



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

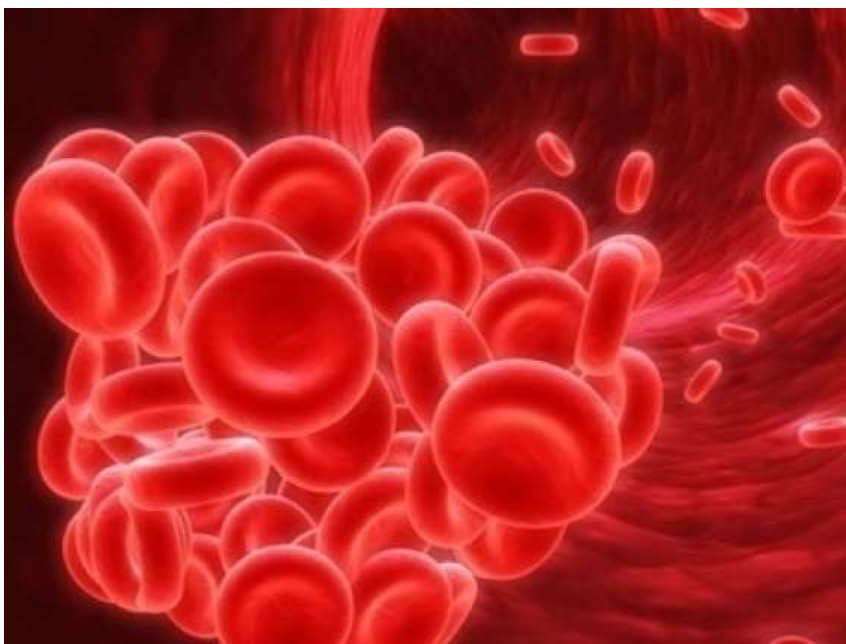
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**Επίδραση της χορήγησης συμπληρώματος διατροφής που περιέχει φυτικά
εκχυλίσματα σε δείκτες θρόμβωσης**

Διπλωματική Εργασία

Γκουγκουλιά Άννα



Αθήνα, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Καθηγήτρια Βιοχημείας (Επιβλέπουσα)

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας

Νομικός Τζώρτζης, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

Η Άννα Γκουγκουλιά δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Βιοχημείας Σμαραγδή Αντωνοπούλου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Ελισσάβετ Φραγκοπούλου για την συμπαράσταση, καθοδήγηση και τη συμβολή της στα ζητήματα που προέκυψαν κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Λαμπρινή Γαβριήλ για τη συμβολή της στο εργαστηριακό μέρος της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγο και τα παιδιά μου για τη στήριξή τους και την υπομονή τους κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ.....	14
1.1 Εισαγωγή	14
1.2 Μηχανισμοί της αιμόστασης.....	14
1.2.1 Αγγειοσύσπαση	14
1.2.2 Πρωτογενής αιμόσταση	15
1.2.3 Δευτερογενής αιμόσταση	17
1.3 Αναστολείς του μηχανισμού πήξης.....	21
1.4 Μηχανισμός ινωδόλυσης.....	22
1.5 Αναστολείς του ινωδολυτικού μηχανισμού	22
1.6 Αιμοπετάλια.....	23
1.6.1 Προσκόλληση των αιμοπεταλίων	24
1.6.2 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.....	24
1.6.3 Συσσώρευση αιμοπεταλίων.....	25
1.7 Δείκτες αξιολόγησης της αιμόστασης	26
1.7.1 Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)	26
1.7.2 Θρομβίνη.....	27
1.7.3 Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF).....	28
1.7.4 Αραχιδονικό οξύ	28
1.7.5 Κολλαγόνο	29
1.7.6 Ρ-σελεκτίνη	29
1.7.7 Παράγοντας von Willebrand (vWF)	30
1.7.8 Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1).....	30
1.7.9 Αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (VCAM-1).....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΩΣ Η ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ.....	32

2.1	Εισαγωγή	32
2.2	Ενεργειακό ισοζύγιο και παχυσαρκία	32
2.3	Μειωμένη πρόσληψη ενέργειας και απώλεια βάρους.....	33
2.4	Διαιτητικά λίπη και έλαια.....	33
2.5	Ψάρια	35
2.6	Βιταμίνη Κ.....	35
2.7	Βιταμίνη Ε	36
2.8	Βιταμίνη Β9	36
2.9	Μαγνήσιο.....	37
2.10	Σελήνιο.....	37
2.11	Αλκοόλ.....	38
2.12	Αλόη (aloe vera)	38
2.13	Πράσινο τσάι και κατεχίνες	39
2.14	Σοκολάτα και κακάο	39
2.15	Μέλι	40
2.16	Κρεμμύδι και σκόρδο.....	40
2.17	Κανέλα	41
2.18	Γιαούρτι	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ		42
3.1	Εισαγωγή	42
3.2	Ρεσβερατρόλη.....	42
3.3	Σταφύλι.....	43
3.4	Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού.....	43
3.5	Κακάο	44
3.6	Ανθοκυανίνες.....	45
3.7	Βιταμίνες Ε και C	46

3.8	Βιταμίνη D.....	49
3.9	Βιταμίνη B9	49
3.10	Βιταμίνη P.....	51
3.11	Σελήνιο.....	51
3.12	Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα.....	52
3.13	Συμπεράσματα	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ		56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ		57
5.1	Σχεδιασμός κλινικής μελέτης	57
5.1.1	Περιγραφή σχεδιασμού	57
5.1.2	Διατροφική σύσταση συμπληρώματος	58
5.1.3	Στρατολόγηση εθελοντών	58
5.2	Ανθρωπομετρία	59
5.3	Παραλαβή πλάσματος κιτρικών	59
5.4	Παραλαβή ορού	59
5.5	Βιοχημικές αναλύσεις σε βιολογικά δείγματα	59
5.6	Μέθοδος ELISA για προσδιορισμό sP-σελεκτίνης	60
5.7	Στατιστική επεξεργασία.....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		64
6.1	Χαρακτηριστικά πληθυσμού	64
6.2	Αιματολογικά χαρακτηριστικά πληθυσμού στην έναρξη της παρέμβασης	64
6.3	Βιοχημικά χαρακτηριστικά πληθυσμού στην έναρξη της παρέμβασης	65
6.4	Διατροφικές συνήθειες πληθυσμού στην έναρξη της παρέμβασης.....	66
6.5	Εκτίμηση της συσώρευσης αιμοπεταλίων έναντι του PAF και του ADP στην έναρξη της παρέμβασης	67
6.6	Επίπεδα της sP-σελεκτίνης στην έναρξη της παρέμβασης.....	67

6.7	Συσχέτιση sP-σελεκτίνης με ανθρωπομετρικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος	68
6.8	Συσχέτιση sP-σελεκτίνης με διατροφικές συνήθειες του δείγματος	68
6.9	Επίπεδα της sP-σελεκτίνης κατά τη διάρκεια της παρέμβασης	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ		71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		77

Περίληψη στα Ελληνικά

Η P-σελεκτίνη συμμετέχει στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και στο ενδοθήλιο και εικάζεται ότι είναι σημαντική τόσο στις αιμοστατικές όσο και στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Τα αυξημένα επίπεδα της P-σελεκτίνης είναι ένας δείκτης πρόγνωσης θρομβωτικών διαταραχών και μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβάντων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογήσει το αποτέλεσμα της κατανάλωσης ενός μίγματος βιταμινών και φυτικών εκχυλίσμάτων στην αντι-θρομβωτική άμυνα του οργανισμού φαινομενικά υγιών εθελοντών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε διπλά τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό συμπλήρωμα κλινική παρέμβαση σε 58 φαινομενικά υγιείς. Στα πλαίσια της παρέμβασης, οι εθελοντές λάμβαναν καθημερινά είτε 80 ml από το διατροφικό συμπλήρωμα είτε 80 ml από το εικονικό συμπλήρωμα επί 8 εβδομάδες. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης πραγματοποιήθηκαν ανακλήσεις 24ώρου με σκοπό να επιβεβαιώσουμε ότι δεν μεταβλήθηκαν οι διατροφικές συνήθειες των εθελοντών. Στα βιολογικά δείγματα των εθελοντών μετρήθηκαν κλασικοί βιοχημικοί δείκτες και στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής μετρήθηκαν τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα των εθελοντών σε τρεις χρονικές στιγμές: πριν την παρέμβαση, στην 4η εβδομάδα και στην 8η εβδομάδα.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η συγκέντρωση της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα των εθελοντών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ως αποτέλεσμα της παρέμβασης τόσο στην ομάδα του διατροφικού συμπληρώματος ($p = 1$) όσο και στην ομάδα του εικονικού συμπληρώματος ($p = 0,8$). Επίσης, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις δύο ομάδες για κάθε χρονική στιγμή ξεχωριστά.

Φαίνεται επομένως ότι η κατανάλωση ενός συμπληρώματος που περιέχει φυτικά εκχυλίσματα δεν επηρεάζει τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης σε φαινομενικά υγιείς εθελοντές.

Λέξεις κλειδιά: Αιμόσταση, P-σελεκτίνη, διατροφικά συμπληρώματα

Abstract

P-selectin participates in adhesion of leukocytes on activated platelets and endothelium and is presumed to be essential for both hemostatic and inflammatory processes. Increased plasma levels of P-selectin are a prognosis marker for thrombotic disorders and future cardiovascular events.

The purpose of this study is to evaluate the effect of the consumption of a mixture of vitamins and natural extracts on the anti-thrombotic status of healthy volunteers. For this purpose a double-blind placebo-controlled clinical trial was performed on 58 apparently healthy volunteers. As part of the intervention, volunteers received daily either 80 ml of the dietary supplement or 80 ml of placebo supplement for 8 weeks. 24 hour recalls were performed during the intervention in order to confirm that the eating habits of the volunteers were not altered. Several biochemical markers were measured and in the present study plasma sP-selectin levels of the volunteers were measured at three time points: before the intervention, at the 4th week and at the 8th week.

The statistical analysis revealed that the concentration of sP-selectin in the plasma of the volunteers were not significantly changed as a result of the intervention in both the supplement group ($p = 1$) and the placebo group ($p = 0.8$). In addition, there was no statistically significant difference among sP-selectin levels between the two groups in each time point.

Therefore appears that the consumption of a supplement containing vitamins and natural extracts did not affect the levels of sP-selectin in apparently healthy volunteers.

Keywords: Hemostasis, P-selectin, dietary supplements

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1. Αγγειοσύσπαση κατά τον τραυματισμό του αγγείου	σ.15
Εικ.2. Πρωτογενής αιμόσταση δημιουργία καλύμματος αιμοπεταλίων	σ.16
Εικ.3. Δευτερογενής αιμόσταση	σ.18
Εικ.4. Ο καταρράκτης της πήξης με την ενδογενή, εξωγενή και κοινή οδό.....	σ.20

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Θεωρητικό μέρος

Πίν.1: Αποτελέσματα κλινικών μελετών για την επίδραση συμπληρωμάτων διατροφής στους αιμοστατικούς δείκτες του ανθρώπινου οργανισμού σ.53

Μεθοδολογία

Πίν.1: Διατροφική σύσταση συμπληρώματος σ.58

Αποτελέσματα

Πίν.1: Βασικά χαρακτηριστικά πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης σ.64

Πίν.2: Αιματολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης σ.64

Πίν.3: Βιοχημικά χαρακτηριστικά πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης σ.65

Πίν.4: Διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης σ.66

Πίν.5: Οι συγκεντρώσεις του PAF και του ADP που απαιτείται για να προκαλέσει το 50% της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σ.67

Πίν.6: Τιμές sP-σελεκτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης σ.69

Πίν.7: Ποσοστιαίες τιμές sP-σελεκτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης σ.70

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	(Adenosine diphosphate) Διφωσφορική αδενοσίνη
ATP	(Adenosine triphosphate) Τριφωσφορική αδενοσίνη
CRP	(C-reactive protein) C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
DPA	(Docosapentaenoic acid) Δοκοσαπεντανοϊκό οξύ
DHA	(Docosahexaenoic acid) Καεξανοϊκό οξύ
ECM	(Extracellular matrix) Εξωκυτταρικό στρώμα
EPA	(Eicosapentaenoic acid) Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
GPIb	(Glycoprotein Ib) Γλυκοπρωτεΐνη Ib
HDL	(High-density lipoprotein cholesterol) Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
hsCRP	(High sensitivity C-reactive protein) Υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
ICAM-1	(Intercellular Adhesion Molecule 1) Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1
IL-1	(Interleukin-1) Ιντερλευκίνη-1
IL-6	(Interleukin-6) Ιντερλευκίνη-6
IL-8	(Interleukin-8) Ιντερλευκίνη-8
LDL	(Low-density lipoprotein cholesterol) Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
PAI	(Plasminogen activator inhibitor) Αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PAI-1	(Plasminogen activator inhibitor-1) Αναστολέας-1 ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PAI-2	(Plasminogen activator inhibitor-2) Αναστολέας-2 ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PAI-3	(Plasminogen activator inhibitor-3) Αναστολέας-3 ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PAI-4	(Plasminogen activator inhibitor-4) Αναστολέας-4 ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PAR	(Proteinase-Activated Receptor) Υποδοχέας επιφάνειας αιμοπεταλίων
PAF	(Platelet Activating Factor) παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PGI2	(Prostaglandin I2) Προστακυκλίνη
PPP	(Platelet poor plasma) Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PRP	(Platelet rich plasma) Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PUFA	(Polyunsaturated fatty acids) Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
sP-σελεκτίνη	(Soluble P-selectin) Διαλυτή P-σελεκτίνη
TFPI	(Tissue factor pathway inhibitor) Αναστολέας οδού ιστικού παράγοντα
TNF-α	(Tumor necrosis factor-α) Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α
tPA	(Tissue plasminogen activator) Ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου
TRAP	(Thrombin receptor-activating peptide) Πεπτίδιο ενεργοποίησης υποδοχέα θρομβίνης
TxA2	(Thromboxane A2) Θρομβοξάνη A2
TxB2	(Thromboxane B2) Θρομβοξάνη B2

uPA	(Urokinase-type plasminogen activator) Ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης
VCAM-1	(Vascular cell adhesion molecule-1) Αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1
VLDL	(Very low-density lipoprotein cholesterol) Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών
vWF	(von Willebrand Factor) Παράγοντας von Willebrand
ΔΜΣ	Δείκτης μάζας σώματος
Παράγοντας II	Προθρομβίνη
Παράγοντας V	Προαξελερίνη, Παράγοντας Β (ασταθής παράγοντας)
Παράγοντας VII	Προκονβερίνη (σταθερός παράγοντας)
Παράγοντας VIII	Αντι-αιμορροφιλικός παράγοντας
Παράγοντας IX	Παράγοντας Christmas
Παράγοντας X	Παράγοντας Stuart-Prower
Παράγοντας XI	Αιμορροφιλικός παράγοντας C
Παράγοντας XII	Παράγοντας Hageman

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ

1.1 Εισαγωγή

Η αιμόσταση είναι ένας φυσιολογικός αμυντικός μηχανισμός για τον ανθρώπινο οργανισμό, ο οποίος περιλαμβάνει ένα σύνολο από πολύπλοκες αλληλορρυθμιζόμενες αλληλεπιδράσεις του αγγειακού τοιχώματος, των αιμοπεταλίων και των πλασματικών παραγόντων που διασφαλίζουν τη ρευστότητα του αίματος στον ενδοαγγειακό χώρο ενώ επιτυγχάνουν την επίσχεση της αιμορραγίας όταν υπάρχει αγγειακός τραυματισμός [1].

Σε περίπτωση αγγειακού τραυματισμού, η αιμόσταση προκαλεί μία διαδικασία που ξεκινά μερικά δευτερόλεπτα μετά τον τραυματισμό του αγγείου και ολοκληρώνεται περίπου μία ώρα αργότερα [2]. Υπάρχουν δύο κύριες συνιστώσες της συγκεκριμένης διαδικασίας. Η πρωτογενής αιμόσταση αναφέρεται στην ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στο σχηματισμό ενός πρωτογενούς καλύμματος από αιμοπετάλια. Η δευτερογενής αιμόσταση αναφέρεται στις αντιδράσεις της πήξης του αίματος που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πλέγματος ινώδους που σταθεροποιεί τον θρόμβο. Αυτές οι δύο διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα και είναι αλληλένδετες. Η ινωδόλυση παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση καθώς αποτρέπει την υπερβολική αύξηση του θρόμβου και συμβάλλει εν τέλει στη διάλυσή του [3].

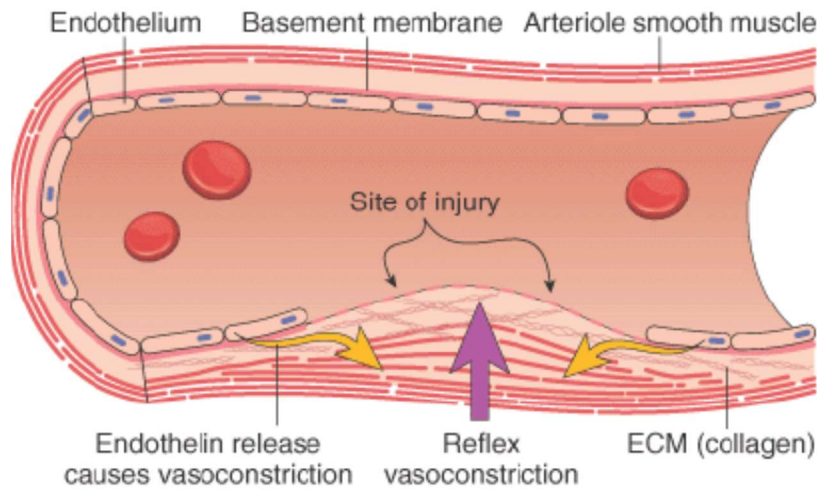
Η ανεπαρκής αιμόσταση μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγία, η οποία εάν είναι μαζική και ραγδαία, μπορεί να οδηγήσει σε υπόταση, καταπληξία ή ακόμη και θάνατο. Αντίθετα, η παρατεταμένη πήξη (θρόμβωση) ή μετανάστευση θρόμβων (εμβολή) μπορεί να εμποδίσει τα αιμοφόρα αγγεία, ενδεχομένως προκαλώντας έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στις αναπτυγμένες χώρες, το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι μία από τις τρεις κύριες αιτίες θανάτου μαζί με τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και την πνευμονική εμβολή [4].

1.2 Μηχανισμοί της αιμόστασης

1.2.1 Αγγειοσύσπαση

Μετά τον τραυματισμό ενός αιμοφόρου αγγείου ακολουθεί μία βραχεία περίοδος αγγειοσύσπασης, η οποία βασίζεται κυρίως σε αντανakλαστικούς νευρογενείς μηχανισμούς με τη διαμεσολάβηση διαβιβαστών όπως η σεροτονίνη, η επινεφρίνη και η νοραδρεναλίνη. Μέσω της αγγειοσύσπασης, οι

πολύ μικρές αρτηρίες του σώματος συσπώνται με αποτέλεσμα να μικραίνει η διάμετρος τους, γεγονός που περιορίζει την απώλεια αίματος και επιταχύνει την έναρξη της αιμοστατικής διαδικασίας. Σε μικρά αγγεία με μικρή βλάβη η αγγειοσύσπαση μπορεί να μπορεί να εξαφανίσει πλήρως τον αυλό του αγγείου και να σταματήσει τη ροή του αίματος (εικόνα 1) [5].

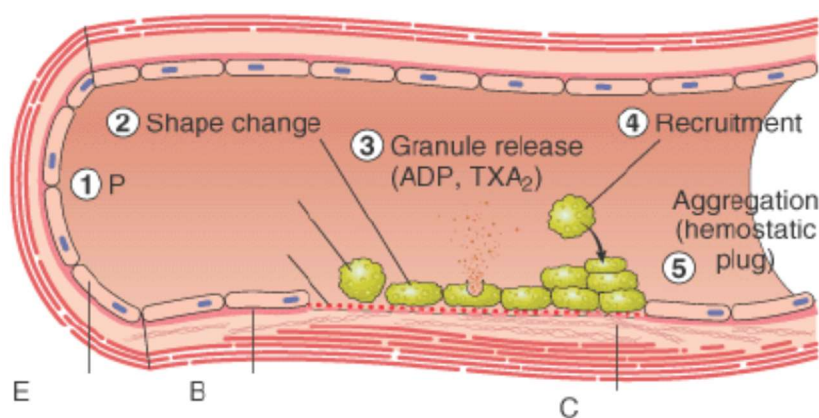


Εικόνα 1. Αγγειοσύσπαση κατά τον τραυματισμό του αγγείου [6]

1.2.2 Πρωτογενής αιμόσταση

Ως πρωτογενής αιμόσταση περιγράφεται η διαδικασία σχηματισμού του πρώτου αιμοπεταλιακού καλύμματος μετά από αγγειακό τραυματισμό (εικόνα 2). Στην αιμοστατική διαδικασία κεντρικό ρόλο παίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, το υπενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια [7].

Το ενδοθήλιο αποτελείται από ένα μονό στρώμα κυττάρων που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων του αίματος και της λέμφου. Με τις αγγειοδραστικές ουσίες που παράγει έχει τη δυνατότητα να τροποποιεί τον αγγειακό τόνο ανάλογα με την ροή του αίματος. Επίσης, το ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αιμοστατικού μηχανισμού καθώς είναι από τους κεντρικούς ρυθμιστές της αιμόστασης. Η ισορροπία μεταξύ αντιθρομβωτικών και προθρομβωτικών παραγόντων καθορίζουν πότε συμβαίνει ο σχηματισμός θρόμβου, η διάδοση και η διάλυση του. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν αντιπηκτικούς παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την πήξη καθώς προάγουν την προώθηση της ινωδολύσης. Μετά από κάθε τραυματισμό, η ενεργοποίηση προθρομβωτικών παραγόντων μετατοπίζει την ισορροπία και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκτούν πολλές προθρομβωτικές ιδιότητες [8, 4].



Εικόνα 2. Πρωτογενής αιμόσταση: δημιουργία καλύμματος αιμοπεταλίων [6]

1.2.2.1 Αντι-θρομβωτικές ιδιότητες του κανονικού ενδοθηλίου

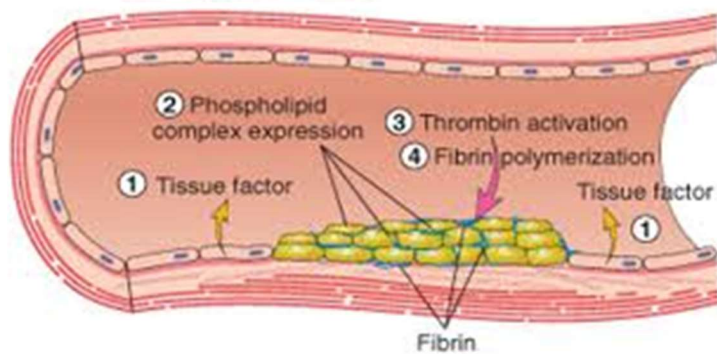
- 1) Το φυσιολογικό και άθικτο ενδοθήλιο αποτρέπει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των παραγόντων της πήξης στην υπο-ενδοθηλιακή εξωκυττάρια ουσία.
- 2) Σύνθεση και έκκριση προστακυκλίνης (PGI_2), ενός αποτελεσματικού αγγειοδιασταλτικού παράγοντα.
- 3) Σύνθεση και έκκριση μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο έχει αντιθρομβωτική δράση και εμποδίζει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο.
- 4) Έκθεση εκτο-νουκλεοτιδάσεων στην ενδοθηλιακή επιφάνειά που υδρολύουν ATP και ADP και εμποδίζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.
- 5) Σύνθεση της θρομβομοδουλίνης που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και δημιουργεί σύμπλεγμα με τη θρομβίνη, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C, η οποία σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη S είναι ο κύριος αναστολέας των παραγόντων Va και VIIIa.
- 6) Σύνθεση γλυκοζαμινογλυκανών που απενεργοποιούν την ενεργή θρομβίνη.
- 7) Σύνθεση του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA), μίας πρωτεΐνης που προωθεί την ινωδόλυση.
- 8) Σύνθεση του αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI), ο οποίος αναστέλλει τη δράση του συμπλέγματος ιστικού παράγοντα-παραγοντα VIIa και παράγοντα Xa [8, 1, 4].

1.2.2.2 Προ-θρομβωτικές ιδιότητες του τραυματισμένου ή ενεργοποιημένου ενδοθηλίου

- 1) Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων: Η ενδοθηλιακή βλάβη έχει ως αποτέλεσμα την επαφή των αιμοπεταλίων με την υποενδοθηλιακή στοιβάδα, η οποία περιλαμβάνει μεταξύ των συστατικών της τον παράγοντα von Willebrand (vWF). Ο παράγοντας von Willebrand είναι μία πρωτεΐνη που συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνδέεται με το κολλαγόνο του εξωκυτταρικού στρώματος (ECM) και τη γλυκοπρωτεΐνη Gp1b, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Οι παραπάνω ιδιότητες επιτρέπουν στον παράγοντα vWF να ενεργεί ως ένα είδος μοριακής κόλλας που συνδέει σφιχτά τα αιμοπετάλια με τα τραυματισμένα αγγειακά τοιχώματα [8, 4].
- 2) Ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης: Τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν έρθουν σε επαφή με κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) ή ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), ή όταν έρθουν σε επαφή με συγκεκριμένα βακτηριακά προϊόντα, όπως η ενδοτοξίνη, παράγουν ιστικό παράγοντα και μειώνουν την έκφραση της θρομβομοδουλίνης, που αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης, η οποία είναι ο κύριος ενεργοποιητής της πήξης. Επίσης, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα δεσμεύονται από τους παράγοντες πήξης IXa και Xa, γεγονός που αυξάνει τις καταλυτικές τους ιδιότητες [8, 4].
- 3) Αντι-ϊνωδολυτικές διαδικασίες: Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν αναστολείς του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI), οι οποίοι περιορίζουν την ινωδόλυση και ευνοούν τη θρόμβωση [8, 4].

1.2.3 Δευτερογενής αιμόσταση

Στη δευτερογενή αιμόσταση η ενεργοποιημένη θρομβίνη προάγει τον σχηματισμό ενός αδιάλυτου ινώδους θρόμβου μέσω της διάσπασης του ινωδογόνου. Η θρομβίνη με τη σειρά της ενεργοποιεί πρόσθετα αιμοπετάλια, τα οποία ενισχύουν το αιμοστατικό κάλυμμα. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός ενός σταθερού και πιο συμπαγούς θρόμβου, ο οποίος είναι ικανός να εμποδίσει την περαιτέρω αιμορραγία (εικόνα 3). Η όλη διαδικασία επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης [9].



Εικόνα 3. Δευτερογενής αιμόσταση [6]

Ο καταρράκτης πήξης είναι μία διαδοχική σειρά από ενζυματικές αντιδράσεις. Σε κάθε στάδιο της διαδικασίας, βασικό ρόλο παίζουν διάφορα προένζυμα που πρωτεολύονται και μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα, κυρίως πρωτεάσες σερίνης. Κάθε ενεργό ένζυμο με τη σειρά του καταλύει τη μετατροπή του επόμενου προενζύμου σε ενεργό ένζυμο. Έτσι ενεργοποιείται μία σειρά αντιδράσεων που τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση της θρομβίνης και στο σχηματισμό του ινώδους. Η θρομβίνη διαδραματίζει ενεργό ρόλο, καθώς δρα σε πολλά σημεία του καταρράκτη και συμμετέχει τόσο στην πηκτική όσο και στην αντιπηκτική διαδικασία [9,4].

Το ήπαρ αποτελεί την κύρια τοποθεσία σύνθεσης των πρωτεϊνών της πήξης, οι οποίες κατόπιν εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος ως ανενεργά προένζυμα. Κάθε αντίδραση στο μονοπάτι της διαδικασίας βασίζεται στο σύμπλεγμα ενός ενζύμου (παράγοντα πήξης), ενός υποστρώματος, που αποτελεί το προένζυμο για την επόμενη αντίδραση της σειράς, και ενός συμπαράγοντα, ο οποίος επιταχύνει την αντίδραση. Αυτά τα ένζυμα είναι γνωστά στην επιστημονική βιβλιογραφία από την ποικιλία των ονομάτων τους αλλά σήμερα για λόγους απλούστευσης περιγράφονται με λατινικούς αριθμούς. Ορισμένοι από τους παράγοντες πήξης, όπως οι παράγοντες II, VII, IX και X, προϋποθέτουν την ύπαρξη της βιταμίνη K ως συμπαράγοντα για να ενεργοποιηθούν. Οι κύριες αντιδράσεις της διαδικασίας θρόμβωσης απεικονίζονται στην εικόνα 4, από την οποία είναι προφανές ότι υπάρχουν δύο οδοί που μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ενός θρόμβου [5, 10].

Και οι δύο οδοί είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική αιμόσταση και ενεργοποιούνται όταν το αίμα περνά έξω από το αγγειακό σύστημα. Η ενδογενής οδός είναι πιο αργή και ενεργοποιείται όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με το τοίχωμα του τραυματισμένου αγγείου ενώ η εξωγενής οδός ενεργοποιείται όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με προϊόντα του τραυματισμένου ιστού, όπως ιστικό

παράγοντα και θρομβοπλαστίνη. Η ενδογενής οδός ονομάζεται έτσι επειδή όλα τα στοιχεία που απαιτούνται για την ενεργοποίησή της περιέχονται στο αίμα, ενώ η εξωγενής οδός ενεργοποιείται από έναν παράγοντα έξω από το αίμα, τον ιστικό παράγοντα. Και οι δύο οδοί στο τέλος του πρώτου σταδίου της πήξης καταλήγουν στο σχηματισμό του παράγοντα Χα. Τα περαιτέρω βήματα του καταρράκτη πήξης είναι κοινά και για τις δύο οδούς και περιλαμβάνουν την μετατροπή της ανενεργούς προθρομβίνης σε θρομβίνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει το ινωδογόνο σε σταθερό ινώδες με αποτέλεσμα τον σχηματισμό θρόμβου [5, 10].

1.2.3.1 Ενδογενής οδός

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας βασίζεται στην ενεργοποίηση του παράγοντα XII (παράγοντας Hageman). Όταν υπάρχει αγγειακή βλάβη και το αίμα εκτίθεται στο κολλαγόνο των τοιχωμάτων των τραυματισμένων αγγείων, τότε η διαμόρφωση του μορίου του παράγοντα XII μεταβάλλεται και μετατρέπεται σε ενεργοποιημένο παράγοντα XIIa. Ταυτόχρονα φωσφολιπίδια απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

Ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIIa δρα σαν συνένζυμο και καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα XI. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIa με την παρουσία ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί με τη σειρά του τον παράγοντα IX (παράγοντα Christmas). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας IXa στη συνέχεια δρα μαζί με τα φωσφολιπίδια που προέρχονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ιόντα ασβεστίου και τον παράγοντα VIII (αντι-αιμορροφιλικό παράγοντα) για την παρασκευή του παράγοντα X. Η ενεργοποίηση κατόπιν του παράγοντα X σε ενεργοποιημένο παράγοντα Χα συνήθως λαμβάνει χώρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, ωστόσο μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο αγγειακό ενδοθήλιο [5, 10, 11].

1.2.3.2 Εξωγενής οδός

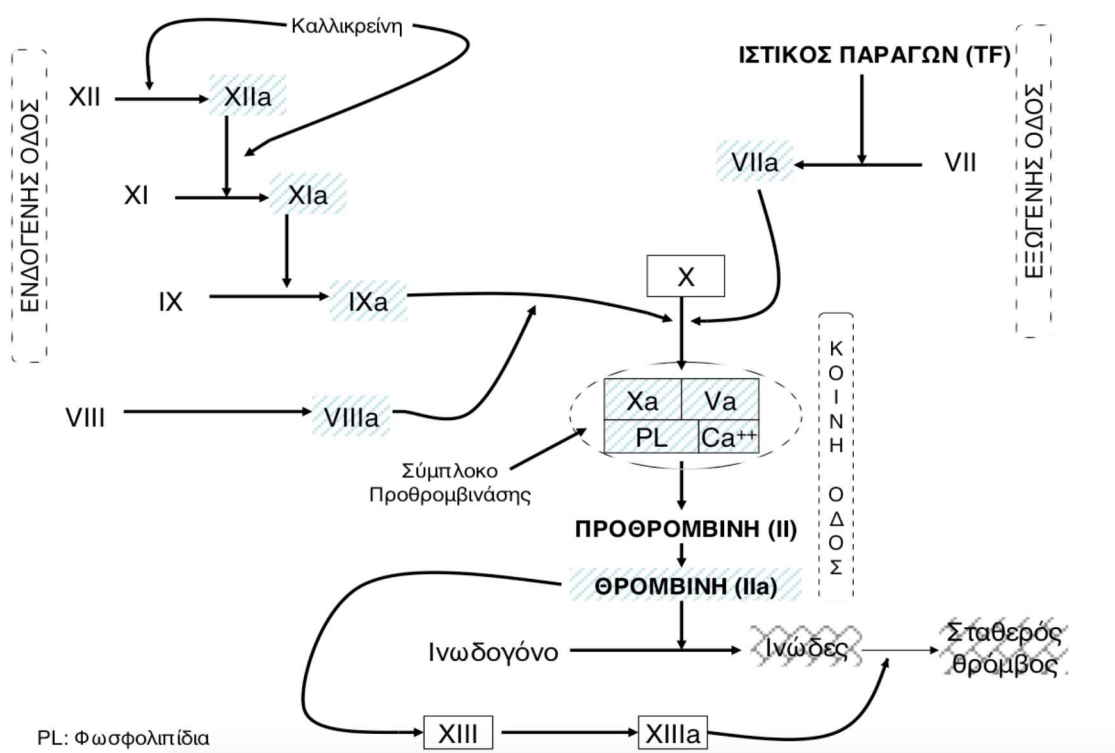
Η εξωγενής οδός ξεκινά με την επαφή του αίματος με τον τραυματισμένο εξωαγγειακό ιστό και αποτελείται από τρεις βασικές φάσεις:

- 1) Ο τραυματισμένος ιστός εκκινεί τη διαδικασία πήξης απελευθερώνοντας φωσφολιπίδια και μία πρωτεΐνη που ονομάζεται ιστικός παράγοντας (ή ιστική θρομβοπλαστίνη).
- 2) Ο ιστικός παράγοντας με την παρουσία ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί τον παράγοντα VII.

- 3) Ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIIa με την παρουσία ιόντων ασβεστίου και του παράγοντα V οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα X και τον σχηματισμό του παράγοντα Xa [5, 10, 11].

1.2.3.3 Κοινή οδός

Το κοινό τελικό στάδιο τόσο της ενδογενούς όσο και της εξωγενούς οδού για την πήξη του αίματος ξεκινά με την μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη υπό την επίδραση του ενεργοποιημένου παράγοντα Xa σε σύμπλεγμα με τον παράγοντα V, ιόντα ασβεστίου και φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων. Η θρομβίνη προκαλεί την ταχεία πρωτεόλυση του ινωδογόνου και τη μετατροπή του σε μονομερές ινώδες. Ταυτόχρονα, η θρομβίνη με την παρουσία ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII (παράγοντα σταθεροποίησης του ινώδους). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIIIa οδηγεί στον πολυμερισμό του μονομερούς ινώδους και τον σχηματισμό τους δικτύου ινικής, σταθεροποιώντας τη δημιουργία του θρόμβου.



Εικόνα 4. Ο καταρράκτης της πήξης με την ενδογενή, εξωγενή και κοινή οδό [12].

Ο σχηματισμός του θρόμβου πραγματοποιείται μέσα σε 3 έως 6 λεπτά από τη στιγμή της βλάβης των αιμοφόρων αγγείων. Επειδή η εξωγενής οδός περιλαμβάνει λιγότερα βήματα και κατά συνέπεια είναι πιο γρήγορη από την ενδογενή οδό, σε περίπτωση σοβαρού τραυματισμού των ιστών γύρω από τα

αιμοφόρα αγγεία ο σχηματισμός θρόμβου μπορεί να συντελεστεί μέσα σε 15 δευτερόλεπτα [5, 10, 11, 12].

1.3 Αναστολείς του μηχανισμού πήξης

Οι φυσικοί αναστολείς του μηχανισμού πήξης του αίματος περιλαμβάνουν την αντιθρομβίνη, την πρωτεΐνη S, την πρωτεΐνη C και τον αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI). Όταν ο μηχανισμός της πήξης ενεργοποιείται, αυτές οι πρωτεΐνες απενεργοποιούν συγκεκριμένους παράγοντες της πήξης. Με τον τρόπο αυτό, παρέχουν έναν ρυθμιστικό μηχανισμό που ελέγχει τη ρευστότητα του αίματος και περιορίζει την επέκταση του θρόμβου [13, 14].

Η αντιθρομβίνη, γνωστή και ως αντιθρομβίνη III, είναι μία πρωτεΐνη που παράγεται από το ήπαρ και θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους αναστολείς του μηχανισμού πήξης. Η κύρια δράση της αντιθρομβίνης είναι να απενεργοποιεί τη θρομβίνη και τους παράγοντες πήξης IX, X, XI και XII [13, 14]. Η παρουσία της ηπαρίνης εξασφαλίζει την ισορροπία της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην αντιθρομβίνη και στη θρομβίνη καθιστώντας εφικτή την αιμόσταση. Αν αυτή η ισορροπία διαταραχθεί θα προκύψει αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης [13, 14].

Η πρωτεΐνη C είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K, που παράγεται από το ήπαρ. Αλληλοεπιδρά με το σύμπλεγμα θρομβίνης-θρομβομοδοουλίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της. Μόλις η πρωτεΐνη C μετατραπεί σε ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C δρα ως αντιπηκτικό αναστέλλοντας τους παράγοντες πήξης Va και VIIIa [13, 14].

Η πρωτεΐνη S είναι επίσης μία γλυκοπρωτεΐνη, εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K, που παράγεται στο ήπαρ, στο ενδοθήλιο, στα αιμοπετάλια και στα μεγακαρυοκύτταρα. Η πρωτεΐνη S κυκλοφορεί στο πλάσμα στην ενεργή της μορφή και δρα ως συμπαράγοντας της πρωτεΐνης C, η οποία αναστέλλει τους παράγοντες πήξεως Va και VIIIa. Η ανεπάρκεια τόσο της πρωτεΐνης C όσο και της πρωτεΐνης S συνδέεται με την εμφάνιση θρόμβου [13, 14].

Τέλος, ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI) παράγεται κυρίως από το ενδοθηλιακό κύτταρο και ελαττώνει τη δραστηριότητα του συμπλέγματος του ιστικού παράγοντα με τον ενεργοποιημένο παράγοντα VII (TF/VIIa) [13, 14, 15].

1.4 Μηχανισμός ινωδόλυσης

Το τελικό στάδιο της αιμόστασης οδηγεί τον οργανισμό στην ενεργοποίηση του ινωδολυτικού μηχανισμού με σκοπό την αποφυγή της ανεξέλεγκτης επέκτασης του σχηματισμού θρόμβου. Η κυρίαρχη ουσία της ινωδόλυσης είναι το πλασμινογόνο, μία πρωτεΐνη που ανήκει στις β-σφαιρίνες του αίματος. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται στο ενεργό ένζυμο πλασμίνη μέσω του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA). Η πλασμίνη με τη σειρά της διασπά το ινώδες συντελώντας στη διάλυση του θρόμβου.

Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου συντελείται με τη βοήθεια ενζύμων, των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου, με σκοπό να σχηματισθεί η πλασμίνη. Δύο είναι τα κυριότεροι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Ο ιστικός ενεργοποιητής και ο ενεργοποιητής τύπου ουροκινάσης.

Ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tPA) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν tPA, το οποίο ενσωματώνεται στο ινώδες με αποτέλεσμα η πλασμίνη που σχηματίζεται από το πλασμινογόνο να διασπά το ινώδες απομακρύνοντας τον θρόμβο.

Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) είναι ένα πολυπεπίδιο που παράγεται στα νεφρικά κύτταρα. Η ουροκινάση ενεργοποιείται στο ενδογενές ινωδολυτικό σύστημα και μετατρέπει το πλασμινογόνο σε πλασμίνη.

Τέλος, υπάρχουν και πλασματικοί ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, όπως οι παράγοντες XI, XII και η καλλικρεΐνη, οι οποίοι δρουν με την ενεργοποίηση της ουροκινάσης [1, 15].

1.5 Αναστολείς του ινωδολυτικού μηχανισμού

Ο μηχανισμός ινωδόλυσης πρέπει με τη σειρά του να ελεγχθεί ώστε να μην διαταραχθεί η ισορροπία της αιμόστασης. Οι αναστολείς του ινωδολυτικού μηχανισμού που βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό χωρίζονται σε δύο ομάδες: Τους αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και τους αδρανοποιητές της πλασμίνης.

Οι αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου είναι οι PAI-1, PAI-2, PAI-3 και η πρωτεάση νεξίνη-1:

- 1) Ο αναστολέας-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο ενδοθήλιο των αγγείων, στο ήπαρ καθώς και σε τύπους ιστών και αδρανοποιεί τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA).
- 2) Ο αναστολέας-2 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-2) παράγεται στον πλακούντα και αδρανοποιεί κυρίως την ουροκινάση και δευτερευόντως τον tPA.
- 3) Ο αναστολέας-3 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-3) απαντάται κυρίως στα ούρα και αδρανοποιεί την ουροκινάση και τον tPA.
- 4) Η πρωτεάση νεξίνη-1 (PN-1) είναι μία σερπίνη η οποία αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης, της πλασμίνης, του tPA και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) [15, 16, 17].

Οι κυριότεροι αδρανοποιητές της πλασμίνης, είναι η α2-αντιπλασμίνη και η α2-μακροσφαιρίνη:

- 1) Η α2-αντιπλασμίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο ήπαρ και βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος καθώς και σε άλλα υγρά του σώματος.
- 2) Η α2-μακροσφαιρίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη η οποία αδρανοποιεί τον ιστικό παράγοντα, την ουροκινάση, την καλλικρεΐνη και το σύμπλοκο στρεπτοκινάσης-πλασμινογόνου [15, 16, 17].

1.6 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά κύτταρα του αίματος, χωρίς πυρήνα, με δισκοειδή μορφή και με διάμετρο 1-2 μm [18]. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αιμόστασης καθώς σε περίπτωση τραυματισμού των αγγείων αναστέλλουν την αιμορραγία σχηματίζοντας ένα αιμοπεταλιακό κάλυμμα και παρέχοντας μία επιφάνεια στην οποία συγκεντρώνονται ενεργοποιημένοι παράγοντες πήξης [1, 10, 18].

Οι λειτουργίες των αιμοπεταλίων εξαρτάται από διάφορες ιντεγκρίνες, οι οποίες είναι κυτταρικοί υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών, τον κυτταρικό σκελετό και δύο τύπους κυτταροπλασματικών κοκκίων:

- 1) Τα α-κοκκία, τα οποία εκθέτουν το μόριο προσκόλλησης P-σελεκτίνη στις μεμβράνες τους και περιέχουν ινωδογόνο, φμπρονεκτίνη, παράγοντες V και VIII, αιμοπεταλιακό παράγοντα 4,

αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (PDGF) και μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα-β (TGF-β).

- 2) Πυκνά σωμάτια (δ-κοκκία), τα οποία περιέχουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), σεροτονίνη, ισταμίνη, επινεφρίνη και ιόντα ασβεστίου.

Σε περίπτωση αγγειακής βλάβης, τα αιμοπετάλια συναντούν τα συστατικά του εξωκυτταρικού στρώματος (ECM), με πιο σημαντικό το κολλαγόνο, και συγκολλητικές γλυκοπρωτεΐνες, όπως τον παράγοντα von Willebrand (vWF). Αυτό οδηγεί σε μία αλληλουχία που περιλαμβάνει την προσκόλληση, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [1, 10, 18].

1.6.1 Προσκόλληση των αιμοπεταλίων

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος μπορεί να προκύψει σε συνθήκες χαμηλής αλλά και υψηλής ταχύτητας διάτμησης αλλά πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Η χαμηλή ταχύτητα διάτμησης παρατηρείται στο φλεβικό σύστημα ενώ η υψηλή ταχύτητα διάτμησης παρατηρείται στις αρτηρίες και στα στενά αγγεία.

Στη χαμηλή ταχύτητα διάτμησης, μετά από αγγειακή βλάβη οι πρωτεΐνες της υποενδοθηλιακής στοιβάδας των αγγείων εκτίθενται σε συστατικά του αίματος. Ως αποτέλεσμα, τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσκολλώνται αρχικά στη φιβρονεκτίνη και τη λαμινίνη με αντίστοιχους υποδοχείς της μεμβράνης και έτσι έρχονται σε άμεση επαφή με το κολλαγόνο, που διεγείρει τους ειδικούς υποδοχείς τους πάνω στα αιμοπετάλια [2, 18].

Στην υψηλή ταχύτητα διάτμησης, μετά από τραυματισμό τα αιμοπετάλια μπορούν να οδηγηθούν σε άμεση προσκόλληση στο κολλαγόνο του εξωκυτταρικού στρώματος μέσω του παράγοντα von Willebrand (vWF). Ο παράγοντας vWF συνδέεται στο κολλαγόνο του εξωκυτταρικού στρώματος (ECM) ενώ τα αιμοπετάλια συνδέονται στον vWF μέσω της γλυκοπρωτεΐνης Gp1b, η οποία βρίσκεται στην επιφάνειά τους. Αυτή η προσκόλληση προκαλεί το επόμενο βήμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [1, 10, 18].

1.6.2 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Μετά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα, σειρά έχει η ενεργοποίησή τους μέσω της επίδρασης διαφόρων παραγόντων που δεσμεύονται στην επιφάνειά τους, όπως:

- 1) Παράγοντες που προέρχονται από το εξωκυτταρικό στρώμα του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος, όπως θρομβίνη, κολλαγόνο και vWF.
- 2) Παράγοντες που προέρχονται από άλλα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, όπως το ADP.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί σε μη αναστρέψιμη αλλαγή του σχήματός τους που από δισκοειδές γίνεται πιο σφαιρικό με επιμήκη ψευδοπόδια. Επίσης επέρχονται ανεπαίσθητες αλλαγές στη δομή των πλασματικών μεμβρανών τους. Ταυτόχρονα, συστατικά των δ-κοκκίων τους, όπως ADP και ασβέστιο, απελευθερώνονται στο πλάσμα μεγιστοποιώντας την περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Οι αλλαγές του σχήματος των αιμοπεταλίων ενισχύουν την επακόλουθη συσσώρευση και αυξάνουν την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με τους παράγοντες πήξης. Οι ανεπαίσθητες αλλαγές της μεμβράνης ενισχύουν την παρουσία στην επιφάνειά της αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων, τα οποία αποτελούν θέσεις σύνδεσης για το ασβέστιο και τους παράγοντες πήξης. Επιπλέον, μία διαμορφωτική αλλαγή στο GPIIb IIIa των αιμοπεταλίων τους επιτρέπει να δεσμεύουν ινωδογόνο.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συνθέτουν επίσης θρομβοξάνη A₂ (TxA₂), μία προσταγλανδίνη που προκαλεί αγγειοσύσπαση και επιπλέον παίζει σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [1, 10, 18].

1.6.3 Συσσώρευση αιμοπεταλίων

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ακολουθεί μετά από την προσκόλληση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και διεγείρεται από μερικούς από τους ίδιους παράγοντες που προκαλούν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως η θρομβοξάνη A₂ (TxA₂). Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προάγεται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο ινωδογόνο και τους υποδοχείς των γλυκοπρωτεϊνών IIb/IIIa σε γειτονικά αιμοπετάλια.

Η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης γίνεται εμφανής από μία σπάνια κληρονομική ανεπάρκεια των γλυκοπρωτεϊνών IIb/IIIa (θρομβασθένεια Glanzmann), η οποία συνδέεται με αιμορραγίες και ανικανότητα των αιμοπεταλίων να συσσωματώνονται [4]. Η αναγνώριση του κεντρικού ρόλου των υποδοχέων των γλυκοπρωτεϊνών IIb/IIIa στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόνωσε την έρευνα για

την ανάπτυξη αντιθρομβωτικών παραγόντων που αναστέλλουν τη λειτουργία των γλυκοπρωτεϊνών IIb/IIIa.

Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης παράγει θρομβίνη, η οποία σταθεροποιεί το βύσμα των αιμοπεταλίων μέσω δύο μηχανισμών:

- 1) Η θρομβίνη ενεργοποιεί έναν υποδοχέα επιφάνειας αιμοπεταλίων (PAR), ο οποίος σε συνεργασία με το ADP και τη θρομβοξάνη A₂ ενισχύει περαιτέρω τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η συστολή των αιμοπεταλίων που ακολουθεί, δημιουργεί μία συγχωνευμένη μάζα αιμοπεταλίων που αποτελεί το τελικό κάλυμμα της δευτερογενούς αιμόστασης.
- 2) Η θρομβίνη μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες σε μικρή απόσταση από το βύσμα των αιμοπεταλίων, σταθεροποιώντας το βύσμα στη θέση του.

Τα ερυθροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα περιέχονται επίσης στο αιμοστατικό βύσμα. Τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται στα αιμοπετάλια με της βοήθεια της P-σελεκτίνης και στο ενδοθήλιο με διάφορα μόρια προσκόλλησης. Με τον τρόπο αυτό συμβάλλουν στη φλεγμονώδη απόκριση που συνοδεύει τη θρόμβωση. Η θρομβίνη επίσης ενισχύει τη φλεγμονή ενεργοποιώντας την προσκόλληση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων του αίματος και παράγοντας χημειοτακτικές ουσίες κατά τη διάρκεια της διάσπασης του ινωδογόνου [1, 4, 10, 18].

1.7 Δείκτες αξιολόγησης της αιμόστασης

Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση υποστηρίζονται από μία σειρά παραγόντων, όπως το ADP, η θρομβίνη, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), το αραχιδονικό οξύ, το κολλαγόνο, η P-σελεκτίνη, ο παράγοντας von Willebrand, το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1) και το αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (VCAM-1). Οι παράγοντες αυτοί συντίθενται ή εκκρίνονται στο σημείο των αγγειακού τραυματισμού [4, 5].

1.7.1 Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)

Σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων παίζει η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP). Το ADP αρχικά απελευθερώνεται από τον τραυματισμένο ιστό και συμβάλλει στην ενεργοποίηση και μετέπειτα στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια όταν ενεργοποιούνται εκκρίνουν το ADP που περιέχεται στα πυκνά κοκκία (δ-κοκκία) τους.

Το ADP δρα μέσω δύο υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες, του υποδοχέα Gq-coupled P2Y₁ και του υποδοχέα Gi-coupled P2Y₁₂. Η διέγερση των αιμοπεταλίων από το ADP οδηγεί στην παραγωγή θρομβοξανθής A₂, στην αλλαγή του σχήματος τους και τελικά στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η απελευθέρωση του υλικού των πυκνών κοκκίων που προκαλείται από το ADP βασίζεται στην παραχθείσα θρομβοξανθή A₂.

Το ADP συμβάλει στη δημιουργία ενός μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης μέσω των υποδοχέων των νουκλεοτιδίων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, η ταυτόχρονη διέγερση τόσο του υποδοχέα P2Y₁ όσο και του υποδοχέα P2Y₁₂ απαιτείται για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση του καθενός από αυτούς τους υποδοχείς των νουκλεοτιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση συγκεκριμένων μονοπατιών που είναι σημαντικά για τη ρύθμιση τόσο της θρόμβωσης όσο και της αιμόστασης [4, 19].

1.7.2 Θρομβίνη

Η θρομβίνη είναι μία πρωτεΐνη που δρα ως πρωτεάση σερίνης στην διαδικασία της πήξης. Αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και η δράση της βασίζεται σε ειδικούς υποδοχείς της, οι οποίοι είναι γνωστοί ως Υποδοχείς Ενεργοποιούμενοι από Πρωτεάσες (Protease-Activated Receptors, PARs).

Οι υποδοχείς είναι τέσσερις (PAR₁, PAR₂, PAR₃ και PAR₄), ωστόσο μόνο οι PAR₁ και PAR₄ απαντώνται σε ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι υποδοχείς της θρομβίνης έχουν έναν μοναδικό μηχανισμό ενεργοποίησης, καθώς η θρομβίνη συνδέεται με τον υποδοχέα και διασπά το εξωκυττάριο άκρο N-τερματικό σε μία ειδική θέση R41/S42. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το νέο N-τερματικό, που αποτελείται από ένα πεπτίδιο Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN), να λειτουργεί ως προσδέτης προς την ενεργό θέση του υποδοχέα.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας PAR₁ είναι απαραίτητος και ο πιο σημαντικός για τη διαδικασία ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω της θρομβίνης, καθώς προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης σε αντίθεση με τον υποδοχέα PAR₄ που χρειάζεται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρομβίνης [20, 21].

1.7.3 Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) είναι μία λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών. Ο PAF είναι ο ισχυρότερος φλεγμονώδης παράγοντας και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε πολλές βιοχημικές διαδικασίες. Συντίθεται από μία ποικιλία κυττάρων τα οποία συμμετέχουν στην εκδήλωση της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN), τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα αιμοπετάλια.

Ο παράγοντας PAF διεγείρει τη φλεγμονώδη αντίδραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ταυτόχρονα ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες που απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (όπως κυτταροκίνες, σελεκτίνες και ιντεγκρίνες) προκαλεί την προσκόλληση αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται από έναν μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης που προκαλείται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στον PAF και τους άλλους απελευθερωμένους παράγοντες, καθώς οι σελεκτίνες βοηθούν στην αρχική αλληλεπίδραση ανάμεσα στα αιμοπετάλια και το αγγειακό ενδοθήλιο ενώ ο PAF διεγείρει τις ιντεγκρίνες ώστε να προκαλέσουν την ισχυρή πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο [22].

1.7.4 Αραχιδονικό οξύ

Το αραχιδονικό οξύ είναι ένα μακράς αλύσου ωμέγα-6 λιπαρό οξύ με 20 άτομα άνθρακα και 4 διπλούς δεσμούς και απαντάται στα κοκκία των αιμοπεταλίων. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω της επίδρασης άλλων παραγόντων ενεργοποίησης (όπως ADP, θρομβίνης και κολλαγόνου).

Το απελευθερωμένο αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται προς προσταγλανδίνες G2/H2 με τη δράση του ενζύμου συνθάση-1 της προσταγλανδίνης H2, οι οποίες στη συνέχεια μετασχηματίζονται σε θρομβοξάνη A2 με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση της θρομβοξάνης A2. Η παραγόμενη θρομβοξάνη A2 προκαλεί έναν μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης για την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση περισσότερων αιμοπεταλίων στο αιμοστατικό βύσμα, καθώς ενεργοποιεί περαιτέρω τα αιμοπετάλια μέσω ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων (PGG2-PGH2 receptors) [23, 24, 25].

1.7.5 Κολλαγόνο

Μετά από αγγειακή βλάβη τα αιμοπετάλια έρχονται σε επαφή με το υποενδοθηλιακό κολλαγόνο το οποίο πυροδοτεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό αιμοστατικού καλύμματος. Εκτός από τη γλυκοπρωτεΐνη Ib (GPIb) και την ιντεγκρίνη $\alpha\text{Ib}\beta 3$, οι οποίες αλληλοεπιδρούν έμμεσα με το κολλαγόνο μέσω του παράγοντα von Willebrand (vWF), υπάρχουν διάφοροι υποδοχείς κολλαγόνου προσαρμοσμένοι στα αιμοπετάλια, κυρίως η ιντεγκρίνη $\alpha 2\beta 1$ και η γλυκοπρωτεΐνη VI, η οποία ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρίνων (Igs).

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο κολλαγόνο και τα αιμοπετάλια είναι ιδιαίτερα σημαντική στις μεσαίες και υψηλές ταχύτητες διάτμησης των αρτηριών και των νοσούντων αγγείων. Στις μικρές αρτηρίες και τα αρτηρίδια, η σύνδεση ανάμεσα στη γλυκοπρωτεΐνη Ib-V-IX και τον παράγοντα vWF που βρίσκεται προσδεμένος στο κολλαγόνο είναι ζωτικής σημασίας για την αρχική πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα. Ωστόσο, η σύνδεση αυτή είναι ασθενής και δεν είναι επαρκής για τη σταθερή πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, γεγονός που αποδεικνύεται από την κύλιση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα σε υψηλές ταχύτητες διάτμησης.

Η σταθερή πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο απαιτεί πρόσθετες συνδέσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων και του κολλαγόνου του εξωκυτταρικού στρώματος (ECM). Οι ιντεγκρίνες αποτελούν την κύρια κατηγορία υποδοχέων επιφάνειας που επιτυγχάνουν σταθερή πρόσδεση σε υψηλές ταχύτητες διάτμησης. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από υπομονάδες α και β . Το κολλαγόνο συνδέεται άμεσα με την ιντεγκρίνη $\alpha 2\beta 1$ των αιμοπεταλίων και έμμεσα (μέσω του παράγοντα vWF) με την ιντεγκρίνη $\alpha\text{Ib}\beta 3$ [26, 27].

1.7.6 P-σελεκτίνη

Η P-σελεκτίνη είναι μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των σελεκτινών, οι οποίες αποτελούν μόρια προσκόλλησης των κυττάρων. Η κύρια λειτουργία της είναι η δημιουργία προσωρινών ασθενών δεσμών με υδατανθρακικά μόρια των λευκοκυττάρων, παρέχοντας το χρόνο να αναπτυχθούν ισχυρότεροι δεσμοί μεταξύ άλλων μορίων. Η P-σελεκτίνη απαντάται στα μη διεγερμένα αιμοπετάλια και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου αποθηκεύεται σε α -κοκκία και σε σώματα Weibel-Palade αντίστοιχα. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η P-σελεκτίνη μετατοπίζεται μαζί με τα κοκκία στη μεμβράνη του πλάσματος διευκολύνοντας την προσκόλληση τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λευκοκύτταρα. Όπως και οι άλλες σελεκτίνες, η P-σελεκτίνη αποτελείται από ένα

πεδίο N-τερματικής ασβεστιο-εξαρτώμενης λεκτίνης, ένα πεδίο επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης, μία σειρά από συμπληρωματικές κανονιστικές πρωτεϊνοειδείς επαναλήψεις, ένα διαμεμβρανικό πεδίο και μία μικρή κυτταροπλαστική ουρά [28, 29].

Ο προσδέτης PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) είναι ο κύριος προσδέτης της P-σελεκτίνης, ο οποίος περιέχεται σε όλα σχεδόν τα λευκοκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση και την κύλιση τους. Η P-σελεκτίνη που απελευθερώνεται από τα σώματα Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων δεσμεύεται στα λευκοκύτταρα του αίματος φέρνοντας τα σε επαφή με το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε σταθερή προσκόλληση, η οποία προκαλείται από άλλα μόρια προσκόλλησης [30]. Ο PSGL-1 περιέχεται επίσης σε μικρές ποσότητες στα αιμοπετάλια και προωθεί την αλληλεπίδραση ανάμεσα στα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο [29].

Η γλυκοπρωτεΐνη Ib είναι επίσης ένας προσδέτης για την P-σελεκτίνη που πιθανώς μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το τοίχωμα του αγγείου. Όταν απελευθερώνονται τα συστατικά των σωμάτων Weibel-Palade, τα οποία περιλαμβάνουν εκτός από την P-σελεκτίνη και εξαιρετικά μεγάλα πολυμερή του παράγοντα von Willebrand (vWF), τα αιμοπετάλια μετατοπίζονται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο μέσω της αλληλεπίδρασης του παράγοντα vWF και της γλυκοπρωτεΐνης Ib, που αποτελεί υποδοχέα του vWF. Θεωρείται πιθανό ότι ο παράγοντας von Willebrand αγκυλώνεται στο ενδοθήλιο συνδεδεμένος με την P-σελεκτίνη που προέρχεται από το ίδιο κοκκίο [29].

1.7.7 Παράγοντας von Willebrand (vWF)

Ο παράγοντας von Willebrand (vWF) είναι μία πολυσθενής γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, στο ενδοθήλιο και στα μεγακαρυοκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα και στο σχηματισμό θρόμβου. Ο παράγοντας von Willebrand συνδέεται με το κολλαγόνο του εξωκυτταρικού στρώματος (ECM) και τη γλυκοπρωτεΐνη Gp1b, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Οι παραπάνω ιδιότητες επιτρέπουν στον παράγοντα vWF να ενεργεί ως ένα είδος μοριακής κόλλας που συνδέει σφιχτά τα αιμοπετάλια με τα τραυματισμένα αγγειακά τοιχώματα [8, 31].

1.7.8 Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1)

Το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών που εκφράζεται στην επιφάνεια των

ενδοθηλιακών κυττάρων (Muro et al., 2005). Τα λευκοκύτταρα περιέχουν τις β2-ιντεγκρίνες LFA-1 και MAC-1, οι οποίες αποτελούν υποδοχείς του ICAM-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το ICAM-1 συντελεί τόσο στην κύλιση όσο και στη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο μέσω της αλληλεπίδρασης με τις β2-ιντεγκρίνες [32, 33].

1.7.9 Αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (VCAM-1)

Το αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους από κυτταροκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) και η ιντερφερόνη (Hosokawa et al., 2006). Μετά την ενεργοποίησή του το VCAM-1 ελευθερώνεται από την επιφάνεια των κυττάρων σε ενεργό διαλυτή μορφή (sVCAM-1). Το VCAM-1 συνδέεται με β1-ιντεγκρίνες των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των ηωσινόφιλων του αίματος και παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλλησή τους στο αγγειακό ενδοθήλιο [32].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΩΣ Η ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

2.1 Εισαγωγή

Η βιβλιογραφία δείχνει ότι η διατροφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ή τη θεραπεία διαταραχών στην αιμόσταση του αίματος. Υπάρχει πλήθος μελετών σχετικά με τις επιπτώσεις της ενεργειακής πρόσληψης και δαπάνης καθώς και συστατικών της διατροφής στην αιμόσταση. Η κατανάλωση τροφών και συστατικών της διατροφής όπως ελαιόλαδου, ψαριών, βιταμινών Κ, Ε και Β9, ιχνοστοιχείων όπως μαγνησίου και σεληνίου, κρασιού, πράσινου τσαγιού, σοκολάτας, μελιού, κρεμμυδιού, σκόρδου, κανέλας και γιαουρτιού, τα περισσότερα εκ των οποίων αποτελούν βασικά συστατικά της μεσογειακής διατροφής, φαίνεται να εμποδίζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και να ευνοούν την ινωδόλυση.

2.2 Ενεργειακό ισοζύγιο και παχυσαρκία

Μία έρευνα των Mertens και Van Gaal έδειξε ότι τα παχύσαρκα άτομα τείνουν να έχουν υψηλότερες τιμές του ινωδογόνου, του παράγοντα VII, του παράγοντα VIII, του παράγοντα von Willebrand και του αναστολέα-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) σε σχέση με μη παχύσαρκα άτομα. Ειδικότερα, η κοιλιακή παχυσαρκία βρέθηκε ότι σχετίζεται με διαταραχές στο ινωδογόνο, τον παράγοντα VIII και τον παράγοντα von Willebrand [34].

Στα πλαίσια της ίδιας έρευνας, αποδείχθηκε ότι τα ίδια τα λιποκύτταρα είναι σε θέση να συνθέσουν τον αναστολέα-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1). Το γεγονός αυτό πιθανώς να εξηγεί τις υψηλές συγκεντρώσεις των παραπάνω παραγόντων σε παχύσαρκα άτομα. Επιπλέον, ο PAI-1 βρέθηκε ότι συσχετίζεται με όλα τα συστατικά του συνδρόμου αντίστασης στην ινσουλίνη, που είναι κοινό χαρακτηριστικό σε παχύσαρκα άτομα, και μπορεί να θεωρηθεί ως μία πραγματική συνιστώσα του μεταβολικού αυτού συνδρόμου. Η απώλεια βάρους φαίνεται να έχει ευεργετική επίδραση στον παράγοντα VII και πιθανώς υποβοηθείται από τη μείωση των τριγλυκεριδίων [34].

Επίσης, μία έρευνα που έγινε σε 52 υγιείς άνδρες έδειξε ότι τα άτομα με περισσότερο σπλαχνικό λίπος στην κοιλιακή περιοχή εμφάνισαν αυξημένο κίνδυνο θρομβογένεσης και είχαν υψηλότερα επίπεδα ινωδογόνου, παράγοντα VIII και αντιγόνου TPA, αυξημένη δραστηριότητα PAI-1 και μειωμένη δραστηριότητα TPA στο πλάσμα σε σχέση με άνδρες με λιγότερο σπλαχνικό λίπος [35].

2.3 Μειωμένη πρόσληψη ενέργειας και απώλεια βάρους

Στα πλαίσια μίας έρευνας του Roggi και των συνεργατών του, 52 υγιή παχύσαρκα άτομα με BMI μεγαλύτερο του 30 ακολούθησαν μία διατροφή πολύ χαμηλών θερμίδων για μία περίοδο τριών μηνών. Στα άτομα που είχαν τη μεγαλύτερη συμμόρφωση με τη δίαιτα, μειώθηκαν ο συμπιεσμένος όγκος των κυττάρων, το ιξώδες του αίματος, η συσσώρευση των ερυθροκυττάρων, τα επίπεδα της σφαιρίνης και ο αριθμός των λευκοκυττάρων ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα της λευκοματίνης. Ωστόσο, δεν υπήρξε καμιά επίδραση στη συγκέντρωση του ινωδογόνου [36].

Ακόμη μία έρευνα του Fanari και των συνεργάτες του σε δείγμα 20 υγιών παχύσαρκων εφήβων που ακολούθησαν μία δίαιτα 1000 θερμίδων την ημέρα για διάστημα ενός μήνα, έδειξε ότι πριν ξεκινήσουν τη συγκεκριμένη διατροφή, το επίπεδο του ινωδογόνου και το ιξώδες του πλάσματος ήταν σημαντικά υψηλότερα στα άτομα του δείγματος σε σχέση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου, που είχαν φυσιολογικό βάρος. Μετά την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατροφής, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο επίπεδο του ινωδογόνου, στο ιξώδες του πλάσματος και στον δείκτη συσσώρευσης των ερυθροκυττάρων σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές. Ωστόσο, το ιξώδες του αίματος δεν μεταβλήθηκε ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης διατροφής [37].

2.4 Διαιτητικά λίπη και έλαια

Τα διάφορα λιπαρά οξέα και η συνολική πρόσληψη λίπους στη διατροφή έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις λιποπρωτεΐνες ορού αίματος και σχετίζονται με τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νόσων. Οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη συσχέτιση της συνολικής πρόσληψης λίπους και των διαφόρων λιπαρών οξέων με τους αιμοστατικούς παράγοντες περισσότερο σε σχέση με άλλα διατροφικά συστατικά. Υπάρχει μία γενική ομοφωνία ότι η υψηλή πρόσληψη λιπών σχετίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα VII στο πλάσμα. Έρευνες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι μία υψηλή σε λιπαρά δίαιτα μπορεί να προκαλέσει προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα [38]. Μία μελέτη από τον Larsen και τους συνεργάτες του έδειξε ότι μετά από κατανάλωση υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά γεύματα αυξάνεται ραγδαία η πηκτική δράση του παράγοντα VII. Αυτή η ραγδαία αύξηση προκαλείται από μία αντίστοιχη αύξηση στη συγκέντρωση του ενεργοποιημένου παράγοντα VII. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η συσσώρευση τους έναντι της θρομβίνης συσχετίστηκε σημαντικά με την πρόσληψη κορεσμένων

λιπαρών οξέων, τόσο σε επιμέρους δείγματα όσο και σε ολόκληρη τη μελέτη. Επίσης, τα διαιτητικά κορεσμένα λίπη συνδέθηκαν με αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [39].

Μία άλλη έρευνα μελέτησε τα πολυακόρεστα και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Στα άτομα που ακολούθησαν μία δίαιτα πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα παρατηρήθηκε μία μείωση στα επίπεδα του PAI-1, η οποία σχετίζεται με την πτώση της ινσουλίνης [40]. Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο δεν επιβεβαιώθηκε από μία άλλη μελέτη (DELTA), η οποία αξιολόγησε τα αποτελέσματα της αντικατάστασης των κορεσμένων λιπαρών οξέων είτε από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα είτε από υδατάνθρακες. Επίσης, η μελέτη DELTA έδειξε ότι η αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων από υδατάνθρακες αύξησε τα επίπεδα του ινωδογόνου. Σε αντίθεση, τα επίπεδα του ινωδογόνου παρέμειναν αμετάβλητα όταν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα αντικαταστάθηκαν από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα του ινωδογόνου μπορεί να είναι ευαίσθητα στη συνολική πρόσληψη λίπους [41]. Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) μπορούν να μειώσουν την παραγωγή του PAF, ο οποίος συντελεί στην ενεργοποίηση και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [42].

Επειδή το ελαιόλαδο είναι βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής, αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να εκτιμηθεί κατά πόσο το ελαιόλαδο ή το κύριο συστατικό του, το ελαϊκό οξύ, είναι ικανά να επηρεάσουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Μία μελέτη από τον Junker και τους συνεργάτες του έδειξε ότι η κατανάλωση ελαιόλαδου μείωσε τους παράγοντες πήξης VIIc, XIIc, XIIa και Xc, ενώ η κατανάλωση ηλιέλαιου οδήγησε σε χαμηλότερη μείωση των παραγόντων πήξης XIIc, XIIa, και IXc. Χαμηλή δέσμευση ινωδογόνου στα αιμοπετάλια βρέθηκε μετά από διατροφή με ηλιέλαιο, ενώ η έκφραση της sP-σελεκτίνης και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν λίγο υψηλότερες μετά από διατροφή με ελαιόλαδο [43]. Μελέτες έχουν πιστοποιήσει την ύπαρξη αναστολέων της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι του PAF στο ελαιόλαδο και η χορήγηση αυτών των αναστολέων οδήγησε σε μείωση των αθηρωματικών πλακών σε υπερ-χοληστερολαιμικά κουνέλια [44]. Επιπλέον, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου, όπως η υδροξυτυροσόλη, μειώνουν σημαντικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι διαφόρων συσσωρευτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου και του PAF οδηγώντας σε πιθανή πρόληψη θρόμβων [44, 45, 46].

2.5 Ψάρια

Η τακτική κατανάλωση ψαριών, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ω-3 λιπαρά οξέα και α-λινολενικό οξύ, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και με δείκτες φλεγμονής (CRP, IL-6) [47]. Επίσης, φαίνεται τα ω-3 λιπαρά οξέα που περιέχονται στα ψάρια αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [48].

2.6 Βιταμίνη K

Η ονομασία βιταμίνη K αναφέρεται σε τρεις διακριτές λιποδιαλυτές ουσίες με παρόμοια δράση: τη βιταμίνη K1 ή φυλλοκινόνη που βρίσκεται στα φυτά, τη βιταμίνη K2 ή μενακινόνη, η οποία παράγεται από τα βακτήρια που βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα και τη βιταμίνη K3 ή μεναδιόνη, η οποία είναι συνθετικής προέλευσης.

Ο κύριος βιολογικός ρόλος της βιταμίνης K είναι ότι δρα ως συμπαραγόντας για το ένζυμο γ-γλουταμυλο-καρβοξυλάση, το οποίο τροποποιεί τους παράγοντες πήξης II, VII, IX και X με την προσθήκη μίας καρβοξυλικής ομάδας στα κατάλοιπα των γλουταμινικών οξέων των παραγόντων πήξεως. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στη δημιουργία του γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος. Με αυτόν τον τρόπο οι παράγοντες της πήξης γίνονται λειτουργικοί, καθώς τους επιτρέπεται να δεσμεύουν το ασβέστιο, έτσι ώστε στη συνέχεια να μπορούν να συνδεθούν στα φωσfolιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό είναι απαραίτητο για τη συγκέντρωση των συμπλεγμάτων των παραγόντων πήξης που είναι ιδιαίτερα ενεργά και τα οποία απαιτούνται για να προχωρήσει η πήξη και ο σχηματισμός θρόμβου [49].

Η βιταμίνη K είναι επίσης απαραίτητη για τη λειτουργία των πρωτεϊνών C, S και Z οι οποίες είναι σημαντικοί αναστολείς της πήξης. Η λειτουργία της πρωτεΐνης C είναι να υποβαθμίζει τους ενεργοποιημένους παράγοντες V και VIII μέσω της παρουσίας ασβεστίου. Η πρωτεΐνη S δρα ως συμπαραγόντας της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (πρωτεΐνη Ca), η οποία διεγείρει την πρωτεολυτική αδρανοποίηση των παραγόντων Va και VIIIa από την πρωτεΐνη Ca, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση της πήξης. Τέλος, η πρωτεΐνη Z αναστέλλει τον ενεργοποιημένο παράγοντα X [49, 50].

2.7 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μία λιποδιαλυτή οργανική ένωση με τη μορφή οκτώ ισομερών, τα οποία είναι γνωστά ως τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες. Από τα ισομερή αυτά, το πιο διαδεδομένο στη φύση και αυτό με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι η α-τοκοφερόλη. Η βιταμίνη E θεωρείται ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που προστατεύει τους ιστούς του σώματος από τις ελεύθερες ρίζες.

Η βιταμίνη E έχει αντιπηκτικές ιδιότητες καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ανταγωνίζεται τις επιδράσεις των παραγόντων πήξης. Μία αύξηση στη συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και απελευθερώνει προστακυκλίνες από το ενδοθήλιο. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην μείωση των επιπέδων του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης (ICAM-1) και του αγγειακού κυτταρικού μορίου προσκόλλησης (VCAM-1) μειώνοντας τη συσσώρευση των κυτταρικών συστατικών του αίματος στο ενδοθήλιο. Επίσης, η αύξηση στην έκφραση της κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης A2 και της κυκλοοξυγονάσης-1 λόγω της αυξορρύθμισης τους από τη βιταμίνη E στον καταρράκτη του αραχιδονικού οξέος, ενισχύει την απελευθέρωση της προστακυκλίνης, η οποία αποτελεί ένα ισχυρό αγγειοδιασταλτικό και αναστολέα της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων στους ανθρώπους. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι τοκοφερόλες φαίνεται να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της αναστολής της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και της αυξημένης δράση του νιτρικού οξειδίου [51].

Στο εργαστήριο, η προληπτική επίδραση της βιταμίνης E στο σχηματισμό θρόμβου φαίνεται να είναι δοσο-εξαρτώμενη. Σε εργαστηριακές μελέτες έχει βρεθεί σημαντική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μόνο σε πολύ μεγάλες δόσεις (> 800 IU / ημέρα), οι οποίες μπορούν επίσης να προκαλέσουν αυξημένο κίνδυνο για μώλωπες και αιμορραγία. Δόσεις μικρότερες των 400 IU / ημέρα έχουν επιφέρει αντιφατικές επιδράσεις στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [52, 53].

2.8 Βιταμίνη B9

Η βιταμίνη B9 ή φυλλικό οξύ είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη η οποία βρίσκεται στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι και λάχανο), στα φρούτα (πορτοκάλια, μπανάνες και φράουλες), στα όσπρια, στα δημητριακά ολικής αλέσεως, στο συκώτι, στο κρέας και στα θαλασσινά. Το φυλλικό οξύ δρα σαν συνένζυμο κατά τη σύνθεση και αναπαραγωγή του DNA συμβάλλοντας στην ομαλή

διαίρεση των κυττάρων. Η έλλειψη του φυλλικού οξέος μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στην παραγωγή θρομβοξάνης [54].

Μία έρευνα από τον Stott και τους συνεργάτες του έδειξε ότι το φυλλικό οξύ μαζί με τη βιταμίνη B12 συμβάλλουν στην καταστροφή των συσσωρευμένων ποσοτήτων ομοκυστεΐνης σε ηλικιωμένους ασθενείς, η οποία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα [55].

2.9 Μαγνήσιο

Το μαγνήσιο είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο υπάρχει σε όλους τους μαλακούς ιστούς και στα οστά στον ανθρώπινο οργανισμό. Απαντάται στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, (σπανάκι και μπρόκολο), στο καλαμπόκι, στη μπανάνα, στα όσπρια, στα αμύγδαλα, στα κάσιους, στη βρώμη, στα δημητριακά ολικής αλέσεως, στα θαλασσινά, στο κρέας και στα γαλακτοκομικά. Το μαγνήσιο φαίνεται να εμποδίζει πολλές από τις δράσεις του ασβεστίου [56]. Η έλλειψη μαγνησίου έχει συσχετιστεί με την αυξημένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό θρόμβου. Επίσης, τα επίπεδα μαγνησίου έχει βρεθεί ότι σχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα του παράγοντα von Willebrand [57, 58].

2.10 Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο βρίσκεται σε οργανική μορφή (σεληνομεθειονίνη) και σε ανόργανη μορφή (σεληνικό νάτριο και σεληνιώδες νάτριο). Τροφές πλούσιες σε σελήνιο είναι τα θαλασσινά, το κρέας, τα αυγά, οι ξηροί καρποί, τα δημητριακά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η έλλειψη σεληνίου έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων.

Το σελήνιο είναι απαραίτητο για τη δράση του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Μία έρευνα από τον Zbikowskaa και στους συνεργάτες του έδειξε ότι τα ανασταλτικά αποτελέσματα του σεληνίου στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης σύνθεσης και απελευθέρωσης δευτερογενών αγωνιστών (TXA₂, ADP) σε διεγερμένα αιμοπετάλια. Είναι επίσης πιθανό ότι το σελήνιο εμποδίζει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τις μεμβράνες των αιμοπεταλίων [59].

Επίσης, μία έρευνα που έγινε από τον Qayyum και τους συνεργάτες του σε 14.439 συμμετέχοντες έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα σεληνίου στο πλάσμα του αίματος σχετίζονται με υψηλό αριθμό

αιμοπεταλίων. Η συσχέτιση αυτή μπορεί να μετριάσει μερικώς την αντιοξειδωτική δράση του σεληνίου στη θρόμβωση και την αθηροσκλήρωση [60].

2.11 Αλκοόλ

Το αλκοόλ δεν ανήκει στα θρεπτικά συστατικά αλλά αποτελεί σημαντικό στοιχείο της διατροφής και της κοινωνικής ζωής των περισσότερων ανθρώπων. Επιπλέον, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών δρα προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων καθώς ελαττώνει προθρομβωτικούς παράγοντες, όπως το ινωδογόνο [61]. Τα βιοενεργά συστατικά του κρασιού, όπως οι φαινόλες, τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια, πιστεύεται ότι συντελούν στην προστατευτική του δράση απέναντι στα καρδιαγγειακά νοσήματα [62, 63]. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι οι μηχανισμοί των βιοενεργών συστατικών του κρασιού ενισχύουν την αναστολή του αραχιδονικού οξέος και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [64]. Τέλος, η ρεσβερατρόλη και κερκετίνη, οι οποίες είναι οι φαινολικές ενώσεις του κρασιού, φαίνεται ότι αναστέλλουν τον PAF και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [65]. Πιο συγκεκριμένα το λευκό κρασί (Robola) και το κόκκινο κρασί (Cabernet Sauvignon) έχει βρεθεί ότι περιέχουν, εκτός από τους αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι του PAF και μικροσυστατικά τα οποία ενδέχεται να ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του PAF [66]. Σε αυτό το πλαίσιο φάνηκε ότι η κατανάλωση του λευκού κρασιού Robola και του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon παράλληλα με ένα γεύμα μείωσε την ικανότητα των αιμοπεταλίων για συσσώρευση έναντι του PAF. Αυτή η δράση φάνηκε να είναι ανεξάρτητη της αιθανόλης και αποδόθηκε στην ύπαρξη των μικροσυστατικών του κρασιού επιβεβαιώνοντας τα *in vitro* αποτελέσματα [66]

2.12 Αλόη (aloe vera)

Η αλόη περιλαμβάνει πάνω από 400 είδη που ανήκουν στην οικογένεια των κρινοειδών (Liliaceae) και χρησιμοποιείται ως ιατρικό σκεύασμα εδώ και χιλιετίες. Η αλόη βέρα ή αλλιώς *Aloe barbadensis* είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φαρμακευτικό φυτό με πολλές θεραπευτικές ιδιότητες. Το ζελέ που περιέχεται στα φύλλα του έχει αντιφλεγμονώδη, ανοσοδιεγερτική και ανοσορρυθμιστική δράση.

Σε μία *in vitro* μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση του Acemannan Immunostimulant (ACM), το οποίο είναι ένα παράγωγο της αλόης, σε απομονωμένα ανθρώπινα ουδετερόφιλα κύτταρα για να αξιολογηθεί αν η παρουσία του ACM επηρεάζει την κινητικότητα των ουδετερόφιλων ή τον μηχανισμό της κυτταρικής προσκόλλησης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η παρουσία

ACM δεν είχε καμία επίδραση στην προσκόλληση των ουδετερόφιλων σε κύτταρα επιμολυσμένα με P-σελεκτίνη και E-σελεκτίνη και δεν ενεργοποίησε τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα [67].

2.13 Πράσινο τσάι και κατεχίνες

Οι κατεχίνες είναι φλαβονοειδή αντιοξειδωτικά. Κύρια πηγή των κατεχινών είναι το πράσινο τσάι καθώς οι κατεχίνες απαντώνται στα φύλλα του. Η ωφέλιμη δράση των κατεχινών είναι πολλαπλή καθώς υπάρχουν πέντε βασικές τους μορφές, καθεμία με συγκεκριμένες ιδιότητες: κατεχίνη (C), επικατεχίνη (EC), επιγαλλοκατεχίνη (EGC), επικατεχίνη γαλλικού εστέρα (ECG) και επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα (EGCG).

Έχει διαπιστωθεί ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι κατεχίνες αναστέλλουν την κινητοποίηση του ασβεστίου μέσω της ενεργοποίησης του συνενζύμου ασβεστίου και ATPάσης και της αναστολής του σχηματισμού 1,4,5-τριφωφορική ινοσιτόλης στα αιμοπετάλια. Δεδομένα από πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η EGCG αναστέλλει τη δράση της φωσφολιπάσης Cγ2 αλλά αυξάνει την παραγωγή της προσταγλανδίνης D2. Επιπλέον, η ECG και η EGCG μπορούν να μειώσουν την παραγωγή του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσω-PAF ακετυλοτρανσφεράση και μειώνοντας έτσι την κολλητικότητα των αιμοπεταλίων και την πιθανότητα συσσώρευσής τους. Επίσης, οι κατεχίνες μπορούν να μειώσουν την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και τη δράση της συνθάσης της θρομβοξανθής A2 [68].

2.14 Σοκολάτα και κακάο

Τα οφέλη της σοκολάτα και του κακάο στη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος έχουν αποδειχθεί από αρκετές μελέτες. Μία έρευνα του Innes και των συνεργατών του έδειξε ότι η μαύρη σοκολάτα μπορεί να επηρεάσει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ωστόσο τα αιμοπετάλια δεν βρέθηκε να επηρεάζονται από τη λευκή σοκολάτα και τη σοκολάτα γάλακτος. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην ανασταλτική δράση των φλαβανολών που περιέχονται στο κακάο. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι συμμετέχοντες κατανάλωναν περίπου 100 gr μαύρης σοκολάτας με περιεκτικότητα σε κακάο 75%. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι η μαύρη σοκολάτα βοηθάει στην πρόληψη του σχηματισμού θρόμβου και ότι μπορεί να παρέχει την ίδια προστασία όπως η λήψη ασπιρίνης [69].

Μία μελέτη του Bordeaux και των συνεργατών του έδειξε ότι η περιστασιακή κατανάλωση σοκολάτας είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [70]. Επιπλέον, η κατανάλωση κακάο σε μορφή ροφήματος επιδρά στη σωστή λειτουργία του ενδοθηλίου και τη διαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου. Επίσης, μέσω της αναστολής της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, η κατανάλωση κακάο συμβάλλει στην ενεργοποίηση της σύνθεσης αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και στη μείωση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών [71, 72].

2.15 Μέλι

Μία έρευνα από τον Ahmed και τους συνεργάτες του μελέτησε in vitro την επίδραση του μελιού στην αιμόσταση του αίματος. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η προσθήκη μελιού σε δείγματα αίματος περιόρισε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και αύξησε το χρόνο πήξης του αίματος. Το μέλι εμπόδισε τους παράγοντες ενεργοποίησης και στις τρεις οδούς του καταρράκτη πήξης (ενδογενή οδό, εξωγενή οδό και κοινή οδό) και ελάττωσε τα επίπεδα του ινωδογόνου. Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες του μελιού αποδίδονται από τους ερευνητές στα φλαβονοειδή που περιέχει, τα οποία πιστεύεται ότι επηρεάζουν τη δράση των παραγόντων πήξης, όπως του παράγοντα VII και του ινωδογόνου [73].

2.16 Κρεμμύδι και σκόρδο

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση κρεμμυδιού προσφέρει πολλά οφέλη στην υγεία, καθώς περιέχει φλαβονοειδή και κυρίως κερκετίνη, μία αντιοξειδωτική ουσία, της οποίας η δράση συνδέεται με την αναστολή των μηχανισμών που οδηγούν στην απόφραξη των αρτηριών και κατά συνέπεια στην αποτροπή του σχηματισμού θρόμβων. Επίσης, η κερκετίνη σε συνδυασμό με το χρώμιο και τη βιταμίνη Β6 μειώνουν τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα, η οποία αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μία μετα-ανάλυση από τους Huxley και Neil σε 100.000 ανθρώπους έδειξε ότι η όσοι κατανάλωναν συχνά κρεμμύδι είχαν 20% λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν καρδιαγγειακά νοσήματα [74].

Το σκόρδο και τα βασικά συστατικά του έχουν επίσης αποτελέσει αντικείμενο διερεύνησης πλήθους μελετών. Το ενεργό συστατικό του σκόρδου είναι η αλισίνη, η οποία αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα που εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η κατανάλωση ωμού σκόρδου, ελαίου σκόρδου και άλλων εκχυλισμάτων σκόρδου έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων η

οποία προκλήθηκε *in vitro* μέσω της χρήσης ADP, κολλαγόνου, αραχιδονικού οξέος, επινεφρίνης και ιονοφόρου του ασβεστίου. Επίσης, η χρόνια κατανάλωση σκόνης σκόρδου και ελαίου σκόρδου εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [75].

2.17 Κανέλα

Η κανέλα αποτελεί ένα μοναδικό μπαχαρικό με σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και θεραπευτικές ιδιότητες. Τα συστατικά της κανέλας παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση και αντισηπτικές, θερμαντικές και αντιρυτιδικές ιδιότητες. Το έλαιο κινναμαλδεΰδη, η οποία προκαλεί το άρωμα και τη γεύση της κανέλλας, έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα και προφυλάσσει τον οργανισμό από καρδιαγγειακά νοσήματα [76].

2.18 Γιαούρτι

Το γιαούρτι είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται ύστερα από ζύμωση του γάλακτος με ειδικά οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*). Τα βακτήρια αυτά προκαλούν την πήξη του γάλακτος και διαμορφώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού. Μία *in vitro* βιολογική μελέτη λιπιδίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού έδειξε μικρή παραγωγή του PAF σε αγελαδινό γάλα υπό επώαση για την παρασκευή γιαουρτιού. Τα λιπίδια του γιαουρτιού παρουσίασαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση απέναντι στο PAF σε σύγκριση με τα λιπίδια του νωπού γάλακτος και του γάλακτος υπό επώαση. Η επώαση του γάλακτος με καλλιέργεια γιαουρτιού που περιείχε *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* είχε ως αποτέλεσμα να βιοσυντεθούν σημαντικές ποσότητες των αναστολέων PAF [77].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

3.1 Εισαγωγή

Στο προηγούμενο κεφάλαιο εξετάστηκαν οι τρόποι με τους οποίους η διατροφή μπορεί να επηρεάζει την εμφάνιση διαταραχών στην αιμόσταση του αίματος. Στο παρόν κεφάλαιο εξετάζεται κατά πόσο η λήψη ορισμένων διατροφικών συμπληρωμάτων μπορεί να εφαρμοστεί για την πρόληψη ή και τη θεραπεία διαταραχών στην αιμόσταση. Καθώς είναι δύσκολο να διαχωριστεί η διαδικασία της αιμόστασης από αυτή της φλεγμονής, παρουσιάζονται κλινικές μελέτες που εξετάζουν την επίδραση ορισμένων συμπληρωμάτων διατροφής σε κάποιον παράγοντα αιμόστασης ή μόρια προσκόλλησης ή ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, όπως οι σελεκτίνες, τα μόρια προσκόλλησης VCAM και ICAM, ο PAI-1 και οι θρομβοξάνες.

3.2 Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται στα σταφύλια, στα μούρα και γενικά στα φρούτα που έχουν μωβ χρώμα. Περιέχεται επίσης στο κόκκινο κρασί καθώς και στις ρίζες του φυτού *Polygonum cuspidatum*, από το οποίο παρασκευάζονται πολλά συμπληρώματα διατροφής. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν ρεσβερατρόλη μπορούν να μειώσουν τη φλεγμονή σε άτομα με καρδιαγγειακά νοσήματα, αντίσταση στην ινσουλίνη, γαστρίτιδα καθώς και άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Μία τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα μελέτη σε 44 υγιείς εθελοντές έδειξε ότι η καθημερινή χορήγηση συμπληρώματος *trans*-ρεσβερατρόλης (400 mg), εκχυλίσματος σταφυλιού (400 mg) και κουεσερτίνης (100 mg) επί 30 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των επιπέδων της IL-8 και των μορίων ICAM-1 και VCAM-1 στο πλάσμα του αίματος. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας υποδηλώνουν ότι η μείωση της έκφρασης των ICAM-1, VCAM-1 και IL-8 στα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό που συμβάλει στα ευεργετικά αποτελέσματα της ρεσβερατρόλης στην καρδιαγγειακή λειτουργία. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) στο πλάσμα του αίματος των ατόμων που λάμβαναν το συμπλήρωμα [78].

Στα πλαίσια μία άλλης τυχαιοποιημένης διπλά-τυφλής, ελεγχόμενης με εικονικό σκεύασμα μελέτης συγκρίθηκε η επίδραση της ημερήσιας πρόσληψης συμπληρώματος με εκχύλισμα σταφυλιού που περιείχε ρεσβερατρόλη (8 mg επί 6 μήνες και στη συνέχεια 16 mg επί 6 ακόμη μήνες) σε σχέση με την πρόσληψη συμπληρώματος με εκχύλισμα σταφυλιού χωρίς ρεσβερατρόλη σε 75 άτομα με υψηλό κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Η χορήγηση του συμπληρώματος ρεσβερατρόλης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της εικόνας των φλεγμονωδών δεικτών, καθώς μειώθηκαν τα επίπεδα της CRP, του TNF-α και του PAI-1 [79].

3.3 Σταφύλι

Τα σταφύλια, ακόμη και αν δεν περιέχουν ρεσβερατρόλη, λόγω των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχουν έχουν αντιθρομβωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Στα πλαίσια μίας διπλά-τυφλής μελέτης διασταυρούμενης μετάβασης χορηγήθηκε χυμός μωβ σταφυλιού ή εικονικό σκεύασμα για 14 ημέρες σε 20 ασθενείς που είχαν εμφανίσει στεφανιαία νόσο και ήταν σε τυπική φαρμακευτική αγωγή. Από τους 20 ασθενείς του δείγματος, οι 10 είχαν υπέρταση και οι 4 ήταν ενεργοί καπνιστές. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα των δεικτών θρομβωτικής λειτουργίας και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, όπως η sP-σελεκτίνη και η θρομβοξάνη B2 (TxB2), καθώς και των γενικών φλεγμονωδών δεικτών, όπως η CRP και η IL-8, δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση του συμπληρώματος. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ελάττωση της τιμής των δεικτών φλεγμονής που εξαρτώνται από αιμοπετάλια, όπως το υπεροξειδίο και ο διαλυτός συνδέτης CD40 [80].

3.4 Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού

Το τσάι είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ροφήματα που καταναλώνονται παγκοσμίως. Προέχεται από τα φύλλα της κινεζικής Καμέλιας και μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις τύπους ανάλογα με το επίπεδο της οξειδωσης που έχει υποστεί, σε πράσινο τσάι (μη οξειδωμένο), τσάι oolong (μερικώς οξειδωμένο) και μαύρο τσάι (οξειδωμένο). Από τα παραπάνω είδη τσαγιού, το πράσινο τσάι έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε κατεχίνες λόγω του ότι έχει υποστεί πολύ λίγη οξείδωση κατά τη διαδικασία παρασκευής του. Οι κύριες κατεχίνες που περιέχονται στο πράσινο τσάι είναι η Κατεχίνη (C), Επικατεχίνη (EC), Επιγαλλοκατεχίνη (EGC), Επικατεχίνη Γαλλικού Εστέρα (ECG) και Επιγαλλοκατεχίνη Γαλλικού Εστέρα (EGCG). Τις τελευταίες δεκαετίες αρκετές έρευνες έχουν

μελετήσει τα οφέλη του τσαγιού και ιδιαίτερα του πράσινου, ειδικά σε ότι αφορά την πιθανότητα να μειώνει τον κίνδυνο θρόμβωσης, εγκεφαλικού επεισοδίου ή στεφανιαίας νόσου.

Μία κλινική μελέτη του Lee και των συνεργατών του ερεύνησε τη μακροπρόθεσμη επίδραση της κατανάλωσης 150 ml πράσινου τσαγιού 4 φορές την ημέρα σε 20 ενήλικες άρρενες καπνιστές επί 4 εβδομάδες. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τους ζητήθηκε να απέχουν από την κατανάλωση κρασιού και άλλων αντιοξειδωτικών διατροφικών συμπληρωμάτων. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η κατανάλωση πράσινου τσαγιού μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της διαλυτής P-σελεκτίνης (sP-σελεκτίνης) στο πλάσμα του αίματος ύστερα από 2 και 4 εβδομάδες. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των διαλυτών VCAM-1 και ICAM-1 [81].

Στα πλαίσια μίας τυχαιοποιημένης μελέτης ερευνήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης μαύρου τσαγιού, πράσινου τσαγιού και πολυφαινόλων που είχαν εξαχθεί από πράσινο τσάι στους δείκτες φλεγμονής, αιμόστασης και ενδοθηλιακής λειτουργίας σε 64 υγιείς καπνιστές επί 4 εβδομάδες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η κατανάλωση τσαγιού δεν επέδρασε στα επίπεδα της IL-6, της IL-1β, του TNF-α, της CRP, του ινωδογόνου, του vWF, του PAI-1, του FVIIa και της u-PA [82].

3.5 Κακάο

Το κακάο είναι ένα αφέψημα με ιδιαίτερη πλούσια διατροφική αξία για τον οργανισμό. Περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σε φλαβονοειδή και προκυανιδίνες, συστατικά τα οποία έχουν αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Έχει αποδειχθεί ερευνητικά ότι τα φλαβονοειδή και οι προκυανιδίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής [83].

Μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολόγησε τις επιπτώσεις της ημερήσιας χορήγησης συμπληρώματος κακάο (234 mg φλαβονολών κακάο και προκυανιδινών) σε σχέση με τη χορήγηση εικονικού συμπληρώματος σε 32 υγιείς εθελοντές επί 28 ημέρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ομάδα που κατανάλωνε το συμπλήρωμα κακάο είχε σημαντική μείωση στην έκφραση της sP-σελεκτίνης. Επίσης, ελαττώθηκε σημαντικά η συσσωμάτωση αιμοπεταλίων σε δείγματα αίματος της ομάδας παρέμβασης προκαλούμενη τόσο από ADP όσο και από κολλαγόνο [84].

Σε μία άλλη μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση της ημερήσιας χορήγησης συμπληρώματος κακάο (36,9 g μαύρης σοκολάτας και 30,95 g ροφήματος σκόνης κακάο) σε 25 υγιείς εθελοντές επί 6 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην έκφραση της sP-σελεκτίνης, καθώς και των IL-1β, IL-6, TNF-α και hsCRP [85].

Τέλος, μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολόγησε τις επιπτώσεις της χορήγησης συμπληρώματος κακάο πλούσιου σε φλαβανόλες σε 40 ασθενείς με στεφανιαία νόσο επί 6 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν έδειξαν καμία μείωση στα επίπεδα των διαλυτών μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 ή στην έκφραση της sP-σελεκτίνης και της E-σελεκτίνης τόσο στην ομάδα παρέμβασης όσο και στην ομάδα ελέγχου [86].

3.6 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών φλαβονοειδών. Αφθονούν σε έναν αριθμό φρούτων και λαχανικών (π.χ. βατόμουρα, κεράσι, κρεμμύδι, κόκκινο λάχανο), στα οποία προσδίδουν ένα χαρακτηριστικό χρώμα, όπως κόκκινο, μπλε ή μωβ. Η κατανάλωση ανθοκυανινών επηρεάζει ευεργετικά το λιπιδικό προφίλ και τις φλεγμονώδεις διαταραχές.

Μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολόγησε τις επιπτώσεις της ημερήσιας χορήγησης συμπληρώματος ανθοκυανινών (320 mg) ή εικονικού σκευάσματος σε 146 ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία επί 24 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα της διαλυτής P-σελεκτίνης στο πλάσμα μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα του συμπληρώματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του PAI-1 [87].

Σε μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή διασταυρούμενη μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολογήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης ανθοκυανινών που εμπεριέχονταν σε χυμό δαμάσκηνου. 21 υγιείς εθελοντές χωρίστηκαν σε 3 ομάδες. Οι συμμετέχοντες στην πρώτη ομάδα κατανάλωναν ημερησίως 200 ml χυμού δαμάσκηνου εμπλουτισμένου σε ανθοκυανίνες, στη δεύτερη ομάδα 200 ml απλού χυμού δαμάσκηνου και στην τρίτη ομάδα αντίστοιχης ποσότητας χυμού ίδιου χρώματος ως εικονικού συμπληρώματος επί 28 ημέρες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι μόνο στην ομάδα που κατανάλωνε συμπλήρωμα χυμού δαμάσκηνου εμπλουτισμένου με ανθοκυανίνες ελαττώθηκε σημαντικά η έκφραση της sP-σελεκτίνης [88].

Τέλος, σε μία άλλη τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή διασταυρούμενη μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολογήθηκε η επίδραση της χορήγησης συμπληρώματος ανθοκυανινών σε 31 υγιείς άνδρες με πίεση αίματος μεγαλύτερη από 140/90 mm Hg επί 4 εβδομάδες. Η ομάδα παρέμβασης λάμβανε δύο φορές την ημέρα τέσσερις κάψουλες Medox που περιείχαν 17 διαφορετικές ανθοκυανίνες. Η κάθε κάψουλα περιείχε 80 mg ανθοκυανινών που προέρχονταν από την επεξεργασία μύρτιλου και μαύρης σταφίδας. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης, του ICAM-1 και του VCAM-1 στο πλάσμα αίματος των συμμετεχόντων [89].

3.7 Βιταμίνες E και C

Η βιταμίνη E είναι μία λιποδιαλυτή ουσία που απαντάται σε πολλές τροφές, όπως στα φυτικά έλαια, στους ξηρούς καρπούς, στα όσπρια και στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Όντας λιποδιαλυτή ουσία, η βιταμίνη E παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού εμποδίζοντας την οξείδωση των λιπαρών οξέων και την εμφάνιση των ελευθέρων ριζών. Επίσης, βελτιώνει την κυκλοφορία του αίματος, μειώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και βοηθάει στην αποφυγή του σχηματισμού θρόμβων.

Η βιταμίνη C είναι μία υδατοδιαλυτή ουσία, την οποία ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει από μόνος του και για το λόγο αυτό θα πρέπει λαμβάνεται από τις τροφές. Είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό και τη σωστή λειτουργία του συνδετικού ιστού. Βοηθάει στον σχηματισμό κολλαγόνου και στην επούλωση των τραυμάτων. Επίσης, βοηθάει στην παραγωγή των στεροειδών και των θυρεοειδικών ορμονών. Διευκολύνει την απορρόφηση του σιδήρου από τον οργανισμό και αυξάνει την παραγωγή λευκοκυττάρων και αντισωμάτων στο πλάσμα τους αίματος. Επιπλέον, η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι η βιταμίνη C έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και αντιοξειδωτική δράση που μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά της να ρυθμίζει τη δραστηριότητα δέσμευσης του πυρηνικού παράγοντα κάππα B (NF-κB) [90].

Η κατανάλωση συμπληρωμάτων βιταμίνης E έχει αποδειχθεί ερευνητικά ότι συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Επίσης, ένας αριθμός μελετών έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός των βιταμινών E και C έχει καρδιοπροστατευτική δράση και συμβάλλει στην καλή λειτουργία της αιμόστασης και στην αποφυγή της φλεγμονής.

Στα πλαίσια μίας τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης με εικονικό σκεύασμα συμμετείχαν 47 ασθενείς με αθηροσκλήρωση πριν και μετά από επέμβαση διαδερμικής διαλυτικής στεφανιαίας αγγειοπλαστικής (PTCA). Σε 23 ασθενείς χορηγήθηκαν καθημερινά 800 IU βιταμίνης E ενώ σε 24 ασθενείς χορηγήθηκε εικονικό σκεύασμα επί 4 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα του αίματος μετά από την επέμβαση αυξήθηκαν σημαντικά περισσότερο στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το συμπλήρωμα. Αντίθετα, τα επίπεδα του μορίου προσκόλλησης sICAM-1 δεν αυξήθηκαν σημαντικά σε καμία από τις δύο ομάδες [91].

Μία άλλη τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα ερεύνησε την επίδραση της ημερήσιας πρόσληψης συμπληρώματος 400 IU βιταμίνης E ή εικονικού σκευάσματος σε 110 ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο επί 6 μήνες. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των μορίων προσκόλλησης sICAM-1 και sVCAM-1 καθώς και στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα του αίματος σε καμία από τις δύο ομάδες [92].

Στα πλαίσια μίας μελέτης ασθενών-μαρτύρων, χορηγήθηκαν καθημερινά 12.000 IU βιταμίνης E (α-τοκοφερόλης) σε 75 εθελοντές επί 3 μήνες. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συμμετείχαν 23 διαβητικοί ασθενείς με μακροαγγειακές επιπλοκές, στη δεύτερη ομάδα 24 διαβητικοί ασθενείς χωρίς μακροαγγειακές επιπλοκές και στην τρίτη ομάδα 25 υγιείς εθελοντές με παρόμοια χαρακτηριστικά, όπως ηλικία, φύλλο και BMI. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα επίπεδα του PAI-1 και της διαλυτής P-σελεκτίνης μειώθηκαν σημαντικά ως αποτέλεσμα της χορήγησης του συμπληρώματος και στις τρεις ομάδες. Επιπλέον, η μείωση στα επίπεδα του PAI-1 υπήρξε σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα με τους διαβητικούς ασθενείς με μακροαγγειακές επιπλοκές σε σύγκριση με την ομάδα των διαβητικών χωρίς μακροαγγειακές επιπλοκές [93].

Σε μία άλλη μελέτη ασθενών-μαρτύρων, χορηγήθηκαν καθημερινά 600 mg συμπληρώματος βιταμίνης E επί 2 εβδομάδες σε 20 ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία και 20 υγιείς εθελοντές, με παρόμοια χαρακτηριστικά, όπως ηλικία και φύλλο. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα του αίματος μειώθηκαν σημαντικά (κατά 40%) στην ομάδα των υπερχοληστερολαιμικών ασθενών [94].

Εκατό ασθενείς με ασυμπτωματική ή μέτρια συμπτωματική, ήπια αορτική στένωση έλαβαν μέρος σε μία τυχαιοποιημένη μελέτη ανοικτής ετικέτας ως προς την επίδραση των βιταμινών E και C στα

επίπεδα ορού των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. 41 ασθενείς λάμβαναν ημερήσια δόση βιταμίνης E (400 IU) και βιταμίνης C (1000 mg) και 39 ασθενείς λάμβαναν ημερήσια δόση μόνο βιταμίνης C (1000 mg) επί 6 μήνες ενώ 20 ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα ορού του ICAM-1, της E-σελεκτίνης, της sP-σελεκτίνης, του VCAM-1, της CRP και της βιταμίνης E μετρήθηκαν με ένζυμο-συνδεδεμένη ανοσορροφητική δοκιμασία κατά την έναρξη της μελέτης και μετά τη χορήγηση των συμπληρωμάτων. Οι μισοί από τους ασθενείς από τις δύο ενεργές ομάδες παρακολουθήθηκαν για 6 περαιτέρω μήνες ώστε να εντοπιστούν μεταβολές μετά τη διακοπή της θεραπείας. Στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε συνδυασμός βιταμινών E και C υπήρξε σημαντική μείωση στα επίπεδα ορού του ICAM-1 ενώ στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο βιταμίνη C υπήρξε σημαντική μείωση στα επίπεδα ορού της sP-σελεκτίνης. Επίσης, παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και στην πρώτη ομάδα [95].

Στα πλαίσια μίας μονά-τυφλής ελεγχόμενης μελέτης ερευνήθηκε η επίδραση της ημερήσιας χορήγησης αντιοξειδωτικού συμπληρώματος που περιείχε βιταμίνη E (300 mg), βιταμίνη C (250 mg) και N-ακετυλοκυστεΐνη (600 mg) σε 46 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, 46 ασθενείς με εξασθενημένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT) και 46 υγιή άτομα. Τα μέλη των τριών ομάδων είχαν ήδη τεθεί σε μία ελεγχόμενη και ισορροπημένη διαίτα επί 10 ημέρες πριν τη χορήγηση του αντιοξειδωτικού συμπληρώματος. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η κατανάλωση του αντιοξειδωτικού συμπληρώματος μείωσε σημαντικά τις τιμές του vWF και του VCAM-1 και στις τρεις ομάδες του πειράματος [96].

Τέλος, μία κλινική μελέτη από τον Accioppi και τους συνεργάτες του είχε ως στόχο να αξιολογήσει τα αποτελέσματα της συνδυασμένης χορήγησης διατροφικών συμπληρωμάτων που περιλαμβάνουν βιταμίνη E, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, νιασίνη και γ-ορυζανόλη σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία. 57 δυσλιπιδαιμικοί εθελοντές χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες στα μέλη των οποίων χορηγήθηκαν διατροφικά συμπληρώματα καθημερινά επί 4 μήνες. Τα μέλη της ομάδας A λάμβαναν εικονικό σκεύασμα, τα μέλη της ομάδας B λάμβαναν συμπλήρωμα με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και βιταμίνη E και τα μέλη της ομάδας C λάμβαναν το ίδιο συμπλήρωμα με επιπλέον γ-ορυζανόλη και νιασίνη. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα επίπεδα του TNF-α και της θρομβοξάνης B2 μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδες B και C ενώ τα επίπεδα της IL-1β μειώθηκαν σημαντικά μόνο στην ομάδα C [97].

3.8 Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D είναι μία λιποδιαλυτή ουσία η οποία είτε παράγεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της απορρόφησης της υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας από το δέρμα είτε προσλαμβάνεται από ορισμένες τροφές πλούσιες σε αυτή. Η βιταμίνη D έχει δύο μορφές: τη βιταμίνη D2 (εργοκαλσιφερόλη), η οποία ανευρίσκεται στις τροφές, και τη βιταμίνη D3 (χοληκαλσιφερόλη), η οποία παράγεται μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ορμονικά δραστική ουσία της βιταμίνης D είναι η 1,25-διυδροξυχοληκαλσιφερόλη D (καλσιτριόλη).

Τα τελευταία χρόνια αρκετές κλινικές μελέτες ελεγχόμενες με εικονικό σκεύασμα έχουν διεξαχθεί καθώς η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και με καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σε μία πιλοτική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη ερευνήθηκε η επίπτωση της χορήγησης συμπληρώματος βιταμίνης D σε 40 ασθενείς με φλεβοθρόμβωση ή πνευμονική εμβολή που παρουσίαζαν ανεπάρκεια βιταμίνης D. Η ομάδα παρέμβασης λάμβανε 50.000 IU βιταμίνης D3 κάθε εβδομάδα επί 8 εβδομάδες ενώ η ομάδα ελέγχου λάμβανε εικονικό σκεύασμα χωρίς βιταμίνη D. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η θεραπεία της ανεπάρκειας της βιταμίνης D δεν είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και της hs-CRP [98].

Σε μία άλλη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη ερευνήθηκε η επίπτωση της χορήγησης υψηλών δόσεων βιταμίνης D σε 60 ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολή ή πνευμονική εμβολή. Στην ομάδα παρέμβασης χορηγήθηκε ενδομυϊκή εφάπαξ δόση 300.000 IU βιταμίνης D. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα παρέμβασης, ωστόσο η μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντική [99].

3.9 Βιταμίνη B9

Η βιταμίνη B9 ή φυλλικό οξύ παίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του DNA και του RNA. Επίσης, είναι απαραίτητη για τις περιόδους γρήγορης ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως είναι η περίοδος της εγκυμοσύνης. Τα χαμηλά επίπεδα του φυλλικού οξέος στο αίμα μπορούν να αυξήσουν την ομοκυστεΐνη, ένα αμινοξύ η αύξηση του οποίου σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολόγησε τις επιπτώσεις της χορήγησης συμπληρώματος φυλλικού οξέος (5 mg/ημέρα) ή εικονικού σκευάσματος σε 24 υγιείς χρόνιους καπνιστές επί 4 εβδομάδες. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα της μελέτης, η χορήγηση συμπληρώματος φυλλικού οξέος μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, του ινωδογόνου πλάσματος, και του D-διμερούς στα άτομα της πειραματικής ομάδας σε σύγκριση με τα άτομα που λάμβαναν εικονικό σκεύασμα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της CRP, του vWF και του παράγοντα VIII [100].

Σε μία τυχαιοποιημένη μελέτη με εικονικό σκεύασμα αξιολογήθηκε η επίδραση της καθημερινής χορήγησης συμπληρώματος φυλλικού οξέος (0,8 mg) σε 267 ενηλικιωμένους επί ένα έτος στους αιμοστατικούς και φλεγμονώδεις δείκτες. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας έδειξαν ότι η ημερήσια κατανάλωση φυλλικού οξέος μείωσε τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα σε σύγκριση με τη λήψη εικονικού σκευάσματος. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα του vWF, του ιστικό παράγοντα, του παράγοντα VIIa, του ινωδογόνου και της CRP [101].

Στα πλαίσια μία άλλης τυχαιοποιημένης, διπλά-τυφλής μελέτης ελεγχόμενης με εικονικό σκεύασμα ερευνήθηκε η επίδραση της ημερήσιας πρόσληψης συμπληρώματος φυλλικού οξέος στους δείκτες φλεγμονής. Συμμετείχαν 530 άνδρες και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, τα μέλη των οποίων λάμβαναν καθημερινά επί ένα έτος συμπλήρωμα φυλλικού οξέος 0,8 mg ή εικονικό σκεύασμα αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα της CRP και του ICAM-1 ως αποτέλεσμα της χορήγησης συμπληρώματος φυλλικού οξέος [102].

Τέλος, σε μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα ερευνήθηκε η επίδραση της ημερήσιας κατανάλωσης συμπληρώματος φυλλικού οξέος και βιταμίνης B6 στους δείκτες της ενδοθηλιακής λειτουργίας και χρόνιας φλεγμονής. 158 υγιή ασυμπτωματικά αδέρφια ασθενών με πρώιμη αθηροσκληρωτική νόσο λάμβαναν καθημερινά συμπλήρωμα φυλλικού οξέος (5 mg) και βιταμίνης B6 (250 mg) ή εικονικό σκεύασμα επί δύο χρόνια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης και η συγκέντρωση ουρικής αλβουμίνης/κρεατινίνης μειώθηκαν ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης του συμπληρώματος. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα της διαλυτής E-σελεκτίνης, του VCAM-1, του vWF, του PAI-1 και της CRP [103].

3.10 Βιταμίνη Ρ

Η βιταμίνη Ρ ή αλλιώς εσπεριδίνη είναι ένα φλαβανοειδές γλυκοσίδιο που ανήκει στην ομάδα των φλαβανοειδών. Περιέχεται σε όλα τα εσπεριδοειδή και κυρίως στα πορτοκάλια. Η εσπεριδίνη έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και συντελεί στην καλή ενδοθηλιακή λειτουργία.

Σε μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα αξιολογήθηκε η επίδραση της καθημερινής χορήγησης συμπληρώματος εσπεριδίνης (450 mg) σε 68 παχύσαρκους εθελοντές επί 6 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι υπήρξε μία τάση ελάττωσης στα επίπεδα του sICAM-1, του sVCAM-1 και της sP-σελεκτίνης. Επίσης, στους συμμετέχοντες με μεσαία ροή της διαστολής μεγαλύτερη ή ίση του 3%, υπήρξε σημαντική μείωση στα επίπεδα των sICAM-1 και sVCAM-1 [104].

3.11 Σελήνιο

Το σελήνιο αποτελεί ένα πολύτιμο ιχνοστοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή, στη σύνθεση του DNA, στον μεταβολισμό της θυροξίνης, στο ανοσοποιητικό σύστημα, στις ηπατικές βλάβες, στα καρδιαγγειακά νοσήματα και στην πρόληψη της δράσης των ελεύθερων ριζών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το σελήνιο πραγματοποιεί τις κύριες λειτουργίες του ως μέρος του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η οποία αντιπροσωπεύει έναν φυσιολογικό μηχανισμό για τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των προστανοειδών με σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Εικάζεται ότι τα συμπληρώματα σεληνίου θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της αρτηριακής θρόμβωσης [105].

Στα πλαίσια μίας προοπτικής τυχαιοποιημένης διπλά-τυφλής μελέτης ελεγχόμενης με εικονικό σκεύασμα, χορηγήθηκε συμπλήρωμα διατροφής 200 μg οργανικού σεληνίου και 200 mg συνενζύμου Q10 σε 437 ηλικιωμένους επί 48 μήνες και έγινε επανέλεγχος έπειτα από 5,2 χρόνια. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι υπήρξε σημαντική μείωση στα επίπεδα της CRP στα άτομα που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, η αύξηση των επιπέδων της διαλυτής Ρ-σελεκτίνης ήταν σημαντικά μικρότερη στην πειραματική ομάδα [106].

Σε μία μελέτη της Jahpona και των συνεργατών της αξιολογήθηκε η επίδραση της ημερήσιας πρόσληψης 200 μg συμπληρώματος σεληνίου σε 20 ασθματικούς ασθενείς υπό τη θεραπεία κορτικοειδών και β-αγωνιστών επί 6 μήνες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν σημαντική μείωση

μετά από 3 μήνες στα επίπεδα του VCAM-1 και της E-σελεκτίνης και μετά από 6 μήνες στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και του ICAM-1 στα άτομα που λάμβαναν συμπλήρωμα σεληνίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [107].

3.12 Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα

Τα ω-3 λιπαρά οξέα ανήκουν στην ομάδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Θεωρούνται απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς δεν μπορεί να τα συνθέσει από μόνος του και πρέπει αναγκαστικά να τα προσλαμβάνει μέσω της διατροφής του. Τα κυριότερα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα είναι: το άλφα-λινολεϊκό οξύ (ALA), το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA). Το πρώτο βρίσκεται κυρίως στο έλαιο του λιναρόσπορου, της σόγιας και στους χλωροπλάστες των πράσινων φυλλωδών λαχανικών ενώ τα άλλα δύο απαντώνται κυρίως στα ψάρια και στα ιχθυέλαια. Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τις ευεργετικές ιδιότητες των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα σε σχέση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα [108].

Σε μία τυχαιοποιημένη διπλά-τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα σε 150 ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο ερευνήθηκε η επίδραση της καθημερινής κατανάλωσης συμπληρώματος ιχθυελαίου OMACOR (850-882 mg εικοσιπεντανοϊκού και δοκοσαεξανοϊκού οξέος) επί 6 εβδομάδες. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα της έρευνας δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και του s-ICAM. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων προκαλούμενη τόσο από TRAP όσο και από αραχιδονικό οξύ [109].

Στα πλαίσια μίας τυχαιοποιημένης διπλά-τυφλής μελέτης διασταυρούμενης μετάβασης, χορηγήθηκαν καθημερινά 4 g CLA80:20 (9cis,11trans-διαζευγμένο λινολενικό οξύ) ή εικονικού σκευάσματος σε 43 υγιείς εθελοντές επί 2 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση του συμπληρώματος δεν είχε σημαντική επίδραση στη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Επίσης, η έκφραση της sP-σελεκτίνης και του ICAM-1 δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά από τη χορήγηση του συμπληρώματος. [110].

Τέλος, στα πλαίσια μίας τυχαιοποιημένης παράλληλης διπλά-τυφλής μελέτης ελεγχόμενης με εικονικό σκεύασμα, 30 υγιείς εθελοντές χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στους συμμετέχοντες της πρώτης ομάδας χορηγήθηκαν καθημερινά κάψουλες ελαίου τόνου (210 mg EPA, 30 mg DPA και 810 mg DHA), της δεύτερης ομάδας κάψουλες ελαίου φώκιας (340 mg EPA, 230 mg DPA και 450 mg DHA) και της τρίτης ομάδας έλαιο sunola ως εικονικό σκεύασμα επί 14 ημέρες. Σημαντική μείωση

στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως προσδιορίζεται από την έκφραση της sP-σελεκτίνης, παρατηρήθηκε μόνο στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το συμπλήρωμα ελαίου ψωμίας [111].

3.13 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών του παρόντος κεφαλαίου για την επίδραση συμπληρωμάτων διατροφής στους αιμοστατικούς δείκτες του ανθρώπινου οργανισμού συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Αποτελέσματα κλινικών μελετών με συμπληρώματα διατροφής

Συμπλήρωμα	Πληθυσμός	Διάρκεια	Αποτελέσματα	Πηγή
Trans-ρεσβερατρόλη, εκχύλισμα σταφυλιού και κουεσερτίνη	44 υγιείς εθελοντές	30 ημέρες	IL-8 ↓, ICAM-1 ↓, VCAM-1 ↓	Agarwal et al., 2013
Εκχύλισμα σταφυλιού που περιείχε ρεσβερατρόλη	75 συμμετέχοντες με υψηλό κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα	6 μήνες	CRP ↓, TNF-α ↓, PAI-1 ↓	Tomé-Carneiro et al., 2013
Χυμός μωβ σταφυλιού	20 ασθενείς με στεφανιαία νόσο	14 ημέρες	sP-σελεκτίνη -, TxB2 -, CRP -, IL-8 -	Albers et al., 2004
Πράσινο τσάι	20 ενήλικες άρρενες καπνιστές	4 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη ↓, VCAM-1 -, ICAM-1 -	Lee et al., 2005
Κακάο	32 υγιείς εθελοντές	28 ημέρες	sP-σελεκτίνη ↓	Murphy et al., 2003
Κακάο (μαύρη σοκολάτα και ρόφημα σκόνης κακάο)	25 υγιείς εθελοντές	6 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη -, IL-1β -, IL-6 -, TNF-α -, CRP -	Mathur et al., 2002
Κακάο πλούσιο σε φλαβανόλες	40 ασθενείς με στεφανιαία νόσο	6 εβδομάδες	ICAM-1 -, VCAM-1 -, sP-selectin -, E-selectin -	Farouque et al., 2006
Ανθοκυανίνες	146 ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία	24 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη ↓, PAI-1 -	Zhang et al., 2016
Ανθοκυανίνες που εμπεριέχονταν σε χυμό δαμάσκηνου	21 υγιείς εθελοντές	28 ημέρες	sP-σελεκτίνη ↓	Santhakumar et al., 2014
Ανθοκυανίνες	31 υγιείς άνδρες	4 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη -, ICAM-1 -, VCAM-1 -	Hassellund et al., 2012
Μαύρου τσάι, πράσινο τσάι και των πολυφαινολών τους	64 υγιείς καπνιστές	4 εβδομάδες	IL-6 -, IL-1β -, TNF-α -, CRP -, vWF -, PAI-1 -, FVIIa -, u-PA -	de Maat et al., 2000
Βιταμίνη Ε	47 ασθενείς με αθηροσκλήρωση	4 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη ↓, sICAM-1 -	Ferns et al., 2000
Βιταμίνη Ε	110 ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	6 μήνες	sP-σελεκτίνη -, sICAM-1 -, sVCAM-1 -	Murphy et al., 2004
Βιταμίνη Ε	47 διαβητικοί ασθενείς και 25 υγιείς εθελοντές	3 μήνες	sP-σελεκτίνη ↓, PAI-1 ↓	Devaraj et al., 2002
Βιταμίνη Ε	20 ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία και 20 υγιείς εθελοντές	2 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη ↓,	Davi et al., 1998

Βιταμίνες E και C	100 ασθενείς με ασυμπτωματική ή μέτρια συμπτωματική, ήπια αορτική στένωση	6 μήνες	ICAM-1 ↓, sP-σελεκτίνη ↓	Tahir et al., 2005
Αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα (βιταμίνη E, βιταμίνη C, και N-ακετυλοκυστεΐνη)	46 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, 46 ασθενείς με εξασθενημένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT) και 46 υγιή άτομα	15 μέρες	vWF ↓, VCAM-1 ↓	Neri et al., 2005
Βιταμίνη E, PUFA, νιασίνη και γ-ορυζανόλη	57 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία	4 μήνες	TNF-α ↓, TxB2 ↓ (ομάδες B και C), IL-1β ↓ (ομάδα C)	Accinni et al., 2006
Βιταμίνη D	40 ασθενείς με φλεβοθρόμβωση ή πνευμονική εμβολή	8 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη -, hs-CRP -	Hejazi et al., 2017
Βιταμίνη D	60 ασθενείς με φλεβοθρόμβωση ή πνευμονική εμβολή	4 εβδομάδες	sP-σελεκτίνη ↓	Gholami et al., 2016
Φυλλικό οξύ	24 υγιείς χρόνιοι καπνιστές	4 εβδομάδες	CRP -, vWF -, FVIII -	Mangoni et al., 2003
Φυλλικό οξύ	267 ενηλικιωμένου	12 μήνες	vWF -, FVIIa -, CRP -	Klerk et al., 2005
Φυλλικό οξύ	530 άνδρες και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ↑ ομοκυστεΐνη	12 μήνες	CRP -, ICAM-1 -	Durga et al., 2005
Φυλλικό οξύ και Βιταμίνη B6	158 υγιή ασυμπτωματικά αδέρφια ασθενών με πρόιμη αθηροσκληρωτική νόσο	2 χρόνια	VCAM-1 -, vWF -, PAI-1 -, CRP -	Vermeulen et al., 2003
Βιταμίνη P	68 παχύσαρκοι εθελοντές	6 εβδομάδες	sICAM-1 ↓, sVCAM-1 ↓, sP-σελεκτίνη ↓	Salden et al., 2016
Οργανικό σελήνιο και συνενζύμου Q10	437 ηλικιωμένους	48 μήνες και επανέλεγχος 5.2 χρόνια	CRP ↓, sP-σελεκτίνη ↓	Alehagen et al., 2015
Σελήνιο	20 ασθματικοί ασθενείς	6 μήνες	VCAM-1 ↓, E-σελεκτίνη ↓, sP-σελεκτίνη ↓, ICAM-1 ↓	Jahnova et al., 2002
Ιχθυέλαιο OMACOR	150 ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο	6 εβδομάδες	sICAM-1 -, sP-σελεκτίνη -	Mackay et al., 2012
CLA 80:20 (9cis, 11 trans-διαζευγμένο λινολενικό οξύ)	43 υγιείς εθελοντές	2 εβδομάδες	ICAM-1 -, sP-σελεκτίνη -	Bachmair et al., 2015
Κάψουλες ελαίου τόνου και κάψουλες ελαίου φώκιας	30 υγιείς εθελοντές	14 ημέρες	sP-σελεκτίνη ↓	Mann et al., 2010

↓ σημαντική μείωση, - μη σημαντική μεταβολή

Με βάση τα συμπεράσματα των παραπάνω ερευνών, η χορήγηση διατροφικών συμπληρωμάτων που περιείχαν ρεσβερατρόλη, εκχύλισμα πράσινου τσαγιού, κακάο, ανθοκυανίνες, σελήνιο, εσπεριδίνη, βιταμίνη D και συνδυασμό βιταμινών E και C είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του επιπέδου αρκετών αιμοστατικών και φλεγμονωδών δεικτών. Αντίθετα, η χορήγηση συμπληρωμάτων που περιείχαν εκχύλισμα σταφυλιού χωρίς ρεσβερατρόλη, βιταμίνη B9 και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα δεν φάνηκε να επιδρά σημαντικά στους αιμοστατικούς και φλεγμονώδεις δείκτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης είναι να αξιολογήσει το αποτέλεσμα της βραχυπρόθεσμης κατανάλωσης ενός μίγματος βιταμινών και φυσικών εκχυλισμάτων στην ενίσχυση της αντι-θρομβωτικής άμυνας του οργανισμού φαινομενικά υγιών εθελοντών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε διπλά τυφλή κλινική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές που κατανάλωναν είτε το συμπλήρωμα είτε εικονικό σκεύασμα επί οκτώ εβδομάδες. Για να προσδιοριστούν τα αποτελέσματα της παρέμβασης, μετρήθηκαν τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα αίματος των εθελοντών πριν την παρέμβαση (0 εβδομάδες), στο μέσο της παρέμβασης (4 εβδομάδες) και στο τέλος της παρέμβασης (8 εβδομάδες).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Σχεδιασμός κλινικής μελέτης

5.1.1 Περιγραφή σχεδιασμού

Η παρούσα εργασία αφορά μία τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή μελέτη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα. Οι συμμετέχοντες ήταν εθελοντές που χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες με βάση το φύλο, την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος και τις καπνιστικές τους συνήθειες. Στην πρώτη ομάδα ολοκλήρωσαν τη διαδικασία 30 εθελοντές που λάμβαναν καθημερινά μετά το γεύμα 80 ml του συμπληρώματος διατροφής Mind Master επί 8 εβδομάδες ενώ στη δεύτερη ομάδα ολοκλήρωσαν τη διαδικασία 28 εθελοντές που λάμβαναν καθημερινά μετά το γεύμα 80 ml εικονικού συμπληρώματος για το ίδιο χρονικό διάστημα. Από τους εθελοντές ζητήθηκε η αποφυγή λήψης οποιουδήποτε αντιφλεγμονώδους ή αναλγητικού φαρμάκου και συμπληρωμάτων διατροφής κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα. Επιπλέον, δόθηκαν οδηγίες για τη διατήρηση των διατροφικών τους συνηθειών κατά το χρονικό διάστημα της συμμετοχής τους στην έρευνα. Οι εθελοντές που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια ενημερώθηκαν πλήρως για τις διαδικασίες, τις υποχρεώσεις και τα δικαιώματά τους και υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στη μελέτη.

Πριν από κάθε προσέλευση είχε ζητηθεί από τους συμμετέχοντες να πραγματοποιούν 12ωρη νηστεία και να συλλέγουν πρωινά ούρα σε ειδική συσκευασία που τους είχε χορηγηθεί. Κατά τη διάρκεια κάθε προσέλευσης, πραγματοποιούνταν μέτρηση διαστολικής και συστολικής αρτηριακής πίεσης, αιμοληψία και ανθρωπομετρικές μετρήσεις (βάρους, ύψους και περιφέρειας μέσης) των συμμετεχόντων, καθώς και συμπλήρωση ερωτηματολογίου σχετικά με τις διατροφικές συνήθειες και τη φυσική τους δραστηριότητα. Τόσο οι μετρήσεις της αρτηριακής πίεσης όσο και οι αιμοληψίες πραγματοποιούνταν από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, παρουσία ιατρού ενώ οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις γίνονταν από εκπαιδευμένο διαιτολόγο. Προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες των συμμετεχόντων, πραγματοποιήθηκαν 3ήμερες τηλεφωνικές ανακλήσεις 24ώρου από εξειδικευμένο διαιτολόγο κατά την πρώτη εβδομάδα, μετά τη δεύτερη αιμοληψία και κατά την τελευταία εβδομάδα της παρέμβασης. Οι συμμετέχοντες κατά τη διάρκεια της παρέμβασης προσήλθαν συνολικά τρεις φορές στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, πριν την έναρξη της παρέμβασης, στο μέσον της παρέμβασης (4 εβδομάδες) και στο τέλος της παρέμβασης (8 εβδομάδες).

5.1.2 Διατροφική σύσταση συμπληρώματος

Το διατροφικό συμπλήρωμα περιείχε Gel από Aloe barbedensis Miller (ΗΠΑ/Μεξικό 36%), συμπυκνωμένο χυμό σταφυλιού, νερό, δεξτρόζη, μίγμα εκχυλισμάτων (πράσινου τσαγιού, Polygonum cuspidatum που περιέχει ρεσβερατρόλη), σταθεροποιητή (κόμμι ξανθάνης), L-καρνιτίνη, μίγμα βιταμινών (βιταμίνη B1, φυλλικό οξύ, βιταμίνη B12, βιταμίνη E), χρωστική ουσία (χλωροφύλλη από φυτικά εκχυλίσματα), μέσο οξύτητας (κιτρικό οξύ), φωσφορικό σίδηρο (III), συντηρητικά (σορβικό κάλιο, βενζοϊκό νάτριο), φυσικό άρωμα, γλυκαντική ουσία (στεβιογλυκοζίδες), συνένζυμο Q10, ασκορβικό οξύ, χολίνη και σεληνιώδες νάτριο (Πίνακας 2).

Πίνακας 1: Διατροφική σύσταση συμπληρώματος. (*Συνιστώμενη Ημερήσια Δόση: η μέση ημερήσια πρόσληψη για την κάλυψη των διατροφικών απαιτήσεων του 97-98% των υγίων ατόμων του πληθυσμού)

Συστατικά	Ανά 100 ml	Ανά ημερήσια δόση (80 ml)	% ΣΗΔ*
Θερμιδική αξία (KJ/Kcal)	226/53	180,8/42,4	-
Πρωτεΐνη	< 0,1 g	< 0,1 g	-
Υδατάνθρακες	13,1 g	10,48 g	-
Λιπαρά	< 0,1 g	< 0,1 g	-
Φυλλικό οξύ	250 µg	200 µg	100%
Βιταμίνη E (α-TP)	15 mg	12 mg	100%
Βιταμίνη B1	1,38 mg	1,1 mg	100%
Βιταμίνη B12	3,13 µg	2,5 µg	100%
Σίδηρος	5,25 mg	4,2 mg	30%
Σελήνιο	34,37 µg	27,5 µg	50%

5.1.3 Στρατολόγηση εθελοντών

Οι συμμετέχοντες στην έρευνα ήταν φαινομενικά υγιείς εθελοντές με δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο των 23 Kg/m². Η ύπαρξη χρόνιων παθήσεων και η λήψη φαρμακευτικής αγωγής ή συμπληρωμάτων διατροφής αποτέλεσαν κριτήρια αποκλεισμού για το συγκεκριμένο δείγμα. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, τους ζητήθηκε να απέχουν από τη λήψη αντιφλεγμονωδών και αναλγητικών φαρμάκων καθώς και άλλων διατροφικών συμπληρωμάτων. Οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τη διαδικασία της μελέτης καθώς και για τις υποχρεώσεις και τα δικαιώματά τους και υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής σε αυτή. Επιπλέον, έλαβαν κατευθυντήριες οδηγίες για τη διατήρηση των διατροφικών τους συνηθειών κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους.

5.2 Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση αναστημόμετρου σε όρθια στάση, χωρίς υποδήματα. Με τη χρήση των δύο παραπάνω μετρήσεων ο ΔΜΣ (Kg/m^2) υπολογίστηκε για κάθε εθελοντή.

5.3 Παραλαβή πλάσματος κιτρικών

Προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση του πλάσματος, επαρκής ποσότητα αίματος (5 ml) μεταφέρθηκε σε σωλήνες αιμοληψίας κενού (vacutainer) που περιείχαν κιτρικά. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση στα 1500 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20 °C. Κατόπιν, παραλήφθηκε το υπερκείμενο, που αποτελεί το πλάσμα κιτρικών, διανεμήθηκε σε σωλήνες erpendorfs ανά 500 μl και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

5.4 Παραλαβή ορού

Κατάλληλη ποσότητα αίματος χωρίς αντιπηκτικό, μεταφέρθηκε σε vacutainers ορού (10 ml). Το vacutainer παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά, έως ότου επήλθε η πήξη του αίματος. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση στα 1500 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20 °C. Κατόπιν, παραλήφθηκε το υπερκείμενο, διανεμήθηκε σε σωλήνες erpendorfs ανά 500 μl και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

5.5 Βιοχημικές αναλύσεις σε βιολογικά δείγματα

Η γλυκόζη, η χοληστερόλη, η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), τα τριγλυκερίδια και το ουρικό οξύ μετρήθηκαν σε δείγματα ορού με φασματοφωτομετρική μέθοδο και με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων.

Επιπλέον απομονώθηκε το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) των εθελοντών και εκτιμήθηκε η ικανότητα των αιμοπεταλίων για συσώρευση, χρησιμοποιώντας ως παράγοντες συσώρευσης τον PAF, το ADP και το ανάλογο θρομβίνης TRAP (thrombin receptor activating peptide).

5.6 Μέθοδος ELISA για προσδιορισμό sP-σελεκτίνης

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μετρήθηκαν τα επίπεδα sP-σελεκτίνης στο πλάσμα κιτρικών των εθελοντών.

Αρχή μεθόδου

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία (ELISA) είναι μία μέθοδος υψηλής ευαισθησίας που χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση της συγκέντρωσης ενός αντισώματος ή αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει εφαρμογές στην ιατρική, κυρίως στον τομέα της ανοσολογίας, καθώς και σε άλλα επιστημονικά πεδία, όπως τη βιομηχανία τροφίμων και την τοξικολογία για τον εντοπισμό αλλεργιογόνων τροφών και τοξικών ουσιών.

Στα πλαίσια της μεθόδου ELISA, μία ποσότητα δείγματος που περιέχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο με άγνωστη συγκέντρωση τοποθετείται σε μία επιφάνεια ώστε ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, το οποίο εφαρμόζεται πάνω στην επιφάνεια, να μπορεί να συνδεθεί με το αντιγόνο. Το συγκεκριμένο αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο έτσι ώστε στο τελικό στάδιο με την προσθήκη του κατάλληλου άχρωμου υποστρώματος να μετατραπεί σε έγχρωμο προϊόν. Για την ποσοτικοποίηση του υπό εξέταση δείγματος χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς.

Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου Sandwich. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά βήματα είναι:

1. Η πρόσδεση και ακινητοποίηση του υπό μέτρηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (ImmunoSorbent)
2. Η χρήση αντισώματος συζευγμένου με ένζυμο
3. Η χρήση χρωμοφόρων υποστρωμάτων, τα οποία οδηγούν στην παραγωγή έγχρωμων διαλυτών προϊόντων επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της παρουσίας του αντιγόνου στο δείγμα.

Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του υπό μέτρηση αντιγόνου. Το υπόστρωμα δέσμευσης είναι συνδεδεμένο σε μία στερεή επιφάνεια. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιγόνο και δεσμεύεται στο υπόστρωμα δέσμευσης μέσω του ενός επιτόπου. Κατόπιν προστίθεται το υπόστρωμα ανίχνευσης, το οποίο συνδέεται στον δεύτερο επίτοπο του αντιγόνου. Το υπόστρωμα ανίχνευσης είτε είναι

επισημασμένο με κατάλληλο ένζυμο είτε συνδέεται με τη σειρά του με ένα επισημασμένο δευτερογενές αντίσωμα. Η μέθοδος "Σάντουιτς" ELISA είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης.

Αντιδραστήρια

Στην παρούσα μελέτη, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της sP-σελεκτίνης χρησιμοποιήθηκαν:

1. DuoSet ELISA kit
2. Μικροπλακίδια των 96 οπών
3. Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml
4. Φιαλίδια erpendorf
5. Πολυκάναλη πιπέττα
6. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ και pH 7,2-7,4
7. Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer): 0,05% Tween 20 σε PBS, pH 7,2-7,4
8. Αντιδραστήριο Αραίωσης (Reagent Diluent): 1% BSA σε PBS και pH 7,2-7,4
9. Διάλυμα Υποστρώματος (Substrate Solution): 1:1 μίγμα χρώματος αντιδραστηρίου A (H₂O₂) και χρώματος αντιδραστηρίου B (Τετραμεθυλοβενζιδίνης)
10. Διάλυμα παύσης αντίδρασης (Stop Solution): 2 NH₂SO₄

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Όλα τα αντιδραστήρια έπρεπε να είναι σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση τους. Όλα τα συστατικά έπρεπε να παραμείνουν για τουλάχιστον 15 λεπτά σε ήπια διέγερση μετά την αρχική ανασύσταση. Οι αραιώσεις τη εργασίας παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν αμέσως:

1. Αντίσωμα δέσμευσης ανθρώπινης sP-σελεκτίνης προερχόμενο από ποντίκι: Αναδιαλύθηκε σε 1,0 ml του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.
2. Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης ανθρώπινης sP-σελεκτίνης προερχόμενο από πρόβατο: Αναδιαλύθηκε σε 1,0 ml αντιδραστηρίου αραίωσης.
3. Streptavidin-HRP: 1,0 ml στρεπταβιδίνης συζευγμένης προς το ένζυμο της υπεροξειδάσης του χρένου αραιώθηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο αραίωσης.
4. Πρότυπο ανασυνδυασμένης ανθρώπινης sP-σελεκτίνης: Χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της κανονικής καμπύλης 7 σημείων. Αναδιαλύθηκε σε 0,5 ml του αντιδραστηρίου αραίωσης.

Αναλυτική πορεία

1. Το αντίσωμα δέσμευσης αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) χωρίς πρωτεΐνη-φορέα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 100 μl του αραιωμένου αντισώματος σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου. Στη συνέχεια το πλακίδιο σφραγίστηκε και επώαστηκε για μία νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση και έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (200 μl). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 4 φορές. Μετά την τελευταία έκπλυση, αφαιρέθηκαν τυχόν υπολείμματα του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης αναστρέφοντας το μικροπλακίδιο σε καθαρό χαρτί κουζίνας.
3. Σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου προστέθηκαν 300 μl από το αντιδραστήριου αραιώσης. Στη συνέχεια, το πλακίδιο επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα.
4. Η διαδικασία της αναρρόφησης και της έκπλυσης επαναλήφθηκε ώστε τα μικροπλακίδια να είναι έτοιμα για την τοποθέτηση των δειγμάτων.
5. Σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου που προετοιμάστηκε με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω προστέθηκαν 100 μl δείγματος ή πρότυπων διαλυμάτων. Στη συνέχεια, το μικροπλακίδιο καλύφτηκε με ταινία και επώαστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Επαναλήφθηκε η διαδικασία της αναρρόφησης/έκπλυσης όπως περιγράφηκε στο βήμα 2 της προετοιμασίας του πλακιδίου.
7. Προστέθηκαν 100 μl του αντισώματος ανίχνευσης σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου, αραιωμένα σε αραιωτικό αντιδραστήριο. Στη συνέχεια, το πλακίδιο καλύφτηκε με μία νέα κολλητική ταινία και επώαστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Επαναλήφθηκε η διαδικασία της αναρρόφησης/έκπλυσης όπως περιγράφηκε στο βήμα 2 της προετοιμασίας του πλακιδίου.
9. Προστέθηκαν 100 μl του διαλύματος στρεπταβιδίνης-HRP σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου. Στη συνέχεια, το πλακίδιο καλύφτηκε και επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ενώ αποφεύχθηκε η έκθεσή του σε άμεσο φως.
10. Επαναλήφθηκε η διαδικασία της αναρρόφησης/έκπλυσης όπως περιγράφηκε στο βήμα 2 της προετοιμασίας του πλακιδίου.
11. Προστέθηκαν 100 μl του διαλύματος υποστρώματος σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου. Στη συνέχεια, το πλακίδιο επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ενώ αποφεύχθηκε η έκθεσή του σε άμεσο φως.

12. Προστέθηκαν 50 μl του διαλύματος παύσης αντίδρασης σε κάθε οπή του μικροπλακιδίου. Στη συνέχεια, η πλάκα χτυπήθηκε απαλά για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμειξη του διαλύματος.
13. Η οπτική πυκνότητα της κάθε οπής του μικροπλακιδίου του πλακιδίου προσδιορίστηκε με τη χρήση μιας συσκευής ανάγνωσης στα 450 nm, χρησιμοποιώντας ως μήκος αναφοράς τα 650 nm.

5.7 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS 18.0 για τα Windows. Για τον έλεγχο της κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων της sP-σελεκτίνης στο δείγμα της μελέτης χρησιμοποιήθηκε το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Για τη σύγκριση των τιμών της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις τρεις χρονικές στιγμές (πριν την παρέμβαση, στο μέσο της παρέμβασης και στο τέλος της παρέμβασης) στην κάθε ομάδα παρέμβασης χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική Friedman's two-way analysis of variance by ranks. Επιπλέον, εφαρμόστηκε το τεστ Man-Whitney-U για να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τιμών της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις δύο ομάδες για κάθε χρονική στιγμή ξεχωριστά. Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης ανάμεσα στις μετρήσεις της sP-σελεκτίνης και τους υπόλοιπους δείκτες υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p-value) ορίστηκε το 5% (0,05).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Χαρακτηριστικά πληθυσμού

Την παρούσα μελέτη ολοκλήρωσαν 58 εθελοντές με ΔΜΣ >23 Kg/m², εκ των οποίων 30 ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης και λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα ενώ 28 ανήκαν στην ομάδα ελέγχου και λάμβαναν το εικονικό συμπλήρωμα. Στην ομάδα παρέμβασης οι συμμετέχοντες είχαν ηλικιακό εύρος 32,9 ± 5,6 ενώ στην ομάδα ελέγχου είχαν ηλικιακό εύρος 34,9 ± 5,8. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακα 3) παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης, όπως η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος και η συστολική και διαστολική πίεση:

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης

Χαρακτηριστικά εθελοντών	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
Φύλο	A: 38%, Γ: 14%	A: 31%, Γ: 17%	0,5
Ηλικία (έτη)	34,9 ± 5,8	32,9 ± 5,6	0,2
ΔΜΣ (Kg/m ²)	27,0 ± 2,0	26,6 ± 2,9	0,5
ΔΑΠ	122,7 ± 10,4	126,9 ± 10,2	0,1
ΣΑΠ	74,5 ± 8,5	78,5 ± 8,8	0,08

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα χαρακτηριστικά των δύο ομάδων κατά την έναρξη της παρέμβασης ($p > 0,05$). Με βάση και το σχεδιασμό της μελέτης, οι συμμετέχοντες στη μελέτη χαρακτηρίζονται ως υπέρβαροι καθώς ο ΔΜΣ τους είναι αυξημένος. Καθώς οι συμμετέχοντες είχαν λάβει οδηγίες να μην μεταβάλουν τις διατροφικές τους συνήθειες, ο ΔΜΣ του πληθυσμού της μελέτης δεν μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της παρέμβασης.

6.2 Αιματολογικά χαρακτηριστικά πληθυσμού στην έναρξη της παρέμβασης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αιματολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού κατά την έναρξη της παρέμβασης και για τις δύο ομάδες:

Πίνακας 2: Αιματολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης

Αιματολογικά χαρακτηριστικά	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
Λευκοκύτταρα WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	$6,2 \pm 1,3$	$5,7 \pm 1,4$	0,2
Λέμφος Lymph ($10^3/\mu\text{l}$)	$2,1 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,4$	0,1
Μονοκύτταρα Mid ($10^3/\mu\text{l}$)	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	0,3
Κοκκιοκύτταρα GRAN ($10^3/\mu\text{l}$)	$3,7 \pm 1,0$	$3,5 \pm 1,2$	0,5
Αιμοσφαιρίνη HGB (g/ dl)	$15,1 \pm 1,3$	$14,6 \pm 2,7$	0,4
Αιματοκρίτης HC (%)	$40,3 \pm 4,0$	$41,0 \pm 4,1$	0,6
Ερυθροκύτταρα RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	$4,5 \pm 1,3$	$4,4 \pm 1,3$	0,7
Αιμοπετάλια PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	$240,6 \pm 32,4$	$224,0 \pm 59,1$	0,2

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αιματολογικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων κατά την έναρξη της παρέμβασης ($p > 0,05$). Τα αιματολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης κυμαίνονται στα φυσιολογικά όρια.

6.3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά πληθυσμού στην έναρξη της παρέμβασης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού κατά την έναρξη της παρέμβασης και για τις δύο ομάδες:

Πίνακας 3: Βιοχημικά χαρακτηριστικά πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης

Βιοχημικά Χαρακτηριστικά	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
Γλυκόζη (mg/dl)	101 ± 12	95 ± 10	0,1
Χοληστερόλη (mg/dl)	201 ± 42	187 ± 42	0,2
HDL (mg/dl)	46 ± 15	49 ± 14	0,4
LDL (mg/dl)	138 ± 45	123 ± 43	0,2
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	92 ± 64	73 ± 38	0,1
Ουρικό οξύ (mg/dl)	$4,6 \pm 1,12$	$4,7 \pm 1,2$	0,6

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα βιοχημικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων κατά την έναρξη της παρέμβασης ($p > 0,05$). Επίσης, από τον πίνακα παρατηρούμε ότι οι τιμές της γλυκόζης, της χοληστερόλης και της LDL των συμμετεχόντων κυμαίνονται σε φυσιολογικά έως οριακά υψηλά επίπεδα. Οι τιμές των τριγλυκεριδίων, του ουρικού οξέος και της HDL κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα.

6.4 Διατροφικές συνήθειες πληθυσμού στην έναρξη της παρέμβασης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού κατά την έναρξη της παρέμβασης και για τις δύο ομάδες:

Πίνακας 4: Διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης

Τροφές	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
MED DIET SCORE	28,9 ± 5,9	28,6 ± 5,4	0,8
Γιαούρτι πλήρες	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,4
Γιαούρτι χαμηλών λιπαρών	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,4	0,8
Τυρί πλήρες	2,0 ± 1,1	1,9 ± 1,3	0,7
Τυρί χαμηλών λιπαρών	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,4	0,3
Φρούτα	1,0 ± 1,3	1,1 ± 1,1	0,8
Λαχανικά σαλάτας	1,1 ± 1,0	1,1 ± 1,3	1,0
Λαχανικά	0,8 ± 0,9	0,5 ± 0,8	0,2
Όσπρια	0,3 ± 0,6	0,4 ± 0,7	0,5
Ψάρια	0,3 ± 0,6	0,4 ± 0,5	0,8
Κόκκινο κρέας	1,0 ± 0,9	1,0 ± 0,9	1,0
Κοτόπουλο/γαλοπούλα	0,5 ± 0,9	0,3 ± 0,3	0,4
Αλλαντικά	0,6 ± 0,6	0,9 ± 0,9	0,1
Δημητριακά ολικής άλεσης	1,0 ± 1,2	1,0 ± 1,7	1,0
Επεξεργασμένα δημητριακά	4,7 ± 2,4	5,0 ± 2,7	0,7
Πατάτες	0,5 ± 0,6	0,4 ± 0,5	0,4
Αυγά	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,3	0,2
Ξηροί καρποί	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,3	0,8
Γλυκά	0,7 ± 0,5	1,0 ± 0,8	0,1
Γλυκαντικά	1,8 ± 2,3	1,7 ± 1,4	0,7
Βότανα	0,09 ± 0,23	0,02 ± 0,09	0,2
Αναψυκτικά	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,3
Καφές	1,5 ± 1,1	1,5 ± 0,8	0,9
Κρασί	0,5 ± 0,8	0,5 ± 0,9	0,8
Άλλα αλκοολούχα ποτά	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,8	0,9
Σάλτσες-spreads	1,0 ± 1,0	0,5 ± 0,6	0,049
Πρόχειρο φαγητό	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,6	0,4
Ημερήσιες συνολικές δαπάνες ενέργειας	2886,5 ± 539,5	2667,7 ± 509,7	0,1
24h Ανάκληση	1991,6 ± 402,0	2000,4 ± 450,6	0,9

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις διατροφικές συνήθειες των δύο ομάδων κατά την έναρξη της παρέμβασης ($p > 0,05$) με

εξαίρεση την κατανάλωση σαλτσών-spreads όπου παρατηρήθηκε οριακά σημαντική διαφορά ($p = 0,049$). Επίσης, από το Med diet score φαίνεται ότι ο βαθμός προσκόλλησης στη Μεσογειακή Διατροφή είναι ενδιάμεσος προς χαμηλός ($MDS \approx 29$).

6.5 Εκτίμηση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων έναντι του PAF και του ADP στην έναρξη της παρέμβασης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του PAF και του ADP που απαιτούνται για να προκληθεί το 50% της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων:

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις PAF και ADP για το 50% της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά την έναρξη της παρέμβασης

	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
EC ₅₀ PAF	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,02
EC ₅₀ ADP	2,7 ± 2,1	3,9 ± 2,7	0,07

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές του δείκτη EC₅₀PAF ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p = 0,02$) ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές του δείκτη EC₅₀ADP κατά την έναρξη της παρέμβασης ($p > 0,05$).

6.6 Επίπεδα της sP-σελεκτίνης στην έναρξη της παρέμβασης

Αρχικά, για τον έλεγχο της κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων της sP-σελεκτίνης στο δείγμα της μελέτης χρησιμοποιήθηκε το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Το αποτέλεσμα του τεστ έδειξε ότι οι μετρηθείσες τιμές της sP-σελεκτίνης στο δείγμα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η ομάδα του εικονικού συμπληρώματος είχε τιμή 38,5 (27,3-65,8) pg/ml και η ομάδα του συμπληρώματος 36,2 (31,9-54,4) pg/ml.

6.7 Συσχέτιση sP-σελεκτίνης με ανθρωπομετρικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης ανάμεσα στις μετρήσεις της sP-σελεκτίνης και τις τιμές των υπόλοιπων δεικτών (ανθρωπομετρικών, αιματολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών) υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Με βάση τα αποτελέσματα:

- 1) Υπήρξε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της HDL ($\rho = -0,3$, $p = 0,009$).
- 2) Υπήρξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της LDL ($\rho = 0,4$, $p = 0,003$).
- 3) Υπήρξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και του ουρικού οξέος ($\rho = 0,5$, $p = 0,00005$).

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τους υπόλοιπους δείκτες.

6.8 Συσχέτιση sP-σελεκτίνης με διατροφικές συνήθειες του δείγματος

Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης ανάμεσα στις μετρήσεις της sP-σελεκτίνης και τις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού της μελέτης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Με βάση τα αποτελέσματα:

- 1) Υπήρξε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της κατανάλωσης τυριών με χαμηλά λιπαρά ($\rho = -0,4$, $p = 0,005$).
- 2) Υπήρξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της κατανάλωσης τυριών πλούσιων σε λιπαρά ($\rho = 0,2$, $p = 0,07$).
- 3) Υπήρξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της κατανάλωσης βοτάνων ($\rho = 0,2$, $p = 0,07$).

Δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση με τις υπόλοιπες διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού.

6.9 Επίπεδα της sP-σελεκτίνης κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

Οι τιμές των συγκεντρώσεων της sP-σελεκτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης τόσο για την ομάδα του διατροφικού συμπληρώματος όσο και στην ομάδα του εικονικού συμπληρώματος εικονίζονται στον πίνακα 8:

Πίνακας 6: Τιμές sP-σελεκτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

sP-σελεκτίνη (ng/ml)	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
	Μέσος (25th-75th)	Μέσος (25th-75th)	
Εβδομάδα 0	36,2 (31,9-54,4)	38,5 (27,3-65,8)	0,9
Εβδομάδα 4	39,8 (29,6-59,8)	42,5 (26,7-59,0)	0,7
Εβδομάδα 8	35,9 (28,9-77,8)	33,4 (26,3-75,1)	0,5

Για τη σύγκριση των τιμών της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις τρεις χρονικές στιγμές (πριν την παρέμβαση, στο μέσο της παρέμβασης και στο τέλος της παρέμβασης) τόσο για την ομάδα παρέμβασης όσο και για την ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική Friedman's two-way analysis of variance by ranks. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή ως αποτέλεσμα της παρέμβασης τόσο στην ομάδα του διατροφικού συμπληρώματος ($p = 1$) όσο και στην ομάδα του εικονικού συμπληρώματος ($p = 0,8$).

Επιπλέον, εφαρμόστηκε το τεστ Man-Whitney-U για να ελεγχθεί αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τιμών της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις δύο ομάδες για κάθε χρονική στιγμή ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου τεστ έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά πριν την παρέμβαση ($p = 0,9$), στο μέσο της παρέμβασης ($p = 0,7$) και στο τέλος της παρέμβασης ($p = 0,5$).

Τέλος, οι μετρηθείσες τιμές της sP-σελεκτίνης μετατράπηκαν σε ποσοστιαίες τιμές με βάση τη μέση τιμή της παραμέτρου πριν την παρέμβαση και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για να διαπιστωθεί αν θα υπάρξει κάποια διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν έδειξαν κάποια διαφοροποίηση σε σχέση με τις απόλυτες τιμές.

Οι ποσοστιαίες τιμές των συγκεντρώσεων της sP-σελεκτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης τόσο για την ομάδα του διατροφικού συμπληρώματος όσο και στην ομάδα του εικονικού συμπληρώματος εικονίζονται στον πίνακα 9:

Πίνακας 7: Ποσοστιαίες τιμές sP-σελεκτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

sP-σελεκτίνη (ng/ml)	Διατροφικό Συμπλήρωμα	Εικονικό Συμπλήρωμα	P
	Μέσος (25th-75th)	Μέσος (25th-75th)	
Εβδομάδα 0	100 (100-100)	100 (100-100)	1
Εβδομάδα 4	98,3 (88,5-111)	101,6 (86,1-124)	0,8
Εβδομάδα 8	97,1 (80,3-120,5)	104,5 (75,6-127,1)	0,9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αιμόσταση είναι ένας μηχανισμός στον ανθρώπινο οργανισμό ο οποίος διασφαλίζει την ισορροπία ανάμεσα στη ρευστότητα του αίματος στον ενδοαγγειακό χώρο και την επίτευξη της επίσχεσης της αιμορραγίας σε περίπτωση αγγειακού τραυματισμού. Στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων συμμετέχουν πολλοί παράγοντες, όπως το ADP, η θρομβίνη, ο PAF, το αραχιδονικό οξύ, το κολλαγόνο, η P-σελεκτίνη, ο παράγοντας vWF, το ICAM-1 και το VCAM-1. Ειδικότερα, η P-σελεκτίνη αποτελεί ένα βασικό μόριο για τη διαδικασία της αιμόστασης και της θρόμβωσης καθώς υποστηρίζει την αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο. Η P-σελεκτίνη συμμετέχει στις λειτουργίες συγκόλλησης σε συνδυασμό με τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου στις οποίες διαμεσολαβούν και άλλα μόρια και εικάζεται ότι είναι σημαντική τόσο στις αιμοστατικές όσο και στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Τα αυξημένα επίπεδα της διαλυτής P-σελεκτίνης στο πλάσμα είναι ένας δείκτης πρόγνωσης θρομβωτικών διαταραχών και μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβάντων.

Αρκετές μελέτες φαίνεται να υποδεικνύουν ότι η διατροφή μπορεί να συντελέσει στην πρόληψη ή τη θεραπεία διαταραχών στην αιμόσταση του αίματος. Διατροφή πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του PAI-1 [40]. Η τακτική κατανάλωση ψαριών ελαττώνει τη συγκέντρωση των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM στα ενδοθηλιακά κύτταρα [47]. Η βιταμίνη Ε έχει αντιπηκτικές ιδιότητες καθώς μειώνει τα επίπεδα των ICAM-1 και VCAM-1 [51]. Η έλλειψη μαγνησίου σχετίζεται με την αυξημένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό θρόμβου [57, 58]. Η μαύρη σοκολάτα βοηθάει επίσης στην πρόληψη του σχηματισμού θρόμβου [69]. Επίσης, η κατανάλωση κακάο σε μορφή ροφήματος βρέθηκε ότι συμβάλλει στην ενεργοποίηση της σύνθεσης αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και στη μείωση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών [71, 72]. Το μέλι έχει επίσης αντιθρομβωτικές ιδιότητες που αποδίδονται στα φλαβονοειδή που περιέχει [73]. Η χρόνια κατανάλωση σκόρδου φαίνεται να εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [75]. Τέλος, η κατανάλωση κανέλλας, μέσω του ελαίου κινναμαλδεϋδης, έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [76].

Σημαντικός αριθμός κλινικών μελετών έχουν ως αντικείμενο την εφαρμογή της λήψης ορισμένων διατροφικών συμπληρωμάτων στην πρόληψη ή και τη θεραπεία διαταραχών στην αιμόσταση του ανθρώπινου οργανισμού. Τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης μειώθηκαν σημαντικά ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης συμπληρωμάτων πράσινου τσαγιού [81], κακάο [84], ανθοκυανινών [87], χυμού

δαμάσκηνου εμπλουτισμένου σε ανθοκυανίνες [88], βιταμίνης E [91, 93, 94], βιταμίνης C [95, 96], υψηλών δόσεων βιταμίνης D [99], εσπεριδίνης [104], σεληνίου [107] και ελαίου φώκιας [111]. Αντίθετα, στα πλαίσια άλλων μελετών οι τιμές της sP-σελεκτίνης δεν μεταβλήθηκαν μετά την κατανάλωση συμπληρωμάτων χυμού μωβ σταφυλιού [80], κακάο (μαύρης σοκολάτας και ροφήματος σκόνης κακάο) [85], κακάο πλούσιου σε φλαβανόλες [86], ανθοκυανινών [89], βιταμίνης E [92], βιταμίνης D [98] και ω-3 λιπαρών οξέων [109, 110].

Τα επίπεδα του ICAM-1 μειώθηκαν σημαντικά ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης συμπληρωμάτων ρεσβερατρόλης με εκχύλισμα σταφυλιού και κουεσερτίνη [78], συνδυασμού βιταμινών E και C [95], εσπεριδίνης [104] και σεληνίου [107]. Αντίθετα, τα επίπεδα του ICAM-1 δεν μεταβλήθηκαν μετά την χορήγηση συμπληρωμάτων πράσινου τσαγιού [81], κακάο πλούσιου σε φλαβανόλες [86], ανθοκυανινών [89], βιταμίνης E [91, 92], φυλλικού οξέος [102] και ω-3 λιπαρών οξέων [109, 110].

Τα επίπεδα του VCAM-1 μειώθηκαν σημαντικά ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης συμπληρωμάτων ρεσβερατρόλης με εκχύλισμα σταφυλιού και κουεσερτίνη [78], συνδυασμού βιταμινών E και C με N-ακετυλοκυστεΐνη [96], εσπεριδίνης [104] και σεληνίου [107]. Αντίθετα, τα επίπεδα του VCAM-1 δεν μεταβλήθηκαν μετά την κατανάλωση συμπληρωμάτων πράσινου τσαγιού [81], κακάο πλούσιου σε φλαβανόλες [86], ανθοκυανινών [89], βιταμίνης E [92] και συνδυασμού φυλλικού οξέος και βιταμίνης B6 [103].

Τα επίπεδα του PAI-1 μειώθηκαν σημαντικά ως αποτέλεσμα της χορήγησης συμπληρωμάτων εκχυλίσματος σταφυλιού με ρεσβερατρόλη [79] και βιταμίνης E [93]. Αντίθετα, τα επίπεδα του PAI-1 δεν μειώθηκαν μετά την κατανάλωση συμπληρωμάτων συνδυασμού μαύρου και πράσινου τσαγιού και των πολυφαινολών τους [82] και συνδυασμού φυλλικού οξέος και βιταμίνης B6 [103].

Τέλος, τα επίπεδα της TxB2 μειώθηκαν σημαντικά ως αποτέλεσμα της χορήγησης συνδυασμού βιταμίνης E, PUFA, νιασίνης και γ-ορυζανόλης [93] ενώ δεν μεταβλήθηκαν ως αποτέλεσμα της χορήγησης χυμού μωβ σταφυλιού [80].

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογήσει το αποτέλεσμα της κατανάλωσης ενός μίγματος βιταμινών, ανόργανων ουσιών και φυσικών εκχυλισμάτων στην ενίσχυση της αντι-θρομβωτικής άμυνας του οργανισμού φαινομενικά υγιών εθελοντών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κλινική παρέμβαση σε 58 φαινομενικά υγιείς εθελοντές με ΔΜΣ >23 Kg/m². Η μελέτη είναι διπλά τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό συμπλήρωμα. Οι εθελοντές που επιλέχθηκαν δεν έπασχαν από χρόνιες

παθήσεις και δεν λάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή ή συμπλήρωμα διατροφής. Στα πλαίσια της παρέμβασης, οι εθελοντές λάμβαναν καθημερινά είτε 80 ml από το διατροφικό συμπλήρωμα είτε 80 ml από το εικονικό συμπλήρωμα μετά από κάθε γεύμα επί 8 εβδομάδες. Για να προσδιοριστούν τα αποτελέσματα της παρέμβασης, μετρήθηκαν τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα αίματος των εθελοντών σε τρεις χρονικές στιγμές: στη χρονική στιγμή 0 (πριν την παρέμβαση), στην 4^η εβδομάδα και στην 8^η εβδομάδα. Επίσης, κατά τη διάρκεια της παρέμβασης πραγματοποιήθηκαν ανακλήσεις 24ώρου με σκοπό να επιβεβαιώσουμε ότι δεν μεταβλήθηκαν οι διατροφικές συνήθειες των εθελοντών.

Η ανάλυση των χαρακτηριστικών του πληθυσμού της μελέτης κατά την έναρξη της παρέμβασης έδειξε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά όσον αφορά τα ανθρωπομετρικά, αιματολογικά, και βιοχημικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου. Οι εθελοντές βάσει του σχεδιασμού της μελέτης ανήκουν στην κατηγορία των υπέρβαρων. Καθώς οι συμμετέχοντες δεν μετέβαλαν τις διατροφικές τους συνήθειες, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στον ΔΜΣ τους κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Τα αιματολογικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων κυμαίνονται στα φυσιολογικά όρια. Οι τιμές της γλυκόζης, της χοληστερόλης και της LDL των συμμετεχόντων κυμαίνονται σε φυσιολογικά έως οριακά υψηλά επίπεδα ενώ οι τιμές των τριγλυκεριδίων, του ουρικού οξέος και της HDL κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Επίσης, με εξαίρεση την κατανάλωση σαλτσών-spreads όπου παρατηρήθηκε οριακά σημαντική διαφορά ($p = 0,049$), δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις διατροφικές συνήθειες των δύο ομάδων κατά την έναρξη της παρέμβασης. Με βάση το Med diet score των συμμετεχόντων, ο βαθμός προσκόλλησης τους στη Μεσογειακή Διατροφή μπορεί να θεωρηθεί ενδιάμεσος προς χαμηλός ($MDS \approx 29$).

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η συγκέντρωση της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα των εθελοντών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ως αποτέλεσμα της παρέμβασης τόσο στην ομάδα του διατροφικού συμπληρώματος ($p = 1$) όσο και στην ομάδα του εικονικού συμπληρώματος ($p = 0,8$). Επίσης, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις δύο ομάδες για κάθε χρονική στιγμή ξεχωριστά. Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η κατανάλωση του συμπληρώματος διατροφής Mind Master επί 8 εβδομάδες δεν είχε κάποια σημαντική επίπτωση στην ενίσχυση της αντι-θρομβωτικής άμυνας του οργανισμού των εθελοντών της μελέτης.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές της sP-σελεκτίνης και τα ανθρωπομετρικά, αιματολογικά, βιοχημικά και κυτταρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων sP-σελεκτίνης και της HDL και στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και της LDL και ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και του ουρικού οξέος. Δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην sP-σελεκτίνη και τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ως προς τη συσχέτιση της sP-σελεκτίνης με την HDL, την LDL και το ουρικό οξύ συμφωνούν με έναν αριθμό σχετικών μελετών. Η μελέτη του Elwakkad και των συνεργατών του σε 40 Αιγύπτιους ενήλικες με υπερχοληστερολαιμία έδειξε την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της HDL και θετικής συσχέτισης μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της LDL [112]. Ο Davi και οι συνεργάτες του έδειξαν θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και της LDL σε 20 υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς [113]. Ο Chan και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι υπήρχε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της HDL και θετική συσχέτιση μεταξύ της sP-σελεκτίνης και της LDL σε 23 ασθενείς με υψηλά επίπεδα HDL και 25 ασθενείς με υψηλά επίπεδα LDL [114]. Μία άλλη έρευνα του Zaleski και των συνεργατών του σε 80 αθλητές έδειξε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και της LDL [115]. Θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και του ουρικού οξέος σε 20 ασθενείς με προεκλαμψία και 20 νορμοτασικούς ασθενείς έδειξε μία έρευνα του Daniel και των συνεργατών του [116]. Τέλος, στα πλαίσια της μελέτης του Garcia και των συνεργατών του βρέθηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και του ουρικού οξέος σε 79 παχύσαρκα παιδιά και 64 παιδιά κανονικού βάρους [117].

Τέλος, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές της sP-σελεκτίνης και τις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών της μελέτης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων sP-σελεκτίνης και της κατανάλωσης τυριών με χαμηλά λιπαρά και σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και της κατανάλωσης τυριών πλούσιων σε λιπαρά και ανάμεσα στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και της κατανάλωσης βοτάνων. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην sP-σελεκτίνη και τις υπόλοιπες διατροφικές συνήθειες.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές κλινικές μελέτες που εξετάζουν την επίδραση ορισμένων διατροφικών συμπληρωμάτων στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα του αίματος. Ωστόσο, ένας μικρός μόνο αριθμός μελετών έχει ερευνήσει την επίδραση της κατανάλωσης κάποιων συστατικών του διατροφικού συμπληρώματος της παρούσας μελέτης στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης. Η κατανάλωση 150 ml πράσινου τσαγιού 4 φορές την ημέρα επί 4 εβδομάδες βρέθηκε να έχει μειώσει σημαντικά τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης σε 20 ενήλικες άρρηνες καπνιστές στην έρευνα του Lee και των συνεργατών του [81]. Σε δύο άλλες έρευνες, η ημερήσια χορήγηση συμπληρώματος 12.000 IU βιταμίνης E σε 47 διαβητικούς ασθενείς και 25 υγιείς εθελοντές επί 3 μήνες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της sP-σελεκτίνης [93] και η χορήγηση συμπληρώματος 600 mg βιταμίνης E καθημερινά επί 2 εβδομάδες σε 20 ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης [94]. Επίσης, σύμφωνα με τη μελέτη του Ferns και των συνεργατών του η χορήγηση συμπληρώματος 800 IU βιταμίνης E καθημερινά σε 24 ασθενείς με αθηροσκλήρωση επί 4 εβδομάδες απέτρεψε την αύξηση της sP-σελεκτίνης μετά από επέμβαση διαδερμικής διαλυτικής στεφανιαίας αγγειοπλαστικής [91].

Ωστόσο, σύμφωνα την έρευνα του Murphy και των συνεργατών του, η ημερήσια πρόσληψη συμπληρώματος 400 IU βιταμίνης E επί 6 μήνες δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης σε 110 ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [92]. Η χορήγηση χυμού μωβ σταφυλιού για 14 ημέρες δεν επηρέασε τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα 20 ασθενών με στεφανιαία νόσο στα πλαίσια της μελέτης του Albers και των συνεργατών του [80]. Τέλος, στην *in vitro* μελέτη του Bowden και των συνεργατών του, η παρουσία ACM, το οποίο είναι ένα παράγωγο της αλόης, δεν είχε καμία επίδραση στην προσκόλληση ανθρώπινων ουδετερόφιλων κύτταρων σε κύτταρα επιμολυσμένα με P-σελεκτίνη [67].

Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η κατανάλωση του συμπληρώματος διατροφής επί 8 εβδομάδες δεν είχε κάποια σημαντική επίπτωση στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο πλάσμα αίματος των εθελοντών, δεν αποκλείει την πιθανότητα να ενισχύθηκε η αντιθρομβωτική άμυνα του οργανισμού των συμμετεχόντων, καθώς η P-σελεκτίνη αποτελεί έναν μόνο από τους παράγοντες που επηρεάζουν την αιμόσταση του ανθρώπινου οργανισμού. Ένας άλλος περιορισμός πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από φαινομενικά υγιείς ενήλικες των οποίων ο οργανισμός μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητος στις μεταβολές στα επίπεδα της P-σελεκτίνης σε σχέση με ασθενείς. Τέλος, το μέγεθος του δείγματος μπορεί να μην ήταν αρκετά μεγάλο ώστε να δώσει στατιστικά σημαντικές μεταβολές για τη

συγκεκριμένη παρέμβαση. Πιθανές μελλοντικές κλινικές μελέτες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν σε μεγαλύτερο δείγμα που να περιλαμβάνει και ασθενείς συμμετέχοντες με μετρήσεις περισσότερων αιμοστατικών παραγόντων, όπως τα ICAM-1 και VCAM-1.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allford S.L. and Machin S.J., (2004). Haemostasis. *The Medicine Publishing company*, 22 (8), 200a-200d
2. Boon G.D., (1993). An Overview of Hemostasis. *Toxicol. Pathol.*, 21 (2), 171-179
3. Roy F.M., Putten V.D., Glatz J.F.C. and Hermens W.T., (2006). Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta* 371, 37–54
4. Kumar V., Abbas A.K. and Aster J.C., (2012). *Robbins Basic Pathology*. 9th Ed. Elsevier, Philadelphia, 79-80
5. Pocock G. and Richards C.D., (2006). *Human Physiology*. The Basis of Medicine. 3rd Ed. Oxford University Press, New York, 239
6. Cito S., Mazzeo M.D. and Badimon L., (2013). A Review of Macroscopic Thrombus Modeling Methods. *Thromb Res.* 131, 116–124
7. Ogedegbe, H.O., (2002). An Overview of Hemostasis. *Lab.Med.* 33 (12), 948-953
8. Michiels C., (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.*, 196 (3), 430-443
9. Gale A.J., (2011). Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol.*, 39 (1), 273-280
10. Pierce T.B., Razzuk M.A., Razzuk L.M. and HOOVER S.J., (1999). A comprehensive review of the physiology of hemostasis and antithrombotic agents. *BUMC Proceedings.* 12, 39-49
11. Spaet T.H., (1966). Analytical Review: Hemostatic Homeostasis. *Blood*, (28) 1. 112-113
12. Πολίτου Μ., (2015). “Αιμοπετάλια. Πήξη του αίματος. Αιμόσταση”. *Μαθήματα Αιματολογίας. Κλινική Αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση Αίματος*. Εκδόσεις Κάλλιπος. 214-246 Downloaded from [http:// repository.kallipos.gr/handle/11419/3087](http://repository.kallipos.gr/handle/11419/3087)
13. Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M. and Reitsma P.H., (2013). New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev.* 93, 327-358

14. Triplett D.A., (2000). Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clinic. Chem.*, 46 (8), 1260-1269
15. Fuentes E., Guzmán L., Rodrigo M.A., Palomo M. and Palomo I., (2014). Thrombolytic/Fibrinolytic Mechanism of Natural Products. Chpt 5 In: Krasimir Kolev *Fibrinolysis and Thrombolysis*: InTech. 108-121
16. Emeis J.J., (1992). Regulation of the acute release of tissue-type plasminogen activator from the endothelium by coagulation activation products. *Ann N Y Acad Sci.* (667) 4, 249-258
17. Hamsten A., Wiman B., de Faire U. and Blombäck M., (1985). Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 313, 1557-1563
18. Hou Y., Carrim N., Wang Y., Gallant R.C., Marshall A. and Ni H., (2015) Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res*, 29 (6), 347- 444
19. Kahner B.N., Shankar H., Murugappan S., Prasad G.L. and Kunapuli S.P., (2006). Nucleotide receptor signaling in platelets. *J. Thromb Haemos* 4, 2317–26
20. Öberg K.V., (2009). The role of platelet thrombin receptors PAR1 and PAR4 in platelet activation. *Linköping University*. 5-70
21. Angiolillo D.J., Capodanno D. and Goto S., (2010). Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *European Heart Journal*. 31, 17-28
22. Demopoulos C.A., Karantonis H.C. and Antonopoulou S., (2003). Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 705-716
23. Rao G.H.R. and White J.G., (1985). Role of Arachidonic Acid Metabolism in Human Platelet Activation and Irreversible Aggregation. *Am. J Hematol.* 19, 339-347
24. Smith W.L., Garavito R.M. and DeWitt D.L, (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 271, 33157-33160

25. Savage B and Ruggeri ZM, Platelet thrombus formation in flowing blood, *in Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2007, Academic Press/Elsevier: Amsterdam; Boston, 359-376
26. Nieswandt B. and Watson S.P., (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, (102) 2, 409-460
27. Puett D., Wasserman B. K., Ford, J.D. and Cunningham L.W.F., (1973). Collagen-Mediated Platelet Aggregation. Effects of Collagen Modification Involving the Protein and Carbohydrate Moieties. *J Clin Invest.* 52, 2495-2506
28. Andre P., (2004). P-selectin in haemostasis. *British J Hema*, 126, 298-306
29. Cambien B. and Wagner D.D., (2004). A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *TRENDS in Molecular Medicine.* (10) 4, 179-186
30. Furie B. and Furie B.C., (2004). Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *TRENDS in Molecular Medicine* (10) 4, 171-178
31. Kroll M.H., Harris T.S, Moake J.L., Handin R.I. and Schafer A., (1991). Von Willebrand Factor Binding to Platelet Gplb. Initiates Signals for Platelet Activation. *J. Clin. Invest.* 88 (5), 1568-1573
32. Petri B. and Bixel M.G., (2006). Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS Journal.* 273, 4399-4407
33. Feletou M. and Rafael S., (2011). Multiple Functions of the Endothelial Cells. *In: Feletou. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators.* Chpt 2. Morgan & Claypool Life Sciences
34. Mertens I. and Van Gaal L.F., (2002). Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev.* 3 (2), 85-101
35. Cigolini M., Targher G., Bergamo Andreis I.A., Tonoli M., Agostino G. and De Sandre G., (1996). Visceral fat accumulation and its relation to plasma hemostatic factors in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16 (3), 368-74

36. Poggi M., Palareti G., Biagi R., Legnani C., Parenti M., Babini A.C., Baraldi L. and Coccheri S., (1994). Prolonged very low calorie diet in highly obese subjects reduced plasma viscosity and red cell aggregation but not fibrinogen. *Int J Obes and Relat Meta Disord* 18, 490-496
37. Fanari P., Semazzi R., Nasrawi F., Ticozzelli P., Gragni G., Agosti R. and Longhini E., (1993). Haemorheological changes in obese adolescents after short-term diet. *Int J Obes and Relat Meta Disord*. 17, 487-494
38. Gonzalez J., Donoso W., Díaz N., Alborno M.E., Huilcaman R., Morales E. and Moore-Carrasco R., (2014). High Fat Diet Induces Adhesion of Platelets to Endothelium in Two Models of Dyslipidemia. *J Obes*. 2-8
39. Larsen L.F., Bladbjerg E.M., Jespersen J. and Marckmann P., (1997). Effects of Dietary Fat Quality and Quantity on Postprandial Activation of Blood Coagulation Factor VII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17 (11), 2904-9
40. Lopez-Segura F., Velasco F., Lopez-Miranda J., Castro P., Lopez-Pedraza R., Blanco A., Jimenez-Perez J., Torres A., Trujillo J., Ordovas J.M. and Perez-Jimenez F., (1996). Monounsaturated fatty acid-enriched diet decreases plasma plasminogen activator inhibitor type 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16, 82-88
41. Elmer P.J., (1996). Effects of a Step1 diet and a High Mono-Unsaturated (MUFA) Fat diet on hemostatic factors in individuals with markers for insulin resistance. *FASEB J*. 10, 2667
42. Nomikos T., Fragopoulou E., Antonopoulou S., (2007). Food ingredients and lipid mediators. *Curr Nutr Food Sci*, 3 (4), 255-276
43. Junker R., Kratz M., Neufeld M., Erren M., Nofer J.R., Schulte H., Nowak-Göttl U., Assmann G. and Wahrburg U., (2001). Effects of diets containing olive oil, sunflower oil, or rapeseed oil on the hemostatic system. *Thromb Haemost*. 85, 280-286
44. Karantonis H.C., Antonopoulou S., Perrea D.N., Sokolis D.P., Theocharis S.E., Kavantzias N., Iliopoulos D.G. and Demopoulos C.A., (2006). In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 16, 174-185

45. Leger C.L., Carbonneau M.A., Michel F., Mas E., Monnier L., Cristol J.P. and Descomps B., (2005). A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 59, 727-730
46. Fragopoulou E., Nomikos T., Karantonis H.C., Apostolakis C., Pliakis E., Samiotaki M., Panayotou G. and Antonopoulou S., (2007). Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 55, 80-89
47. Lopez-Garcia E., Schulze M.B., Manson J.E., Meigs J.B., Albert C.M., Rifai N., Willett W.C. and Hu F.B., (2004). Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *Journal of Nutrition*, 134 (7), 1806-1811
48. Seo T., Blaner W.S. and Deckelbaum R.S., (2005). Omega-3 fatty acids: Molecular approaches to optimal biological outcomes. *Curr Opin Lipidol*, 16 (1), 11-18
49. Furie B., Bouchard B.A. and Furie B.C., (1999). Vitamin K-Dependent Biosynthesis of γ -Carboxyglutamic Acid. *Blood*, (93) 6, 1798-1808
50. Ferland G., (1998). The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr. Revs.*, 56, 223-230
51. Rizvi S., Raza S.T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S. and Mahdi F., (2014). The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos University Med J*, (14) 2, 157-165
52. Nutescu E., Shpiro N.L., Ibrahim S. and West P., (2006). Warfarin and its interaction with foods, herbs and other dietary supplements. *Expert Opin Drug Saf.* 5 (3), 433-451
53. Stanger M.J., Thompson L.A., Young A.J. and Lieberman H.R., (2012). Anticoagulant activity of select dietary supplements. *Nutr. Rev.* 70 (2), 107-117
54. Gresele P., Page C.P., Fuster V. and Vermynen J., (2002). Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics. *Campridge University Press*, 478
55. Stott D.J., MacIntosh G., Lowe G.D., Rumley A., McMahon A.D., Langhorne P., Tait R.C., O'Reilly D.S., Spilg E.G., MacDonald J.B., MacFarlane P.W. and Westendorp R.G., (2005).

Randomized controlled trial of homocysteine-lowering vitamin treatment in elderly patients with vascular disease. *American Society for Clinical Nutrition*. 82 (6), 1320-1326

56. Iseri L.T. and French J.H., (1984). Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J*. 108, 188-193

57. Szabo C., Farrago M., Dora E., Horvath I. and Kovach A.G., (1991). Endothelium-dependent influence of small changes in extracellular magnesium concentrations on the tone of feline middle cerebral arteries. *Stroke*. 22, 785-789

58. Ohira T., Peacock J.M., Iso H., Chambless L.E., Rosamond W.D. and Folsom A.R., (2009). Serum and magnesium and risk of ischemic stroke. *Am J Epidemiol*. 169, 1437- 44

59. Żbikowskaa H.M., Wachowicza B. and Krajewskia H., (2010). Selenium compounds inhibit the biological activity of blood platelets. *Platelets*. 10, 185-190

60. Qayyum R., Kurbanova N., Zia R. and Adomaityte J., (2014). Serum Selenium Levels Are Associated with Blood Platelet Count in Us Adults. *Journal of Hospital Medicine*. 9

61. Doll R., Peto R., Hall E.I., Wheatley K. and Gray R. (1994). Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observation on male British doctors. *British Medical Journal* 309, 911-918

62. Fragopoulou E., Antonopoulou S. and Demopoulos C.A. (2002). Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2684–2694

63. Fragopoulou E., Antonopoulou S., Nomikos T. and Demopoulos C.A., (2003). Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties. *Biochim Biophys Acta*, 1632, 90–99

64. Fragopoulou E., Nomikos T., Tsantila N., Mitropoulou A., Zabetakis I. and Demopoulos, C.A., (2001). Biological activity of total lipids from red and white wine/must. *J Agric Food Chem*, 49, 5186–5193

65. Fragopoulou E., Nomikos T., Antonopoulou S., Mitsopoulou C.A. and Demopoulos C.A., (2000). Separation of biologically active lipids from red wine. *J Agric Food Chem*, 48, 1234–1238

66. Xanthopoulou M.N., Asimakopoulos D., Antonopoulou S., Demopoulos C.A. and Fragopoulou E., (2014). Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells. *Food Chem* 165, 50-59
67. Bowden R.A., Tizard I.R. and Smith C.W., (1996). A natural carbohydrate inhibits LFA-1 and MAC-1 mediated adhesion. *Faseb J.* 10 (6), A1150
68. Velayutham P., Babu A. and Liu D., (2008). Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Curr Med Chem.* 15 (18), 1840-1850
69. Innes A.J., Kennedy G., McLaren M., Bancroft A.J. and Belch J.J., (2003) Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets.* 14 (5), 325-7
70. Bordeaux B., Yanek L.R., Moy T.F., White L.W., Becker L.C., Faraday N. and Becker D.M., (2007). Casual chocolate consumption and inhibition of platelet function. *Prev Cardiol.* 10 (4), 175-80
71. Corti R., Flammer A.J., Hollenberg N.K. and Luscher T.F., (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119:1433-1441
72. Selmi C., Mao T.K., Keen C.L., Schmitz H.H. and Eric G.M., (2006). The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47 (2):S163-S171.
73. Ahmed A., Khan R.A., Azim M.K., Saeed S.A., Mesaik M.A., Ahmed S and Imran I., (2011). Effects of natural honey of human platelets and blood coagulation proteins. *Pak. J. Pharm. Sci.* 24 (3), 389-397
74. Huxley R.R. and Neil H., (2003). The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition.* 57, 904-908
75. Banerjee S.K. and Maulik S.K., (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorder: A review. *Nutr J.* 1, 11-14
76. Hamidpour R., Hamidpour M., Hamidpour S. and Shahlari M., (2015). Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells

and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaracidal, and repellent activities. *J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 5, 66-70

77. Antonopoulou S., Semidalas C.E., Koussissis S. and Demopoulos C.A., (1996). Platelet-Activating Factor (PAF) Antagonists in Foods: A Study of Lipids with PAF or Anti-PAF-like Activity in Cow's Milk and Yogurt. *J Agric. Food Chem.* 44, 3047-3051

78. Agarwal B., Campen M.J., Channell M.M., Wherry S.J., Varamini B., Davis J.G., Baur J.A. and Smoliga J.M., (2013). Resveratrol for primary prevention of atherosclerosis: clinical trial evidence for improved gene expression in vascular endothelium. *Int J Cardiol.* 166 (1), 246-248

79. Tomé-Carneiro J., González M., Larrosa M., Yáñez-Gascón M.J., García-Almagro F.J., Ruiz-Ros J.A., Tomás-Barberán F.A., García-Conesa M.T. and Espín J.C., (2013). Grape resveratrol increases serum adiponectin and downregulates inflammatory genes in peripheral blood mononuclear cells: a triple-blind, placebo-controlled, one-year clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 27 (1), 37-48

80. Albers A.R., Varghese S., Vitseva O., Joseph A., Freedman V. and Freedman J.E., (2004). The anti-inflammatory effects of purple grape juice consumption in subjects with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 179-180

81. Lee W., Min W.K., Chun S., Lee Y.W., Park H., Lee D.H., Lee Y.K. and Son J.E., (2005). Long-term effects of green tea ingestion on atherosclerotic biological markers in smokers. *Clin Biochem.* 38 (1), 84-87

82. De Maat M.P., Pijl H., Kluft C. and Princen H.M., (2000). Consumption of black and green tea had no effect on inflammation, haemostasis and endothelial markers in smoking healthy individuals. *Eur J Clin Nutr.* 54 (10), 757-763

83. Hollman, P.C., Hertog, M.G.L. and Katan, M.B., (1996). Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 785-789

84. Murphy K.J., Chronopoulos A.K, Singh I., Francis M.A., Moriarty H., Pike M.J, Turner A.H., Mann N.J. and Sinclair A.J, (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr.* 77 (6), 1466-1473
85. Mathur S., Devaraj S., Grundy S.M. and Jialal I., (2002). Cocoa Products Decrease Low Density Lipoprotein Oxidative Susceptibility but Do Not Affect Biomarkers of Inflammation in Humans. *J Nutr.* 132: 3663–3666
86. Farouque H.M.O., Leung M., Hope S.A., Baldi M., Schechter C., Cameron J.D. and Meredith I.T., (2006). Acute and chronic effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in subjects with coronary artery disease: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Clin Sci.* 111 (1), 71-80
87. Zhang X., Zhu Y., Song F., Yao Y., Ya Y., Li D., Ling W. and Yang Y., (2016). Effects of purified anthocyanin supplementation on platelet chemokines in hypocholesterolemic individuals: a randomized controlled trial. *Nutr Metab.* 13, 86
88. Santhakumar A.B., Kundura A.R., Fanning K., Netzel M., Stanley R. and Singha I., (2015). Consumption of anthocyanin-rich Queen Garnet plum juice reduces platelet activation related thrombogenesis in healthy volunteers. *J of funct. Foods.* 12, 11-22
89. Hassellund S.S., Flaa A., Kjeldsen S.E., Seljeflot I., Karlsen A., Erlund I. and Rostrup M., (2012). Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: a double-blind randomized placebo-controlled crossover study. *J Hum Hypertens.* 27, 100-106
90. Ellulu M.S., Rahmat A., Patimah I., Khaza'ai H. and Abed Y., (2015). Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. *Drug Des Devel Ther.* 9, 3405-3412
91. Ferns G.A.A., Forster L.A., Williams J.C., Tull S.P., Verma P.K., Starkey B. and Gershlick A.H., (2000). Effect of vitamin E supplementation on circulating cell adhesion molecules pre-and post-coronary angioplasty. *Ann Clin Biochem* 37, 649-654
92. Murphy R.T., Foley J.B., Tome M.T., Mulvihill N.T., Murphy A., McCarroll N., Crean P. and Walsh M.J., (2004). Vitamin E modulation of C-reactive protein in smokers with acute coronary syndromes. *Free Radic Biol Med.* 36 (8), 959-65

93. Devaraj S., Cabo Chan A.V. and Jlalal I., (2002). A-Tocopherol Supplementation Decreases Plasminogen Activator Inhibitor-1 and P-Selectin Levels in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 25, 524–529
94. Davi G., Romano M., Mezzetti A., Procopio A., Iacobelli S., Antidormi T., Bucciarelli T., Alessandrini P., Cuccurullo F. and Bittolo Bon G., (1998). Increased Levels of Soluble P-Selectin in Hypercholesterolemic Patients. *Circulation*. 97, 953-957
95. Tahir M., Foley B., Pate G., Crean P., Moore D., McCarroll N. and Walsh M., (2005). Impact of vitamin E and C supplementation on serum adhesion molecules in chronic degenerative aortic stenosis: a randomized controlled trial. *Am Heart J*. 150 (2), 302-306
96. Neri S., Signorelli S.S., Torrisi B., Pulvirenti D., Mauceri B., Abate G., Ignaccolo L., Bordonaro F., Cilio D., Calvagno S. and Leotta C., (2005). Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. *Clin Ther*. 27 (11), 1764-1773
97. Accinni R., Rosina M., Bamonti F., Della Noce C., Tonini A., Bernacchi F., Campolo J., Caruso R., Novembrino C., Gherzi L., Lonati S., Grossi S., Ippolito S., Lorenzano E., Ciani A., Gorini M., (2006). Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 16 (2), 121-127
98. Hejazi M.E., Modarresi-Ghazani F., Hamishehkar H., Mesgari-Abbasi M., Dousti S. and Entezari-Maleki T., (2017). The Effect of Treatment of Vitamin D Deficiency on the Level of P-Selectin and hs-CRP in Patients With Thromboembolism: A Pilot Randomized Clinical Trial. *J Clin Pharmacol*. 57, 40–47
99. Gholami K., Talasaz A.H., Entezari-Maleki T., Salarifar M. and Hadjibabaie M., (2015). The Effect of High-Dose Vitamin D3 on Soluble P-Selectin and hs-CRP Level in Patients with Venous Thromboembolism. A Randomized Clinical Trial. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. *J Sage* 22 (5), 483-489

100. Mangoni A.A., Arya R., Ford E., Asonganyi B., Sherwood R.A., Ouldred E., Swift C.G. and Jackson S.H., (2003). Effects of folic acid supplementation on inflammatory and thrombogenic markers in chronic smokers. A randomised controlled trial. *Thromb Res.* 110 (1), 13-7
101. Klerk M., Durga J., Schouten E.G., Kluft C., Kok F.J. and Verhoef P., (2005). No effect of folic acid supplementation in the course of 1 year on haemostasis markers and C-reactive protein in older adults. *Thromb Haemost.* 94 (1), 96-100
102. Durga J., van Tits L.J.H., Schouten E.G., Kok F.J. and Verhoef P., (2005). Effect of Lowering of Homocysteine Levels on Inflammatory Markers. A Randomized Controlled Trial. *Arch Intern Med.* 165 (12), 1388-1394
103. Vermeulen E.G., Rauwerda J.A., van den Berg M., de Jong S.C., Schalkwijk C., Twisk J.W. and Stehouwer C.D., (2003). Homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 lowers urinary albumin excretion but not plasma markers of endothelial function or C-reactive protein: further analysis of secondary end-points of a randomized clinical trial. *Eur J Clin Invest.* 33 (3), 209-215
104. Salden B.N., Troost F.J., de Groot E., Stevens Y.R., Garcés-Rimón M., Possemiers S., Winkens B. and Masclee A.A., (2016). Randomized clinical trial on the efficacy of hesperidin 2S on validated cardiovascular biomarkers in healthy overweight individuals *Am J Clin Nutr* 105, 1-2
105. Wiwanitkit V., (2007). New Developments in Thrombohemostatic Diseases. New York: *Nova Science Publishers*, 64
106. Alehagen U., Lindahl T.L., Aaseth J., Svensson E. and Johansson P., (2015). Levels of sP-selectin and hs-CRP Decrease with Dietary Intervention with Selenium and Coenzyme Q10 Combined: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *PLoS ONE.* 10 (9), 1-16
107. Jahnova E., Horvathova M., Gazdik F. and Weissova S., (2002). Effects of selenium supplementation on expression of adhesion molecules in corticoid-dependent asthmatics. *Bratislavske Lekarske Listy.* 103 (1), 12-16

108. Li D., (2015). European Review for Medical and Pharmacological Sciences Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: meta-analysis based. Systematic review, *Asia Pac J Clin Nutr.* 24 (1), 10-15
109. Mackay I., Ford I., Thies F., Fielding S., Bachoo P. and Brittenden J., (2012). Effect of Omega-3 fatty acid supplementation on markers of platelet and endothelial function in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 221, 514-520
110. Bachmair E.M., Wood S.G., Keizer H.G., Horgan G.W., Ford I. and de Roos B., (2014). Supplementation with a 9c,11t-rich conjugated linoleic acid blend shows no clear inhibitory effects on platelet function in healthy subjects at low and moderate cardiovascular risk: A randomized controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 741–750
111. Mann N.J., O’Connell S.L., Baldwin K.M., Singh I. and Meyer B.J., (2010). Effects of Seal Oil and Tuna-Fish Oil on Platelet Parameters and Plasma Lipid Levels in Healthy Subjects. *Lipids*, 45, 669–681
112. Elwakkad A.S., Mohamed S.I. and Fathalla M., (2007). Relation between hypercholesterolaemia and vascular endothelial microinflammation. *East. Mediterr. Health J.* 13 (3), 515-521
113. Davi G., Romano M., Mezzetti A., Procopio A., Iacobelli S., Antidormi T., Bucciarelli T., Alessandrini P., Cuccurullo F. and Bon G.B., (1998). Increased Levels of Soluble P-Selectin in Hypercholesterolemic Patients. *Circulation.* 97, 953-957
114. Chan L.W., Luo X.P., Ni H.C., Shi H.M, Liu L., Wen Z.C., Gu X.Y., Qiao J. and Li J., (2015). High levels of LDL-C combined with low levels of HDL-C further increase platelet activation in hypercholesterolemic patients. *Braz. J. Med. and Biol. Res.* 48 (2), 167-173
115. Zaleski A., Capizzi J., Ballard K.D., Troyanos C., Baggish A., D’Hemecourt P., Thompson P.D. and Parker B., (2013). Statins Attenuate the Increase in P-Selectin Produced by Prolonged Exercise. *J Sports Med.* 1-5
116. Daniel Y., Kupferminc M.J., Baram A., Jaffa A.J., Wolman I., Shenhav M. and Lessing J.B., (1998). *Hum Reprod.* 13 (12), 3537-3541

117. Garcia A.G., Nunez G.G., Sandoval M.E.V., Castellanos S.G. and Aguilar C.A., (2014). Factors associated with early Platelet activation in obese children. *Clin. Med. & Res.* 1 (2), 21-26