

Επίδραση πρότυπων φαινολικών
ενώσεων και εκχυλισμάτων λευκού
και κόκκινου κρασιού στα ένζυμα
μεταβολισμού του PAF

Ασημακόπουλος Δημήτρης

Χημικός

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων και εκχυλισμάτων λευκού και κόκκινου κρασιού στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF

Ασημακόπουλος Δημήτρης

Χημικός

Τριμελής επιτροπή

Ε. Φραγκοπούλου (Επιβλέπουσα)

Σ. Αντωνοπούλου

Τ. Νομικός

Αθήνα 2011

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Εφαρμοσμένης Διαιτολογίας-Διατροφής, κατά την περίοδο 2009-2011.

Επιβλέπουσα της εργασίας ήταν η λέκτορας κα. Ελισάβετ Φραγκοπούλου. Το επιστημονικό της έργο και η προσωπική της στάση αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον μου για το κομμάτι της βιοχημείας των τροφίμων καθώς και για την ερευνητική αναζήτηση γενικότερα. Για το λόγο αυτό, για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση αλλά και για το προσωπικό ενδιαφέρον που έδειξε σε όλα τα στάδια αυτής της διαδικασίας, την ευχαριστώ θερμά.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια, συνάδελφο και φίλη Μαριάννα Ξανθοπούλου. Οι επιστημονικές τις συμβουλές, η ανεξάντλητη πρακτική βοήθεια και η συνεχής στήριξη σε προσωπικό επίπεδο, συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Επίσης, ευχαριστώ τις διαιτολόγους Μαρία Σαραντοπούλου και Ιωάννα Μπακογιάννη για τη συνεργασία, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθηγήτρια κα. Σμαραγδή Αντονοπούλου και τον επίκουρο καθηγητή κ. Τζώρτζη Νομικό για την υποστήριξη, τη συνάδελφο Νατάσα Μικελλή και τη διαιτολόγο Ιωάννα Βλαχογιάννη για την βοήθεια τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο καθώς και για την αρμονική συνύπαρξη στην καθημερινότητα του εργαστηρίου.

Μέρος της έρευνας έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας της σχολής Θετικών επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών, τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του οποίου ευχαριστώ για τη συνεργασία και τη φιλοξενία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Θανάση και Αργυρώ Ασημακοπούλου, τη Δήμητρα Μ. και τους φίλους μου για την υπομονή και την ηθική στήριξη.

Στον Μανώλη Δράγαζη

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAG	Αλκυλοακετυλογλυκερόλη
AAGPC	1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη
AAPA	1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ
ADP	Αδενόσινο-διφωσφορικό οξύ
ALPA	Ακετυλολυσωφωσφατιδικό οξύ
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
bFGF	Βασικός παράγοντας ανάπτυξης ινοβλαστών
cAMP	Κυκλική τριφωσφορική αδενοσίνη
CoA	Συνένζυμο A
CPT	κυτίδυλοδιφωσφορικό οξύ
DHAP	Φωσφοδιυδρόξυ ακετόνη
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ Αιθυλενογλυκολη-δι(β-αμινο-αιθυλειθέρας)-N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ
EGTA	οξύ
GC	Αέρια χρωματογραφία
GPX	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Αναγωγή της γλουταθειόνης
GSH	Γλουταθειόνη
GST	Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HL	Κυτταρική σειρά ανθρώπινων λευκοκυττάρων
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
ICAM	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης
Ig-	Ανοσοσφαιρίνη-
IL-4	Ιντερλευκίνη-4
iNOS	Επαγόμενη συνθάση του NO
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
Lpa	Λιποπρωτεΐνη α
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
MAPK	Πρωτεϊνική Κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνα
MCP1	Πρωτεΐνη χημειοτακτισμού μονοκυττάρων
MCSF	Παράγοντας διέγερσης αποικιών μονοκυττάρων

NADPH	Νικοτινάμιδο-αδένινο-φωσφορικό-δινουκλεοτίδιο
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κάπα Β
NQO1	Οξειδωαναγωγή της κινώνης
OxLDL	Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAF-AH	PAF-ακετυλουδρολάση
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PDGF	Αιμοπεταλικός αυξητικός παράγοντας
PECAM	Μόριο προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων –αιμοπεταλίων
PLA₂	Φωσφολιπάση A ₂
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	Πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα
RNS	Ενεργές ρίζες αζώτου
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
Sn	Σύστημα στερεοειδικής αρίθμησης
SOD	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
TGF	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TNF	Ογκονεκρωτικός παράγοντας
Tris	Τρι-υδοξυλαμινομεθάνιο
VCAM	Αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης
λυσο-PAF AT	Ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση
NO	Οξείδιο του αζώτου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΛΕΓΜΟΝΗ- ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	1
1.1 Φλεγμονή	1
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά φλεγμονής	1
1.1.2 Οξεία και χρόνια φλεγμονή	1
1.2 Αθηροσκλήρυνση	3
1.2.1 Δομή του αγγειακού τοιχώματος.....	3
1.2.2 Ενδοθήλιο: Δομή και Λειτουργία.....	4
1.2.3 Σταδια αθηρωματικής διαδικασίας	5
1.2.3.1 Έναρξη-εξέλιξη αθηρωματικής διαδικασίας	5
1.2.3.2 Σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας	6
1.2.3.3 Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και θρόμβωση	7
1.3. Κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση	8
1.3.1 Μονοκύτταρα/Μακροφάγα.....	8
1.3.2 Λεμφοκύτταρα	9
1.3.3 Αιμοπετάλια	9
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)	11
2.1 Εισαγωγή.....	11
2.2 Χημική δομή του PAF	12
2.3 Παραγωγή Κύτταρα.....	12
2.4 Βιολογικές Δράσεις.....	13
2.5 Μεταβολισμός του PAF	14
2.5.1 Βιοσύνθεση	14
2.5.1.1 Σύνθεση αιθερικών λιποειδών	15
2.5.1.2 Πορεία εξ' υπαρχής βιοσύνθεσης του PAF (DE NOVO PATHWAY)	15
2.5.1.3 Πορεία ανασχηματισμού (Remodeling Pathway).....	16
2.5.1.4 Ένζυμα βιοσύνθεσης του PAF	17
2.5.1.4.1 DTT - ανεξάρτητη CDP-χολίνη : αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινο-τρανσφεράση	18
2.5.1.4.2 Ακετυλο-CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο-PAF AT).....	18
2.5.2 Αποικοδόμηση του PAF	19
2.5.2.1 Ένζυμα αποικοδόμησης του PAF.....	20
2.6 PAF και Φλεγμονή.....	21
2.7 PAF και Αθηροσκλήρωση.....	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΡΑΣΙ.....	25
3.1 Γενικά.....	25
3.2 Σύσταση του κρασιού.....	25
3.2.1 Νερό	26
3.2.2 Οργανικά συστατικά	26
3.2.2.1 Οργανικά οξέα	26
3.2.2.2 Αλκοόλες	26
3.2.2.3 Αρωματικές ενώσεις.....	28
3.2.2.4 Σάκχαρα.....	28
3.2.2.5 Πολυζακχαρίτες	28
3.2.2.6 Φαινολικές ενώσεις	29
3.2.3 Αζωτούχες ενώσεις.....	31
3.2.4 Ένζυμα.....	31
3.2.5 Βιταμίνες	31
3.2.6 Λιποειδή.....	32
3.2.7 Ανόργανα συστατικά	32
3.3 Βιολογικές δράσεις	32
3.3.1 Αντιοξειδωτική δράση	34
3.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση	36
3.3.3 Αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων.....	37
3.3.4 Επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF	38
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ.....	 39
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	 40
5.1 Δείγματα	40
5.2 Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL) με την μέθοδο Bligh-Dyer	40
5.3 Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα και πολικά– Κατανομή κατά αντιρροή	41
5.4 Εκχύλιση διαφορετικών τάξεων φαινολικών ενώσεων	42
5.5 Χημικοί προσδιορισμοί	43
5.5.1 Προσδιορισμός ορθο-φαινολικών	43
5.5.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών	44
5.5.3 Προσδιορισμός φωσφόρου	45
5.5.4 Προσδιορισμός σακχάρων	46
5.6 Καλλιέργεια μονοκυττάρων.....	47

5.7 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	48
5.8 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης (λυσο-PAF AT)	50
5.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CDP – χολίνη : αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινوترανσφεράση (CPT-PAF).....	52
5.10 Προσδιορισμός του παραγόμενου PAF	53
5.11 Βιολογική δοκιμασία in vitro	54
5.12 Προσδιορισμός δραστηριότητας PAF ακετολουϊδρολάσης (PAF AH)	57
5.12.1 Με ραδιενέργεια.....	57
5.12.2 Προσδιορισμός δραστηριότητας PAF ακετολουϊδρολάσης (PAF-AH) με χρήση ανασυνδιασμένης PAF-AH (Human Recombinant).....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
6.1 Δείγματα.....	62
6.2 Επεξεργασία οίνων-απομόνωση δειγμάτων	62
6.2.1 Μέθοδος 1.....	62
6.2.1.1 Απομόνωση ολικών λιποειδών (TL) με τη μέθοδο Bligh –Dyer	62
6.2.1.2 Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα και πολικά με κατανομή κατά αντιρροή ...	62
6.2.2 Μέθοδος 2: Εκχύλιση διαφορετικών τάξεων φαινολικών ενώσεων.....	63
6.3 Χημικοί προσδιορισμοί.....	65
6.4 Ανίχνευση Δραστηριότητας της λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράσης (AT)	68
6.4.1 Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δραστηριότητα της λυσο-PAF AT ..	69
6.4.1.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων.....	69
6.4.1.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων	72
6.4.2 Επίδραση κλασμάτων του λευκού κρασιού στην δραστηριότητα της λυσο-PAF AT	74
6.4.2.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων.....	74
6.4.2.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων	76
6.4.3 Επίδραση κλασμάτων του κόκκινου κρασιού στην δραστηριότητα της λυσο-PAF AT	77
6.4.3.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων.....	77
6.4.3.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων	80
6.5 Ανίχνευση Δραστηριότητας της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινوترανσφεράση (PAF CPT)	81
6.5.1 Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δραστηριότητα της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλ-γλυκερόλη φωσφοχολινوترανσφεράση	81
6.5.1.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων.....	81
6.5.1.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων	83

6.5.2 Επίδραση κλασμάτων του λευκού κρασιού στην δραστικότητα της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλ-γλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση.....	85
6.5.2.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων.....	86
6.5.2.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων	87
6.5.3 Επίδραση κλασμάτων του κόκκινου κρασιού στην δραστικότητα της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλ-γλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση.....	87
6.5.3.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων.....	88
6.5.3.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων	89
6.6 Ανίχνευση Δραστικότητας της PAF ακετολοϋδρολάσης	89
6.6.1 Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF ακετολοϋδρολάσης	89
6.6.2 Επίδραση κλασμάτων του λευκού και κόκκινου κρασιού στην δραστικότητα της PAF ακετολοϋδρολάσης	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	93
7.1 Επίδραση στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF	96
7.2 Επίδραση στο αποικοδομητικό ένζυμο του PAF.....	98
7.3 Συμπεράσματα.....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο PAF αποτελεί έναν ισχυρό φλεγμονώδη μεσολαβητή ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών. Στο πλαίσιο αυτό η μελέτη των ενζύμων μεταβολισμού του PAF, τα οποία καθορίζουν τα επίπεδα του στον οργανισμό, αποκτά ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η βιοσύνθεση του PAF γίνεται μέσω δυο πορειών της εξ' ύπαρξης πορείας (de novo) και της πορείας ανασχηματισμού (remodeling). Το κύριο ένζυμο στην remodeling πορείας είναι η ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράση (λυσο-PAF AT) ενώ της εξ' ύπαρξης πορείας η CDP-χολίνη:αλκυλο-ακετυλο-γλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF-CPT). Η αποικοδόμηση του PAF γίνεται κυρίως μέσω της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH). Προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει τις ευεργετικές ιδιότητες της μετριοπαθούς κατανάλωση κρασιού έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα για την επίδραση εκχυλισμάτων κρασιού στον μεταβολισμό του PAF.

Σκοπός: Η διερεύνηση της επίδρασης πρότυπων φαινολικών ενώσεων καθώς και εκχυλισμάτων κρασιού, στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, λυσο-PAF AT και PAF-CPT, και στο αποικοδομητικό ένζυμο PAF-AH.

Υλικά και μέθοδος: Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη κρασιών, το κόκκινο Cabernet Sauvignon, κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon, και το λευκό Αμπελόν, κύρια ποικιλία Ρομπόλα, τα οποία επεξεργάστηκαν με δυο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης. Με τον πρώτο τρόπο (Bligh-Dyer) παρελήφθησαν τα ολικά λιποειδή τα οποία στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα και προέκυψε και ένα υδατικό κλάσμα (W). Με τον δεύτερο, διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα και νερό διαφορετικού pH, παρελήφθησαν διαφορετικής τάξεως φαινολικά κλάσματα.

Η μελέτη της επίδρασης τόσο των πρότυπων φαινολικών όσο και των προϊόντων εκχύλισης στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF έγινε α) πραγματοποιώντας τις ενζυμικές αντιδράσεις παρουσία και απουσία των ενώσεων σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων χρησιμοποιώντας ως πηγή των ενζύμων ομογενοποίημα U937 μονοκυττάρων και β) επωάζοντας τα U937 μονοκύτταρα παρουσία και απουσία των ενώσεων για 24h, παραλαβή του ομογενοποιημάτος και πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων. Και στις δυο περιπτώσεις ο υπολογισμός της δραστηριότητας των βιοσυνθετικών ενζύμων έγινε με διαχωρισμό του παραγόμενου PAF με χρωματογραφία TLC και ποσοτικό προσδιορισμό του με βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της PAF-AH έγινε με χρήση ραδιενεργού υποστρώματος ή με μέτρηση φασματοφωτομετρικά του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις ως % αναστολή των ενζύμων σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (απουσία ένωσης).

Αποτελέσματα: Τα πολικά λιποειδή και των δύο κρασιών εμφανίζουν παρόμοια αναστολή της δράσης της λυσο-PAF-AT (IC50: 1,13 και 1,17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα) ενώ τα PL του λευκού είναι καλύτεροι αναστολείς της PAF CPT έναντι αυτών του κόκκινου (IC50: 0,876 και 2,302 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα). Η κερκετίνη παρουσιάζει καλύτερη ανασταλτική ικανότητα στη δράση της λυσο-PAF-AT (IC50: 566 μM) σε σχέση με τη ρεσβερατρόλη (IC50: 745 μM), ενώ η ρεσβερατρόλη είναι πιο ισχυρός αναστολέας της PAF-CPT (IC50: 22,6 μM) έναντι της κερκετίνης (IC50: 95,7 μM).

Τα κλάσματα, και των δύο κρασιών, που προέκυψαν από τον δεύτερο τρόπο εκχύλισης είναι αναστολείς της δράσης της λυσο-PAF-AT. Πιο συγκεκριμένα, τα κλάσματα FI, FII, FIII και FIV του κόκκινου είναι καλύτεροι αναστολείς του ενζύμου (στα 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 86,5 99,9 89 και 19,3 % αναστολή αντίστοιχα) έναντι αυτών του λευκού (IC50: 3,36 , 0,67 , 0,68 , 0,58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα). Όσον αφορά την επίδραση των PL και των δυο κρασιών στη δράση της PAF-AH ποσότητα ίση με 0,85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ δεν έδειξε σημαντική αναστολή του ενζύμου (τόσο του ανασυνδιασμένου όσο και του προερχόμενου από τα μονοκύτταρα). Ανάλογη δράση παρουσίασαν και τα πρότυπα φαινολικά όπου ακόμα και σε μεγάλες ποσότητες δεν παρουσίασαν σημαντική δράση. Τα φαινολικά κλάσματα FI, FII, FIII και FIV του κόκκινου κρασιού, σε συγκέντρωση 0,85 mg/mL έδειξαν μεγαλύτερη % αναστολή της ανασυνδιασμένης PAF AH (71,84 , 99 ,71 , 54,26 και 22,22 % αντίστοιχα) σε σχέση με αυτά του λευκού στις ίδιες συγκεντρώσεις (14,27 , 33,52 , 14,17 και 12,79 % αντίστοιχα).

Επώαση των κυττάρων με ρεσβερατρόλη και κερκετίνη έδειξε αναστολή και της λυσο-PAF-AT (IC50: 94,01 και 81,91 μM αντίστοιχα) και της PAF-CPT (IC50: 0,40 μM και 0,14 μM αντίστοιχα). Τα PL του κόκκινου κρασιού που επώαστηκαν με τα κύτταρα έδειξαν αναστολή της δράσης της λυσο-PAF-AT (IC50: 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) και σε συγκέντρωση 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ έδειξαν 31 % αναστολή της PAF-CPT. Τα PL του λευκού δεν έδειξαν σημαντική αναστολή σε συγκέντρωση από 0.00001 μέχρι 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ της λυσο-PAF-AT ενώ ανέστειλαν την PAF-CPT με IC50: 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Συμπεράσματα: Τα συστατικά του λευκού και του κόκκινου κρασιού και οι πρότυπες φαινολικές ενώσεις μπορούν να τροποποιήσουν τον μεταβολισμό του PAF αναστέλλοντας τα βιοσυνθετικά του ένζυμα και μη επηρεάζοντας σε σημαντικό βαθμό το κύριο αποικοδομητικό του ένζυμο. Επίσης, τόσο οι πρότυπες φαινολικές ενώσεις όσο και τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχουν τα δύο κρασιά εμφάνισαν καλύτερη ανασταλτική δράση σε συστήματα ακέραιων κυττάρων.

SUMMARY

Background: PAF is a strong inflammatory mediator that plays a predominant role in the formation of atherosclerotic plaques. PAF biosynthesis can be achieved either by de novo or remodelling pathway. The main enzyme in remodelling pathway is acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase (lyso-PAF-AT), while in de novo is CDP-choline: alkylacetylgllycerol cholinephosphotransferase (PAF-CPT). PAF catabolism is mainly achieved through PAF-acetylhydrolase (PAF-AH). Previous research has demonstrated the beneficial qualities of moderate wine consumption against cardiovascular diseases. Nevertheless, the bibliography lacks data concerning the effect of wine extracts on the metabolism of PAF.

Aim: To examine the effect of both phenolic standards and wine extracts in the biosynthetic PAF enzymes lyso-PAF AT, PAF-CPT and the deconstructing enzyme PAF-AH.

Material and Method: Two different kinds of wine were used, red wine Cabernet Sauvignon (main variety Cabernet Sauvignon) and white wine Ambelon (main variety Robola) which were processed with two different methods of extraction. In the first extraction (Bligh-Dyer), the total lipids were delivered, which were then separated in polar (PL) and neutral (NL) ones. An aqueous fraction (W) occurred as well. In the second extraction method, successive extractions with acid ethyl and water of a different pH, resulted in different classes of phenolic fractions.

In order to study the effect of standard phenolics and wine extracts on the PAFs metabolism a) enzymatic reactions were performed in the presence or absence of the compounds using U937 monocytes homogenates as a source of enzymes (free cells system) and b) incubation of U937 monocytes in the presence or absence of the compounds for 24 hours was performed, homogenates were obtained and enzymatic reactions were performed. In both cases the specific activity of biosynthetic enzymes was calculated after TLC separation of the produced PAF and its quantification by the washed rabbit platelet aggregation assay. PAF-AH activity was measured by the trichloroacetic acid precipitation method using [^3H] PAF as a substrate or by spectrophotometry method using thio-PAF as substrate. The results were expressed as % activity of the enzymes compared to the reference sample (absence of compound).

Results: Both red and white wine PLs inhibit lyso-PAF-AT in a similar manner (IC_{50} : 1,13 and 1,17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectively), while white wine PL is more potent inhibitor of PAF-CPT compared to red wine PL (IC_{50} : 0,876 and 2,302 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectively). Quercetin exhibits a greater inhibition capacity of lyso-PAF-AT (IC_{50} : 566 μM) than resveratrol (IC_{50} : 745 μM). However, resveratrol is a greater PAF inhibitor (IC_{50} : 22,6 μM) than quercetin (IC_{50} : 95,7 μM).

The phenolic fractions from the second extraction method namely fractions FI, FII, FIII and FIV of the red wine are greater inhibitors of the lyso-PAF-AT (in 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 86,5 99,9 89 and 19,3

% inhibition ratio perspective) than those of the white wine (IC_{50} : 3,36 , 0,67 , 0,68 , 0,58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectively).

As far as concerning the effect of the PL of both wines in the activity of PAF-AH a amount of 0.85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ has shown no inhibition of the U937 PAF-AH enzyme. Similarly, phenolic standards even in greater amount have shown no inhibitory activity. The phenolic fractions FI, FII, FIII and FIV, in concentration of 0,85 mg/mL of red wine are more potent inhibitors of recombinant PAF-AH (71,84 , 99 ,71 , 54,26 and 22,22 % respectively) compared to the corresponded ones of white wine (14,27 , 33,52 , 14,17 και 12,79 % respectively).

The incubation of U937 cells with resveratrol and quercetin for 24h is leading to inhibition of lyso PAF-AT (IC_{50} : 94,01 and 81,91 μM respectively) and PAF-CPT (IC_{50} : 0,40 μM and 0,14 μM respectively). The incubation of cells with red wine PL for 24h results in inhibition of lyso-PAF-AT (IC_{50} : 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and an amount of 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ inhibits PAF-CPT approximately 31%. The incubation of cells with white wine PL in range of concentrations from 0.00001 to 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ has shown no significant inhibition of lyso-PAF-AT, while inhibit PAF-CPT with IC_{50} : 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Conclusion: Red and white wine compounds, as well as the phenolic standards can modify PAF metabolism by inhibiting PAF biosynthetic enzymes without, however, affecting its main catabolic enzyme. It is also should mention that wine compounds are more potent inhibitors of the PAF metabolic enzymes in cell culture systems compared to cell free systems.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΦΛΕΓΜΟΝΗ- ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

1.1 Φλεγμονή

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά φλεγμονής

Η φλεγμονή είναι η εντοπισμένη απόκριση του σώματος στη μόλυνση ή τον κυτταρικό τραυματισμό και αποτελεί προστατευτική διαδικασία του οργανισμού, απαραίτητη για την επιβίωση. Σκοπός της είναι ο περιορισμός, η απενεργοποίηση ή η καταστροφή του επιβλαβή παράγοντα, η καταστροφή των νεκρών ιστών και κυττάρων και η επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης. Τα χαρακτηριστικά της δράσης της είναι ανεξάρτητα του αιτίου και διαφέρουν μόνο ποσοτικά ανάλογα με την ένταση και την έκταση της βλάβης ¹.

1.1.2 Οξεία και χρόνια φλεγμονή ²

Η πρωταρχική και άμεση απόκριση του οργανισμού σε έναν επιβλαβή παράγοντα καλείται οξεία φλεγμονή. Είναι σχετικά σύντομης χρονικής διάρκειας μιας και μπορεί να διαρκέσει από μερικά λεπτά της ώρας έως μερικές ημέρες. Εκδηλώνει, κατά κύριο λόγο, χαρακτηριστικά μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης με παράλληλη συμμετοχή και της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης σε βαθμό που ποικίλει.

Η έναρξη της φλεγμονώδους διαδικασίας γίνεται από ειδικούς φλεγμονώδεις μεσολαβητές, οι οποίοι απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Τέτοιοι μεσολαβητές είναι πρωτεΐνες του συμπληρώματος (C3), πρωτεΐνες του συστήματος πήξης (XIa, XIIa, XIa, XIa ή θρομβίνη), οι κινίνες, τα εικοσανοειδή, κυτταροκίνες, το οξειδίο του αζώτου, τα ελεύθερα είδη οξυγόνου (ROS) και άλλα μόρια. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της φλεγμονής, περιλαμβάνει τους εξής μηχανισμούς:

1. Έκκριση ισταμίνης και άλλων αγγειοδραστικών ουσιών όπως οι προσταγλανδίνες και ο PAF από τα PMN (κυρίως βασεόφιλα) και τα σιτευτικά κύτταρα (κύτταρα που μοιάζουν με τα βασεόφιλα και βρίσκονται σε διάφορους ιστούς). Οι ουσίες αυτές προκαλούν αγγειοδιαστολή αυξάνοντας έτσι τον ανεφοδιασμό του προσβληθέντος ιστού με αίμα.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση ερυθρότητας και την αύξηση της θερμοκρασίας τοπικά στο σημείο της βλάβης.

2. Αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων με τη δράση των παραπάνω ουσιών. Αυτό επιτρέπει την έξοδο από τα αγγεία και την συσσώρευση στο σημείο της βλάβης διαφόρων ανοσοσφαιρινών, υγρού καθώς και ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων. Αυτά, εξέρχονται από τα αγγεία (μετανάστευση) και προσελκύονται στο σημείο της βλάβης (χημειοτακτισμός) από διάφορες ουσίες που εκκρίνονται τοπικά από κατεστραμμένα κύτταρα του ιστού, από τις ενεργοποιημένες πρωτεΐνες του συμπληρώματος κ.α. Η τοπική συσσώρευση υγρού προκαλεί διόγκωση του προσβεβλημένου ιστού (οίδημα) το οποίο σε συνδυασμό με τις ουσίες που έχουν εκκριθεί στο σημείο εκείνο, προκαλεί άλγος.
3. Φαγοκύτωση, ενδοκυττάρια πέψη και καταστροφή των βακτηρίων αλλά και κομματιών από κατεστραμμένα κύτταρα τα οποία υπάρχουν στο σημείο της βλάβης. Η φαγοκύτωση γίνεται τόσο από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα που με χημειοτακτισμό πηγαίνουν στο σημείο της βλάβης όσο και από τα μακροφάγα του ιστού αυτού που έχουν προέλθει από τα μονοκύτταρα του αίματος.

Οι μηχανισμοί λύσης της φλεγμονώδους αντίδρασης μετά την εξάλειψη του επιβλαβή παράγοντα περιλαμβάνουν την μείωση του χρόνου ημιζωής των φλεγμονωδών μεσολαβητών, την απομάκρυνση των λευκοκυττάρων με τη βοήθεια φαγοκυττάρωσης απόπτωσης και εκκαθάρισης μέσω των λεμφαδένων, καθώς και τον περιορισμό της δράσης των κυτταροκινών μέσω έκκρισης ανταγωνιστών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών ³.

Κάτω από κάποιες συνθήκες, στις οποίες η φλεγμονώδης αντίδραση δεν μπορεί να εξαλείψει τον βλαπτικό παράγοντα, να αποκαταστήσει τον προσβεβλημένο ιστό ή να τερματιστεί ομαλά, η διαδικασία μπορεί να μεταπέσει σε χρόνια. Στις περιπτώσεις αυτές μιλάμε για χρόνια φλεγμονή, μια αντίδραση σχετικά αργή, η οποία μπορεί να συντηρείται για μήνες ή ακόμα και για πολλά χρόνια. Η χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζεται από 1) μετανάστευση μονοπύρηνων κυττάρων (λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, μακροφάγα, και σε ορισμένες περιπτώσεις ηωσινόφιλα) 2) καταστροφή ιστού, και 3) προσπάθειες επιδιόρθωσης της βλάβης με αντικατάσταση του συνδετικού ιστού, αγγειογένεση και ίνωση ⁴.

Η υποκλινική χρόνια συστηματική φλεγμονή θεωρείται υπαίτια της εκδήλωσης των περισσότερων χρόνιων μη μεταδιδόμενων νοσημάτων, μεταξύ άλλων και των καρδιαγγειακών, όπως της αθηροσκλήρωσης ⁵.

1.2 Αθηροσκλήρωση^{6, 7, 8}

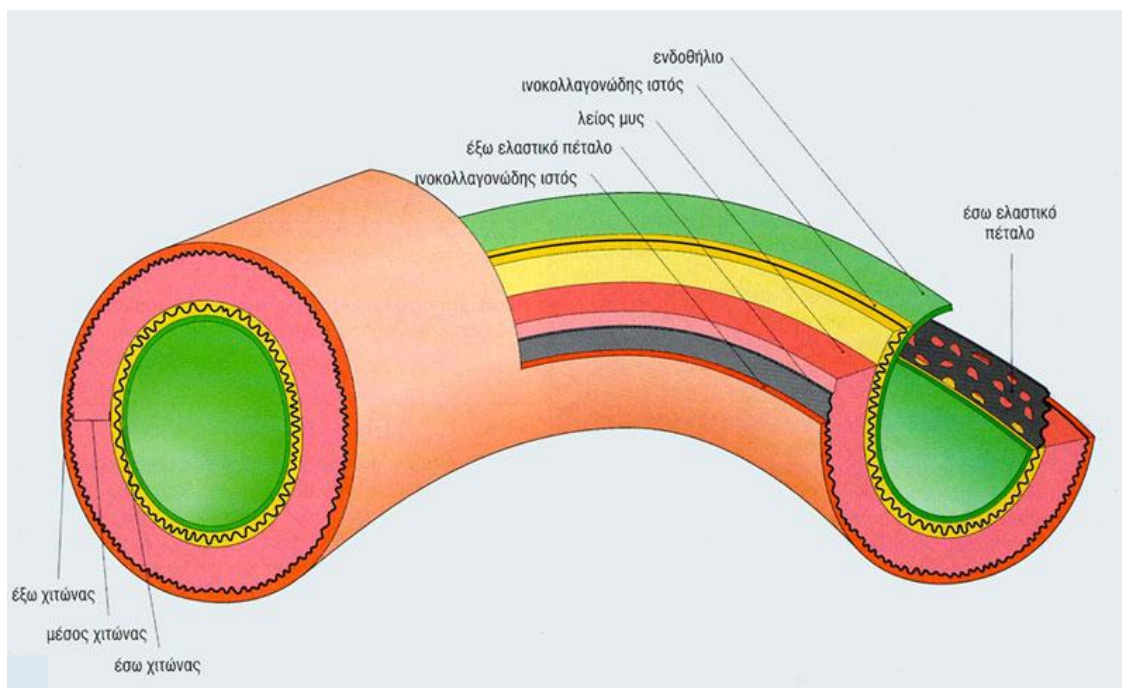
Η αθηροσκλήρωση είναι μια συστηματική αγγειακή φλεγμονώδης νόσος με μεγάλη κλινική σημασία καθώς οι επιπλοκές της μπορεί να εκδηλωθούν ανεξάρτητα από την έκταση της προσβολής των αρτηριών ενός οργάνου. Θεωρητικά λοιπόν, κάθε όργανο ή ιστός μπορεί να προσβληθεί από τη νόσο. Τα συμπτώματα, όμως, εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους νεφρούς, τα κάτω άκρα και το λεπτό έντερο. Συνέπειες της νόσου, μπορεί να είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το οξύ εγκεφαλικό επεισόδιο, όπως επίσης και η χρόνια ισχαιμική καρδιοπάθεια, η γάγγραινα των κάτω άκρων, η απόφραξη της μεσεντερίου αρτηρίας και η ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια.

Η χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, εκδηλώνεται στις αρτηρίες και ξεκινάει από την δεύτερη κιόλας δεκαετία της ζωής του ανθρώπου, εκδηλώνεται, όμως, συνήθως κατά την μέση ηλικία ή αργότερα. Παρατηρείται σε αρτηρίες μεικτού τύπου, μέσου και μεγάλου μεγέθους και χαρακτηρίζεται από πάχυνση και δημιουργία αθηροσκληρωτικών βλαβών στο τοίχωμα των αρτηριών, όπως επίσης και από τη δημιουργία τοιχωματικών ή αποφρακτικών θρόμβων στα προσβεβλημένα αγγεία. Για το λόγο αυτό, ονομάζεται και αθηροθρομβωτική νόσος.

Ένας μεγάλος αριθμός προδιαθεσικών παραγόντων συνδέονται με την αθηροσκλήρωση, ο βαθμός επικυνδυνότητας των οποίων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, μιας και οι περισσότεροι από αυτούς συνυπάρχουν σε ένα περιβάλλον. Κάποιοι από αυτούς είναι το κάπνισμα, η υπέρταση, το αυξημένο ποσοστό τριγλυκεριδίων, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερχοληστεριναιμία, η παχυσαρκία, ο μικρός βαθμός φυσικής δραστηριότητας, η διατροφή, διάφοροι θρομβογόνοι παράγοντες και η κληρονομικότητα (γενετικοί παράγοντες). Η συνύπαρξη αυτή δεν αυξάνει αθροιστικά τον κίνδυνο αλλά πολλαπλασιαστικά.

1.2.1 Δομή του αγγειακού τοιχώματος

Το τοίχωμα μιας φυσιολογικής αρτηρίας αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές: α) τον έσω χιτώνα (intima), που καλύπτεται από μια στιβάδα κυττάρων, το ενδοθήλιο που είναι συνήθως το λεπτότερο στρώμα, και από τον υποστηρικτικό υπενδοθηλιακό ιστό, β) τον μέσο χιτώνα (media), που αποτελείται κυρίως από λεία μυϊκά κύτταρα και από πυκνό συνδετικό ιστό (ελαστίνη, κολλαγόνο) και γ) από τον έξω χιτώνα (adventitia) ο οποίος αποτελείται από ινοελαστικό συνδετικό ιστό (ινοβλάστες, εξωκυτταρικό δίκτυο συνδετικού ιστού). Τις τρεις αυτές στιβάδες μεσολαβούν δύο ομόκεντρα στρώματα ελαστίνης: το έσω ελαστικό πέταλο (internal elastic lamina) που βρίσκεται ανάμεσα στον έσω και μέσο χιτώνα και το έξω ελαστικό πέταλο (external elastic lamina) με το οποίο χωρίζεται ο μέσο από τον έξω χιτώνα^{8,9}.



Σχήμα 1.1: Δομή του αγγειακού τοιχώματος

1.2.2 Ενδοθήλιο: Δομή και Λειτουργία

Το ενδοθήλιο είναι ο μεγαλύτερος αυτοκρινής, παρακρινής και ενδοκρινής αδένας με βάρος 1,5 kg και επιφάνεια περίπου 700 m², που καλύπτει εσωτερικά όλα τα αγγεία ¹⁰.

Αποτελείται από μια στοιβάδα λεπτών κυττάρων που επενδύουν τον έσω χιτώνα των αρτηριών και συνδέονται μεταξύ τους με μια σειρά κυτταρικών συνδέσμων (junctional complexes). Λειτουργεί αποτρεπτικά στην είσοδο έμμορφων στοιχείων του αίματος στο τοίχωμα της αρτηρίας καθώς και στην δημιουργία θρόμβων. Παράλληλα, με τις ουσίες που παράγει, ρυθμίζει την κατάσταση σύσπασης (τόνο) των λείων μυϊκών κυττάρων του τοιχώματος της αρτηρίας.

Οι βασικές λειτουργίες του ενδοθηλίου είναι οι εξής ⁸ :

1. Ρύθμιση του αγγειακού τόνου με την παραγωγή αγγειοδιασταλτικών (EDRF) και αγγειοσυσπαστικών ουσιών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες προκαλείται αγγειοδιαστολή λόγω της επικράτησης της δράσης των αγγειοδιασταλτικών παραγόντων (μονοξειδίο του αζώτου-NO). Στην περίπτωση της αθηροσκλήρωσης προκαλείται αγγειοσύσπαση εξ αιτίας της επικράτησης των αγγειοσυσπαστικών παραγόντων.
2. Διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στις ουσίες που προάγουν την πήξη και αυτών που ενεργοποιούν την ινωδόλυση στην επιφάνεια του ενδοθηλίου.
3. Διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των ουσιών που προάγουν την φλεγμονή και αυτών

που την μπλοκάρουν.

4. Ρύθμιση της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων στο τοίχωμα των αρτηριών.
5. Αναστολή ή προαγωγή των μηχανισμών που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων.

1.2.3 Στάδια αθηρωματικής διαδικασίας

1.2.3.1 Έναρξη-εξέλιξη αθηρωματικής διαδικασίας^{8, 11, 12}

Η αθηρωματική διαδικασία, δηλαδή η διαδικασία δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας, ξεκινάει από φλεγμονώδη βλάβη έπειτα από τραυματισμό αρτηριακού τοιχώματος που προέρχεται από ανοσολογικά, μηχανικά ή άλλα αίτια, ή από δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να προκληθεί από διάφορους μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως η οξειδωμένη LDL, η οποία περιέχει PAF και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, ή μέσω μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας ή βιοσύνθεσης του NO^{13, 14}, που προκαλούν αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου⁶. Η εμπλοκή του PAF στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης θα αναφερθεί λεπτομερώς στο κεφάλαιο 2.

Μόρια λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) που βρίσκονται στο πλάσμα, προσεγγίζουν την περιοχή και εναποτίθενται στο τοίχωμα της αρτηρίας. Από εκεί εύκολα διαπερνούν την ενδοθηλιακή στιβάδα και εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο. Όλα τα κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων της αθηροσκληρωτικής βλάβης, είναι δυνατόν να προκαλέσουν οξείδωση της LDL. Η οξειδωμένη LDL, κινητοποιεί την παραγωγή μιας σειράς ουσιών, κυτταροκινών και χημειοτακτικών παραγόντων όπως MCP-1 και MCSF (διεγερτικοί παράγοντες των μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων) καθώς και των PDGF και IL-8, που προκαλούν την ενεργοποίηση και την προσέλκυση των μονοκυττάρων στην περιοχή της βλάβης. Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα προσκολλούνται, μέσω μορίων συγκόλλησης (PECAM-1, L-σελεκτίνες, ιντεγκρίνες), στο ενδοθήλιο και εν συνεχεία εισέρχονται στην υπενδοθηλιακή περιοχή όπου μετατρέπονται σε μακροφάγα. Αυτά, φαγοκυτταρώνουν μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων μορίων LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (foam cells).

Σημαντικό ρόλο στη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα παίζει ο MCSF. Τα μακροφάγα-αφρώδη κύτταρα, μετά τον κορεσμό τους με λιποειδή, οδηγούνται στο θάνατο. Τόσο πριν όσο και μετά το θάνατό τους απελευθερώνουν ουσίες όπως οξειδωμένη LDL χοληστερόλη και ελεύθερες ρίζες O₂, οι οποίες επιδεινώνουν περισσότερο την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ενώ παράλληλα, απελευθερώνουν μια σειρά από παράγοντες που προκαλούν την

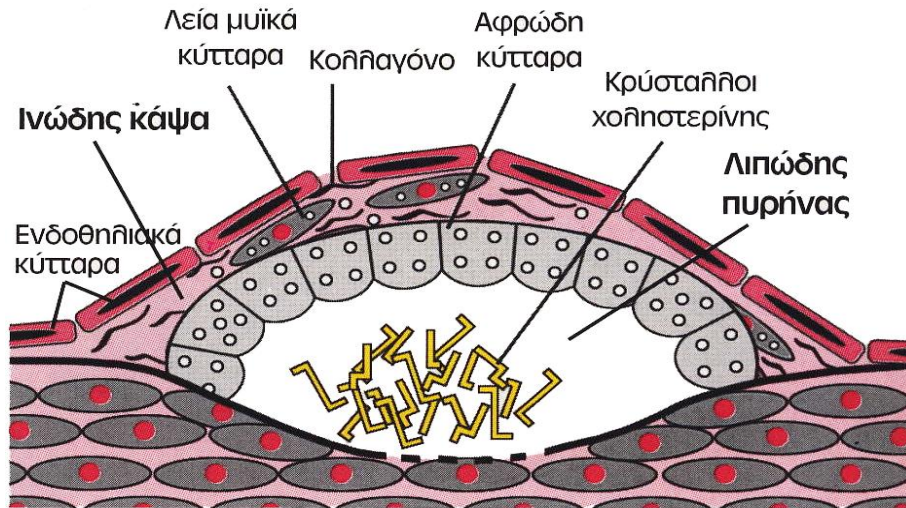
ενεργοποίηση και την είσοδο νέων μονοκυττάρων στην περιοχή. Σε συνδυασμό επίσης, με άλλα κύτταρα της περιοχής, εκκρίνονται αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την παραγωγή εξωκυττάρου συνδετικού ιστού. Η ακολουθία των διεργασιών αυτών, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία και την σταδιακή αύξηση της αθηροσκληρωτικής βλάβης.

Οι πρώιμες ασυμπτωματικές βλάβες της αθηροσκλήρωσης εμφανίζονται ήδη από την βρεφική και πρώτη παιδική ηλικία με τη μορφή λιπωδών ραβδώσεων (fatty streaks). Αυτές εμφανίζονται στην επιφάνεια της εσωτερικής στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος με τη μορφή μικρών, λεπτών, ελαφρώς ανάγλυφων επιμήκων γραμμώσεων με υποκίτρινη απόχρωση. Αποτελούνται από αφρώδη κύτταρα γεμάτα με χοληστερόλη και εστέρες χοληστερόλης, T-λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Προκαλούνται από μια φλεγμονώδη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται κυρίως τα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα και μπορούν είτε να εξελιχθούν σε πιο επιπεπλεγμένες μορφές αθηροσκλήρωσης, είτε να υποχωρήσουν (αναστρέψιμο στάδιο) ¹⁵.

1.2.3.2 Σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας

Εξέλιξη των λιπωδών ραβδώσεων είναι ο σχηματισμός της ινώδους πλάκας (fibrous plaque), η οποία αποτελεί προχωρημένη αθηροσκληρωτική βλάβη και η οποία μπορεί να επιπλακεί με αιμορραγία, θρόμβωση ή επασβέστωση. Κάνει την εμφάνισή της στην εφηβική αλλά κυρίως στην ενήλικη ζωή και αναπτύσσεται με αργό ρυθμό, επί σειρά ετών, αθόρυβα και χωρίς κλινικά συμπτώματα, στον έσω αρτηριακό χιτώνα. Περιβάλλεται από ινώδη κάψα και προσεκβάλλει στον αυλό της αρτηρίας παρεμποδίζοντας συχνά την αιματική ροή. Αποτελείται από μεγάλο αριθμό λείων μυϊκών ινών, μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα περιβάλλονται από κολλαγόνο ελαστικές ίνες, και διάφορα πρωτεογλυκανικά μόρια και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως ο PDGF και ο bFGF έτσι ώστε να επιτευχθεί τόσο ο πολλαπλασιασμός όσο και η μετανάστευσή τους. Τα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυταροκίνες, και τον παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF) ⁶.



Σχήμα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της αθηρωματικής πλάκας⁸

1.2.3.3 Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και θρόμβωση⁸

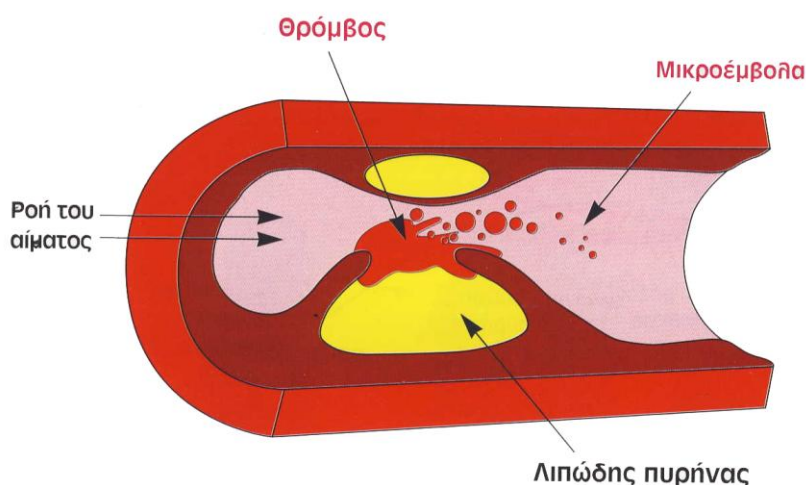
Κατά τη διαδικασία εξέλιξης της αθηροσκληρωτικής βλάβης, υπάρχουν σημεία στο ινώδες συνεχές, όπου η ινώδης κάψα είναι λεπτότερη και λιγότερο ανθεκτική. Αυτά τα χαρακτηριστικά, καθιστούν την πλάκα επιρρεπή στη διάρρηξη. Τέτοιες πλάκες είναι συνήθως μικρού μεγέθους και με μαλακή σύσταση. Παρουσιάζουν μεγάλο, συνήθως ακυτταρικό, λιπώδη πυρήνα, μειωμένη πυκνότητα λείων μυϊκών κυττάρων και ελαττωμένες συγκεντρώσεις κολλαγόνου στην ινώδη κάψα¹⁶. Οι ευάλωτες πλάκες με τα παραπάνω γνωρίσματα αποτελούν τα 2/3 του συνόλου των αθηροσκληρωτικών πλακών.

Βασικός παράγοντας που οδηγεί στην ρήξη της πλάκας είναι η συσσώρευση και δραστηριοποίηση των μακροφάγων τα οποία αποδιοργανώνουν την ινώδη κάψα εκκρίνοντας πρωτεολυτικά ένζυμα (κολλαγενάσες, ζελατινάσες, στρομελυσίνες) που διασπούν το κολλαγόνο. Η έκκριση των πρωτεϊνών προάγεται από την αλληλεπίδραση μακροφάγων-T-λεμφοκυττάρων στην περιοχή της βλάβης. Επιπρόσθετα, η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο στον έσω χιτώνα και η αύξηση του προγραμματισμένου θανάτου τους (απόπτωση) από τη δράση των ενεργοποιημένων μακροφάγων οδηγεί στην εξασθένηση και την αστάθεια της ινώδους πλάκας. Στο έργο αυτό, συνεισφέρουν και οι οξειδωμένες μορφές της LDL που δρουν κυτταροτοξικά.

Με την ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, το περιεχόμενό της (εστέρες και κρύσταλλοι χοληστερίνης), όπως και το περιεχόμενο της ινώδους κάψας, έρχονται σε επαφή με τα στοιχεία του αίματος πυροδοτώντας με αυτόν τον τρόπο τον σχηματισμό θρόμβου. Οι εστέρες της χοληστερόλης θεωρούνται εξαιρετικά θρομβογόνες ουσίες. Η έκθεση του υπενδοθηλιακού κολλαγόνου στην κυκλοφορία του αίματος έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την προσκόλλησή τους στην επιφάνεια της πλάκας, την εναπόθεση

ινωδογόνου και την παγίδευση κυττάρων του αίματος. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει και ο ιστικός παράγοντας (tissue factor) ο οποίος είναι μια γλυκοπρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους που εκφράζεται μέσω των κυτταροκινών και θεωρείται ο κυριότερος ρυθμιστής της αιμόστασης και της θρόμβωσης. Ο παράγοντας αυτός δημιουργεί σύμπλεγμα με τους παράγοντες πήξης VII/VIIa το οποίο ενεργοποιεί τους παράγοντες IX και X με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή θρομβίνης.

Η δημιουργία θρόμβου προκαλεί την απόφραξη του αγγείου στο σημείο της ρήξης της πλάκας. Είναι επίσης πιθανό, ο θρόμβος να αποκολληθεί από την πλάκα και να προκαλέσει απόφραξη σε κάποιο άλλο σημείο του αρτηριακού δικτύου δρώντας ως έμβολο.



Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση ρήξης της αθηροσκληρωτικής πλάκας και του σχηματισμού του ενδοαυλικού θρόμβου με αποσπάσεις μικρών τμημάτων του θρόμβου (μικροέμβολα) κατά την ροή του αίματος⁸

1.3. Κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση

Οι βασικές κατηγορίες κυττάρων που εμπλέκονται στη αθηροσκληρωτική διαδικασία είναι τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια

1.3.1 Μονοκύτταρα/Μακροφάγα

Τα μονοκύτταρα αποτελούν τύπο λευκοκυττάρων τα οποία παράγονται στον μυελό των οστών. Προσκολλώνται στο αρτηριακό τοίχωμα από την δράση των κυτοκινών, της Lp(a) καθώς και από την οξειδωμένη LDL. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια μορίων προσκόλλησης προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα διαπερνούν την ενδοθηλιακή στιβάδα και εισέρχονται στον έσω χιτώνα των αρτηριών όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα, εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα του σώματος και είναι παρόντα σε όλα τα στάδια της αθηρογένεσης. Παράγονται από τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων που εισέρχονται στους ιστούς, και στη συνέχεια, μέσω των υποδοχέων εκκαθαριστών (scavenger receptor) προσλαμβάνουν εξωκυττάρια LDL και μετασχηματίζονται σε αφρώδη κύτταρα

συμμετέχοντας έτσι στον σχηματισμό των λιποειδών ραβδώσεων και στη δομή της αρωματικής πλάκας¹⁷. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση της LDL¹⁸ και έχουν την ικανότητα να παράγουν κυτταροκίνες που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής, όπως τον TNF-α, την ιντερλευκίνη-1 και τον β-αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού, πρωτεολυτικά ένζυμα (μεταλλοπρωτεϊνάσες) και αυξητικούς παράγοντες, όπως τον αυξητικό αιμοπεταλιακό παράγοντα¹⁹.

1.3.2 Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα ανήκουν στα λευκά αιμοσφαίρια και είναι τα κύρια συστατικά της ειδικής ανοσοαπάντησης (χυμικής και κυτταρικής). Αποτελούν μια ετερογενή πληθυσμιακή ομάδα κυττάρων, με μεγάλες διαφορές ως προς τη μορφολογία, το μέγεθος των κυττάρων, τη δομή της κυτταρικής επιφάνειας, τα ειδικά συστατικά που περιέχονται στα κοκκία, την προέλευση, τη λειτουργία και τη διάρκεια ζωής. Ανάλογα με την λειτουργία τους διαχωρίζονται σε B, T και κύτταρα φονείς²⁰. Οι δύο πρώτοι τύποι έχουν αναγνωριστεί στις αθηρωματικές αλλοιώσεις.

Τα T-λεμφοκύτταρα συναντώνται με τη μορφή T-βοηθητικών και T-κυτταροτοξικών κυττάρων και έχουν ρόλο ρυθμιστικό στη δράση των μακροφάγων και στη διαδικασία της φλεγμονής. Ενεργοποιούνται από το αντιγόνο που εμφανίζεται στην επιφάνεια των μακροφάγων και εκκρίνουν διάφορους βιολογικούς μεσολαβητές όπως κυτταροκίνες, ιντερφερόνη-γ, ιντερλευκίνη-2, IL-4, TNF-α, TGF-β και άλλους²¹.

Τα B-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται κυρίως στον μυελό των οστών, ενεργοποιούνται από ένα μεγάλο αριθμό αντιγόνων (ανάμεσα σε αυτά και η LDL) και είναι ικανά προς παραγωγή αντισωμάτων μέσα στη βλάβη¹⁸.

1.3.3 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, άχρωμα, απύρρηνα κύτταρα, ακανόνιστου δισκοειδούς σχήματος προερχόμενα από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών και ο χρόνος ζωής τους είναι 7-10 μέρες. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής, παράγοντας χημειοτακτικούς παράγοντες (π.χ. σεροτονίνη, παράγωγα του αραχιδονικού οξέος) και αυξητικούς παράγοντες (TGF-α και β, βασικούς αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών [bFGF], καθώς και αυξητικούς παράγοντες των αιμοπεταλίων, PDGF)²⁰.

Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της αθηρωμάτωσης, καθώς είναι πλούσια σε χημειοκίνες και κυτταροκίνες, που απελευθερώνονται αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους. Όταν το ενδοθήλιο τραυματιστεί, τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται και προσκολλώνται στο σημείο τραυματισμού αποκτώντας ακανθοειδείς προεκβολές και αποκαλύπτοντας στην

επιφάνειά τους τους υποδοχείς Ia-IIa, IIb-IIIa, Ib/IX. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η συγκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους και με τις κολλαγόνες ίνες του ενδοθηλίου, ενώ παράλληλα αλληλεπιδρούν με τα μονοκύτταρα για τον σχηματισμό θρομβίνης ²². Τα ενεργοποιημένα από θρομβίνη ή άλλο μεσολαβητή της φλεγμονής, αιμοπετάλια παράγουν PAF κατά τη φλεγμονώδη απάντηση.

Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έχουμε και κατά την ρήξη της ινώδους πλάκας, με πιθανό αποτέλεσμα την δημιουργία θρόμβου και την απόφραξη του αγγειακού αυλού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

2.1 Εισαγωγή

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών. Συντίθεται και εκκρίνεται από πλήθος κυττάρων και αποτελεί έναν ισχυρό διεγέρτη των αιμοπεταλίων καθώς και έναν σημαντικό χημικό μεσολαβητή πολλών λειτουργιών των λευκών αιμοσφαιρίων. Συμμετέχει στους μηχανισμούς της αιμόστασης και σε ένα μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων του οργανισμού.

Η επικέντρωση του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας και η συστηματική μελέτη του PAF έχουν τις ρίζες τους στις δεκαετίες '50- '60, όπου είχε αρχίσει η έρευνα πάνω στη σχέση (αιτιολογική και θεραπευτική) των λιποειδών με την αθηροσκλήρυνση καθώς και με άλλες ασθένειες.

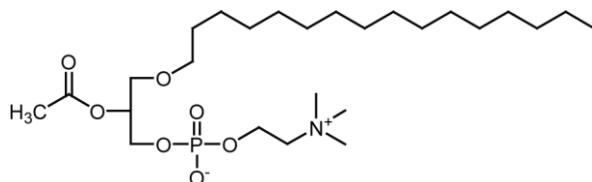
Το πρώτο ερέθισμα δίδεται το 1966, όταν οι Barbaro και Zvaifler, σε πειράματα που έκαναν σε κουνέλια, παρατήρησαν ότι η επίδραση αντιγόνου σε λευκοκύτταρα, χωρίς την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, προκαλεί ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ταυτόχρονη έκκριση ισταμίνης²³. Ο μηχανισμός αυτός συνδέθηκε με μια ουσία την οποία ο Benveniste και οι συνεργάτες του ονόμασαν το 1977 Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) αποδίδοντάς της ταυτόχρονα χαρακτηριστικά λιποειδικής φύσης²⁴.

Ο προσδιορισμός, όμως, της δομής του PAF αποδίδεται στην ερευνητική ομάδα των Δημόπουλο, Hanahan και Pinckard που το 1979 ανακοίνωσαν την παρασκευή, με ημισυνθετικές μεθόδους, της 1-O-αλκυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνης²⁵. Μιας ένωσης της οποίας οι χημικές, βιολογικές και χρωματογραφικές ιδιότητες ήταν πανομοιότυπες με αυτές του φυσικά παραγόμενου PAF. Παράλληλα, η ομάδα του Snyder, απέδωσε τη δομή αυτή στο αντί-υπερτασικό πολικό λιποειδές του νεφρού (Antihypertensive Polar Renomedullary Lipid, APRL)²⁶.

Ένα χρόνο μετά, η ομάδα Hanahan, Δημόπουλου, Liehr και Pinckard ταυτίζουν με δημοσίευσή τους τον φυσικά παραγόμενο από βασεόφιλα κουνελιού (ενεργοποιημένα με IgE) PAF με τον ημισυνθετικά παραγόμενο και επιβεβαιώνουν τη δομή του²⁷.

2.2 Χημική δομή του PAF

Από το 1979, λοιπόν, όπως είδαμε παραπάνω, η ονομασία του PAF κατά IUPAC είναι 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-χολίνη και αποτελεί ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές η δομή του οποίου φαίνεται στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Δομή του PAF

Ένας αιθερικός δεσμός συνδέει στη sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού μια αλκυλομάδα, το μέγεθος της οποίας υποδεικνύει το βαθμό βιολογικής δραστηριότητας της ένωσης. Έχουν ανιχνευτεί μόρια PAF με 16, 17 και 18 άτομα άνθρακα στην αλκυλομάδα τους. Από αυτά ο 16:0-PAF είναι ο πιο δραστήριος και ταυτόχρονα αυτός που απαντάται με μεγαλύτερη συχνότητα.

Στην sn-2 θέση υπάρχει συνδεδεμένο με εστερικό δεσμό ένα μόριο οξικού οξέος και στην sn-3 θέση μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης.

Από κει και πέρα ξεδιπλώνεται μια μεγάλη λίστα μορίων αναλόγων του PAF (PAF-like) που απαντώνται στη φύση και που ομοιάζουν στη δομή και στις βιολογικές δράσεις με τον PAF²⁸. Η διαφοροποίηση των μοριακών αναλόγων του PAF εντοπίζεται κυρίως στα είδη των ομάδων και των δεσμών με τα οποία συνδέεται η γλυκερόλη.

2.3 Κύτταρα και ιστοί που παράγουν PAF

Η σύνθεση του PAF οφείλεται στην απόκριση, σε εξωγενή ερεθίσματα, ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων και ιστών, πολλά από τα οποία γίνονται ταυτόχρονα και στόχοι της βιολογικής του δράσης μιας και παρουσιάζει τόσο αυτοκρινή όσο και παρακρινή δράση. Από κύτταρα θηλαστικών που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις και αλλεργικές διεργασίες (πρώτη ανίχνευση)²⁹, σε πολλά βιολογικά υγρά όπως στο πλάσμα³⁰, ούρα³¹, σάλιο³², μέχρι και σε φυτικά κύτταρα, σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς καθώς και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Στον πίνακα 2.1 συνοψίζονται τα κύτταρα και οι ιστοί που παράγουν PAF.

Πίνακας 2.1: Κύτταρα και ιστοί που παράγουν PAF

Κύτταρο	Είδος
Αιμοπετάλια, Λευκοκύτταρα, Μαστοκύτταρα, Λεμφοκύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού, ινδικού χοιριδίου κ.α.
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ανθρώπου, ποντικού, κουνελιού κ.α.
Νευρώνες, εγκεφαλικά κύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού
Μυοκύτταρα καρδιάς	Επίμυος
Ηπατικά κύτταρα Kupffer	Επίμυος
Σπερματοζώαρια	Ανθρώπου, κουνελιού, βοδιού
Εμβρυϊκά κύτταρα	Ανθρώπου, ποντικού, κουνελιού
HaCaT κυτταρική σειρά Κερατινοκυττάρων	Ανθρώπου
Νεφρικά κύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος κ.α.
Αιμοπετάλια, Λευκοκύτταρα, Μαστοκύτταρα, Λεμφοκύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού, ινδικού χοιριδίου κ.α.

2.4 Βιολογικές Δράσεις

Εκτός απ' την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ο PAF θεωρείται υπεύθυνος μιας πληθώρας βιολογικών δράσεων, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Απ' τη στιγμή που θα συντεθεί από τα κύτταρα, εάν δεν μεταβολιστεί άμεσα, μπορεί είτε να παραμείνει σε αυτά και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής, είτε να ενσωματωθεί στην πλασματική τους μεμβράνη και να ενεργοποιήσει γειτονικά κύτταρα ως διακυτταρικός μεσολαβητής είτε να εκκριθεί απ' τα κύτταρα, να συνδεθεί με τον υποδοχέα του και να ξεδιπλώσει την πολυδιάστατη παρακρινική του δραστηριότητα. Στοιχεία της βιολογικής του δράσης παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Δράσεις του PAF σε κύτταρα και ιστούς

Είδος κυττάρου/ ιστού	Δράσεις
Αιμοπετάλια	Αποκοκκίωση, αλλαγή σχήματος, συσσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, συσσώρευση, χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίων, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας, έκκριση εικοσανοειδών
Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα	Συσσώρευση, σύνθεση εικοσανοειδών, παραγωγή υπεροξειδίων, έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων, παραγωγή IL-1

Πίνακας 2.2 (συνέχεια)

Είδος κυττάρου/ ιστού	Δράσεις
Ηωσινόφιλα	Χημειοταξία, έκκριση κατιοντικών πρωτεϊνών, αύξηση κυτταροτοξικότητας, παραγωγή υπεροξειδίων, σύνθεση IL-8, μετανάστευση διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, πολυμερισμός ακτίνης
Λεμφοκύτταρα	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ανακατανομή κυτταροσκελετού και αλλαγή σχήματος, σύνθεση εικοσανοειδών, μετανάστευση, αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητας με τα ουδετερόφιλα
Νευρώνες	Αύξηση ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνositόλης, έκκριση προλακτίνης, ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-jun
Σπερματοζωάρια	Αύξηση κινητικότητας, αύξηση διεισδυτικότητάς στον τράχηλο της μήτρας
Ήπαρ	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας, αύξηση στην έκκριση γαλακτικού και οξαλοξικού οξέος
Πνεύμονας	Μείωση επιφάνειας τριχοειδών, σύσπαση απομονωμένου πνευμονικού ιστού και μείωση της διατασιμότητάς του, αγγειοσύσπαση, πνευμονικό οίδημα
Καρδιά	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας, σύσπαση των στεφανιαίων, μείωση της ροής αίματος, πρόκληση αρρυθμιών
Έντερο	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση

2.5 Μεταβολισμός του PAF

2.5.1 Βιοσύνθεση.

Ο PAF συντίθεται μέσω δύο πορειών, οι οποίες βρίσκονται κάτω από ενζυμικό έλεγχο και ρυθμίζονται από έξω κυτταρικά σήματα ανάλογα με την παθοφυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Κατά την **πορεία ανασχηματισμού** (remodeling pathway), έχουμε παραγωγή PAF, με την ταυτόχρονη κινητοποίηση του αραχιδονικού οξέος, ως απόκριση σε φλεγμονώδες ερέθισμα ενώ η **εξ' υπαρχής πορεία βιοσύνθεσης** (de novo pathway), θεωρείται, κυρίως, υπεύθυνη για τη διατήρηση των βασικών επιπέδων PAF στο αίμα και στους ιστούς. Τα σημεία του κυττάρου που λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις βιοσύνθεσης PAF, είναι ενδοκυτταρικά μεμβρανικά σωματίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και οι κυτταρικές μεμβράνες³³.

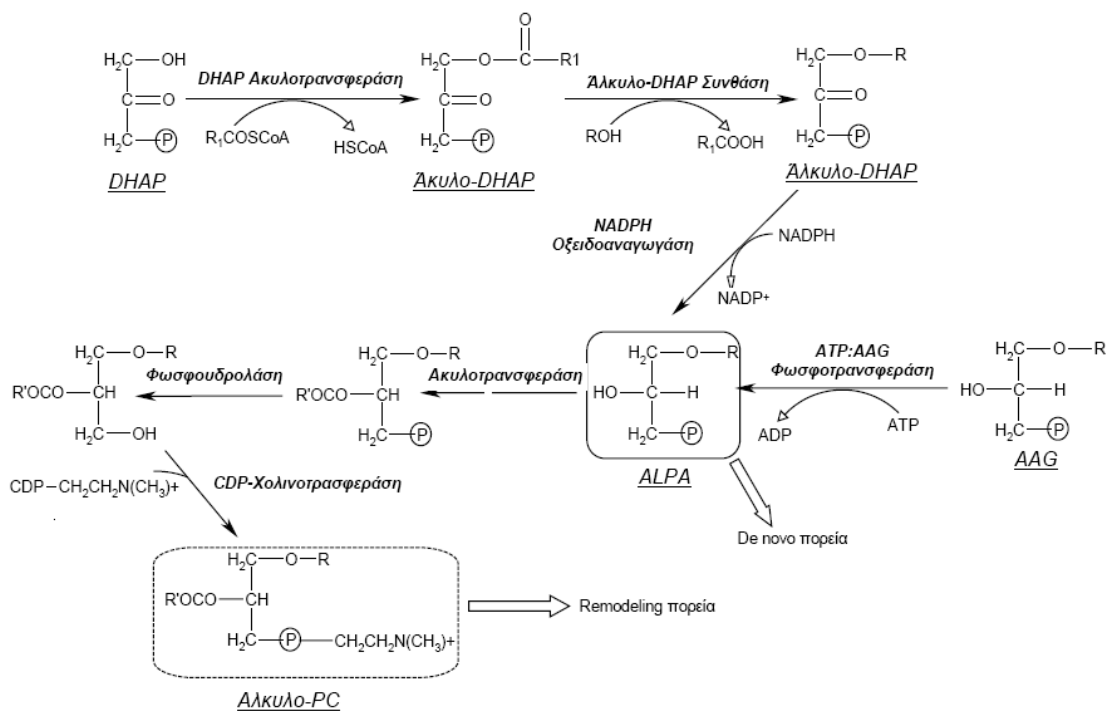
2.5.1.1 Σύνθεση αιθερικών λιποειδών^{34, 35, 36}

Στο πρώτο στάδιο, η φωσφο-διϋδροξυ-ακετόνη (DHAP), η οποία προέρχεται από την γλυκολυτική πορεία, μετατρέπεται σε 1-ακυλο-φωσφο-διϋδροξυ-ακετόνη (άκυλο-DHAP) με την δράση του ενζύμου άκυλο-CoA:DHAP ακυλοτρανσφεράση.

Το επόμενο βήμα, είναι η αντικατάσταση της άκυλο- ομάδας της άκυλο-DHAP με μια αλυσίδα λιπαρής αλκοόλης, η οποία ενώνεται με αιθερικό δεσμό στην DHAP, προς σχηματισμό της 1-άλκυλο-φωσφο-διϋδροξυ-ακετόνης (άλκυλο-DHAP). Η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση της άλκυλο-DHAP.

Το ένζυμο NADPH- οξειδοαναγωγή της άλκυλο-DHAP, ανάγει στο επόμενο στάδιο, την κετονική ομάδα στην sn-2 θέση της άλκυλο-DHAP, δίνοντας 1-O-άλκυλο-2- λυσο-sn- γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ (ALPA)³⁷.

Το ALPA είναι ένα, κομβικής σημασίας, ενδιάμεσο προϊόν, από το οποίο μπορούν να σχηματιστούν, είτε τα γλυκεριναιθερικά φωσfolιποειδή των μεμβρανών που αποτελούν πρόδρομα μόρια στην remodeling πορεία, είτε απευθείας PAF μέσω της de novo πορείας.



Σχήμα 2.2: Αντιδράσεις σχηματισμού αιθερικών λιποειδών³⁸

2.5.1.2 Πορεία εξ' υπαρχής βιοσύνθεσης του PAF (DE NOVO PATHWAY)

Η de novo πορεία βιοσύνθεσης PAF θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες στους ιστούς (νεφρά, κεντρικό νευρικό σύστημα) και στο αίμα^{39, 40}, αν και έχει βρεθεί και σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής όπως AIDS, καρδιοπάθεια, και περιλαμβάνει τρία στάδια

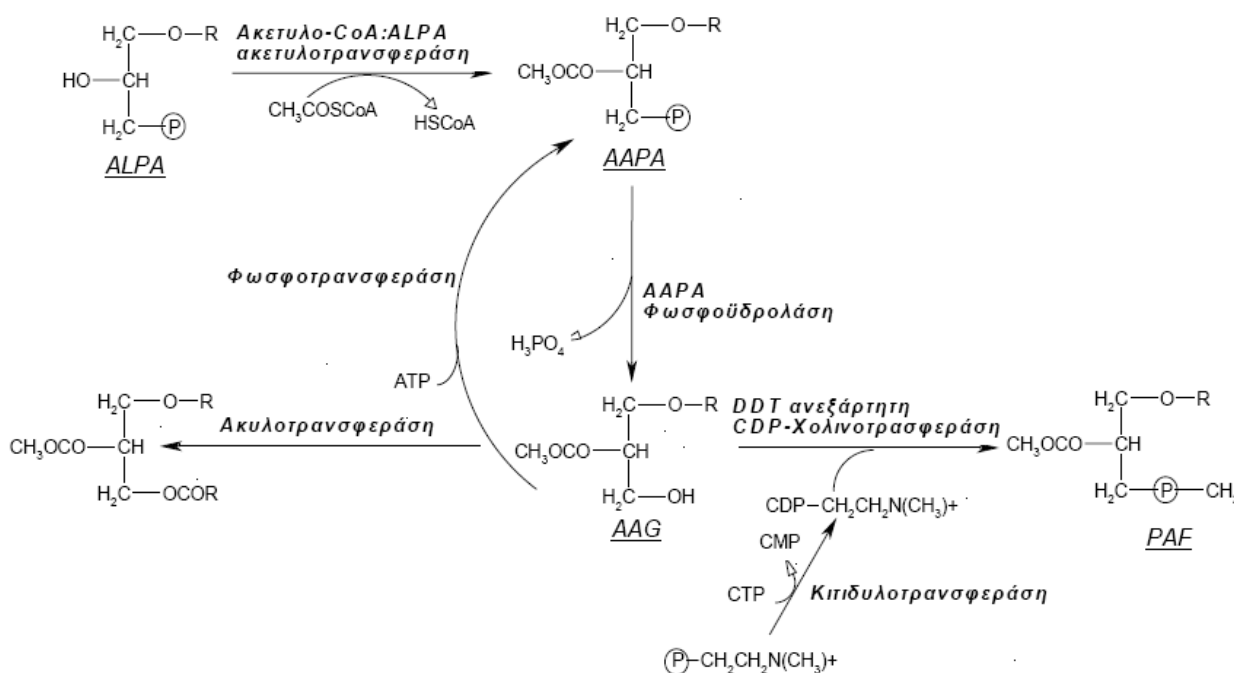
αντιδράσεων.

Στο πρώτο στάδιο, μεταφέρεται μια ακετυλομάδα στο ALPA μέσω του ενζύμου ακετυλο-CoA:ALPA ακετυλοτρανσφεράση, με αποτέλεσμα την παραγωγή του 1-O-αλκυλο-2ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ (AAPA).

Στο επόμενο στάδιο, η φωσφορική ομάδα του AAPA απομακρύνεται προς σχηματισμό της αλκυλοακετυλογλυκερόλης (AAG). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο AAPA-φωσφορυλάση.

Κατά το τελευταίο στάδιο, το ένζυμο DDT-ανεξάρτητη CDP-χολίνη: AAG φωσφοχολινοτρανσφεράση, μεταφέρει στη sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού της AAG την φωσφοχολίνη από το μόριο της CDP-χολίνης.

Όλα τα ένζυμα της de novo πορείας είναι μεμβρανικά και έχουν τελείως διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά τόσο από τα ένζυμα της remodeling πορείας όσο και από τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την de novo σύνθεση των άλλων μεμβρανικών γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών⁴¹.



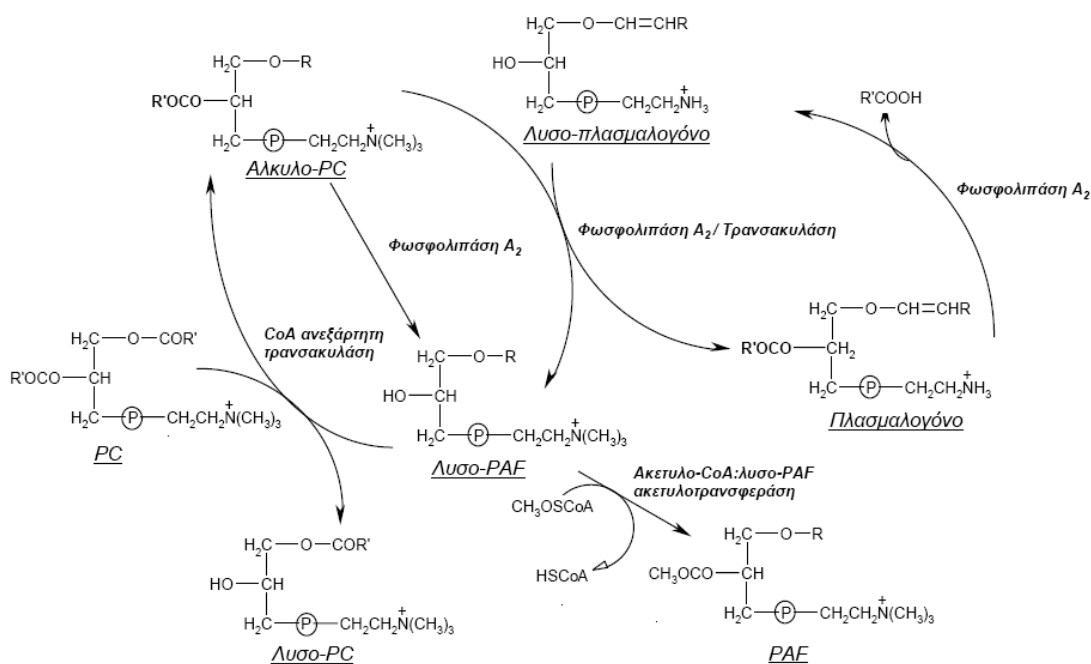
Σχήμα 2.3: Αντιδράσεις De novo πορείας³⁸

2.5.1.3 Πορεία ανασχηματισμού (Remodeling Pathway)

Η πορεία ανασχηματισμού ονομάζεται έτσι διότι χρησιμοποιεί ως πρόδρομα μόρια, για να βιοσυνθέσει PAF, ήδη υπάρχοντα αιθερικά φωσφολιποειδή της κυτταρικής μεμβράνης και σε αντίθεση με την de novo πορεία, (είναι αυτή που) της αποδίδεται άμεση συσχέτιση με την κατάσταση φλεγμονής μιας και ενεργοποιείται ως απόκριση των κυττάρων σε φλεγμονώδεις

παράγοντες.

Η παραγωγή του PAF μέσω της πορείας αυτής, επιτυγχάνεται σε δύο στάδια αντιδράσεων: την υδρόλυση του πρόδρομου γλυκεριναιθερικού φωσφολιποειδούς και την ακετυλίωση της ενδιάμεσης ένωσης. Κατά το πρώτο στάδιο, έχουμε παραγωγή λυσο-PAF (ενδιάμεση ένωση) από την υδρόλυση του αραχιδονικού οξέος που είναι εστεροποιημένο στην θέση sn-2 του 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (AAGPC). Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται, είτε απευθείας με την καταλυτική δράση της κυτοπλασματικής φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂) για αλκυλο-PC, είτε με την διαδοχική δράση των ενζύμων PLA₂ και CoA-IT (ανεξάρτητης συνενζύμου A- τρανσακυλάσης), κατά την οποία το αραχιδονικό οξύ μεταφέρεται, μετά την υδρόλυσή του, σε ένα ακυλο-δέκτη που συνήθως είναι λυσο-πλάσμαλογόνο^{42, 43, 44}. Στο δεύτερο στάδιο, ο λυσο-PAF ακετυλιώνεται προς παραγωγή PAF από το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο PAF-AT)⁴⁵.



Σχήμα 2.4: Αντιδράσεις σχηματισμού PAF μέσω της remodeling πορείας³⁸

2.5.1.4 Ένζυμα βιοσύνθεσης του PAF

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κυριότερα ένζυμα της διαδικασίας βιοσύνθεσης του PAF καθώς και κάποια από τα χαρακτηριστικά τους.

2.5.1.4.1 DTT-ανεξάρτητη CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF CPT) ⁴⁶

Το ένζυμο PAF CPT καταλύει, όπως είδαμε πιο πάνω, το τελευταίο στάδιο της de novo πορείας βιοσύνθεσης του PAF. Ενεργοποιείται από φυσιολογικούς παράγοντες όπως η ακετυλοχολαμίνη και η ντοπαμίνη⁴⁷ και εντοπίζεται σε διάφορα είδη κυττάρων όπως ουδετερόφιλα, αιμοπετάλια κουνελιών, ανθρώπινα μεσαγγειακά, όπως επίσης και στην κυτοπλασματική επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου. Παρουσιάζει βέλτιστη λειτουργία σε pH 8.0, είναι αρκετά σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες και απαιτεί ιόντα Mg^{2+} (10-20 μM), ενώ αναστέλλεται από ιόντα Ca^{2+} (σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM), δεοξυχολικό και η δραστηριότητά του μειώνεται σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 2-3% ^{48, 49}. Αναστολή της δράσης του ενζύμου έχει φανεί σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα από τα πολικά λιποειδή ψαριών και ελαιόλαδου, από την ρεσβερατρόλη καθώς και από κάποια αντιφλεγμονώδη φάρμακα ⁴⁹, ενώ ενεργοποίηση έχει φανεί σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά και ουδετερόφιλα κύτταρα από φορβολικούς εστέρες ⁵⁰.

Η παρατηρούμενη ρύθμιση (με θετικό ή αρνητικό πρόσημο) της δραστηριότητας, αναγάγει το ένζυμο αυτό σε έναν από τους κύριους ρυθμιστές της de novo σύνθεσης και το τελευταίο στάδιο αυτής, σε καθοριστικό για τα επίπεδα του παραγόμενου PAF. Επίσης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια βρέθηκε θετική συσχέτιση της PAF CPT με φλεγμονώδεις δείκτες ⁴⁰.

2.5.1.4.2 Ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο-PAF AT)

Η λυσο-PAF AT καταλύει την ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF, που είναι η τελευταία αντίδραση της remodeling πορείας. Βρίσκεται στο μικροσωμιακό κλάσμα διαφόρων ιστών και κυττάρων του αίματος που παράγουν PAF ⁵¹ και εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και στα τεταρτοταγή κοκκία ανθρώπινων ουδετερόφιλων και HL-60 κυττάρων, ενώ έχει εντοπιστεί και σε νεφρικά κύτταρα ^{52, 53}. Η εξειδίκευση που παρουσιάζει όσον αφορά στα λιποειδικά υποστρώματα είναι ευρεία, καθώς ακετυλιώνει αιθερικά και εστερικά ανάλογα του PAF όπως και ανάλογα με σκελετό αιθανολαμίνης. Η σειρά προτίμησης σε υπόστρωμα είναι κατά τον Hollamnd ⁵⁴ η εξής: αλκυλο-λυσο-PAF > ακυλο-λυσο-PAF > αλκενυλο-λυσο-PAF > αλκυλο-λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη > ακυλο-λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη.

Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από φυσικά παραγόμενες ενώσεις, όπως το ακυλο-CoA, το αραχιδονικό οξύ, το ελαϊκό οξύ, τη λυσο-PC, το φωσφατιδικό οξύ (σε ενδοθηλιακά κύτταρα), καθώς και από μη ειδικούς αναστολείς όπως οι χηλικοί παράγοντες EDTA, EGTA, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , p-βρωμο-φαινυλο-ακυλοβρωμίδιο, δι-ισοπροπυλο-φθορο-φωσφορικό, N-

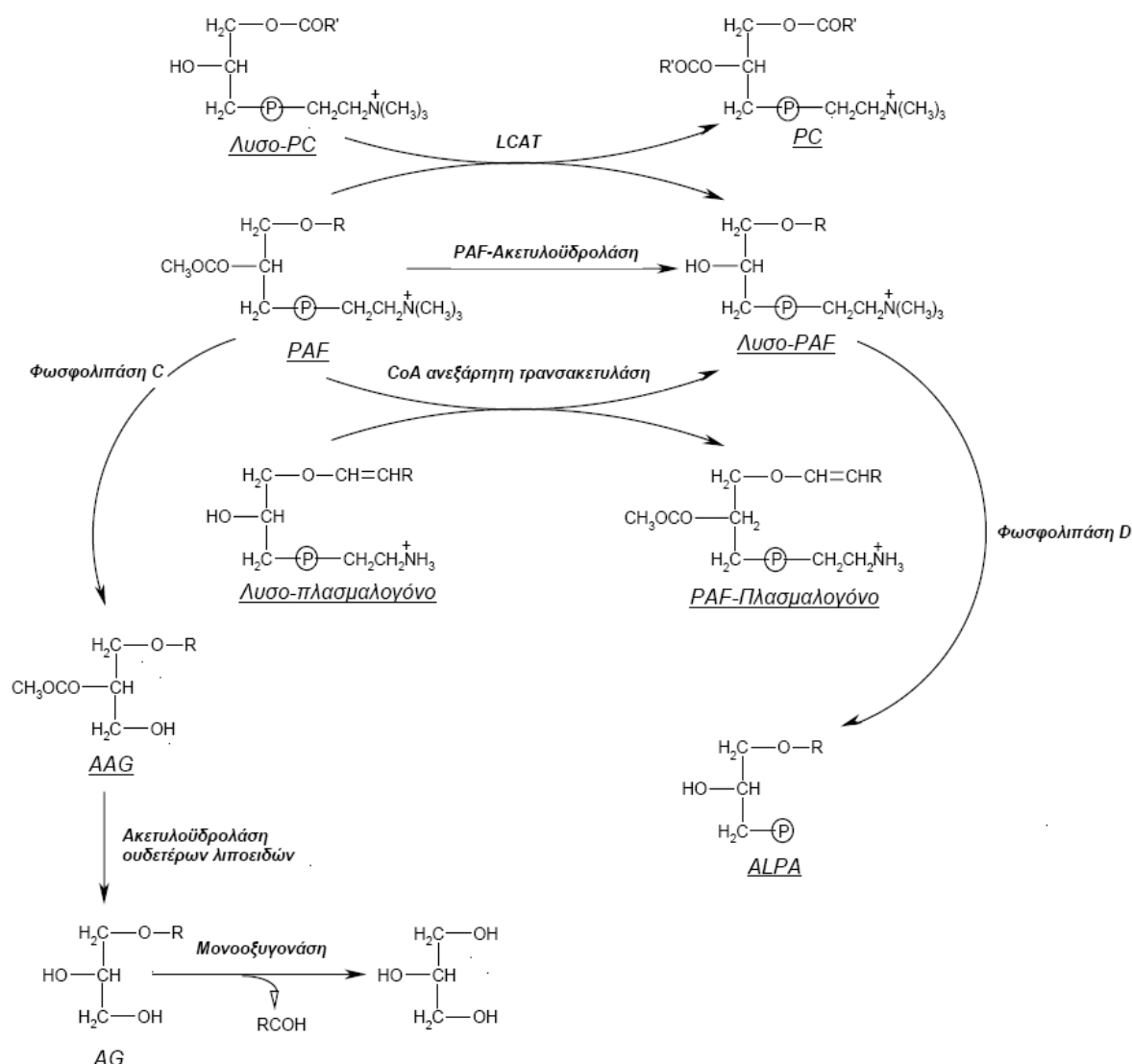
αιθυλαμίδιο⁵³.

Μελέτες σε σπλήνα αρουραίου, ανθρώπινα ουδετερόφιλα, παρωτιδικούς αδένες ινδικού χοιριδίου και μαστοκύτταρα ποντικού, έχουν δείξει ότι το ένζυμο υφίσταται ομοιοπολική ρύθμιση της δραστηριότητάς του μέσω φωσφορυλίωσης- αποφωσφορυλίωσης^{55, 56}. Στη φωσφορυλιωμένη του μορφή είναι ενεργό⁵⁵ και σε αυτό συμβάλλουν, σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα, η cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση^{57, 58}, η Ca/καλμοδουλίνη-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση⁵⁹ και η MAP-κινάση p-38⁶⁰, ενώ απενεργοποιείται με αποφωσφορυλίωση.

Τέλος, σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2008, γίνεται λόγος για δύο ισομορφές της λυσο-PAF AT. Η πρώτη, ενεργοποιείται από φλεγμονώδεις παράγοντες, παρουσιάζει όμως δραστηριότητα και σε κανονικές συνθήκες καταλύοντας τον σχηματισμό φωσφατιδυλοχολίνης κατά την βιογένεση των κυτταρικών μεμβρανών. Η δεύτερη ισομορφή, δείχνει να συμμετέχει στην παραγωγή PAF σε βασικά επίπεδα παραμένοντας, όμως, ανενεργή σε κατάσταση φλεγμονής⁶¹.

2.5.2 Αποικοδόμηση του PAF

Το κύριο προϊόν της διαδικασίας αποικοδόμησης του PAF είναι το ανενεργό μόριο λυσο-PAF το οποίο προκύπτει από την απομάκρυνση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του γλυκεριναιθερικού σκελετού. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο PAF-ακετυλοϋδρολάση και μπορεί να οδηγήσει στο μόριο ALPA με τη δράση μιας ειδικής φωσφολιπάσης D. Άλλα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση αυτή είναι η λεκιθίνη:χολεστερόλη ακυλοτρανσφεράση (LCAT) και η CoA ανεξάρτητη τρανσακετυλάση εκ των οποίων η πρώτη μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-PC μόριο, ενώ η δεύτερη σε λυσο-πλάσμογόνο. Μια άλλη οδός αποικοδόμησης του PAF είναι η μετατροπή του σε AAG με την δράση μιας φωσφολυπάσης C, η υδρόλυσή του σε AG μέσω μιας ακετυλοϋδρολάσης (ειδικής για ουδέτερα λιποειδή) και η κατάληξή του σε γλυκερόλη μέσω μιας μονοξυγονάσης. Στο σχήμα 2.5 παρουσιάζονται όλες οι παραπάνω αντιδράσεις.



Σχήμα 2.5: Αντιδράσεις αποικοδόμησης του PAF³⁸

2.5.2.1 Ένζυμα αποικοδόμησης του PAF

Η PAF-AH είναι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του PAF. Κατατάσσεται στην κατηγορία των PLA₂, σε αντίθεση όμως με τις περισσότερες φωσφολιπάσες, η δράση της δεν εξαρτάται από το ασβέστιο (Ca²⁺) και επιπλέον, έχει την ιδιότητα να αποσπά από την sn-2 θέση του γλυκεριναιθερικού σκελετού εστεροποιημένες μικρές ανθρακικές αλυσίδες^{62, 63}. Επίσης, η καταλυτική της δράση δεν επηρεάζεται από το είδος του δεσμού που είναι συνδεδεμένο το λιπαρό οξύ στην sn-1 θέση⁶⁴.

Έχουν χαρακτηριστεί δύο ενδοκυτταρικές ισομορφές και μια εκκρινόμενη (εξωκυτταρική), οι οποίες εντοπίζονται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς (π.χ. ήπαρ, αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα)^{65, 66}.

Η εκκρινόμενη PAF-AH, γνωστή και ως lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂), συναντάται στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες μεγάλης πυκνότητας (HDL)

σε ένα ποσοστό 20% και με τις λιποπρωτεΐνες μικρής πυκνότητας (LDL) κατά 80%, με τη δυνατότητα μάλιστα να μεταφέρεται ανάμεσα στις δύο, χωρίς όμως η έκκρισή της να σχετίζεται με τον σχηματισμό των λιποπρωτεϊνών^{67, 68, 69}. Η Lp-PLA₂ παράγεται από κύτταρα του αίματος ή ιστών όπως τα μακροφάγα, τα ηπατοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα T-λεμφοκύτταρα.

Η ενδοκυτταρική PAF-AH εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και των ιστών⁶⁶ με δύο διαφορετικές ισομορφές Ib και II. Η PAF-AH II κυριαρχεί σε κάποιους ιστούς όπως το ήπαρ και τα νεφρά και έχει 43% ομολογία (στην αλληλουχία των αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα) με την PAF-AH του πλάσματος.

Η ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική PAF-AH παρουσιάζουν σχετικά όμοιες ιδιότητες. Η μόνη διαφορά τους εντοπίζεται στο γεγονός ότι η ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ανθεκτικότητας στη δράση των πρωτεασών κατά την πρωτεόλυση⁷⁰ και στους αναστολείς της υδρολάσης της σερίνης PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride) και DFP διυσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό οξύ⁶³.

2.6 PAF και Φλεγμονή^{71, 72}

Η επίδραση του PAF στη φλεγμονώδη αντίδραση, τόσο στη φυσιολογική (τυχαία, οξεία) όσο και στην παθολογική (χρόνια), φαίνεται ότι είναι καθοριστική, και συνδέεται με την ικανότητά του να δρα ως μεσολαβητής στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, να διεγείρει τα φλεγμονώδη κύτταρα καθώς και στην ενδοκυτταρική σήμανση (intracellular signaling).

Την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, όπως τα φαγοκύτταρα και τα μονοκύτταρα μέσω κάποιου μεσολαβητή της φλεγμονής, διαδέχεται η παραγωγή PAF, εικοσανοειδών, ισταμίνης και κυτταροκινών. Ο παραγόμενος PAF μπορεί είτε να εκκριθεί από τα κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα, είτε να δράσει ενδοκυτταρικά σε πυρηνικούς υποδοχείς. Επιπρόσθετα σε κάποια κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στην μεμβράνη των κυττάρων και συμμετέχει στην επικοινωνία τους με άλλα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα του PAF. Ο PAF που είτε εμφανίζεται στην μεμβρανική επιφάνεια των κυττάρων είτε κυκλοφορεί στο πλάσμα, μπορεί να προκαλέσει την αλληλεπίδραση των κυττάρων αυτών καθώς και την ενεργοποίηση άλλων, ενισχύοντας το αρχικό σήμα της φλεγμονώδους απόκρισης. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της αναγνώρισης και της δέσμευσης του PAF από τους ειδικούς υποδοχείς του, που εκφράζονται από τα κύτταρα στόχους και εμφανίζονται στην επιφάνεια της μεμβράνης τους, και της συνεργιστικής του δράσης με την P-σελεκτίνη που τα ενεργοποιεί.

Ο υποδοχέας του PAF εκφράζεται και σε άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως στα φαγοκύτταρα και προκαλείται ισχυρή προσκόλληση -των τελευταίων- στα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας λόγω της αύξησης των CD11/CD18 ιντεγκρινών τους.

Προσκόλληση μονοκυττάρων παρατηρείται και στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα που παράγουν και εκθέτουν στην επιφάνειά τους PAF, ο οποίος με τη σειρά του εγείρει την έκφραση και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών στην επιφάνειά τους, όπως τη θρομβίνη (συσσώρευση αιμοπεταλίων), την ισταμίνη, το λευκοτριένιο D4, τη βραδυκινίνη, και την τριφωσφορική αδενοσίνης (ATP).

Ανασταλτική δράση στην εμφάνιση ή στην εξέλιξη φλεγμονωδών καταστάσεων στον οργανισμό, έχει φανεί ότι παρουσιάζουν διάφοροι ανταγωνιστές του PAF καθώς και η PAF-AH οι οποίοι υπονομεύουν, ουσιαστικά, τον παρακρινή ρόλο του PAF, ανακόπτοντας την κρίσιμη διαδικασία αλληλεπίδρασης κυττάρου- κυττάρου^{73, 74}.

2.7 PAF και Αθηροσκλήρωση^{64, 75, 76, 77}

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια και πολυπαραγοντική φλεγμονώδης νόσος, της οποίας οι διαδικασίες ανάπτυξης και εξέλιξης θα μπορούσαν να παραλληλισθούν με ένα μεγάλο πολύπλοκο και δαιδαλώδες δίκτυο διασυνδεδεμένων/διασταυρούμενων βιομηχανικών μηχανισμών στο οποίο ο PAF εντοπίζεται σχεδόν σε κάθε του κόμβο. Θεωρείται ο ισχυρότερος λιποειδικός μεσολαβητής, μιας και με τη δράση του συμβάλλει στην αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, την οξείδωση της LDL, την απελευθέρωση δραστικών μορίων οξυγόνου και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία συνεπάγεται τη θρόμβωση.

Οι παραπάνω ιδιότητες αποδίδονται στον PAF αφενός λόγω του ότι βιοσυντίθεται από έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων, όπως τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αφρώδη κύτταρα, τα αιμοπετάλια, καθώς και κατά την οξείδωση της LDL, και αφετέρου λόγω του ότι οι υποδοχείς του εμφανίζονται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων, όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα φαγοκύτταρα, τα αιμοπετάλια κ.α., ενοποιώντας και συντονίζοντας έτσι την δράση όλων τους για τον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.

Ο PAF θεωρείται ότι αποτελεί μια ένωση “κλειδί” για την αθηρογένεση. Διάφορα, όμως, πειραματικά δεδομένα, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, δείχνουν ότι εκτός από ένωση “κλειδί” αποτελεί τη γενεσιουργό αιτία της αθηρογένεσης, μια ιδιότητα που αρχικά αποδιδόταν στην LDL, στα υψηλά επίπεδα αυτής και στην οξείδωσή της.

Τα πειράματα αυτά έδειξαν αφενός ότι αθηρογόνο δράση έχουν τα ox-LDL και όχι τα LDL σωματίδια, και αφετέρου ότι τόσο η ίδια η οξείδωση της LDL όσο και η αθηρογόνος δράση των ox-LDL οφείλονται στη διαμεσολάβηση των λειτουργιών του PAF και των PAF-like μορίων.

Η παρουσία, λοιπόν, LDL στην κυκλοφορία του αίματος αποτελεί αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη για την έναρξη της αθηρωματικής διαδικασίας μιας και υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό ελέγχονται. Στις περιπτώσεις όμως

φλεγμονώδους κατάστασης ή οξειδωτικού στρες, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων PAF. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση της LDL και την παραγωγή επιπλέον ποσότητας PAF. Παράλληλα ο PAF συνδέεται με τους υποδοχείς του στην επιφάνεια του ενδοθηλίου διεγείροντάς το και αυξάνοντας την διαπερατότητά του. Μόρια οξειδωμένης LDL και μονοκύτταρα εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο, δημιουργούνται μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα και πολλαπλασιάζονται και αρχίζει ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων τα οποία αποτελούν τη θεμέλια ουσία οικοδόμησης ινώδους πλάκας.

Κρίσιμο, λοιπόν, σημείο για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης αναδεικνύεται η ρύθμιση των επιπέδων του PAF στον οργανισμό, μια διαδικασία που ρυθμίζεται τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, από τις PAF-ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AHs), από εξωγενή ή ενδογενή αντιοξειδωτικά και από τους ανταγωνιστές του PAF.

Όπως είδαμε, ο PAF και τα PAF-like μόρια, συμβάλλουν στην οξείδωση της LDL. Αυτό συμβαίνει μέσω της απελευθέρωσης δραστικών μορίων οξυγόνου και μέσω της διέγερσης μονοκυττάρων και μακροφάγων τα οποία παράγουν ανιόντα υπεροξειδίων και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγεται PAF. Οι οξειδωμένες LDL παρουσιάζουν διάφορες αθηρογόνες ιδιότητες όπως την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, που αποτελεί ένα από τα αρχικά γεγονότα της αθηρογένεσης. Επίσης, στην παρουσία ox-LDL, οφείλεται και η σταδιακή απώλεια της δραστηριότητας της PAF-AH, με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της συγκέντρωσης PAF στο αίμα και την μείωση της δραστηριότητας της HDL.

Τα κύτταρα του ενδοθηλίου, εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς του PAF με τους οποίους ο PAF συνδέεται, ενεργοποιώντας και τροποποιώντας τις λειτουργίες τους. Επίσης, συντίθεται από αυτά και δρα ως παρακρινής μεσολαβητής στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και ως αυτοκρινής προκαλώντας φλεγμονώδη απάντηση με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου.

Από τον PAF, ενεργοποιούνται και τα μονοκύτταρα τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα του στην πλασματική τους μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό, προσκολλώνται ταχύτατα στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή ενδοθηλιακά κύτταρα που φέρουν την P – σελεκτίνη, με αποτέλεσμα τη σύνθεση χημειοκινών, κυτταροκινών και ιστικού παράγοντα. Τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα και αυτά σε αφρώδη κύτταρα, υποενδοθηλιακά. Από τα δύο τελευταία, έχει παρατηρηθεί σύνθεση PAF κατά την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης.

Όπως είδαμε και πιο πάνω, ο PAF συνδέεται μέσω των υποδοχέων του, με τα αιμοπετάλια, τα ενεργοποιεί και προκαλεί την συσώρευσή τους. Παράλληλα, βιοσυντίθεται από τα ενεργοποιημένα και προσκολλημένα στο ενδοθήλιο αιμοπετάλια και παραμένει συνδεδεμένος σε αυτά συμμετέχοντας στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα κύτταρα.

Η δράση του PAF εντοπίζεται και κατά τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών

κυττάρων διεγείροντας τη μεταγραφή μιας ηπαρίνης που δεσμεύει τον επιδερμικό παράγοντα αύξησης στα μονοκύτταρα και τη σύνθεση IL-6 στα λεία μυϊκά κύτταρα.

Επιπλέον, ο PAF συνεισφέρει και στην διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας, απελευθερώνοντας πρωτεάσες οι οποίες αποικοδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας του έσω και μέσου χιτώνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΡΑΣΙ

3.1 Γενικά

Ο οίνος, είναι το προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης της γλυκόζης που βρίσκεται στον χυμό των σταφυλιών, των οποίων η καλλιέργεια είναι γνωστή από το 5000 π. Χ. περίπου. Η λέξη κρασί, προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη *κρᾶσις* που σημαίνει *ανάμειξη* και δήλωνε αρχικά την ανάμειξη οίνου και νερού. Με τον καιρό επεκτάθηκε σε κάθε είδους οίνο και αποτελεί, πλέον, έννοια ταυτόσημη⁷⁸.

Τα χρησιμοποιούμενα για την παραγωγή του κρασιού σταφύλια ανήκουν στο είδος *Vitis Vinifera* από τα οποία παράγεται μια μεγάλη ποικιλία κρασιών όπως τα ξηρά, τα αφρώδη τα γλυκά και τα αρωματικά. Η ποικιλία καθώς και η ποιότητα των κρασιών εξαρτάται από: α) τη σύσταση των σταφυλιών από την οποία προέρχονται, β) τις συνθήκες ζύμωσης και γ) τις μεταβολές που υφίσταται το κρασί κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης⁷⁹.

Το κρασί αποτελεί βασικό στοιχείο της μεσογειακής δίαιτας της οποίας η προστατευτική δράση από καρδιοπάθειες και διάφορες μορφές καρκίνου έχει επισημανθεί από το 1970 με την μελέτη των επτά χορών⁸⁰.

3.2 Σύσταση του κρασιού

Η ανάπτυξη, κυρίως, των τεχνικών της χρωματογραφίας (GC, HPLC, TLC, DCCC) τα τελευταία 30-40 χρόνια, έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση 500 και πλέον συστατικών του κρασιού. Από αυτά τα κυριότερα είναι α) το νερό, που καταλαμβάνει ποσοστό 80-85% της συνολικής σύστασής του, β) οι αλκοόλες, όπως η αιθανόλη, με 9-15% και γ) διάφορες άλλες ουσίες που βρίσκονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (~3%)⁸¹. Η ακριβής σύσταση καθώς και οι συγκεντρώσεις του κάθε συστατικού διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών, το χρόνο ωρίμανσής τους, τις κλιματολογικές και τις γεωγραφικές συνθήκες κατά την ωρίμανση των σταφυλιών και άλλους παράγοντες⁸².

Τα συστατικά του κρασιού μπορούν διαιρεθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: το νερό, τα οργανικά συστατικά και τα ανόργανα συστατικά τα οποία παρουσιάζονται πιο αναλυτικά παρακάτω.

3.2.1 Νερό

Το νερό είναι το συστατικό που επικυριαρχεί, ποσοτικά, στη σύσταση τόσο των σταφυλιών όσο και του κρασιού και είναι υπεύθυνο για κάποια από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του τελευταίου όπως ο υδάτινος χαρακτήρας και η πυκνότητά του. Συμμετέχει σε πολλές χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς και κατά την διαδικασία της ωρίμανσης και της παλαίωσης⁸¹.

3.2.2 Οργανικά συστατικά

3.2.2.1 Οργανικά οξέα^{79, 81}

Τα οργανικά οξέα αποτελούν μια σημαντική ομάδα ενώσεων για το κρασί μιας και συμμετέχοντας στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του όπως την γεύση και το άρωμα καθώς και στην προστασία του από μικροβιολογικές και χημικές προσβολές.

Τα οργανικά οξέα, χωρίζονται σε πτητικά και μη πτητικά ή σταθερά.

Πτητικά: Το πιο σημαντικό πτητικό οξύ του κρασιού είναι το οξικό οξύ, το οποίο αποτελεί δείκτη οξύνης του. Η περιεκτικότητά του κυμαίνεται γύρω στα 0.35 g/L ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συνδέεται με την βακτηριακή προσβολή και το “ξίνισμα” με αποτέλεσμα την ανάδυση άσχημων οσμών. Άλλα πτητικά οξέα είναι το βουτυρικό, το μυρμηγκικό, το προπιονικό, το φορμικό και το ισοβουτυρικό.

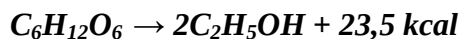
Μη πτητικά: Σε αυτά οφείλεται η χαρακτηριστική όξινη γεύση του κρασιού. Τα πιο σημαντικά οξέα είναι το τρυγικό (1,5- 4,4 g/L) το οποίο είναι σταθερό σε βακτηριακές προσβολές και υπεύθυνο για τη διαμόρφωση του pH, το μηλικό (0- 4 g/L) το οποίο μένει σχεδόν αμετάβλητο κατά την αλκοολική ζύμωση και μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτικό ή πυροσταφυλικό και το κιτρικό (0- 0,5 g/L) το οποίο προέρχεται από τα σταφύλια διατηρώντας την περιεκτικότητά του κατά την αλκοολική ζύμωση και μπορεί να μετατραπεί σε οξικό οξύ. Άλλα μη πτητικά οξέα είναι το γαλακτικό, το ηλεκτρικό, το γλυκουρονικό, το γλυκονικό, το οξαλοξικό, το ουρονικό, το κιτρομηλικό, το ασκορβικό το α-κετογλουταρικό, το πυροσταφυλικό και το διμεθυλογλυκερικό.

3.2.2.2 Αλκοόλες

Οι αλκοόλες, αποτελούν προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων του μούστου (γλεύκους) οι οποίες με την εμφάνισή τους, σ' αυτό το υδατικό διάλυμα των ανόργανων και οργανικών συστατικών των σταφυλιών, σηματοδοτούν την μετουσίωση του μούστου σε κρασί. Επίσης, σε συνδυασμό με τα οργανικά οξέα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τα οργανοληπτικά

χαρακτηριστικά του κρασιού και λειτουργούν ως προστατευτικοί παράγοντες συμβάλλοντας στην σταθερότητα και στην διατηρησιμότητά του.

Το κύριο προϊόν της βιολογικής αποικοδόμησης της φρουκτόζης και της γλυκόζης του γλεύκους (αλκοολική ζύμωση) είναι η αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη):



Οι βασικότεροι παράγοντες που ελέγχουν την παραγωγή της, είναι τα σάκχαρα, η θερμοκρασία και τα στελέχη των ζυμών του γλεύκους. Η αιθανόλη αποτελεί τη σημαντικότερη, ίσως, αλκοόλη του κρασιού, μιας και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή της κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, περιορίζεται όλο και περισσότερο η ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διατήρηση της σταθερότητας, καθώς και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κρασιού. Η περιεκτικότητα της αιθανόλης στο κρασί ποικίλλει από 12 έως 14 gr/L.

Μια άλλη αλκοόλη που εντοπίζεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στο κρασί (0,1 – 0,2 g/L) σε σχέση με την αιθανόλη, είναι η μεθανόλη η οποία σχηματίζεται κατά την ενζυματική υδρόλυση των πηκτινών, μιας ομάδας πολυσακχαριτών που υπάρχουν στους ιστούς των σταφυλιών. Χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό μιας και συγκεντρώνεται στους ιστούς με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό, οξειδώνεται παράγοντας φορμαλδεΐδη και μυρμιγκικό οξύ και προκαλεί μεγάλες βλάβες ή και καταστρέφει το οπτικό νεύρο του οφθαλμού, προκαλώντας τύφλωση, και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, το θάνατο^{81, 83}.

Δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, που σχηματίζονται σε μικρές ποσότητες από σάκχαρα και αμινοξέα, είναι οι ανώτερες αλκοόλες. Έχουν 3 με 6 άτομα άνθρακα και ο σχηματισμός τους εξαρτάται από την δράση των ζυμών, την συγκέντρωση των σακχάρων και των αμινοξέων καθώς και τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όπως η θερμοκρασία, το pH, τα επίπεδα οξυγόνου κ.ά. Αν και, κατά κανόνα, έχουν έντονη και άσχημη οσμή, σε μικρές συγκεντρώσεις επιδρούν θετικά στο άρωμα του κρασιού. Οι ανώτερες αλκοόλες που εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο κρασί, είναι κατά φθίνουσα σειρά: η 3-μεθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη), 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, η 2-μεθυλ-1-προπανόλη (ισοβουτυρική αλκοόλη) και η 1-προπανόλη.

Μια άλλη κατηγορία αλκοολών είναι οι πολυαλκοόλες, οι οποίες είναι προϊόντα αναγωγής των σακχάρων του σταφυλιού. Από τις πολυαλκοόλες ενδιαφέρον για τα τρόφιμα παρουσιάζουν από τις εξιτόλες η D-σορβιτόλη, η D-μαννιτόλη και από τις πεντιτόλες η ξυλιτόλη.

3.2.2.3 Αρωματικές ενώσεις

Το άρωμα του κρασιού, το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως ταυτότητα για το είδος την ποικιλία αλλά και την κατάστασή του (φρέσκο, παλαιωμένο, ξινισμένο, αλλοιωμένο κ.τ.λ.), οφείλεται κατά κύριο λόγο στις ανώτερες αλκοόλες, για τις οποίες έχει ήδη γίνει αναφορά, και στους εστέρες.

Πάνω από 160 εστέρες έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί στο κρασί, οι περισσότεροι από τους οποίους σχηματίζονται από την αντίδραση της αιθανόλης με ελεύθερα πτητικά οργανικά οξέα κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης ή κατά την παλαίωση. Ο συχνότερα απαντούμενος στο κρασί εστέρας, είναι ο οξικός αιθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από την εστεροποίηση της αιθανόλης και του οξικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες, συνήθως, κυμαίνεται είναι 50 – 100 mg/L.

Στο άρωμα το κρασιού, συνεισφέρουν σημαντικά και άλλα στοιχεία όπως διάφορες καρβονυλικές ενώσεις (αλδεΐδες, κετόνες), καθώς και τα τερπένια. Τα τερπένια είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Στο κρασί εντοπίζονται κυρίως τα μονοπρένια (τερπένια με 10 άτομα άνθρακα), των οποίων η δομή δεν επηρεάζεται από τις ζυμώσεις και η συνολική συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 1 και 3 mg/L^{81, 85}.

3.2.2.4 Σάκχαρα

Στη διαδικασία της οينوποίησης, κομβικό στάδιο αποτελεί η αλκοολική ζύμωση, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.2. Ο χυμός των ώριμων σταφυλιών είναι πλούσιος σε γλυκόζη (από 150 έως 250g/l) και φρουκτόζη, δύο σάκχαρα τα οποία λειτουργούν ως οργανικό υπόστρωμα του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* κατά την αλκοολική ζύμωση με την σειρά τους την καταναλώνουν με σκοπό την παραγωγή ενέργειας σε μορφή ATP.

Η περιεκτικότητα σακχάρων αποτελεί βασική παράμετρο κατηγοριοποίησης των κρασιών σε γλυκά, στα οποία είναι μεγαλύτερη από 50%, ξηρά όπου είναι μικρότερη του 1%, και στις ενδιάμεσες κατηγορίες.

3.2.2.5 Πολυσακχαρίτες^{86, 87}

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερείς ενώσεις σακχάρων με σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος και χαρακτηρίζονται ως ομογενείς όταν στην αλυσίδα τους περιέχουν ένα είδος σακχάρου και ετερογενείς όταν περιέχουν περισσότερα από ένα.

Στο κρασί η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από 100 mg μέχρι μερικά γραμμάρια ανά λίτρο.

Λόγω της μοριακής τους σύστασης και των κολλοειδών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν, εμποδίζουν τη διήθηση του κρασιού και συμπεριφέρονται ως προστατευτικά κολλοειδή.

Διακρίνονται σύμφωνα με την προέλευσή τους σε πολυσακχαρίτες του σταφυλιού, πολυσακχαρίτες που προέρχονται από την αυτόλυση των ζυμών, πολυσακχαρίτες που προέρχονται από τα βακτήρια, πολυσακχαρίτες που παράγονται από βακτήρια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση και πολυσακχαρίτες που παράγονται από τον *Botrytis cinerea*. Οι πολυσακχαρίτες του γλεύκους προέρχονται από την φλούδα της ρόγας και διακρίνονται στις πηκτίνες και τα κόμμεα.

Οι πηκτίνες είναι μεγαλομοριακοί υδατάνθρακες, με μεγάλα μοριακά βάρη και αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού του γαλακτουρονικού οξέος. Μετά τη σύνθλιψη της ρόγας, τα εστεροποιημένα με μεθανόλη τμήματα της πηκτινικής αλυσίδας υδρολύονται ενζυματικά. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης και της ωρίμανσης του κρασιού, η συγκέντρωση των πηκτινών είναι αμελητέα.

Τα κόμμεα, που συχνά αναφέρονται ως γόμμες, είναι ανυδρίτες πεντοζών ή εξοζών με γενικό μοριακό τύπο $(C_5H_{10}O_5)-nH_2O$ ή $n(C_6H_{12}O_6)-nH_2O$, τα οποία όταν υδρολύονται σε όξινο περιβάλλον, απελευθερώνουν μονοσακχαρίτες που αποτελούν ένα μέρος από τα αναγωγικά ζάχαρα του κρασιού. Η περιεκτικότητά τους στο κρασί κυμαίνεται από 0,1-3 g/l.

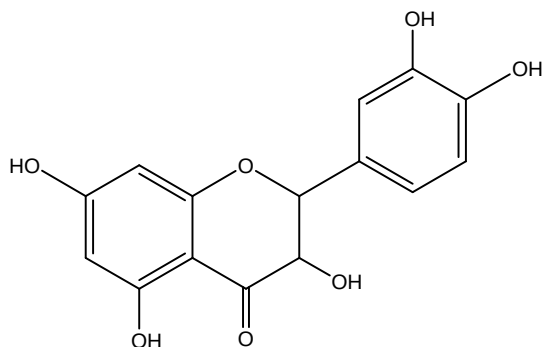
3.2.2.6 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις φέρουν μια ομάδα $-OH$ απευθείας συνδεδεμένη σε έναν αρωματικό δακτύλιο ($ArOH$). Έχουν εντοπιστεί πάνω από 200 είδη φαινολικών ενώσεων στο κρασί οι οποίες προέρχονται από τη φλούδα, τη σάρκα και τα κουκούτσια των σταφυλιών. Είναι υπεύθυνες για τη γεύση, το χρώμα και το άρωμα του κρασιού, έχουν έντονα προστατευτικό ρόλο λόγω των αντιμικροβιακών, αντιβιοτικών και αντισηπτικών τους ιδιοτήτων και συνεισφέρουν στην παλαίωση.

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: στις σύνθετες πολυφαινόλες και στις απλές. Οι σύνθετες πολυφαινόλες διακρίνονται περαιτέρω στις флаβονοειδείς και στις μη флаβονοειδείς φαινόλες.

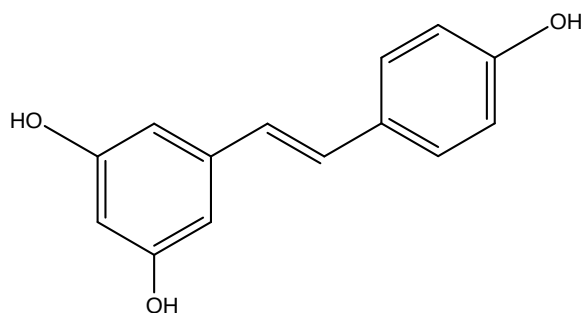
Οι флаβονοειδείς φαινόλες είναι πολυφαινολικές ενώσεις με γενικό τύπο $C_6-C_3-C_6$. Η δομή τους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη του флаβανικού σκελετού, ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους στα άκρα και από έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο, ο οποίος φέρει οξυγόνο⁸⁸. Οι κυριότερες υποκατηγορίες είναι οι флаβονόλες ή ανθοξανθίνες (κερκετίνη, καμπφερόλη), οι τανίνες (φλαβανόλες) που εντοπίζονται στο κρασί τόσο με την μονομερή τους μορφή ως κατεχίνες (κατεχίνη, γαλλοκατεχίνη) όσο και με την πολυμερή τους μορφή ως

προανθοκυανιδίνες⁸⁹ και οι ανθοκυανίνες οι οποίες είναι υδατοδιαλυτά μόρια που ευθύνονται για το κόκκινο χρώμα του κρασιού μέσω της αντίδρασής τους με κατεχίνη και αιθανόλη⁹⁰. Χαρακτηριστική δομή φλαβονόλης είναι η δομή της κερκετίνης, που απεικονίζεται στο σχήμα 3.1.



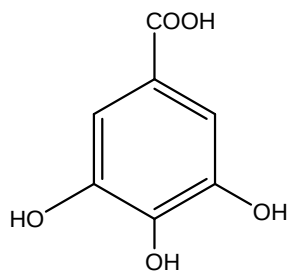
Σχήμα 3.1: Χημική δομή κερκετίνης

Όσον αφορά στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες, πρόκειται για περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινολικές ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με ένα αιθάνιο ή μια αιθυλενική αλυσίδα. Σε αυτές, συγκαταλέγονται τα στιλβένια το πιο σημαντικό από τα οποία είναι η ρεσβερατρόλη (σχήμα 3.2), η οποία προέρχεται από τους φλοιούς του σταφυλιού και για το λόγο αυτό ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο στο κόκκινο κρασί. Αν και η περιεκτικότητά της είναι σχετικά μικρή, της τάξης των 1-3 mg/l, της έχουν αποδοθεί πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων για τον ανθρώπινο οργανισμό, μεταξύ άλλων και προστατευτική δράση απέναντι στα καρδιαγγειακά νοσήματα⁹¹.



Σχήμα 3.2: Χημική δομή ρεσβερατρόλης

Στις απλές φαινολικές ενώσεις ανήκουν τα φαινολικά οξέα τα οποία αποτελούνται από έναν φαινολικό δακτύλιο και μπορούν να διαχωριστούν σε παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το παρακουμαρικό οξύ και σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, όπως το βανιλλικό, το γαλλικό (σχήμα 3.3) και το συριγγικό οξύ. Η παρουσία τους στο κρασί οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου ενυπάρχουν στους φλοιούς και τη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών, όπου γίνεται η παλαίωση. Εμφανίζονται είτε ως ελεύθερα φαινολικά μόρια, είτε ενωμένα με άλλα μόρια, σάκχαρα, οργανικά οξέα ή αλκοόλες, ως δομικά συστατικά σύνθετων ενώσεων.



Σχήμα 3.3: Χημική δομή γαλλικού οξέος

Η περιεκτικότητά του συνόλου των μη φλαβονοειδών φαινολών είναι 100-150 mg/L για τους ερυθρούς οίνους και 10-15mg/L στους λευκούς. Κατά την παλαίωση σε ξύλινα βαρέλια, οι ερυθροί οίνοι εμπλουτίζονται σε φαινολοξέα σε ποσότητες που ποικίλλουν ανάλογα με την προέλευση του ξύλου και το βαθμό αποξήρανσής του⁹².

3.2.3 Αζωτούχες ενώσεις^{79, 81}

Οι αζωτούχες ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην καθαρότητα του κρασιού, μιας και αποτελούν θρεπτικό συστατικό των ζυμών, των βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών, καθώς και στον σχηματισμό του αρώματός του. Η περιεκτικότητά τους στο κρασί κυμαίνεται από 0,5 έως 4 g/L. Έχει παρατηρηθεί ότι τα κόκκινα κρασιά είναι πλουσιότερα σε αζωτούχες ενώσεις σε σχέση με τα λευκά. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τα στερεά μέρη των σταφυλιών τα οποία παραμένουν περισσότερο χρόνο σε επαφή με το γλεύκος στην “ερυθρή” οينوποίηση σε σχέση με τη “λευκή”. Οι αζωτούχες ενώσεις χωρίζονται σε ανόργανες και σε οργανικές. Στην κατηγορία των ανόργανων ανήκουν τα αμμωνιακά άλατα ενώ στην κατηγορία των οργανικών ανήκουν οι πρωτεΐνες, τα πολυπεπίδια, τα αμινοξέα (αλανίνη, ασπαραγινικό, γλουταμινικό, προλίνη), τα αμίδια (ασπαραγίνη, γλουταμίνη) οι βιογενείς αμίνες, οι νουκλεϊνικές ενώσεις, και οι εξοζαμίνες (γλυκοζαμίνες, γαλακτοζαμίνες).

3.2.4 Ένζυμα

Τα ένζυμα που εντοπίζονται στο κρασί είναι κυρίως καταλάσες, οξειδάσες, ιμπερτάσες, πρωτεάσες, τανάσες και άλλα.

3.2.5 Βιταμίνες

Οι κυριότερες βιταμίνες που περιέχονται στο κρασί είναι: θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), πεντοθενικό οξύ (B5), νικοτιναμίδιο, αδερίνη (B4), βιοτίνη, ασκορβικό οξύ (C), βιταμίνη της διαπερατότητας (P).

3.2.6 Λιποειδή^{93, 94}

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη κλασικών γλυκερινούχων λιποειδών τόσο σε κόκκινο όσο και σε λευκό κρασί. Πιο συγκεκριμένα, τα λιποειδή που έχουν βρεθεί, ανήκουν στην τάξη των φωσφο-γλυκερινούχων λιποειδών, των γλυκο-γλυκερινούχων λιποειδών και φωσφο-γλυκο γλυκερινούχων λιποειδών.

3.2.7 Ανόργανα συστατικά

Τα ανόργανα συστατικά που εντοπίζονται στο κρασί, προέρχονται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού (μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα κόκκινα κρασιά όπως συμβαίνει και με τις αζωτούχες ενώσεις) και από τα υλικά με τα οποία έρχεται σε επαφή ο μούστος και το κρασί κατά την αλκοολική ζύμωση, την ωρίμανση, την παλαίωση και την συντήρηση (βαρέλι, δεξαμενές, δοχεία, σωληνώσεις, συσκευές επεξεργασίας, φίλτρα και άλλες διατάξεις). Τα βασικότερα από αυτά είναι:

Κατιόντα: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+}

Ανιόντα: SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{2-} , Si , B , F^- , Br^- , I^-

Η περιεκτικότητα των ανόργανων συστατικών στο κρασί είναι 2 – 4g/L.

3.3 Βιολογικές δράσεις

Αναφορές για τις ευεργετικές επιδράσεις του οίνου στην υγεία υπάρχουν ήδη από το 450 π.Χ., περίπου, όταν ο Ιπποκράτης συνιστούσε την κατανάλωσή του με τη μορφή διάφορων σκευασμάτων (π.χ. προσθήκη αψίνθου), ή ακόμα και σκέτου, χωρίς την ανάμειξη με νερό (ακρατέστατος οίνος), ως αντιπυρετικό, διουρητικό, απολυμαντικό σε πληγές ή απλά, ως διατροφικό πρόσθετο.

Το έναυσμα όμως για την συστηματική ενασχόληση της σύγχρονης ιατρικής, που είναι βασισμένη στην επιστημονική τεκμηρίωση (**Evidence-Based Medicine**), με το κρασί, δόθηκε το 1970 με την δημοσίευση μιας συστηματικής επιδημιολογικής μελέτης που διεξήχθη σε 7 χώρες υπό την καθοδήγηση του καθηγητή Ancel Keys του Πανεπιστημίου της Μινεσότα⁸⁰. Η μελέτη αυτή, η οποία είναι πλέον γνωστή ως "Μελέτη των Εφτά Χωρών", ανέδειξε τα συστατικά της μεσογειακής διαίτας, της οποίας αναπόσπαστο κομμάτι είναι και το κρασί, ως βασική αιτία για τον χαμηλό δείκτη θνησιμότητας και νοσηρότητας από καρδιαγγειακές νόσους των χωρών που την εφαρμόζαν σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Την μελέτη αυτή ακολούθησαν πολλές άλλες⁹⁵ και το 1992, οι γιατροί Renaud και De

Lorgeril ⁹⁶, με τη δημοσίευση μιας εργασίας τους στο περιοδικό Lancet, εισήγαγαν το όρο “Γαλλικό παράδοξο” (“French Paradox”) στρέφοντας το βλέμμα της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας στην νότια Γαλλία. Συγκεκριμένα, στην περιοχή της Τουλούζης παρατηρήθηκε πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας καρδιακής νόσου παρά την αυξημένη κατά κεφαλήν κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε κορεσμένα λιπαρά και τα υψηλά ποσοστά καπνίσματος, παράγοντες των οποίων η θετική συσχέτιση με καρδιαγγειακές παθήσεις είχε καταδειχθεί από το 1970 με την μελέτη Framingham ⁹⁷. Η παραδοξότητα αυτή αποδόθηκε, από μεταγενέστερες έρευνες, στην διαδεδομένη συνήθεια των Γάλλων, να καταναλώνουν καθημερινά μετριοπαθή ποσότητα (1-2 ποτήρια) κρασιού με το γεύμα τους.

Πολλές μελέτες, βέβαια, έθεσαν το ερώτημα αν οι παρατηρούμενες θετικές επιδράσεις του κρασιού στην υγεία, οφείλονται στην αλκοόλη γεγονός που καθιστά κάθε αλκοολούχο ποτό ευεργετικό ή σε άλλα συστατικά του, όπως π.χ. στις πολυφαινόλες στα φλαβονοειδή, στις ανθοκυανίνες, που εντοπίζονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά σε άλλα οινοπνευματώδη ⁹⁸. Στο ερώτημα αυτό δεν έχουν διατυπωθεί ακόμα κοινώς αποδεκτές απαντήσεις αφού και οι δύο απόψεις στηρίζονται σε πολλές και μεγάλες επιδημιολογικές έρευνες.

Το 1995 δημοσιοποιήθηκε μια τέτοια στην οποία παρακολουθήθηκαν 7.234 γυναίκες και 6.051 άνδρες για 12 περίπου χρόνια και η οποία δεν βρήκε συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση μύρας ή άλλων αλκοολούχων ποτών και στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Εντούτοις, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα και στη μετριοπαθή κατανάλωση αλκοόλ με τη μορφή κρασιού ⁹⁹.

Σε μια πιο πρόσφατη δημοσίευση μιας έρευνας που διήρκεσε 20 χρόνια, με δείγμα 12.8934 ενήλικες και διεξήχθη σε δύο πόλεις της Καλιφόρνια, παρατηρήθηκε μείωση της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα (κατά κύριο λόγο), η οποία συσχετίστηκε με την μέτρια κατανάλωση λευκού, κόκκινου και άλλων τύπων κρασιού σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την μύρα ή το λικέρ ¹⁰⁰. Σημαντικό επιχείρημα στην θέση αυτή αποτελεί και η μελέτη παρέμβασης της Καρατζή και των συνεργατών της που διερεύνησε την επίδραση του κόκκινου κρασιού και του κόκκινου κρασιού που του είχε αφαιρεθεί το αλκοόλ σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της αρτηριακής δυσκαμψίας και με τους δύο τύπους κρασιού, γεγονός που απομακρύνει την προσοχή μας από τις ιδιότητες των αλκοολών ¹⁰¹.

Στον αντίποδα, υπάρχουν πολλές έρευνες που υποστηρίζουν το αντίθετο όπως για παράδειγμα η δωδεκαετής μελέτη που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό της American Heart Association το 1999 με 21.537 ενήλικες άνδρες για δείγμα, που κατέληγε στο συμπέρασμα ότι οι άνδρες που καταναλώνουν μικρή ή μέτρια ποσότητα αλκοόλ (2 με 6 ποτήρια την εβδομάδα) παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο Αιφνίδιου Καρδιακού Θανάτου, ανεξάρτητα από το είδος του ποτού ¹⁰².

Αυτό που αποτελεί κοινό τόπο για το μεγαλύτερο κομμάτι της επιστημονικής κοινότητας είναι η χαρακτηριστική διαγραμματική περιγραφή της συσχέτισης της κατανάλωσης αλκοόλ και της θνησιμότητας με το λατινικό γράμμα J (shaped curve) που κωδικοποιεί ουσιαστικά τον αυξημένο κίνδυνο θανάτου για όσους υπερκαταναλώνουν αλκοόλ και για όσους απέχουν από αυτό σε σχέση με αυτούς που καταναλώνουν μέτριες ποσότητες (20-30 γραμμάρια περίπου) αλκοολούχων ποτών (αιθανόλης) την ημέρα^{103, 104, 105}.

3.3.1 Αντιοξειδωτική δράση

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στη μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του κρασιού. Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται, από τη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών στα φαινολικά συστατικά και πιο συγκεκριμένα στην δράση τους κατά των ελεύθερων ριζών.

Οι ελεύθερες ρίζες αζώτου (RNS) και οξυγόνου (ROS) αποτελούν προϊόντα φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού και εμφανίζουν έντονη οξειδωτική δράση. Απέναντι σ' αυτά ο οργανισμός αντιπαραθέτει τα ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH) και καταλάση τα οποία σε συνδυασμό με τα αντιοξειδωτικά των τροφών (βιταμίνες C και E, σελήνιο, φαινολικά συστατικά) συμβάλλουν στη διατήρηση των κατάλληλων επιπέδων των ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση, στη προστασία του οργανισμού από παθολογικές καταστάσεις, όπως την υπεροξείδωση των λιποειδών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, την οξείδωση των πρωτεϊνών και την καταστροφή του DNA του κυττάρου (οξειδωτικό στρες). Αποτέλεσμα της δράσης των ROS είναι και η οξείδωση της LDL γεγονός που, όπως έχει καταδειχθεί παραπάνω, συμβάλλει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης^{106, 107}.

Παράγοντες που επιτείνουν την αύξηση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό είναι η φτωχή σε αντιοξειδωτικά (φρούτα, λαχανικά) διαίτα, το κάπνισμα και η έκθεση σε ακτινοβολία UV. Ο τερματισμός της αλυσιδωτής αντίδρασης παραγωγής ελευθέρων ριζών μπορεί να επιτευχθεί με την αναγωγική δράση των φαινολικών ενώσεων οι οποίες παρέχοντας ηλεκτρόνια στις πρώτες, τις σταθεροποιούν.

Ένας άλλος μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών είναι η δέσμευση προ-οξειδωτικών μετάλλων όπως ο σίδηρος (Fe^{2+}) και ο χαλκός (Cu^{2+}), σχηματίζοντας χηλικές ενώσεις με τα ιόντα τους. Με τον τρόπο αυτό περιορίζεται η ικανότητά τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες.

Επίσης προστατεύουν από την δημιουργία ox-LDL, αποτρέποντας την οξείδωση της βιταμίνης E, της α -τοκοφερόλης και των καροτινοειδών (β-καροτένιο, λυκοπένιο) εντός του μορίου της λιποπρωτεΐνης και αυξάνοντας τη ρευστότητα των φωσφολιποειδικών μεμβρανών

της^{108, 109}. Τέλος, οι πολυφαινόλες, έχει φανεί ότι αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων οξειδάση της ξανθίνης, κυκλοοξυγονάσης και λιποξυγονάση τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία οξείδωσης της LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο^{110, 111}, ενώ παράλληλα ενεργοποιούν και αυξάνουν τα επίπεδα των εσωτερικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως GSH, GR, Gpx και άλλων¹⁰⁸.

Τα φλαβονοειδή, αποτελούν μια υποομάδα των φαινολικών συστατικών, των οποίων η αντιοξειδωτική δράση έχει αποτελέσει το επίκεντρο πολλών ερευνών. Η δομή τους και ο βαθμός υδροξυλίωσης, είναι τα κύρια χαρακτηριστικά που τους αποδίδουν την αντιοξειδωτική ικανότητα μιας και σ' αυτά οφείλεται ο περιορισμός της δράσης των ελευθέρων ριζών και ο σχηματισμός σταθερότερων μορίων¹¹². Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί η φλαβονόλη κερκετίνη.

Επίσης, έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει ένα άλλο συστατικό του κρασιού που ανήκει στην οικογένεια των πολυφαινόλων και πιο συγκεκριμένα των στιλβενίων, η ρεσβερατρόλη. Επώαση καρδιακών μυικών κυττάρων με ρεσβερατρόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έδειξε αύξηση των ενζύμων της φάσης II και των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάσης, GSH, GR, GST και NQO1 και προστατευτική δράση ενάντια στην ενδοκυτταρική συσσώρευση ROS¹¹¹.

Επιπλέον σε μελέτη¹¹¹ της εκκαθαριστικής, έναντι ελευθέρων ριζών, ικανότητας των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ρεσβερατρόλη, κερκετίνη και γαλλικό οξύ, φάνηκε πως και οι τρεις παρουσιάζουν τέτοιου είδους δράση. Πιο συγκεκριμένα, το γαλλικό οξύ έδειξε να είναι ο ισχυρότερος εκκαθαριστής με την κερκετίνη να έπεται.

Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει την δράση των φλαβονοειδών και σε καλλιέργειες κυττάρων και έχουν βρει έντονη αντιοξειδωτική δράση. Ο T. Lapidot και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση φαινολικών ενώσεων όπως η κατεχίνη και η κερκετίνη σε β-κύτταρα παγκρέατος σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και βρήκαν σημαντική προστατευτική δράση¹¹⁴, λόγω του ότι ενισχύουν την ανασταλτική δράση της οξειδάσης της γλυκόζης (glucose oxidase) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Παρόλα αυτά έχει επισημανθεί η δυσκολία στη διατύπωση ασφαλών συμπερασμάτων από τέτοιου είδους πειράματα, αφ' ενός εξ αιτίας της αδυναμίας προσομοίωσης των συνθηκών της κυτταρικής καλλιέργειας, με αυτές που επικρατούν στον ανθρώπινο οργανισμό και αφ' εταίρου λόγω του ότι στα κυτταρικά συστήματα που χρησιμοποιούνται δεν περιέχονται ενδογενή αντιοξειδωτικά και έτσι οι έντονες ευεργετικές δράσεις των εξωγενών αντιοξειδωτικών που παρατηρούνται, πιθανώς να είναι πλασματικές¹¹⁵.

3.3.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονώδης απόκριση, αποτελεί, όπως επισημάναμε και παραπάνω, σημαντική διαδικασία του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού απέναντι σε επιβλαβείς παράγοντες. Η επίδραση όμως, τέτοιων παραγόντων και άλλων ζημιογόνων ερεθισμάτων όπως ελεύθερες ενεργές ρίζες, οξειδωμένη LDL κ.α, για μεγάλο χρονικό διάστημα, έχει σαν αποτέλεσμα την παρατεταμένη φλεγμονώδη απάντηση και τη μη φυσιολογική ρύθμιση του μηχανισμού αναστολής της, γεγονός άμεσα συνδεδεμένο με τον τραυματισμό των ιστών και, κατ' επέκταση, με την παθογένεια διάφορων καρδιαγγειακών νοσημάτων/διαταραχών όπως της αθηροσκλήρυνσης.

Έχει φανεί ότι το κρασί και κυρίως το κόκκινο, συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης της HDL, δρα παρεμποδιστικά στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, βελτιώνει την λειτουργία του ενδοθηλίου και παρουσιάζει αγγειοδιασταλτικές ικανότητες¹¹⁶.

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει αποδώσει την προστατευτική δράση του κρασιού έναντι της αθηροσκλήρωσης στην επίδραση των φαινολικών συστατικών του στη φλεγμονώδη διαδικασία.

Οι πολυφαινόλες μειώνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1, των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, μειώνουν την παραγωγή των κυτταροκινών που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση όπως TNF-α και IL-6, μειώνουν τον αριθμό των μονοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων^{117, 118}. Επίσης, αυξάνουν την ελαστικότητα των στεφανιαίων αρτηριών μέσω της παραγωγής του παράγοντα EDGF και συμβάλλουν στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εμποδίζοντας το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας^{113, 119}.

Πολλές μελέτες έχουν ως κέντρο του ενδιαφέροντός τους τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB μιας και έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνος για την παραγωγή πολλών προφλεγμονωδών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί *in vitro*, η επίδραση της ρεσβερατρόλης στην ενεργοποίηση του NF-κB. Διάφορες κυτταρικές σειρές όπως τα μυελοκύτταρα U937, τα λεμφοκύτταρα (Jurkat), επιθηλιακά κύτταρα (Hela) εκτέθηκαν στη δράση των φλεγμονωδών παραγόντων TNF, PMA, H₂O₂, LPS, και κεραμίδιο (ceramide) και παρατηρήθηκε αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB από την ρεσβερατρόλη¹²⁰.

Επίσης, μετά από επώαση μακροφάγων (RAW 264.7) από το περιτόναιο ποντικών με ρεσβερατρόλης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της παραγωγής NO και δοσοεξαρτώμενη μείωση του mRNA και της πρωτεΐνης του iNOS, πιθανόν από την αναστολή της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB¹²¹.

Παρόμοια δράση φάνηκε να έχει και η κερκετίνη η οποία σε *in vitro* πείραμα σε μακροφάγα κύτταρα (RAW 264.7) έδειξε αναστολή της απελευθέρωσης NO, καθώς και της έκκριση του TNF- α ¹²².

Επώαση λείων μυϊκών κυττάρων με οξειδωμένη LDL παρουσία ρεσβερατρόλης, (100 μ M) έδειξε μείωση του SR-A υποδοχέα. Ο SR-A βρίσκεται στην επιφάνεια των λείων μυϊκών κυττάρων και δεσμεύει την ox-LDL, τα οποία στην συνέχεια μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Η παρατηρούμενη μείωση της δραστηριότητας του SR-A συσχετίστηκε και με την αναστολή της δράσης του ενζύμου της COX-2 της οποίας αναστολέας είναι η ρεσβερατρόλη¹²³.

Τέλος σε *in vitro* μελέτη, σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου ομφάλιου λώρου που ενεργοποιήθηκαν με TNF- α και LPS, βρέθηκε ότι η ρεσβερατρόλη ανέστειλε την έκφραση των ICAM-1 και VCAM-1 καθώς και την προσκόλληση των ουδετερόφιλων. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η ρεσβερατρόλη προκάλεσε σημαντική αναστολή της πρόσφυσης U937 μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα που διεγέρθηκαν με LPS. Οι συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης που δοκιμάστηκαν ήταν 100 nmol/L και 1 μ mol/L¹²⁴.

3.3.3 Αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των καρδιαγγειακών νοσημάτων συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης και στις παθήσεις της στεφανιαίας αρτηρίας μέσω της ενεργοποίησης και της προσκόλλησής τους στο ενδοθήλιο, αλλά και μέσω της συσσώρευσής τους και της δημιουργίας θρόμβων.

Η θετική επίδραση του κρασιού και ιδιαίτερα των φαινολικών συστατικών του στα καρδιαγγειακά νοσήματα μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, έχει μελετηθεί και έχει αποδειχθεί από έναν μεγάλο αριθμό μελετών^{125, 126}.

Σε *in vitro* πείραμα που έγινε στο αίμα 6 υγείων εθελοντών βρέθηκε σημαντική και δωσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, που προκαλείται από κολλαγόνο, θρομβίνη και ADP, όταν επώαστηκαν με 10-1000 μ M ρεσβερατρόλης κόκκινου κρασιού¹²⁷.

Ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από ADP συσσώρευση αιμοπεταλίων, έχει παρουσιάσει σε *in vitro* πείραμα και η κερκετίνη όταν επώαστηκε με πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια¹²⁸. Σε άλλα *in vitro* πειράματα, η κερκετίνη έδειξε αναστολή της παραγωγής TNF- α που επάγεται από LPS, όταν επώαστηκε με καλλιέργεια RAW 264.7 μακροφάγων κυττάρων¹²⁹, και αναστολή στην παραγωγή IL8 από LPS στα κύτταρα του πνεύμονα (A549)¹³⁰.

Τέλος, προηγούμενες μελέτες εξέτασαν την επίδραση εκχυλισμάτων πέντε ελληνικών κρασιών και των αντίστοιχων μούστων λευκού και κόκκινου κρασιού στη επαγόμενη από PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιών, αναδεικνύοντας την αντισυσσωρευτική τους

ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κρασί Αμπελόν (κύρια ποικιλία Ρομπόλα) και το cabernet sauvignon (κύρια ποικιλία cabernet sauvignon) παρουσίασαν την καλύτερη ανασταλτική δράση ανάμεσα στα λευκά και τα κόκκινα κρασιά αντίστοιχα. Επίσης το κλάσμα των πολικών λιποειδών εμφάνισε ισχυρότερη αντισυσσωρευτική δράση έναντι του κλάσματος των ουδέτερων¹³¹.

3.3.4 Επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF

Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία, δύσκολα εντοπίζει κανείς δημοσιεύσεις που να θέτουν στο επίκεντρο της έρευνάς τους την μελέτη της επίδρασης του κρασιού στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF. Παρόλα αυτά, έχει φανεί σε *in vitro* πειράματα σε μεσαγγειακά κύτταρα πως τα πολικά λιποειδή ψαριών, τα πολικά λιποειδή του ελαιολάδου, αλλά και η ρεσβερατρόλη, η οποία αποτελεί συστατικό του κρασιού, προκαλούν δοσοεξαρτώμενη αναστολή του ενζύμου⁴⁹.

Η ικανότητα των φλαβονοειδών να αναστέλλουν την δράση της PLA₂ έχει φανεί σε *in vitro* έρευνες^{132, 133}. Επιπλέον έχει βρεθεί πως τα φλαβονοειδή αναστέλλουν την λυσο-PAF AT και αυτό εξαρτάται από τη δομή τους. Πιο συγκεκριμένα, η λουτεολίνη αποτελεί ισχυρότερο αναστολέα της λυσο-PAF AT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων, ακολουθούμενη από την κερκετίνη, ενώ οι δομικά συγγενικές τους φλαβονοειδείς ενώσεις απιγενίνη και καμφερόλη, έδειξαν μικρή ανασταλτική δράση. Αυτό υποδεικνύει ότι η ύπαρξη υδροξυλικής ομάδας στη θέση 5' είναι σημαντική για την ανασταλτική δράση. Επίσης, η αναγωγή σε απλό του δεσμού μεταξύ του C2 και C3 της λουτεολίνης προκάλεσε αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT, που υποδηλώνει τη σημασία του να είναι επίπεδος ο ετεροκυκλικός δακτύλιος. Επίσης, η Ο-γλυκοζυλίωση του άνθρακα 7 μπλόκαρε την ανασταλτική ικανότητα, αλλά οι αιτίες αυτού του φαινομένου μας είναι ακόμα άγνωστες¹³⁴. Επιπλέον, η κερκετίνη, η ναριγίνη και η εσπεριδίνη φάνηκαν να ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες¹³⁵. Τα παραπάνω φλαβονοειδή μπλόκαραν την παραγωγή του PAF αναστέλλοντας τη δράση της λυσο-PAF AT και της PLA₂ και εντείνοντας τον σχηματισμό λιγότερο βιολογικά ενεργών λιποειδικών μεσολαβητών από την ανεξάρτητη του PAF, αλλά εξαρτημένη από το CoA, τρανσακυλάση (TA)¹³⁵. Αυτό το ένζυμο υδρολύει τον PAF, παράγοντας άκυλο-PAF, ο οποίος έχει ανασταλτικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Παρόλ' αυτά δεν επηρεάστηκε η δραστηριότητα της PAF AH. Επίσης, αρνητική επίδραση στην δραστηριότητα της λυσο PAF-AT έχουν παρουσιάσει και κάποιες προανθοκυανιδίνες¹³⁶.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ

Η δημοσίευση της "Μελέτης των Εφτά Χωρών" το 1970 από τον Ancel Keys και η μετέπειτα διατύπωση του "Γαλλικού Παραδόξου" το 1992 από τους Renaud και De Lorgeril του φαινομένου, δηλαδή, των χαμηλών ποσοστών εμφάνισης στεφανιαίας νόσου παρά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε κορεσμένα λίπη, στους κατοίκους της νότιας Γαλλίας, έστρεψαν το βλέμμα μεγάλου κομματιού της επιστημονικής κοινότητας στην μελέτη του κρασιού ως προστατευτικού παράγοντα από καρδιαγγειακές παθήσεις. Από τότε, πολλοί ερευνητές, προσπάθησαν να ερμηνεύσουν το φαινόμενο αυτό, επικεντρώνοντας, κυρίως στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει την ύπαρξη βιοδραστικών συστατικών στο κρασί με ικανότητα αναστολής της προκαλούμενης από PAF-συσσώρευσης αιμοπεταλίων, ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και αναστολής της λιποξυγονάσης, ενός ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις καταστάσεις.

Επειδή τα δεδομένα για την επίδραση φαινολικών ενώσεων και εκχυλισμάτων κρασιού στον μεταβολισμό του PAF είναι περιορισμένα, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη, καθώς και εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon (με κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon) και του λευκού κρασιού Αμπελόν (με κύρια ποικιλία Ρομπόλα) στα βοσυνθετικά ένζυμα του PAF, λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράση και CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση, καθώς και στο αποικοδομητικό ένζυμο PAF ακετολοϋδρολάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από κόκκινο (Cabernet Sauvignon, κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon, κτήμα Χατζημιχάλη, 2003) και λευκό (Ambelon, κύρια ποικιλία Ρομπόλα, 2005) κρασί.

5.2 Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL) με την μέθοδο Bligh-Dyer^{137, 138}

- *Όργανα:*
 - 2 Διαχωριστικές χοάνες του 1L.
 - Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 και 500 mL.
 - 2 σφαιρικές φιάλες των 500 mL.
 - Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
 - Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης σε ελαττωμένη πίεση (flash evaporator)
- *Αντιδραστήρια:*
 - Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας
- *Αρχή μεθόδου:*

Με κατάλληλης σύστασης μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών, καθώς επίσης και εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών (π.χ. άλατα, αμινοξέα, σάκχαρα, κλπ.). Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στη χλωροφορμική φάση (πολική φάση) κατανέμονται όλα τα λιποειδή, ενώ στην υδατική φάση κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

- *Αναλυτική πορεία:*

Το δείγμα εκχυλίζεται στη διαχωριστική χοάνη με μείγμα χλωροφορμίου:μεθανόλης:νερού (1:2:0,8 v/v/v), και στη συνέχεια προστίθενται υπολογισμένες

ποσότητες χλωροφορμίου και νερού προκειμένου η αναλογία να γίνει 1:1:0,9 v/v/v. Η χλωροφορμική στιβάδα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης απομακρύνεται με περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης με ελαττωμένη πίεση σε θερμοκρασία 30-35 °C. Τα λιποειδή μεταφέρονται σε μικρή ποσότητα μείγματος χλωροφορμίου – μεθανόλης σε προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού σε αέριο άζωτο. Έπειτα ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία -20° C για περαιτέρω ανάλυση.

5.3 Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) – Κατανομή κατά αντιρροή^{138, 139}

▪ Όργανα / Αντιδραστήρια:

- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υάλινες πιπέτες Pasteur.
- Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, αιθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας.

▪ Αρχή μεθόδου:

Τα ολικά λιποειδή κατανέμονται σε διφασικό σύστημα πετρελαϊκού αιθέρα – αιθανόλης (87%). Τα πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της αιθανόλης, ενώ τα ουδέτερα λιποειδή κατανέμονται στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Για τον καλύτερο ποσοτικό διαχωρισμό των λιποειδών, η πορεία αυτή πραγματοποιείται 8 φορές συνολικά.

▪ Αναλυτική πορεία:

Τα ολικά λιποειδή, που παραλαμβάνονται από την Bligh- Dyer, εξατμίζονται και αναδιαλύονται σε 9,0 ml πετρελαϊκού αιθέρα προεξισορροπημένου με 87% αιθανόλη. Προστίθενται 3,0 ml αιθανόλης προεξισορροπημένης με πετρελαϊκό αιθέρα. Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Παραλαμβάνεται η αιθανολική φάση (κάτω φάση - πολική), η οποία μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει 9,0 ml πετρελαϊκό αιθέρα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της αιθανολικής φάσης. Στη συνέχεια προστίθεται στον πρώτο σωλήνα 3,0 ml 87% αιθανόλης και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία. Στο τέλος της όλης διαδικασίας, η αιθανολική φάση (8x3,0 ml) περιέχει τα φωσφολιποειδή, ενώ στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα (2x9,0 ml) περιέχονται τα ουδέτερα λιποειδή. Τόσο τα πολικά όσο και τα ουδέτερα λιποειδή, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη και αποθηκεύτηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία -20° C.

5.4 Εκχύλιση διαφορετικών τάξεων φαινολικών ενώσεων ¹⁴⁰

▪ Όργανα:

- Κωνικές εσμυρισμένες φιάλες
- Υάλινα σιφώνια
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υάλινες πιπέτες Pasteur.
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης σε ελαττωμένη πίεση (flash evaporator)
- Αέριο άζωτο
- Φυγόκεντρος HERMLE (Z 320)

▪ Αντιδραστήρια:

- Οργανικοί διαλύτες (οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας.
- Αέριο άζωτο

▪ Αρχή μεθόδου:

Πραγματοποιώντας εκχύλιση υγρού-υγρού παραλαμβάνονται 4 κλάσματα τα οποία περιέχουν διαφορετικές τάξεις φαινολικών ενώσεων.

▪ Αναλυτική πορεία:

Απομακρύνεται η αλκοόλη από το δείγμα του κρασιού σε συσκευή εξάτμισης με περιστροφή υπό κενό σε θερμοκρασία 25-30°C. Στο υπόλειμμα της εξάτμισης (μη αλκοολούχο κρασί) ρυθμίζεται το pH 2.0 και εκχειλίζεται 3 φορές με 150 ml οξικού αιθυλεστέρα. Για τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 500 g για 10 λεπτά. Η υδατική φάση (κλάσμα **FI**) περιέχει τις ανθοκυανίνες ενώ η οργανική φάση η οποία περιέχει τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά εξατμίζεται μέχρι ξηρού και αναδιαλύεται σε 100 ml νερού pH 7.0. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ξανά εκχύλιση 3 φορές με 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Η οργανική που προκύπτει (κλάσμα **FII**) περιέχει τις προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες και τους γλυκοζίτες της κερκετίνης. Στην υδατική φάση ρυθμίζεται το pH 2.0 και πραγματοποιείται ξανά εκχύλιση με 3 φορές 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση που προκύπτει (κλάσμα **FIII**) περιέχει τα φαινολικά οξέα, και το παράγωγο της κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ. Η υδατική φάση αποτελεί το κλάσμα **FIV** και περιέχει τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά. Όλα τα κλάσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο νερού

(υδατικές) ή αιθανόλης (οργανικές) και αποθηκεύτηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου στους -20°C .

5.5 Χημικοί προσδιορισμοί

5.5.1 Προσδιορισμός ορθο-φαινολικών^{138, 141}

▪ *Όργανα- Αναλώσιμα:*

- Φωτόμετρο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10ml
- Κυψελίδες φωτομέτρου (micro)

▪ *Στερεά Αντιδραστήρια:*

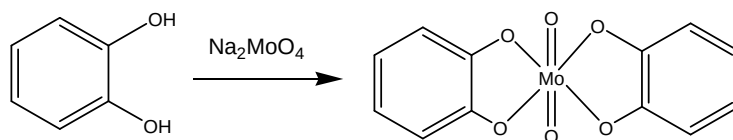
- Κερκετίνη
- Ένυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

▪ *Διαλύματα:*

- Διαλύματα Κερκετίνης 1mM σε EtOH: ζυγίζονται 0,0017g Κερκετίνης και διαλύονται σε 5ml αιθανόλης.
- Διάλυμα $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,087% w/v σε $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1: Ζυγίζονται 0,5435g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 50ml $\text{H}_2\text{O}:\text{αιθανόλη}$ 1:1 v.v.

▪ *Αρχή μεθόδου:*

Τα ιόντα του Mo, MoO_4^{2-} , σχηματίζουν σύμπλοκη ένωση με την ορθο-διφαινόλη μέσω και των δύο υδροξυλίων της:



Το σύμπλοκο αυτό έχει μέγιστη απορρόφηση στα 370nm.

▪ *Αναλυτική πορεία:*

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 100μl αιθανόλης και 1150μl διαλύματος $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Μετά από παραμονή 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα φωτομετρείται στα 370nm.

Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός, καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα κερκετίνης, συγκέντρωσης από 5 έως 80 μM , οπότε κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, βάσει της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε *ορθο*-φαινολικές ενώσεις.

5.5.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών^{138, 142}

▪ *Όργανα:*

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II

▪ *Αντιδραστήρια:*

- Πρότυπο διάλυμα τυροσόλης συγκέντρωσης 1mg/ml αιθανόλης.
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% w/v.
- Διάλυμα Folin – Ciocalteu: Διαλύονται 10g βολφραμικού νατρίου και 2,5g μολυβδαινικού νάτριο σε 70 ml νερό. Προστίθενται 5ml φωσφορικού οξέος 85% και 10ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το όλο μείγμα αφήνεται σε επαναρροή για 10 ώρες. Ύστερα προστίθενται 16g θειικού λιθίου, 5ml νερό και μια σταγόνα βρωμίου και ακολουθεί επαναρροή για 15 λεπτά. Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φέρεται σε όγκο 100ml συμπληρώνοντας με νερό (εξασθενημένα σύμπλοκα των φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβολφραμικού οξέων με τις ακόλουθες μορφές σχηματίζονται στο διάλυμα: $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

▪ *Αρχή μεθόδου:*

Παρουσία του αντιδραστήριου του Folin – Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα προαναφερθέντα οξέα, ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος το οποίο τελικά φωτομετρείται στα 725nm.

▪ *Αναλυτική πορεία:*

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται διαδοχικά 3,5ml νερό, 0,1ml Folin – Ciocalteu και αναδεύουμε ισχυρά. Μετά από παραμονή 3 λεπτών προστίθενται 0,4ml Na_2CO_3 35% w/v και το όλο μείγμα αφού αναδευτεί εντόνως αφήνεται προς αντίδραση για μία ώρα και φωτομετρείται στα 725nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος από 1 –

60μg οπότε και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος.

5.5.3 Προσδιορισμός φωσφόρου^{138, 143}

▪ *Όργανα:*

- Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180 °C.
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/ Novaspec II.
- Υάλινοι δοκιμαστικού σωλήνες.
- Φιάλη αζώτου

▪ *Αντιδραστήρια:*

- Υπερχλωρικό οξύ 70%.
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4%
- Ζυγίζονται 2,125g μολυβδαινικού αμμωνίου και διαλύονται σε αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 500ml.
- Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ)
- Διαλύονται 30g NaHSO_3 και 6g Na_2SO_3 σε 250ml H_2O . Στο διάλυμα αυτό των θειωδών αλάτων διαλύεται 0,5g από 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ. Μετά από 3 ώρες αναμένεται να έχει σχηματιστεί ίζημα. Το αντιδραστήριο διηθείται και φυλάσσεται σε ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο για χρήση ένα μήνα μετά την παρασκευή του.
- Αντιδραστήριο ANSA: Παρασκευάζεται πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού (αναμιγνύονται 2ml πρότυπο δ/μα ANSA και 3ml νερό).
- Πρότυπο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου - 4μg φωσφόρου/ml

▪ *Αρχή μεθόδου:*

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή, με καύση παρουσία υπερχλωρικού οξέος, του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα. Στη συνέχεια με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο το οποίο παρουσία του ANSA σαν αναγωγικού μέσου και θέρμανση σε όξινο περιβάλλον, ανάγεται προς κυανό του φωσφομολυβδαινίου. Εάν δεν πραγματοποιηθεί καύση υπολογίζεται ο ανόργανος φωσφορος.

▪ *Αναλυτική πορεία:*

Το δείγμα που περιέχει 0,5 -5 μg φωσφόρου φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα pyrex, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου, προστίθενται 0,5ml υπερχλωρικού οξέος και τοποθετείται σε αμμόλουτρο 170 – 180 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν τα δείγματα, προστίθενται 1ml νερό, 3 ml μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος, 0,5 ml αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 100°C για 10 min. Αφήνονται να ψυχθούν για 20 min και φωτομετρούνται στα 820 nm. Παράλληλα, γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε παραλείποντας την καύση στο αμμόλουτρο.

5.5.4 Προσδιορισμός σακχάρων ¹⁴⁴

▪ *Όργανα:*

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/ Novaspec II.
- Υάλινοι δοκιμαστικού σωλήνες.
- Υάλινα σιφώνια

▪ *Αντιδραστήρια:*

- Ορκινόλη (5-μεθυλορεσορκινόλη, 3,5-διυδροξύ τολουόλιο)
- Γλυκόζη

▪ *Διαλύματα*

- Διάλυμα Ορκινόλης 2mg/ml σε πυκνό θειικό οξύ (70%): Ζυγίζονται 0,2290g ένυδρης ορκινόλης (orcinol x H₂O) σε ογκομετρική φιάλη και προστίθενται 100ml πυκνού H₂SO₄. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη.
- Διάλυμα Γλυκόζης 1,5mg/ml σε H₂O

▪ *Αρχή μεθόδου:*

Οι εξόζες με την επίδραση του πυκνού H₂SO₄ σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρουρόλη, που με την ορκινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 505nm. Η προσθήκη πυκνού H₂SO₄ έχει επίσης σαν αποτέλεσμα και την υδρόλυση των παραγώγων των εξοζών.

▪ *Αναλυτική πορεία:*

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 1000μl H₂O και 2000μl διαλύματος ορκινόλης 2mg/ml και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Μετά από παραμονή 20 λεπτών σε θερμοκρασία 80 °C και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα φωτομετρείται στα 505nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός, καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, που περιέχουν από 10 έως 100g γλυκόζης, οπότε κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, βάσει της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε σάκχαρα.

5.6 Καλλιέργεια μονοκυττάρων

Χρησιμοποιήθηκε μια σταθερή κυτταρική σειρά ανθρώπινων προμονοκυττάρων U937. Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε από ένα διάχυτο ιστιοκυτταρικό λέμφωμα ενός άνδρα ασθενή 37 ετών και διατηρεί τα χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων, τους Fc υποδοχείς (+) και άλλων καθιστώντας την ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη τους στο εργαστήριο. Η μορφολογία των κυττάρων της κυτταρικής σειράς είναι πανομοιότυπη με αυτή των καρκινικών κυττάρων της υπεζωκοτικής συλλογής από την οποία η σειρά δημιουργήθηκε. Η ιστιοκυτταρική καταγωγή της σειράς φαίνεται από την ικανότητα της για παραγωγή λυσοζύμης και την έντονη δραστικότητα εστεράσης των κυττάρων. Τα U937 είναι μυελοειδούς καταγωγής και αποτελούν πρόδρομη μορφή μονοκυττάρων (προμονοκύτταρα). Μπορούν να μετατραπούν σε μονοκύτταρα με την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Παράγουν μεγάλο αριθμό κυτταροκινών και χημειοκινών, είτε σε βασικά επίπεδα (IL-1, GM-CSF), είτε σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων. Τα U937 χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο ως κυτταρικό μοντέλο μελέτης της διέγερσης και της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και για μελέτες αντικαρκινικής δράσης.

▪ *Όργανα:*

- Δοχεία καλλιέργειας 75 cm² και 25 cm²
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ 5% και σταθερής θερμοκρασίας 37° C
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής, aura B4
- Φυγόκεντρος HERMLE Z320
- Μικροσκόπιο Zeiss Axiolab

▪ *Αντιδραστήρια:*

- RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK)
- Ορός εμβρύων μόσχου (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK): Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- L-Γλουταμίνη (Sigma): Το διάλυμα συγκέντρωσης 200mM χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma): Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v)
- Trypan Blue: Αναδιαλύονται 0,4g στερεού trypan blue σε 100ml απεσταγμένο H_2O με 0,81g NaCl (0,81%) και 0,06g μονόξινο φωσφορικό κάλιο (0,06%).

▪ *Αναλυτική πορεία:*

Τα κύτταρα, U937, καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε RPMI 1640, 10% FCS, 2 mmol/L γλουταμίνη, 0,1 g/L στρεπτομυκίνη, 105 units/L πενικιλίνη σε δοχεία καλλιέργειας 25 cm^2 και 75 cm^2 . Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα με 5% CO_2 και 95% υγρασία. και θερμοκρασία 37°C . Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Η διαδικασία απαιτούσε φυγοκέντρηση στα 250g για 10 min, αναρρόφηση υπερκείμενου και αναδιασπορά σε νέο θρεπτικό υλικό με τελική συγκέντρωση $0,7 \times 10^6$ κύτταρα/mL. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιούνταν με χρώση με Trypan Blue και μέτρηση των κυττάρων με το αιματοκυττόμετρο στο μικροσκόπιο. Για τη μέτρηση πραγματοποιείται αραιώση 1:1 του διαλύματος των κυττάρων με το διάλυμα της χρωστικής. Πριν την παραλαβή του ομογενοποιημένου γίνεται επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ορό (FCS). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συγχρονισμός των κυττάρων.

Για την παραλαβή του ομογενοποιημένου ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων φυγοκεντρείται στα 500 g για 10 λεπτά, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Έπειτα το διάλυμα επεξεργάζεται με υπερήχους τέσσερις φορές διάρκειας 10 δευτερολέπτων η κάθε μία. Το διάλυμα επαναφυγοκεντρείται και το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

5.7 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford ¹⁴⁵

▪ *Όργανα:*

- ELISA Reader (Biotek, Power Wave XS2)
- Plate

▪ *Αντιδραστήρια:*

- Πρότυπο stock διάλυμα BSA συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/ml}$: Ζυγίζονται 100 μg BSA και διαλύονται σε 1ml H_2O . Τα aliquots φυλάσσονται στους -20°C στην κατάψυξη.
- Διάλυμα εργασίας BSA: αραιώση 1:4 του stock διαλύματος BSA $C_{\text{fin}}=25 \mu\text{g/ml}$
- Stock Διάλυμα Bradford: σε 50ml Μεθανόλης διαλύονται 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250. Το διάλυμα αυτό προστίθεται σε 100 ml διαλύματος 85% H_3PO_4 και αραιώνεται μέχρι τελικό όγκο 200 ml με H_2O . Το τελικό διάλυμα έχει βαθύ κόκκινο χρώμα και τελικές συγκεντρώσεις 0,5 mg/ml Coomassie Blue G, 25% μεθανόλη και 42,5% H_3PO_4 . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4°C και είναι σταθερό για πάρα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Διάλυμα εργασίας Bradford: αραιώση 1 ml stock με 4 ml H_2O . Το διάλυμα είναι σκούρου καφέ χρώματος, με pH 1.1 και είναι σταθερό για εβδομάδες στους 4°C και σε σκουρόχρωμη φιάλη.

▪ *Αρχή μεθόδου*

Η χρωστική μπορεί να υπάρχει σε τρεις μορφές: την κατιονική, την ουδέτερη και την ανιονική μορφή. Οι μορφές αυτές έχουν διαφορετικό χρώμα και, ως εκ τούτου, απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος.

Κατιονική μορφή $\rightleftharpoons$ ουδέτερη μορφή $\rightleftharpoons$ Ανιονική μορφή

Κόκκινο χρώμα

Πράσινο χρώμα

Μπλέ χρώμα

470nm

650nm

595nm

Η απορρόφηση αυξάνεται όταν η χρωστική συνδέεται με την πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Λαμβάνει 2 πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε.

▪ *Αναλυτική πορεία*

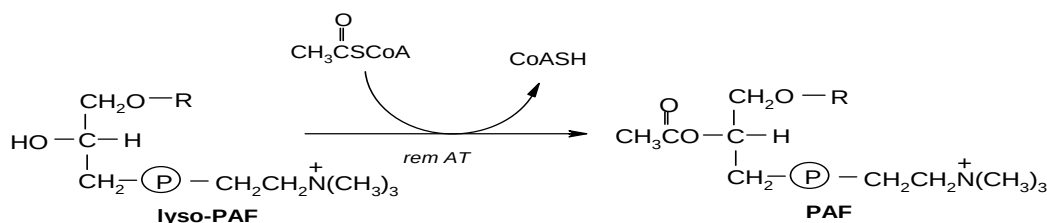
Στα δείγματα πραγματοποιείται αραιώση με νερό μέχρι τελικού όγκου 200 μl . Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μl διαλύματος εργασίας Bradford σε κάθε πηγάδι και γίνεται επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση στα 595 nm. Ταυτόχρονα, για τον προσδιορισμό της ποσότητας κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα BSA.

5.8 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης (λυσο-PAF AT)⁵³

- *Όργανα:*
 - Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
 - Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5810
 - Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- *Αναλώσιμα:*
 - Σωλήνες πολυπροπυλενίου
 - Tips κίτρινα, μπλε
- *Στερεά αντιδραστήρια:*
 - Tris alpha. Alpha, alpha Tris OH methyl- methylamine 99,9%
 - lyso-PAF (C16:0) (Sigma)
 - Ακετυλο-CoA (Sigma)
 - BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)
 - Silica gel G (Fluka)
- *Διαλύματα:*
 - Διάλυμα φύλαξης (stock) λυσο-PAF 2,5 mg/ml: Διαλύονται 10 mg λυσο-PAF σε 4 ml MeOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Διάλυμα ακετυλο-CoA 20 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7,4): Διαλύονται 25 mg σε 1540 ml ρυθμιστικού διαλύματος.
 - Διάλυμα BSA 10 mg/ml: Διαλύονται 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7,4).
 - Διάλυμα λυσο-PAF σε BSA (10mg/ml) συγκέντρωσης 800 μM (διάλυμα εργασίας): Φέρονται 25,3 μL διαλύματος λυσο-PAF 4,11 mM σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε 130 μL BSA 10 mg/ml. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση λυσο-PAF 20 μM και τελική συγκέντρωση BSA 0,25 mg/ml.
 - Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4): Διαλύονται 0,605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 ml νερό.

■ Αρχή μεθόδου:

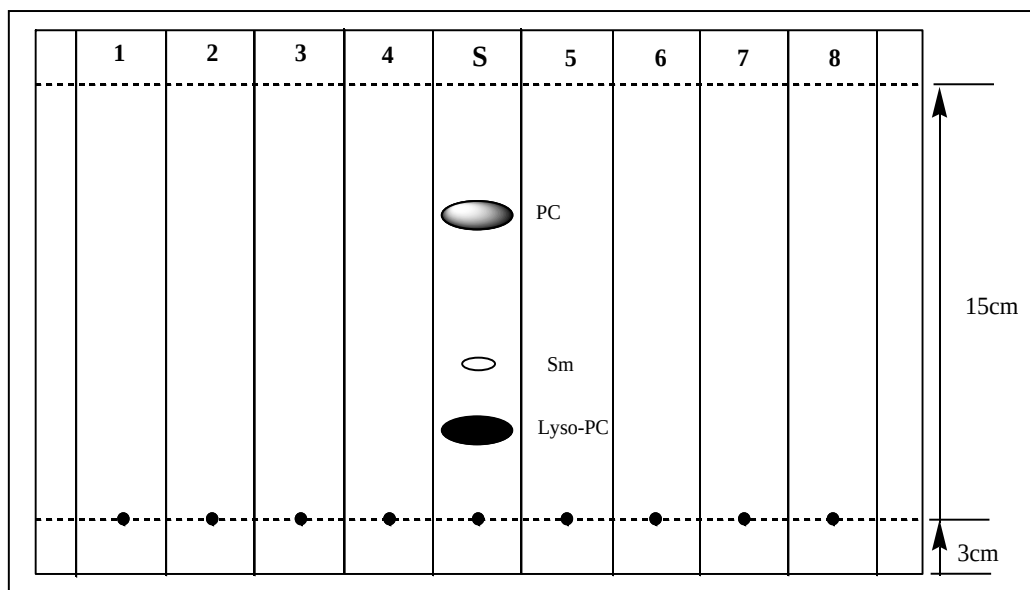
Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της λυσο-PAF AT βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF, μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με λυσο-PAF και ακετυλο-CoA, παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μείγμα της αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογικό πείραμα.



■ Αναλυτική πορεία:

• Ενζυμική αντίδραση:

1. Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), 5 μ L διαλύματος εργασίας λυσο-PAF (τελική συγκέντρωση 20 μ M), 2 μ L διαλύματος ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200 μ M). Ο τελικός όγκος του μείγματος επώασης είναι 200 μ L.
2. Προεπώαση για 5 min στους 37 °C.
3. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος 10 μ g συνολικής πρωτεΐνης.
4. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο για 10 min στους 37°C.
5. Η αντίδραση σταματά με τη προσθήκη διαλύματος 1 mL CHCl₃:CH₃OH (2 %CH₃COOH) 1/1.



Σχήμα 5.1: Απεικόνιση πλάκας TLC μετά από ανάπτυξη και εμφάνιση σε ατμούς ιωδίου

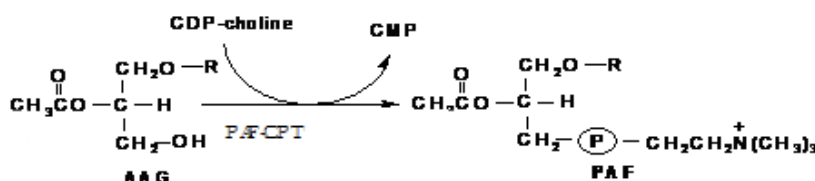
5.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινوترانسφεράση (CPT-PAF)

- *Όργανα:*
 - Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
 - Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5810 R
 - Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- *Αναλώσιμα:*
 - Σωλήνες πολυπροπυλενίου
 - Tips κίτρινα, μπλε
- *Στερεά αντιδραστήρια:*
 - Tris alpha. Alpha, alpha Tris OH methyl- methylamine 99,9%
 - BSA (Sigma)
 - Silica gel G (Merck)
 - EDTA
 - MgCl_2
 - Διθειοθρεϊτόλη (DTT)
 - Αλκυλοακέτυλο-γλυκερόλη (AAG)
- *Διαλύματα:*
 - Ρυθμιστικό διάλυμα CPT-PAF Tris-HCl, 100mM pH 8/ EDTA 0,5mM / MgCl_2 10mM, DTT 15mM: Διαλύονται 1,211g Tris, 0,2033 g MgCl_2 , 0,0146 g EDTA και 0,2313 g DTT σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 8 με HCl 1N και ρυθμίζεται ο όγκος στα 100mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού. C τελικό EDTA= 0,5mM, C τελικό MgCl_2 = 0,02 M, C τελικό DTT = 0,015 M
 - CDP-χολίνη διάλυμα φύλαξης 100mM: Διαλύονται 100g σε 1830 μL απεσταγμένου νερού
 - CDP-χολίνη διάλυμα εργασίας 4mM: φέρονται 960 μL νερό σε eppendorf και προστίθενται 40 μL από το δ/μα 100mM
 - Διάλυμα BSA 40 mg/mL: Διαλύονται 400mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10 mL νερού

- AAG διάλυμα φύλαξης 10mM: Διαλύονται 5mg AAG (95% καθαρότητας) σε 1,325mL αιθανόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20 °C

▪ Αρχή μεθόδου:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CPT-PAF βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF, μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με CDP-χολίνη και AAG, παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μείγμα της αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογικό πείραμα.



- Ενζυμική αντίδραση:

1. Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα CPT-PAF, 5μl CDP-χολίνη (C_{τελική} 0,1 mM), 5μl BSA. Προεπώαση για 10 min στους 37 °C.
2. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος 5 μg συνολικής πρωτεΐνης.
3. Έπειτα από 30 sec προστίθενται 2 μl AAG
4. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37 °C για 5 min.
5. Η αντίδραση σταματά με τη προσθήκη διαλύματος 1mL CHCl₃:CH₃OH (2% CH₃COOH) 1/1.

5.10 Προσδιορισμός του παραγόμενου PAF

1. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300 μL παγωμένου H₂O και 1111 μL μείγματος CHCl₃/CH₃OH (2 % CH₃COOH).
2. Μετά από έντονη ανάδευση φυγοκεντρείται το μείγμα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση, η οποία εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο (100 μl) και φέρεται σε πλάκα TLC επιστρωμένη με Silica gel G.
3. Η πλάκα αναπτύσσεται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης

$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (100:57:16:8).

4. Μετά το τέλος της ανάπτυξης, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I_2 .
5. Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ Sm και λυσο-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.
6. Το ξύσμα φέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ο PAF εκχυλίζεται με 2 ml μείγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8). Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα CHCl_3 και H_2O ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση που περιέχει τον PAF, η οποία φυλάσσεται στους -20°C . Ο προσδιορισμός του παραγόμενου PAF γίνεται με βιολογική δοκιμασία (βλ. § 5.7)

5.11 Βιολογική δοκιμασία *in vitro* ^{138, 146, 147}

- *Όργανα:*
 - Συσσωρευματομέτρο (CHRONO – LOG)
 - pHμετρο (CHEMTRIX Type 60A)
 - Φωτόμετρο (Pharmacia Biotech/Novaspec II)
 - Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο 37°C .
 - Φυγόκεντρος Sorval RC-5B Refrigerated, DuPont
- *Αντιδραστήρια:*
 - Διάλυμα 10 x Tyrodes stock: Σε 1lt περιέχονται 80g NaCl, 1,95g KCl, 2,13g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10g γλυκόζη.
 - Διάλυμα 100x CaCl_2 stock: Ποσότητα 1,911g σε 100 ml H_2O .
 - Διάλυμα 0,2M EGTA stock: Ποσότητα 0,76g EGTA / 10ml H_2O . Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7,5 με 5M NaOH.
 - Διάλυμα ζελατίνης 10% w/v σε H_2O .
 - Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pHμέτρου.
 - Διαλύματα Tyrodes-Zelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Zelatin-EGTA pH 6,5 (Tg-EGTA pH 6,5): Σε 80ml νερό προστίθενται 10ml Tyrodes 10 x Stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203g NaHCO_3 σε 10ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του νερού στο NaHCO_3 . Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δυο τμήματα των

50ml. Στο ένα από τα δυο προστίθενται 25μl 0,2 M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των δυο κλασμάτων στο 6,46 με 1N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tyrodes και Ca pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2): Σε 5ml Tyrodes 10 x stock προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5ml 100 x CaCl_2 stock. Κατόπιν, προστίθενται 2,5ml NaHCO_3 (παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1N HCl. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- Αντιδραστήριο ACD: Σε 100ml νερό περιέχονται 13,65g κιτρικού οξέος, 25g κιτρικού νατρίου και 20g δεξτρόζης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock: Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) /ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20 °C.
- Διάλυμα BSA 2,5mg/ml φυσιολογικού ορού: Από 10ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μl και προστίθενται 250μl BSA stock.
- Ficoll-Paque (Pharmacia).

▪ *Αναλυτική πορεία:*

1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού:

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται μέχρι τα 50ml. Αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24° C στα 500g (~1850rpm). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2ml Ficoll-paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14ml. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσια σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσό πλάσματος τα 9ml για κάθε 2ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφόνια και μεταφέροντας ίσους όγκους πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζουμε με parafilm. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24° C στα 750g (2200rpm), οπότε τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του πλάσματος και της στιβάδας στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με πιπέτα, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

α) Αν υπάρχουν 2 σωλήνες: προστίθενται 7ml (Tg-EGTA pH 6,5) σε κάθε σωλήνα. Το

διάλυμα αφήνεται να διαχυθεί ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα.

β) Αν υπάρχουν 3 σωλήνες: προστίθενται 3ml (Tg-EGTA pH 6,5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να διαχυθεί ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14ml του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε 2 ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3ml (Tg-EGTA pH 6,5).

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2ml Ficoll (8ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 2500rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα των αιμοπεταλίων με πιπέτα, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

Προστίθενται όγκοι (~ 8ml) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να διαχυθεί στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14ml, ενώ καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 2350 rpm. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται αφαιρώντας και την τελευταία σταγόνα από τα τοιχώματα του δοχείου. Προστίθενται με αυτόματη πιπέτα 0,8ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείρωντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε έναν πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ ml: Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων παίρνουμε 10μL και 990μL Tg pH6,5 και φωτομετρείται στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10μL είναι:

$$Αρ.Κυττάρων / 10λ = A \times 1,25 \times 10^8$$

όπου A η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού:

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 50μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 200μL Tg-Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας, που περιστρέφεται με 1200rpm. Επωάζονται για 15min σε υδρόλουτρο 37° C. Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του συσσωρευματομέτρου με Tg-Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων. Κατόπιν, τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική θερμοστατούμενη

κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με τη συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100% συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική δραστηριότητα. Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα ομοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF (γρήγορη συσσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις).

Τέλος, αφού είναι γνωστή η συγκέντρωση του PAF στο κάθε εξεταζόμενο δείγμα, προσδιορίζεται η δράση των εκχυλισμάτων του κρασιού στη δράση του ενζύμου που μελετάμε, δηλαδή στη δράση της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης.

5.12 Προσδιορισμός δραστηριότητας PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) ⁵³

5.12.1 Με ραδιενέργεια

- *Όργανα:*
 - Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μ L
 - Φυγόκεντρος eppendorf
 - Vortex
 - Υδρόλουτρο
 - Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης (vials) όγκου 20 ml
 - Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia, συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100

■ *Αντιδραστήρια*

- PAF (I6:0) (Sigma)
- Υγρό σπινθηρισμού Dioxane base: Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7 g PPO, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου σε 1 L διοξάνης και 200 ml νερό.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50 mM pH 7.4 : Διαλύονται 0,605 gr Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 με HCl 1N και ρυθμίζεται ο όγκος στα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) PAF σε χλωροφόρμιο: μεθανόλη (1:1), 10-4 M
- Διάλυμα BSA 100 mg/ml: Διαλύονται 500 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (100 mM-pH 7,2). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.
- Διάλυμα BSA 10 mg/ml: Το διάλυμα BSA 100 mg/ml αραιώνεται 1/10 με Tris-HCl (100 mM-pH 7,2). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.
- Διάλυμα PAF σε BSA (10 mg / mL) συγκέντρωσης 800 μM και ειδικής δραστηριότητας 1000 cpm / nmol (διάλυμα εργασίας): Φέρεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PAF 10-4 M σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BSA 10 mg / mL έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση PAF 800 μM. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση PAF 20 μM (20.000 cpm) και τελική συγκέντρωση BSA 0.25 mg / mL.
- Διάλυμα TCA 40% (w/v). Διαλύονται 40 gr TCA σε 100 mL νερού.

■ *Αρχή μεθόδου:*

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση της ραδιενέργειας του ραδιενεργού προϊόντος ($[^3\text{H}]\text{-CH}_3\text{OOOH}$) που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με $[^3\text{H}]\text{-PAF}$, παρουσία BSA και την καταβύθιση των πρωτεϊνών με TCA. Το επισημασμένο οξικό οξύ διαχωρίζεται από τον μη αντιδρών $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ αφού αυτός καταβυθίζεται ως σύμπλοκο με την BSA.

■ *Αναλυτική πορεία:*

Σε σωλήνα τύπου eppendorf φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, 5 μL διαλύματος εργασίας $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ / PAF (τελική συγκέντρωση 20 μM, 20000 cpm), το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού

παρασκευάσματος 32 μg συνολικής πρωτεΐνης. Ο τελικός όγκος του μείγματος επώασης είναι 200 μL . Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37 °C για 45 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης προσθέτονται 2 μL διαλύματος BSA 100 mg/mL για να εξασφαλιστεί η ποσοτική δέσμευση των προϊόντων από την BSA και μετά από 0.5 λεπτά προσθέτονται 64 μL διαλύματος TCA 40% (w/v.) (τελική συγκέντρωση TCA 9.7% w/v.). Το μείγμα αφήνεται σε πάγο για 30 λεπτά ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και στην συνέχεια φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά. Αναρροφάται το υπερκείμενο με συσκευή κενού και το ίζημα παραλαμβάνεται, με την βοήθεια του υγρού σπινθηρισμού (dioxane base), σε πλαστικό δοχείο για την μέτρηση της ραδιενέργειας. Γίνεται επίσης και δείγμα αναφοράς, το οποίο δεν περιέχει ενζυμικό παρασκεύασμα. Η ειδική δραστηριότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον τύπο :

Ειδική δραστηριότητα AH (nmol/min/mg πρωτεΐνης) =

$$\frac{[RA_{\text{δείγματος}} (\text{cpm}) - RA_{\text{τυφλού}} (\text{cpm})]}{t_{\text{επώασης}} \times \text{Ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος (mg πρωτεΐνης)}} \times \text{ειδική δραστηριότητα } [^3\text{H}]\text{-PAF (nmol/cpm)}$$

5.12.2 Προσδιορισμός δραστηριότητας PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) με χρήση ανασυνδιασμένης PAF-AH (Human Recombinant)

▪ Αντιδραστήρια

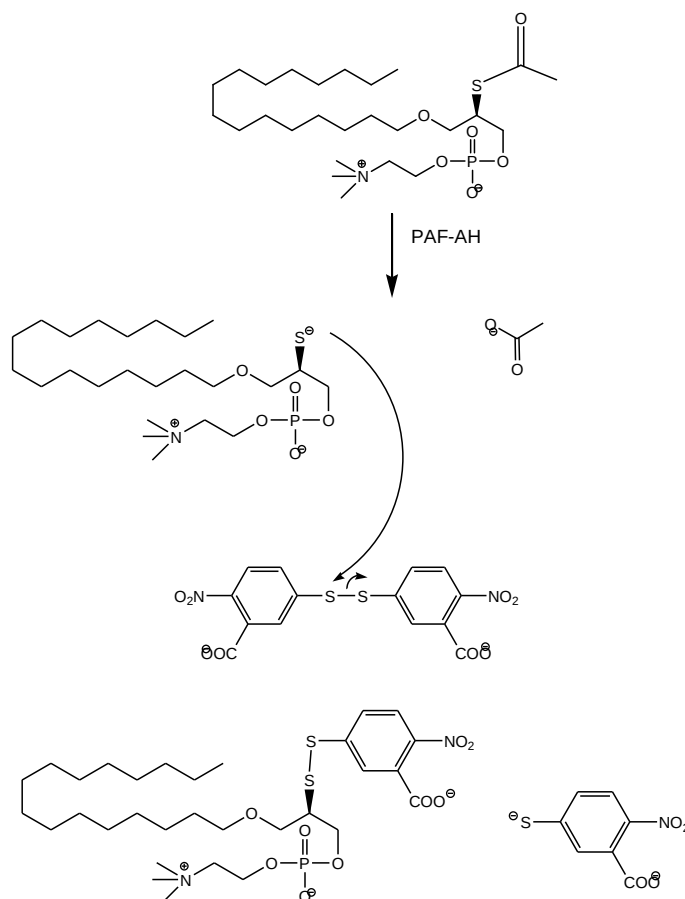
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.1M pH 7.2: ζυγίζονται 0.6055g Tris (MW=121.14) για 50mL διαλύματος. Ρύθμιση του pH στο 7.2 με διάλυμα HCl.
- Διάλυμα PAF-AH (Human Recombinant) σε Buffer: ένα aliquot PAF-AH (Cat. No. 10279, Lot. No. 0404721-1) περιέχει 5 μl διαλύματος PAF-AH που έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.45mg/ml, δραστηριότητα 2.25 unit/ml σε διαλύτη 100mM Na₂SO₄, pH 7.2, 100mM NaCl, 20% glycerol. Ένα aliquot αραιώνεται σε 95 μl buffer, λίγο πριν την χρήση του. Διατηρείται για μια ώρα στους 0°C.
- Διάλυμα αποθήκευσης υποστρώματος 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4.63mM) thio-PAF: εξατμίζεται μέχρι ξηρού το διάλυμα της συσκευασίας, που περιέχει 5mg thio-PAF (MW=539.8), αναδιαλύονται σε 2ml αιθανόλης και μοιράζεται σε κατάλληλο αριθμό eppendorffs, τα οποία περιέχουν 130 μl διαλύματος. Σε κάθε aliquot περιέχονται 325 μg thio-PAF. Τα aliquots φυλάσσονται στους -80° C μέχρι την ενζυμική δοκιμασία.
- Διάλυμα εργασίας υποστρώματος 200 μM θειο-PAF: λαμβάνεται 1 aliquot

διαλύματος αποθήκευσης θειο-PAF. Εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το περιεχόμενο αναδιαλύεται σε 3mL buffer. Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 0.108μg/μl ή 200μM. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C για μια εβδομάδα

- Διάλυμα 1mM DTNB σε ρυθμιστικό διάλυμα: ζυγίζονται 0.00396 g DTNB (MW=396.35) για 10mL διαλύματος Tris-HCl 0.1M pH 7.2. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στο σκοτάδι στους 0oC για 8 ώρες. Παρασκευάζεται την ημέρα που χρησιμοποιείται.

■ Αρχή μεθόδου

Ο θειο-PAF μετατρέπεται σε βιολογικά ανενεργό λυσο-θειο-PAF από το ένζυμο PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH). Οι PAF-AHs βρίσκονται και ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά. Η υδρόλυση του θειοεστερικού δεσμού στην sn-2 θέση του υποστρώματος από την ακετυλοϋδρολάση απελευθερώνει θειόλες που δεσμεύονται από το DTNB, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.2.



Σχήμα 5.2: Αρχή μεθόδου προσδιορισμού της δραστηριότητας PAF AH

Το 5-θειο-2-νιτρο βενζοϊκό οξύ που παράγεται δίνει απορρόφηση στα 405nm.

Αναλυτική πορεία

Σε πλάκα 96 πηγαδιών τοποθετούνται οι κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος, διαλύτη/διαλύματος αναστολέα και διαλύματος του ενζύμου. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 60μl διαλύματος υποστρώματος. Γίνεται ανακίνηση για 30 sec και ακολουθεί επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 40 μl διαλύματος DTNB, με το οποίο τελειώνει η αντίδραση. Γίνεται ξανά ανακίνηση για 30sec και επώαση για 1 min και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 405 nm.

	Ρυθμιστικό δ/μα (μl)	Διάλυμα PAF-AH (μl)	DMSO (μl)	Διάλυμα αναστολέα (μl)	Διάλυμα υποστρώματος (μl)	Διάλυμα DTNB (μl)
Τυφλό	95	-	5	-	60	40
Δείγμα αναφοράς	85	10	5	-	60	40
Δείγμα με αναστολέα	85	10	-	5	60	40

Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίζεται ως εξής:

1. Αρχικά προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό, για το χρονικό διάστημα των 30min επώασης, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta A_{405} / \text{min} = \frac{A_{405}^{\text{sample}} - A_{405}^{\text{blank}}}{t}$$

2. Χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος για τον υπολογισμό της δραστηριότητας της PAF-AH. Η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το συντελεστή ε του DTNB. Μια unit του ενζύμου υδρολύει 1μmol 2-thio PAF ανά λεπτό στους 25° C.

$$\text{Activity} = \frac{\Delta A_{405} / \text{min}}{\varepsilon_{405}^{\text{DTNB}} \times l} \times \frac{V_{\text{assay}}}{V_{\text{enzyme}}} \times (\text{sample dilution})$$

Όπου $\varepsilon_{405}=12.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $l=0.784$ cm (η οπτική διαδρομή), $V_{\text{assay}}=0.225\text{mL}$, $V_{\text{enzyme}}=0.01\text{mL}$. Η δραστηριότητα εκφράζεται σε $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Δείγματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ένα λευκό και ένα κόκκινο κρασί του κτήματος Χατζημιχάλη:

1. **Ambelon:** Λευκός, ξηρός οίνος του 2006, 750 ml (13% vol), κύρια ποικιλία Ρομπόλα.
2. **Cabernet Sauvignon:** Ερυθρός, ξηρός οίνος του 2003, 750 ml (13,5% vol), κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon.

6.2 Επεξεργασία οίνων-απομόνωση δειγμάτων

Για την παραλαβή των δειγμάτων, τα κρασιά εκχυλίστηκαν με δύο διαφορετικούς τρόπους.

6.2.1 Μέθοδος 1

6.2.1.1 Απομόνωση ολικών λιποειδών (TL) με τη μέθοδο Bligh –Dyer

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στην απομόνωση των ολικών λιποειδών του κρασιού από τα υδατικά συστατικά. Το 90% των TL, επεξεργάζεται περαιτέρω με την μέθοδο κατα αντιρροή.

6.2.1.2 Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) με κατανομή κατά αντιρροή

Με τη μέθοδο αυτή διαχωρίστηκαν τα ολικά λιποειδή του κρασιού (TL), σε πολικά (PL) και σε ουδέτερα (NL) λιποειδή.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1, και εκφράζονται σε γραμμάρια λιποειδών ανά 750 ml κρασιού ενώ στην παρένθεση φαίνεται το επί τοις εκατό ποσοστό σε κάθε κλάσμα. Ειδικότερα στην περίπτωση των ουδέτερων και των πολικών λιποειδών εκφράζεται το ποσοστό επί των ολικών λιποειδών.

Πίνακας 6.1: Ποσότητες κλασμάτων που προκύπτουν από την εκχύλιση με τη Μέθοδο 1.

Κλάσμα	Ποσότητα g/750 ml Λευκού κρασιού	Ποσότητα g/750 ml Κόκκινου κρασιού
Υδατικά συστατικά (W)	13.5 (98.3%)*	23,2 (97,5%)*
Ολικά λιποειδή (TL)	0.349 (1.7%)*	0,596 (2,5%)*
Πολικά λιποειδή (PL)	0.305 (87.3% TL) *	0,558 (93,6% TL) *
Ουδέτερα λιποειδή (NL)	0.0006 (0.2% TL) *	0,001 (0,2% TL) *

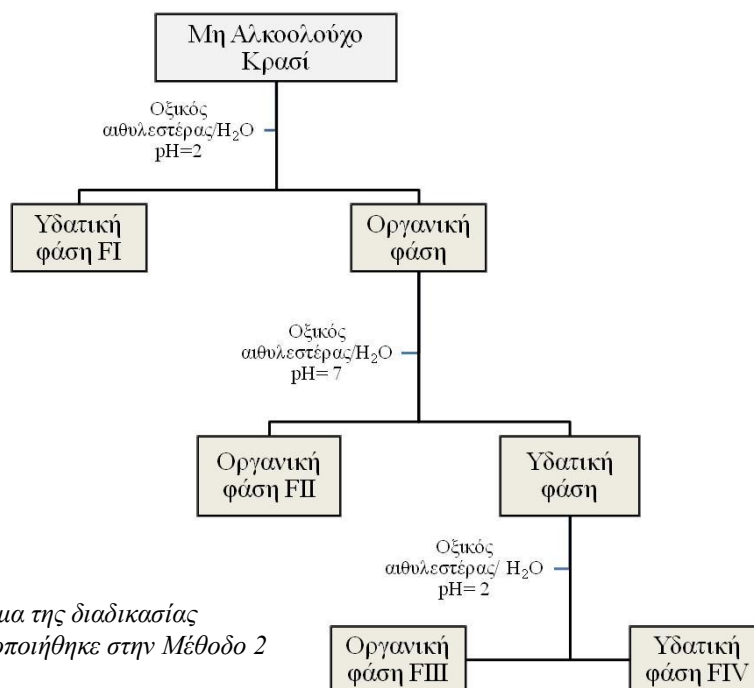
*: % w/w

Αυτό που παρατηρείται μετά την εκχύλιση Bligh-Dyer είναι ότι τα υδατικά συστατικά (W) αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία των συστατικών του κρασιού τόσο στο λευκό (98,3 % w/w) όσο και στο κόκκινο (97,5 % w/w). Επίσης, και στα δύο είδη κρασιών, το ποσοστό των πολικών λιποειδών είναι κατά πολύ μεγαλύτερο (87.3 % για το λευκό, 93,6 % για το κόκκινο) από αυτό των ουδέτερων (της τάξης του 0,2 %).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ολικά λιποειδή του κόκκινου κρασιού είναι περίπου διπλάσια από αυτά του λευκού, τόσο ποσοτικά όσο και ποσοστιαία. Το ίδιο ισχύει και για τα πολικά λιποειδή των δύο κρασιών.

6.2.2 Μέθοδος 2: Εκχύλιση διαφορετικών τάξεων φαινολικών ενώσεων

Ο τρόπος αυτός εκχύλισης αποσκοπεί στον διαχωρισμό του φαινολικού περιεχομένου του κρασιού στις επιμέρους τάξεις φαινολικών ενώσεων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται στο σχήμα 6.1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2 και εκφράζονται σε γραμμάρια ανά 750 ml κρασιού ενώ στην παρένθεση φαίνεται το % w/w.



Σχήμα 6.1: Σχεδιάγραμμα της διαδικασίας εκχύλισης που πραγματοποιήθηκε στην Μέθοδο 2

Πίνακας 6.2: Ποσότητες κλασμάτων που προκύπτουν από την εκχύλιση με τη Μέθοδο 2.

Κλάσμα	Ποσότητα g/750 ml Λευκού κρασιού	Ποσότητα g/750 ml Κόκκινου κρασιού
Κλάσμα I (FI)	16.3 (94.1%)*	23,5 (92,1%)*
Κλάσμα II (FII)	0.540 (3.13%)*	1,35 (5,30%)*
Κλάσμα III (FIII)	0.150 (0.89%)*	0,27 (1,07%)*
Κλάσμα IV (FIV)	0.320 (1.85%)*	0,38 (1,49%)*

*: % w/w

Ο Ghiselli και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν¹⁴³ τις τάξεις των φαινολικών ενώσεων που λαμβάνονται στα κλάσματα με τη μέθοδο αυτή και πρότεινε την παρακάτω σύσταση:

FI: Ανθοκυανίνες

FII: Προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες, φλαβονόλες (κυρίως κερκετινο-3-O-γλυκοζίτης)

FIII: Φαινολικά οξέα, παράγωγα κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ

FIV: Λοιπά φαινολικά συστατικά που δεν κατανεμήθηκαν στις προηγούμενες φάσεις.

Τα δεδομένα του πίνακα 6.2 υποδεικνύουν ότι τα φαινολικά του κλάσματος των ανθοκυανινών (FI) αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων που εκχυλίστηκαν, και στα δύο είδη κρασιών. Συγκεκριμένα στο λευκό καταλαμβάνουν το 94,1% w/w και στο κόκκινο το 92,1% w/w. Επόμενο σε ποσοστό κλάσμα αλλά σημαντικά μικρότερο

από το πρώτο, είναι το II (FII) και ακολουθεί αυτό της υδατικής φάσης (FIV). Τέλος, με ποσοστό 0,89% για το λευκό και 1,07% για το κόκκινο, συναντάμε το κλάσμα των φαινολικών οξέων και των παράγωγων της κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ (FIII).

Όπως ήταν αναμενόμενο, η μάζα των φαινολικών των αντίστοιχων κλασμάτων είναι μεγαλύτερη στο Cabernet Sauvignon σε σχέση με το Ambelon γεγονός που οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο οινοποίησης των κόκκινων, που πραγματοποιείται παρουσία των στέμφυλων, έναντι των λευκών κρασιών.

6.3 Χημικοί προσδιορισμοί

Στο πλαίσιο του προσδιορισμού της σύστασης των εκχυλισμάτων που προήλθαν από τα δύο κρασιά, πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί στα κλάσματα που προέκυψαν και από τους δύο τρόπους εκχύλισης.

Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά, τα όρθο-φαινολικά, τα σάκχαρα καθώς και ο οργανικός και ο ανόργανος φώσφορος με βάση τις μεθόδους που αναφέρονται στο κεφάλαιο 5. Τα αποτελέσματα, όσο αφορά στον πρώτο τρόπο εκχύλισης παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.

Στον πίνακα 6.3 παρατηρούμε πώς το κλάσμα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά και των δύο κρασιών είναι το υδατικό κλάσμα (W). Αξίζει επίσης να επισημανθεί η μεγάλη διαφορά στην μάζα ανά λίτρο κρασιού των συστατικών του W σε σχέση με το κλάσμα των ολικών λιποειδών και στο Ambelon και στο Cabernet Sauvignon.

Συγκρίνοντας τα δύο κρασιά μεταξύ τους βλέπουμε πως το κόκκινο είναι πλουσιότερο σε ολικά φαινολικά και σάκχαρα σε όλα τα κλάσματα και σε ανόργανο φώσφορο στο υδατικό κλάσμα, ενώ υπολείπεται, σε σχέση με το λευκό, σε όρθο-φαινολικά στα ολικά και πολικά λιποειδή και σε οργανικό φώσφορο στα PL.

Πίνακας 6.3: Χημικοί προσδιορισμοί των κλασμάτων που προήλθαν από εκχύλισης των κρασιών Ambelon (A) και Cabernet Sauvignon (CS) με τη Μέθοδο 1.

Συστατικό	Τύπος Κρασιού	Κλάσμα		
		W	TL	PL
Ολικά φαινολικά ^α	A	191±37.0 (1.06±0.21)	20.7±2.37 (6.55±0.75)	17.7±1.45 (5.28±0.44)
	CS	2220 ±250 (7,19 ±0,81)	65,7 ±5,8 (8,88 ±0,79)	41,7 ±3,88 (6,34 ±0,59)
Όρθο-φαινολικά ^β	A	80.9±9.03 (0.45±0.05)	18.2±1.90 (5.75±0.60)	19.7±1.01 (5.85±0.30)
	CS	485 ±64,9 (1,57 ±0,21)	14,4 ±1,7 (1,95 ±0,23)	11,7 ±1,25 (1,78 ±0,19)
Σάκχαρα ^γ	A	4570±614 (25.31±3.4)	12.8±1.9 (4.04±0.60)	13.1±1.85 (3.80±0.55)
	CS	6920 ±958 (22,41 ±3,1)	33,6 ±3,77 (4,54 ±0,51)	22,3 ±2,7 (3,47 ±0,41)
Οργανικός φώσφορος ^δ	A	5.72±0.072 (0.032±0.004)	ε	0.35±0.01 (0.104±0.002)
	CS	ε	ε	0,077 ±0,01 (0,012 ±0,002)
Ανόργανος φώσφορος ^δ	A	125±13.4 (0.69±0.07)	ε	ε
	CS	111 ±13,9 (0,36 ±0,04)	ε	ε

^α Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο κρασιού και ως % w/w γαλλικού οξέος στο κλάσμα στην παρένθεση

^β Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg κερκετίνης ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w κερκετίνης στο κλάσμα στην παρένθεση

^γ Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg γλυκόζης ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w γλυκόζης στο κλάσμα στην παρένθεση

^δ Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg φωσφόρου ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w φωσφόρου στο κλάσμα στην παρένθεση

^ε Δεν πραγματοποιήθηκαν προσδιορισμοί

Τα αποτελέσματα στα κλάσματα που προήλθαν από τον δεύτερο τρόπο εκχύλισης παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.

Ο πίνακας 6.4 μας δείχνει πως η μεγαλύτερη μάζα σε φαινολικές ενώσεις, σάκχαρα και φώσφορο ανά λίτρο κρασιού εντοπίζεται στο FI κλάσμα και στα δύο κρασιά. Αξίζει να σημειωθεί πως το κλάσμα FII έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σχέση με τα άλλα σε ολικά και όρθο-φαινολικά συστατικά ενώ το FI κλάσμα παρουσιάζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα.

Πίνακας 6.4: Χημικοί προσδιορισμοί των κλασμάτων που προήλθαν από εκχύλισης των κρασιών *Ambelon* (A) και *Cabernet Sauvignon* (CS) με τη Μέθοδο 2

Συστατικό	Τύπος Κρασιού	Κλάσμα			
		FI	FII	FIII	FIV
Ολικά φαινολικά ^a	A	220±115.9 (1.01±0.53)	82.5±11.7 (11.3±1.60)	1.80±0.10 (0.87±0.05)	18.2±1.90 (5.75±0.60)
	CS	2950 ±273 (9,4 ±0,86)	457 ±62 (25,1 ±3,4)	35,6 ±3,6 (9,67 ±0,98)	14,4 ±1,7 (1,95 ±0,23)
Όρθο-φαινολικά ^b	A	71.3±8.8 (0.33±0.04)	45.9±5.05 (6.27±0.69)	1.00±0.11 (0.48±0.05)	0.75±0.087 (0.17±0.02)
	CS	468 ±63,4 (1,49 ±0,2)	122 ±13,7 (6,7 ±0,75)	8,36 ±0,77 (2,27 ±0,21)	6,9 ±0,77 (1,35 ±0,15)
Σάκχαρα ^γ	A	1700±181 (7.79±0.82)	9.20±1.17 (1.26±0.16)	1.53±0.17 (0.74±0.08)	1.82±0.13 (0.42±0.03)
	CS	2260 ±270 (7,2 ±0,85)	115 ±14,2 (6,32 ±0,78)	21 ±2,54 (5,7 ±0,69)	66,2 ±11,8 (12,9 ±2,3)
Οργανικός φώσφορος ^δ	A	17.1±1.98 (0.078±0.009)	0.097±0.014 (0.013±0.002)	0.004±0.0001 (0.0017±0.0002)	0.118±0.013 (0.027±0.003)
	CS	ε	0,268 ±0,036 (0,015±0,002)	0,063 ±0,008 (0,017±0,002)	0,12 ±0,02 (0,024±0,003)
Ανόργανος φώσφορος ^δ	A	112±11.7 (0.51±0.05)	ε	ε	0.152±0.017 (0.035±0.004)
	CS	114 ±17,8 (0,43 ±0,06)	ε	ε	114 ±17,8 (0,43 ±0,06)

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w συγκέντρωση γαλλικού οξέος στο κλάσμα στην παρένθεση

^b Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg κερκετίνης ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w

συγκέντρωση κερκετίνης στο κλάσμα στην παρένθεση

^γ Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg γλυκόζης ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w συγκέντρωση γλυκόζης στο κλάσμα στην παρένθεση

^δ Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg φωσφόρου ανά λίτρο κρασιού και ως %w/w συγκέντρωση φωσφόρου στο κλάσμα στην παρένθεση

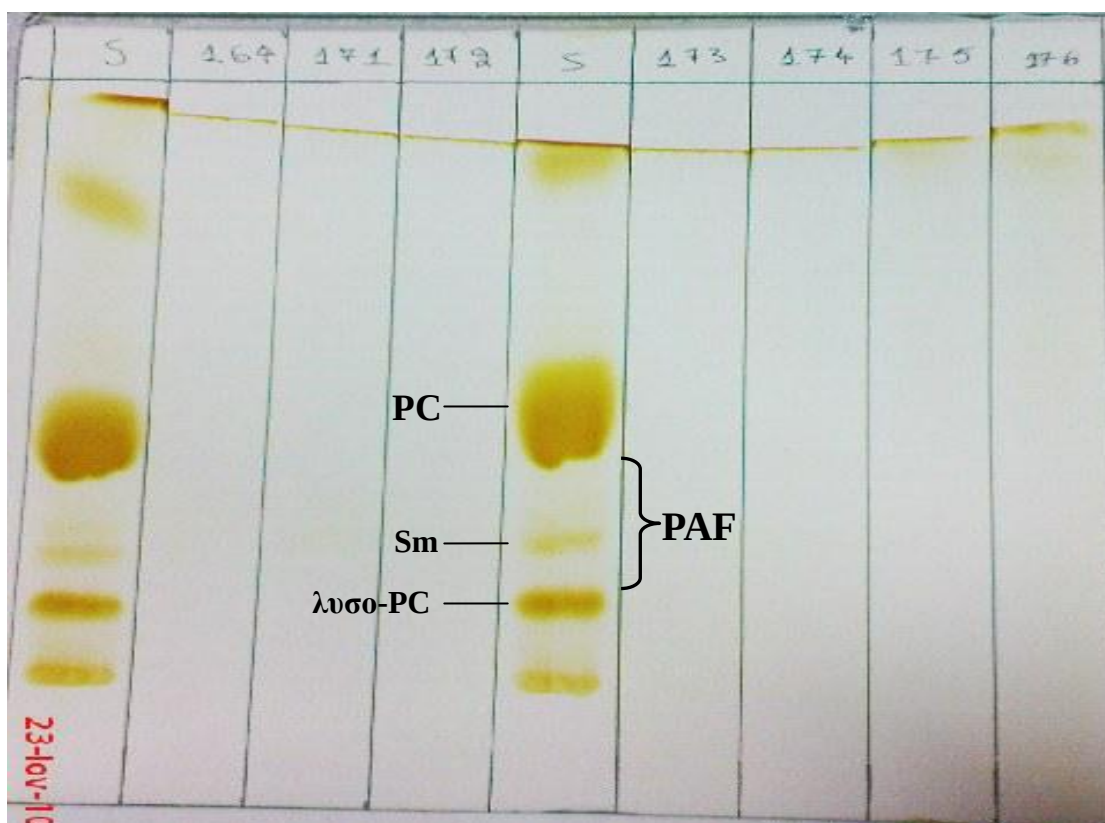
^ε Δεν πραγματοποιήθηκαν προσδιορισμοί

6.4 Ανίχνευση Δραστικότητας της λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράσης (AT)

Για την ανίχνευση της δραστικότητας της λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράσης γίνεται προσδιορισμός του παραγόμενου PAF, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.5. Ο PAF παράγεται με την επίδραση του ενζύμου PAF AT, που προέρχεται από ομογενοποίηση κυττάρων U937, στα υποστρώματα λυσο-PAF και ακέτυλο-CoA. Η δραστικότητα της λυσο-PAF AT, και επομένως η ποσότητα του PAF που ανιχνεύεται μπορεί να επηρεαστεί (να ανασταλεί ή να ενεργοποιηθεί) από την παρουσία των συστατικών του κρασιού.

Η ποσότητα του PAF που παράχθηκε, αφού απομονωθεί με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), τοποθετείται σε εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, ώστε να υπολογιστεί η συσσώρευση που προκαλεί σε αυτά. Χαρακτηριστική εικόνα μιας πλάκας TLC, έπειτα από εμφάνιση της σε ατμούς I_2 , είναι αυτή που φαίνεται στο σχήμα 6.2. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του PAF που παράχθηκε, τόσο μεγαλύτερη αναμένεται να είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από την οποία ακολούθως μπορούμε να υπολογίσουμε την επίδραση που έχει στο ένζυμο η προσθήκη εκχυλισμάτων κρασιού ή πρότυπων φαινολικών ενώσεων.

Έτσι για κάθε δείγμα υπολογίζεται το ποσοστό της επαγόμενης από PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων, σχεδιάζεται η γραφική παράσταση της επί τοις εκατό αναστολής συναρτήσει της ποσότητας και υπολογίζεται η ποσότητα του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου (IC_{50}).



Σχήμα 6.2: Φωτογραφία πλάκας ανάπτυξης TLC, όπου PC= φωσφατιδυλο-χολίνη, Sm= σφιγγομυελίνη

6.4.1 Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δραστηριότητα της λυσο-PAF AT

Ο προσδιορισμός της επίδρασης των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη έγινε με δύο μεθόδους:

6.4.1.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων

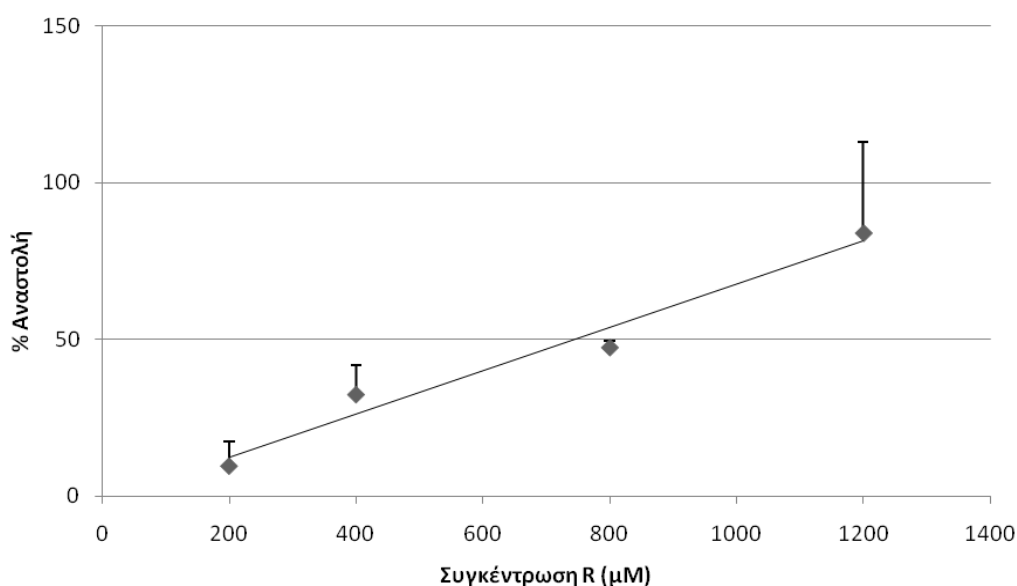
Κατά την μέθοδο αυτή, η ενζυμική αντίδραση της λυσο-PAF AT πραγματοποιήθηκε απουσία δείγματος αναφοράς ή παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης. Η μέθοδος αυτή γίνεται για την διερεύνηση της απευθείας επίδρασης των πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δράση του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαφορετικής συγκέντρωσης διαλύματα ρεσβερατρόλης σε DMSO. Η ποσότητα DMSO ήταν σταθερή και ίση με 2 μ L σε όλες τις ενζυμικές αντιδράσεις, και στο δείγμα αναφοράς προστέθηκαν 2 μ L DMSO επιπλέον.

α) Τα αποτελέσματα της επί της εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από την ρεσβερατρόλη είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης

Συγκέντρωση ρεσβερατρόλης (μM)	% αναστολή της λυσο-PAF AT	Τυπική απόκλιση
200	9,7	7,5
400	32,5	9,19
800	47,5	2,12
1200	84	28,99

Από τις τιμές του πίνακα 6.5 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης (Σχήμα 6.3).



Σχήμα 6.3: Επίδραση της ρεσβερατρόλης στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία ρεσβερατρόλης).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.3 είναι: $y = 0,0692x - 1,5627$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: $\text{IC}_{50} = 745,1 \mu\text{M}$.

Στα κλάσματα του κρασιού, σε αντίθεση με τις πρότυπες ενώσεις μας (ρεσβερατρόλη, κερκετίνη), εξετάζουμε τις ιδιότητες μιας ομάδας ενώσεων (λιποειδή, φαινολικά) για την οποία

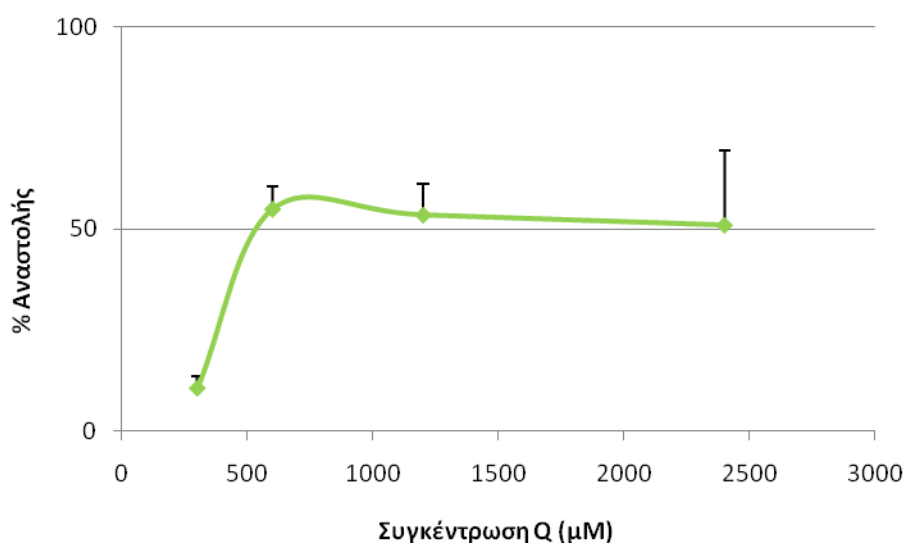
δεν μπορούμε να υπολογίσουμε, και κατ' επέκταση να χρησιμοποιήσουμε, μοριακό βάρος. Για να μπορέσει, λοιπόν, να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των πρότυπων φαινολικών ενώσεων με αυτά των εκχυλισμάτων των κρασιών μετατρέπουμε τα μM σε $\mu\text{g/mL}$. Έτσι προκύπτει: $\text{IC}_{50} = 0,170 \mu\text{g/mL}$.

β) Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από την κερκετίνη παρουσιάζονται στον πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης

Συγκέντρωση κερκετίνης (μM)	% αναστολή της λυσο-PAF AT	Τυπική απόκλιση
300	10,7	3
600	54,95	5,59
1200	53,5	7,78
2400	51	18,38

Από τις τιμές του πίνακα 6.6 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης της κερκετίνης (Σχήμα 6.4).



Σχήμα 6.4: Επίδραση της κερκετίνης στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία κερκετίνης)

Παρατηρώντας το γράφημα του σχήματος 6.4, διαπιστώνουμε πως στα 600 μM η % αναστολή της λυσο-PAF AT αγγίζει την μέγιστη τιμή της δημιουργώντας πλατώ, μιας και αυξανόμενης της συγκέντρωσης της κερκετίνης, αυτή παραμένει σχεδόν σταθερή. Έτσι, για τον υπολογισμό της εξίσωσης της ευθείας και εν συνεχεία του IC_{50} , χρησιμοποιούμε τις δύο πρώτες τιμές συγκέντρωσης και έχουμε:

$$y = 0,1475x - 33,55, \text{IC}_{50} = 566,44 \mu\text{M} = 0,1916 \mu\text{g}/\mu\text{L}.$$

6.4.1.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων

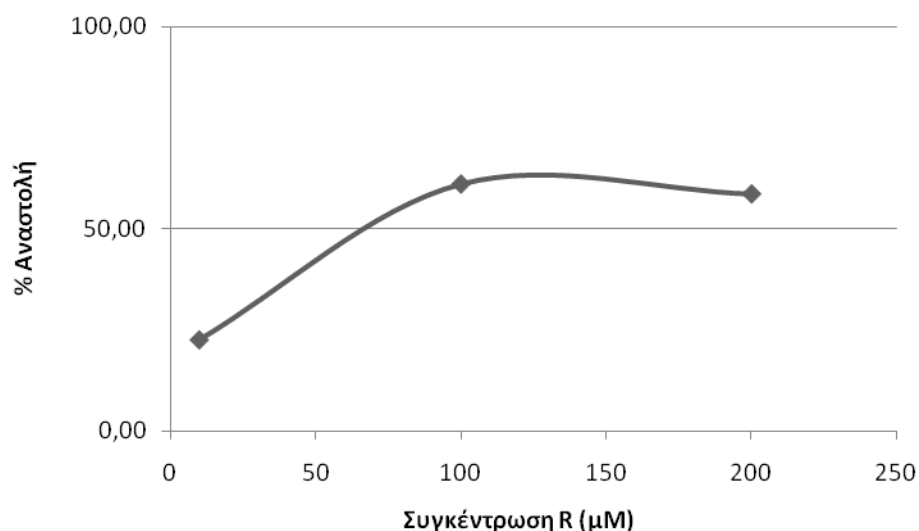
Κατά την μέθοδο αυτή οι υπό μελέτη πρότυπες φαινολικές ενώσεις, επώαστηκαν με τα κύτταρα U937 για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που δεν περιείχε ορό, αφού είχε προηγηθεί συγχρονισμός (βλ. § 5.4). Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί, κυρίως, στην διερεύνηση της επίδρασης των πρότυπων φαινολικών ενώσεων στην πορεία μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούν/ απενεργοποιούν τα ένζυμα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης ή κερκετίνης. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαινολικών σε DMSO και προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό ίδια ποσότητα DMSO, ίση με 2 μL . Στο δείγμα αναφοράς απουσία φαινολικών ενώσεων προστέθηκαν 2 μL DMSO. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % αναστολή της λυσο-PAF AT ως προς το δείγμα αναφοράς απουσία φαινολικών.

α) Τα αποτελέσματα της επί της εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από ρεσβερατρόλη που επώαστηκε με κύτταρα U937 είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης

Συγκέντρωση ρεσβερατρόλης (μM)	% αναστολή της λυσο-PAF AT
10	22.47
100	60.93
200	58.49

Από τις τιμές του πίνακα 6.7 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης (Σχήμα 6.5).



Σχήμα 6.5: Επίδραση της ρεσβερατρόλης στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ακέραιων κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία ρεσβερατρόλης).

Από τα 100 μM και πάνω, δεν προκαλείται περαιτέρω αναστολή της λυσο-PAF AT από την ρεσβερατρόλη που επώαστηκε με U937. Το IC_{50} υπολογίστηκε από την εξίσωση της ευθείας που σχηματίζεται από τις δύο πρώτες τιμές: $y = 0,5133x + 1,7453$ $IC_{50} = 94,01 \mu M = 0,02 \mu g/\mu L$

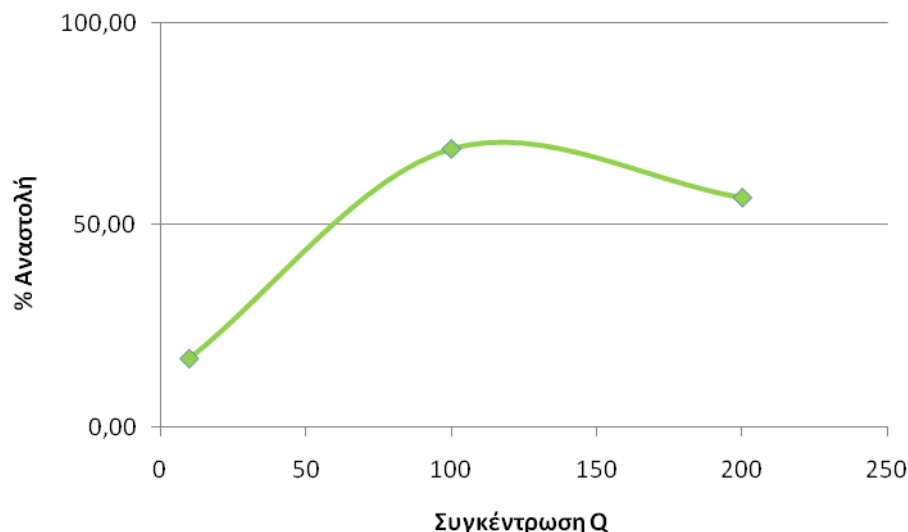
Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και με μικρότερες τιμές (0,05, 0,1, 1 μM) συγκέντρωσης της πρότυπης ουσίας όμως τα αποτελέσματά του έδειξαν μικρή ή καθόλου αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT.

β) Τα αποτελέσματα της επί της εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από κερκετίνη που επώαστηκε με κύτταρα U937 είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.8: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνη

Συγκέντρωση ρεσβερατρόλης (μM)	% αναστολή της λυσο-PAF AT
10	16.9
100	68.8
200	56.74

Από τις τιμές του πίνακα 6.7 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης της κερκετίνης (Σχήμα 6.6).



Σχήμα 6.6: Επίδραση της κερκετίνης στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ακέραιων κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία κερκετίνης).

Από τα 100 μM και πάνω, δεν προκαλείται περαιτέρω αναστολή της λυσο-PAF AT από την κερκετίνη που επώαστηκε με U937. Το IC_{50} υπολογίστηκε από την εξίσωση της ευθείας που σχηματίζεται από τις δύο πρώτες τιμές: $y = 0,6927x + 6,7394$ $\text{IC}_{50} = 81,91 \mu\text{M} = 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

6.4.2 Επίδραση κλασμάτων του λευκού κρασιού στην δραστικότητα της λυσο-PAF AT

Τα κλάσματα του λευκού κρασιού, την επίδραση των οποίων εξετάσαμε, ήταν αυτά των πολικών λιποειδών που προέκυψαν από την εκχύλιση με την μέθοδο Blight- Dyer (PL) καθώς και αυτά που προέκυψαν από την μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων (FI, FII, FIII, FIV).

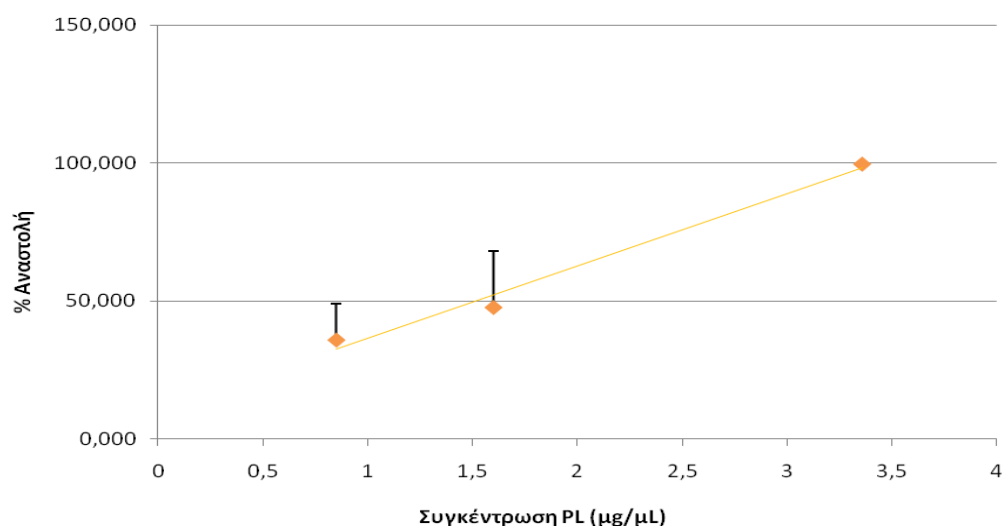
6.4.2.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων

Όσον αφορά στον πρώτο τρόπο εκχύλισης, τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τα πολικά λιποειδή (PL) του Ambelon είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.9.

Πίνακας 6.9: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της λυσο-PAF AT	Τυπική απόκλιση
0,84	34,98	15,80
1,68	75,33	20,64
3,36	99,57	0,49

Από τις τιμές του πίνακα 6.9 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών του Ambelon (Σχήμα 6.7).



Σχήμα 6.7: Επίδραση των PL του Ambelon στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία PL).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.7 είναι: $y = 24,03x - 22,861$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης των PL που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: $IC_{50} = 1,13 \mu g/\mu L$.

Στις ίδιες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκε και το υδατικό κλάσμα οι τιμές του οποίου όμως έδειξαν μικρή ενεργοποίηση.

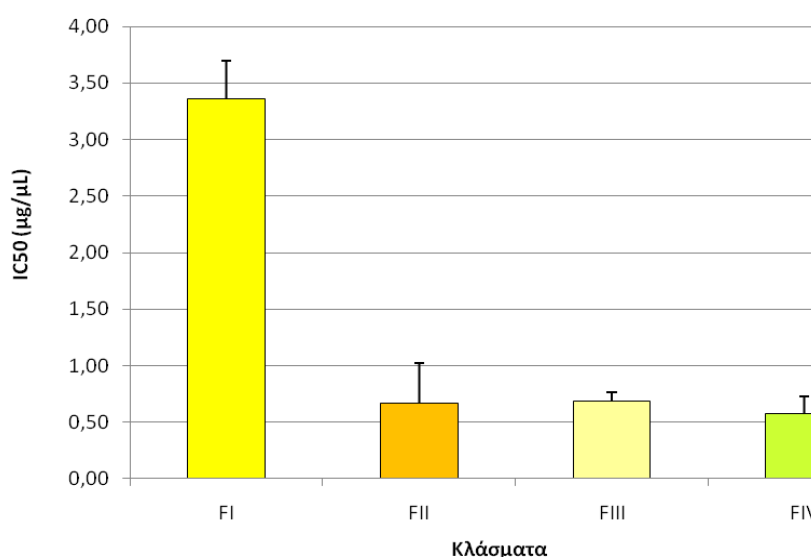
Όσον αφορά στον δεύτερο τρόπο εκχύλισης, στον πίνακα 6.10 παρουσιάζονται τα IC_{50} των τιμών των κλασμάτων των φαινολικών ενώσεων που προκαλούν αναστολή της δράσης του

ενζύμου λυσο-PAF AT (IC_{50}). Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει από δύο πειραματικές δοκιμές.

Πίνακας 6.10: Επίδραση διαφορετικών κλασμάτων φαινολικών ενώσεων που προέκυψαν από τον δεύτερο τρόπο εκχύλισης, στη δράση της λυσο-PAF AT (IC_{50})

Κλάσμα	IC_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Τυπική απόκλιση
FI	3,36	0,33
FII	0,67	0,35
FIII	0,68	0,085
FIV	0,58	0,14

Το σχήμα που ακολουθεί αποτελεί διαγραμματική σύγκριση των IC_{50} των εκχυλισμάτων FI, FII, FIII και FIV.



Σχήμα 6.8: Τιμές IC_{50} των κλασμάτων της μεθόδου 2 στη δράση των κλασμάτων της λυσο-PAF AT

Παρατηρείται μεγάλη διαφορά στο IC_{50} των ανθοκυανινών σε σχέση με αυτό των άλλων τριών, τα οποία κινούνται σε παρόμοια επίπεδα, υποδηλώνοντας πως είναι λιγότερο ισχυροί αναστολείς της λυσο-PAF AT.

6.4.2.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τα πολικά λιποειδή (PL) που επώαστηκαν με κύτταρα U937 είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.11.

Πίνακας 6.11: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της λυσο-PAF AT
0,00001	9,89
0,0001	17,08

Παρόλο που τα PL στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στον πίνακα 6.11 προκαλούν μικρή αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0,002 , 0,01 , 0,05 μg/μL) εμφανίζουν μικρή ενεργοποίηση.

6.4.3 Επίδραση κλασμάτων του κόκκινου κρασιού στην δραστικότητα της λυσο-PAF AT

Τα κλάσματα του κόκκινου κρασιού, την επίδραση των οποίων εξετάσαμε, ήταν αυτά των πολικών λιποειδών που προέκυψαν από την εκχύλιση με την μέθοδο Blight- Dyer (PL) καθώς και αυτά που προέκυψαν από την μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων (FI, FII, FIII, FIV). Παρακάτω παρουσιάζονται οι μελέτες σε σύστημα ελεύθερων κυττάρων και μετά από την επώασή τους με U937.

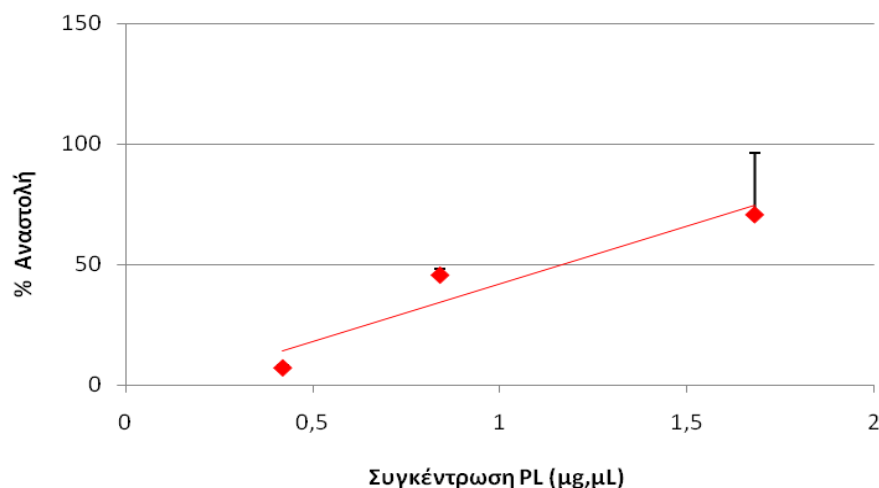
6.4.3.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τα πολικά λιποειδή (PL) του Cabernet Sauvignon παρουσιάζονται στον πίνακα 6.12.

Πίνακας 6.12: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της λυσο-PAF AT	Τυπική απόκλιση
0.42	6.9	1,04
0.84	45.6	2,70
1.68	70.8	25,60
3.36	88.1	20,35
6.93	99.9	14,98

Από τις τιμές του πίνακα 6.12 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών του Cabernet Sauvignon (Σχήμα 6.9).



Σχήμα 6.9: Επίδραση των PL του Cabernet Sauvignon στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία PL).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.9 είναι: $y = 47,75x - 5,7$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης των PL που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: **IC₅₀ = 1,17 μg/mL**.

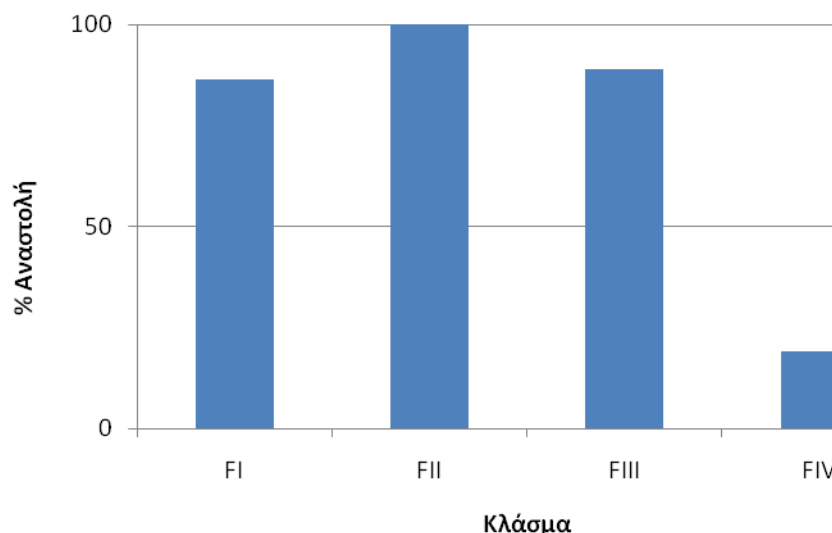
Το υδατικό κλάσμα που παραλάβαμε από αυτή την εκχύλιση αναστέλλει το ένζυμο κατά 60 % σε συγκέντρωση 0,05 μg/mL ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η αναστολή αγγίζει το 100 %.

Όσον αφορά στην επίδραση των κλασμάτων που προέκυψαν με την μέθοδο 2, δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις από 0,05 μg/mL μέχρι 0,85 μg/mL. Οι τιμές της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από την επίδραση διαλυμάτων συγκέντρωσης 0,05 μg/mL των τεσσάρων εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.14.

Πίνακας 6.14:. Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών κλασμάτων κρασιού

Συγκέντρωση 0,05 μg/mL	% Αναστολή της λυσο-PAF AT
FI	86,5
FII	99,9
FIII	89
FIV	19,3

Στο επόμενο γράφημα φαίνεται διαγραμματικά η αναστολή που προκαλείται στη λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση από τα κλάσματα FI, FII, FIII, FIV σε συγκέντρωση 1.6μg/μL.



Σχήμα 6.10: Γράφημα σύγκρισης: % αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT - διαφορετικά κλάσματα κρασιού

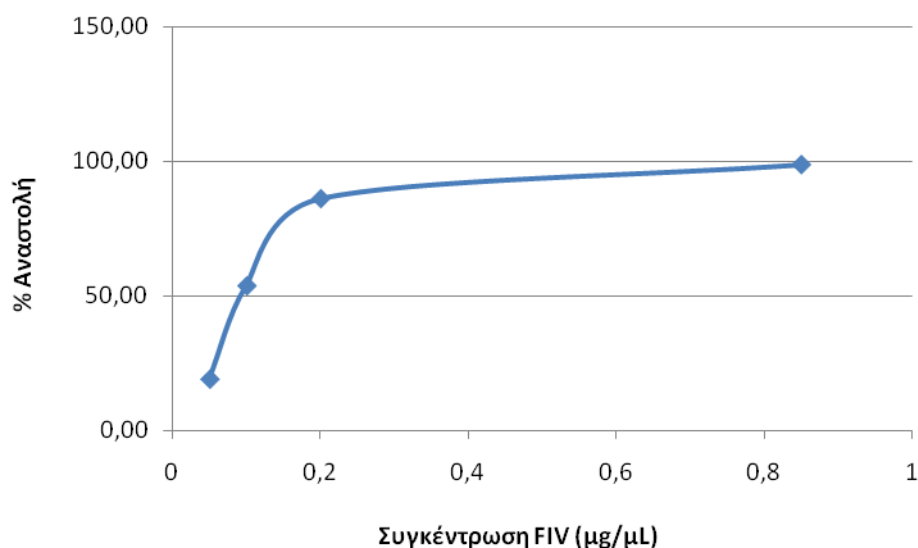
Στο γράφημα του σχήματος 6.10 φαίνεται πως το κλάσμα των προκυανιδινών, των κατεχινών, των επικατεχινών και των φλαβονολών (FII) αναστέλλει πλήρως την λυσο-PAF AT. Τα κλάσματα των ανθοκυανινών (FI) και των φαινολικών οξέων και των παραγώγων της κερκετίνης (FIII) παρουσιάζουν αρκετά υψηλά ποσοστά αναστολής του ενζύμου. Τέλος το κλάσμα των “λοιπών φαινολικών συστατικών” (FIV) δεν αναστέλλει αποτελεσματικά το ένζυμο.

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τέσσερις συγκεντρώσεις του FIV κλάσματος των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με την μέθοδο 2 παρουσιάζονται στον πίνακα 6.13.

Πίνακας 6.13: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών του FIV κλάσματος

Συγκέντρωση του FIV (μg/μL)	% Αναστολή της λυσο-PAF AT
0,05	19,13
0,1	53,81
0,2	86,17
0,85	98,80

Από τις τιμές του πίνακα 6.13 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης του κλάσματος FIV που προέκυψε από τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων (Σχήμα 6.11).



Σχήμα 6.11.: Επίδραση του FIV κλάσματος του Cabernet Sauvignon στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία FIV).

Παρατηρώντας το γράφημα του σχήματος 6.11, διαπιστώνουμε ότι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0,2 μg/μL, η % αναστολή της λυσο-PAF AT τείνει να σταθεροποιηθεί αγγίζοντας το 100 %. Έτσι, για τον υπολογισμό της εξίσωσης της ευθείας και εν συνεχεία του IC_{50} , χρησιμοποιούμε τις τρεις πρώτες τιμές συγκέντρωσης από τις οποίες προκύπτουν:

$$y = 429,34x - 2,9483, IC_{50} = 0,109 \mu g/\mu L$$

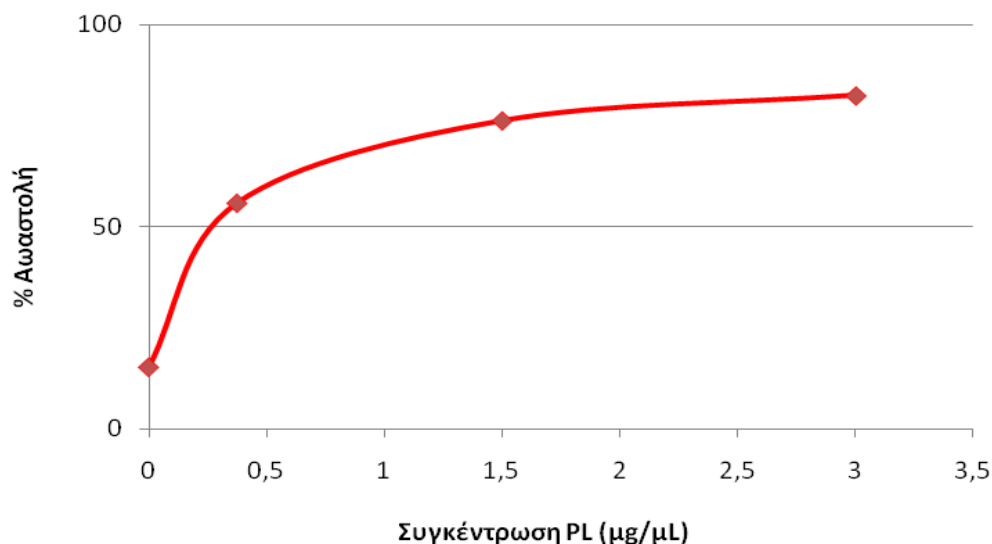
6.4.3.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τα πολικά λιποειδή (PL) που επώαστηκαν με κύτταρα U937 είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.15.

Πίνακας 6.15: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της λυσο-PAF AT
0,00001	15,26
0,375	55,90
1,5	76,30
3	82,48

Από τις τιμές του πίνακα 6.15 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της λυσο-PAF AT συναρτήσει της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών (Σχήμα 6.12).



Σχήμα 6.12: Επίδραση των PL του Cabernet Sauvignon στη δράση της λυσο-PAF AT σε σύστημα ακέραιων κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία PL).

Για τον υπολογισμό της εξίσωσης της ευθείας, απορρίφθηκε η τελευταία τιμή (3 μg/μL).: $y = 35,487x - 26,974$, $IC_{50} = 0,65 \mu g/\mu L$

6.5 Ανίχνευση Δραστικότητας της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF CPT)

Για την ανίχνευση της δραστικότητας της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση ακολουθούνται τα ίδια βήματα που περιγράφηκαν στην παράγραφο 6.4.

6.5.1 Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση

Ο προσδιορισμός της επίδρασης των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη έγινε και σε αυτή την περίπτωση με δύο μεθόδους:

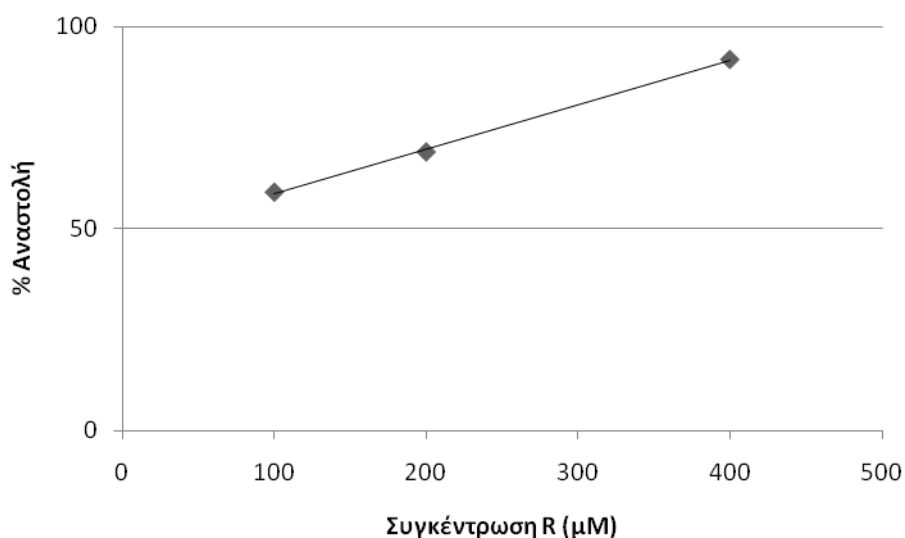
6.5.1.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων

α) Τα αποτελέσματα της επί της εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από την ρεσβερατρόλη είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.14.

Πίνακας 6.14: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρούλης

Συγκέντρωση ρεσβερατρούλης (μM)	% αναστολή της PAF CPT
100	59.39
200	69.3
400	92.32

Από τις τιμές του πίνακα 6.14 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσεως της συγκέντρωσης της ρεσβερατρούλης (Σχήμα 6.13).



Σχήμα 6.13 Επίδραση της ρεσβερατρούλης στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία ρεσβερατρούλης).

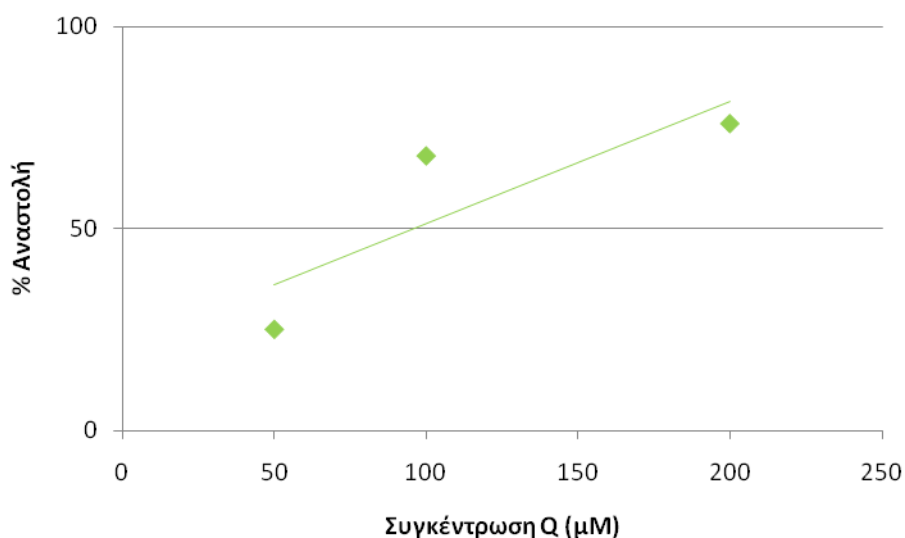
Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.13 είναι: $y = 0,1107x - 47,5$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης της ρεσβερατρούλης που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: $IC_{50} = 22,6 \mu M = 0,0052 \mu g/\mu L$.

β) Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από την κερκετίνη είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.15.

Πίνακας 6.15: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης

Συγκέντρωση κερκετίνης (μM)	% αναστολή της PAF CPT
50	25
100	68
200	76
400	91

Από τις τιμές του πίνακα 6.15 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσει της συγκέντρωσης της κερκετίνης, (Σχήμα 6.14).



Σχήμα 6.14: Επίδραση της κερκετίνης στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία κερκετίνης).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.14 είναι: $y = 0,3029x - 21$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: $IC_{50} = 95,74 \mu M = 0,0032 \mu g/\mu L$.

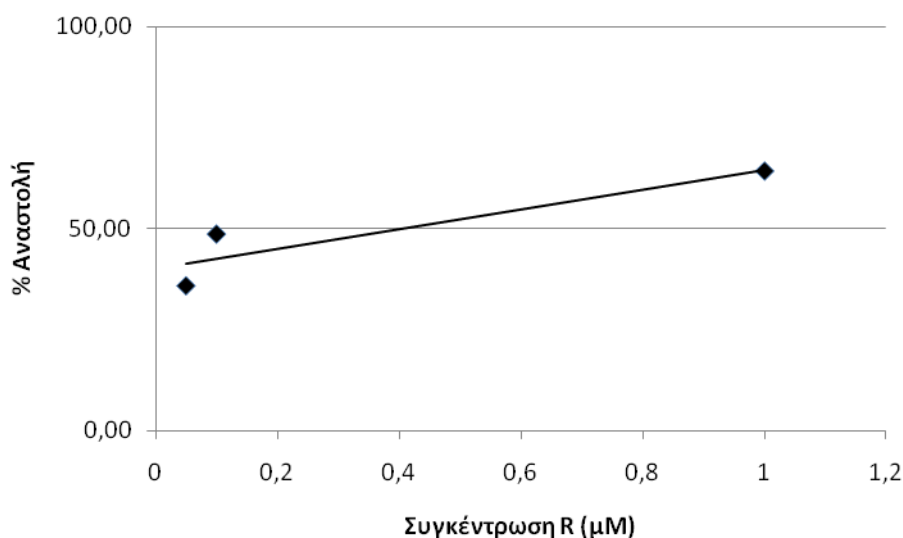
6.5.1.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων

α) Τα αποτελέσματα της επί της εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από ρεσβερατρόλη που επώαστηκε με κύτταρα U937 παρουσιάζονται στον πίνακα 6.16.

Πίνακας 6.16: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρώλης

Συγκέντρωση ρεσβερατρώλης (μM)	% Αναστολή της PAF CPT
0,05	35,80
0,1	48,65
1	64,30

Από τις τιμές του πίνακα 6.16 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσει της συγκέντρωσης της ρεσβερατρώλης (Σχήμα 6.15).



Σχήμα 6.15: Επίδραση της ρεσβερατρώλης στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ακέραιων κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία ρεσβερατρώλης).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.15 είναι: $y = 24,36x - 40,24$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης της ρεσβερατρώλης που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: $IC_{50} = 0,4 \mu M = 0,091 ng/\mu L$.

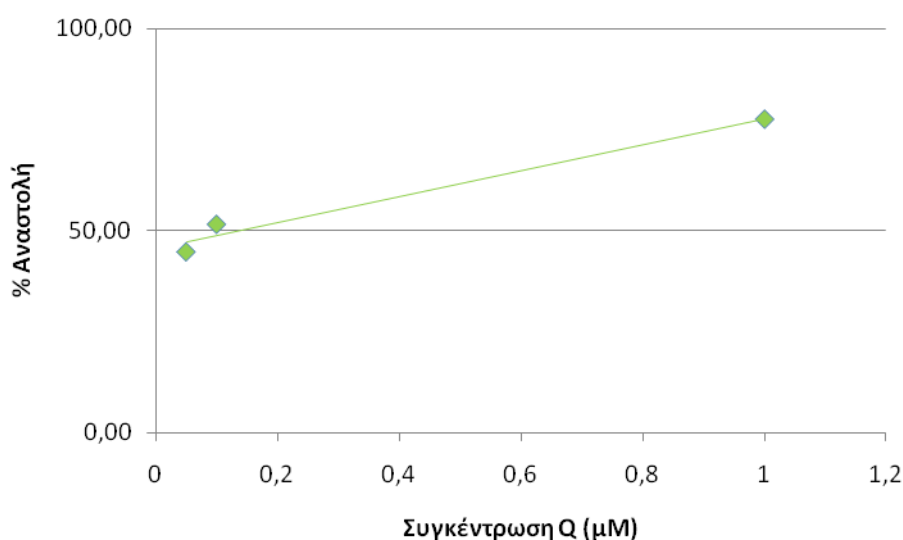
Δοκιμάστηκαν και οι συγκεντρώσεις 10, 100, 200 μM αλλά παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της PAF CPT.

β) Τα αποτελέσματα της επί της εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από κερκετίνη που επώαστηκε με κύτταρα U937 παρουσιάζονται στον πίνακα 6.17.

Πίνακας 6.17: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης

Συγκέντρωση κερκετίνης (μM)	% Αναστολή της PAF CPT
0,05	44,60
0,1	51,45
1	77,56

Από τις τιμές του πίνακα 6.17 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσει της συγκέντρωσης της κερκετίνης (Σχήμα 6.16).



Σχήμα 6.16: Επίδραση της κερκετίνης στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ακέραιων κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία κερκετίνης).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.16 είναι: $y = 32,158x - 45,54$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης της κερκετίνης που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: **IC₅₀ = 0,14 μM = 0,047 ng/μL.**

Δοκιμάστηκαν και οι συγκεντρώσεις 10, 100, 200 μM αλλά παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της PAF CPT.

6.5.2 Επίδραση κλασμάτων του λευκού κρασιού στην δραστηριότητα της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση

Τα κλάσματα του λευκού κρασιού, την επίδραση των οποίων εξετάσαμε, ήταν αυτά των πολικών λιποειδών που προέκυψαν από την εκχύλιση με την μέθοδο Blight- Dyer (PL) καθώς και αυτά που προέκυψαν από την μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων (FI, FII, FIII, FIV). Όλα

τα κλάσματα μελετήθηκαν τόσο σε σύστημα ελεύθερων κυττάρων όσο και μετά από την επώασή τους με U937.

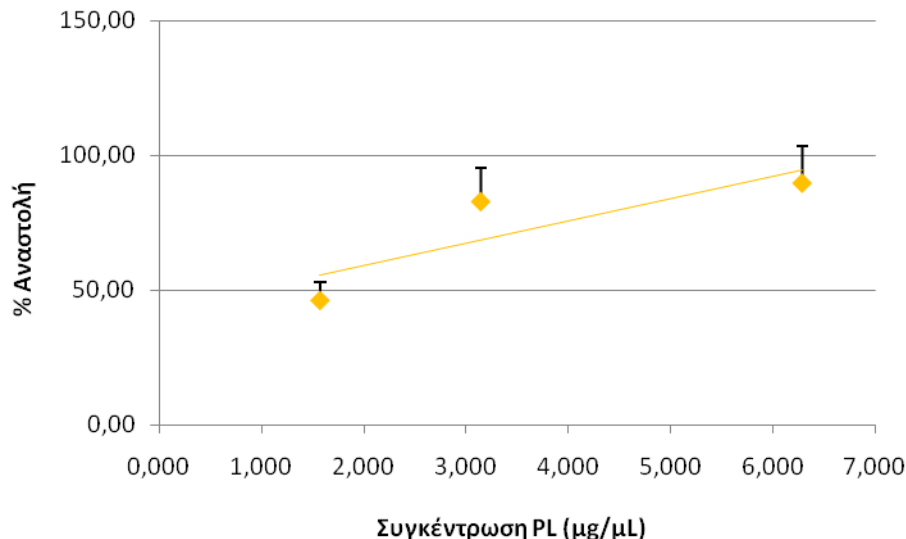
6.5.2.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από τα πολικά λιποειδή (PL) είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.18.

Πίνακας 6.18: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της PAF CPT	Τυπική απόκλιση
1,57	46,22	6,93
3,14	82,88	12,20
6,30	89,74	13,50

Από τις τιμές του πίνακα 6.18 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσει της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών (Σχήμα 6.17).



Σχήμα 6.17: Επίδραση των PL του Ambelon στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία PL).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.17 είναι: $y = 8,2236x + 42,792$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης των PL που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου:

$$IC_{50} = 0,876 \mu g/\mu L.$$

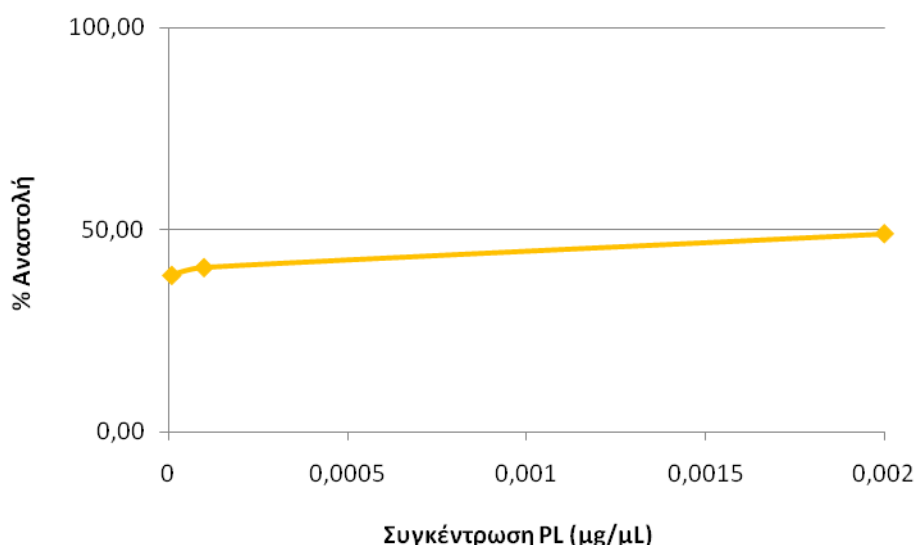
6.5.2.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από τα πολικά λιποειδή (PL) που επωάστηκαν με κύτταρα U937 παρουσιάζονται στον πίνακα 6.19.

Πίνακας 6.19: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της PAF CPT
0,00001	38,64
0,0001	40,60
0,002	49,05

Από τις τιμές του πίνακα 6.19 προέκυψε το γράφημα τοις επί της εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσεως της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών (Σχήμα 6.18).



Σχήμα 6.18: Επίδραση των PL του Ambelon του στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ακέραιων κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία PL).

Από την παραπάνω γραφική παράσταση του σχήματος 6.18, παρατηρείται πως η τιμή του IC₅₀ είναι περίπου 0,002 μg/μL.

6.5.3 Επίδραση κλασμάτων του κόκκινου κρασιού στην δραστικότητα της CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση

Τα κλάσματα του κόκκινου κρασιού, την επίδραση των οποίων εξετάσαμε, ήταν αυτά

των πολικών λιποειδών που προέκυψαν από την εκχύλιση με την μέθοδο Blight- Dyer (PL) Όλα τα κλάσματα μελετήθηκαν τόσο σε σύστημα ελεύθερων κυττάρων όσο και μετά από την επώασή τους με U937.

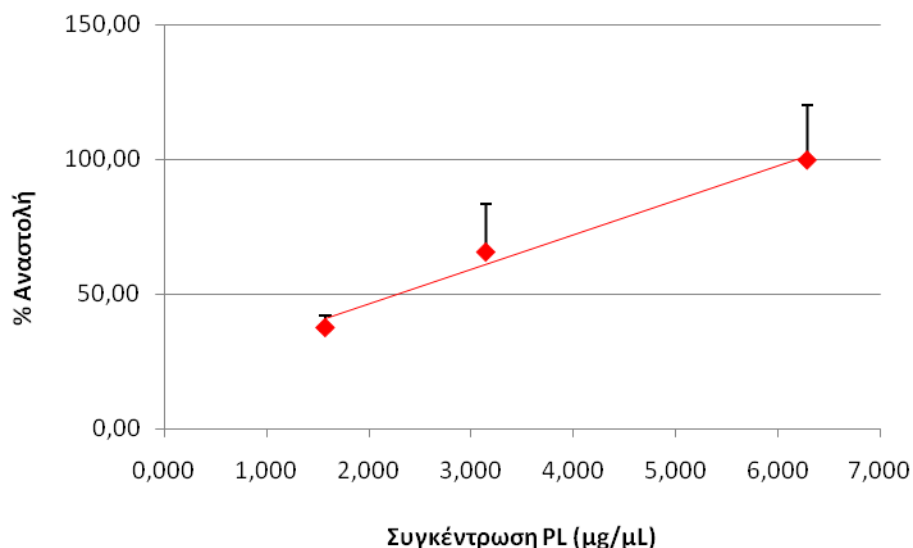
6.5.3.1 Σύστημα ελεύθερο κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από τα πολικά λιποειδή (PL) παρουσιάζονται στον πίνακα 6.20.

Πίνακας 6.20: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της PAF CPT	Τυπική απόκλιση
1,57	37,40	4,71
3,14	65,58	18
6,29	99,92	19,98

Από τις τιμές του πίνακα 6.20 προέκυψε το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT συναρτήσει της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών (Σχήμα 6.19).



Σχήμα 6.19: Επίδραση των PL του Cabernet Sauvignon στη δράση της PAF CPT σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του δείγματος αναφοράς (απουσία PL).

Η εξίσωση της ευθείας του σχήματος 6.19 είναι: $y = 12,927x + 20,236$. Από αυτήν υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης των PL που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του ενζύμου: $IC_{50} = 2,302 \mu g/\mu L$.

6.5.3.2 Σύστημα ακέραιων κυττάρων

Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF CPT από τα πολικά λιποειδή (PL) που επωάστηκαν με κύτταρα U937 παρουσιάζονται στον πίνακα 6.19.

Πίνακας 6.19: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF CPT από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών (PL)

Συγκέντρωση PL (μg/μL)	% αναστολή της PAF CPT
0,0001	9,63
0,002	18,43
0,05	31

6.6 Ανίχνευση Δραστικότητας της PAF ακετυλοϋδρολάσης

Για την ανίχνευση της δραστικότητας της PAF ακετυλοϋδρολάσης γίνεται προσδιορισμός του παραγόμενου lyso-PAF. Ο lyso-PAF παράγεται με την επίδραση του ανασυνδυασμένου ενζύμου PAF AH, στο υπόστρωμα thio-PAF, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο της Μεθοδολογίας (§ 5.8). Η δραστικότητα της PAF AH και επομένως το ποσοστό μετατροπής του thio PAF στο βιολογικά ανενεργό lyso-PAF μπορεί να επηρεαστεί (να ανασταλεί ή να ενεργοποιηθεί) από την παρουσία των συστατικών του κρασιού.

Έτσι για κάθε δείγμα γίνεται φωτομέτρηση και καταγραφή της απορρόφησης του συμπλόκου προϊόντος-χρωστικής (5-thio-2-nitrobenzoic acid) της αντίδρασης από την οποία υπολογίζεται η δραστικότητα του ενζύμου. Όσο μεγαλύτερη η ποσότητα του lyso-PAF που παράχθηκε τόσο εντονότερο αναμένεται να είναι το χρώμα του προϊόντος και, επομένως, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση του διαλύματος από την οποία ακολούθως μπορούμε να υπολογίσουμε την επίδραση που έχει στο ένζυμο η προσθήκη εκχυλισμάτων κρασιού ή πρότυπων φαινολικών ενώσεων.

6.6.1 Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων στη δραστικότητα της PAF ακετυλοϋδρολάσης

α) Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF AH από την ρεσβερατρόλη είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.20.

Πίνακας 6.20: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF AH από τη επίδραση συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης

Συγκέντρωση ρεσβερατρόλης (mM)	% αναστολή της PAF AH	Τυπική απόκλιση
0,01	2	1,08
0,1	2,3	1,24
0,6	6,1	3,29
1,2	8,9	4,8
2	19,54,0	10,55

Από τον πίνακα 6.20 φαίνεται πως στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, η αναστολή της PAF ακετυλοϋδρολάσης από την ρεσβερατρόλη είναι πολύ μικρή.

Δεν κατέσται δυνατός όμως ο υπολογισμός IC_{50} για την συγκεκριμένη ένωση γιατί η διαλυτότητά της στον υδατικό διαλύτη που χρησιμοποιείται είναι μικρή σε μεγαλύτερες των 2 mM συγκεντρώσεις.

β) Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF AH από την κερκετίνη παρουσιάζονται στον πίνακα 6.21.

Πίνακας 6.21: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF AH από τη επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης

Συγκέντρωση κερκετίνης (mM)	% αναστολή της PAF AH
0,01	10,3
0,1	19,4
0,6	21,9

Από τον πίνακα 6.21 φαίνεται πως στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, η αναστολή της PAF ακετυλοϋδρολάσης από την κερκετίνη είναι πολύ μικρή.

Δεν κατέσται δυνατός όμως ο υπολογισμός IC_{50} για την συγκεκριμένη ένωση γιατί η διαλυτότητά της στον υδατικό διαλύτη που χρησιμοποιείται είναι μικρή σε μεγαλύτερες των 0,6 mM συγκεντρώσεις.

6.6.2 Επίδραση κλασμάτων λευκού και κόκκινου κρασιού στην δραστικότητα της PAF ακετυλοϋδρολάσης

Τα κλάσματα του λευκού και του κόκκινου κρασιού, την επίδραση των οποίων εξετάσαμε, ήταν αυτά των πολικών λιποειδών που προέκυψαν από την εκχύλιση με την μέθοδο Blight- Dyer (PL) καθώς και αυτά που προέκυψαν από την μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων (FI, FII, FIII, FIV).

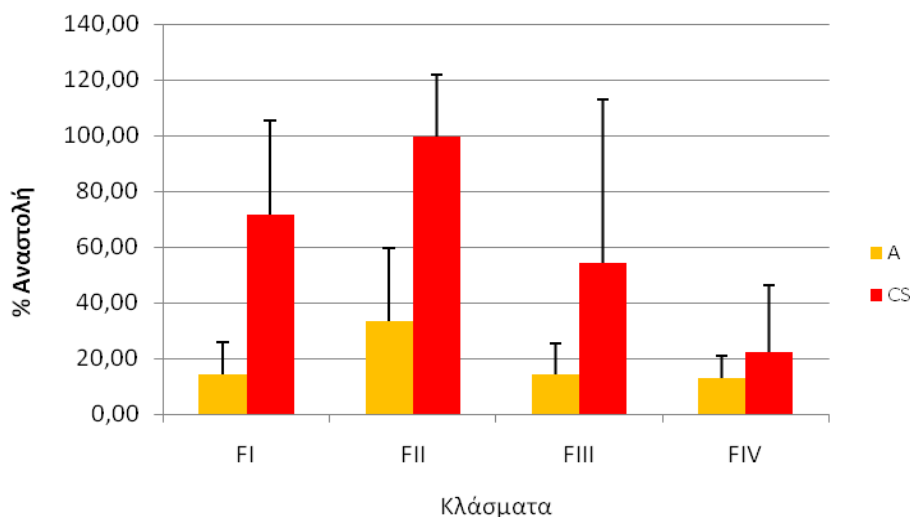
Τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής της δράσης της PAF AH από τα κλάσματα σε σταθερή συγκέντρωση 0,85 mg/mL είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.22.

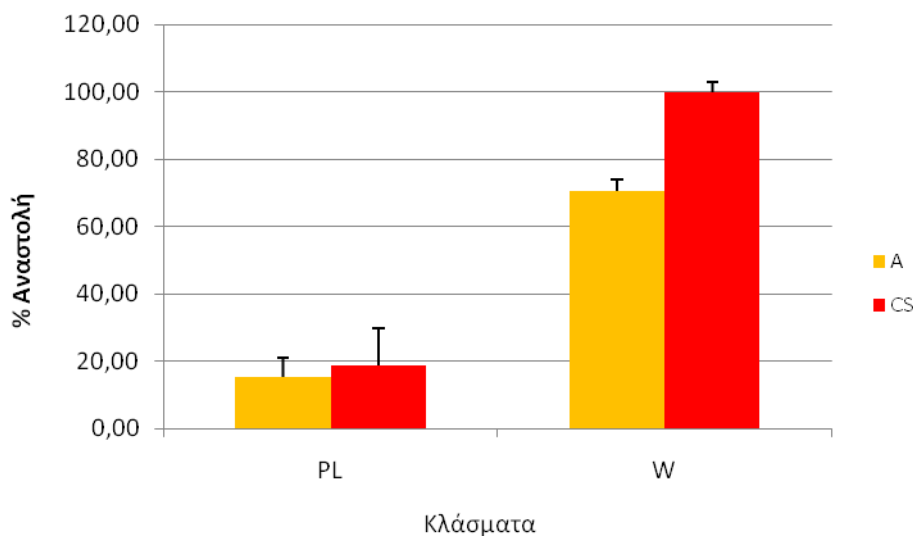
Πίνακας 6.22: Ποσοστό (%) αναστολής της δράσης της PAF AH από τη επίδραση των εκχυλισμάτων κρασιού

Κλάσμα	Συγκέντρωση mg/mL	% αναστολή της PAF AH	
		CS	A
PL	0,85	18,61	15,21
W	0,85	100,00	70,71
FI	0,85	71,84	14,27
FII	0,85	99,72	33,52
FIII	0,85	54,26	14,17
FIV	0,85	22,22	12,79

Για τα κλάσματα FIV CS, FIV A, A W και CS W δοκιμάστηκε και η συγκέντρωση 0,27 mM/mL και βρέθηκαν οι αντίστοιχες αναστολές: 56,37 , 13,36 , 19,71 , 45,46 %.

Οι τιμές του πίνακα 6.22 παρουσιάζονται και στα συγκριτικά γραφήματα των σχημάτων 6.20 και 6.21.



Σχήμα 6.20: Γράφημα: % αναστολή της δράσης της PAF AH από τα κλάσματα FI-FIV**Σχήμα 6.21:** Γράφημα: % αναστολή της δράσης της PAF AH από τα κλάσματα PL και W

Από την παρατήρηση του πίνακα 6.22 καθώς και των σχημάτων 6.20 και 6.21, προκύπτει πως τα κλάσματα του κόκκινου κρασιού, είναι, στο σύνολό τους, πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της δραστηριότητας της PAF AH σε σχέση με τους αντίστοιχους του λευκού.

Επίσης, και για τα δύο κρασιά, τα κλάσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση με την μέθοδο 2 κατατάσσονται με αύξουσα σειρά ως προς την ικανότητα αναστολής του ενζύμου ως εξής: FIV, FIII, FI, FII. Αξιοσημείωτο είναι πως το υδατικό κλάσμα του κόκκινου κρασιού προκαλεί πλήρη αναστολή της δράσης της PAF AH.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των PL και των δύο κρασιών στην δράση της PAF AH από ομογενοποίηση U937 μονοκυττάρων. Κανένα από τα δύο δεν προκάλεσε αναστολή του ενζύμου σε ποσότητα 0,85 mg/mL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις συνιστούν την σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας για τους πληθυσμούς του δυτικού κόσμου με κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις την εγκεφαλική συμφόρηση και την καρδιακή ανεπάρκεια. Οι εκδηλώσεις αυτές είναι το αποτέλεσμα μιας συστηματικής αγγειακής διαδικασίας, της αθηροσκλήρωσης.

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια εκφυλιστική πολυπαραγοντική νόσος. Η επικρατέστερη θεωρία για την ανάπτυξή της είναι αυτή που τη συνδέει με τη διαδικασία της φλεγμονής. Σύμφωνα με αυτή, η εκδήλωση των φλεγμονωδών διεργασιών λαμβάνουν χώρα στις αρτηρίες, ενώ μπορεί να ξεκινάει ακόμα και από την προεφηβική ηλικία και εξελίσσεται με το πέρασ του χρόνου, φτάνοντας να αποκτά κλινικά συμπτώματα, όπως η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και η δημιουργία τοιχωματικών ή αποφρακτικών θρόμβων στα προσβεβλημένα επικαρδιακά και άλλα αγγεία ⁸.

Σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στη εξέλιξη της αθηρογένεσης, σύμφωνα με τη θεωρία της φλεγμονής, παίζει ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), ένας λιποειδικός μεσολαβητής της φλεγμονώδους απόκρισης που ανήκει στην κατηγορία γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών. Ο κομβικός του ρόλος οφείλεται στο γεγονός ότι βιοσυντίθεται από διάφορους τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική διαδικασία καθώς και στο ότι οι πρωτεϊνικής φύσεως υποδοχείς του εμφανίζονται στην επιφάνεια ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα φαγοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και άλλα ^{68, 79}. Κάποιες από τις βασικές δράσεις του είναι η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, η οξειδωση της LDL, η απελευθέρωση δραστικών μορίων οξυγόνου, καθώς και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η αύξηση των επιπέδων του PAF στο αίμα αποτελεί σημαντική ένδειξη της έναρξης της αθηρογένεσης. Έτσι, η ρύθμισή τους τόσο στο αίμα όσο και στους ιστούς, αποτελεί διαδικασία υψηλής σημασίας για την υγεία του οργανισμού. Τα επίπεδα του PAF καθορίζονται από τη σχετική δράση αφενός της λυσο PAF, που είναι το βασικό ένζυμο της remodeling πορείας βιοσύνθεσης, και της PAF CPT, που είναι το βασικό ένζυμο της εξ' υπαρχής πορείας βιοσύνθεσης, και αφετέρου, από το αποικοδομητικό

ένζυμο PAF AH.

Λόγω των μεγάλων ποσοστών θνησιμότητας που έχουν αποδοθεί στην αθηροσκλήρωση έχει ιδιαίτερη σημασία να προσδιοριστούν και να μελετηθούν οι αιτίες που την προκαλούν. Κάτι τέτοιο φαντάζει ιδιαίτερα δύσκολο μιας και ο χαρακτηρισμός της νόσου ως πολυπαραγοντική δεν αφήνει περιθώρια εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων ακόμα και άμα τη εξαντλήσει κάποιας εξ αυτών. Παρουσιάζει εντούτοις μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, η προσπάθεια να φωτιστούν σημεία των καθημερινών λειτουργιών του ανθρώπου που επιβαρύνουν ή αναστέλλουν την εξέλιξη της νόσου. Η διατροφή σαν μια τέτοια καθημερινή λειτουργία έχει δικαιολογημένα μπει στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας εδώ και πολλά χρόνια.

Ένας μεγάλος όγκος επιδημιολογικών μελετών που συνέκλινε στη διαπίστωση πως στις χώρες της νότιας Ευρώπης το ποσοστό καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με αυτό των υπόλοιπων ανεπτυγμένων χωρών, έχει στρέψει τα τελευταία χρόνια την προσοχή των ερευνητών στην μελέτη των συστατικών που συνιστούν την λεγόμενη Μεσογειακή Διατροφή ⁸⁰. Ο όρος Μεσογειακή Διατροφή δεν αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο διαιτολόγιο που υιοθετούν όλες οι χώρες της Μεσογείου, όσο σε ένα ευρύτερο διατροφικό πρότυπο με αρκετά κοινά συστατικά, όπως το ελαιόλαδο, τα δημητριακά, το σταφύλι και τα παράγωγά τους και σε κάποιες κοινές διατροφικές συνήθειες όπως η συχνή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, η μέτρια κατανάλωση ψαριού και γαλακτοκομικών και η χαμηλή κατανάλωση κρέατος και κορεσμένου λίπους.

Μελετώντας τα παραπάνω τρόφιμα σε επίπεδο μικροσυστατικών παρατηρείται αφενός μειωμένη παρουσία κορεσμένων και *trans*-λιπαρών και, αφετέρου, έντονη παρουσία υδατανθράκων, βιταμινών, διαιτητικών ινών, πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης και φαινολικών ενώσεων. Αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής δίαιτας είναι και το κρασί το οποίο είναι πλούσιο σε βιοενεργά μικροσυστατικά, όπως βιταμίνες αζωτούχες ενώσεις ανόργανα συστατικά, λιποειδή και φαινολικές ενώσεις, στα οποία έχει αποδοθεί μεγάλο μέρος των ευεργετικών του επιδράσεων. Έχουν εντοπιστεί πάνω από 200 φαινολικές ενώσεις, οι κυριότερες των οποίων είναι τα φλαβονοειδή (κερκετίνη), τα στυλβένια (ρεσβερατρόλη) και τα φαινολικά οξέα (γαλλικό οξύ). Οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ^{113, 114}, αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις ^{118, 119} ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, περιορίζουν την οξείδωση της LDL, δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής NO από το ενδοθήλιο, επιδρούν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, μειώνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη σύνθεση προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών παραγόντων, ενώ αναστέλλουν τη δράση διάφορων συσσωρευτικών παραγόντων, όπως το ADP, ο PAF και η θρομβίνη.

Το ενδιαφέρον της έρευνας επικεντρώθηκε στο κρασί και στα συστατικά του από τη

στιγμή που διατυπώθηκε το γαλλικό παράδοξο, σύμφωνα με το οποίο, οι κάτοικοι της νότιας Γαλλίας εμφανίζουν μικρά ποσοστά στεφανιαίας καρδιακής νόσου παρά την αυξημένη κατά κεφαλήν κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε κορεσμένα λιπαρά ⁹⁶. Μεταγενέστερες έρευνες απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στο μόνο χαρακτηριστικό της Μεσογειακής Δίαιτας που υιοθετούν στο διαιτολόγιό τους οι Γάλλοι, την καθημερινή κατανάλωση μέτριας ποσότητας κρασιού ^{100, 101}.

Προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει την ύπαρξη βιοδραστικών συστατικών στο κρασί με ικανότητα αναστολής της προκαλούμενης από PAF-συσσώρευσης αιμοπεταλίων ^{125-128, 131}, ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και αναστολής της λιποξυγονάσης ¹¹¹, ενός ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις καταστάσεις.

Παρόλα αυτά, τα δεδομένα για την επίδραση εκχυλισμάτων κρασιού στον μεταβολισμό του PAF είναι αρκετά περιορισμένα. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων εκχυλισμάτων κρασιού καθώς και των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράση και CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση, και στο αποικοδομητικό ένζυμο PAF ακετυλοϋδρολάσης.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη κρασιών, το κόκκινο Cabernet Sauvignon, κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon, και το λευκό Ambelon, κύρια ποικιλία Ρομπόλα. Τα συγκεκριμένα κρασιά, σε προηγούμενες έρευνες έδειξαν την καλύτερη δράση ανάμεσα σε άλλα είδη κόκκινου και λευκού κρασιού έναντι της προκαλούμενης από PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ^{94, 131}.

Για την παραλαβή διαφορετικών εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν δυο διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης. Ο πρώτος τρόπος, η εκχύλιση Bligh-Dyer, σκοπό είχε την παραλαβή των ολικών λιποειδών (TL), τα οποία στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε πολικά (PL) και ουδέτερα (NL). Επιπλέον από αυτό τον τρόπο εκχύλισης προέκυψε και ένα υδατικό κλάσμα (W). Με τον δεύτερο έγιναν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα και παρελήφθησαν τα διαφορετικής τάξεως φαινολικά κλάσματα των ανθοκυανινών (FI), των προκυανιδινών, κατεχινών, επικατεχινών και φλαβονολών (FII), των φαινολικών οξέων και των παραγώγων της κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ (FIII) και των συστατικών που δεν κατανεμήθηκαν στις προηγούμενες φάσεις (FIV).

Για την ανίχνευση της δραστηριότητας των βιοσυνθετικών ενζύμων λυσο-PAF AT και PAF CPT μέσω του προσδιορισμού του παραγόμενου PAF, οι υπό μελέτη πρότυπες φαινολικές ενώσεις καθώς και τα εκχυλίσματα είτε προστέθηκαν στο ομογενοποίημα των κυττάρων U937 (σύστημα ελεύθερο κυττάρων) είτε επώαστηκαν με την καλλιέργεια (σύστημα ακέραιων κυττάρων).

7.1 Επίδραση στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των φαινολικών ενώσεων και των εκχυλισμάτων των δύο κρασιών στα ένζυμα του μεταβολισμού του PAF πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας ως πηγή των ενζύμων ομογενοποίημα μονοκυττάρων U937 παρουσία ή απουσία των ενώσεων/εκχυλισμάτων (σύστημα ελεύθερο κυττάρων).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη παρουσιάζουν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα στη δράση της λυσο-PAF-AT έχοντας $IC_{50}=0.17$ και $0.19 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα. Δεδομένα για την επίδραση της ρεσβερατρόλης στην δράση της λυσο-PAF-AT δεν υπάρχουν στην βιβλιογραφία. Όσον αφορά την κερκετίνη υπάρχει μια μελέτη των R. Yanoshita και των συνεργατών του¹³⁴, στην οποία το IC_{50} της κερκετίνης βρέθηκε ότι είναι $80\mu\text{M}$. Το γεγονός ότι η τιμή αυτή είναι μικρότερη συγκρινόμενη με αυτή της παρούσας μελέτης ($566 \mu\text{M}$) μπορεί να αποδοθεί αφενός στο διαφορετικό είδος κυττάρων που χρησιμοποιεί ως πηγή ενζύμου (RBL-2H3) και αφετέρου στον διαφορετικό τρόπο προσδιορισμού της δραστηριότητας (χρήση ραδιενεργού υποστρώματος). Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη τα κύτταρα έχουν ενεργοποιηθεί με τον φλεγμονώδη παράγοντα VGEF οπότε μπορεί το ένζυμο, το οποίο έχει δηλωθεί ότι είναι διλειτουργικό⁶¹ να βρίσκεται σε διαφορετική διαμόρφωση.

Τα πολικά λιποειδή του λευκού κρασιού και του κόκκινου κρασιού εμφάνισαν παρόμοια ικανότητα αναστολής της λυσο-PAF AT, μιας και έχουν IC_{50} ίσο με $1,13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ και $1,17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι τα εκχυλίσματα αποτελούν μείγματα διαφόρων ενώσεων. Ενώ τα πολικά λιποειδή των δύο κρασιών δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη δράση τους, τα αντίστοιχα υδατικά κλάσματα διαφοροποιούνται εξ ολοκλήρου. Το W του Cabernet Sauvignon είναι ισχυρός αναστολέας της λυσο-PAF AT με τιμή IC_{50} μικρότερη των $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, το αντίστοιχο του Ambelon επηρεάζει ελάχιστα το ένζυμο. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη δράση των φαινολικών συστατικών μιας και το υδατικό κλάσμα του κόκκινου κρασιού έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά έναντι του λευκού ($7,19 \%$ και $1,06 \%$ αντίστοιχα) καθώς και σε όρθο-φαινολικά ($1,57 \%$ και $0,45 \%$). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί, πως το υδατικό κλάσμα του κόκκινου κρασιού είναι πολύ καλύτερος αναστολέας του ενζύμου συγκρινόμενο με το αντίστοιχο κλάσμα των πολικών λιποειδών γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό σε σάκχαρα που εμφανίζει το W σε σχέση με τα PL ($22,41$ έναντι $3,47 \%$ w/w).

Όσον αφορά τα κλάσματα που προέκυψαν από τον δεύτερο τρόπο εκχύλισης τα κλάσματα FII, FIII και FIV του λευκού κρασιού παρουσιάζουν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα με IC_{50} περίπου ίσο με $0,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Το κλάσμα των ανθοκυανινών (FI) έδειξε την μικρότερη ανασταλτική ικανότητα του ενζύμου με IC_{50} $3,36 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Σχετικά με τα τέσσερα κλάσματα που προέκυψαν από το κόκκινο κρασί τα FI, FII και FIII εμφανίζουν ισχυρότατη

αναστολή της δράσης του ενζύμου αγγίζοντας στην περίπτωση του FII το 100% ήδη από την χαμηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε, την 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Για το λόγο αυτό δεν κατέσται δυνατός ο υπολογισμός του IC_{50} . Αντίθετα για το κλάσμα FIV υπολογίστηκε το IC_{50} και βρέθηκε ίσο με 0,109 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Αυτό υποδεικνύει πως το συγκεκριμένο κλάσμα έχει μεν μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα σε σχέση με τα κλάσματα του λευκού κρασιού, αποτελεί όμως τον λιγότερο ικανό αναστολέα σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα του κόκκινου κρασιού. Εξήγηση στο φαινόμενο αυτό όσο και στην ισχυρή ανασταλτική δράση του FII, μπορεί να δοθεί παρατηρώντας του χημικούς προσδιορισμούς στους οποίους το FIV κλάσμα έχει το μικρότερο ποσοστό (1,95 % w/w) και το FII το μεγαλύτερο (25,2 % w/w) σε ολικά φαινολικά συστατικά σε σχέση με αυτά των FI, και FIII (9,4 και 9,7 % w/w αντίστοιχα). Παράλληλα, το FIV παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό σε σάκχαρα (12,9 % w/w έναντι 7,2 , 6,32 , 5,7 % w/w των FI, FII, FIII αντίστοιχα). Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί πως και τα τέσσερα κλάσματα αυτού του τρόπου εκχύλισης, αναδεικνύονται σε καλύτερους αναστολείς της λυσο-PAF AT από τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις. Το ίδιο ισχύει συγκρίνοντάς τα με τα αντίστοιχα του λευκού κρασιού.

Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα αυτά με τις πρότυπες ενώσεις, παρατηρούμε πως τόσο η κερκετίνη όσο και η ρεσβερατρόλη έχουν μικρότερο IC_{50} και κατά συνέπεια είναι καλύτεροι αναστολείς του ενζύμου με εξαίρεση τα φαινολικά εκχυλίσματα του κόκκινου κρασιού. Πιθανή ερμηνεία του φαινομένου αυτού είναι ότι τα εκχυλίσματα αποτελούν μείγματα ενός μεγάλου αριθμού συστατικών, η δράση των οποίων μπορεί να είναι είτε ανασταλτική είτε προωθητική στη δράση του ενζύμου.

Όσον αφορά την επίδραση των ενώσεων στο ένζυμο PAF CPT στο σύστημα ελεύθερο κυττάρων, παρατηρείται αναστολή της δράσης το ενζύμου από την ρεσβερατρόλη και την κερκετίνη, των οποίων το IC_{50} είναι 22,6 και 95,74 μM αντίστοιχα. Φαίνεται επομένως ότι η ρεσβερατρόλη είναι πιο ισχυρός αναστολέας της PAF-CPT σε σύγκριση με την κερκετίνη.

Τα κλάσματα των πολικών λιποειδών και των δύο κρασιών είναι αναστολείς της δράσης της PAF CPT. Ειδικότερα τα PL του λευκού είναι πολύ καλύτεροι αναστολείς του ενζύμου σε σχέση με αυτά του κόκκινου μιας και εμφανίζουν μικρότερο IC_{50} (0,876 έναντι 2,302 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των PL του λευκού σε σχέση με αυτά του κόκκινου τόσο σε όρθο-φαινολικά συστατικά (5,85 έναντι 1,78 % w/w) όσο και σε οργανικό φώσφορο (0,104 έναντι 0,012 % w/w). Το γεγονός όμως ότι τα PL και των δύο παρουσιάζουν μεγαλύτερο IC_{50} από τις πρότυπες ενώσεις μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα κλάσματα αυτά είναι μείγματα δραστικών και μη δραστικών συστατικών.

Επιπλέον, με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση των ενώσεων στην δράση της λυσο-PAF AT επώαστηκαν τα μονοκύτταρα παρουσία και απουσία των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ή των εκχυλισμάτων των δυο κρασιών. Και σε αυτή την περίπτωση βρέθηκε πως η

ανασταλτική ικανότητα των πρότυπων ενώσεων είναι παρόμοια, μιας και το IC₅₀ της ρεσβερατρόλης ήταν 94,01 μM και αυτό της κερκετίνης 81,91 μM . Ο Balestrieri και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από VEGF δράση της ακετυλοτρανσφεράσης σε κύτταρα kaposi's sarcoma και βρήκαν ότι συγκέντρωση 25 μM ¹³⁵ αναστέλλει το ένζυμο σε ποσοστό σχεδόν 100%. Η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ χαμηλότερη από το IC₅₀ που προέκυψε στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο στη συγκεκριμένη δημοσίευση υπήρχε διαφορά στη μέθοδο που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας, καθώς και στο είδος των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή ενζύμου.

Για τα πολικά λιποειδή του λευκού δεν προσδιορίστηκε η τιμή του IC₅₀. Στις μικρές συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν η αναστολή ήταν δοσοεξαρτώμενη αλλά παρέμενε σε χαμηλά επίπεδα. Τα πολικά του κόκκινου έδειξαν αναστολή του ενζύμου με IC₅₀ ίσο με 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, η οποία όμως είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις.

Οι πρότυπες φαινολικές ενώσεις με IC₅₀ της τάξης των $\text{ng}/\mu\text{L}$ αναδεικνύονται σε πολύ ισχυρούς αναστολείς της PAF CPT κατά την επώασή τους στην καλλιέργεια των U937, με την κερκετίνη να υπερέχει, με σχεδόν υποδιπλάσια τιμή, της ρεσβερατρόλης (0,047 και 0,091 $\text{ng}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα). Όπως και στην περίπτωση του συστήματος ελεύθερου κυττάρων τα πολικά λιποειδή και των δύο δειγμάτων αναστέλλουν τη δράση της PAF CPT. Και εδώ, τα PL του Ambelon είναι πιο ισχυροί αναστολείς σε σύγκριση με αυτά του Cabernet Sauvignon. Αν και το IC₅₀ των PL του Cabernet Sauvignon δεν προσδιορίστηκε από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, η δράση του ήταν δοσοεξαρτώμενη.

Η επώαση, των U937 με τα υπό μελέτη συστατικά, τόσο των πρότυπων φαινολικών ενώσεων όσο και των πολικών λιποειδών, έδειξε μεγαλύτερη αναστολή της δράσης της PAF CPT από αυτή που βρέθηκε στο σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Η τελευταία παρατήρηση λειτουργεί συμπληρωματικά στην γενικότερη διαπίστωση πως στην παρούσα μελέτη, η επώαση των αναστολέων με τα κύτταρα προκαλεί μεγαλύτερη αναστολή στην δράση και των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF σε σχέση με την αναστολή που παρατηρείται στο σύστημα ελεύθερο κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται, στο ότι οι τα συστατικά του κρασιού που εξετάστηκαν δεν είναι τόσο δραστικά στην άμεση αναστολή των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων (σύστημα ελεύθερο κυττάρων), όσο στο να επιδρούν στην μεταγωγή σήματος (επώαση) η οποία οδηγεί στην απενεργοποίησή των ενζύμων.

7.2 Επίδραση στο αποικοδομητικό ένζυμο του PAF

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των PL και των δυο κρασιών στη δράση της ανασυνδιασμένης PAF-AH δεν φάνηκε σημαντική αναστολή του ενζύμου σε 0.85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μεγάλη αναστολή της PAF AH από το υδατικό

κλάσμα και του κόκκινου (100 %) και του λευκού (70,71 %), σε ποσότητα 0,85 mg/mL.

Ανάλογη δράση παρουσίασαν και τα πρότυπα φαινολικά όπου ακόμα και σε μεγάλες ποσότητες δεν παρουσίασαν σημαντική δράση.

Όσον αφορά, τέλος, τις διάφορες τάξεις φαινολικών που προέκυψαν με τη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης, τα κλάσματα του κόκκινου κρασιού έδειξαν πιο ισχυρή δράση στην αναστολή της ανασυνδιασμένης PAF AH σε σχέση με αυτά του λευκού.

Επιπλέον, όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή του ενζύμου ομογενοποίηση μονοκυττάρων U937 δεν παρατηρήθηκε αναστολή του από τα πολικά λιποειδή και των δυο κρασιών.

7.3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη φάνηκε ότι και τα δυο κρασιά περιέχουν ενώσεις που αναστέλλουν άμεσα ή έμμεσα τη δράση των ενζύμων μεταβολισμού του PAF.

Πιο συγκεκριμένα η μελέτη της επίδρασης των συστατικών του κρασιού σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη εμφανίζουν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα στην λυσο-PAF AT και ότι η ρεσβερατρόλη είναι ισχυρότερος αναστολέας της PAF CPT σε σχέση με την κερκετίνη. Τα πολικά λιποειδή τόσο του λευκού όσο και του κόκκινου κρασιού αναστέλλουν σημαντικά την δράση των δυο βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF. Τα PL του λευκού κρασιού είναι καλύτεροι αναστολείς της δράση της PAF CPT σε σχέση με αυτά του κόκκινου κρασιού. Τα πολικά λιποειδή και των δυο κρασιών αναστέλλουν σε μικρό βαθμό την δράση του αποικοδομητικού ενζύμου PAF-AH. Οι διάφορες τάξεις φαινολικών ενώσεων του κόκκινου κρασιού είναι καλύτεροι αναστολείς τόσο της λυσο-PAF AT όσο και της PAF-AH σε σχέση με τα αντίστοιχα κλάσματα του λευκού κρασιού.

Αξίζει να αναφερθεί ότι τόσο οι πρότυπες φαινολικές ενώσεις όσο και τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχουν τα δύο κρασιά εμφάνισαν καλύτερη ανασταλτική δράση σε συστήματα ακέραιων κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι τα συστατικά του κρασιού αναστέλλουν σε μικρότερο βαθμό άμεσα τα ένζυμα, ενώ είναι πιο δραστικά στην έμμεση απενεργοποίηση των ενζύμων, επηρεάζοντας κάποιο παράγοντα στην μεταγωγή σήματος που ευθύνεται για την απενεργοποίησή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vander, MD. Sherman, PhD, Luciana, PhD Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού, (Μετάφραση: Τσακόπουλος Μ, Γελαδάς Ν), 8η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 2001.
2. Τσελέπης Α.Δ., Τσουκάτος Δ.Κ. Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα 1997
3. Cotran R. S., Kumar V., Collins T., Robbins S.L., Pathologic Basis of Disease, Philadelphia: W.B Saunders Company, 1998.
4. Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L., Pathologic basis of disease. WB Saunders Company, Philadelphia , 51-92. 1994.
5. Mathur N., Pedersen B. K., Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation. Mediators of Inflammation Volume 2008, 2008:109502.
6. Russel R., Atherosclerosis - An Inflammatory disease. The New England Journal of Medicine, 1999, 340: 115 – 126.
7. Διονυσίου-Αστερίδου Α. Γ. Αθηροσκλήρυνση, Βιοχημική Προσέγγιση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχλίδης, 1997
8. Κρεμαστινός Θ. Δημήτριος Καρδιολογία, Επίτομη Κλινική Καρδιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασζαλίδης, 2005.
9. Pugsleya M. K., Tabrizchib R., The vascular system, An overview of structure and function, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 44, 2000.
10. Laroia S., Ganti A.K., Laroia A., Tenduliar K. K., Endothelium and the lipid metabolism :the current understanding. Int J Cardiol, 2003, 88: 1 – 9.
11. Packard R. R. S., Libby P., Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. Clinical Chemistry, 2008, 54: 24 – 38.
12. Toth P. P., Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about

- it. *Int J Clin Pract*, 2008, 62:1246 – 1254.
13. Harrison D. G., Cai H., Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production, *Cardiol Clin*, 2003, 21(3): 289-302.
14. Esper R. J., Vilarino J. O., et al., Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism, *Adv Cardiol*, 2008, 45: 17-43.
15. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 90s., *Nature*, 1993, 362:801-9.
16. Chyu K. Y., Shah P. K., The role of inflammation in plaque disruption and thrombosis, *Rev Cardiovasc Med*, 2001, 2, 82-91.
17. Göran K. Hansson, M.D., Ph.D., review article, mechanisms of disease, Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease, *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
18. Kadar A., Glasz T., Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovascular surgery* 2001, 9:109-21.
19. Xing L, Remick DG. Relative cytokine and cytokine inhibitor production by mononuclear cells and neutrophils. *Shock*. 2003;20:10-6.
20. Böcker, Denk, Heitz, Παθολογική Ανατομική, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 2007.
21. Ιωαννίδου-Παπαγιαννάκη Ε, Λευκός Ν, Κλωνιζάκης Ι, Πουμπουρίδου Ε, Μπουντώνας Γ, Ευθυμιάδης Α, Τσάπας Γ., Παράγοντες φλεγμονής στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ο ρόλος των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, *Καρδιολογία* 1998;1:1-20.
22. Osterud B. A global view on the role of monocytes and platelets in atherogenesis. *Thromb Res*, 1997;85:1-22.
23. Barbaro J. F., Zvaifler N. J., Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody, *Proc. Soc. Exp. Biol Med*, 1966, 122, 1245-1247.
24. Benveniste J., Camussi J., Mencia-Huerta J.M., Polonsky J., Isolation and partial characterization of (PAF) platelet-activating-factor, *Ann. Immunol.*, 1977, 128, 259-260.
25. Demopoulos C. A., Pinckard R. N., Hanahan D. J., Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators), *J Biol Chem*, 1979, 254, 9355-9358.
26. Blank M. L., Snyder F., Byers L. W., Brooks B., Muirhead E. E., Antihypertensive activity

- of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine., *Biochem Biophys. Res Commun.*, 1979, 29;90(4):1194-200.
27. Hanahan D. J., Demopoulos C. A., Liehr J., Pinckard R. N., Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine, *J Biol Chem*, 1980, 255, 5514-5516.
28. Venable M. E, Zimmerman G. A, McIntyre T. M., Prescott S. M., Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* 1993;34:691-702.
29. Antonopoulou S., Demopoulos C.A., Argyropoulos D., Balltas G., Kotsifaki H., Diamanti-Kipioti A., *Biochem. J.*, 1998, 330 (Pt 2), 791-794.
30. Cooney S. J., Small M. A., Baldo B. A. *Lipids*, 1991, 26, 1140-1143.
31. Sobhani I., Denizot Y., Vissuzaine C., Vatie J., Benveniste J., Lewin M.J., Mignon M., *Dig. Dis. Sci.*, 1992, 37, 1583-1592.
32. Billah M. M., Johnston J.M., Identification of phospholipid platelet-activating factor (1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in human amniotic fluid and urine. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1983, 31;113(1):51-8.
33. Nomikos T., Fragopoulou E., Antonopoulou S., *Food Ingredients and Lipid Mediators. Current Nutrition & Food Science*, 2007, 3: 255 - 276.
34. Wykle R. L., Blank M. L., Malone B., Snyder F., Evidence for a mixed function oxidase in the biosynthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine, *J Biol Chem*, 1972, 247, 5442-5447.
35. La Belle E. F., Jr., Hajra A. K., Biosynthesis of acyl dihydroxyacetone phosphate in subcellular fractions of rat liver, *J Biol Chem*, 1972, 247, 5835-5841.
36. Chae K., Piantadosi C., Snyder F., An alternate enzymic route for the synthesis of the alkyl analog of phosphatidic acid involving alkylglycerol, *Biochem Biophys. Res Commun.*, 1973, 51, 119-124.
37. Hajra A. K., Acyl dihydroxyacetone phosphate: precursor of alkyl ethers, *Biochem Biophys. Res Commun.*, 1970, 39, 1037-1044.
38. Φραγκοπούλου Ε. Μελέτη του μεταβολισμού και της δράσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό και νεφρικά κύτταρα. Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα 2004.
39. Snyder F, Metabolism of platelet activating factor and related ether lipids: enzymatic

- pathways, subcellular sites, regulation, and membrane processing, *Prog Clin Biol Res.* 1988, 282, 57-72.
40. Detopoulou P., Nomikos T., Frangopoulou E., Antonopoulou S., Kotroyiannis I., Vassiliadou C., Panagiotakos DB., Chrysohoou C., Pitsavos C., Stefanadis C., Platelet activating factor (PAF) and activity of its biosynthetic and catabolic enzymes in blood and leukocytes of male patients with newly diagnosed heart failure, *Clin Biochem*, 2009, 42, 44-9.
41. Snyder F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 1990, 259:C697-708.
42. Lee, T.C., Uemura, Y., and Snyder, F. A novel CoA-independent transacetylase produces the ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of platelet-activating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells., *J. Biol. Chem*, 1992, 267(28).
43. Ninio E., Breton M., Bidault J., Colard O., Biosynthesis of paf-acether. XVII. Regulation by the CoA-independent transacylase in human neutrophils. *FEBS*, 1991, 289(2), 138.
44. Snyder F., Lee T. C., Blank M. L., The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. *Prog. Lipid Res.*, 1992, 31, 65.
45. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* 1980, 255:10256-60.
46. Snyder F., Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes, *Biochem J*, 1995, 305 (Pt 3), 689-705.
47. Bussolino F., Pescarmona G., Camussi G., Gremo F., Acetylcholine and dopamine promote the production of platelet activating factor in immature cells of chick embryonic retina, *J Neurochem.*, 1988, 51, 1755-1759.
48. Snyder F., CDP-choline: alkylacetyl glycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet-activating factor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1348, 111.
49. Tsoupras A. B, Fragopoulou E., Nomikos T., Iatrou C, Antonopoulou S., Demopoulos C. A., Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells. *Mediators Inflamm.*, 2007, 27683.
50. Heller R., Bussolino F., Ghigo D., Garbarino G., Pescarmona G., Till U., Stimulation of

- platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells by activation of the de novo pathway. Phorbol 12-myristate 13-acetate activates 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate:Acetyl-CoA acetyltransferase and dithiothreitol-insensitive 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol:CDP-choline cholinephosphotransferase. *J Biol Chem* 1991, 266:21358–61.
51. Ribbes G., Ninio E., Fontan P., Record M., Chap H., Benveniste J., Douste-Blazy L., Evidence that biosynthesis of platelet-activating factor (paf-acether) by human neutrophils occurs in an intracellular membrane, *FEBS Lett.*, 1985, 191, 195-199.
52. Mollinedo F., Gomez-Cambronero J., Cano E., Sanchez-Crespo M., Intracellular localization of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 154:1232-9.
53. Nomikos T. N., Iatrou C., Demopoulos C. A., Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue. *Eur J Biochem* 2003, 270:2992-3000.
54. Holland M. R., Venable M. E., Whatley R. E., Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Prescott S.M., Activation of the acetyl-coenzyme A:lysoplatelet-activating factor acetyltransferase regulates platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells, *J Biol Chem*, 1992, 267, 22883-22890.
55. Lenihan D. J., Lee T. C., Regulation of platelet activating factor synthesis: modulation of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase by phosphorylation and dephosphorylation in rat spleen microsomes, *Biochem Biophys. Res Commun.*, 1984, 120, 834- 839.
56. Ninio E., Joly F., Hieblot C., Bessou G., Mencia-Huerta J. M., Benveniste J., Biosynthesis of paf-acether. IX. Role for a phosphorylation-dependent activation of acetyltransferase in antigen-stimulated mouse mast cells, *J Immunol.*, 1987, 139, 154-160.
57. Heller R., Bussolino F., Ghigo D., et al. Protein kinase C and cyclic AMP modulate thrombin-induced platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1093:55-64.
58. Nieto M. L., Velasco S., Sanchez Crespo M., Modulation of acetyl-CoA:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1988, 263:4607-11.
59. Domenech C., Machado-De Domenech E., Soling H. D., Regulation of acetyl-CoA:1-

- alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine O²-acetyltransferase (lyso-PAF-acetyltransferase) in exocrine glands. Evidence for an activation via phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1987, 262:5671-6.
60. Nixon A. B., O'Flaherty J. T., Salyer J. K., Wykle R. L., Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase. *J Biol Chem* 1999, 274:5469-73.
61. Harayama T., Shindou H., Ogasawara R., Suwabe A., Shimizu T., Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 2008, 283:11097-106.
62. Stafforini D. M., McIntyre T. M., Zimmerman G. A., Prescott S. M., Platelet-activating factor acetylhydrolases, *J Biol Chem*, 1997, 272, 17895-17898.
63. Braquet P., Touqui L., Shen T.Y., Vargaftig B. B., *Pharmacol. Rev.* 1987, 39, 97-145.
64. Tselepis A. D., John C. M., Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein- associated phospholipase A₂, platelet activating factor-acetylhydrolase, *Atheroscler. Suppl*, 2002, 3, 57.
65. Farr R. S., Wardlow M. L., Cox C. P., Meng K. E., Greene D. E., Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor, *Fed. Proc.*, 1983, 42, 3120-3122.
66. Blank M. L., Cress E. A., Whittle T., Snyder F., In vivo metabolism of a new class of biologically active phospholipids: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a platelet activating-hypotensive phospholipid, *Life Sci.*, 1981, 29, 769-775.
67. Blencowe C., Hermetter A., Kostner G. M., Digner H. P., Enhanced association of platelet-activating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein, *J Biol Chem*, 1995, 270, 31151-31157.
68. Tselepis A. D., Karabina S. A., Stengel D., Piedagnel R., Chapman M. J., Ninio E., N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL, *J Lipid Res*, 2001, 42, 1645-1654.
69. Karasawa K., Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(11):1359-72.
70. Blank M. L., Snyder F. J., *J. Chromatogr.* 1983, 273, 415.
71. Koltai M., Hosford D., Guinot P., Esanu A., Braquet P., PAF - A review of its effects

- antagonists and possible future clinical implications – (Part I). *Drugs*, 1991, 42, 9-29.
72. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P. PAF, a review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part II). *Drugs*, 1991, 42, 174- 204.
73. Lane J. S, Todd K. E, Gloor B., et al. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001, 99:365-70.
74. Hayashi J., Hiromura K., Koizumi R., et al. Platelet-activating factor antagonist, SM-12502, attenuates experimental glomerular thrombosis in rats. *Nephron* 2001, 87:274-8.
75. Demopoulos C. A., Karantonis H. C., Antonopoulou S., Platelet activating factor-a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 150, 705.
76. Stafforini D. M., McIntyre T. M., Zimmerman G. A., Prescott S. M., 1:Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci.*2003, 40:643-72.
77. Ninio E., Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005, 8:123-31.
78. Μπαμπινιώτης Γ., Λεξικό της νέας ελληνικής Γλώσσας, Κέντρο λεξικολογίας, 1998
79. Βουδούρη Ε.Κ., Κοντομηνάς Μ.Γ., Εισαγωγή στην χημεία των τροίμων, Ο.Ε.Δ.Β., 1992
80. Keys A., Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970, 41: (suppl I)
81. Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D.M., Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention, *J Clin Lab Anal.* 1997, 11(5):287-313.
82. McDonald M., Hughes M., Burns J., Lean M., Crozier A., Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 1998, 46:368-375
83. Dyer R. H., Collaborative study of a gas liquid chromatographic method for the determination of methanol in alcoholic beverages. *J. AssoC. Off Anal. Chem.*, 1972, v. 55 : 564-565.
84. Guymon J. F., Heitz J. E., The fusel oil content of California wines. *Food Technology.* 1952, 6: 359-362.
85. Mc Murryc J., Οργανική Χημεία, Τόμος 2, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2002.
86. Τσακίρη Ν. Α., Οινολογία. Από το σταφύλι στο κρασί, Εκδ. Ψύχαλου, 1998.

87. Σουφλερός Ηρ. Ε., Οινολογία: επιστήμη και τεχνογνωσία, Θεσσαλονίκη, 1997.
88. Ross J. A., Kasum C. M., Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic effects and safety. *Annu. Rev. Nutr.*, 2002, Vol.22: 19-34.
89. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.*, 2004, Vol. 79: 727-747
90. Scalbert A., Johnson I., Saltmarsch M., Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81(suppl): 215S – 217S.
91. Ribéreau – Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Handbook of Enology*, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2000.
92. Κουράκου-Δραγώνα, Σ., Θέματα Οινολογίας, Εκδόσεις Τροχαλία, 1998.
93. Fragopoulou E., Nomikos T., Antonopoulou S., Mitsopoulou C., Demopoulos C. A. Separation of biologically active lipids from red wine. *J Agric Food Chem.* 2000, 48:1234-8.
94. Fragopoulou E., Antonopoulou S., Demopoulos C. A., Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must, *J.Agric.Food Chem*, 2002, 50, 2684.
95. Asplund K., Tuomilehto J., Kuulasmaa K., Torppa J., Multinational stroke mortality data at the baseline of the WHO MONICA project, 1989, Cerebral vascular disease 7: proceedings of the World Federation of Neurology 14th International Salzburg Conference. ICS858, pp. 167-170.
96. Renaud, De Lorgeril., Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
97. Kannel W. B., Wolf P. A., Verter J., McNamara P. M., Epidemiologic assessment of the role of blood pressure in stroke. The Framingham study. *JAMA* 1970, 214:301-10.
98. Fuchs F., Vascular effects of alcoholic beverages. Is it only alcohol that matters? *Hypertension*, 2005, 45: 851 – 852.
99. Gronbaek M., Deis A., Sorensen T., Becker U., Schnohr P., Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ*, 1995, 310: 1165 – 1169.
100. Klatsky A., Friedmann G., Armstrong M., Kipp H. Wine, liquor, beer and mortality. *Am J Epidemiol*, 2003, 158: 585 – 595.
101. Karatzi P., Papamichael C., Aznaouridis K., Karatzis E., Lekakis J., Matsouka C., Boskou

- G., Chiou A., Sitara M., Feliou G., Kontoyiannis P., Zampelas A., Mavrikakis M., Constituents of red wine other than alcohol improve function in patients with coronary artery disease, *Conor. Artery Dis*, 2004, 15(8):485-90.
102. Albert C., Manson J., Cook N., Ajani U., Gaziano J., Hennekens C., Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation*, 1999, 10: 944 – 950.
103. Gordova A., Jackson L., Berke – Schlessel D., Sumpio B., The cardiovascular protective effect of red wine. *Am Coll Surg*, 2005, 200(3): 428 – 439.
104. De Lorimier AA., Alcohol, wine and health. *Am J Surg* 2000, 180: 357–361.
105. Pitsavos C., Makrilakis K., Panagiotakos D. B., Chrysohoou C., Ioannidis I., The J-shape effect of alcohol intake on the risk of developing acute coronary syndromes in diabetic subjects: the CARDIO2000 II Study, *Diabetes UK. Diabetic Medicine*, , 2004, 22, 243–248.
106. Cirico T. L., Omaye S. T., Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem. Toxic.*, 2005, 44(4):510-6.
107. Morton L. W., Caccetta R. A., Puddey I. B., Croft K. D., Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds., *Clin. Exp. Pharmac. and Physiol.* 2000, 27:152.
108. Masella R., Vari R., D’Archivio M., et al., Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J. Nutr.* 2004, 134:785-91.
109. Berrougui H., Cloutier M., Isabelle M., Khalil A., Phenolic-extract from argan oil (*Argania Spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006, 184:389-96.
110. Fuhrman B., Arivam M., Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Cur. Opin. Lipid.* 2001, 12:41-8.
111. Xanthopoulou M. N., Fragopoulou E., Kalathara K., Nomikos T., Karantonis H. C., Antonopoulou S., Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chemistry*, 2010, 120, 665–672.
112. Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C., Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, Vol. 36 (No 7): 838-849.
113. Cao Z., Li Y., Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol

- p in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury.
- Eur J Pharmac.*
- , 2004, Vol. 489: 39-48
114. Lapidot T., Walker M. D., Kanner J., Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic β -Cells in Vitro, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7220-7225.
 115. Halliwell B., Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? , *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 476, 107–112.
 116. Rathel T., Samtleben R., Vollman A., Dirsch V., Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and vinification process. *J Hypertens.*, 2007, 25:541-9.
 117. Zern T. L., Fernandez M. L., Cardioprotective effect of dietary polyphenols. *J. Nutr.*, 2005, 135:2291-4.
 118. Dell’Agli M., Busciala A., Bosisio E., Vascular effects of wine polyphenols, *Cardiovascular Research*, 2004, 63:593-602.
 119. Stoclet J., Chataigneu T., Ndiaye M., Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004, 500:299-313.
 120. Pervaiz S., Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The FASEB J.*, 2003, 17(14):1975-85.
 121. Tsai S. H., Lin-Shiau S. Y., Lin. J. K., Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br. J. Pharmacol*, 1999, 126, 673-680.
 122. Wadsworth T.L., Koop D. R., Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.*, 1999, Vol. 57: 941-949.
 123. Mietus-Snyder M., Gowri M. S., Pitas R. E., Class A- Scavenger Receptor up regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation *J.Bio.Chem.*, 2000, 9;275(23):17661-70.
 124. Pace-Asciak C. R., Hahn S., Diamandis E. P., Soleas G., Goldberg D. M., The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 1995, 235(2), 207-219.

125. Orsini, F., Pelizzoni F., Verotta L., Aburjai T., Rogers C. B., Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-beta-D-glucopyranoside and related compounds. *J. Nat. Prod.*, 1997, 60, 1082-1087.
126. Zhirong W., Yuanzhu H., Jiangang Z., Kejiang C., Yinan X., Joseph M. W., Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro, *International Journal of Molecular Medecine*, 2002, 9: 77-79.
127. Alarcón de la Lastra C., Villegas I., Resveratrol as an anti- inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications , 405 *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 405 – 430.
128. Beretz A., Stierle A., Anton R., Cazenave J. P., Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31, 3597-3600.
129. Manjeet K. R., Ghosh B., Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. *Int. J. Immunopharmacol*, 1999, 21, 435–443.
130. Geraets L., Moonen H. J. J., Brauers K., Wouters E. F. M., Bast A., Hageman G. J., Dietary flavonoles are inhibitors of poly (ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J. Nutr.*, 2007, 137, 2190-2195.
131. Fragopoulou E., Nomikos T., Tsantila N. Mitropoulou A., Zabetakis I., Demopoulos C.A., Biological Activity of Total Lipids from Red and White Wine/Must, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5186-5193.
132. Lindahl M., Tagesson C., Selective inhibition of group II phospholipase A₂ by quercetine. *Inflammation*, 1993, 17 (5):573-582.
133. Gil B., Sanz M. J., Terncio M. C., et al., Effects of flavonoids on Naja naja and human recombinant synovial phospholipases A₂ and inflammatory responses in mice, *Life Sci.*, 1994, 54:L333-L338.
134. Yanoshita R., Chang H. W., Son K. H., Kudo I., Samejima Y., Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids. *Inflamm Res*, 1996, 45:546-9.
135. Balestrieri M. L., Castaldo D., Balestrieri C., Quagliuolo L., Giovane A., Servillo L., Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. *J Lipid Res*, 2003, 44:380-7.
136. Hartisch C., Kolodziej H., von Bruchhausen F., Dual inhibitory activities of tannins from

- Hamamelis virginiana and related polyphenols on 5-lipoxygenase and lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase. *Planta Med*, 1997, 63:106-10.
137. Bligh E., Dyer W., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*, 1959, 37:911-7.
138. Φραγκοπούλου Ε., Απομόνωση και in vitro μελέτη λιποειδών από οίνους και γλεύκη. Δομικές μελέτες των βιολογικά δραστικών κλασμάτων, Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, 2000.
139. Galanos D., Kapoulas V., Isolation of polar mixtures from triglyceride mixtures. *J Lipid Res.*, 1962, 3:134.
140. Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Scaccini C., Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine., *J Agric Food Chem.*, 1998, 46:361-7.
141. Arranz S., Cert R., Perez-Jimenez J., Cert A., Saura-Calixto F., Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*, 2008, 110:985-90.
142. Singleton V., Joseph A., Rossi J., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.*, 1965, 16:144-58.
143. Barlett G., Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem.*, 1959, 234:466-8.
144. Fisher H., Hansen R. G., Norton H. W., Quantitative Determination of Glucose and Galactose. *Analytical Chemistry*, 1955, 27 (5), 857-859.
145. Bradford M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72:248-54
146. Stephen M., Prescott M. D., Thomas M., McIntyre M. D., Guy A., Zimmerman M. D., Diana M., Stefforini M. D., *Japanese Circulation Journal*, 1996, 60 – 3: 137 – 141.
147. Prescott S. M., McIntyre T. M., Zimmerman G. A., Stafforini D. M., Inflammation as an early component of atherosclerosis and vascular damage- a role for P-selectin and platelet activating factor. *Jpn Circ J.*, 1996, 60:137-41.