea with meal plus iron	4,1363	1,43306	16
	water with meal	4,0544	1,31666	16
	Total	4,1865	1,21312	48
cholesterol t=1,5	tea with meal	4,1556	,83181	16
	tea with meal plus iron	4,1588	1,41397	16
	water with meal	3,9213	1,40159	16
	Total	4,0785	1,22413	48
cholesterol t=3	tea with meal	4,1163	,82682	16
	tea with meal plus iron	4,0488	1,47966	16
	water with meal	3,9831	1,24706	16
	Total	4,0494	1,19007	48
cholesterol t=5	tea with meal	4,1388	,85126	16
	tea with meal plus iron	4,0288	1,34019	16
	water with meal	3,9750	1,26060	16
	Total	4,0475	1,14735	48



**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Source	lipase	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
cholesterol	Linear	,477	1	,477	3,575	,065	3,575	,456
	Quadratic	,135	1	,135	1,369	,248	1,369	,209
	Cubic	,006	1	,006	,066	,798	,066	,057
cholesterol * Interv	Linear	,123	2	,061	,459	,635	,918	,120
	Quadratic	,157	2	,078	,796	,457	1,592	,177
	Cubic	,099	2	,050	,519	,598	1,039	,130
Error(cholesterol)	Linear	6,010	45	,134				
	Quadratic	4,434	45	,099				
	Cubic	4,308	45	,096				

a Computed using alpha = ,05

**Parameter Estimates**

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
cholesterol baseline (mmol/L)	Intercept	4,054	,308	,000	3,434	4,675	13,162	1,000
	[Interv=1]	,314	,436	,474	-,563	1,192	,722	,109
	[Interv=2]	,082	,436	,852	-,796	,959	,188	,054
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
cholesterol t=1,5	Intercept	3,921	,311	,000	3,294	4,549	12,591	1,000
	[Interv=1]	,234	,440	,597	-,653	1,121	,532	,082
	[Interv=2]	,238	,440	,592	-,650	1,125	,539	,082
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
cholesterol t=3	Intercept	3,983	,304	,000	3,371	4,595	13,114	1,000
	[Interv=1]	,133	,430	,758	-,732	,998	,310	,061
	[Interv=2]	,066	,430	,879	-,800	,931	,153	,053
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
cholesterol t=5	Intercept	3,975	,293	,000	3,386	4,564	13,585	1,000
	[Interv=1]	,164	,414	,694	-,670	,997	,396	,067
	[Interv=2]	,054	,414	,897	-,780	,887	,130	,052
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	4,195	,295	3,600	4,790
tea with meal plus iron	4,093	,295	3,498	4,688
water with meal	3,983	,295	3,388	4,579

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	,102	,418	1,000	-,937	1,141
	water with meal	,211	,418	1,000	-,828	1,251
tea with meal plus iron	tea with meal	-,102	,418	1,000	-1,141	,937
	water with meal	,110	,418	1,000	-,930	1,149
water with meal	tea with meal	-,211	,418	1,000	-1,251	,828
	tea with meal plus iron	-,110	,418	1,000	-1,149	,930

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	chol	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	chol	Level 2 vs. Level 1	,727	,088	3,326	,400
		Level 3 vs. Previous	,341	,217	1,663	,227
		Level 4 vs. Previous	,090	,605	,279	,078
	chol * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(chol)	Level 2 vs. Level 1	,219			
		Level 3 vs. Previous	,205			
		Level 4 vs. Previous	,321			
tea with meal plus iron	chol	Level 2 vs. Level 1	,008	,891	,019	,052
		Level 3 vs. Previous	,156	,100	3,083	,376
		Level 4 vs. Previous	,118	,203	1,770	,238
	chol * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(chol)	Level 2 vs. Level 1	,418			
		Level 3 vs. Previous	,051			
		Level 4 vs. Previous	,067			
water with meal	chol	Level 2 vs. Level 1	,284	,116	2,782	,345
		Level 3 vs. Previous	,000	,961	,002	,050
		Level 4 vs. Previous	,002	,875	,026	,053
	chol * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(chol)	Level 2 vs. Level 1	,102			
		Level 3 vs. Previous	,141			
		Level 4 vs. Previous	,079			

a Computed using alpha = ,05

## 5. ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

triglyc	Dependent Variable
1	TRGL_0
2	TRGL_1.5
3	TRGL_3
4	TRGL_5

### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	16
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	16

### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
triglycerides baseline (mmol/L)	tea with meal	2,16	1,694	16
	tea with meal plus iron	2,22	1,413	16
	water with meal	1,74	1,041	16
	Total	2,04	1,395	48
triglycerides t=1,5	tea with meal	2,1800	1,66640	16
	tea with meal plus iron	2,3556	1,26506	16
	water with meal	1,8394	1,06994	16
	Total	2,1250	1,34509	48
triglycerides t=3	tea with meal	2,3206	1,92587	16
	tea with meal plus iron	2,2063	1,19772	16
	water with meal	2,0000	1,13989	16
	Total	2,1756	1,44021	48
triglycerides t=5	tea with meal	2,0981	1,82267	16
	tea with meal plus iron	2,0644	1,21596	16
	water with meal	1,8381	1,16436	16
	Total	2,0002	1,40656	48

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Source	triglyc	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
triglyc	Linear	,010	1	,010	,055	,815	,055	,056
	Quadratic	,820	1	,820	9,498	,004	9,498	,854
	Cubic	,087	1	,087	,795	,377	,795	,141
triglyc * Interv	Linear	,459	2	,230	1,227	,303	2,454	,254
	Quadratic	,003	2	,002	,018	,982	,036	,053
	Cubic	,287	2	,144	1,310	,280	2,621	,269
Error(triglyc)	Linear	8,423	45	,187				
	Quadratic	3,886	45	,086				
	Cubic	4,934	45	,110				

a Computed using alpha = ,05

### Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
triglycerides baseline (mmol/L)	Intercept	1,738	,352	,000	1,028	2,447	4,935	,998
	[Interv=1]	,424	,498	,399	-,578	1,427	,852	,133
	[Interv=2]	,480	,498	,340	-,523	1,483	,964	,157
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
triglycerides t=1,5	Intercept	1,839	,339	,000	1,156	2,523	5,423	1,000
	[Interv=1]	,341	,480	,481	-,625	1,307	,710	,107
	[Interv=2]	,516	,480	,288	-,450	1,482	1,076	,184
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
triglycerides t=3	Intercept	2,000	,366	,000	1,262	2,738	5,459	1,000
	[Interv=1]	,321	,518	,539	-,723	1,364	,619	,093
	[Interv=2]	,206	,518	,692	-,837	1,250	,398	,068
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.
triglycerides t=5	Intercept	1,838	,358	,000	1,117	2,559	5,133	,999
	[Interv=1]	,260	,506	,610	-,760	1,280	,513	,079
	[Interv=2]	,226	,506	,657	-,794	1,246	,447	,072
	[Interv=3]	0(b)	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

### Estimates

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	2,190	,346	1,494	2,886
tea with meal plus iron	2,211	,346	1,515	2,907
water with meal	1,854	,346	1,158	2,550

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	-,021	,489	1,000	-1,236	1,194
	water with meal	,336	,489	1,000	-,879	1,552
tea with meal plus iron	tea with meal	,021	,489	1,000	-1,194	1,236
	water with meal	,357	,489	1,000	-,858	1,572
water with meal	tea with meal	-,336	,489	1,000	-1,552	,879
	tea with meal plus iron	-,357	,489	1,000	-1,572	,858

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	trigl	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	trigl	Level 2 vs. Level 1	,005	,719	,134	,064
		Level 3 vs. Previous	,359	,288	1,215	,178
		Level 4 vs. Previous	,241	,233	1,548	,214
	trigl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(trigl)	Level 2 vs. Level 1	,039			
		Level 3 vs. Previous	,295			
		Level 4 vs. Previous	,156			
tea with meal plus iron	trigl	Level 2 vs. Level 1	,305	,395	,768	,130
		Level 3 vs. Previous	,103	,610	,272	,078
		Level 4 vs. Previous	,611	,078	3,582	,425
	trigl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(trigl)	Level 2 vs. Level 1	,398			
		Level 3 vs. Previous	,380			
		Level 4 vs. Previous	,171			
water with meal	trigl	Level 2 vs. Level 1	,166	,147	2,341	,299
		Level 3 vs. Previous	,716	,048	4,654	,523
		Level 4 vs. Previous	,007	,821	,053	,055
	trigl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(trigl)	Level 2 vs. Level 1	,071			
		Level 3 vs. Previous	,154			
		Level 4 vs. Previous	,131			

a Computed using alpha = ,05

## 6. HDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

lipase	Dependent Variable
1	HDL_0
2	HDL_1.5
3	HDL_3
4	HDL_5

### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	14
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	16

### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
HDL baseline (mmol/L)	tea with meal	,8621	,32875	14
	tea with meal plus iron	,8544	,15979	16
	water with meal	,8481	,20044	16
	Total	,8546	,23056	46
HDL t=1.5	tea with meal	,8379	,28901	14
	tea with meal plus iron	,8544	,14841	16
	water with meal	,8394	,20927	16
	Total	,8441	,21477	46
HDL t=3	tea with meal	,8621	,31051	14
	tea with meal plus iron	,8506	,15416	16
	water with meal	,8306	,19854	16
	Total	,8472	,22156	46
HDL t=5	tea with meal	,8879	,32615	14
	tea with meal plus iron	,8488	,17530	16
	water with meal	,8400	,19201	16
	Total	,8576	,23170	46

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Source	lipase	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
lipase	Linear	,001	1	,001	,176	,677	,176	,069
	Quadratic	,006	1	,006	2,513	,120	2,513	,341
	Cubic	,000	1	,000	,108	,744	,108	,062
lipase * Interv	Linear	,008	2	,004	1,227	,303	2,455	,253
	Quadratic	,005	2	,003	1,140	,329	2,281	,238
	Cubic	,002	2	,001	,680	,512	1,359	,157
Error(lipase)	Linear	,142	43	,003				
	Quadratic	,096	43	,002				
	Cubic	,056	43	,001				

a Computed using alpha = ,05

**Parameter Estimates**

Dependent Variable	Parameter	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
HDL baseline (mmol/L)	Intercept	,059	,000	,729	,967	14,388	1,000
	[Interv=1]	,086	,872	-,160	,188	,162	,053
	[Interv=2]	,083	,941	-,162	,174	,075	,051
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
HDL t=1.5	Intercept	,055	,000	,729	,950	15,291	1,000
	[Interv=1]	,080	,985	-,164	,161	,019	,050
	[Interv=2]	,078	,848	-,142	,172	,193	,054
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
HDL t=3	Intercept	,057	,000	,717	,945	14,685	1,000
	[Interv=1]	,083	,705	-,135	,199	,381	,066
	[Interv=2]	,080	,804	-,141	,181	,250	,057
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
HDL t=5	Intercept	,059	,000	,721	,959	14,232	1,000
	[Interv=1]	,086	,583	-,126	,222	,554	,084
	[Interv=2]	,083	,917	-,160	,177	,105	,051
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	,863	,060	,741	,984
tea with meal plus iron	,852	,056	,738	,966
water with meal	,840	,056	,726	,953

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	,010	,083	1,000	-,195	,216
	water with meal	,023	,083	1,000	-,183	,229
tea with meal plus iron	tea with meal	-,010	,083	1,000	-,216	,195
	water with meal	,013	,080	1,000	-,186	,211
water with meal	tea with meal	-,023	,083	1,000	-,229	,183
	tea with meal plus iron	-,013	,080	1,000	-,211	,186

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	hdl	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	hdl	Level 2 vs. Level 1	,008	,150	2,347	,295
		Level 3 vs. Previous	,002	,235	1,548	,211
		Level 4 vs. Previous	,016	,116	2,834	,345
	hdl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(hdl)	Level 2 vs. Level 1	,004			
		Level 3 vs. Previous	,001			
		Level 4 vs. Previous	,006			
tea with meal plus iron	hdl	Level 2 vs. Level 1	,000	1,000	,000	,050
		Level 3 vs. Previous	,000	,778	,083	,058
		Level 4 vs. Previous	,000	,834	,045	,055
	hdl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(hdl)	Level 2 vs. Level 1	,002			
		Level 3 vs. Previous	,003			
		Level 4 vs. Previous	,007			
water with meal	hdl	Level 2 vs. Level 1	,001	,447	,609	,113
		Level 3 vs. Previous	,003	,241	1,488	,208
		Level 4 vs. Previous	6,25E-006	,970	,001	,050
	hdl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(hdl)	Level 2 vs. Level 1	,002			
		Level 3 vs. Previous	,002			
		Level 4 vs. Previous	,004			

a Computed using alpha = ,05



## 7. LDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

Idl	Dependent Variable
1	LDL_0
2	LDL_1.5
3	LDL_3
4	LDL_5

### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	13
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	15

### Descriptive Statistics

LDL baseline (mmol/L)	tea with meal	3,5677	1,53929	13
	tea with meal plus iron	2,8916	1,31301	16
	water with meal	2,7479	1,19594	15
	Total	3,0424	1,36031	44
LDL t=1.5	tea with meal	4,0214	2,16000	13
	tea with meal plus iron	2,6725	1,55117	16
	water with meal	2,6339	1,34140	15
	Total	3,0579	1,76801	44
LDL t=3	tea with meal	3,1025	1,50088	13
	tea with meal plus iron	2,9149	1,39203	16
	water with meal	2,7329	1,21557	15
	Total	2,9083	1,34455	44
LDL t=5	tea with meal	3,1306	,87839	13
	tea with meal plus iron	2,7698	1,20710	16
	water with meal	2,7220	1,17971	15
	Total	2,8601	1,09934	44

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Source	Idl	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
Idl	Linear	1,319	1	1,319	6,647	,014	6,647	,711
	Quadratic	,075	1	,075	,169	,683	,169	,069
	Cubic	,320	1	,320	,635	,430	,635	,122
Idl * Interv	Linear	2,178	2	1,089	5,487	,008	10,975	,823
	Quadratic	,606	2	,303	,683	,511	1,366	,157
	Cubic	3,996	2	1,998	3,969	,027	7,938	,680
Error(Idl)	Linear	8,138	41	,198				
	Quadratic	18,178	41	,443				
	Cubic	20,640	41	,503				

a. Computed using alpha = ,05

**Parameter Estimates**

Dependent Variable	Parameter	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
LDL baseline (mmol/L)	Intercept	,348	,000	2,046	3,450	7,905	1,000
	[Interv=1]	,510	,116	-,210	1,850	1,607	,348
	[Interv=2]	,484	,768	-,833	1,121	,297	,060
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
LDL t=1.5	Intercept	,437	,000	1,752	3,516	6,032	1,000
	[Interv=1]	,641	,052	,093	2,682	2,165	,561
	[Interv=2]	,608	,950	-1,189	1,266	,064	,050
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
LDL t=3	Intercept	,353	,000	2,019	3,447	7,734	1,000
	[Interv=1]	,519	,480	-,678	1,417	,713	,107
	[Interv=2]	,492	,713	-,811	1,175	,370	,065
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
LDL t=5	Intercept	,287	,000	2,143	3,301	9,490	1,000
	[Interv=1]	,421	,337	-,442	1,259	,971	,158
	[Interv=2]	,399	,905	-,759	,854	,120	,052
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.

a. Computed using alpha = ,05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	3,456	,357	2,734	4,177
tea with meal plus iron	2,812	,322	2,162	3,462
water with meal	2,709	,333	2,038	3,381

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	,643	,481	,565	-,557	1,844
	water with meal	,746	,488	,402	-,472	1,965
tea with meal plus iron	tea with meal	-,643	,481	,565	-1,844	,557
	water with meal	,103	,463	1,000	-1,052	1,258
water with meal	tea with meal	-,746	,488	,402	-1,965	,472
	tea with meal plus iron	-,103	,463	1,000	-1,258	1,052

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Type of Intervention	Source	Idl	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	Idl	Level 2 vs. Level 1	2,676	,216	1,707	,226
		Level 3 vs. Previous	6,227	,061	4,290	,478
		Level 4 vs. Previous	2,440	,121	2,780	,336
	Idl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(Idl)	Level 2 vs. Level 1	1,567			
		Level 3 vs. Previous	1,451			
		Level 4 vs. Previous	,878			
tea with meal plus iron	Idl	Level 2 vs. Level 1	,768	,408	,724	,125
		Level 3 vs. Previous	,282	,558	,359	,087
		Level 4 vs. Previous	,051	,282	1,243	,181
	Idl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(Idl)	Level 2 vs. Level 1	1,061			
		Level 3 vs. Previous	,786			
		Level 4 vs. Previous	,041			
water with meal	Idl	Level 2 vs. Level 1	,195	,158	2,220	,284
		Level 3 vs. Previous	,027	,429	,662	,118
		Level 4 vs. Previous	,004	,810	,060	,056
	Idl * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(Idl)	Level 2 vs. Level 1	,088			
		Level 3 vs. Previous	,040			
		Level 4 vs. Previous	,073			

Measure: MEASURE\_1  
a Computed using alpha = ,05

## 8. ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ ΛΙΠΑΣΗ

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

lipase	Dependent Variable
1	LIP_0
2	LIP_1.5
3	LIP_3
4	LIP_5

### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	14
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	16

### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
Lipase baseline (U/L)	tea with meal	38,6000	25,56494	14
	tea with meal plus iron	47,2375	47,85989	16
	water with meal	32,8375	7,67810	16
	Total	39,6000	31,76938	46
Lipase t=1.5	tea with meal	37,2143	15,32298	14
	tea with meal plus iron	50,6250	53,39364	16
	water with meal	34,9625	9,87569	16
	Total	41,0957	33,18104	46
Lipase t=3	tea with meal	37,6143	12,35525	14
	tea with meal plus iron	49,5250	50,60861	16
	water with meal	35,1625	9,64883	16
	Total	40,9043	31,15108	46
Lipase t=5	tea with meal	37,1214	10,51550	14
	tea with meal plus iron	47,2688	52,91948	16
	water with meal	37,8063	12,37144	16
	Total	40,8891	32,22916	46

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Source	lipase	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
lipase	Linear	25,783	1	25,783	,274	,603	,274	,081
	Quadratic	22,796	1	22,796	,774	,384	,774	,138
	Cubic	6,418	1	6,418	,317	,576	,317	,085
lipase * Interv	Linear	163,689	2	81,844	,870	,426	1,740	,190
	Quadratic	105,023	2	52,511	1,782	,180	3,565	,352
	Cubic	21,186	2	10,593	,523	,596	1,047	,131
Error(lipase)	Linear	4044,238	43	94,052				
	Quadratic	1266,913	43	29,463				
	Cubic	870,119	43	20,235				

a Computed using alpha = ,05

### Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
Lipase baseline (U/L)	Intercept	7,973	,000	16,758	48,917	4,118	,981
	[Interv=1]	11,672	,624	-17,776	29,301	,494	,077
	[Interv=2]	11,276	,208	-8,340	37,140	1,277	,239
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
Lipase t=1.5	Intercept	8,290	,000	18,245	51,680	4,218	,985
	[Interv=1]	12,135	,854	-22,220	26,724	,186	,054
	[Interv=2]	11,723	,189	-7,980	39,305	1,336	,257
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
Lipase t=3	Intercept	7,795	,000	19,443	50,882	4,511	,993
	[Interv=1]	11,410	,831	-20,559	25,462	,215	,055
	[Interv=2]	11,023	,200	-7,868	36,593	1,303	,247
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
Lipase t=5	Intercept	8,154	,000	21,363	54,250	4,637	,995
	[Interv=1]	11,936	,955	-24,756	23,386	,057	,050
	[Interv=2]	11,531	,416	-13,792	32,717	,821	,126
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

### Estimates

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	37,638	8,461	20,575	54,700
tea with meal plus iron	48,664	7,914	32,703	64,625
water with meal	35,192	7,914	19,231	51,153

### Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	-11,027	11,585	1,000	-39,889	17,836
	water with meal	2,445	11,585	1,000	-26,417	31,308
tea with meal plus iron	tea with meal	11,027	11,585	1,000	-17,836	39,889
	water with meal	13,472	11,193	,706	-14,412	41,355
water with meal	tea with meal	-2,445	11,585	1,000	-31,308	26,417
	tea with meal plus iron	-13,472	11,193	,706	-41,355	14,412

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	lipase	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	lipase	Level 2 vs. Level 1	26,883	,656	,208	,071
		Level 3 vs. Previous	1,201	,914	,012	,051
		Level 4 vs. Previous	6,629	,818	,055	,055
	lipase * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(lipase)	Level 2 vs. Level 1	129,140			
		Level 3 vs. Previous	99,163			
		Level 4 vs. Previous	120,581			
tea with meal plus iron	lipase	Level 2 vs. Level 1	183,603	,198	1,814	,243
		Level 3 vs. Previous	5,641	,673	,185	,069
		Level 4 vs. Previous	55,378	,479	,527	,104
	lipase * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(lipase)	Level 2 vs. Level 1	101,189			
		Level 3 vs. Previous	30,498			
		Level 4 vs. Previous	105,134			
water with meal	lipase	Level 2 vs. Level 1	72,250	,120	2,725	,340
		Level 3 vs. Previous	25,503	,245	1,463	,205
		Level 4 vs. Previous	194,370	,095	3,183	,386
	lipase * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(lipase)	Level 2 vs. Level 1	26,510			
		Level 3 vs. Previous	17,428			
		Level 4 vs. Previous	61,069			

a Computed using alpha = ,05

## 9. ГЛҮҮГЭ

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

lipase	Dependent Variable
1	GLU_0
2	GLU_1.5
3	GLU_3
4	GLU_5

### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	16
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	15

### Descriptive Statistics

<i>Type of Intervention</i>		<i>Mean</i>	<i>St. Dev</i>	<i>N</i>
glucose baseline	tea with meal	7,4506	2,53672	16
	tea with meal plus iron	6,0800	3,06675	16
	water with meal	6,4040	1,65624	15
	Total	6,6500	2,52106	47
glucose 1,5	tea with meal	11,5463	4,76050	16
	tea with meal plus iron	9,3838	4,63526	16
	water with meal	9,4693	3,18217	15
	Total	10,1472	4,30248	47
glucose 3	tea with meal	8,9788	4,76904	16
	tea with meal plus iron	8,0806	5,28501	16
	water with meal	7,7200	2,47588	15
	Total	8,2713	4,32157	47
glucose 5	tea with meal	7,4888	3,82050	16
	tea with meal plus iron	7,0069	4,10930	16
	water with meal	5,7187	1,49761	15
	Total	6,7598	3,39237	47

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Source	lipase	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
glucose	Linear	5,963	1	5,963	1,036	,314	1,036	,169
	Quadratic	294,645	1	294,645	69,717	,000	69,717	1,000
	Cubic	76,634	1	76,634	37,485	,000	37,485	1,000
glucose * Interv	Linear	11,800	2	5,900	1,025	,367	2,050	,218
	Quadratic	2,938	2	1,469	,348	,708	,695	,102
	Cubic	4,895	2	2,447	1,197	,312	2,394	,248
Error(glucose)	Linear	253,220	44	5,755				
	Quadratic	185,957	44	4,226				
	Cubic	89,954	44	2,044				

a Computed using alpha = ,05

### Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
glucose baseline	Intercept	,647	,000	5,101	7,707	9,903	1,000
	[Interv=1]	,900	,251	-,767	2,861	1,163	,206
	[Interv=2]	,900	,721	-2,138	1,490	,360	,064
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
glucose 1,5	Intercept	1,104	,000	7,245	11,694	8,580	1,000
	[Interv=1]	1,536	,183	-1,019	5,173	1,352	,262
	[Interv=2]	1,536	,956	-3,182	3,011	,056	,050
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
glucose 3	Intercept	1,132	,000	5,438	10,002	6,819	1,000
	[Interv=1]	1,576	,429	-1,917	4,435	,799	,122
	[Interv=2]	1,576	,820	-2,815	3,537	,229	,056
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
glucose 5	Intercept	,874	,000	3,958	7,479	6,546	1,000
	[Interv=1]	1,216	,153	-,680	4,221	1,456	,296
	[Interv=2]	1,216	,295	-1,162	3,739	1,059	,179
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

### Estimates

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	8,866	,822	7,210	10,522
tea with meal plus iron	7,638	,822	5,982	9,293
water with meal	7,328	,848	5,618	9,038



### Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	1,228	1,162	,889	-1,663	4,120
	water with meal	1,538	1,181	,599	-1,401	4,478
tea with meal plus iron	tea with meal	-1,228	1,162	,889	-4,120	1,663
	water with meal	,310	1,181	1,000	-2,630	3,249
water with meal	tea with meal	-1,538	1,181	,599	-4,478	1,401
	tea with meal plus iron	-,310	1,181	1,000	-3,249	2,630

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	gluc	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	gluc	Level 2 vs. Level 1	268,386	,000	24,228	,996
		Level 3 vs. Previous	4,321	,415	,702	,123
		Level 4 vs. Previous	53,961	,001	18,174	,978
	gluc * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(gluc)	Level 2 vs. Level 1	11,078			
		Level 3 vs. Previous	6,155			
		Level 4 vs. Previous	2,969			
tea with meal plus iron	gluc	Level 2 vs. Level 1	174,636	,000	24,100	,996
		Level 3 vs. Previous	1,946	,703	,151	,065
		Level 4 vs. Previous	11,323	,256	1,396	,198
	gluc * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(gluc)	Level 2 vs. Level 1	7,246			
		Level 3 vs. Previous	12,848			
		Level 4 vs. Previous	8,112			
water with meal	gluc	Level 2 vs. Level 1	140,944	,000	31,296	,999
		Level 3 vs. Previous	,704	,666	,195	,070
		Level 4 vs. Previous	69,065	,000	61,901	1,000
	gluc * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(gluc)	Level 2 vs. Level 1	4,504			
		Level 3 vs. Previous	3,617			
		Level 4 vs. Previous	1,116			

a Computed using alpha = ,05

## 10. C-Reactive Protein

### Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE\_1

crp	Dependent Variable
1	CRP_0
2	CRP_1.5
3	CRP_3
4	CRP_5

### Between-Subjects Factors

Type of Intervention	Value Label	N
1	tea with meal	14
2	tea with meal plus iron	16
3	water with meal	16

### Descriptive Statistics

	Type of Intervention	Mean	St. Dev	N
CRP baseline (mg/L)	tea with meal	4,7607	5,45235	14
	tea with meal plus iron	3,5594	3,58679	16
	water with meal	10,8638	25,68421	16
	Total	6,4657	15,60623	46
CRP t=1.5	tea with meal	5,0857	6,04700	14
	tea with meal plus iron	3,6525	3,68672	16
	water with meal	12,5500	32,66822	16
	Total	7,1835	19,66910	46
CRP t=3	tea with meal	5,4507	6,43061	14
	tea with meal plus iron	3,5550	3,51003	16
	water with meal	13,1581	33,92950	16
	Total	7,4722	20,44535	46
CRP t=5	tea with meal	5,4364	6,26312	14
	tea with meal plus iron	3,3650	3,16599	16
	water with meal	15,5175	42,21923	16
	Total	8,2224	25,26962	46

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Source	crp	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
crp	Linear	67,472	1	67,472	1,444	,236	1,444	,217
	Quadratic	,003	1	,003	,008	,931	,008	,051
	Cubic	1,601	1	1,601	,535	,468	,535	,110
crp * Interv	Linear	103,116	2	51,558	1,104	,341	2,207	,231
	Quadratic	2,524	2	1,262	2,912	,065	5,823	,539
	Cubic	4,711	2	2,355	,787	,462	1,574	,175
Error(crp)	Linear	2008,995	43	46,721				
	Quadratic	18,637	43	,433				
	Cubic	128,695	43	2,993				

a Computed using alpha = ,05

### Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		Noncent. Parameter	Observed Power(a)
CRP baseline (mg/L)	Intercept	3,902	,008	2,995	18,733	2,784	,777
	[Interv=1]	5,712	,291	-17,622	5,416	1,068	,181
	[Interv=2]	5,518	,193	-18,433	3,824	1,324	,253
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
CRP t=1.5	Intercept	4,925	,014	2,618	22,482	2,548	,702
	[Interv=1]	7,209	,306	-22,003	7,075	1,035	,173
	[Interv=2]	6,965	,208	-22,944	5,149	1,277	,239
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
CRP t=3	Intercept	5,114	,014	2,846	23,471	2,573	,711
	[Interv=1]	7,486	,309	-22,803	7,389	1,030	,172
	[Interv=2]	7,232	,191	-24,187	4,981	1,328	,255
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.
CRP t=5	Intercept	6,310	,018	2,791	28,244	2,459	,671
	[Interv=1]	9,238	,281	-28,710	8,548	1,091	,187
	[Interv=2]	8,924	,180	-30,150	5,845	1,362	,265
	[Interv=3]	.	.	.	.	.	.

a Computed using alpha = ,05

b This parameter is set to zero because it is redundant.

### Estimates

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
tea with meal	5,183	5,407	-5,720	16,087
tea with meal plus iron	3,533	5,058	-6,667	13,733
water with meal	13,022	5,058	2,823	23,222

### Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE\_1

(I) Type of Intervention	(J) Type of Intervention	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
tea with meal	tea with meal plus iron	1,650	7,404	1,000	-16,794	20,095
	water with meal	-7,839	7,404	,887	-26,283	10,605
tea with meal plus iron	tea with meal	-1,650	7,404	1,000	-20,095	16,794
	water with meal	-9,489	7,152	,575	-27,308	8,329
water with meal	tea with meal	7,839	7,404	,887	-10,605	26,283
	tea with meal plus iron	9,489	7,152	,575	-8,329	27,308

Based on estimated marginal means  
a Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

### Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE\_1

Type of Intervention	Source	crp	Mean Square	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power(a)
tea with meal	crp	Level 2 vs. Level 1	1,479	,144	2,418	,302
		Level 3 vs. Previous	3,896	,108	2,978	,359
		Level 4 vs. Previous	1,594	,221	1,654	,222
	crp * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(crp)	Level 2 vs. Level 1	,612			
		Level 3 vs. Previous	1,308			
		Level 4 vs. Previous	,964			
tea with meal plus iron	crp	Level 2 vs. Level 1	,139	,311	1,097	,166
		Level 3 vs. Previous	,042	,507	,462	,098
		Level 4 vs. Previous	,803	,597	,292	,080
	crp * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(crp)	Level 2 vs. Level 1	,126			
		Level 3 vs. Previous	,090			
		Level 4 vs. Previous	2,752			
water with meal	crp	Level 2 vs. Level 1	45,495	,356	,906	,145
		Level 3 vs. Previous	33,698	,247	1,453	,204
		Level 4 vs. Previous	177,090	,266	1,337	,191
	crp * Interv	Level 2 vs. Level 1	.	.	,000	.
		Level 3 vs. Previous	.	.	,000	.
		Level 4 vs. Previous	.	.	,000	.
	Error(crp)	Level 2 vs. Level 1	50,234			
		Level 3 vs. Previous	23,191			
		Level 4 vs. Previous	132,457			

a Computed using alpha = ,05

## ΑΔΕΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΔΙΟΙΚΗΣΗ 2<sup>ης</sup> ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΙΩΣ ΚΑΙ ΑΙΓΑΙΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ  
«ΑΤΤΙΚΟΝ»

### ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ

*1ης Συνεδρίασης*

στις 20/02/09

#### ΑΠΟΦΑΣΗ

**Θέμα :** Έγκριση διεξαγωγής κλινικής μελέτης «Μελέτη της μεταγευματικής επίδρασης της κατανάλωσης πράσινου τσαγιού στην αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος και σε δείκτες φλεγμονής σε άτομα με σταθερή στεφανιαία νόσο» (Β' Καρδ. Κλιν., 24/28-01-09)

Το Επιστημονικό Συμβούλιο (παρόντες: Καθηγητής Δημήτριος Κρεμαστινός, ο οποίος δεν ψήφισε για λόγους δεοντολογίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυριακή Κανελλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γεωργία Γερολουκά - Κωστοπαναγιώτου, Λέκτορας Ιωάννης Κακίσης, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλεάνθη Δήμα, Επίκουρος Καθηγητής Παναγιώτης Χαλβατσιώτης, Ειδικευόμενη Ιατρός Αικατερίνη Δημουλά, Τομεάρχης Νικόλαος Γράσσο) αφού έλαβε υπόψη του:

- 1) την αριθμ. 1/20-02-09 απόφαση της Επιτροπής Βιοηθικής Δεοντολογίας (Θέμα 32<sup>ο</sup>) (Παρόντες: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυριακή Κανελλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γεωργία Γερολουκά - Κωστοπαναγιώτου, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Αθανασία Τζιώκα, Επίκουρος Καθηγητής Παναγιώτης Χαλβατσιώτης, Λέκτορας Ιωάννης Κακίσης)
- 2) τις διαδικασίες και τους κανονισμούς υποβολής πρωτοκόλλων για διενέργεια κλινικής δοκιμής στο Νοσοκομείο

- 3) το γεγονός ότι οι φάκελοι είναι πλήρεις και καλύπτουν όλες τις προϋποθέσεις για τη διεξαγωγή της μελέτης
- 4) ότι από τη διενέργεια της μελέτης δεν προκύπτει οικονομική επιβάρυνση για το Νοσοκομείο

**Ομόφωνα Αποφασίζει**

Εγκρίνει τη κλινική μελέτη «Μελέτη της μεταγευματικής επίδρασης της κατανάλωσης πράσινου τσαγιού στην αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος και σε δείκτες φλεγμονής σε άτομα με σταθερή στεφανιαία νόσο», που θα διεξαχθεί στην Β΄ Καρδιολογική Κλινική.

**Υπεύθυνος Μελέτης:** Λέκτορας Λουκιανός Ραλλίδης

**Διευθυντής:** Καθηγητής Δημήτριος Κρεμαστινός

Παραπέμπει το θέμα στο Δ/κό Συμβούλιο για ενημέρωση και περαιτέρω έγκριση.

**Ο Πρόεδρος του Επιστημονικού Συμβουλίου**

**Καθηγητής Δημήτριος Κρεμαστινός**