



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΧ VIVO ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΟΛΟΚΥΘΟΣΠΟΡΟΥ, ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΚΑΙ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΩΝ**

ΜΑΜΑΤΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ



Αθήνα, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νομικός Τζώρτζης(Επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Καλογερόπουλος Νικόλαος

**Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Εγώ η Βασιλική Μαμάτα,

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.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ	8
ABSTRACT- ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
Κολοκυθόσπορος	17
Είδη	17
Κατανάλωση-Τρόποι κατανάλωσης	18
Σύσταση-Βιοδράσεις	19
Αιμοπετάλια και χρόνιες παθήσεις	23
Αθηροσκλήρωση-Καρδιοαγγειακά	23
Καρκίνος	26
Νευροεκφυλιστικές νόσοι	30
Διατροφή και Αιμοπετάλια	33
Συστατικά τροφίμων και αιμοπετάλια	33
Τρόφιμα και αιμοπετάλια	37
ΣΚΟΠΟΣ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	45
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	46
Δείγματα κολοκυθόσπορου	46
Εκχυλίσεις κολοκυθόσπορου	47
Όργανα	47
Αντιδραστήρια - Διαλύτες	47
Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με διαλύτες μειούμενης πολικότητας (Εκχύλιση 1)	47
Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με υδατοαιθανολικά μίγματα (Εκχύλιση 2)	48
Εκχύλιση ολικών λιποειδών από κολοκυθόσπορο με την μέθοδο Folch (Εκχύλιση 3)	48
Βιολογική δοκιμασία συσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων	50
Όργανα	50
Αντιδραστήρια - Διαλύτες	50
Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP από υγιείς εθελοντές	50
Προετοιμασία εκχυλισμάτων για την εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής τους δράσης	51
Εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων	51
Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών με GC/MS	52

Όργανα	52
Αντιδραστήρια - Διαλύτες	52
Πειραματική πορεία	53
Προσδιορισμός στερολών και σκουαλενίου	55
Όργανα	55
Αντιδραστήρια - Διαλύτες	56
Πειραματική πορεία	56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
Παραλαβή εκχυλισμάτων από διαφορετικά είδη κολοκυθόσπορου	58
Πρώτο εκχυλιστικό σχήμα-Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με διαλύτες μειούμενης πολικότητας	58
Δεύτερο εκχυλιστικό σχήμα-Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με υδατοαιθανολικά μίγματα	59
Τρίτο εκχυλιστικό σχήμα-Εκχύλιση ολικών λιποειδών από κολοκυθόσπορο με την μέθοδο Folch	60
Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες	61
Σύσταση εκχυλισμάτων σε πολυφαινόλες	65
Αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων	76
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	87

Στους γονείς μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον καθηγητή μου, Τζώρτζη Νομικό για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια του καθόλη τη διάρκεια της δημιουργίας αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος, Νίκο Καλογερόπουλο για την ιδιαίτερη βοήθεια του σε πολλές πτυχές αυτής της εργασίας, και την καθηγήτρια και πρύτανη Σμαραγδή Αντωνοπούλου για την παραχώρηση του κατάλληλου εξοπλισμού για την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Άρτεμις Οικονομίδου για την βοήθεια της στο πειραματικό μέρος της διατριβής αλλά και για την ηθική υποστήριξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Ο κολοκυθόσπορος ανήκει στο γένος *Cucurbita* και είναι μέλος της οικογένειας *Cucurbitaceae*. Αυτή η οικογένεια, έχει σημαντική διατροφική και πολιτισμική αξία για τον άνθρωπο αφού ο κολοκυθόσπορος καταναλώνεται, είτε μαγειρεμένος, είτε ωμός, ενώ το έλαιο του χρησιμοποιείται και ως λειτουργικό τρόφιμο με ποικίλες φαρμακευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Τα αιμοπετάλια, πέρα από τον φυσιολογικό τους ρόλο στην αιμόσταση, όταν είναι υποκλινικά ενεργοποιημένα μπορούν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη χρόνιων παθήσεων όπως η αθηροθρόμβωση, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις και ο καρκίνος. Στα πλαίσια αυτά η τροποποίηση της δράσης των αιμοπεταλίων μέσω της διατροφής μελετάται ιδιαίτερα εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Δεδομένου ότι πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις του κολοκυθόσπορου, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση εκχυλισμάτων από διαφορετικούς κολοκυθόσπορους με τρία διαφορετικά σχήματα εκχύλισης, η εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης τους, η ανάλυση τους ως προς την σύστασή τους σε φυτοστερόλες, σκουαλένιο και πολυφαινόλες και η συσχέτιση των επιμέρους χαρακτηριστικών της σύστασής τους με την αντιαιμοπεταλιακή δράση. Για το σκοπό αυτό, έγινε εκχύλιση 4 διαφορετικών ειδών κολοκυθόσπορων (λεπτός ψημένος δίχως αλάτι, λεπτός ψημένος με αλάτι, πλατύς ψημένος με αλάτι, πλατύς ψημένος δίχως αλάτι) με 3 διαφορετικά σχήματα εκχύλισης. Στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκαν οι πολυφαινόλες και οι φυτοστερόλες, με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. Ο προσδιορισμός της αντιαιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων κολοκυθόσπορου προσδιορίστηκε βάση της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που επαγεται από γνωστούς ενδογενείς αγωνιστές αυτών. Όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, έδειξαν ανασταλτική δράση στην επαγόμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων, με τις τιμές IC_{50} να κυμαίνονται από 0,01 έως 2,74 mg/mL. Ισχυρότερη αντιαιμοπεταλιακή δράση παρουσίασαν τα υδατικά εκχυλίσματα. Ο λεπτός κολοκυθόσπορος με αλάτι είχε τη μεγαλύτερη ποσότητα συνολικών φυτοστερολών, ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση σκουαλενίου ανιχνεύθηκε στον πλατύ κολοκυθόσπορο με αλάτι. Η κύρια φυτοστερόλη που ανιχνεύθηκε ήταν η β-σιτοστερόλη. Η ανάλυση ως προς τις πολυφαινόλες και τερπενικές ενώσεις έδειξε ότι η συνολική συγκέντρωσή τους ήταν μεγαλύτερη στον πλατύ, ανάλοτο κολοκυθόσπορο. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και στα 4 είδη κολοκυθόσπορου φάνηκε να παρουσιάζει η τερπενική αλκοόλη ουβαόλη. Συμπερασματικά, ο κολοκυθόσπορος αποτελεί πλούσια πηγή φυτοστερολών και φαινολικών ενώσεων και τα υδατικά του εκχυλίσματα εμφανίζουν την καλύτερη ανασταλτική δράση στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τόσο ο ίδιος ο κολοκυθόσπορος, ως τρόφιμο, όσο και τα επιμέρους εκχυλίσματά του, ως συμπληρώματα, θα μπορούσαν να ασκήσουν σημαντικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις.

Λέξεις κλειδιά: Κολοκυθόσπορος, αιμοπετάλια, πολυφαινόλες, φυτοστερόλες
αντιαιμοπεταλιακή δράση

ABSTRACT- ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ

Pumpkin belongs to genus *Cucurbita* of the Cucurbitaceae family. This family has important nutritional and cultural value for human since pumpkin seeds are used in cooking, either raw or roasted, while its oil is used as a nutraceutical with a variety of pharmaceutical and therapeutical properties. Besides their physiological role on hemostasis, platelets, when transiently activated can contribute to the development of chronic conditions such as atherosclerosis , neurodegenerative disorders and cancer. Due to this fact, alternating platelet function through diet has been studied extensively lately. Given the fact that recent research has shown the importance of cardioprotective effects of pumpkin seeds, the goal of this study was to isolate extracts from different species of pumpkin seeds using three different extraction methods, to asses their antiplatelet activity, to determine their phytosterol, squalene and polyphenol composition and to correlate their composition with antiplatelet activity. To achieve these purposes, extraction of four different species of pumpkin seeds took place (thin roasted without salt, thin roasted with salt, thick roasted without salt and thick roasted with salt) using three different extraction methods. The determination of phytosterols and polyphenols was done upon the yielding extracts using gas chromatography-mass spectroscopy. The determination of antiplatelet activity of the pumpkin seeds extracts was done according to their ability to inhibit platelet aggregation caused by known endogenous agonists. All extracts showed inhibitory action on platelet aggregation, with IC₅₀ values ranging from 0,01 to 2,74 mg/ml. The most powerful antiplatelet action was exerted by water extracts. Thin salted pumpkin seeds seemed to have the biggest amount of total phytosterols, while the biggest squalene concentration was detected on thick salted pumpkin seeds. The main phytosterol detected was β -sitosterol. Polyphenol analysis of pumpkin seeds has shown that their total concentration was greater on thick unsalted pumpkin seeds. The greatest concentration in all four species of pumpkin seeds was uvaol's, a terpenic alcohol. To conclude with, pumpkin seed is a great source of phytosterols and phenolic compounds, while its water extracts show the strongest antiplatelet activity. Both pumpkin seeds and pumpkin seed water extracts used as a food supplement could exert important cardioprotective effects.

Key words: Pumpkin seed, platelets, polyphenols, phytosterols, antiplatelet activity.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1 Κολοκυθόσπορος PS1	σ.48
Εικ.2 Κολοκυθόσπορος PS2	σ.48
Εικ.3 Κολοκυθόσπορος PS3	σ.48
Εικ.4 Κολοκυθόσπορος PS4	σ.48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Κωδικοί των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις διαφορετικές μεθοδολογίες εκχύλισης.....	σ.49
Πίν.2: Απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίζονται με GC/MS.....	σ.54
Πίν.3: Επιλεγμένα ιόντα (m/z) για ποσοτικοποίηση στερολών και σκουαλενίου. Σε παρένθεση το σχετικό μέγεθος των κορυφών των ιόντων.....	σ.57
Πίν.4: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με το πρώτο σχήμα εκχύλισης..	σ.59
Πίν.5: Συνολική ποσότητα εκχυλισμάτων και το ποσοστό ανάκτησης του κάθε εκχυλίσματος που απομονώθηκαν με το πρώτο σχήμα εκχύλισης.....	σ.59
Πίν.6: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με το δεύτερο σχήμα εκχύλισης.....	σ.60
Πίν.7: Συνολική ποσότητα εκχυλισμάτων και το ποσοστό ανάκτησης του κάθε εκχυλίσματος που απομονώθηκαν με το δεύτερο σχήμα εκχύλισης.....	σ.60
Πίν.8: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με το τρίτο σχήμα εκχύλισης.....	σ.61
Πίν.9: Συνολική ποσότητα εκχυλισμάτων και το ποσοστό ανάκτησης του κάθε εκχυλίσματος που απομονώθηκαν με το τρίτο σχήμα εκχύλισης.....	σ.61
Πίν.10: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων PS1 σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες.....	σ.62
Πίν.11: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων PS2 σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες.....	σ.62
Πίν.12: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων PS3 σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες.....	σ.62
Πίν.13: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων PS4 σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες.....	σ.63
Πίν.14: Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του PS1.....	σ.63
Πίν.15: Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του PS2.....	σ.63
Πίν.16: Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του PS3.....	σ.64
Πίν.17: Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του PS4.....	σ.64
Πίν.18: Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες στα 4 είδη κολοκυθόσπορου - Συγκεντρωτικός πίνακας.....	σ.65
Πίν.19: Σχετική αναλογία φυτοστερολών στα 4 είδη κολοκυθόσπορου -Συγκεντρωτικός πίνακας.....	σ.65
Πίν.20: Σύσταση εκχυλισμάτων PS1 σε πολυφαινόλες (ng/mg).....	σ.65
Πίν.21: Σύσταση εκχυλισμάτων PS2 σε πολυφαινόλες.....	σ.68
Πίν.22: Σύσταση εκχυλισμάτων PS3 σε πολυφαινόλες.....	σ.69
Πίν.23: Σύσταση εκχυλισμάτων PS4 σε πολυφαινόλες.....	σ.70
Πίν.24: Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο PS1.....	σ.72
Πίν.25: Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο PS2.....	σ.73
Πίν.26: Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο PS3.....	σ.74

Πίν.27: Συνολική ποσότητα πολυφαινόλων ανά εκχυλιστικό σχήμα στο PS4.....	σ.75
Πίν.28: Σύσταση κολοκυθόσπορων σε πολυφαινόλες.....	σ.76
Πίν.29: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι ADP χρησιμοποιώντας το A.....	σ.78
Πίν.30: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι ADP χρησιμοποιώντας το S.....	σ.78
Πίν.31: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι ADP χρησιμοποιώντας το AUC.....	σ.78
Πίν.32: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι TRAP χρησιμοποιώντας το A.....	σ.79
Πίν.33: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι TRAP χρησιμοποιώντας το S.....	σ.79
Πίν.34: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι TRAP χρησιμοποιώντας το AUC.....	σ.79
Πίν.35: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι PAF χρησιμοποιώντας το A.....	σ.79
Πίν.36: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι PAF χρησιμοποιώντας το S.....	σ.80
Πίν.37: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι PAF χρησιμοποιώντας το AUC.....	σ.80
Πίν.38: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι ADP χρησιμοποιώντας το A, S και το AUC - Συγκεντρωτικός πίνακας.....	σ.80
Πίν.39: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι TRAP χρησιμοποιώντας το A, S και το AUC - Συγκεντρωτικός πίνακας.....	σ.81
Πίν.40: IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι PAF χρησιμοποιώντας το A, S και το AUC - Συγκεντρωτικός πίνακας.....	σ.81
Πίν.41: Σύγκριση διαφορετικών ειδών κολοκυθόσπορου (λεπτός-πλατύς) ως προς το σκουαλένιο και τις φυτοστερόλες.....	σ.85
Πίν.42: Σύγκριση κολοκυθόσπορων διαφορετικής επεξεργασίας (αλατισμένος- μή αλατισμένος) ως προς το σκουαλένιο και τις φυτοστερόλες.....	σ.86
Πίν.43: Σύγκριση διαφορετικών ειδών κολοκυθόσπορου (λεπτός-πλατύς) ως προς τις συνολικές και τις επιμέρους πολυφαινόλες.....	σ.87
Πίν.44: Σύγκριση κολοκυθόσπορων διαφορετικής επεξεργασίας (αλατισμένος- μή αλατισμένος) ως προς τις συνολικές και τις επιμέρους πολυφαινόλες.....	σ.88

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A	Ύψος συσσώρευσης
AA	Αραχιδονικό οξύ
AD	Νόσος Alzheimer
ADA	Απαμινάση της αδενοσίνης
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
ALP	Αλκαλική φωσφατάση
ALS	Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση
ALT	Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης
Asp	Ασπαρτικό οξύ
AST	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
AUC	Εμβαδόν κάτω απο την καμπύλη
BHT	Βουτυλοϋδροξυτολουόλιο
BSA	Βοείου αλβουμίνη ορού
BSTFA	Δις- (τριμεθυλοσιλυλο) –τριφθοροακεταμίδιο
cAMP	3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
COX-1	Κυκλο-οξυγονάση 1
COX-2	Κυκλο-οξυγονάση 2
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EGb 761	Εκχύλισμα Ginkgo biloba 761
ERK	Κινάσες ενεργοποιούμενες από εξωκυτταρικά σήματα
eNOS	Ενδοθηλιακή συνθάση του NO
FGF	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
GC/MS	Αέρια χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας
Glu	Γλουταμινικό οξύ
HbA_{1c}	Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
HD	Νόσος του Huntington
IC50	Συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή
IGF-1	Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1
IgG/IgM	Ανοσοσφαιρίνη G/ Ανοσοσφαιρίνη M
ITP	Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα
JNK	Κινάση Janus
LA	Λινελαϊκό οξύ
LDH	Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος

LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MAO	Μονοαμεινοοξειδάση
MAP	Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με μικροσωληνίσκους
MMPs	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
mRNA	Μεταφορικό RNA
MS	Σκλήρυνση κατά πλάκας
MUFA	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
MW	Μοριακό βάρος
NETs	Εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων
NIDDM	Μή ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης
NDDs	Νευροεκφυλιστικές ασθένειες
NTDPase	Νουκλεοσιδική τριφωσφατάση
NK	Κύτταρα φυσικοί φονείς
NMDA	Υποδοχέας του Ν-μεθυλο-D-ασπαραγινικού οξέος.
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
PAF	Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
PAG	Μικροσυσσωματώματα αιμοπεταλίων
PAI-1	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PD	Νόσος του Parkinson
PDGF	Αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων
PKA	Πρωτεϊνική κινάση Α
PLA2	Φωσφολιπάση Α2
PLC	Φωσφολιπάση C
PMPs	Μικροσωματίδια αιμοπεταλίων
rRNA	Ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου
RT	Χρόνος κατακράτησης
S	Κλίση
SDF-1	Παράγοντας στρωματικών κυττάρων 1
STAT	Μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής
TXA₂	Θρομβοξάνιο Α2
TXB₂	Θρομβοξάνιο Β2
TF	Ιστικός παράγοντας
TFP1	Αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού του ιστικού παράγοντα 1
TGF-β1	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β1
TRAP	Πεπτίδιο Ενεργοποίησης του Υποδοχέα της Θρομβίνης
TSP-1	Θρομβοσπονδίνη-1

VEGF	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VMAT	Φυσαλιδώδης μεταφορέας μονοαμίνης
VTE	Φλεβική θρομβοεμβολή
vWF	Παράγοντας von Willebrand

Κολοκυθόσπορος

Είδη

Ο κολοκυθόσπορος είναι ο σπόρος της κολοκύθας, όπως προκύπτει και από το όνομά του. Η κολοκύθα ανήκει στα δέκα πιο συχνά καλλιεργήσιμα είδη λαχανικών παγκοσμίως κυρίως στις εύκρατες και υποτροπικές περιοχές του κόσμου (Saavedra et al, 2013). Η κολοκύθα, ανήκει στο γένος *Cucurbita* και είναι μέλος της οικογένειας *Cucurbitaceae* από την οποία τα είδη *C.moschata*, *C.maxima* και *C.pepo* είναι τα πλέον καλλιεργήσιμα είδη στον κόσμο (Durante et al, 2014).

Ο όρος κολοκύθα έχει τις ρίζες του στην Ελληνική και Λατινική λέξη για το μεγάλο, στρογγυλό φρούτο. Έτσι, η λέξη κολοκύθα χρησιμοποιείται για να περιγράψει τους εδωδιμους καρπούς του γένους *Cucurbita* που έχουν στρογγυλό ή σχεδόν στρογγυλό σχήμα. Έχει αναλογία μήκους-πλάτους 1:1 και σχεδόν πάντα καταναλώνεται όταν είναι ώριμη (Harry et al, 1996). Η κολοκύθα είναι δικοτυλήδονο φυτό και αποτελείται από ένα εύκαμπτο χυμώδες στέλεχος με τρίφυλλα φύλλα. Είναι επίσης αναρριχητικό φυτό και μεγαλώνει από 0,6 έως 5 μέτρα. Όταν ωριμάσει βγάζει άνθη και καρπούς οι οποίοι έχουν αμέτρητους σπόρους (Caili et al, 2006).

Η οικογένεια *Cucurbitaceae* κατηγοριοποιείται συνολικά σε 15 φυλές που εμπεριέχουν 97 γένοι και 940-980 είδη. Αυτή η οικογένεια, έχει σημαντική διατροφική και πολιτισμική αξία για τον άνθρωπο για περισσότερα από 12.000 χρόνια (Khalaf et al, 2016).

Το γένος *Cucurbita* της οικογένειας *Cucurbitaceae* περιέχει συνολικά πέντε καλλιεργήσιμα είδη. Αυτά είναι τα *Cucurbita argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. moschata*, και *C. Pepo* (Harry et al, 1996). Το είδος *Cucurbitae pepo* L. εμφανίζει ίσως την μεγαλύτερη ποικιλομορφία στα χαρακτηριστικά των καρπών του όπως το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα τους ενώ σχεδόν όλα τα καλλιεργήσιμα είδη δεν έχουν πικρή γεύση, η σάρκα τους είναι πιο παχιά, με πιο έντονο χρωματισμό και είναι λιγότερο ινώδης σε σχέση με αυτά που φύονται στην φύση. Αυτοί οι καλλιεργήσιμοι τύποι έχουν επίσης μεγαλύτερα και παράλληλα λιγότερα βλαστικά και αναπαραγωγικά μέρη.

Τα άγρια είδη *Cucurbita* είναι έντονα διακλαδισμένα φυτά που φέρουν καρπούς, τις κολοκύθες, που είναι μικρού μεγέθους (περίπου 10 cm σε διάμετρο), στρογγυλές, λείες και γραμμωτές. Έχουν λεπτή ινώδη και πικρής γεύσης σάρκα, που εμπεριέχει αρκετές εκατοντάδες μικρούς επίπεδους και σχεδόν ελλειπτικούς σπόρους (Gong et al, 2011).

Το είδος *C. Pero* είναι, ανάμεσα στα υπόλοιπα, αυτό με τη μεγαλύτερη χρηματική αξία. Φύεται στην Βόρεια Αμερική, αλλά έχει βρεθεί άγριο και στο νότιο τμήμα των Ηνωμένων Πολιτειών και του βορειοανατολικού Μεξικού. Τα κολοκυνθοειδή, τα οποία είναι ενδημικά τόσο σε ξηρές όσο και σε εύκρατες περιοχές της γής, χρειάζονται μεγάλες περιόδους ζεστού και ξηρού κλίματος για την βέλτιστη ανάπτυξή τους. Είναι ευαίσθητα στον παγετό, ανθεκτικά της ξηρασίας και δέν ανέχονται το υγρό, ελλιπώς σταγγισμένο χώμα (Jacks et al, 1972).

Κατανάλωση-Τρόποι κατανάλωσης

Οι καρποί των διαφόρων ειδών *cucurbita* χρησιμοποιούνται για μαγειρικούς σκοπούς ανά τον κόσμο εδώ και πολλά χρόνια (Harry et al, 1996). Καταναλώνονται μαγειρεμένοι, ως συστατικό σε πίτες, σούπες και αρτοσκευάσματα (Durante et al, 2014). Βέβαια, μόνο ένα μικρό μέρος του φυτού χρησιμοποιείται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα, είτε μετατρέπεται σε θρεπτικά συστατικά για τρόφιμα και ζωοτροφές ή σε λιπάσματα (Saavedra et al, 2013).

Ο κολοκυθόσπορος είναι ένα πολύ δημοφιλές σνακ σε αρκετές χώρες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και η Ελλάδα. Καταναλώνεται είτε ωμός είτε ψημένος, αλατισμένος ή μη, και χρησιμοποιείται στην μαγειρική και στην αρτοποιία ως συστατικό αρτοσκευασμάτων, δημητριακών και σε σαλάτες. Επίσης, οι σπόροι κολοκύθας χρησιμοποιούνται συχνά για απευθείας κατανάλωση και σε πολλές Αραβικές χώρες. Οι σπόροι αυτοί είναι άριστη πηγή πρωτεϊνών (25.2–37%) και λιπιδίων (37.8–45.4 %) (Saavedra et al, 2013). Επιπλέον, το έλαιο του κολοκυθόσπορου σήμερα, αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη αξία όχι μόνο ως εδωδιμο έλαιο αλλά και ως φαρμακοτρόφιμο (nutraceutical), καθώς φαίνεται ότι παρέχει πολλά οφέλη στην υγεία τα οποία αποδίδονται εξίσου στα μακρο- και μικροθρεπτικά του συστατικά (Barakat et al, 2011). Επίσης, το έλαιο του κολοκυθόσπορου είναι ένα πολύ δημοφιλές λάδι σαλάτας στην Αυστρία, την Ουγγαρία αλλά και την Σλοβενία (Kalogeropoulos). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, διατίθεται τυποποιημένο σε κάψουλες που περιέχουν 1 γραμμάριο λαδιού (Stevenson et al, 2007).

Τέλος, η κολοκύθα έχει χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο σε πολλές χώρες όπως στην Κίνα, την Γιουγκοσλαβία, την Αργεντινή, την Ινδία, το Μεξικό, τη Βραζιλία και την Αμερική (Cailli et al, 2006).

Σύσταση-Βιοδράσεις

Το 80% του συνολικού ποσοστού λιπαρών οξέων του κολοκυθόσπορου αποτελείται από ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη είναι περίπου 35% (Kamel et al, 1982). Επιπλέον, ο κολοκυθόσπορος αποτελεί καλή πηγή καλίου, φωσφόρου, σιδήρου και β-καροτενίου (Caili et al, 2006).

Οι σπόροι του γένους *Cucurbita sp* χρησιμοποιήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην Κινεζική ιατρική, για την καταπολέμηση των εντερικών παράσιτων και την αντιμετώπιση προβλημάτων των χοληφόρων αδένων και του προστάτη. Επιπλέον, οι μη εκκολαφθέντες (nongerminated) σπόροι έχουν υπογλυκαιμική δράση, ενώ μπορούν επίσης να λειτουργήσουν με αντιοξειδωτικό, αντικαρκινικό και αντι-φλεγμονώδη τρόπο (Barda et al, 2016).

Το έλαιο του κολοκυθόσπορου είναι συνήθως ένα εξαιρετικά ακόρεστο λάδι, στο οποίο κυριαρχούν το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ. Έχει πολύ χαμηλά επίπεδα λινολενικού οξέος ή άλλων κορεσμένων λιπαρών οξέων, γεγονός που το κάνει να αποκτά υψηλή οξειδωτική σταθερότητα για αποθήκευση ή για βιομηχανική χρήση, και χαμηλή παραγωγή ελεύθερων ριζών στην διατροφή του ανθρώπου (Stevenson et al, 2007).

Επιπλέον, το έλαιο του κολοκυθόσπορου παρέχει πολλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου. Το πιο σημαντικό από αυτά, είναι η πρόληψη της διόγκωσης και η μείωση του μεγέθους του προστάτη. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποδεικνύουν ότι το έλαιο του κολοκυθόσπορου μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη της υπέρτασης και να μετριάσει την υπερχοληστερολαιμία και την αρθρίτιδα. Ακόμα, η μείωση της πίεσης στην ουροδόχο κύστη και στην ουρήθρα, καθώς και η βελτιωμένη συμμόρφωση της ουροδόχου κύστης, έχουν συσχετιστεί με τα λιπιδικά συστατικά του κολοκυθόσπορου. Το έλαιο του κολοκυθόσπορου, φαίνεται να βελτιώνει τον διαβήτη μέσω της προώθησης της υπογλυκαιμικής δραστηριότητας. Επίσης, είναι μια σημαντική πηγή βιταμίνης E (τοκοφερόλη) κυρίως στις Ιαπωνικές δίαιτες (Carolina et al, 2012). Δίαιτες υψηλές σε κολοκυθόσπορο έχουν επίσης συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα γαστρικού καρκίνου, καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, και του παχέος εντέρου. Τα καροτενοειδή που προέρχονται από όλων των ειδών τις κολοκύθες έχουν συνδεθεί με την πρόληψη του καρκίνου του προστάτη. Σε αντίθεση με όλα τα παραπάνω, το λάδι του κολοκυθόσπορου δεν φαίνεται να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση (Stevenson et al, 2007).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της τοκοφερόλης θα μπορούσαν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη θεραπευτική δράση του ελαίου του κολοκυθόσπορου. Βρέθηκε ότι το έλαιο από ψημένο κολοκυθόσπορο περιείχε υψηλότερα επίπεδα R- και γ-τοκοφερόλης από ότι το έλαιο από ψημένο ηλιέλαιο (Stevenson et al, 2007).

Αιθανολικά εκχυλίσματα από το είδος *Cucurbita pepo* έχουν χρησιμοποιηθεί για περισσότερα από τριάντα χρόνια στην Ευρώπη, κυρίως ως θεραπεία για την υπερπλασία του αδένου του προστάτη και για προβλήματα ούρησης λόγω υπερδραστικής ουροδόχου κύστης. Τα ενεργά συστατικά των σπόρων του *Cucurbita pepo* είναι οι Δ5-, Δ7- και Δ8- στερόλες. Οι Δ7-στερόλες που κυριαρχούν σε μεγάλο βαθμό, θεωρούνται τα βασικά ενεργά συστατικά του κολοκυθόσπορου που βοηθάνε στην θεραπεία της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη. Η υψηλή περιεκτικότητα του σε καροτενοειδή, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και λιποδιαλυτές βιταμίνες παίζει επίσης ρόλο σε αυτήν του τη δράση (Rocco et al, 2016).

Αντιδιαβητική δράση

Η κολοκύθα μελετάται κυρίως για την αντιδιαβητική της δράση. Ο πολτός των καρπών και οι σπόροι αυτού του φυτού έχουν δείξει υπογλυκαιμική δράση σε φυσιολογικά ζώα αλλά και σε αρουραίους και κουνέλια με επαγόμενο διαβήτη (alloxan-induced diabetic rats and rabbits.). Το έλαιο από τους κολοκυθόσπορους που δεν έχουν βλαστήσει και οι πρωτείνες από κολοκυθόσπορους που είχαν βλαστήσει κατείχαν υπογλυκαιμική δράση. Οι πρωτείνες με μοριακό βάρος άνω των 60 kDa και κάτω των 3 kDa από τους κολοκυθόσπορους 4 ημερών μετά την βλάστηση τους, αυξάνουν εμφανώς τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα. Επιπλέον, το έλαιο από τους σπόρους που δεν έχουν βλαστήσει και τα πρωτεϊνικά συστατικά από βλαστημένους σπόρους με μοριακό βάρος μεταξύ 3–60 kDa βελτίωσαν την ανοχή της γλυκόζης στο αίμα. Παρόλα αυτά, οι πρωτείνες από τους κολοκυθόσπορους που δεν έχουν βλαστήσει δεν κατείχαν υπογλυκαιμική δράση (Makni et al, 2008, Caili et al, 2006).

Αντιβακτηριδιακή δράση

Έχουν υπάρξει αναφορές σχετικά με ευρέως φάσματος αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων κολοκύθας. Το έλαιο της κολοκύθας αναστέλλει τα *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii biogroup sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica subsp. enterica serotype typhimurium*, *Serratia marcescens* και τον *Staphylococcus aureus* σε συγκέντρωση 2.0% (v/v). Ένα πεπτίδιο από τον κολοκυθόσπορο αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τα *B. cinerea*, *F. oxysporum* και *M. arachidicola* στη δόση των 375 μg. Οι α- και β-moschin, δύο πρωτείνες με μοριακό βάρος 12 kDa από φρέσκους κολοκυθόσπορους, εμφανίζουν ανασταλτική δράση στην μετάφραση. Σημαντική ανασταλτική δράση φάνηκε να κατέχει μία καθαρισμένη πρωτεΐνη (MW 28000) κατά της ανάπτυξης των μυκήτων *Fusarium oxysporum* σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2mM. Φάνηκε επίσης ότι αυτή η πρωτεΐνη

εμφανίζει συνεργιστική δράση μαζί με την νικομυκίνη (nikkomycin), έναν αναστολέα της συνθάσης της χιτίνης, στην αναστολή της ανάπτυξης της *Candida albicans*. Τρεις βασικές πρωτεΐνες του κολοκυθόσπορου, η MAP2 (MW: 2249D), MAP4 (MW: 4650D) και η MAP11 (MW: 11696D), αναστέλουν την ανάπτυξη των κυττάρων των ζυμομηκύτων, με την MAP11696 να είναι ο πιο αποτελεσματικός αναστολέας (Caili et al, 2006).

Υποχοληστερολαιμικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η χορήγηση ελαίου από κολοκυθόσπορο έχει αναφερθεί να επιτυγχάνει στην ρύθμιση των περισσότερων παραμέτρων που επηρεάζονται κατά την αρθρίτιδα, κυρίως στη χρόνια φάση (chronic phase). Η θεραπεία των αυθόρμητα υπερτασικών αρουραίων με φελοδιπίνη ή καπτοπρίλη, σε μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με έλαιο κολοκυθόσπορου, έδειξε βελτίωση στις μετρούμενες ελεύθερες ρίζες στην καρδιά και στους νεφρούς. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι το έλαιο κολοκυθόσπορου ήταν αποτελεσματικό για χρήση κατά της υπερχοληστερολαιμίας (Caili et al, 2006).

Αντικαρκινική δράση

Η μοσχατίνη (Moschatin), μία rRNA N-γλυκοσιδάση από τους σπόρους κολοκύθας εμπόδισε ισχυρά την πρωτεϊνοσύνθεση στο κυτταρόπλασμα των δικτυοκυττάρων των κουνελιών. Έχει παρατηρηθεί ότι οι πρωτεΐνες MAP2 και MAP4 έχουν επίδραση στην ανάπτυξη των K-562 κυττάρων στην λευχαιμία, αλλά πολύ μικρή σε συγκεντρώσεις άνω των 6 mM. Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες από τον κολοκυθόσπορο αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο μελάνωμα (Caili et al, 2006).

Ανοσορυθμιστική δράση

Σε μελέτες για την αντινεοπλασματική δράση των πολυσακχαριτών του κολοκυθόσπορου, παρατηρήθηκε αύξηση της ανοσολογικής λειτουργίας των κυττάρων. Τα εκχυλίσματα κολοκύθας μπορούσαν να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο σπλήνα και την δράση των κυττάρων NK και να ενισχύσουν τον αριθμό των CD4+, CD8+ και την αναλογία CD4+ /CD8+ (Caili et al, 2006).

Ανθελμιντικές ιδιότητες

Ο κολοκυθόσπορος είχε αναγνωρισθεί ως ανθελμινθικό και καταναλωνόταν φρέσκος ή ψημένος για την ανακούφιση από τις κοιλιακές κράμπες και την διάταση λόγω εντερικών σκουλικιών. Η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων κολοκυθόσπορου στην θεραπεία κουταβιών από *heterophyiasis* σε πειραματικό επίπεδο, είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και η συνδιαστική χρήση εκχυλισμάτων από φυστίκι *areca* και κολοκυθόσπορο είχε εξαιρετικά αποτελέσματα, σε σχέση με αυτά του κάθε εκχυλίσματος ξεχωριστά (Caili et al, 2006).

Δράση κατά του σχηματισμού λίθων της ουροδόχου κύστης

Σε έρευνα που διεξήχθη στην Ταϊλάνδη, φάνηκε ότι η συμπληρωματική χορήγηση κολοκυθόσπορου ως σνακ, ανέστειλε τη δημιουργία ή τη συσσώρευσης κρυστάλλων που ακολούθως μειώνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη λίθων στην ουροδόχο κύστη. Ο κολοκυθόσπορος ή το συμπλήρωμα ορθοφωσφορικού σε δόση 60 mg/kg ημερησίως, μπορούσε να μειώσει την εμφάνιση λίθων της ουροδόχου κύστης, ενώ όσο περισσότερο διαρκούσε η συμπληρωματική χορήγηση του κολοκυθόσπορου, τόσο καλύτερα τα αποτελέσματα. Έχει αναφερθεί ότι το έλαιο του κολοκυθόσπορου μπορεί να μειώσει σημαντικά την πίεση στην ουροδόχο κύστη, να αυξήσει την συμμόρφωση της και να μειώσει την πίεση στην ουρήθρα (Caili et al, 2006).

Άλλες δράσεις

Σε προκαταρκτικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, έχουν φανεί διάφορες άλλες φαρμακολογικές ιδιότητες του κολοκυθόσπορου. Προθεραπεία των αυθόρμητα υπερτασικών αρουραίων με έλαιο κολοκυθόσπορου για 4 εβδομάδες και έπειτα ενδοφλεβια χορήγηση φελοδιπίνης ή καπτοπρίλης παρήγαγε σημαντικά ευεργετική υποτασική δράση. Σε μία κλινική δοκιμή, το καθημερινό συμπλήρωμα 30 g σκόνης κολοκυθόσπορου είχε υποτασική δράση σε 20 υγιή και 20 διαβητικά άτομα με διαβήτη τύπου 2 (NIDDM). Η συμπληρωματική χορήγηση πρωτεϊνών κολοκυθόσπορου έπειτα από δηλητηρίαση με CCl₄ είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των επιπέδων δραστηριότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT), της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) και της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) με αποτέλεσμα την ανακούφιση των αρνητικών επιπτώσεων που συνδέονται με τον πρωτεϊνικό υποσιτισμό (Caili et al, 2006).

Οι πρωτεΐνες από τον κολοκυθόσπορο αναστέλουν την θρυψίνη και τον ενεργοποιημένο παράγοντα *Hageman*, μίας σερινοπρωτεάσης που συμμετέχει στην διαδικασία πήξης του αίματος (Caili et al, 2006).

Αθηροσκλήρωση-Καρδιοαγγειακά

Η καρδιοαγγειακή νόσος είναι μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Οι ερευνητές υπολογίζουν ότι μέχρι το 2030, στις χώρες χαμηλού εισοδήματος, η καρδιοαγγειακή νόσος θα είναι υπεύθυνη για περισσότερους θανάτους από ότι οι μολυσματικές ασθένειες και οι διατροφικές διαταραχές μαζί. Τα αιμοπετάλια παίζουν βασικό ρόλο στην διαδικασία της αιμόστασης και της επούλωσης των τραυμάτων. Ωστόσο, η υπερδραστηριότητα τους σχετίζεται με την ανάπτυξη αλλά και τις επιπλοκές πολλών καρδιαγγειακών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης, της αθηροσκλήρωσης, του εμφράγματος του μυοκαρδίου, της περιφερικής αρτηριακής νόσου και του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (El Haouari et al, 2016).

Διάφοροι παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με την υπερδραστηριότητα των αιμοπεταλίων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, η υπέρταση, το κάπνισμα, το άγχος και η υπερχοληστερολαιμία. Επιπλέον, η υπερβολική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αποδίδεται εξίσου στις υψηλές μηχανικές δυνάμεις διάτμησης (shear forces) στην κυκλοφορία του αίματος, και στην αγγειακή βλάβη, η οποία παρατηρείται σε ασθενείς με υπέρταση και διαβήτη (Prociuk et al, 2008). Πράγματι, έπειτα από τραυματισμό των αγγείων και/ή ρήξη αθηρωματικής πλάκας, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται μέσω των επιφανειακών υποδοχέων τους στον υποενδοθηλιακό χώρο, το οποίο και πυροδοτεί την ενεργοποίηση και την επακόλουθη συσσωμάτωση τους. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ελευθερώνουν προθρομβωτικούς μεσολαβητές οι οποίοι βρίσκονται μέσα στα κυστίδια τους (granules), όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η σεροτονίνη, η Ρ-σελεκτίνη, το ινωδογόνο, το Ca^{2+} και η θρομβοξανή A_2 (TXA_2), τα οποία ενισχύουν ακόμα περισσότερο την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την δημιουργία θρόμβου (El Haouari et al, 2016).

Η παρουσία ενός θρόμβου σε μία αρτηρία που παρέχει αίμα σε ένα ζωτικής σημασίας όργανο όπως η καρδιά ή ο εγκέφαλος, είναι η πιο κοινή αιτία οξέων στεφανιαίων διαταραχών συμπεριλαμβανομένου του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της στηθάγχης. Έτσι, η πρόληψη των αρτηριακών θρομβωτικών ασθενειών έχει προτεραιότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Υπό την έννοια αυτή, η αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων μπορεί να παρέχει προστασία έναντι των καρδιοαγγειακών νοσημάτων που επηρεάζουν εκατομύρια ανθρώπους παγκοσμίως (El Haouari et al, 2016).

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση

Τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα κυτταρικά σωματίδια που προέρχονται από το κυτταρόπλασμα, από τα πρόδρομα κύτταρα τους, τα μεγακαρυοκύτταρα στον μυελό των οστών, και κυκλοφορούν στο αίμα παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση (El Haouari et al, 2016). Αποτελούν τα μικρότερα σχηματισμένα στοιχεία του αίματος με διάρκεια ζωής 7-10 ημερών και περιέχουν ποικιλία ενδοκυτταρικών οργανιδίων, συμπεριλαμβανομένων των διαφορετικών τύπων εκκριτικών κοκκίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που καταλήγει στην αποκοκκίωση και την συσσωμάτωσή τους, είναι απαραίτητη για την αιμόσταση (Heber et al, 2015). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων, η οποία σχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της θρόμβωσης και στην επίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών. Έτσι λοιπόν, έχει φανεί ότι σε ασθενείς με διαβήτη και υπέρταση, τα αιμοπετάλια είναι πιο ευαίσθητα στους αγωνιστές και υπάρχει αυξημένη αυθόρμητη συσώρευση τους, η οποία προωθεί την δημιουργία θρόμβου. Επιπροσθέτως, αρκετές μελέτες προτείνουν ότι τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή και την αθηροσκλήρωση, όχι μόνο δια μέσου της δημιουργίας θρόμβου αλλά και ως επαγωγείς της φλεγμονής (El Haouari et al, 2016).

Πράγματι, ένα έυρος μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και/ή αποθηκευμένα σε αυτά συνεισφέρουν στην επικοινωνία τους με άλλα φλεγμονώδη κύτταρα κατά την αγγειακή φλεγμονή, που εμπλέκεται στην δημιουργία και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Γενικά, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συμβαίνει μετά από αγγειακή βλάβη, ρήξη αθηρωματικής πλάκας και/ή ενεργοποίηση από αγωνιστές. Επιπλέον, διάφοροι παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, συμπεριλαμβανομένης της υπερχοληστερολαιμίας, της υπέρτασης, του καπνίσματος, του διαβήτη, της ανθυγιεινής διατροφής, του άγχους και της έλλειψης φυσικής δραστηριότητας, αυξάνουν τον αριθμό των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ακόμα, σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, υπάρχει αύξηση προφλεγμονοδών μεσολαβητών και/ή αγωνιστών αιμοπεταλίων στο αίμα (El Haouari et al, 2016).

Τα αιμοπετάλια αντιδρούν σε ποικιλία αγωνιστών με συγκεκριμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, τα αιμοπετάλια αντιδρούν στην θρομβίνη και στην TXA_2 μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων, με μία παροδική αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , το οποίο ενεργοποιεί την φωσφολιπάση A_2 (PLA_2) στα αιμοπετάλια, οδηγώντας στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (AA), το οποίο έπειτα μετατρέπεται από την κυκλοοξυγονάση (COX-1) σε TXA_2 , το οποίο ενισχύει την ενεργοποίηση και την συσώρευση τους. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα κύτταρα του ενδοθηλίου, και προάγουν την τοπική αγγειακή φλεγμονή μέσω μεσολαβητών της φλεγμονής όπως οι χημειοκίνες, η οποία αλλάζει την φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου. Επιπλέον, έχει φανεί ότι τα αιμοπετάλια

ασθενών με καρδιοαγγειακή νόσο είναι υπερδραστήρια και λιγότερο ευαίσθητα στους αντιαιμοπεταλιακούς παράγοντες (El Haouari et al, 2016).

Το υγιές και ακέραιο επιθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων μέσω της απελευθέρωσης προστακυκλίνης (PGI₂) και νιτρικού οξέος (NO), τα οποία μειώνουν την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Παρόλα αυτά, κατά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια παράγουν μία ποικιλία από προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, οι οποίοι διεγείρουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αυξάνουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Επίσης, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παράγουν περισσότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του ενεργού NO, και ενισχύουν περαιτέρω την ενεργοποίησή τους. Ακόμα, έχει φανεί ότι τα αιμοπετάλια που διεγείρονται από την θρομβίνη απελευθερώνουν περισσότερες από 300 διαφορετικές πρωτεΐνες αρκετές από τις οποίες έχουν αναγνωριστεί στις αθηρωματικές βλάβες, όπου και προκαλούν την ενεργοποίηση και την μετανάστευση/στρατολόγηση κυττάρων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η Α-δισιντεγκρίνη και η μεταλλοπρωτεϊνάση που εκφράζονται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα αλληλεπιδρούν με την ιντεγκρίνη GPIIb/IIIa των αιμοπεταλίων και επάγουν την ενεργοποίησή τους, προκαλώντας την επιτάχυνση του σχηματισμού του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προκαλεί ανακατανομή των ανιονικών φωσfolιπιδίων που επάγουν την σύνθεση και την έκφραση του ιστικού παράγοντα και προωθούν την διαδικασία της πήξης (El Haouari et al, 2016).

Πέρα από τον παραδοσιακό τους ρόλο στην αιμόσταση και την θρόμβωση, τα αιμοπετάλια αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως ανοσοτροποποιητικά κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα μικροσωματίδια που προέρχονται από αυτά μπορούν να συνδεθούν με τα λευκοκύτταρα, και έτσι να διεγείρουν την αμοιβαία ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων με αποτέλεσμα την ταχεία, τοπική απελευθέρωση κυτταροκινών που προέρχονται από τα αιμοπετάλια. Με αυτόν τον τρόπο τα αιμοπετάλια διαμορφώνουν δραστικές λειτουργίες των λευκοκυττάρων και συμβάλλουν σε φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις σε τραυματισμό ή μόλυνση. Τα αιμοπετάλια ενισχύουν την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων, την διαφοροποίηση και την απελευθέρωση κυτταροκινών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και ουδετερόφιλων ενισχύουν την οξειδωτική έκκριση, τον σχηματισμό εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων (NETs) και την φαγοκυττάρωση και παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή. Οι αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα προκαλούν την διαφοροποίησή των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, ρυθμίζουν την απελευθέρωση κυτταροκινών και μετριάζουν τις λειτουργίες των μακροφάγων. Ανάλογα με την υποκείμενη παθολογία, τα αιμοπετάλια μπορούν να ενισχύσουν ή να ελατώσουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα λευκοκύτταρα, υποδεικνύοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων αντιπροσωπεύουν ένα καλά ισορροπημένο σύστημα για τον περιορισμό της

υπερβολικής φλεγμονής κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης. Στην αθηροσκλήρωση, η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα επιταχύνει βασικά βήματα της αθηρογένεσης προωθώντας την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων και τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων στα σημεία των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων αποσταθεροποιούν τις αθηρωματικές πλάκες και προωθούν την ρήξη τους. Τα λευκοκύτταρα με τη σειρά τους ρυθμίζουν επίσης τη λειτουργία και την παραγωγή των αιμοπεταλίων, η οποία είτε οδηγεί σε αυξημένη καταστροφή των αιμοπεταλίων ή σε αύξηση της παραγωγή τους (Kral et al, 2016) .

Καρκίνος

Πέρα από τον κεντρικό τους ρόλο στην αιμόσταση και την θρόμβωση, τα αιμοπετάλια συνεισφέρουν στην ανάπτυξη μίας πληθώρας ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων και των κακοηθειών. Αρκετά πειραματικά και κλινικά στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στον καρκίνο προωθεί την εξέλιξη της νόσου. Η ιδέα ότι τα αιμοπετάλια μπορεί να συμμετέχουν στην βιολογία του καρκίνου δεν είναι καινούργια αφού βρέθηκε πειραματικά ότι η μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων ή της λειτουργικότητάς τους, έχει αντιμεταστατικές ιδιότητες σε μοντέλα ζώων.

Σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα, οι ασθενείς με καρκίνο, συχνά παρουσιάζουν θρομβωκυττάρωση και αυξημένους δείκτες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων όπως η P-σελεκτίνη και τα προερχόμενα από αιμοπετάλια μικροσωματίδια (PMPs), αντανακλώντας μια κατάσταση ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της πορείας της νόσου. Τα αιμοπετάλια πιστεύεται επιπλέον, ότι συμβάλλουν στην κατάσταση υπερπηκτικότητας που παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με καρκίνο, που οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου φλεβικής θρομβοεμβολής (VTE), η οποία είναι η κύρια αιτία θανάτου κατά τη διάρκεια της πορείας της νόσου. Τέλος, τα αποτελέσματα πολυάριθμων τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών έδειξαν ότι τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα μπορούν να μειώσουν τη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων μορφών καρκίνου (Mezouar et al, 2016).

Δράσεις των αιμοπεταλίων στον καρκίνο

Ο καρκίνος προάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συμμετέχουν σε κάθε στάδιο της εξέλιξης του καρκίνου.

Η ανάπτυξη του όγκου

Όταν ενεργοποιούνται, τα αιμοπετάλια που καταφθάνουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου μπορούν να ρυθμίζουν τοπικά τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων και να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό όχι μόνο μέσω παρακρινούς σηματοδότησης, αλλά και μέσω της άμεσης επαφής με τα καρκινικά κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα PMPs απελευθερώνουν πράγματι πολυάριθμες μιτογόνες πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες από τα α-κοκκία τους, συμπεριλαμβανομένου των PDGF-A και PDGF-B, του IGF-I και του παράγοντα PF4, του VEGF, του TGF-β1, του παράγοντα SDF-1 των στρωματικών κυττάρων και της αγγειοποιητίνης, τα οποία βρέθηκε ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη του όγκου σε διάφορες *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Mezouar et al, 2016).

Όσον αφορά την ανάπτυξη του όγκου, τα αιμοπετάλια όχι μόνο εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, αλλά απελευθερώνουν και τοξικές κυτταροκίνες που αναστέλλουν την ανάπτυξη του. Ο αγγειοστατικός παράγοντας PF4 φάνηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου και τη μετανάστευση τους. Εξαιτίας αυτού, προτάθηκε ως πρόσθετη θεραπεία του καρκίνου (Mezouar et al, 2016).

Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση ορίζεται ως ο σχηματισμός νέων μικροαγγείων από προϋπάρχον αγγειακό σύστημα. Αυτή η διαδικασία φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την πρωτογενή ανάπτυξη όγκων μεγαλύτερων των 2 mm. Όχι μόνο εμποδίζει την υποξία και την νέκρωση, αλλά και επιτρέπει την παράδοση των πρωτεασών και των κυτταροκινών που συμβάλλουν στην περαιτέρω ενδαγγείωση, εξαγγείωση και διάδοση. Έχουν συσσωρευτεί στοιχεία που υποστηρίζουν τη συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην νεοαγγείωση όγκων. Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, τα αιμοπετάλια έρχονται σε επαφή με τις υποενδοθηλιακές προθρομβωτικές δομές, όπως το κολλαγόνο, σε νέα αγγεία με ανώμαλη διαμόρφωση. Αυτό προκαλεί αλλαγές στη στρωτή ροή του αίματος, ειδικά με την αύξηση της διατμητικής τάσης, και την επαγόμενη από τον παράγοντα VEGF απελευθέρωση του παράγοντα *von Willebrand* από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στη συνέχεια απελευθερώνουν τις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την αγγειογένεση και περιέχονται στα κοκκία τους (Mezouar et al, 2016).

Οι ενώσεις με προ-αγγειογενετική δράση είναι οι VEGF, PDGF, TGF, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, η αγγειοποιητίνη-1, η 1-φωσφο-σφιγγοσίνη και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMPs. Αυτές με αντι-αγγειογενετική δράση είναι ο παράγοντας PF4, η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1), η ενδοστατίνη, η σεροτονίνη, ο αναστολέας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) και η αγγειοστατίνη. Ως εκ τούτου, τα

αιμοπετάλια θα μπορούσαν θεωρητικά να διεγείρουν ή να αναστείλλουν την αγγειογένεση. Ωστόσο, στις περισσότερες μελέτες, οι προ-αγγειογενετικές επιδράσεις υπερσχύουν των αντι-αγγειογενετικών (Mezouar et al, 2016).

Μετάσταση

Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια παίζουν κεντρικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση, καθώς και στην παθοφυσιολογία των θρομβωτικών διαταραχών. Ωστόσο, εκτός από την αιμόσταση, τα αιμοπετάλια φαίνεται ότι εμπλέκονται σε μια ποικιλία παθοφυσιολογικών αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένων των ανοσοαποκρίσεων, την φλεγμονή, την αγγειογένεση, την αναγέννηση των ιστών, και τη μετάσταση του καρκίνου (Varon et al, 2015).

Η εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία της μετάστασης περιλαμβάνει την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο, την ενδοαγγείωση μέσα στον αυλό των αιμοφόρων αγγείων, την ενδοαγγειακή μετανάστευση, την σύλληψη στα τριχοειδή, και, τέλος, την εξαγγείωση στον περιβάλλοντα ιστό. Ενώ η εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της λέμφου παρατηρείται σε ανθρώπινους όγκους και χρησιμοποιείται ως ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη της νόσου, η διάδοση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φαίνεται να αποτελεί τον κύριο μηχανισμό της μετάστασης. Ωστόσο, λόγω των υψηλών διατμητικών δυνάμεων και την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος, το αίμα είναι ένα δυσμενές μέσο για την κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων. Μόνο το 0,1% από αυτά επιβιώνουν στην κυκλοφορία (Mezouar et al, 2016).

Σήμερα υπάρχουν πειστικά στοιχεία ότι τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων σε κάθε φάση της μετάστασης. Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι η παρεμπόδιση των αιμοπεταλίων ή η εξάντληση τους αναστέλλει την μετάσταση. Η σύνδεση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των καρκινικών κυττάρων της κυκλοφορίας έχει ευρέως αποδειχθεί έκτοτε. Αυτή η διαδικασία ξεκινάει από μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης αποδείχθηκε ότι επηρεάζει την μεταστατική διαδικασία. Κανονικά, τα αιμοπετάλια που κυκλοφορούν εντός του αγγειακού συστήματος παρεμποδίζονται από την πρόσδεση τους στο αγγειακό τοίχωμα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου, τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μια ανώμαλη ενεργοποιημένη κατάσταση που οδηγεί στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-καρκινικών κυττάρων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταστατική διαδικασία (Mezouar et al, 2016).

Τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν διάφορες κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων που ρυθμίζονται από την αγγειογένεση όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF, ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων PDGF, ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών FGF, και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Από την άλλη, τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης αγγειοστατίνη και ενδοστατίνη, και οι δύο ισχυροί αναστολείς της αγγειογένεσης, θρομβοσπονδίνη-1 (TSP1) που είναι αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, και ιστικούς αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών. Αυτά τα βιολογικά δραστικά μόρια τα οποία μπορούν να εισχωρήσουν στο ενδοθήλιο και τους ιστούς κατά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην τραυματισμένη περιοχή του αγγειακού συστήματος, κάνουν τα αιμοπετάλια αποτελεσματικούς προαγωγούς της ανάπτυξης και της προσκόλλησης των κυττάρων καθώς και της ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων (Varon et al, 2015).

Τα μικροσωματίδια (MP) είναι μικρά κυστίδια πλασματικής μεμβράνης που προέρχονται από διάφορα κύτταρα κατά την ενεργοποίηση ή την απόπτωση τους. Ο μηχανισμός σχηματισμού των MP είναι η διαταραχή των μηχανισμών υποστήριξης της ασυμμετρίας μεταξύ των δύο φωσφολιπιδικών στοιβάδων της κυτταρικής μεμβράνης. Τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMP) αποτελούν την πλειοψηφία των MP που κυκλοφορούν στο αίμα. Τα PMP περιέχουν ένα μοναδικό υποσύνολο πρωτεϊνών που προέρχονται από το μητρικό κύτταρο και τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει σαφές ότι έχουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Η πιο καλά μελετημένη από τις λειτουργίες αυτές είναι η συμμετοχή τους στην πήξη του αίματος, παρέχοντας μια πηγή ιστικού παράγοντα (TF) καθώς και αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες, όπου τα σύμπλοκα των παραγόντων πήξης μπορούν να συγκεντρωθούν (Varon et al, 2015).

Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα PMP, απομονωμένα, είτε από το πλάσμα ή από τα υπερκείμενα των διεγερμένων αιμοπεταλίων, προωθούν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης σε μια ποικιλία κυττάρων, διεγείρουν την απελευθέρωση κυτταροκινών, μεταβάλλουν την αγγειακή δραστηριότητα, επάγουν την φλεγμονή και την αγγειογένεση, και εμπλέκονται στην μετάσταση του καρκίνου (Varon et al, 2015).

Έχει αποδειχθεί ότι τα PMP μπορούν να εκφράσουν και να μεταφέρουν λειτουργικούς υποδοχείς από την μεμβράνη των αιμοπεταλίων, όπως η γλυκοπρωτεΐνη IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) και η P-σελεκτίνη, σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και έτσι να ενισχύσουν την εμφύτευση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων/προγονικών κυττάρων, καθώς και να προσδώσουν προσκολλητικές ιδιότητες στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, τα PMP προωθούν την προσκόλληση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο και διεγείρουν την έκφραση της COX-2 στα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα PMP μπορούν όχι μόνο να μεταφέρουν παθητικά διάφορες πρωτεΐνες και υποδοχείς,

αλλά και να έλκουν χημικά τα αιμοποιητικά κύτταρα και να διεγείρουν την προσκόλληση, την επιβίωση, και τον πολλαπλασιασμό τους. Ακόμα, τα PMP ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως το μονοπάτι ERK, το μονοπάτι PI3-κινάσης/Akt, και αυτό των πρωτεϊνών STAT. Στην ενίσχυση των μονοπατιών αυτών εμπλέκονται και μόρια λιπιδιακής φύσης. Ο ρόλος των PMP στην ανάπτυξη του καρκίνου είναι ακόμη άγνωστος, αλλά το επίπεδο των PMP συσχετίζεται ιδιαίτερα με επιθετικούς όγκους, με αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, με φτωχή κλινική έκβαση και έναν πιο επιθετικό φαινότυπο (Varon et al, 2015).

Νευροεκφυλιστικές νόσοι

Τα αιμοπετάλια χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό δομικών, βιοχημικών και μοριακών διαταραχών σε μια ποικιλία παθήσεων, όπως οι αιμορραγικές διαταραχές, οι ψυχιατρικές παθήσεις, το HIV/AIDS, η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (NDDs). Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με παρατηρήσιμες δομικές, λειτουργικές και βιοχημικές διαφορές παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε μια ποικιλία NDDs. Πρόσφατα στοιχεία από μελέτες υπαινίσσονται ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οι συναφείς διαταραχές, όπως η απόπτωση, δεν περιορίζονται μόνο σε κινητικούς νευρώνες στην αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), αλλά και σε περιφερικούς ιστούς, όπως τα αιμοπετάλια. Σύγχρονα στοιχεία ενοχοποιούν επίσης τη συμμετοχή των αιμοπεταλίων και σε άλλες NDDs (Behari et al, 2013).

Αιμοπετάλια και ALS

Η αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS) είναι μια χρόνια, προοδευτική νευρομυϊκή παραλυτική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από βαθμιαίο εκφυλισμό των κινητικών νευρώνων που ακολουθείται από αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο. Οι σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την παθογένεση της δεν περιορίζονται μόνο στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και σε περιφεριακούς ιστούς, όπως οι σκελετικοί μύες, το συκώτι, τα λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, κλπ. Μελέτες αναδεικνύουν την έντονη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τις μορφολογικές αλλαγές στα αιμοπετάλια των ασθενών με ALS.

Η αυξημένη συνθετάση της γλουταμίνης αλλά η φυσιολογική έκφραση του μεταφορέα EAAT2 έχει βρεθεί στα αιμοπετάλια των ασθενών με ALS, ενοχοποιώντας την γλουταμινική διεγερτο-τοξικότητα στην παθογένεση του. Οι τροποποιημένες λειτουργίες που ελέγχονται από την σεροτονίνη, όπως η ευερεθιστότητα του κινητικού νευρώνα και ο ενεργειακός μεταβολισμός φανερώνονται από μια σημαντική μείωση του επιπέδου σεροτονίνης των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ALS. Εκτός αυτού, η

θρομβοσπονδίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη που απελευθερώνεται από τα άλφα-κοκκία των αιμοπεταλίων, είναι αυξημένη στους μύες των ασθενών με ALS, υποδηλώνοντας ότι τα αιμοπετάλια λειτουργούν ως ένας βιολογικός δείκτης. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ανωτέρω ευρήματα, είναι σαφές ότι η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων παίζει έναν επιτακτικό ρόλο στην ALS, υποδεικνύοντας την συστηματική εμπλοκή ως ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας της ALS (Behari et al, 2013).

Αιμοπετάλια και Νόσος του Parkinson

Η νόσος του Parkinson χαρακτηρίζεται κλινικά από τρέμουλο ηρεμίας, βραδυκινησία, ακαμψία και ανισορροπία όρθιας στάσης και παθολογικά από το θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία, το κοιλιακό μέρος της συμπαγούς μοίρας. Η νευρωνική απώλεια σχετίζεται με τη συσσώρευση των σωμάτων Lewy, την πρωτεοσωμική δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες και την μειωμένη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων. Η έλλειψη αντιοξειδωτικών ενζύμων λόγω οξειδωτικού στρες σε κύτταρα του αίματος συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων ενοχοποιούνται για την ασθένεια. Τα στοιχεία δείχνουν τη χρησιμότητα των αιμοπεταλίων για τη μελέτη του γονιδίου SNCA και της γ-συνουκλεΐνης (συστατικά των σωμάτων Lewy), για τους δείκτες της μεθυλίωσης και του mRNA του μεταφορέα VMAT, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη μιας συστηματικής δυσλειτουργίας στην παθολογία της νόσου. Μειωμένη πρόσληψη γλουταμικού και αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού παρατηρήθηκαν επίσης στα αιμοπετάλια ασθενών ιδιοπαθούς PD (Behari et al, 2013).

Αιμοπετάλια και Νόσος Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (AD) χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρώνων, συναπτικό εκφυλισμό, γεροντικές πλάκες και νευροϊνιδιακές αλλοιώσεις με προοδευτική γνωσιακή παρακμή και εξασθένηση της μνήμης, και προκαλείται κυρίως από την εναπόθεση του βήτα-αμυλοειδούς (Αβ) (πλάκες) στον εγκέφαλο και τα μικρότερα αγγεία (Αβ-αγγειοπάθεια). Τα αιμοπετάλια είναι μια σημαντική περιφερειακή πηγή της πρόδρομης πρωτεΐνης του Αβ (APP), τα οποία περιέχουν όλους τους ενζυμικούς μηχανισμούς για την επεξεργασία του, καθιστώντας τα ιδανικά για τη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου του Alzheimer. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η ετερογένεια των αιμοπεταλίων και μια σημαντική αύξηση των υπερδομικών ανωμαλιών επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου. Έχουν τεκμηριωθεί παραλλαγές στα επίπεδα και τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης-A2 και της κυκλοξυγονάσης COX-2, και μείωση στην πρόσληψη γλουταμικού, στα αιμοπετάλια ασθενών με AD. Έχουν επίσης αναφερθεί μιτοχονδριακές ανωμαλίες (μορφολογικές, βιοχημικές και γενετικές)

σε διάφορους ιστούς στην νόσο Alzheimer. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με AD έχουν μια εξωεγκεφαλική μείωση της δράσης της κυκλοξυγονάσης, η οποία ακολούθως εξαπλώνεται και στον εγκέφαλο. Άλλες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την διαταραγμένη μιτοχονδριακή λειτουργία και την έλλειψη κυκλοξυγονάσης στον εγκέφαλο, στα αιμοπετάλια και τους ινοβλάστες των αθρών με AD (Behari et al, 2013). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι αλλαγμένες λειτουργίες των αιμοπεταλίων, όπως η αυξημένη ενεργοποίηση τους ή η αλλοιωμένη ρευστότητα της μεμβράνης τους, καθώς και η αλλοιωμένη αναλογία APP, συνδέονται με την ανάπτυξη της AD. Επίσης, τα αιμοπετάλια παίζουν κεντρικό ρόλο στον παθολογικό σχηματισμό θρόμβων και θρομβοπενίας, τα οποία είναι θεμελιώδεις παράγοντες κινδύνου για την AD (Kniewallner et al, 2015). Όλα αυτά τα στοιχεία αιτιολογούν τον πιθανό ρόλο των αιμοπεταλίων σε αυτή τη νόσο (Behari et al, 2013).

Αιμοπετάλια και σκλήρυνση κατά πλάκας

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) είναι μια ανοσοδιαμεσολαβούμενη απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος και μπορεί να θεωρηθεί ως μοντέλο νευροφλεγμονώδους ασθένειας, στο οποίο τα έλυτρα μυελίνης γύρω από τους νευράξονες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού είναι κατεστραμμένα. Τα αιμοπετάλια έχουν από καιρό ενοχοποιηθεί στην αιτιολογία της MS. Η εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των αιμοπεταλίων του αίματος σε ασθενείς με MS, έδειξε έντονη ενεργοποίηση τους που αποδεικνύει την συστηματική συμμετοχή στην MS χαρακτηριζόμενη από αλλοιώσεις των βιολογικών διεργασιών. Προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρόνια ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στην MS μπορεί τώρα πλέον να θεωρηθεί ως καθιερωμένο φαινόμενο, όπως υποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα αιμοπεταλίων-ειδικών δεικτών, όπως τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων του πλάσματος, η έκφραση της P-σελεκτίνης, τα κυκλοφορούντα μικροσυσσωματώματα αιμοπεταλίων (PAG) και τα σχετικά με τα αιμοπετάλια αντισώματα IgG/IgM. Επίσης, η επικράτηση της θρομβοπενίας τύπου ιδιοπαθούς θρομβοπενικής πορφύρας (ITP) σε ασθενείς με MS, βρέθηκε να είναι περίπου 25 φορές υψηλότερη από ότι στο γενικό πληθυσμό. Οι μεταβολές στη λειτουργία των αιμοπεταλίων στην σκλήρυνση κατά πλάκας αποδεικνύονται από τις διακυμάνσεις στις δραστηριότητες των κυκλοφορούντων ενζύμων όπως η 5'-νουκλεοτιδάση και η απαμινάση της αδενοσίνης (ADA). Μια μελέτη προτείνει την θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας με εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης καθώς η σεροτονίνη θεωρείται αγωνιστής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ως εκ τούτου, τα αιμοπετάλια μπορεί να είναι βασικοί παράγοντες στην MS και σε συναφείς διαταραχές και απαιτούν περισσότερη προσοχή στη νευρολογική έρευνα (Behari et al, 2013).

Αιμοπετάλια και Νόσος του Huntington

Η νόσος του Huntington (HD) είναι μια νευροεκφυλιστική γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μη φυσιολογικών ακούσιων κινήσεων, γνωστικών ελλειμμάτων και κατάθλιψης. Οι μελέτες δείχνουν ότι η αυξημένη δραστικότητα των μονοαμινοξειδασών MAO-B και MAO-A στον εγκέφαλο και στα αιμοπετάλια συνδέεται με νευρωνική βλάβη λόγω της εξέλιξης της νόσου του Huntington. Επιπλέον, η μέτρηση της πρόσληψης γλουταμικού (Glu) και ασπαραγινικού (Asp) στα αιμοπετάλια του αίματος και η παρουσία τους σε αυτά υποδηλώνουν επίσης νόσο του Huntington. Η αύξηση σε Asp των αιμοπεταλίων, είναι μια άμεση ή έμμεση συνέπεια της γονιδιακής βλάβης της νόσου, αφού τα αιμοπετάλια έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τους νευρώνες. Ένα άλλο εύρημα υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο της γλυκίνης σε απόκριση στον υποδοχέα γλυκίνης-NMDA στα αιμοπετάλια των ασθενών με HD. Μια παρεκκλίνουσα ενίσχυση της σηματοδότησης του υποδοχέα αδενোসίνης (2A) τεκμηριώνεται στα αιμοπετάλια των ατόμων με HD, υπονοώντας ότι η κυτταρική δυσλειτουργία μπορεί να σχετίζεται με τα κλινικά και τα γενετικά χαρακτηριστικά. Με βάση αυτά τα στοιχεία, δικαιολογείται ότι τα αιμοπετάλια συνολικά, παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της HD (Behari et al, 2013).

Διατροφή και Αιμοπετάλια

Συστατικά τροφίμων και αιμοπετάλια

Πολυφαινόλες

Το σταφύλι είναι το φρούτο για το οποίο έχουν γίνει οι περισσότερες μελέτες, όσο αφορά την δράση του κατά της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Στις περισσότερες μελέτες, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων έχει προσδιοριστεί ex vivo και δίνεται χυμός σταφυλιού για μία περίοδο 7-28 ημερών σε υγιή άτομα σε ποσότητες που κυμαίνονται από 300 - 500mL/μέρα. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο χυμός των μώβ, αλλά όχι των κόκκινων, σταφυλιών αναστέλει αποτελεσματικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, παρά τις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της αντίδρασης των αιμοπεταλίων (Chong et al, 2010).

Άλλα φρούτα και χυμοί φρούτων με ανασταλτική δράση κατά της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι ο χυμός από ρόδι (50 mL/μέρα για 14 μέρες), το εκχύλισμα από σπόρους σταφυλιού και ένας συνδυασμός διαφόρων μούρων (μύρτιλα, κόκκινα

μύρτιλα, πουρές φραγκοστάφυλων, πουρές απο φράουλες και χυμός απο σμέουρα) για τον οποίο τα στοιχεία δεν είναι και τόσο πειστικά. Το πιο σημαντικό πολυφαινολικό συστατικό που υπάρχει σε αυτά τα φρούτα και τους χυμούς τους, με αντιαιμοπεταλιακή δράση, είναι οι ανθοκυανίνες, τα φαινολικά οξέα, οι φλαβονόλες (κερκετίνη) και οι προκυανιδίνες. Αντίθετα, ο χυμός πορτοκάλι, ο χυμός γκρέιπφρουτ και ο χυμός απο ιπποφάες δεν φάνηκε να έχουν καμία επίδραση στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Chong et al, 2010). Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί πως η κερκετίνη (που βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα μήλα) όταν απομονώθηκε και καταναλώθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα ως συμπλήρωμα σε σούπα, δεν έδειξε να επηρεάζει σημαντικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, παρότι η δόση του συμπληρώματος ήταν σχεδόν δέκα φορές μεγαλύτερη απο ότι η κανονική δόση στα τρόφιμα. Επιπλέον, υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία απο μελέτες in vitro που υποδεικνύουν ότι η αντιαιμοπεταλιακή δράση είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιείται συνδυασμός πολυφαινολικών συστατικών παρά όταν αυτά χρησιμοποιούνται ξεχωριστά. Αυτή η συνεργιστική σχέση μεταξύ συγκεκριμένων πολυφαινολικών συστατικών ίσως να μπορεί να εξηγήσει γιατί τα φρούτα ή οι χυμοί τους, που περιέχουν ένα συνδυασμό πολυφαινολών, είναι πιο δραστικά απο τις απομονωμένες πολυφαινόλες (Chong et al, 2010).

Η διαφορετική δραστικότητα μεταξύ των κατηγοριών των πολυφαινολών ίσως είναι ένας ακόμη λόγος που μπορεί να εξηγήσει τα διαφορετικά αποτελέσματα των μελετών. Μελέτες in vitro έχουν αναφέρει ότι οι φλαβονόλες (του σταφυλιού) είναι πιο δραστικοί αντιοξειδωτικοί και αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες απ'ότι οι φλαβανόνες (άφθονες στα εσπεριδοειδή). Αυτό ίσως να προσφέρει μία εξήγηση για την σημαντική μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που παρατηρείται όταν καταναλώνεται χυμός μώβ σταφυλιού σε σύγκριση με την έλλειψη αντίστοιχης δράσης όταν καταναλώνεται ο ίδιος όγκος χυμού απο πορτοκάλι η γκρέιπφρουτ. Εάν αυτή η διαφορετική επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων επηρεάζεται εν μέρει απο τη διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα των δυο κατηγοριών των φλαβονοειδών, παραμένει άγνωστο και μένει να ερευνηθεί.

Επίσης, η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων στα τρόφιμα είναι κλειδί για την επίδρασή τους στη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Ο χυμός πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ έχει τρεις φορές χαμηλότερο συνολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών απο ότι ο χυμός μώβ σταφυλιού. Είναι δύσκολο να καθοριστεί εάν το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή, η υποκατηγορία του φλαβονοειδούς ή ο συνδυασμός αυτών των δύο καθορίζει την επίδραση στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο των τροφίμων σε πολυφαινόλες σε κάποιες μελέτες, και όπου αναφέρονται οι συγκεντρώσεις, η σύγκριση μπορεί να συγχέεται με τις διαφορές

μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της συνολικής περιεκτικότητας αυτών (Chong et al, 2010).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια κατηγορία φυτικών φαινολών που είναι διαθέσιμες σε διάφορες πηγές τροφίμων όπως τα εσπεριδοειδή, τα μούρα, το πράσινο τσάι, το κόκκινο κρασί, καθώς και η σκόνη κακάο. Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση μίας διατροφής πλούσιας σε φλαβονοειδή σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου. Αν και πιστεύεται ότι τα φλαβονοειδή βελτιώνουν την καρδιαγγειακή υγεία μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, υπάρχουν ενδείξεις που αναφέρουν ότι οι τροφές πλούσιες σε φλαβονοειδή έχουν αντι-αιμοπεταλιακές ιδιότητες και μπορεί να παρέχουν κάποια προστασία έναντι της θρόμβωσης, καθώς και άλλων καρδιαγγειακών επιπλοκών. Για παράδειγμα, η κατανάλωση ενός ροφήματος κακάου που είναι πλούσιο σε φλαβανόλες, έχει δείξει ότι αναστέλλει την *ex vivo* συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίησή τους σε υγιείς ενήλικες. Οι αντιαιμοπεταλιακές δράσεις των φλαβονολών που υπάρχουν στο κακάο σε αυτόν τον πληθυσμό φαίνεται να είναι παρόμοιες με εκείνες της ασπιρίνης. Στην πραγματικότητα, είναι πιθανό ότι οι φλαβανόλες του κακάο και η ασπιρίνη επηρεάζουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων μέσω ενός παρόμοιου μηχανισμού, καθώς οι συνδυαστικές δράσεις αυτών των παραγόντων δεν επιπροστίθενται. Τα θεραπευτικά οφέλη των φλαβονοειδών μπορεί να είναι μεγαλύτερα για άτομα με παθολογικές καταστάσεις σε σύγκριση με τα υγιή. Ωστόσο, δεν υπάρχει επαρκής κλινική έρευνα αυτή τη στιγμή για να υποστηρίξει τη θεωρητική επίπτωση που έχουν τα φλαβονοειδή σε πληθυσμούς ασθενών. Ακόμα κι έτσι, ένα σημαντικό ποσοστό της έρευνας υποστηρίζει το θεραπευτικό δυναμικό που μπορούν να έχουν τα συμπληρώματα φλαβονοειδών για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων και την καρδιαγγειακή υγεία (Duhamel et al, 2007).

Ω-3 λιπαρά οξέα

Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα (π.χ. εικοσαπεντανοϊκό οξύ, δοκοσαεξανοϊκό οξύ και α-λινολενικό οξύ) είναι χρήσιμα για την πρόληψη και τη θεραπεία διάφορων καρδιαγγειακών παθήσεων συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της ισχαιμίας του μυοκαρδίου και του διαβήτη. Συμπλήρωμα ω-3 λιπαρών οξέων (250 mg/kg για 60 μέρες) σε κουνέλια φάνηκε επίσης να βελτιώνει την λειτουργία των αιμοπεταλίων μειώνοντας σημαντικά την συσσωρευση τους που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ. Επιπλέον, το εμπλουτισμένο με ω-3 λιπαρά οξέα γάλα μείωσε τα επίπεδα της θρομβοξάνης B2

κατά 40% και βελτίωσε σημαντικά τη λειτουργία των αιμοπεταλίων σε αρουραίους. Παρότι οι μηχανισμοί που συνεισφέρουν σε αυτές τις επιδράσεις δεν είναι πλήρως αναγνωρισμένοι, είναι πιθανό ότι επηρεάζονται από την αύξηση του περιεχομένου των αιμοπεταλίων σε ω-3 λιπαρά οξέα (Duhamel et al, 2007).

Το περιεχόμενο των αιμοπεταλίων σε φωσφολιπίδια μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την πρόσληψη αυτών με υψηλό ποσοστό ω-3 λιπαρών οξέων. Παρότι δεν είναι ξεκάθαρο πώς οι αλλαγές στο περιεχόμενο των αιμοπεταλίων σε φωσφολιπίδια τροποποιούν την λειτουργία των αιμοπεταλίων, είναι πιθανό αυτές οι αλλαγές να επηρεάζουν τους ενδοκυτταρικούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην ρύθμιση της ενεργοποίησης, της συσσώρευσης και της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων. Πράγματι, το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από επιδημιολογικά δεδομένα που φανερώνουν ότι το α-λινολενικό οξύ ίσως να έχει αντι-αιμοπεταλιακή δράση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να ερμηνεύονται με κάποια επιφύλαξη καθώς οι μελέτες σε ανθρώπους δεν έχουν δείξει συνεπή αποτελέσματα του α-λινολενικού οξέος στη λειτουργία των αιμοπεταλίων ή στην καρδιαγγειακή νόσο (Duhamel et al, 2007).

Ταυρίνη

Η ταυρίνη (2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ) είναι ένα παράγωγο του αμινοξέος κυστεΐνη και προέρχεται πρωτίστως από πηγές τροφίμων όπως το κρέας, το ψάρι και τα θαλασσινά. Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν αναδείξει τα οφέλη της ταυρίνης στην πρόληψη και την θεραπεία της υπέρτασης, της ισχαιμίας του μυοκαρδίου, της αθηροσκλήρωσης και του διαβήτη. Παρότι οι μηχανισμοί της δράσης της δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι, φαίνεται ότι τα καρδιοπροστατευτικά της οφέλη προκαλούνται τουλάχιστον εν μέρει από την επίδραση της στην λειτουργία των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, οι υψηλές συγκεντρώσεις ταυρίνης στα αιμοπετάλια φαίνεται να σχετίζονται με βελτίωση της λειτουργίας τους (π.χ. μειωμένη ενεργοποίηση) και με μείωση στη συγκέντρωση της θρομβοξάνης. Συμπλήρωμα ταυρίνης (400-1600 mg/μέρα) έχει φανεί να εμποδίζει την λειτουργία των αιμοπεταλίων κατά 30-70% σε κατά τα άλλα υγιή άτομα. Η έλλειψη ταυρίνης προκαλεί διπλάσια αύξηση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε γάτες. Παρότι το συμπλήρωμα ταυρίνης ίσως να έχει ανεξάρτητα οφέλη για την καρδιαγγειακή υγεία, είναι επίσης πιθανό ότι αυτές του οι δράσεις ενισχύονται όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα διατροφικά φάρμακα. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός της ταυρίνης με N-ακετυλοκυστεΐνη μπορεί να παράγει μια συνεργιστική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα επειδή αυτά τα δύο θρεπτικά συστατικά δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών που επηρεάζουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Έτσι, η ταυρίνη μόνη ή σε συνδυασμό με κάποια αντιοξειδωτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετριάσει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς και τη θρόμβωση. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για

να εξεταστεί αν η ταυρίνη παράγει ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή νόσο επηρεάζοντας τα καρδιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα (Duhamel et al, 2007).

Τρόφιμα και αιμοπετάλια

Ginkgo biloba

Το εκχύλισμα *Ginkgo biloba* έχει φανεί ότι μειώνει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της μείωσης της ADP-προκαλούμενης συσσώρευσης τους και της μείωσης του οξειδωτικού στρες, καθώς και μέσω της βελτίωσης της κυκλοφορίας του αίματος που προκαλεί μειώνοντας το ιξώδες του με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το εκχύλισμα *Ginkgo biloba* μπορεί να βελτιώσει την καρδιαγγειακή υγεία, μέσω της δράσης του στα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) των αιμοπεταλίων, στην παραγωγή της θρομβοξανής A2 και B2, καθώς και του ασβεστίου $[Ca^{2+}]_i$ στα αιμοπετάλια. Στην πραγματικότητα, έχει φανεί ότι το εκχύλισμα *Ginkgo biloba* 761 (EGb 761) μπορεί να αναστείλει ευθέως την συσσώρευση των αιμοπεταλίων εμποδίζοντας την παραγωγή της θρομβοξανής B2 που διεγείρεται από το αραχιδονικό οξύ. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, το εκχύλισμα του φυτού *Ginkgo biloba* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα για την βελτίωση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και την μείωση του σχηματισμού θρομβώσεων. Επίσης, μερικές κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ίσως έχει οφέλη και στην καρδιαγγειακή νόσο (Duhamel et al, 2007).

Ginseng

Το Ginseng είναι ένα είδος φυτού με σαρκώδεις ρίζες που προέρχεται από την ανατολική Ασία και το εκχύλισμά του αναφέρεται πως προστατεύει την καρδιά από την ισχαιμία αφού βελτιώνει την κυκλοφορία του αίματος, καθώς και την λειτουργία των αιμοπεταλίων μειώνοντας την ενεργοποίηση, την συσσώρευση και την προσκόλληση τους. Τα θεραπευτικά συστατικά του Ginseng είναι αυτά που είναι λιπόφιλα, δηλαδή οι σαπωνίνες που αναφέρονται και ως *ginsenosides*. Έχει φανεί ότι η *ginsenoside Rg*, από το κόκκινο *Ginseng*, αναστέλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από την επινεφρίνη και την θρομβίνη και την απελευθέρωση της σεροτονίνης. Επίσης, μειώνει το ασβέστιο $[Ca^{2+}]_i$ δοσοεξαρτώμενα. Το κόκκινο *Ginseng* αναστέλει επίσης την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP και το κολλαγόνο με τρόπο δοσοεξαρτώμενο, αποδεικνύοντας ότι οι αντιθρομβωτικές δράσεις του ίσως οφείλονται στην αντιαιμοπεταλιακή του ιδιότητα. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι το

κόκκινο *Ginseng* μειώνει την απελευθέρωση μορίων σηματοδότησης από τα αιμοπετάλια και μπορεί να παρατείνει τον χρόνο δημιουργίας θρόμβου. Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εκχύλισμα *Ginseng* μπορεί να είναι ευεργετικό για άτομα με υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρδιοαγγειακών παθήσεων, λόγω των αποτελεσμάτων του που επηρεάζουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων καθώς και το $[Ca^{2+}]_i$ (Duhamel et al, 2007).

Ginger

Το *Ginger* (*Zingiber officinale*), ή αλλιώς η πιπερόριζα, είναι ένα είδος φυτού που συλλέγεται για τα μεγάλα υπόγεια ριζώματα του και χρησιμοποιείται ως καρύκευμα. Τα συστατικά του και τα παράγωγά τους έχουν αναφερθεί ως δραστικοί αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες. Πράγματι, φαίνεται ότι το φυσικό συστατικό του *Ginger* *8-paradol*, είναι ισχυρός αναστολέας της κυκλοξυγονάσης-1 και μπορεί να αποτρέψει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ. Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα *Ginger* μπορεί να μειώσει τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα, καθώς και την παραγωγή της θρομβοξάνης B2 και της προσταγλανδίνης E2 από τα αιμοπετάλια, όταν λαμβάνεται από το στόμα ή όταν δίνεται ενδοπεριτοναϊκά. Βάση αυτών των παρατηρήσεων, φαίνεται ότι το συμπλήρωμα *Ginger* (500 mg/kg σωματικού βάρους) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιθρομβωτικό, αντιφλεγμονώδες και για την μείωση της χοληστερόλης με δυνατότητα βελτίωσης της καρδιοαγγειακής υγείας (Duhamel et al, 2007).

Καφεΐνη

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία σε φρούτα, λαχανικά, στον καφέ, το κρασί και στο ελαιόλαδο. Τα πιθανά οφέλη του καφέ, ενός δημοφιλούς αφεψήματος πλούσιου σε πολυφαινόλες, ακόμα δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Σε μελέτη βρέθηκε ότι ο κίνδυνος οξέος στεφανιαίου συνδρόμου είναι διαγραμματικής μορφής J ανάλογα με τη δόση καφέ που καταναλώνεται κάθε μέρα. Η αύξηση με υψηλότερες δόσεις ίσως να οφείλεται στην υψηλή πίεση του αίματος που προκαλείται από την καφεΐνη που περιέχεται στον καφέ από τους σπόρους του *Coffea arabica*. Παρόλα αυτά, η μέτρια κατανάλωση καφέ μειώνει τον κίνδυνο στεφανιαίου συνδρόμου. Η αντιθρομβωτική δράση του καφέ αναφέρεται πως είναι ανεξάρτητη από την καφεΐνη, αλλά μπορεί να αποδοθεί στα φαινολικά οξέα που περιέχει, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν στα αιμοπετάλια. Σε μία μεγάλη συγχρονική μελέτη φάνηκε ότι ο καφές έχει δόσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση που είναι πιο εμφανής στις γυναίκες. Σε αυτή τη μελέτη φάνηκε επίσης ότι η προστατευτική αυτή δράση του καφέ είναι ανεξάρτητη του περιεχομένου του σε καφεΐνη. Μία κούπα καφέ περιέχει άφθονο χλωρογενικό

οξύ, δηλαδή καφεϊκό οξύ εστεροποιημένο με κινικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ μπορεί να απορροφηθεί έπειτα από υδρόλυση, σχεδόν πλήρως (~95%) από το λεπτό έντερο, ενώ φτάνει στην ανώτατη συγκέντρωση στο αίμα έπειτα από 2 ώρες όταν λαμβάνεται από το στόμα. Το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγα του αναστέλουν, όπως έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro* και *in vivo*. Συγκεκριμένα, βρέθηκε σε μελέτη, ότι 1, 2mM καφεϊκού οξέος μειώνουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το κολλαγόνο κατά 50% (Schumacher et al, 2011).

Το ραδίκι (*Cichorium intybus*) είναι μία από τις πλουσιότερες πηγές καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του όπως το χλωρογενικό οξύ. Το αλκοολικό (40%) εκχύλισμα (1:5) ολόκληρου του φυτού, έχει αναφερθεί ότι περιέχει 12.98 ± 0.06 g% καφεϊκού οξέος και παραγώγων του. Πρέπει να σημειωθεί πως ο καφές από καβουρδισμένους σπόρους ραδικιού δεν περιέχει καφεΐνη και έχει χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο καφέ εδώ και πολλά χρόνια. Η κατανάλωση καφέ από σπόρους ραδικιού για μία εβδομάδα, φάνηκε να βελτιώνει σημαντικά τις αιμορεολογικές παράμετρους, όπως το ιξώδες του πλάσματος, του αίματος συνολικά και την δυσμορφία των ερυθροκυττάρων (Schumacher et al, 2011).

Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο έχει φανεί να αναστέλει μερικώς την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP, το κολλαγόνο και το αραχιδονικό οξύ, καταλήγοντας σε μείωση της απελευθέρωσης της TXA₂. Οι προστατευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου συχνά αποδίδονται στο υψηλό ποσοστό του σε ω-9 μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA; 70–85%), κυρίως υπό τη μορφή ελαϊκού οξέος. Ωστόσο, το ελαιόλαδο, σε αντίθεση με άλλα φυτικά έλαια, περιέχει επίσης υψηλά ποσοστά διαφόρων μικροθρεπτικών συστατικών (π.χ. φαινολικές ενώσεις, όπως υδροξυτυροσώλη και ελευρωπαΐνη) που έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικές βιοδραστικές λειτουργίες (Vilahur et al, 2013).

Οι Karantonis και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν, κατά τη σύγκριση διαφορετικών πηγών ελαϊκού οξέος (ελαιόλαδο, σόγια, καλαμπόκι, ηλίανθος και σησαμέλαιο), μεγαλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση στο δείγμα ελαιόλαδου, υποστηρίζοντας την ικανότητα αυτών των δευτερευόντων συστατικών του να ασκούν αντιαιμοπεταλιακή δράση. Ουσιαστικά, οι φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για την ανιχνευθείσα μείωση στην απελευθέρωση TXA₂. Τέλος, αν και αμφιλεγόμενες, μερικές αναφορές έχουν αποδώσει στο ελαιόλαδο τη δυνατότητα να μειώνει τα κυκλοφορούντα επίπεδα του παράγοντα vWF, πιθανόν αλλοιώνοντας την

προσκόλληση των αιμοπεταλίων και την συσσωμάτωσή τους. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να υποστηρίξουν αυτή την υπόθεση (Vilahur et al, 2013).

Κρεμμύδι και σκόρδο

Τα φυτά του γένους *Allium* όπως το κρεμμύδι (*Allium cepa*) και το σκόρδο (*Allium sativum*) ασκούν πολλαπλά καρδιαγγειακά οφέλη, όπως η μείωση της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και η ενίσχυση της ινωδολύσης και των αντιαιμοπεταλιακών δράσεων. Το ωμό σκόρδο και το κρεμμύδι αναστέλουν εξίσου την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ βρασμένα έχουν λίγη ή καθόλου δράση. Μέχρι στιγμής, αρκετές κλινικές δοκιμές έχουν δείξει την ισχυρή δυνατότητα του σκόρδου να μειώσει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, έξι μελέτες έχουν αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα του σκόρδου στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, από τις οποίες οι πέντε ανέφεραν θετικά αποτελέσματα (μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων) και η μία κανένα αποτέλεσμα. Το σκόρδο και το κρεμμύδι αποδείχθηκε επίσης ότι κατέχουν ανασταλτική δράση στην παραγωγή θρομβοξάνης, πιθανώς ως αποτέλεσμα της άμεσης μη-ανταγωνιστικής (non-competitive) αναστολής με την κυκλοξυγονάση. Μια μελέτη που εξέτασε την επίδραση της κατανάλωσης μιας σκελίδας φρέσκου σκόρδου στην παραγωγή θρομβοξάνης από τα αιμοπετάλια ανέφερε σημαντική μείωση κατά 80% στα επίπεδα της TXA2 στον ορό μετά από 26 εβδομάδες. Αν και τα κρεμμύδια μειώνουν επίσης τη σύνθεση TXA2, η αντιαιμοπεταλιακή τους δράση είναι 13 φορές χαμηλότερη από εκείνη του σκόρδου. Ως εκ τούτου, μια μελέτη σε κουνέλια ανέφερε ότι, ενώ το ωμό εκχύλισμα σκόρδου μείωσε την TXB2 ορού, το εκχύλισμα κρεμμυδιού σε ισοδύναμη δόση δεν το έκανε (Vilahur et al, 2013).

Πολλά συστατικά που έχουν απομονωθεί από τα είδη του γένους *Allium* έχουν αναγνωριστεί ως αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Αυτά, συμπεριλαμβάνουν την αλλισίνη, το παραφινικό σουλφίδιο (paraffinic sulphide) και την αδενοσίνη. Τα περισσότερα από αυτά τα συστατικά έχουν ως κοινό το υψηλό τους περιεχόμενο σε θείο. Στην πραγματικότητα, η αντιαιμοπεταλιακή δράση των κρεμμυδιών είναι θείο-εξαρτώμενη (χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θείο καταλήγει σε μικρότερη αντιαιμοπεταλιακή δράση). Η αλλισίνη και πιο συγκεκριμένα, το αχοένιο, ένα προϊόν αυτοσυμπήκνωσης της αλλισίνης, θεωρείται η πρωταρχική ουσία υπεύθυνη για την ανασταλτική δράση του σκόρδου στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το αχοένιο αναστέλει την πρόσδεση του ινωδογόνου και του παράγοντα Von Willebrand στον υποδοχέα GPIIb/IIIa χωρίς να επηρεάζει την πρόσδεση του παράγοντα Von Willebrand στον υποδοχέα GPIb. Επίσης, το αχοένιο φαίνεται να εκμηδενίζει τον αριθμό των λειτουργικών υποδοχέων στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων μειώνοντας το ιξώδες στο εσωτερικό μέρος της λιπιδικής

διπλοστοιβάδας παρά επηρεάζοντας τη συγγένεια του ινωδογόνου για τον υποδοχέα GPIIb/IIIa ή την διαμόρφωση του. Η ανασταλτική δράση του αχονίου στην πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb/IIIa επαληθεύει το εύρημα ότι τι αχόνιο αναστέλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται απο όλους τους γνωστούς μας αγωνιστές. Επιπλέον, το αχόνιο φάνηκε να μειώνει την παραγωγή της θρομβοξάνης A2 τροποποιώντας τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Ένα παραφινικό σουλφίδιο του γένους *Allium*, το τρισουλφιδικό διαλλύλιο, έχει φανεί να έχει επίσης αντ αιμοπεταλιακές ιδιότητες. Μελέτες έδειξαν οτι αυτό το πολυσουλφίδιο αναστέλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την κινητοποίηση του Ca^{2+} που προκαλείται απο την θρομβίνη, με τρόπο εξαρτώμενο απο την συγκέντρωση, καθώς και την σύνθεση της θρομβοξάνης A2 χωρίς να επηρεάζουν τον σχηματισμό της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Vilahir et al, 2013).

Τομάτα

Τόσο οι φρέσκιες όσο και οι επεξεργασμένες τομάτες (*Solanum lycopersicum*) έχουν συσχετιστεί με μείωση του επιπολασμού των καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω μείωσης των επιπέδων των λιπιδίων, αλλά και εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και αντ αιμοπεταλιακών ιδιοτήτων τους. Η τομάτα έχει δείξει αντισυσσωρευτική δράση μέσω αναστολής του ADP και του κολλαγόνου, όχι όμως του αραχιδονικού οξέος, σε υγιή άτομα 3 ώρες έπειτα απο την πρόσληψη. Ο μηχανισμός δράσης με τον οποίο οι τομάτες αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων δέν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Έχει προταθεί ότι η αδενοσίνη και άλλα νουκλεοτίδια είναι υπεύθυνα για αυτήν την αναστολή μέσω αλληλεπίδρασης με τρεις αιμοπεταλιακούς υποδοχείς, τους GPVI, P2Y1 και P2Y12 (ADP-υποδοχείς). Έτσι, τα βιοδραστικά συστατικά της τομάτας, έχει φανεί οτι αλληλεπιδρούν με τα ενδοαιμοπεταλιακά μονοπάτια μεταγωγής σήματος της ενεργοποίησης αυτών των υποδοχέων, πιθανώς εμποδίζοντας την φωσφορύλωση της φωσφολιπάσης C (PLC), του cAMP και των Akt/VASP. Παρόλα αυτά, απομένει να προσδιοριστούν τόσο τα συστατικά της τομάτας που κατέχουν αντ αιμοπεταλιακή δράση όσο και η βιοδραστικότητα τους. Είναι ενδιαφέρον, ότι έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι τόσο ο πολτός τομάτας απο πράσινες όσο και απο κόκκινες τομάτες, ασκεί παρόμοια αντ αιμοπεταλιακή δράση, παρά το γεγονός ότι ο πολτός πράσινης ντομάτας δέν περιέχει λυκοπένιο, το κύριο φυσικό καροτενοειδές αντιοξειδωτικό που υπάρχει στις τομάτες. Άλλες δύο μελέτες συμφώνησαν ότι το λυκοπένιο δέν φαίνεται να συμβάλλει στην ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, σε αντίθεση με αυτές τις παρατηρήσεις, ο Hsiao και οι συνεργάτες του απέδειξαν, in vitro και in vivo, ότι το λυκοπένιο ασκεί αντ αιμοπεταλιακή δράση η οποία μπορεί να περιλαμβάνει την αναστολή της PLC που ακολουθείται από αναστολή της ενδοκυτταρικής κινητοποίησης του Ca^{+2} . Επιπλέον, το λυκοπένιο έδειξε επίσης να ενεργοποιεί το σχηματισμό του κυκλικού

GMP που προέρχεται από NO, με αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (Vilahur et al, 2013).

Μανιτάρια

Τα μανιτάρια είναι μια σημαντική φυσική πηγή θρεπτικών και βιολογικά ενεργών συστατικών. Ένα ευρύ φάσμα δράσεων έχει αποδοθεί στα μανιτάρια και τους μήκυτες, συμπεριλαμβανομένης της αντιμικροβιακής δράσης, της αντικαρκινικής, της νευροπροστατευτικής, και της οφέλιμης δράσης τους στο καρδιαγγειακό σύστημα (αντιοξειδωτικές, αντι-υπερτασικές, αντιδιαβητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες). Επιπλέον, τα τελευταία δέκα χρόνια αρκετές αναφορές έχουν αποκαλύψει την ικανότητα συγκεκριμένων οικογενειών μανιταριών να ασκούν αντιαιμοπεταλιακή δράση παρεμβαίνοντας σε διάφορους υποδοχείς των αιμοπεταλίων, αλλά και σε πληθώρα μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Το 2004, ένα μεθανολικό εκχύλισμα του *Pleurotus florida* Eger (ένα εδώδιμο και δημοφιλές μανιτάρι) φάνηκε ότι σχεδόν κατέλυσε την προκαλούμενη από το ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων (95% μείωση) έπειτα από 5 λεπτά επώασης σε πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Από την άλλη, ένα στερεό εκχύλισμα του *Stereum hirsutum* φάνηκε να μειώνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αποκλείοντας το ενεργό κέντρο της θρομβίνης, και ένα εκχύλισμα από το *Hericium erinaceus* φάνηκε να εμποδίζει επιλεκτικά την μεταγωγή του υποδοχέα GPIIb/IIIa. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες από τον Kamruzzaman και τους συνεργάτες του έχουν συνεισφέρει ως προς τους μηχανισμούς με τους οποίους ορισμένα φαρμακευτικά μανιτάρια μπορούν να παρέχουν αντιαιμοπεταλιακή προστασία. Αυτοί οι ερευνητές ανέφεραν την ικανότητα του *Phellinus baumii* (ενός μανιταριού της οικογένειας *Hymenochaetaceae* βασιδιομυκήτων) και του *P-terphenyl curtisian* E (ενός αντιοξειδωτικού συστατικού του άγριου μανιταριού *Paxillus curtissi*) να αναστέλουν την συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP, το κολλαγόνο και τη θρομβίνη, να καταστέλλουν την έκκριση του ATP, την κινητοποίηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και την πρόσδεση του ινωδογόνου. Είναι ενδιαφέρον, ότι έχουν επίσης προσφέρει ενδείξεις ότι η ουσία *P-terphenyl curtisian* E καταστέλλει την επαγόμενη από το κολλαγόνο ενεργοποίηση του υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPIIb/IIIa, παρεμβαίνοντας με τις τρεις γνωστές MAPKs των αιμοπεταλίων (JNK, ERK2, και p38), τη σηματοδότηση της Akt, και με την ρύθμιση του cAMP και την επακόλουθη ενεργοποίηση της PKA και φωσφορυλίωση της VASP. Αυτές οι μεταγενέστερες παρατηρήσεις, υποστηρίζουν την ιδέα της ικανότητας των μανιταριών στην παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω πολλαπλών πιθανών στόχων (Vilahur et al, 2013).

Πλούσια σε πολυφαινόλες ποτά (κρασί και μπύρα)

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν δείξει επανειλημμένα ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (1 έως 3 ποτά/ημέρα) σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο καρδιοαγγειακής νόσου. Μερικές από τις προστατευτικές επιδράσεις του φάνηκε να συνδέονται με την αιθανόλη. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει, κατά τη σύγκριση των διαφόρων τύπων ποτών, ότι το κόκκινο κρασί φαίνεται να ασκεί μεγαλύτερη προστατευτική δράση από ότι άλλες μορφές αλκοόλ, υποστηρίζοντας έναν προστατευτικό ρόλο των πολυφαινολικών ενώσεων. Τα ευεργετικά αποτελέσματα των πολυφαινολών φαίνεται να διαμεσολαβούνται μέσω μιας πληθώρας βιοχημικών μονοπατιών και μηχανισμών σηματοδότησης, ενεργώντας είτε ανεξάρτητα είτε συνεργιστικά. Οι πολυφαινόλες έχουν φανεί να ρυθμίζουν τη φλεγμονή, τον μεταβολισμό των λιπιδίων, να βελτιώνουν την αντιοξειδωτική κατάσταση και λειτουργία του ενδοθηλίου, να αυξάνουν την απελευθέρωση NO, και να προστατεύουν από τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συλλογικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ρεσβερατρόλη (η κύρια πολυφαινόλη του κρασιού που βρίσκεται στο περίβλημα των σταφυλιών και στους σπόρους του) έχει αντιθρομβωτική δράση λόγω της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης, της μειωμένης σύνθεσης προθρομβωτικών μεσολαβητών (σύνθεση εικοσανοειδούς) και της μείωσης στο γονίδιο έκφρασης του ιστικού παράγοντα. Πράγματι, η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει, με εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση τρόπο, τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το κολλαγόνο, το ADP, και την θρομβίνη. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι εξασθενεί την επαγόμενη από τον ιστικό παράγοντα ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της μείωσης της δραστηριότητας της PLCβ και της αναστολής των φωσφοδιεστερασών του cAMP και του cGMP, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα τους στα αιμοπετάλια και επακολούθως μειώνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη, ενεργοποιώντας τα eNOS και/ή αναστέλλοντας την παραγωγή δραστηκών μορφών οξυγόνου, φάνηκε να ρυθμίζει την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO μειώνοντας περαιτέρω την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων (Vilahur et al, 2013).

Κακάο (πλούσιο σε φλαβονοειδή)

Βραχυπρόθεσμες μελέτες έχουν αποδείξει μια καρδιοπροστατευτική επίδραση του κακάο και της σοκολάτας. Το κακάο και η μαύρη σοκολάτα φαίνεται να έχουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, και αντι-υπερτασικές ιδιότητες, καθώς και να βελτιώνουν την αγγειακή λειτουργία και να μειώνουν την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Πολλές από τις ευεργετικές επιδράσεις της κατανάλωσης σοκολάτας μεσολαβούνται, τουλάχιστον εν μέρει, από τα φαινολικά της συστατικά. Πράγματι, η σοκολάτα είναι μια πλούσια πηγή πολυφαινολικών ενώσεων (π.χ. 41 γραμμάρια

σοκολάτας περιέχουν σχεδόν όση φαινόλη όσο 140mL κόκκινο κρασί). Οι πιο σημαντικές φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν την κερκετίνη, την επικατεχίνη, την προκυανιδίνη, και το κόκκινο-κακάο (η χρωστική που περιέχεται στο κακάο). Μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους έχουν αναφέρει μια σταθερή αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της συσσωμάτωσης τους με την κατανάλωση του πλούσιου σε πολυφαινόλες κακάο ή της μαύρης σοκολάτας σε μέτριες ποσότητες, είτε σε οξεία ή σε χρόνια βάση. Ωστόσο, ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για το ανασταλτικό αποτέλεσμα αυτής της τροφής στη λειτουργία των αιμοπεταλίων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, καθώς και το εάν το υψηλό φαινολικό περιεχόμενό τους είναι κυρίως υπεύθυνο για την εν λόγω αντιαιμοπεταλιακή δράση. Μέχρι στιγμής, το κακάο και η μαύρη σοκολάτα έχουν δείξει να εμποδίζουν την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, μειώνοντας την επαγόμενη από το ADP, την αδρεναλίνη και, την επινεφρίνη ενεργοποίηση του υποδοχέα της μεμβράνης GPIIb/IIIa, την προκαλούμενη από το ADP έκφραση της P-σελεκτίνης και την δραστηριότητα της PLA2 και της COX. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν αύξηση στην παραγωγή NO από το ενδοθήλιο (Vilahur et al, 2013).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της *ex vivo* αντιαιμοπεταλιακής δράσης διαφόρων εκχυλισμάτων Ελληνικών κολοκυθόσπορων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται και καταναλώνονται ευρέως στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες χώρες. Οι διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης έγιναν με σκοπό να εντοπιστούν τα πλέον βιοδραστικά εκχυλίσματα έναντι της συσσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων που επάγεται από γνωστούς αγωνιστές αυτών. Σκοπός της μελέτης ήταν επίσης η ανάλυση των εκχυλισμάτων ως προς την σύστασή τους σε φυτοστερόλες, σκουαλένιο και πολυφαινόλες και τέλος συσχέτιση των επιμέρους χαρακτηριστικών της σύστασής τους με την αντιαιμοπεταλιακή δράση.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Δείγματα κολοκυθόσπορου

Οι κολοκυθόσποροι της μελέτης ήταν Ελληνικής προέλευσης και εμπορικά διαθέσιμοι. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω είδη:

Λεπτός ψημένος δίχως αλάτι (PS1)

Λεπτός ψημένος με αλάτι (PS2)

Πλατύς ψημένος με αλάτι (PS3)

Πλατύς ψημένος δίχως αλάτι (PS4)

! "\$%& 1.Κολοκυθόσπορος **PS1**



! "\$%& 2.Κολοκυθόσπορος **PS2**



! "\$%& 3.Κολοκυθόσπορος **PS3**



! "\$%& 4.Κολοκυθόσπορος **PS4**



Όργανα

- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Büchi Rotavapor R-114
- Ομογενοποιητής Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel IKA- Labortechnik
- Αναλυτικός ζυγός Kern ACJ/ACS, ACJ 220-4M
- Λυοφιλοποιητής Heto, LyoLab 3000
- Σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό Speedvac, CentriVac Concentrator, CentriVac Cold Trap, LABCONCO
- Φυγόκεντρος Eppendorf, Centrifuge 5810 R

Αντιδραστήρια - Διαλύτες

- Αιθανόλη
- Ακετόνη
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Χλωροφόρμιο
- Μεθανόλη
- Απεσταγμένο νερό

Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με διαλύτες μειούμενης πολικότητας (Εκχύλιση 1)

Ζυγίστηκαν 2,5g δείγματος προς εκχύλιση και προστέθηκαν σε δύο γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50mL. Προστέθηκαν 25mL οξινισμένου νερού (2% με οξικό οξύ) σε κάθε σωλήνα και έγινε ανάμιξη με τη βοήθεια του ομογενοποιητή. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του υπερκείμενου σε εσφυρισμένη γυάλινη ή κωνική φιάλη. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Δηλαδή, στο ίζημα της φυγοκέντρησης προστέθηκαν άλλη μία φορά 25mL οξινισμένου νερού σε κάθε σωλήνα και ξαναέγινε ανάμιξη με τον ομογενοποιητή, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υπερκείμενου να είναι 100mL. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε από την αρχή με οξινισμένη αιθανόλη (2% με οξικό οξύ), ακετόνη και οξικό αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν, εξατμίστηκαν με τη βοήθεια περιστρεφόμενης συσκευής

εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση σε σκοτάδι. Η παραλαβή του ξηρού υπολείμματος έγινε με τον αντίστοιχο διαλύτη κάθε φορά και τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένους βιδωτούς σωλήνες με εξαίρεση τα διαλύματα νερού τα οποία μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια έγινε εξάτμιση των διαλυμάτων σε σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενόν μέχρι ξηρού, με εξαίρεση τα δείγματα νερού τα οποία λυοφιλοποιήθηκαν. Τα ξηρά υπολείμματα ζυγίστηκαν και αναδιαλύθηκαν το καθένα σε γνωστό όγκο του αντίστοιχου διαλύτη. Τέλος, έγινε σηματοδότηση των δειγμάτων και φυλάχθηκαν στους -20°C .

Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με υδατοαιθανολικά μίγματα (Εκχύλιση 2)

Ζυγίστηκαν 2,5g δείγματος προς εκχύλιση και προστέθηκαν σε δύο γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50mL. Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 25mL νερού και έγινε ανάμιξη με τον ομογενοποιητή. Έπειτα έγινε φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του υπερκείμενου σε εσφυρισμένη γυάλινη ή κωνική φιάλη. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Δηλαδή, στα ίδια δείγματα, ξαναπροστέθηκαν 25mL νερού σε κάθε σωλήνα και ξαναέγινε ανάμιξη με τον ομογενοποιητή, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του υπερκείμενου να είναι 100mL. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε από την αρχή με αιθανόλη 100%, αιθανόλη 70% και αιθανόλη 30%. Τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν, εξατμίστηκαν με τη βοήθεια περιστρεφόμενης συσκευής εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση σε σκοτάδι. Η παραλαβή του ξηρού υπολείμματος έγινε με τον αντίστοιχο διαλύτη κάθε φορά και τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένους βιδωτούς σωλήνες με εξαίρεση τα διαλύματα νερού τα οποία μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια έγινε εξάτμιση των διαλυμάτων σε σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενόν μέχρι ξηρού, με εξαίρεση τα δείγματα νερού τα οποία λυοφιλοποιήθηκαν. Τα ξηρά υπολείμματα ζυγίστηκαν και αναδιαλύθηκαν το καθένα σε γνωστό όγκο του αντίστοιχου διαλύτη. Τέλος, έγινε σηματοδότηση των δειγμάτων και φυλάχθηκαν στους -20°C .

Εκχύλιση ολικών λιποειδών από κολοκυθόσπορο με την μέθοδο Folch (Εκχύλιση 3)

Ζυγίστηκαν 2,5g δείγματος προς εκχύλιση και προστέθηκαν σε δύο γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50mL. Προστέθηκαν 25mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) σε κάθε σωλήνα και έγινε ανάμιξη με τον ομογενοποιητή. Έπειτα έγινε φυγοκέντρωση των διαλυμάτων στις 2500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε εσφυρισμένη γυάλινη ή κωνική φιάλη. Η ανάμιξη με τον ομογενοποιητή

και η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκαν ακόμα μία φορά και το τελικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη στην οποία προστέθηκαν 20mL NaCl 0,9% με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί διφασικό σύστημα. Το διφασικό σύστημα αναδεύτηκε έντονα και παρέμεινε στη ψύξη για μία νύχτα. Στη συνέχεια παρελήφθη η χλωροφορμική (κάτω) φάση σε εσμυρισμένη φιάλη και ο διαλύτης εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση σε σκοτάδι. Το ξηρό υπόλειμμα αναδιαλύθηκε σε μικρή ποσότητα CHCl₃:MeOH (1:1) και μεταφέρθηκε σε προζυγισμένους βιδωτούς σωλήνες. Τα δείγματα σηματοδοτήθηκαν και φυλάχθηκαν στους -20 °C.

1. Κωδικοί των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις διαφορετικές μεθοδολογίες εκχύλισης

Εκχύλιση 1					Εκχύλιση 2				Εκχύλιση 3
Κολοκυθόσπορος	οξ. Νερό	οξ. Αιθανόλη	Ακετόνη	οξ. Αιθυλεστέρας	Νερό	Αιθανόλη 100%	Αιθανόλη 30%	Αιθανόλη 70%	Χλωροφόρμιο: Μεθανόλη
PS1	PS1 1	PS1 2	PS1 3	PS1 4	PS1 5	PS1 6	PS1 7	PS1 8	PS1 9
PS2	PS2 1	PS2 2	PS2 3	PS2 4	PS2 5	PS2 6	PS2 7	PS2 8	PS2 9
PS3	PS3 1	PS3 2	PS3 3	PS3 4	PS3 5	PS3 6	PS3 7	PS3 8	PS3 9
PS4	PS4 1	PS4 2	PS4 3	PS4 4	PS4 5	PS4 6	PS4 7	PS4 8	PS4 9

Όργανα

- Αναδευτήρας Vortex-2 Genie , Scientific Industries
- Συσσωρευματομέτρο (Aggregometer) Chrono-log
- Φυγόκεντρος Eppendorf, Centrifuge 5810 R
- Φωτόμετρο Novaspec II, Pharmacia Biotech
- Αιματολογικός αναλυτής Auto Hematology Analyzer BC-3000 plus, Mindray
- Πιπέτες 1-10μL και 100-1000μL

Αντιδραστήρια - Διαλύτες

- Διάλυμα βοείου αλβουμίνης ορού (BSA)
- Φυσιολογικός ορός
- Αέριο άζωτο
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικού οξέος - Citrate buffer 0,105 M, pH=7,4
- PAF (10^{-5} M)
- TRAP (1mM)
- ADP (0,123 mM και 1,23 mM)

Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP από υγιείς εθελοντές

Παραλαμβάνονται 50mL αίματος (τα 5 πρώτα ml απορρίπτονται) σε 4 βιδωτούς πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 1400μL αντιπηκτικού διαλύματος κιτρικού οξέος ο καθένας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 140 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, δίχως επιτάχυνση ή επιβράδυνση. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πιπέτα και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Τα δείγματα τοποθετούνται ξανά για φυγοκέντρηση στις 1500 g για 20 λεπτά. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση παραλαμβάνεται ξανά το υπερκείμενο (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια, PPP) και μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα των 15 mL. Η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ελέγχεται με τον αιματολογικό αναλυτή έτσι ώστε να είναι $300 \times 10^3/\mu\text{L}$. Σε περίπτωση που η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη, γίνεται αρραίωση με κατάλληλο όγκο του PPP.

Προετοιμασία εκχυλισμάτων για την εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής τους δράσης

Τα εκχυλίσματα αναδιαλύθηκαν είτε σε διάλυμα BSA 2,5 mg/ml για την εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής τους δράσης έναντι του PAF, είτε σε φυσιολογικό ορό για την εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής τους δράσης έναντι TRAP και ADP. Λήφθησαν 200μL από τα εκχυλίσματα και τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένους πλαστικούς σωλήνες. Έγινε εξάτμιση τους με άζωτο και ζυγίστηκαν, έτσι ώστε να υπολογιστεί το ξηρό βάρος. Στη συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε 200μL κατάλληλου διαλύτη και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους. Έπειτα από 10 λεπτά τα εκχυλίσματα ήταν έτοιμα για χρήση.

Εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων

Σε ειδικές γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 250 μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και προεπωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Στην ειδική θέση του συσσωρευματομέτρου τοποθετείται μία γυάλινη κυψελίδα που περιέχει 500 περίπου μικρόλιτρα από το PPP και λειτουργεί ως τυφλό βάση του οποίου υπολογίζεται το 0% και το 100% της διαπερατότητας του εναιωρήματος αιμοπεταλίων. Στην συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στις ειδικές θερμοστατούμενες κυψελίδες του συσσωρευματομέτρου μαζί με ένα μικρό μαγνητικό αναδευτήρα που περιστρέφεται με 1200 rpm/min και προστίθενται διάφορες ποσότητες του συσσωρευτικού παράγοντα (PAF, ADP ή TRAP) έτσι ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση του αγωνιστή που προκαλεί 70-80% συσσώρευση. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Από κάθε καμπύλη συσσώρευσης υπολογίζεται το ύψος συσσώρευσης (Amplitude-A), η ταχύτητα συσσώρευσης (slope-S) και το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve-AUC).

Για την έρεση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων, το PRP προ-επωάζεται με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος για 2 min και στη συνέχεια προστίθεται ο συσσωρευτικός παράγοντας που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων. Ο συνολικός όγκος διαλύματος μέσα στην κυψελίδα είναι πάντοτε 300μL.

Η ανασταλτική ικανότητα των δειγμάτων εκτιμάται με το δείκτη IC50 (Inhibitory Concentration for 50% inhibition). Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί στη συγκέντρωση εκείνη του εκχυλίσματος που προκαλεί αναστολή της δράσης των αγωνιστών κατά 50%. Όσο πιο μικρό είναι το IC50 τόσο πιο δραστικό θεωρείται το δείγμα που μελετάται, αφού έχει την ικανότητα να προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του αγωνιστή σε μικρότερη ποσότητα. Για να υπολογιστεί το IC50 (με βάση το ύψος συσσώρευσης) γίνεται καμπύλη της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος με την % αναστολή από την οποία υπολογίζεται το IC50.

$$\% \text{ inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{εκχυλίσματος}}) / A_{\text{control}}$$

Το IC50 υπολογίζεται και για τις τρεις μετρούμενες παραμέτρους της καμπύλης συσσώρευσης δηλαδή το A, S, AUC.

Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών με GC/MS

Όργανα

- Σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενόν Speedvac, CentriVac Concentrator, CentriVac Cold Trap, LABCONCO
- Υδατόλουτρο (Water Bath), Memmet
- Αναλυτικός ζυγός Kern ACJ/ACS, ACJ 220-4M
- GC Χρωματογράφος (6890N Agilent Technologies εφοδιασμένος με 5973 Mass Selective Detector & 7683 Series Injector)
- HPLC Χρωματογράφος (HP 1050, ανιχνευτής UV-Vis και φθορισμομετρικός HP1046A)
- Φιαλίδια GC
- Πιπέτα 1-100μL

Αντιδραστήρια - Διαλύτες

- διάλυμα KOH/MeOH 3 N
- αντιοξειδωτικό BHT - Butylated Hydroxytoluene
- διάλυμα BF3/Μεθανόλης
- διάλυμα NaCl
- Σιλυλιωτικό BSTFA [Bis-(Trimerhysilyl)-trifluoroacetamide], 99% με 1% TMCS

Πειραματική πορεία

Παρελήφθησαν 100μL εκχυλίσματος και τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα φυαλίδια GC. Τα δείγματα εξατμίστηκαν σε άζωτο και ακολούθησε σιλυλίωση. Σε κάθε φυαλίδιο προστέθηκαν 50μL εσωτερικού προτύπου και τοποθετήθηκαν στον φυγοκεντρικό εξατμιστήρα για εξαίτηση μέχρι ξηρού. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα ξηρά εκχυλίσματα 250μL σιλυλιωτικού αντιδραστηρίου BSTFA, το οποίο μετατρέπει τις πολυφαινόλες και τα τυχόν τερπενικά οξέα στους πτητικούς τριμεθυλ-σιλυλιωμένους αιθέρες (TMS) τους. Τα φυαλίδια σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο στους 70°C για 20 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση σιλυλίωσης. Αφού ψύχθηκαν ήταν έτοιμα να μετρηθούν με GC/MS. Ο διαχωρισμός των πολυφαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία, ενώ η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με φασματογράφο μάζας.

Για την ανάλυση, 1μL από τα σιλυλιωμένα δείγματα εισαγόταν με σχάση δείγματος 20:1 (split ratio 20:1) στον αέριο χρωματογράφο. Ο αέριος χρωματογράφος ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbrohn, Germany) HP Series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7638.

Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη HP-5 MS με επικάλυψη 5% phenyl-95% methyl siloxane, μήκους 30m, με εσωτερική διάμετρο 0,25 mm και πάχος εσωτερικής επίστρωσης 0,25 μm. Ο εισαγωγέας τέθηκε στους 250°C και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την αεριοχρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή μάζας (MSD transfer line) στους 300 °C. Ός φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He υψηλής καθαρότητας με ροή 0.6 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αεριοχρωματογράφου που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό ήταν: 70°C για 5 λεπτά, 70-130°C με ρυθμό ανόδου 15°C/min, 130-160°C με ρυθμό ανόδου 4°C/min και παραμονή για 15 λεπτά και τέλος άνοδος από 160-300°C με ρυθμό 10°C/min και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 15 λεπτά.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολικών και τερπενικών συστατικών έγινε με την τεχνική της εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring). Κατ' αυτήν την μέθοδο, η ανίχνευση των πολυφαινολών και των τερπενικών οξέων (ποιοτικός προσδιορισμός) βασίζεται στην παρουσία στο δείγμα τριών χαρακτηριστικών για κάθε συστατικό ιόντων (θραυσμάτων) με ανοχή $\pm 0.05 \times RT$ όπου RT είναι ο αναμενόμενος χρόνος κατακράτησης των συστατικών από πρότυπα διαλύματα και ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται σε ένα από τα τρία ιόντα που ορίζεται ως "ίόν στόχος" (target), ενώ επιβεβαιώνεται από τους λόγους της έντασης απόκρισης των άλλων 2 ιόντων (qualifiers) προς την ένταση απόκρισης του ιόντος στόχου στο δείγμα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό εφαρμόστηκε η μέθοδος εσωτερικού προτύπου. Ός τέτοιο επελέγη η 3-(4-υδρόξυ-φαινυλο)-1-προπανόλη. Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς

για κάθε συστατικό με μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων σε περιοχή συγκεντρώσεων 80-3500 ng/mL. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές με καλούς συντελεστές γραμμικής συσχέτισης ($R^2 > 0.996$) για όλες τις ουσίες που προσδιορίστηκαν. Οι ποσοτικοί υπολογισμοί έγιναν βάσει των ιόντων στόχων (target ions), ενώ χρησιμοποιήθηκαν και 1-2 ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions), η αναλογία των σημάτων των οποίων επιβεβαιώνει ή απορρίπτει την υπόθεση ταυτοποίησης του κάθε συστατικού. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές m/z των ιόντων-στόχων και των ιόντων επιβεβαίωσης.

Πίνακας 2. Απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίζονται με GC/MS.

Ένωση	Ιόν-στόχος (target ion) (m/z) ^a	Ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions) (m/z) ^a
Βανιλίνη	194	209
Κινναμωμικό οξύ	205	220
Τυροσόλη	179	267,282
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	267	223,193
p-Υδροξυφαινοξικό οξύ	252	296,281
3-(4-Υδροξυφαινοξυ) -1- προπανόλη (εσωτερικό πρότυπο)	206	191,179
Φλωρετικό οξύ	192	310
Βαννιλικό οξύ	297	267,312
Ομοβανιλικό οξύ	326	267,311
ο- Κουμαρικό οξύ	293	308,147
Πρωτοκατεχικό οξύ	193	355,370
3-4 Διυδροξυφαινοξικό οξύ	384	267,179
Συριγγικό οξύ	327	342,312
p-Κουμαρικό οξύ	308	293,219
Γαλλικό οξύ	281	458,443
Φερουλικό οξύ	338	323,308
Καφεϊκό οξύ	396	219,381
Σιναπικό οξύ	368	353,338
Ρεσβερατρόλη	444	445,443
Χρυσίνη	383	384
Επικατεχίνη	368	355,474
Ναριγκενίνη	473	296

Ένωση	Ιόν-στόχος (target ion) (m/z) ^a	Ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions) (m/z) ^a
Κατεχίνη	368	355,474
Γενιστεΐνη	473	
Καμπφερόλη	559	560
Χλωρογενικό οξύ	345	307,324
Κερκετίνη	647	559,575
Μυρισετίνη	735	647,575
Λουτεολίνη	559	471,399
Τερπενικά Οξέα		
Ολεανολικό οξύ	203	320,482
Ουρσολικό οξύ	203	320
Μασλινικό οξύ	203	320

a: αφορούν τους τριμεθυλσιλυλαιθέρες των συστατικών

Προσδιορισμός στερολών και σκουαλενίου

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός Kern ACJ/ACS, ACJ 220-4M
- Αναδευτήρας Vortex-2 Genie , Scientific Industries
- Λουτρό Υπερήχων (Sonication)
- Υδατόλουτρο (Water Bath), Memmet
- Φυγόκεντρος Eppendorf, Centrifuge 5810 R
- Σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενόν Speedvac, CentriVac Concentrator, CentriVac Cold Trap, LABCONCO
- GC Χρωματογράφος (6890N Agilent Technologies εφοδιασμένος με 5973 Mass Selective Detector & 7683 Series Injector)
- HPLC Χρωματογράφος (HP 1050, ανιχνευτής UV-Vis και φθορισμομετρικός HP1046A)
- Φυαλίδια GC
- Πιπέτα 1-100μL

Αντιδραστήρια - Διαλύτες

- άζωτο
- διάλυμα KOH/MeOH 3 N
- αντιοξειδωτικό BHT - Butylated Hydroxytoluene
- διάλυμα χοληστερόλης 100mg/L
- διάλυμα BF₃/Μεθανόλης
- διάλυμα NaCl
- Σιλυλιωτικό BSTFA [Bis-(Trimerhysilyl)-trifluoroacetamide], 99% με 1% TMCS

Πειραματική πορεία

Παρελήφθησαν 50μL από τα κλάσματα της εκχύλισης 4, και 200μL από τα κλάσματα των εκχυλίσεων 3 και 9, τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό πώμα και εξατμίστηκαν. Προστέθηκαν 2mL διαλύματος KOH/MeOH 3 N, 100 μL διαλύματος χοληστερόλης 100mg/L (εσωτερικό πρότυπο) και ανακινήθηκαν καλά με τον αναδευτήρα. Στη συνέχεια έγινε ανάδευση υπό την επίδραση υπερήχων (sonication) και παραμονή των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 60°C για 60 λεπτά. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε νερό βρύσης για κρύωμα και προστέθηκαν 1,5mL BF₃/Μεθανόλης. Έπειτα από καλή ανακίνηση με τη βοήθεια του αναδευτήρα τα δείγματα παρέμειναν στο υδατόλουτρο στους 95°C για 3 λεπτά. Αφού έγινε ξανά κρύωμα των σωλήνων με νερό βρύσης προστέθηκαν 4mL κορεσμένου διαλύματος NaCl και 2mL διαλύματος n-εξανίου που περιείχε αντιοξειδωτικό BHT 100ppm. Τα δείγματα ανακινήθηκαν με τον αναδευτήρα, φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm για 10 λεπτά και έγινε παραλαβή της εξανικής φάσης (πάνω φάση). Προστέθηκε ξανά 1mL διαλύματος n-εξανίου με αντιοξειδωτικό BHT 100ppm και έγινε ανακίνηση με αναδευτήρα. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις 2000 rpm για 10 λεπτά και παρελήφθη η εξανική φάση που ενώθηκε με την πρώτη.

Για τον προσδιορισμό των στερολών ως τριμεθυλοσιλυλαιθέρων (TMS) μεταφέρονται 1000 μL από την στιβάδα του n-εξανίου σε vials GC και εξατμίζονται μέχρι ξηρού με άζωτο ή με σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενόν. Προσθέτονται 250μL BSTFA και σφραγίζονται GC vials. Στη συνέχεια ανακινούνται με τη βοήθεια αναδευτήρα και παραμένουν στο υδατόλουτρο στους 70°C επί 20 λεπτά. Έπειτα τοποθετούνται σε βαθιά ψύξη (-40°C) μέχρι να αναλυθούν στο GC/MS.

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα β-σιτοστερόλης από το οποίο μεταφέρονται σε GC-vials όγκοι που περιέχουν 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 και 1000μg β-σιτοστερόλης. Προστίθεται εσωτερικό πρότυπο χοληστερόλης,

εξατμίζονται μέχρι ξηρού και σιλυλιώνονται όπως τα δείγματα. Αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς κατασκευάσθηκε και για το σκουαλένιο.

'(%&#&) 3. Επιλεγμένα ιόντα (m/z) για ποσοτικοποίηση στερολών και σκουαλενίου. Σε παρένθεση το σχετικό μέγεθος των κορυφών των ιόντων

Ιόν ποσοτικοποίησης	Επιβεβαιωτικά ιόντα				
σκουαλένιο	69(100)	81(50)	95(20)	137(20)	341(10)
χοληστερόλη (IS)	458 M ⁺ (50)	329(100)	368(95)	129(90)	73(85)
καμπεστερόλη	472 M ⁺ (45)	343(100)	129(97)	382(90)	367(40)
στιγμαστερόλη	484 M ⁺ (60)	83(100)	129(88)	394(75)	255(72)
β-σιτοστερόλη	486 M ⁺ (50)	396(100)	357(95)	129(85)	381(45)

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683. Για την ανάλυση, 1 μ L σιλυλιωμένου δείγματος εισάγεται στον αεριοχρωματογράφο (splitlessmode). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν HP-5MS (Agilent) 30 m x 0.2 mm x 0.25 μ m και το φέρον αέριο ήταν He υψηλής καθαρότητας, με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς του δείγματος στον ανιχνευτή μάζας ρυθμίσθηκαν στους 250°C και 300°C αντίστοιχα. Η θερμοκρασία φούρνου ήταν αρχικά 210°C, αυξήθηκε στους 300°C με ρυθμό 5.5°C/min και παρέμεινε στους 300°C επί 15 min. Η ταυτοποίηση των φυτοστερολών και του σκουαλενίου έγινε βάσει των χρόνων κατακράτησης, και με τη χρήση των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας Wiley και NIST 2005, των φασμάτων μάζας πρότυπων ουσιών και βιβλιογραφικών δεδομένων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση χοληστερόλης ως εσωτερικό πρότυπο και καμπυλών αναφοράς κατασκευάσθηκαν με πρότυπα διαλύματα β-σιτοστερόλης και σκουαλενίου που περιείχαν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα προς ανάλυση δείγματα. Η ποσοτικοποίηση της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης έγινε επίσης βάσει της καμπύλης αναφοράς της β-σιτοστερόλης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παραλαβή εκχυλισμάτων από διαφορετικά είδη κολοκυθόσπορου

Πρώτο εκχυλιστικό σχήμα-Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με διαλύτες μειούμενης πολικότητας

Στο πρώτο σχήμα εκχύλισης έγινε εκχύλιση κολοκυθόσπορου συνολικής ποσότητας 5g απο κάθε διαφορετικό είδος, με οξινισμένο νερό, οξινισμένη αιθανόλη, ακετόνη και οξικό αιθυλεστέρα διαδοχικά, και παρελήφθησαν 4 κλάσματα από το κάθε είδος, με καθαρό βάρος και συγκεντρώσεις που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

'(%&#&) 4. Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με το πρώτο σχήμα εκχύλισης

	1 οξ. Νερό (mg/mL)	2 οξ. Αιθανόλη (mg/mL)	3 Ακετόνη (mg/mL)	4 οξ. Αιθυλεστέρας (mg/mL)
PS1	74	469	417	11
PS2	50	346	281	20
PS3	57	282	260	17
PS4	55	287	114	18

'(%&#&) 5. Συνολική ποσότητα εκχυλισμάτων και το ποσοστό ανάκτησης του κάθε εκχυλίσματος που απομονώθηκαν με το πρώτο σχήμα εκχύλισης

	1 οξ. Νερό (g)	2 οξ. Αιθανόλη (g)	3 Ακετόνη (g)	4 οξ. Αιθυλεστέρας (g)	Ανάκτηση (%)
PS1	0,6705 (13,4%)	2,345 (46,9%)	2,0862 (41,7%)	0,0557 (1,1%)	103,0
PS2	0,5028 (10,1%)	1,7343 (34,7%)	1,407 (28,1%)	0,1006 (2%)	74,89
PS3	0,5771 (11,5%)	1,4109 (28,2%)	1,3028 (26%)	0,088 (1,7%)	67,58
PS4	0,5569 (11,1%)	1,4397 (28,8%)	0,5749 (11,5%)	0,0907 (1,8%)	53,24

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες, την μεγαλύτερη ανάκτηση εμφανίζει ο κολοκυθόσπορος PS1 και ακολουθούν ο PS2, PS3, PS4. Η μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλίζεται στο αιθανολικό κλάσμα και στη συνέχεια στο νερό, ακετόνη και οξικό αιθυλεστέρα.

Δεύτερο εκχυλιστικό σχήμα-Εκχύλιση κολοκυθόσπορου με υδατοαιθανολικά μίγματα

Στο δεύτερο σχήμα εκχύλισης έγιναν 4 εκχυλίσεις με 4 διαφορετικούς διαλύτες. Σε 5g κολοκυθόσπορου από το κάθε είδος, έγινε εκχύλιση με νερό, με αιθανόλη 100%, αιθανόλη 70% και αιθανόλη 30%. Από αυτές τις εκχυλίσεις προέκυψαν τα παρακάτω κλάσματα, με καθαρό βάρος και συγκεντρώσεις που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με το δεύτερο σχήμα εκχύλισης

	5 Νερό (mg/mL)	6 Αιθανόλη 100% (mg/mL)	7 Αιθανόλη 30% (mg/mL)	8 Αιθανόλη 70% (mg/mL)
PS1	28,0	199,7	43,2	13,5
PS2	28,9	291,5	66,9	Χάθηκε
PS3	38,7	303,6	42,4	18
PS4	30,0	238,8	22,8	32,5

Πίνακας 7. Συνολική ποσότητα εκχυλισμάτων και το ποσοστό ανάκτησης του κάθε εκχυλίσματος που απομονώθηκαν με το δεύτερο σχήμα εκχύλισης

	5 Νερό (g)	6 Αιθανόλη 100% (g)	7 Αιθανόλη 30% (g)	8 Αιθανόλη 70% (g)
PS1	0,2796 (5,6%)	0,9983 (20%)	0,4324 (8,6%)	0,2457 (4,9%)
PS2	0,2889 (5,8%)	1,4577 (29,2%)	0,6691 (13,4%)	Χάθηκε
PS3	0,3871 (7,7%)	1,518 (30,4%)	0,4249 (8,5%)	0,1944 (3,9%)
PS4	0,3003 (6%)	1,1943 (23,9%)	0,2283 (4,6%)	0,1787 (3,6%)

Όπως παρατηρούμε στους παραπάνω πίνακες ο κολοκυθόσπορος PS3 εμφανίζει την μεγαλύτερη ανάκτηση, ενώ στους κολοκυθόσπορους PS1 και PS4 εκχυλίζεται παρόμοια ποσότητα σε αυτό το εκχυλιστικό σχήμα. Μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλίζεται με την αιθανόλη 100% (1-1,5 g), το νερό και η αιθανόλη εκχυλίζουν παρόμοιες ποσότητες (0,3-0,6 g) ενώ η αιθανόλη 70% εμφανίζει τη μικρότερη ικανότητα εκχύλισης (~ 0,2 g).

Τρίτο εκχυλιστικό σχήμα-Εκχύλιση ολικών λιποειδών από κολοκυθόσπορο με την μέθοδο Folch

Στο τρίτο σχήμα εκχύλισης έγινε μία κλασσική εκχύλιση ολικών λιποειδών κατά Folch πάλι από 5 g κολοκυθόσπορου. Από αυτήν την εκχύλιση προέκυψαν τα παρακάτω κλάσματα, με καθαρό βάρος και συγκεντρώσεις που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

'(%&#&) 8. Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με το τρίτο σχήμα εκχύλισης

	9 Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη (mg/mL)
PS1	248,8
PS2	358,0
PS3	471,6
PS4	500,6

'(%&#&) 9. Συνολική ποσότητα εκχυλισμάτων και το ποσοστό ανάκτησης του κάθε εκχυλίσματος που απομονώθηκαν με το τρίτο σχήμα εκχύλισης

	9 Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη (g)	Ανάκτηση (%)
PS1	2,4888	49,78
PS2	1,7902	35,8
PS3	2,3583	47,17
PS4	2,5003	50,01

Όπως παρατηρούμε από τους παραπάνω πίνακες η ποσότητα λιποειδών στους κολοκυθόσπορους κυμαίνεται από 35-50%. Η μικρότερη ποσότητα απομονώνεται από τον λεπτό, αλατισμένο κολοκυθόσπορο (PS2).

Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες

Τα κλάσματα 3 και 4 από το πρώτο σχήμα εκχύλισης και τα κλάσματα 9 από το τρίτο σχήμα εκχύλισης αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους σε φυτοστερόλες και σκουαλένιο έτσι ώστε να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις του περιεχομένου αυτού με την αντιαιμοπεταλιακή δράση των κολοκυθόσπορων. Τα αποτελέσματα από αυτήν την ανάλυση φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

'(%&#&) 10. Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων **PS1** σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες

PS1	3 Ακετόνη (μg/mg)	4 οξ. Αιθυλεστέρας (μg/mg)	9 Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη (μg/mg)
squalene	0,689	1,0875	0,841
campesterol	0,000277	0,0625	0,00587
stigmasterol	0,000577	1,325	0,0011
β-sitosterol	0,0030	0,0125	0,00665

'(%&#&) 11. Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων **PS2** σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες

PS2	3 Ακετόνη (μg/mg)	4 οξ. Αιθυλεστέρας (μg/mg)	9 Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη (μg/mg)
squalene	0,5388	0,71	0,633
campesterol	0,000188	0,0053	0,00047
stigmasterol	0,0002695	0,866	0,000418
β-sitosterol	0,00283	0,0066	0,00412

'(%&#&) 12. Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων **PS3** σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες

PS3	3 Ακετόνη (μg/mg)	4 οξ. Αιθυλεστέρας (μg/ mg)	9 Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη (μg/mg)
squalene	0,7369	0,78125	1,279
campesterol	0,000165	ΔΑ	0,000827
stigmasterol	0,00025	ΔΑ	0,000541
β-sitosterol	0,00355	ΔΑ	0,00726

ΔΑ: Δεν ανιχνεύτηκε

'(%&#&) **13.** Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων **PS4** σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες

PS4	3 (μg/mg) Ακετόνη	4 (μg/mg4 (μg/mg) οξ. Αιθυλεστέρας)	9 (μg/mg) Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη
squalene	0,45	0,4786	0
campesterol	0,0001285	0,005	0
stigmasterol	0,000514	Not Detected	0
β-sitosterol	0,0023	0,0107	0

'(%&#&) **14.** Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του **PS1**

PS1	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 3 (μg)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 4 (μg)	Συνολική ποσότητα στο σχήμα εκχύλισης (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 9 (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)
squalene	1,44	60,57	1.497,57	299,5	2.092	418,4
campesterol	0,578	3,48	4,058	0,812	14,6	2,92
stigmasterol	1,204	73,8	75	15	2,737	0,547
β-sitosterol	6,25	0,69	6,95	1,39	16,54	3,30
Total (phytosterols)	8,04	77,97	86,01	17,20	33,87	6,77

'(%&#&) **15.** Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του **PS2**

PS2	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 3 (μg)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 4 (μg)	Συνολική ποσότητα στο σχήμα εκχύλισης (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 9 (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)
squalene	758	71,426	829,42	165,88	1133,2	226,6
campesterol	0,265	0,533	0,798	0,1596	0,803	0,161
stigmasterol	0,379	87,12	87,499	17,5	0,748	0,15
β-sitosterol	3,981	0,664	4,645	0,929	7,376	1,475
Total (phytosterols)	4,62	88,31	92,94	18,58	8,927	1,78

'(%)&#&) 16. Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του **PS3**

PS3	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 3 (μg)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 4 (μg)	Συνολική ποσότητα στο σχήμα εκχύλισης (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 9 (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)
squalene	960	68,75	1028,75	205,75	3.016,26	603,25
campesterol	0,215	ΔΑ	0,215	0,043	1,95	0,39
stigmasterol	0,326	ΔΑ	0,326	0,0652	1,276	0,255
β-sitosterol	4,625	ΔΑ	4,625	0,925	17,121	3,424
Total (phytosterols)	5,166	ΔΑ	5,16	1,033	20,34	4,06

ΔΑ: Δεν ανιχνεύτηκε

'(%)&#&) 17. Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες του **PS4**

PS4	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 3 (μg)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 4 (μg)	Συνολική ποσότητα στο σχήμα εκχύλισης (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)	Συνολική ποσότητα στο εκχύλισμα 9 (μg)	Συγκέντρωση στον κολοκυθόσπορο (μg/g)
squalene	258,70	43,41	302,1	60,423	0	0
campesterol	0,074	0,453	0,527	0,105	0	0
stigmasterol	0,295	Not Detected	0,295	0,059	0	0
β-sitosterol	1,322	0,971	2,293	0,459	0	0
Total (phytosterols)	1,69	1,42	3,11	0,623	0	0

'(%)&#&) 18. Σύσταση σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες στα 4 είδη κολοκυθόσπορου - *+, #-%. / 0."#\$) 1(%)&#&)

	PS1 (μg/g)		PS2 (μg/g)		PS3 (μg/g)		PS4 (μg/g)	
	Εκχύλισμα 1	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 3
squalene	299,5	418,4	165,8	226,8	205,75	603,2	302,1	0
campesterol	0,812	2,92	0,1596	0,16	0,043	0,39	0,527	0

	PS1 (μg/g)		PS2 (μg/g)		PS3 (μg/g)		PS4 (μg/g)	
stigmasterol	15	0,547	17,5	0,149	0,0652	0,255	0,295	0
β-sitosterol	1,391	3,308	0,929	1,476	0,925	3,424	2,293	0
Total phyto-sterols	17,20	6,77	18,58	1,78	1,03	4,06	3,11	0

' (%&#&) 19. Σχετική αναλογία φυτοστερολών στα 4 είδη κολοκυθόσπορου -
*+, #-%. / 0."#\$) 1(%&#&)

	PS1		PS2		PS3		PS4	
% φυτοστερόλης	Εκχύλισ η 1	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 3
campesterol	4,7%	43%	1%	9%	4,2%	9,6%	16,9%	0
stigmasterol	87,2%	8%	94,2%	8,3%	6,3%	6,3%	9,5%	0
β-sitosterol	8,1%	49%	5%	82,7%	89,5%	84,1%	73,6%	0

Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, ο κολοκυθόσπορος PS2 έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φυτοστερόλες όταν εκχυλίζεται με το πρώτο σχήμα εκχύλισης, ενώ ακολουθεί ο κολοκυθόσπορος PS1. Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φυτοστερόλες όταν εκχυλίζεται με το τρίτο σχήμα εκχύλισης την έχει ο κολοκυθόσπορος PS1. Σχετικά με την σύσταση σε σκουαλένιο, παρατηρούμε ότι ο κολοκυθόσπορος PS4 έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πρώτο εκχυλιστικό σχήμα ενώ ο κολοκυθόσπορος PS3 έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο τρίτο εκχυλιστικό σχήμα.

Σύσταση εκχυλισμάτων σε πολυφαινόλες

Τα κλάσματα που προέκυψαν από τα τρία σχήματα εκχύλισης αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους σε πολυφαινόλες έτσι ώστε να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις του περιεχομένου αυτού με την αντιαιμοπεταλιακή δράση των κολοκυθόσπορων. Τα αποτελέσματα από αυτήν την ανάλυση φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

'(%&##&) **20.** Σύσταση εκχυλισμάτων **PS1** σε πολυφαινόλες (ng/mg).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Βανιλίνη	0,854	0,605	0,039	11,49	1,605	0,302	0,664		0,114
Κινναμωμικό οξύ	0,434	1,374	0,034	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		0,0585
Τυροσόλη	0,238	N.D.	N.D.	0,03	0,329	0,113	N.D.		0,0078
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	2,949	1,769	0,0587	1,53	2,835	0,655	5,358		0,035
p-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	1,066	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,218	N.D.		N.D.
Βαννιλικό οξύ	0,279	0,364	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
3-4 Διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Συριγγικό οξύ	N.D.	0,431	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
p-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	2,24	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Καφεϊκό οξύ	0,427	0,374	0,0113	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Σιναπικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ρεσβερατρόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10,164		N.D.
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3,74	N.D.	N.D.		N.D.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ολεανολικό	N.D.	13,61	N.D.	123,55	N.D.	6,05	N.D.		1,535
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ουβαόλη	N.D.	18,41	0,421	N.D.	9,04	N.D.	N.D.		3,95
TOTAL	6,24	36,91	0,56	138,8	17,55	7,34	16,18		5,70

'(%&#&) **21.** Σύσταση εκχυλισμάτων **PS2** σε πολυφαινόλες.

(ng/mg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Βανιλίνη	N.D.	N.D.	N.D.	7,76	1,494	0,153		2,1	0,148
Κινναμωμικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,184		N.D.	0,078
Τυροσόλη	0,145	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	0,009
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	1,618	1,088	N.D.	0,916	7,178	0,387		19,3	0,043
p-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,397	0,22		N.D.	N.D.
Βαννιλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,91	N.D.		1,35	0,018
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
3-4 Διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Συριγγικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,624	N.D.		2,72	N.D.

(ng/mg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ρ-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Καφεϊκό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		6,18	N.D.
Σιναπικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		30,07	N.D.
Ρεσβερατρόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ολεανολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		565,36	1,76
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ουβαόλη	N.D.	39,95	0,656	N.D.	4,684	9,757		N.D.	7,087
TOTAL	1,76	41,04	0,65	8,67	16,28	10,70		627,1	9,15

'(%&#&) **22.** Σύσταση εκχυλισμάτων **PS3** σε πολυφαινόλες.

(ng/mg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Βανιλίνη	N.D.	0,805	0,074	10,658	0,309	0,168	-	1,63	0,151
Κινναμωμικό οξύ	N.D.	3,022	0,0213	N.D.	3,246	0,257	-	6,087	0,345
Τυροσόλη	0,35	N.D.	N.D.	N.D.	0,58	N.D.	-	N.D.	0,0613
ρ-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	6,52	8,305	0,068	0,511	3,119	0,676	-	43,21	0,243
ρ-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	0,317	N.D.	N.D.	2,534	0,088	-	13,5	N.D.
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,11	-	1,95	N.D.

(ng/mg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Βαννιλικό οξύ	N.D.	0,697	N.D.	N.D.	1,078	0,028	-	3,31	0,031
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	N.D.	0,33	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	2,025	N.D.
3-4 Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Συριγγικό οξύ	N.D.	0,41	N.D.	N.D.	0,805	N.D.	-	2,375	0,0679
p-Κουμαρικό οξύ	0,85	2,097	N.D.	N.D.	4,39	0,181	-	N.D.	0,115
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	1,744	N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Καφεϊκό οξύ	N.D.	1,317	N.D.	N.D.	0,929	0,018	-	8,975	N.D.
Σιναπικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Ρεσβερατρόλη	N.D.	0,4825	N.D.	N.D.	N.D.	0,214	-	1,968	0,052
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	1,618	N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	9,656	N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Ολεανολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	12,25	17,629
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	0,733
Ουβαόλη	N.D.	31,43	0,747	N.D.	N.D.	16,318	-	16,2	8,071
TOTAL	7,73	49,21	0,91	11,17	16,99	18,06	-	126,51	27,501

'(%&#&) **23.** Σύσταση εκχυλισμάτων **PS4** σε πολυφαινόλες.

(ng/mg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Βανιλίνη	N.D.	0,662	0,548	9,164	0,605	0,271	0,865	1,581	0,187
Κινναμωμικό οξύ	N.D.	4,293	N.D.	N.D.	1,1	0,372	5,332	9,968	0,357
Τυροσόλη	0,779	N.D.	N.D.	N.D.	1,6	0,076	N.D.	N.D.	0,038

(ng/mg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	9,757	5,75	0,049	0,671	16,081	0,857	21,462	46,572	0,648
p-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	N.D.	0,731	N.D.	N.D.	5,685	N.D.	6,138	10,59	0,21
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	0,618	N.D.	N.D.	N.D.	0,278	N.D.	2,765	N.D.
Βαννιλικό οξύ	N.D.	0,678	N.D.	N.D.	2,52	0,182	2,17	4,084	0,124
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	N.D.	0,26	N.D.	N.D.	0,309	N.D.	1,867	2,475	N.D.
3-4 Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Συριγγικό οξύ	N.D.	0,569	N.D.	N.D.	2,055	0,184	2,512	3,206	0,127
p-Κουμαρικό οξύ	N.D.	1,056	N.D.	N.D.	N.D.	0,106	3,088	5,809	N.D.
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,537	N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Καφεϊκό οξύ	N.D.	0,742	N.D.	N.D.	2,283	0,036	1,362	2,972	N.D.
Σιναπτικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ρεσβερατρόλη	N.D.	0,245	N.D.	N.D.	N.D.	0,06	N.D.	N.D.	0,0625
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5,44	N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,113	N.D.	N.D.	N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ολεανολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	5,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ουβαόλη	N.D.	30,81	N.D.	N.D.	N.D.	5,346	N.D.	N.D.	5,585
TOTAL	10,56	46,43	6,4	9,83	32,24	7,88	41,70	96,01	7,34

'(%&#&) 24. Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο **PS1**

PS1 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Βανιλίνη	12,98	1,60	0,302	0,664		0,114
Κινναμωμικό οξύ	1,84	N.D.	N.D.	N.D.		0,0585
Τυροσόλη	0,268	0,329	0,113	N.D.		0,0078
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	6,306	2,835	0,655	5,358		0,035
p-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	1,066	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	N.D.	0,218	N.D.		N.D.
Βαννιλικό οξύ	0,643	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
3-4 Διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Συριγγικό οξύ	0,431	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
p-Κουμαρικό οξύ	2,24	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Καφεϊκό οξύ	0,8123	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Σιναπτικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ρεσβερατρόλη	N.D.	N.D.	N.D.	10,164		N.D.
Χρυσίνη	N.D.	3,74	N.D.	N.D.		N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.

PS1 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ολεανολικό	137,16	N.D.	6,05	N.D.		1,535
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.
Ουβαόλη	18,831	9,04	N.D.	N.D.		3,95
TOTAL	182,59	17,55	7,34	16,18		5,70

'(%&#&) 25. Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο **PS2**

PS2 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Βανιλίνη	7,76	1,494	0,153		2,1	0,148
Κινναμωμικό οξύ	N.D.	N.D.	0,184		N.D.	0,078
Τυροσόλη	0,145	N.D.	N.D.		N.D.	0,009
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	3,622	7,178	0,387		19,3	0,043
p-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ομοβανιλική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	0,397	0,22		N.D.	N.D.
Βαννιλικό οξύ	N.D.	1,91	N.D.		1,35	0,018
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
3-4 Διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Συριγγικό οξύ	N.D.	0,624	N.D.		2,72	N.D.
p-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Καφεϊκό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		6,18	N.D.
Σιναπικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.		30,07	N.D.

PS2 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Ρεσβερατρόλη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ολεανολικό	N.D.	N.D.	N.D.		565,36	1,76
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.	N.D.
Ουβαόλη	40,606	4,684	9,757		N.D.	7,087
TOTAL	52,13	16,28	10,70		627,1	9,15

'(%&#&) 26. Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο **PS3**

PS3 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Βανιλίνη	11,537	0,309	0,168	-	1,63	0,151
Κινναμωμικό οξύ	3,043	3,246	0,257	-	6,087	0,345
Τυροσόλη	0,35	0,58	N.D.	-	N.D.	0,0613
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	15,404	3,119	0,676	-	43,21	0,243
p-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	0,317	2,534	0,088	-	13,5	N.D.
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Φλωρετικό οξύ	N.D.	N.D.	0,11	-	1,95	N.D.
Βαννιλικό οξύ	0,697	1,078	0,028	-	3,31	0,031
o- Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	0,33	N.D.	N.D.	-	2,025	N.D.

PS3 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
3-4 Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Συριγγικό οξύ	0,41	0,805	N.D.	-	2,375	0,0679
p-Κουμαρικό οξύ	2,947	4,39	0,181	-	N.D.	0,115
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	-	1,744	N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Καφεϊκό οξύ	1,317	0,929	0,018	-	8,975	N.D.
Σιναπτικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Ρεσβερατρόλη	0,4825	N.D.	0,214	-	1,968	0,052
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	N.D.	-	1,618	N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	-	9,656	N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.
Ολεανολικό	N.D.	N.D.	N.D.	-	12,25	17,629
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	0,733
Ουβαόλη	32,177	N.D.	16,318		16,2	8,071
TOTAL	69,02	16,99	18,06		126,51	27,50

'(%&#&) 27. Συνολική ποσότητα πολυφαινολών ανά εκχυλιστικό σχήμα στο **PS4**

PS4 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Βανιλίνη	10,374	0,605	0,271	0,865	1,581	0,187
Κινναμωμικό οξύ	4,293	1,1	0,372	5,332	9,968	0,357
Τυροσόλη	0,779	1,6	0,076	N.D.	N.D.	0,038
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	16,227	16,081	0,857	21,462	46,572	0,648
p-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	0,731	5,685	N.D.	6,138	10,59	0,21

PS4 (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
Ομοβανικική αλκοόλη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Φλωρετικό οξύ	0,618	N.D	0,278	N.D.	2,765	N.D.
Βαννιλικό οξύ	0,678	2,52	0,182	2,17	4,084	0,124
ο-Κουμαρικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Πρωτοκατεχικό οξύ	0,26	0,309	N.D	1,867	2,475	N.D.
3-4 Διυδροξυφαινυλ οξικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D	N.D.	N.D.	N.D.
Συριγγικό οξύ	0,569	2,055	0,184	2,512	3,206	0,127
p-Κουμαρικό οξύ	1,056	N.D.	0,106	3,088	5,809	N.D.
Γαλλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,537	N.D.
Φερουλικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Καφεϊκό οξύ	0,742	2,283	0,036	1,362	2,972	N.D.
Σιναπικό οξύ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ρεσβερατρόλη	0,245	N.D.	0,06	N.D.	N.D.	0,0625
Χρυσίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Επικατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ναριγκενίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5,44	N.D.
Κατεχίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Καμπφερόλη	N.D.	N.D.	0,113	N.D.	N.D.	N.D.
Χλωρογενικό	N.D.	N.D.	N.D	N.D.	N.D.	N.D.
Κερκετίνη	N.D.	N.D.	N.D	N.D.	N.D.	N.D.
Μυρισετίνη	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ολεανολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ουρσολικό	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ουβαόλη	30,81	N.D.	5,346	N.D.	N.D.	5,585
TOTAL	67,382	32,24	7,88	41,709	96,01	7,345

'(%&#&) 28. Σύσταση κολοκυθόσπορων σε πολυφαινόλες.

TOTAL (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
PS1	182,59	17,55	7,34	16,18	-	5,70
PS2	52,13	16,28	10,70	-	627,1	9,15

TOTAL (ng/mg)	Εκχύλιση 1	5	6	7	8	Εκχύλιση 3
PS3	69,02	16,99	18,06	-	126,51	27,50
PS4	67,38	32,24	7,88	41,709	96,01	7,34

Όπως φαίνεται και στους παραπάνω πίνακες τη μεγαλύτερη ποσότητα σε πολυφαινόλες την έχει ο κολοκυθόσπορος PS4. Ανάλογα με τις τρεις διαφορετικές εκχυλιστικές μεθόδους, βλέπουμε ότι σε κάθε είδος κολοκυθόσπορου το κλάσμα με την μεγαλύτερη ποσότητα είναι διαφορετικό. Έτσι στους κολοκυθόσπορους PS1, PS3 και PS4 την μεγαλύτερη ποσότητα την έχει το πρώτο εκχυλιστικό σχήμα, στον κολοκυθόσπορο PS2 το κλάσμα 8.

Αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων

Βασικός σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η αντιαιμοπεταλιακή δράση των διαφόρων εκχυλισμάτων 4 ειδών κολοκυθόσπορου. Για τον σκοπό αυτό υπολογίστηκε το IC50 του κάθε εκχυλίσματος σε τρεις διαφορετικούς συσσωρευτικούς παράγοντες (ADP, TRAP, PAF) ανάλογα με το ύψος συσσώρευσης (A), την κλίση (S) και την περιοχή κάτω από την καμπύλη συσσώρευσης (AUC). Αναλύθηκαν μόνο τα εκχυλίσματα που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

'(%&#&) **29. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **ADP** χρησιμοποιώντας το **A**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1									
PS2	0,26				0,101				
PS3	0,28	0,158	2,32				1,37	0,34	
PS4	0,27								

'(%&#&) **30. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **ADP** χρησιμοποιώντας το **S**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1									
PS2	0,33				0,14				
PS3	0,52	0,25	2,93				1,86	0,88	
PS4									

'(%&#&) **31. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **ADP** χρησιμοποιώντας το **AUC**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1									
PS2	0,35				0,09				
PS3	0,24	0,13	2,14				1,27	0,31	
PS4	0,22								

'(%&#&) **32. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **TRAP** χρησιμοποιώντας το **A**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1					0,24				
PS2	0,057				0,014				
PS3	0,29								
PS4	2,74								

'(%&#&) **33. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **TRAP** χρησιμοποιώντας το **S**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1					0,29				
PS2	0,18				0,016				
PS3	0,32								
PS4									

'(%&#&) **34. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **TRAP** χρησιμοποιώντας το **AUC**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1					0,22				
PS2					0,01				
PS3	0,28								
PS4	2,57								

'(%&#&) **35. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **PAF** χρησιμοποιώντας το **A**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1					0,74	0,27			
PS2	0,067				0,23				
PS3		0,44		0,0015					
PS4									

'(%&#&) 36. IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **PAF** χρησιμοποιώντας το **S**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1					0,74	0,49			
PS2									
PS3									
PS4									

'(%&#&) 37. IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **PAF** χρησιμοποιώντας το **AUC**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1					0,62	0,25			
PS2	0,05				0,21				
PS3				0,015					
PS4									

'(%&#&) 38. IC50 (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **ADP** χρησιμοποιώντας το **A,S** και το **AUC**
- Συγκεντρωτικός πίνακας.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1	A									
	S									
	AUC									
PS2	A	0,26				0,101				
	S	0,33				0,14				
	AUC	0,35				0,09				
PS3	A	0,28	0,158	2,32				1,37	0,34	
	S	0,52	0,25	2,93				1,86	0,88	
	AUC	0,24	0,13	2,14				1,27	0,31	
PS4	A	0,27								
	S									
	AUC	0,22								

'(%&#&) **39. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **TRAP** χρησιμοποιώντας το **A,S** και το **AUC** - Συγκεντρωτικός πίνακας.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1	A					0,24				
	S					0,29				
	AUC					0,22				
PS2	A	0,057				0,014				
	S	0,18				0,016				
	AUC					0,01				
PS3	A	0,29								
	S	0,32								
	AUC	0,28								
PS4	A	2,74								
	S									
	AUC	2,57								

'(%&#&) **40. IC50** (mg εκχυλίσματος/mL) έναντι **PAF** χρησιμοποιώντας το **A,S** και το **AUC** - Συγκεντρωτικός πίνακας.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PS1	A					0,74	0,27			
	S					0,74	0,49			
	AUC					0,62	0,25			
PS2	A	0,067				0,23				
	S									
	AUC	0,05				0,21				
PS3	A		0,44							
	S									
	AUC									
PS4	A									
	S									
	AUC									

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασικός σκοπός της διατριβής αυτής ήταν να εκτιμηθεί η αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων από κολοκύθόσπορους διαφορετικής επεξεργασίας, να προσδιοριστεί η σύσταση σε πολυφαινόλες και φυτοστερόλες των εκχυλισμάτων αυτών και τελικά να γίνει συσχέτιση αυτής της αντιαιμοπεταλιακής δράσης με τη σύσταση.

Ο κολοκυθόσπορος είναι ένα σπόρος που χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο από την αρχαιότητα, ενώ έχει μελετηθεί πολύ τα τελευταία χρόνια τόσο για την διατροφική του αξία όσο και για τις πολλαπλές φαρμακευτικές του ιδιότητες (Harry et al, 1996).

Αρχικά έγινε εκχύλιση τεσσάρων διαφορετικών ειδών κολοκυθόσπορου με τρεις διαφορετικές εκχυλιστικές μεθόδους, και προέκυψαν τριάντα έξι διαφορετικά κλάσματα από τα τέσσερα είδη κολοκυθόσπορου που χρησιμοποιήθηκαν (πλατύς & λεπτός κολοκυθόσπορος, αλατισμένος η όχι). Η ανάκτηση ήταν μεγαλύτερη στο πρώτο εκχυλιστικό σχήμα σε σχέση με το τρίτο, σε όλους τους κολοκυθόσπορους. Συγκεκριμένα η μέση ανάκτηση στο πρώτο σχήμα ήταν 74% ενώ στο τρίτο 45%. Αυτό πιθανώς εξηγείται από την διαδοχική μορφή εκχύλισης του πρώτου σχήματος. Επίσης στην πρώτη εκχύλιση, παρατηρούμε ότι το 2ο κλάσμα, του οποίου διαλύτης είναι η οξινομένη αιθανόλη, έχει μεγαλύτερη ανάκτηση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα.

Δέν υπάρχουν πολλές μελέτες που να έχουν χρησιμοποιήσει τα ίδια εκχυλιστικά σχήματα με την παρούσα μελέτη. Παρόλα αυτά, σε μία μελέτη που έγινε από την Ξανθοπούλου και τους συνεργάτες της, στην οποία το πρώτο και το τρίτο σχήμα εκχύλισης ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράψαμε εδώ, φάνηκε ότι υπήρχε μεγαλύτερη ανάκτηση στο πρώτο εκχυλιστικό σχήμα σε σχέση με το τρίτο, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας. Ακόμα, σ' αυτήν την μελέτη το 3 κλάσμα της πρώτης εκχύλισης (με ακετόνη) φάνηκε να έχει μεγαλύτερη ανάκτηση σε όλα τα είδη κολοκυθόσπορου, ενώ στην παρούσα μελέτη μεγαλύτερη ανάκτηση παρουσίασε το 2 κλάσμα (με οξινομένη αιθανόλη). Αυτό ίσως να οφείλεται στην διαφορά ότι στην μελέτη αυτήν χρησιμοποιήθηκε οξινομένη αιθανόλη ως διαλύτης στο 2 κλάσμα, ενώ στην μελέτη της Ξανθοπούλου και των συνεργατών της χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (Xanthopoulou et al, 2009).

Από τα αρχικά εκχυλίσματα επιλέχθηκαν τα κλάσματα που είχαν ως διαλύτη ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα και χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1) για να αναλυθούν ως προς την σύσταση τους σε σκουαλένιο και φυτοστερόλες. Η επιλογή των συγκεκριμένων κλασμάτων έγινε με βάση τον διαλύτη τους, καθώς οι συγκεκριμένοι διαλύτες είναι μη πολικοί και σε τέτοιου είδους διαλύτες είναι πιο εύκολο να εκχυλιστούν οι φυτοστερόλες καθώς είναι ενώσεις αδιάλυτες στο νερό και σε πολικούς διαλύτες.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι, ο κολοκυθόσπορος PS2 είχε τη μεγαλύτερη ποσότητα συνολικών φυτοστερολών όταν εκχυλίστηκε με την πρώτη εκχυλιστική μέθοδο, και ο κολοκυθόσπορος PS1 είχε τη μεγαλύτερη ποσότητα συνολικών φυτοστερολών (6,775 μg/

g) όταν εκχυλίστηκε με την τρίτη εκχυλιστική μέθοδο. Φαίνεται λοιπόν ότι οι φυτοστερόλες εκχυλίζονται καλύτερα με το πρώτο σχήμα εκχύλισης από ότι με το τρίτο. Αυτό ίσως να συμβαίνει γιατί η εκχύλιση στο πρώτο σχήμα είναι διαδοχική.

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2013, η οποία ερεύνησε την διατροφική αξία και τις ευεργετικές ιδιότητες των ξηρών καρπών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, βρέθηκε ότι η συνολική ποσότητα φυτοστερολών στον κολοκυθόσπορο ήταν 434,4 $\mu\text{g/g}$ (Kalogeropoulos et al, 2013), ενώ σε μία μελέτη που διεξήχθη το 2005, βρέθηκε ίση με 2.650 $\mu\text{g/g}$ (Philips et al, 2005). Παρατηρούμε λοιπόν ότι η συνολική συγκέντρωση φυτοστερολών στον κολοκυθόσπορο ήταν μεγαλύτερη σε αυτές τις μελέτες σε σχέση με την παρούσα μελέτη.

Σχετικά με την αναλογία των φυτοστερολών στα διαφορετικά είδη κολοκυθόσπορου, παρατηρούμε ότι ο κολοκυθόσπορος PS1, έχει το μεγαλύτερο ποσοστό καμπεστερόλης σε σχέση με τα άλλα είδη στην τρίτη εκχυλιστική μέθοδο με ποσοστό 43% των συνολικών φυτοστερολών. Ο κολοκυθόσπορος PS2 υπερτερεί σε στιγμαστερόλη, με ποσοστό 94,2% στην πρώτη εκχυλιστική μέθοδο ενώ ο κολοκυθόσπορος PS3 έχει το μεγαλύτερο ποσοστό β -σιτοστερόλης (89,5%) όταν εκχυλίζεται με την πρώτη εκχυλιστική μέθοδο.

Στον κολοκυθόσπορο PS1 και PS2 υπερτερούν η στιγμαστερόλη στην πρώτη εκχυλιστική μέθοδο ενώ στην τρίτη η β -σιτοστερόλη. Στον κολοκυθόσπορο PS3 και PS4 υπερτερούν η στιγμαστερόλη στην πρώτη εκχυλιστική μέθοδο ενώ στην τρίτη, για τον κολοκυθόσπορο PS3, η β -σιτοστερόλη. Ο κολοκυθόσπορος PS4 δέν μπόρεσε λόγω σφάλματος να αναλυθεί στην τρίτη εκχυλιστική μέθοδο. Αυτή η ομοιότητα και παράλληλα διαφορά των κολοκυθόσπορων ίσως να οφείλεται στο είδος τους, αφού οι κολοκυθόσποροι PS1 και PS2 ήταν λεπτοί, ενώ οι κολοκυθόσποροι PS3 και PS4 πλατείς. Με την πρώτη εκχυλιστική μέθοδο, η καμπεστερόλη ήταν περισσότερη στον κολοκυθόσπορο PS4 (16,9%), η στιγμαστερόλη στον κολοκυθόσπορο PS2 (94,2%) και η β -σιτοστερόλη στον κολοκυθόσπορο PS3 (89,5%). Με τη δεύτερη εκχυλιστική μέθοδο, η καμπεστερόλη ήταν περισσότερη στον κολοκυθόσπορο PS1 (43%), η στιγμαστερόλη στον κολοκυθόσπορο PS2 (8,3%) και η β -σιτοστερόλη στον κολοκυθόσπορο PS3 (84,1%).

Συνολικά, εάν συγκρίνουμε τους κολοκυθόσπορους με βάση το είδος τους (λεπτός-πλατύς), παρατηρούμε ότι η στιγμαστερόλη και η καμπεστερόλη έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στον λεπτό κολοκυθόσπορο. Η αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα στιγμαστερόλης στον λεπτό κολοκυθόσπορο οδηγεί σε μεγαλύτερη συνολική συγκέντρωση φυτοστερολών σε αυτό το είδος κολοκυθόσπορου (Πίνακας 41). Επιπλέον, στους μή αλατισμένους κολοκυθόσπορους βλέπουμε αυξημένη ποσότητα καμπεστερόλης και β -σιτοστερόλης σε σύγκριση με τους αλατισμένους, ενώ η συνολική συγκέντρωση φυτοστερολών είναι ίδια και ανεξάρτητη από το αλάτισμα (Πίνακας 42). Βασική φυτοστερόλη που ανιχνεύθηκε ήταν η β -σιτοστερόλη.

Σχετικά με την συγκέντρωση του σκουαλενίου, φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε όλα τα είδη κολοκυθόσπορου όταν αυτά εκχυλίζονται με την τρίτη εκχυλιστική μέθοδο. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σκουαλενίου παρατηρείται στον κολοκυθόσπορο PS3 στην τρίτη εκχυλιστική μέθοδο και είναι ίση με 603,25 $\mu\text{g/g}$, η οποία συνάδει με τη συγκέντρωση που αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες όπως αυτή του Καλογερόπουλου και των συνεργατών του (Kalogeropoulos et al, 2013), όπου η συγκέντρωση σκουαλενίου είναι $716 \pm 26 \mu\text{g/g}$. Επίσης παρόμοια συγκέντρωση (890 $\mu\text{g/g}$) φαίνεται και από την μελέτη του Ryan και των συνεργατών του (Ryan et al, 2007). Για το σκουαλένιο, δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ λεπτού και πλατύ κολοκυθόσπορου. Παρόλα αυτά στην σύγκριση μεταξύ αλατισμένου και μή, φάνηκε ότι στον μή αλατισμένο κολοκυθόσπορο η ποσότητα σκουαλενίου ήταν μεγαλύτερη (Πίνακας 44 και 45).

Πίνακας 41. Σύγκριση διαφορετικών ειδών κολοκυθόσπορου (λεπτός-πλατύς) ως προς το σκουαλένιο και τις φυτοστερόλες

	PS_type	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Συγκέντρωση σκουαλενίου ($\mu\text{g/g}$)	Λεπτός	2	232,65	94,54	66,85
	Πλατύς	2	253,93	68,14	48,182
Συγκέντρωση σκουαλενίου ($\mu\text{g/g}$)	Λεπτός	2	322,6	135,48	95,80
	Πλατύς	1	603,25	.	.
Συγκέντρωση καμπτεστερόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	0,485	0,46	0,326
	Πλατύς	2	0,285	0,34	0,242
Συγκέντρωση καμπτεστερόλης (μέθοδος Folch)	Λεπτός	2	1,54	1,95	1,38
	Πλατύς	1	0,39	.	.
Συγκέντρωση σιγμαστερόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	16,25	1,767	1,25
	Πλατύς	2	0,18	0,162	0,1149
Συγκέντρωση σιγμαστερόλης (μέθοδος Folch)	Λεπτός	2	0,348	0,281	0,199
	Πλατύς	1	0,255	.	.
Συγκέντρωση β-σιτοστερόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	1,16	0,326	0,231
	Πλατύς	2	1,61	0,967	0,684
Συγκέντρωση β-σιτοστερόλης (μέθοδος Folch)	Λεπτός	2	2,392	1,295	0,916

	Πλατύς	1	3,424	.	.
--	--------	---	-------	---	---

'(%&#&#) 42. Σύγκριση κολοκυθόσπορων διαφορετικής επεξεργασίας (αλατισμένος- μή αλατισμένος) ως προς το σκουαλένιο και τις φυτοστερόλες

	Salted	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Συγκέντρωση σκουαλενίου (μg/g)	χωρίς	2	300,807	1,849	1,307
	με αλάτι	2	185,775	28,248	19,975
Συγκέντρωση σκουαλενίου (μg/g)	χωρίς	1	418,40	.	.
	με αλάτι	2	415,025	266,190	188,225
Συγκέντρωση καμπεστερόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	χωρίς	2	0,669	0,201	0,142
	με αλάτι	2	0,101	0,082	0,058
Συγκέντρωση καμπεστερόλης (μέθοδος Folch)	χωρίς	1	2,92	.	.
	με αλάτι	2	0,275	0,162	0,115
Συγκέντρωση στιγμαστερόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	χωρίς	2	7,647	10,398	7,352
	με αλάτι	2	8,782	12,328	8,717
Συγκέντρωση στιγμαστερόλης (μέθοδος Folch)	χωρίς	1	0,547	.	.
	με αλάτι	2	0,202	0,074	0,053
Συγκέντρωση β-σιτοστερόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	χωρίς	2	1,842	0,637	0,451
	με αλάτι	2	0,927	0,002	0,002
Συγκέντρωση β-σιτοστερόλης (μέθοδος Folch)	χωρίς	1	3,308	.	.
	με αλάτι	2	2,45	1,377	0,974

Όλα τα κλάσματα που συγκεντρώθηκαν από τις εκχυλίσεις, αναλύθηκαν και ως προς την σύσταση τους σε πολυφαινόλες. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο κολοκυθόσπορος PS2 στο εκχύλισμα 8 είχε τη μεγαλύτερη συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών, ίση με 627,1 ηg/mgτο οποίο προέκυψε από εκχύλιση με αιθανόλη 70%. Αμέσως μετά ακολουθεί ο κολοκυθόσπορος PS1 στο υδατικό εκχύλισμα 1 με συγκέντρωση 182,59 ηg/mg.

Παρατηρούμε επίσης, ότι το σύνολο των πολυφαινολών σε κάθε κολοκυθόσπορο είναι μεγαλύτερο όταν αυτοί εκχυλίζονται με την πρώτη μέθοδο σε σχέση με την τρίτη. Αυτό ίσως να συμβαίνει γιατί στο πρώτο εκχυλιστικό σχήμα έχουμε διαδοχικές εκχυλίσσεις με διαφορετικούς διαλύτες (διαφορετικής πολικότητας). Την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών στην πρώτη εκχυλιστική μέθοδο παρουσιάζει ο κολοκυθόσπορος PS1 (82,846 ng/mg). Σχετικά με τις επιμέρους πολυφαινόλες παρατηρούμε ότι στο 1 κλάσμα (με οξινισμένο νερό) τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα είδη κολοκυθόσπορων είχαν η τυροσόλη (0,378 ng/mg) και το p-βενζοϊκό οξύ (5,21 ng/mg), στο 2 κλάσμα (με οξινισμένη αιθανόλη) το p-βενζοϊκό οξύ (4,228 ng/mg) και η ουβαόλη (30,15 ng/mg), στο 4 κλάσμα (οξικός αιθυλεστέρας) η βανιλίνη (9,7868 ng/mg) και το p-βενζοϊκό οξύ (7,303 ng/mg), στο 6 κλάσμα (αιθανόλη 100%) η βανιλίνη (0,224 ng/mg), το p-βενζοϊκό οξύ (0,644 ng/mg) και το φλωρετικό οξύ (0,2065 ng/mg) και στο κλάσμα 9 (χλωροφόρμιο:μεθανόλη) η βανιλίνη (0,15 ng/mg), το κινναμωνικό οξύ (0,2096 ng/mg), η τυροσόλη (0,029 ng/mg), το p-βενζοϊκό οξύ (0,242 ng/mg) και η ουβαόλη (6,173 ng/mg). Τα αποτελέσματα αυτά, μοιάζουν πολύ με τα αποτελέσματα της μελέτης του Καλογερόπουλου και των συνεργατών του στην οποία ανιχνεύθηκαν παρόμοιες πολυφαινόλες στον κολοκυθόσπορο, με το p-βενζοϊκό οξύ, την τυροσόλη και το πρωτοκατεχικό οξύ να κατέχουν τις μεγαλύτερες ποσότητες (Kalogeropoulos et al, 2013).

Μετά τη σύγκριση των κολοκυθόσπορων ανάλογα με το είδος τους, δέν φάνηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η συνολική ποσότητα πολυφαινολών ήταν ελάχιστα υψηλότερη στον λεπτό κολοκυθόσπορο καθώς και η ουβαόλη ενώ η τυροσόλη, το πρωτοκατεχικό και το p-βενζοϊκό οξύ φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στον πλατύ κολοκυθόσπορο. Μεγαλύτερη φάνηκε να είναι η ποσότητα ολικών πολυφαινολών στον αλατισμένο κολοκυθόσπορο σε σύγκριση με τον μή αλατισμένο, αλλά και η συγκέντρωση βανιλίνης και τυροσόλης. Αντιθέτως, η ουβαόλη ήταν ελαφρώς περισσότερη στον αλατισμένο κολοκυθόσπορο. Σχετικά με το ολεανολικό οξύ, αυτό ανιχνεύθηκε μόνο στον μή αλατισμένο κολοκυθόσπορο (Πίνακας 43 και 44).

Πίνακας 43. Σύγκριση διαφορετικών ειδών κολοκυθόσπορου (λεπτός-πλατύς) ως προς τις συνολικές και τις επιμέρους πολυφαινόλες

	PS_type	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ολικές πολυφαινόλες (μg/g PS)	Λεπτός	2	17,891	0,973	0,688
	Πλατύς	2	2,074	1,472	1,041
Συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	17345,32	3645,654	2577,867
	Πλατύς	2	15301,65	127,594	90,223
Συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών (μέθοδος Folch)	Λεπτός	2	36,032	17,892	12,652
	Πλατύς	2	103,845	78,719	55,663

Συνολική συγκέντρωση τυροσόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	23,417	12,486	8,829
	Πλατύς	2	63,578	32,792	23,188
Συνολική συγκέντρωση p-βενζοϊκού οξέος (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	912,425	500,655	354,017
	Πλατύς	2	2941,41	256,275	181,214
Συνολική συγκέντρωση πρωτοκατεχικού οξέος (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	0	.	.	.
	Πλατύς	2	83,992	12,908	9,128
Συνολική συγκέντρωση ουβαόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Λεπτός	2	11424,595	3697,69	2614,663
	Πλατύς	2	8967,494	135,852	96,062

'(%&#&) 44. Σύγκριση κολοκυθόσπορων διαφορετικής επεξεργασίας (αλατισμένος- μη αλατισμένος) ως προς τις συνολικές και τις επιμέρους πολυφαινόλες

	Salted	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ολικές πολυφαινόλες (μg/g PS)	Χωρίς	2	10,159	9,961	7,044
	Με αλάτι	2	9,806	12,407	8,773
Συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Χωρίς	2	17657,535	3204,117	2265,653
	Με αλάτι	2	14989,445	313,942	221,991
Συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών (μέθοδος Folch)	Χωρίς	2	35,781	17,537	12,401
	Με αλάτι	2	104,096	78,364	55,412
Συνολική συγκέντρωση βανιλίνης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Χωρίς	2	480,129	85,233	60,269
	Με αλάτι	2	294,608	197,152	139,408
Συνολική συγκέντρωση τυροσόλης (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Χωρίς	2	59,506	38,55	27,26
	Με αλάτι	2	27,489	18,244	12,901

Συνολική συγκέντρωση p-κουμαρικού οξέος (1η εκχυλιστική μέθοδος)	Χωρίς	2	12,32	17,423	12,32
	Με αλάτι	1	689,822	.	.
Συνολική συγκέντρωση ολεανολικού οξέος (1η εκχυλιστική μέθοδος)	χωρίς	1	7742,14	.	.
	Με αλάτι	0	.	.	.

Από τα βιολογικά πειράματα σε απομωνομένα ανθρώπινα αιμοπετάλια φάνηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα των κολοκυθόσπορων παρουσιάζουν ανασταλτική δράση κατά της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Οι τιμές IC₅₀ κυμάνθηκαν από 0,01 mg/mL που ήταν η χαμηλότερη τιμή στο εκχύλισμα 5 (με διαλύτη νερό) του κολοκυθόσπορου PS2 για το ADP, έως 2,93 mg/mL που ήταν η μεγαλύτερη τιμή στον κολοκυθόσπορο PS3 στο εκχύλισμα 3 (με διαλύτη ακετόνη) για το ADP. Όπως έχουμε αναφέρει και προηγουμένως, όσο πιο μικρή η τιμή του IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αναστολή που προκαλεί το εκχύλισμα. Άρα το κλάσμα PS2 5 έχει και την ισχυρότερη αντιαιμοπεταλιακή δράση.

Στη συνέχεια, έγινε μία προσπάθεια να συσχετιστούν οι τιμές IC₅₀ (με βάση το A) που βρέθηκαν σε κάθε κλάσμα για κάθε συσσωρευτικό παράγοντα (ADP, TRAP, PAF), χωρίς να μπορεί να αποδειχθεί κάποια συσχέτιση. Αυτό σημαίνει ότι η ανασταλτική δράση που προκαλεί κάθε εκχύλισμα δεν είναι όμοια για κάθε συσσωρευτικό παράγοντα. Επίσης, καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της σύστασης των κολοκυθόσπορων σε πολυφαινόλες και φυτοστερόλες με την ανασταλτική τους δράση, με εξαίρεση το κινναμωνικό οξύ. Βρέθηκε λοιπόν ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση ενός εκχυλίσματος σε κινναμωνικό οξύ τόσο μικρότερο είναι το IC₅₀ (με βάση το A) του κλάσματος στο ADP. Ίσως λοιπόν το κινναμωνικό οξύ να είναι ένα από τα συστατικά του κολοκυθόσπορου που του προσδίδει την αντιαιμοπεταλιακή του δράση.

Το συμπέρασμα λοιπόν είναι ότι ο κολοκυθόσπορος είναι ένας πλούσιος σε θρεπτικά συστατικά σπόρος ο οποίος φαίνεται να έχει αντιαιμοπεταλιακή δράση, γεγονός που τον καθιστά σημαντικό τόσο διατροφικά όσο και φαρμακευτικά, καθώς η κατανάλωση του ή η χρήση του ως συμπλήρωμα διατροφής θα μπορούσε να παρέχει σημαντικά οφέλη στον άνθρωπο. Οι φαινολικές του ενώσεις, οι φυτοστερόλες του αλλά και τα υπόλοιπα συστατικά του, κάνουν τον κολοκυθόσπορο έναν πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης. Χρειάζεται βέβαια περαιτέρω έρευνα, έτσι ώστε να εξακριβωθούν τα συστατικά του τα οποία του προσδίδουν την αντιαιμοπεταλιακή του δράση, αλλά και ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου αυτό επιτυγχάνεται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Saavedra, M. J. et al. "Evaluation Of The Potential Of Squash Pumpkin By-Products (Seeds And Shell) As Sources Of Antioxidant And Bioactive Compounds". *Journal of Food Science and Technology* 52.2 (2013): 1008-1015.
- Durante, Miriana, Marcello Lenucci, and Giovanni Mita. "Supercritical Carbon Dioxide Extraction Of Carotenoids From Pumpkin (*Cucurbita* Spp.): A Review". *IJMS* 15.4 (2014): 6725-6740.
- Harry S Paris. *Summer Squash: History, Diversity, and Distribution*. Hort Technology (1996); 6(1).
- Caili F, Huan S, Quanhong L. A Review on Pharmacological Activities and Utilization Technologies of Pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition* (2006); 61: 73–80.
- Khalaf, Eman M and Manish N Raizada. "Taxonomic And Functional Diversity Of Cultured Seed Associated Microbes Of The Cucurbit Family". *BMC Microbiology* 16.1 (2016): n. pag.
- Gong, Li et al. "Genetic Relationships And Evolution In *Cucurbita* Pepo (Pumpkin, Squash, Gourd) As Revealed By Simple Sequence Repeat Polymorphisms". *Theoretical and Applied Genetics* 124.5 (2011): 875-891.
- Jacks, TJ, TP Hensarling, and LY Yatsu. "Cucurbit Seeds: I. Characterizations And Uses Of Oils And Proteins. A Review". *Economic Botany* 26.2 (1972): 135-141.
- Barakat, Lamiaa and Rasha Mahmoud. "The Antiatherogenic, Renal Protective And Immunomodulatory Effects Of Purslane, Pumpkin And Flax Seeds On Hypercholesterolemic Rats". *North American Journal of Medical Sciences* (2011): 411-417.
- Kalogeropoulos, Nick et al. "Nutritional Evaluation And Health Promoting Activities Of Nuts And Seeds Cultivated In Greece". *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64.6 (2013): 757-767.
- Stevenson DG, Eller FJ, Wang L, Jane J, Wang T ,Inglett GE. Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. *J Agric Food Chem* (2007); 55, 4005–4013.
- Kamel BS, deMan JM, Blackman B. Nutritional, fatty acid and oil characteristics of different agricultural seeds. *J Fd Technology* (1982); 17,263-269.
- Bardaa, Sana et al. "Oil From Pumpkin (*Cucurbita* Pepo L.) Seeds: Evaluation Of Its Functional Properties On Wound Healing In Rats". *Lipids Health Dis* 15.1 (2016): n. pag.
- Carolina Medici Veronezi, Neuza Jorge. Bioactive Compounds in Lipid Fractions of Pumpkin (*Cucurbita* sp) Seeds for Use in Food. *Journal of Food Science* (2012); Vol. 77, Nr. 6.

- Rocco Damiano, Tommaso Cai, Paolo Fornara, Corrado Antonio Franzese, Rosario Leonardi, Vincenzo Mirone. The role of Cucurbita pepo in the management of patients affected by lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia: A narrative review. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* (2016); 88, 2.
- Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Garoui El M, Jaber H, Makni J, Boudawara T, Zeghal N. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in α -3 and α -6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008); 3714–3720.
- El Haouari, Mohammed and Juan A. Rosado. "Medicinal Plants With Antiplatelet Activity". *Phytother. Res.* 30.7 (2016): 1059-1071.
- Prociuk, M.A. et al. "Cholesterol-Induced Stimulation Of Platelet Aggregation Is Prevented By A Hempseed-Enriched Diet". This Article Is One Of A Selection Of Papers Published In The Special Issue Bridging The Gap: Where Progress In Cardiovascular And Neurophysiologic Research Meet.". *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86.4 (2008): 153-159.
- Heber, Stefan and Ivo Volf. "Effects Of Physical (In)Activity On Platelet Function". *BioMed Research International* 2015 (2015): 1-11.
- Kral, Julia Barbara et al. "Platelet Interaction With Innate Immune Cells". *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 43.2 (2016): 78-88.
- Mezouar, Soraya et al. "Role Of Platelets In Cancer And Cancer-Associated Thrombosis: Experimental And Clinical Evidences". *Thrombosis Research* 139 (2016): 65-76.
- Varon, D. and E. Shai. "Platelets And Their Microparticles As Key Players In Pathophysiological Responses". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13 (2015): S40-S46.
- Behari, Madhuri and Mohita Shrivastava. "Role Of Platelets In Neurodegenerative Diseases: A Universal Pathophysiology". *International Journal of Neuroscience* 123.5 (2013): 287-299.
- Kniewallner, Kathrin et al. "Platelets In The Alzheimer'S Disease Brain: Do They Play A Role In Cerebral Amyloid Angiopathy?". *CNR* 12.1 (2015): 4-14.
- Chong, Mary F.-F., Rory Macdonald, and Julie A. Lovegrove. "Fruit Polyphenols And CVD Risk: A Review Of Human Intervention Studies". *British Journal of Nutrition* 104.S3 (2010): S28-S39.
- Duhamel, Todd A et al. "Targeting Platelets For Prevention And Treatment Of Cardiovascular Disease". *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11.12 (2007): 1523-1533.
- Schumacher, Edit et al. "Thrombosis Preventive Potential Of Chicory Coffee Consumption: A Clinical Study". *Phytotherapy Research* 25.5 (2011): 744-748.

- Vilahur, Gemma and Lina Badimon. "Antiplatelet Properties Of Natural Products". *Vascular Pharmacology* 59.3-4 (2013): 67-75.
- Xanthopoulou, Marianna N. et al. "Antioxidant And Lipoxygenase Inhibitory Activities Of Pumpkin Seed Extracts". *Food Research International* 42.5-6 (2009): 641-646.
- Phillips, Katherine M., David M. Ruggio, and Mehdi Ashraf-Khorassani. "Phytosterol Composition Of Nuts And Seeds Commonly Consumed In The United States". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53.24 (2005): 9436-9445.
- Ryan, E. et al. "Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content And Fatty Acid Profile Of Selected Seeds, Grains, And Legumes". *Plant Foods for Human Nutrition* 62.3 (2007): 85-91.