



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πτυχιακή εργασία

**«Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποιίας στη
συσσώρευση αιμοπεταλίων»**

ΜΠΟΥΛΟΥΓΟΥΡΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ (Α.Μ.: 213053)

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Φραγκοπούλου Ελισάβετ

Αθήνα, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο

Νομικός Τζώρτζης

Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Μπουλουγούρη Βασιλική,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι η 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.

*«Η ζωή είναι σύντομη..
Η τέχνη απέραντη..
Η ευκαιρία στιγμιαία..
Και το πείραμα αθέβαιο..»*

Ουμπέρτο Έκο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας ήταν πολλά τα άτομα που αποτέλεσαν έμπνευση και με βοήθησαν στην ομαλή πορεία και έκβασή της.

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Φραγκοπούλου Ελισάβετ, για την ανάθεση ενός θέματος με πολύ ενδιαφέρον και προοπτικές, για τις οδηγίες και τις πολύτιμες συμβουλές της, καθώς και την άψογη καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της διαμόρφωσης και ολοκλήρωσης της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Χολέβα, για τη σημαντική της συμβολή στην άρτια διεξαγωγή των πειραμάτων, για τις γνώσεις που μου προσέφερε, τις συμβουλές της, αλλά και την προθυμία της να μου λύσει κάθε απορία ή πρόβλημα οποιαδήποτε στιγμή τη χρειαζόμουν.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω πολύ τα άτομα που δέχτηκαν να είναι εθελοντές στο πείραμά μας.

Τις πιο θερμές ευχαριστίες μου, αξίζουν η οικογένειά μου και οι φίλοι μου που ήταν κοντά μου και με στήριζαν όλη αυτή την απαιτητική χρονιά δείχνοντας αμέριστο ενδιαφέρον, υπομονή, αγάπη και εμπιστοσύνη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	
1.1 Εισαγωγή	15
Καρδιαγγειακό σύστημα	15
Γενικά στοιχεία για τα αιμοπετάλια.....	17
1.2 Ο φυσιολογικός ρόλος των αιμοπεταλίων	18
1.2.1 Αιμόσταση.....	18
Δημιουργία αιμοπεταλιακού βύσματος (Πρωτογενής αιμόσταση).....	18
Πήξη αίματος (Δευτερογενής αιμόσταση).....	20
Φυσιολογικοί μηχανισμοί που αντισταθούν στην πήξη στον ανθρώπινο οργανισμό	21
Ινωδολυτικό σύστημα: Ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης θρόμβου	23
1.2.2 Φλεγμονή.....	24
1.3 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις	25
1.3.1 Παράγοντες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων	25
vWF	26
Κολλαγόνο	27
Ινωδογόνο.....	27
Παράγοντας III ή TF	27
PAF.....	28
Χημικοί παράγοντες των κοκκίων των αιμοπεταλίων	29
1.3.2 Αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα.....	31
1.4 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση και σε άλλες νοσηρές καταστάσεις.....	32
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων σε παθολογικές καταστάσεις.....	32
Υποθέσεις προαγωγής αθηροσκλήρωσης	32
Περιγραφή της αθηροσκλήρωσης	33
Εμπλοκή αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση	38
1.5 Επίδραση της διατροφής στα αιμοπετάλια και κατ' επέκταση στην	

αθηροσκλήρωση	42
Ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA).....	42
Ελαιόλαδο.....	43
Κρεμμύδι και σκόρδο (ajoene).....	43
Τομάτα.....	44
Μανιτάρια	44
Κακάο.....	45
Ποτά-Αλκοόλ	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΩΦΕΛΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΚΑΤΆΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	
2.1 Εισαγωγή.....	46
Επιδημιολογικά δεδομένα κατανάλωσης αλκοόλ.....	46
Μεταβολισμός της αιθανόλης	47
2.2 Η θέση του αλκοόλ στα καρδιαγγειακά νοσήματα.....	49
Επιδημιολογικές μελέτες.....	49
Επίδραση της αιθανόλης στο βιοχημικό προφίλ	50
Προϋποθέσεις εκδήλωσης ευεργετικών δράσεων	53
2.3 Υπεροχή κρασιού έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών.....	55
Γαλλικό παράδοξο	55
Μελέτες σύγκρισης κρασιού με άλλα ποτά.....	56
2.4 Ο προστατευτικός ρόλος των συστατικών του κρασιού σε επίπεδο μηχανισμού	58
Συστατικά του κρασιού	58
Λεπτομερής περιγραφή των φαινολικών συστατικών του κρασιού.....	60
Επίδραση των μικρο-συστατικών του κρασιού στις βιολογικές λειτουργίες.....	64
2.5 Αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες κρασιού-πολυφαινολών	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	
3.1 Εισαγωγή	72
3.2 Είδη αξιοποιήσιμων παραπροϊόντων και συστατικά τους	73
Σπόροι.....	73
Φλούδες.....	74
Grape pomace (Στέμφυλα-Μίγμα από σπόρους και φλούδες).....	74
Τσάμπουρα (Κοτσάνια)	75
3.3 Οι ευεργετικές ιδιότητες των παραπροϊόντων	79
Αντιοξειδωτική δράση	80
Αντιαιμοπεταλιακή δράση	81

3.4 Αξιοποίηση παραπροϊόντων.....	86
Λιπάσματα και ζωοτροφές.....	86
Βιομηχανίες τροφίμων	87
Βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών.....	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ	89
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	90
5.1 Εκχυλίσματα παραπροϊόντων οينوποίησης.....	90
Δείγματα.....	90
Περιγραφή μεθόδων εκχύλισης.....	90
5.2 Βιολογικά δείγματα	93
5.2.1 Πρωτόκολλο παραλαβής αίματος	93
Χαρακτηριστικά εθελοντών	93
Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας	94
Υπολογισμός αριθμού αιμοπεταλίων	94
5.2.2 Προετοιμασία συσσωρευτικών παραγόντων.....	95
PAF.....	95
ADP	95
TRAP	95
5.3 Έλεγχος επίδρασης εκχυλισμάτων στις βιολογικές δράσεις των αιμοπεταλίων..	96
Μέτρηση συσσώρευσης αιμοπεταλίων με δράση διάφορων αγωνιστών	96
Προσδιορισμός %αναστολής αιμοπεταλίων μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
6.1 Απόδοση εκχυλίσεων.....	99
6.2 Μάζες εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα	99
6.3 Αντιαιμοπεταλιακή δράση Cabernet Sauvignon	101
6.4 Αντιαιμοπεταλιακή δράση Syrah.....	121
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	138

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες που συμβαίνουν στον οργανισμό, επηρεάζοντας αισθητά τη λειτουργία των αγγείων, έχοντας άλλοτε προστατευτικά και άλλοτε δυσμενή αποτελέσματα. Αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ της αιμόστασης, της πήξης και της φλεγμονής. Η ενεργή συμμετοχή τους σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης είναι ο κυριότερος λόγος που έχουν γίνει αντικείμενο ενδιαφέροντος πολλών μελετών. Προηγούμενες μελέτες μας έχουν πιστοποιήσει ότι το κρασί περιέχει αναστολείς του PAF με αντι-αιμοπεταλιακή δράση. Τα παραπροϊόντα οиноποίησης, κυρίως οι σπόροι και οι φλούδες, αποτελούν μια φθηνή και κατά βάση ανεκμετάλλευτη πηγή ανάλογων συστατικών με οφέλη για τον οργανισμό.

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής πτυχιακής εργασίας είναι ο προσδιορισμός της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οиноποίησης. Χρησιμοποιήθηκαν παραπροϊόντα οиноποίησης από δύο ποικιλίες σταφυλιού, Cabernet Sauvignon και Syrah. Για την εκχύλιση των παραπροϊόντων είχαν χρησιμοποιηθεί τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι (Bligh-Dyer, αιθανόλη 80%, εξάνιο, νερό). Εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν *in vitro* τη συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP και TRAP.

Ισχυρότερη και δόσοεξαρτώμενη αναστολή παρουσίασαν τα εκχυλίσματα αιθανόλης, με τις τιμές των IC_{50} να κυμαίνονται μεταξύ 70-200μg παραπροϊόντων, ανάλογα την ποικιλία σταφυλιού και ακολούθησαν τα εκχυλίσματα της λιποειδικής φάσης της Bligh-Dyer με IC_{50} από 200-300μg παραπροϊόντων. Τα εκχυλίσματα εξανίου (2-240μg) προκάλεσαν αναστολή που ωστόσο δεν έφτασε μέχρι το 50%, ενώ τα υδατικά (0,1-170μg), προκάλεσαν ενεργοποίηση.

Τα ευρήματα της μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα αιθανόλης των παραπροϊόντων οиноποίησης θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή για την παραλαβή συστατικών με αντι-αιμοπεταλιακή δράση για τον εμπλουτισμό τροφίμων και τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής.

Λέξεις κλειδιά: Αιμοπετάλια, αθηροσκλήρωση, κρασί, παραπροϊόντα οиноποίησης, αντι-αιμοπεταλιακή δράση

ABSTRACT

Platelets play a crucial role in physiological and pathological processes that occur in the body, affecting significantly vessels function and having not only protective but also adverse effects. Platelets have a key role in linking hemostasis, coagulation and inflammation. They have been the subject of many studies because of their active role in all the stages of atherosclerosis. Our previous studies have confirmed that wine contains PAF inhibitors with anti-platelet activity. Wine by-products, especially seeds and skins, consist a cheap and unexploited source of wine-like compounds offering benefits to the human body.

The aim of the present Thesis is to determine the anti-platelet activity of wine by-products extracts.

Wine by-products from two grape varieties, Cabernet Sauvignon and Syrah were used and four different extraction methods (Bligh-Dyer, 80% ethanol, hexane, water) were performed.

Their in vitro ability to inhibit human platelet aggregation against three aggregative factors (PAF, ADP, TRAP) was tested.

More potent and dose-dependent inhibition of platelet aggregation was showed by ethanol extracts, with IC_{50} values ranging between 70-200 μ g winery by-products, depending on the grape variety, followed by the extracts of the Bligh-Dyer lipid phase with IC_{50} values ranging between 200-300 μ g. The hexane extracts (2-240 μ g) revealed inhibition, which however did not reach up to 50%, while the aqueous extracts (0,1-170 μ g) favoured platelet aggregation.

Findings of the study lead to the conclusion that ethanol extracts of wine by-products could be a source of anti-platelet-derived components for food enrichment and creation of nutritional supplements.

Keywords: Platelets, atherosclerosis, wine, wine by-products, antiplatelet action

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1.: Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση υποδοχέων	91
Εικ.2.: Σταδιακή εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας	36
Εικ.3.: Ο ρόλος των φωσφολιπιδικών μεσολαβητών στην αθηροσκλήρωση	38
Εικ.4.: Ποσοστά κατανάλωσης αλκοόλ με τη μορφή μπύρας, κρασιού, βαριά οινοπνευματωδών και άλλων σε Αφρική, Αμερική, Ευρώπη και σε παγκόσμιο επίπεδο το 2010.....	47
Εικ.5.: Προϊόντα μεταβολισμού αιθανόλης	49
Εικ.6.: Σκελετός φλαβονολών	60
Εικ.7.: Σκελετός μονομερών και πολυμερών φλαβονολών	61
Εικ.8.: Σκελετός προανθοκυανιδινών	61
Εικ.9.: Σκελετός ανθοκυανινών	61
Εικ.10.: Σκελετός υδροξυκινναμωμικών οξέων	62
Εικ.11.: Σκελετός υδροξυβενζοϊκών οξέων	63
Εικ.12.: Σκελετός στιλβενίων	63
Εικ.13.: Ευνοϊκές επιδράσεις των συστατικών του κρασιού για την παρεμπόδιση της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας	66
Εικ.14.: Grape pomace	75
Εικ.15.: Σταφύλια ποικιλίας Cabernet Sauvignon και Syrah	90
Εικ.16.: Μορφή καμπυλών συσσώρευσης αιμοπεταλίων	102
Εικ.17.: Απεικόνιση ύψους συσσώρευσης και AUC	103
Εικ.18.: Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων.....	126

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1.: Συνδυασμοί υποδοχέων αιμοπεταλίων – προσδετών και δράσεις που προάγουν	26
Πίν.2.: Φαινολικά οξέα παραπροϊόντων	78
Πίν.3.: Φλαβονόλες και στιλβένια παραπροϊόντων.....	79
Πίν.4.: Δράσεις παραπροϊόντων οينوποίησης-πολυφαινολών στα αιμοπετάλια	84
Πίν.5.: Μάζες εκχυλισμάτων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon ανά μέθοδο εκχύλισης	93
Πίν.6.: Μάζες εκχυλισμάτων της ποικιλίας Syrah ανά μέθοδο εκχύλισης	99
Πίν.7.: Μάζες εκχυλισμάτων Cabernet Sauvignon που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα	91
Πίν.8.: Μάζες εκχυλισμάτων Syrah που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα	101
Πίν.9.: IC ₅₀ για εκχυλίσματα (χλωροφορμίου, αιθανόλης, εξανίου) της ποικιλίας Cabernet Sauvignon έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP και TRAP.....	120
Πίν.10.: IC ₅₀ για εκχυλίσματα (χλωροφορμίου, αιθανόλης, εξανίου) της ποικιλίας Syrah έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP και TRAP.	130

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	Adenosine diphosphate, Διφωσφορική αδενοσίνη
ALA	α -Linolenic acid, α -λινολενικό οξύ
APC	Activated protein C, ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
Apo	Apolipoprotein, Απολιποπρωτεΐνη
ATP	Adenosine triphosphate, Τριφωσφορική αδενοσίνη
AT	Antithrombin, Αντιθρομβίνη
BAC	Blood alcohol concentration, Συγκέντρωση αλκοόλ στο αίμα
BSA	Bovine serum albumin, Αλβουμίνη ορού βόειος
Ca ²⁺	Calcium, Κατιόν ασβεστίου
CRP	C-Reactive Protein, C αντιδρώσα πρωτεΐνη
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate, Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CD40L	CD40 ligand, προσδέτης CD40
CVD	Cardiovascular diseases, Καρδιαγγειακά νοσήματα
CHD	Coronary heart disease, Στεφανιαία νόσος
COX	Cyclooxygenase, Κυκλοοξυγενάση
CS	Cabernet Sauvignon
DHA	Docosahexaenoic acid, Δοκοσαεξαενοϊκό οξύ
DMSO	Dimethyl sulfoxide, Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ECM	Extracellular matrix, Εξωκυτταρική μήτρα
EPA	Eicosapentaenoic acid, Εικοσιπεντανοϊκό οξύ
FDPs	Fibrin degradation products, προϊόντα αποδόμησης ινώδους
GP-Ib	Glycoprotein complex I, Γλυκοπρωτεΐνη Ib
GP-IIb/IIIa	Glycoprotein IIb/IIIa, Γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa
GPVI	Glycoprotein VI, Γλυκοπρωτεΐνη VI
GPIb/IV	Glycoprotein complex Ib/IV, Γλυκοπρωτεΐνη Ib/IV
GPCR	G protein-coupled receptor, Υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη
HDL	High-density lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
IL-6	Interleukin 6, Ιντερλευκίνη 6
IL-1 β	Interleukin 1 beta, Ιντερλευκίνη 1 β
LDL	Low-density lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LpPLA ₂	Lipoprotein-associated phospholipase A ₂ , Φωσφολιπάση A ₂ σχετιζόμενη με λιποπρωτεΐνη
Mg	Magnesium, Μαγνήσιο
m-RNA	Messenger RNA, Αγγελιοφόρο RNA
MUFA	Monounsaturated fatty acids, Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NO	Nitrogen oxide, Μονοξείδιο του αζώτου
PAF	Platelet-activating factor, Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH	Platelet-activating factor acetylhydrolase, Ακετοϋδρολάση

	του PAF
PAR	Protease-activated receptor, Υποδοχέας που ενεργοποιείται από πρωτεάσες
PDGF	Platelet-derived growth factor, Παράγοντας ανάπτυξης που παράγεται από αιμοπετάλια
PF4	Platelet factor 4, Παράγοντας 4 αιμοπεταλίων
PGI ₂	Prostacyclin, Προστακυκλίνη
PLA ₂	Phospholipase A ₂ , Φωσφολιπάση A ₂
PLC	Phospholipase C, Φωσφολιπάση C
PMNL	Polymorphonuclear Leukocyte, Πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα
P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₁₂	ADP receptors, Υποδοχείς ADP
PPP	Platelet-Poor Plasma, Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PRP	Platelet-rich plasma, Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
P-sel	P-selectin, P-σελεκτίνη
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1, Προσδέτης της γλυκοπρωτεΐνης P-σελεκτινής
PTP	Protein tyrosine phosphatase, Τυροσινική φωσφατάση
PUFA	Polyunsaturated fatty acids, Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
ROS	Reactive oxygen species, Ενεργές μορφές οξυγόνου
S	Syrah
TF	Tissue factor, Ιστικός παράγοντας
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor, Αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα
TGF-α	Tumour growth factor-α, Παράγοντας ανάπτυξης όγκων-α
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha, Παράγοντας νέκρωσης όγκων
t-PA	Tissue plasminogen activator, Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
TRAP	Thrombin receptor activating peptide, Πεπτίδιο που ενεργοποιεί τον υποδοχέα θρομβίνης
TXA ₂	Thromboxane A ₂ , Θρομβοξάνη A ₂
VLDL-c	Very-low-density lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας
VSMC	Vascular smooth muscle cells, Λεία μυϊκά κύτταρα
vWF	Von Willebrand factor, Παράγοντας Von Willebrand

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Καρδιαγγειακό σύστημα

Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι ένα σύστημα οργάνων που είναι υπεύθυνο για την προμήθεια οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στους ιστούς καθώς και για την απομάκρυνση τελικών προϊόντων του μεταβολισμού από αυτούς. Γενικός του σκοπός είναι η επαρκής ροή αίματος στα αιμοφόρα αγγεία (αρτηρίες, φλέβες, τριχοειδή).

Τα αγγεία συγκροτούνται από 3 στιβάδες: α) Το ενδοθήλιο, το οποίο αποτελείται από μία μονή στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια του αγγείου, μαζί με τον υποκείμενο υποενδοθηλιακό ιστό (έσω χιτώνα), β) το μέσο χιτώνα που απαρτίζεται από λεία μυϊκά κύτταρα που επιτρέπουν στο αγγείο να συστέλλεται και να διαστέλλεται και γ) τον έξω χιτώνα.[1]

Το αίμα που ρέει στα αιμοφόρα αγγεία αποτελείται από ποικίλα κύτταρα τα οποία αιωρούνται μέσα στο πλάσμα. Τα κύτταρα του αίματος (έμμορφα συστατικά) είναι τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθροκύτταρα, τα οποία αποτελούν το 99% των κυττάρων του αίματος, μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς, ενώ τα λευκοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού. Τα αιμοπετάλια είναι τα πιο μικρά από τα έμμορφα συστατικά του πλάσματος.[2]

Όταν ένα αγγείο υποστεί βλάβη, χρειάζεται ένας τρόπος για να προληφθεί η μεγάλη απώλεια αίματος. Η άμεση έμφυτη αντίδραση είναι η εκδήλωση συστολής του, η οποία επιβραδύνει τη ροή του αίματος στην περιοχή της βλάβης. Ωστόσο, για τη μόνιμη επούλωση των τοιχωμάτων των αγγείων και επομένως τη διακοπή της αιμορραγίας και την αποφυγή εκτεταμένης μόλυνσης, λαμβάνουν χώρα κάποιες διεργασίες κατά τις οποίες ενεργοποιούνται διάφορα κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και των αιμοπεταλίων.[3] Η αιμόσταση όπως ονομάζεται, αναλαμβάνει ρόλο στη διατήρηση της ρευστότητας του αίματος στο αγγειακό σύστημα, επιτρέποντας ταυτόχρονα τον ταχύ

σχηματισμό ενός στερεού θρόμβου αίματος για την πρόληψη ή το σταμάτημα της αιμορραγίας. Τα στοιχεία που εμπλέκονται στον αιμοστατικό μηχανισμό περιλαμβάνουν τα αγγειακά τοιχώματα, τα αιμοπετάλια, τους παράγοντες πήξης, τους αναστολείς (αντιπηκτικά συστήματα) και το ινωδολυτικό σύστημα.[4, 5] Το αιμοστατικό σύστημα διατηρείται χάριν σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ προπηκτικών και αντιπηκτικών παραγόντων που επιτρέπουν τη φυσιολογική απόκριση στην αιμορραγία, αποφεύγοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη παθολογικών θρόμβων.

Προηγείται, η ταχεία δημιουργία ενός αιμοπεταλιακού βύσματος που διαμεσολαβείται μέσω της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων και του κατεστραμμένου ενδοθηλίου που επενδύει τα αιμοφόρα αγγεία (πρωτογενής αιμόσταση).[5] Στη συνέχεια, μια σειρά από καταρράκτες που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες πήξης και ένζυμα, καθώς και τις επιφάνειες των κυττάρων (αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων), συνεργάζονται για να παραχθεί θρομβίνη. Η θρομβίνη είναι το ένζυμο κλειδί στην πήξη, που στη συνέχεια οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού θρόμβου αποτελούμενου κυρίως από ινώδες. (δευτερογενής αιμόσταση)[4]

Στη διεργασία της πήξης συμμετέχουν ποικίλα είδη κυττάρων. Ωστόσο, εκείνη δύναται να πραγματοποιηθεί και χωρίς την παρουσία των κυτταρικών συστατικών, με μόνη εξαίρεση τα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια έχουν εξέχουσα θέση στη θρόμβωση, καθώς στην ενεργοποιημένη τους μορφή, η εξωτερική μεμβράνη τους είναι απαραίτητη για τη συνάθροιση ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης καθώς και για την πραγματοποίηση διάφορων αντιδράσεων του καταρράκτη της πήξης. Επιπρόσθετα, η σημαντικότητά τους τονίζεται και από το γεγονός ότι μετά τον τραυματισμό ενός αιμοφόρου αγγείου, τα αιμοπετάλια συμμετέχουν και έχουν κεντρικό ρόλο και στις δύο αλληλοεξαρτώμενες διαδικασίες που συμβάλλουν στην παύση της αιμορραγίας. Δηλαδή στη δημιουργία του αιμοπεταλιακού βύσματος, που συμβαίνει ταχύτατα στα αρχικά στάδια, αλλά και στην πήξη του αίματος (θρόμβωση) που είναι το αργό συμβάν της αιμόστασης, διεργασίες που συμβαίνουν με ταχεία αλληλουχία.[3] Επιπλέον, εξέχον είναι ο ρόλος τους στη φλεγμονή αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, καθώς αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα του αίματος, επάγουν την παραγωγή δεικτών φλεγμονής και συμμετέχουν σε διάφορες νοσηρές διαδικασίες.

Γενικά στοιχεία για τα αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι θραύσματα κυττάρων, απύρρηνα, δισκοειδούς σχήματος και με διάμετρο 2-4μm και έχουν μείζον ρόλο στη διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας. Παράγονται από τη διάσπαση του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων του μυελού των οστών, όπου ένα μέρος των θραυσμάτων εισέρχεται στην κυκλοφορία.[6] Τα κυτταρικά θραύσματα που εισέρχονται στην κυκλοφορία ως αιμοπετάλια χαρακτηρίζονται από ικανότητα αμοιβαδοειδούς κίνησης, παρόμοιας με των λευκοκυττάρων. Είναι πολύ μικρότερα από τα ερυθροκύτταρα. Σε κατάσταση ηρεμίας, ο ανθρώπινος οργανισμός δύναται να παράγει περίπου 200 δισεκατομμύρια αιμοπετάλια την ημέρα, με σκοπό τη διατήρηση του αριθμού τους στο περιφερικό αίμα στη φυσιολογική μέση τιμή των $150-400 \times 10^9$ ανά λίτρο αίματος. Τα αιμοπετάλια μπορούν να συνθέσουν έναν περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, καθώς περιέχουν αγγελιοφόρο RNA (mRNA), αλλά όχι πυρήνα και ως εκ τούτου δεν περιέχουν DNA. Η διάρκεια ζωής τους είναι περίπου 7-10 ημέρες. Στη συνέχεια καταστρέφονται και απομακρύνονται από την κυκλοφορία από το ήπαρ και το σπλήνα.[2]

Η εξωτερική τους μεμβράνη αποτελείται από λιπίδια (35%), πρωτεΐνες (57%) και υδατάνθρακες (8%) καθώς και πλήθος υποδοχέων. Στο κέντρο των αιμοπεταλίων υπάρχουν διάφορα υπο-κυτταρικά σωματίδια που αποτελούν τόπους αποθήκευσης ουσιών πρωταρχικής σημασίας για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τα κυριότερα από αυτά, τα οποία είναι και μορφολογικά διαφορετικά μεταξύ τους, είναι τα α-κοκκία (α-granules), τα πυκνά κοκκία ή δ-κοκκία (dense-granules) και τα λ-κοκκία ή λυσοσώματα (lysosomes). Καθένα από αυτά περιλαμβάνει μοναδικά απαραίτητα συστατικά.

α-κοκκία

Περιέχουν αιμοστατικά δραστικές ουσίες όπως vWF, προθρομβίνη[7], φιβρονεκτίνη, PDGF, PF4, TGF-α, παράγοντες πήξης όπως P-σελεκτίνη, ινωδογόνο και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον καταρράκτη πήξης. Επίσης, έχουν αποθηκευμένα και κάποια αντιπηκτικά όπως ο TFPI και η πλασμίνη.

δ-κοκκία

Αποτελούν αποθήκη των μη μεταβολικών ουσιών των αιμοπεταλίων όπως σεροτονίνης, Ca^{2+} , νουκλεοτιδίων τα οποία δεν παίρνουν μέρος στις ενδοκυττάρειες μεταβολικές

διεργασίες. Περιέχουν επίσης ADP, ATP, Mg και *rolip* που επιταχύνει και ενισχύει τη σταθερότητα του ινώδους.[7]

λ-κοκκία

Τα λυσοσώματα δεν έχουν κάποιο ιδιαίτερο μορφολογικό γνώρισμα και είναι λίγα σε αριθμό. Περιέχουν πρωτεάσες, γλυκοζιδάσες και διάφορα άλλα ένζυμα.[2]

1.2 Ο φυσιολογικός ρόλος των αιμοπεταλίων

1.2.1 Αιμόσταση

Δημιουργία αιμοπεταλιακού βύσματος (Πρωτογενής αιμόσταση)

Η συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση που ενεργοποιείται έπειτα από ένα τραύμα, προϋποθέτει την προσκόλλησή τους σε μια επιφάνεια. Σε φυσιολογικές καταστάσεις δεν προσκολλώνται στο ενδοθήλιο που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων.[3] Αυτό συμβαίνει γιατί τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος έχουν αντιθρομβωτικές ιδιότητες καθώς φυσιολογικά συνθέτουν και εκκρίνουν αναστολείς αιμοπεταλίων, αναστολείς πήξης και ενεργοποιητές ινωδόλυσης.[8] Παραδείγματα αποτελούν η προστακυκλίνη (ή προσταγλανδίνη I_2 , PGI_2), ένα εικοσανοειδές που αναστέλλει τη συσώρευση των αιμοπεταλίων και το μονοξείδιο του αζώτου (NO) που πέραν από την αγγειοδιασταλτική του δράση, είναι άλλος ένας αναστολέας που εμποδίζει τις δράσεις των αιμοπεταλίων (προσκόλληση, ενεργοποίηση, συσώρευση) σε ένα φυσιολογικό ενδοθήλιο.[3] Αντιθέτως, η υποενδοθηλιακή στιβάδα είναι εξαιρετικά θρομβογόνος και περιέχει κολλαγόνο, παράγοντα von Willebrand (vWF) και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην προσκόλληση αιμοπεταλίων.[8]

Ένας τραυματισμός του αγγείου προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου και έκθεση των μορίων της υποενδοθηλιακής στιβάδας.[3] Έτσι, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο κολλαγόνο και τον vWF στον υποενδοθηλιακό ιστό και υποβάλλονται σε μορφολογική αλλαγή, λαμβάνοντας ανώμαλη επιφάνεια, σχηματίζοντας πολυάριθμα ψευδοπόδια και αυξάνοντας έτσι δραστικά την επιφάνειά τους. Ο σχηματισμός του

βύσματος των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει μια σειρά από διαδικασίες που αναλύονται παρακάτω:

Προσκόλληση των αιμοπεταλίων

Μετά την αγγειακή βλάβη ο vWF λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ του υποενδοθηλιακού κολλαγόνου και των υποδοχέων Gr-Ib των αιμοπεταλίων, προάγοντας τη στρατολόγηση των αιμοπεταλίων. Ο GP-Ib είναι ο κύριος υποδοχέας για τον vWF.

Αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση-έκκριση

Η δέσμευση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο πυροδοτεί την απελευθέρωση των διάφορων χημικών παραγόντων που περιέχονται στα κοκκία τους. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες δρουν τοπικά τροποποιώντας το μεταβολισμό, το σχήμα και τις πρωτεΐνες επιφανείας των αιμοπεταλίων (ενεργοποίηση αιμοπεταλίων). Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ωθεί στην έκθεση ειδικών υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τους. Οι υποδοχείς αυτοί δεσμεύουν αρκετούς από τους παράγοντες της θρόμβωσης και για αυτό το λόγο η επιφάνεια των αιμοπεταλίων χρησιμεύει για την εκτέλεση των αντιδράσεων της πήξης.[3] Παράλληλα απελευθερώνεται το ασβέστιο και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκθέτουν στην επιφάνειά τους τον αποθηκευμένο στα α-κοκκία ιστικό παράγοντα ο οποίος, μαζί με το ασβέστιο, έχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του θρόμβου. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν κυτταροκίνες και χυμοκίνες οι οποίες ρυθμίζουν τις αποκρίσεις του ανοσολογικού συστήματος.[6]

Συσσώρευση αιμοπεταλίων

Μερικές από τις παραπάνω μεταβολές προκαλούν προσκόλληση νέων αιμοπεταλίων στα παλιά ένα φαινόμενο θετικής ανατροφοδότησης που καλείται συσσώρευση αιμοπεταλίων. Πολλές πρωτεΐνες και άλλα μόρια παράγονται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μέσω των κοκκίων τους και παρέχουν κίνητρο για περαιτέρω συσσωμάτωση αιμοπεταλίων. Η TXA₂ μαζί με το ADP μεγεθύνουν αυτή τη συσσώρευση, οδηγώντας στο σχηματισμό του βύσματος των αιμοπεταλίων, το οποίο προσωρινά στεγανοποιεί την αγγειακή βλάβη. Η δέσμευση του ADP προκαλεί επίσης μια διαμορφωτική αλλαγή στους υποδοχείς GPIIb / IIIa που παρουσιάζονται επί της

επιφανείας των αιμοπεταλίων και οδηγεί σε εναπόθεση ινωδογόνου. Οι προαναφερθείσες λειτουργίες υποκινούνται από την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . [9]

Πήξη αίματος (Δευτερογενής αιμόσταση)

Η θρόμβωση – πήξη αίματος αποτελεί τον κυρίαρχο αιμοστατικό μηχανισμό που συμβάλλει στην υποστήριξη και ενίσχυση του αιμοπεταλιακού βύσματος και στη στερεοποίηση του αίματος που παραμένει στον αυλό της πληγής. [3] Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη δημιουργία ινώδους και σταθεροποιημένων συσσωρευμένων αιμοπεταλίων. Οι πρωτεΐνες της πήξης είναι τα βασικά συστατικά του συστήματος πήξης, που οδηγούν σε μια περίπλοκη αλληλεπίδραση αντιδράσεων (καταρράκτης πήξης). Η πλειονότητα των παραγόντων πήξης είναι πρόδρομα μόρια γνωστά ως ζυμογόνα που κυκλοφορούν σε ανενεργό μορφή και παράγονται συνήθως από το ήπαρ. Το αποτέλεσμα του καταρράκτη ενεργοποίησης των ενζύμων είναι η παραγωγή θρομβίνης.

Πιο συγκεκριμένα, η επαφή του αίματος με τον υποενδοθηλιακό ιστό, αποτελεί έναυσμα για την έναρξη μιας τοπικής αλληλουχίας χημικών αντιδράσεων, που χαρακτηρίζεται ως “καταρράκτης πήξης” και συμβάλλει στην ενεργοποίηση ενζύμων του πλάσματος. Τα αρχικά στάδια του καταρράκτη της πήξης περιλαμβάνουν δύο φαινομενικά παράλληλες οδούς, την εξωγενή και την ενδογενή.

Εξωγενής οδός

Στην εξωγενή οδό, στην οποία η παρουσία ενός κυτταρικού συστατικού εκτός του αίματος (ιστικός παράγοντας ή TF) κρίνεται απαραίτητη για τη λειτουργία της, η θρόμβωση εξελίσσεται μέσω της δημιουργίας ενός συμπλέγματος μεταξύ του ιστικού παράγοντα και του παράγοντα VIIa. Ο ιστικός παράγοντας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη διάφορων ιστικών κυττάρων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων κάτω από το ενδοθήλιο. [9]

Ενδογενής οδός

Η ενδογενής οδός, όπου όλα τα στοιχεία που χρειάζονται για να επιτευχθεί βρίσκονται μέσα στο αίμα, συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του παράγοντα XII. [3] Η ενδογενής οδός

πυροδοτείται κυρίως από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ενώ η εξωγενής από την έκθεση του ιστικού παράγοντα λόγω αγγειακού τραύματος.[9]

Οι 2 οδοί συγχωνεύονται στον παράγοντα Χα, που είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Εν συνεχεία, η θρομβίνη φανερώνει 3 δράσεις. Καταλύει τη μετατροπή του διαλυτού ινωδογόνου σε αδιάλυτο ινώδες[8], ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII ο οποίος συμβάλλει στη σταθεροποίηση του ινώδους και επιπλέον ενισχύει το σχηματισμό της, μέσω θετικής ανατροφοδότησης των αντιδράσεων του καταρράκτη της πήξης.[3]

Ωστόσο, προκειμένου να αποτραπεί ο σχηματισμός παθολογικών θρόμβων και να περιοριστεί ο σχηματισμός του θρόμβου μόνο στην περιοχή του τραυματισμού, ενεργοποιείται, σχεδόν ταυτόχρονα, το αντι-πηκτικό σύστημα όπου λειτουργούν άμεσοι και έμμεσοι αναστολείς της θρομβίνης.[5] Μόλις σχηματιστεί ο θρόμβος, το ινωδολυτικό σύστημα εξασφαλίζει ότι εκείνος λύεται έτσι ώστε να μην οδηγήσει σε μια παθολογική επιπλοκή. Στο σύνολό τους, τα συστήματα υπάρχουν για να ισορροπεί το ένα το άλλο και έτσι να διατηρείται μια τάξη. Η ισορροπία μεταξύ της πήξης και της ινωδόλυσης συμβάλλει στην αποτελεσματική λειτουργία του αιμοστατικού συστήματος.[4]

Φυσικοί μηχανισμοί που αντιτάσσονται στην πήξη στον ανθρώπινο οργανισμό

Η απελευθέρωση προστακυκλίνης και μονοξειδίου του αζώτου από τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Δεδομένου ότι αυτή η συσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη θρόμβωση, αυτοί οι παράγοντες περιορίζουν το μέγεθος και την έκταση της θρόμβωσης, αποτρέποντας έτσι την επέκταση του θρόμβου πέρα από το σημείο της βλάβης.

Ο οργανισμός, ωστόσο, έχει επιπρόσθετους μηχανισμούς για τον περιορισμό της ίδιας της θρόμβωσης. Οι κύριοι αντιπηκτικοί μηχανισμοί που είναι φυσικά παρόντες στο ανθρώπινο σώμα είναι οι ακόλουθοι :

Αντιθρομβίνη

Η αντιθρομβίνη (ΑΤ) είναι ο κύριος αναστολέας της θρομβίνης. Είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης, ο οποίος δεσμεύει και αδρανοποιεί τη θρομβίνη αλλά και αρκετούς άλλους παράγοντες της πήξης.

Αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI)

Είναι ένα πολυπεπίδιο που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Δρα ως φυσικός αναστολέας της εξωγενούς οδού μέσω της δέσμευσής του στο σύμπλοκο ιστικού παράγοντα-παράγοντα VIIa με επακόλουθο την απώλεια της ικανότητας δημιουργίας του παράγοντα Xa.

Μονοπάτι της πρωτεΐνης C

Η φάση διάδοσης της πήξης αναστέλλεται από την οδό της πρωτεΐνης C που αποτελείται κυρίως από τέσσερα βασικά στοιχεία:

- Την πρωτεΐνη C, μια πρωτεάση σερίνης με ισχυρές αντιπηκτικές, προϊνωδολυτικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες. Ενεργοποιείται από τη θρομβίνη για να σχηματίσει την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) και δρα αναστέλλοντας τους ενεργοποιημένους παράγοντες πήξης V και VIII
- Τη θρομβομοντουλίνη, ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, που αποτρέπει το σχηματισμό του θρόμβου στο άθικτο ενδοθήλιο, μέσω της σύνδεσής του με τη θρομβίνη. Στη συνέχεια, η συνδεδεμένη θρομβίνη συνδέεται με την πρωτεΐνη C η οποία και ενεργοποιείται αδρανοποιώντας τους παράγοντες Va και VIIIa
- Υποδοχέας της πρωτεΐνης C (Endothelial protein C receptor), ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που βοηθά στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C
- Πρωτεΐνη S, μια γλυκοπρωτεΐνη εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K που συντίθεται από ενδοθηλιακά κύτταρα και ηπατοκύτταρα. Υπάρχει στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή (40%) αλλά και σε συζευγμένη μορφή (60%). Η αντιπηκτική δραστηριότητα προκύπτει λόγω της ελεύθερης μορφής της.

Protein Z dependent protease inhibitor/protein Z (PZI)

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως ένα συστατικό του αντιπηκτικού συστήματος το οποίο παράγεται στο ήπαρ. Αναστέλλει τον παράγοντα Χα σε μια αντίδραση που απαιτεί PZ και ασβέστιο.[8]

Ινωδολυτικό σύστημα: Ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης θρόμβου

Η ινωδόλυση είναι μια ενζυμική διαδικασία που προκαλεί διάλυση του θρόμβου, αφού αυτός δημιουργηθεί, σε προϊόντα αποδόμησης του ινώδους (FDPs). Το ινωδολυτικό σύστημα είναι ένα παράλληλο σύστημα το οποίο ενεργοποιείται μαζί με την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης και χρησιμεύει στον περιορισμό του μεγέθους του θρόμβου.[8]

Η φυσιολογία αυτού του συστήματος είναι ανάλογη με εκείνη του συστήματος πήξης. Αρχικά, δημιουργείται ένα προένζυμο του πλάσματος, το πλασμινογόνο, το οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί προς το ένζυμο πλασμίνη από ειδικές πρωτεΐνες, τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η δημιουργία της πλασμίνης συνεπάγεται διάσπαση του ινώδους, γεγονός που προκαλεί λύση του θρόμβου. Ένας ειδικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου είναι ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (t-PA) ο οποίος εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.[3] Η απελευθέρωση του t-PA διεγείρεται μέσω της απόφραξης ιστού, της θρομβίνης, της επινεφρίνης, της βασοπρεσίνης και της εντατικής άσκησης.[8]

Κατά τη θρόμβωση, τόσο το πλασμινογόνο όσο και ο t-PA δεσμεύονται με το ινώδες και ενσωματώνονται σε όλη την έκταση του θρόμβου. Απουσία ινώδους, ο t-PA έχει πολύ ασθενή ενζυμική δράση. Η παρουσία ινώδους αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα του t-PA να καταλύει τη δημιουργία πλασμίνης από το πλασμινογόνο. Επομένως, το ινώδες είναι σημαντικός παράγοντας για την έναρξη της ινωδολυτικής διεργασίας που οδηγεί στη διάλυσή του.[3]

Η δράση της πλασμίνης ρυθμίζεται αυστηρά από τον αναστολέα της (α -2 αντιπλασμίνη). Η ρύθμιση από αυτόν αλλά και άλλους αναστολείς, αποτρέπει την ευρέως διαδεδομένη ινωδόλυση.[8]

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα αιμοπετάλια και το ινώδες, μαζί με ορισμένους παράγοντες πήξης, διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην φυσιολογική πήξη του

αίματος. Ωστόσο, έχει φανεί ότι αυτοί οι παράγοντες εμπλέκονται επίσης και στη φλεγμονή.

1.2.2 Φλεγμονή

Σωματικές βλάβες, μολυσματικά παθογόνα ή χημικά και άλλα επιβλαβή ερεθίσματα, μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργία ιστών ή κυττάρων. Η άμεση ανταπόκριση του σώματος για την επισκευή και προστασία από αυτές τις επιπλοκές αναφέρεται ως φλεγμονή. Το αποτέλεσμα του τραύματος ενός ιστού είναι η εκδήλωση οξείας φλεγμονής που είναι ουσιαστικά μια βραχυπρόθεσμη απόκριση, όπου αυξάνονται η ροή του αίματος και η αγγειακή διαπερατότητα, τα συμβάντα που συνοδεύονται με την αυξημένη διήθηση λευκοκυττάρων. Τα γεγονότα αυτά λαμβάνουν χώρα προκειμένου να απομακρυνθεί το ερέθισμα που προκάλεσε το τραύμα και να επουλωθεί ο ιστός. Σημαντικοί δείκτες που αυξάνονται κατά την παρουσία φλεγμονής είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α). Στην πραγματικότητα, υπάρχει μια θεμελιώδης συσχέτιση μεταξύ της φλεγμονώδους διαδικασίας και του καταρράκτη της πήξης. Ο TF, το ασβέστιο και η θρομβίνη που συμμετέχουν στην πήξη πιθανόν να αντιστοιχούν και στη φλεγμονή. Η φλεγμονή και η πήξη πιθανόν να έχουν παρόμοια επίδραση στα αιμοπετάλια και στη μορφολογία του δικτύου του ινώδους, λόγω των αναφερθέντων παραγόντων πήξης.

Τα αιμοπετάλια θεωρούνται σημαντικοί ενισχυτές της οξείας φλεγμονής, ιδίως μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα ουδετερόφιλα. Αυτή η αλληλεπίδραση προάγει τη συνάθροιση επιπλέον ουδετερόφιλων αλλά και άλλων λευκοκυττάρων στον ιστό που φλεγμαίνει. Τα αιμοπετάλια επιπλέον εκκρίνουν ενεργοποιητές, που είναι έμμεσα υπεύθυνοι για την παραγωγή κυταρροκινών, που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές λειτουργίες.

Τόσο η πήξη όσο και η φλεγμονή είναι καθοριστικής σημασίας για τον εντοπισμό, τον περιορισμό και την καταστροφή των παθογόνων, καθώς και τον περιορισμό του μεγέθους της βλάβης των ιστών. Όταν ένας μολυσματικός παράγοντας εισέλθει στον

οργανισμό, αφού προηγηθεί η έμφυτη ανοσολογική απόκριση, ακολουθεί η ενεργοποίηση της πήξης. Η φλεγμονώδης απόκριση προωθεί την ενεργοποίηση του συστήματος πήξης και η πήξη επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα της φλεγμονώδους διαδικασίας. Η αλληλεπίδραση των 2 διαδικασιών εκδηλώνεται κυρίως σε 3 σημεία. Αρχικά, οι πρωτεΐνες επιφανείας που εκτίθενται λόγω του κατεστραμμένου ενδοθηλίου λειτουργούν ως έναυσμα τόσο για τη διαδικασία της πήξης όσο και για την φλεγμονώδη απόκριση. Επίσης, κατά τη φλεγμονώδη διαδικασία απελευθερώνονται κυτταροκίνες οι οποίες μειώνουν την έκφραση της θρομβομοντουλίνης και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C, ενώ αυξάνουν την έκφραση του TF. Με τον τρόπο αυτό, η φλεγμονή ρυθμίζει το σύστημα πήξης μεταβάλλοντας την ισορροπία μεταξύ προπηκτικών και αντιπηκτικών παραγόντων. Επιπλέον, άλλη μια κοινή συνιστώσα μεταξύ φλεγμονής και πήξης αποτελεί η θρομβίνη που παράγεται από τον καταρράκτη της πήξης. Η θρομβίνη έχει ζωτικό ρόλο στην προώθηση της αιμόστασης αλλά συμβάλλει επίσης και στη διέγερση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών, διαδικασίες εξίσου σημαντικές για την αποκατάσταση του ιστού.[9]

1.3 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις

1.3.1 Παράγοντες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Είναι γεγονός ότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που δύνανται να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια, αφότου ένα αιμοφόρο αγγείο υποστεί χτύπημα ή κάκωση. Οι περισσότεροι αγωνιστές δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και μέσω αυτών ασκούν τη δράση τους. Οι υποδοχείς αυτοί, συνεισφέρουν στην ταχύτατη προσκόλληση και συσώρευση των αιμοπεταλίων στις περιοχές που έχουν υποστεί βλάβη.

Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από έναν αγωνιστή, μεταδίδεται ένα σήμα στο κύτταρο το οποίο προάγει διαφορετικά βιοχημικά συμβάντα. Οι σημαντικότεροι από αυτούς τους αγωνιστές είναι ο vWF, το κολλαγόνο, το ινωδογόνο, ο TF, το ADP, η θρομβίνη και ο PAF που δρουν σε συγκεκριμένους υποδοχείς οι οποίοι παρατίθενται αναλυτικά στη συνέχεια.[8]

Πίνακας 1: Συνδυασμοί υποδοχέων αιμοπεταλίων – προσδετών και δράσεις που προάγουν

Υποδοχείς αιμοπεταλίων	Προσδέτης	Δράση
GPIb-IX-V	vWF, θρομβίνη, P-σελεκτίνη	Στρατολόγηση αιμοπεταλίων
$\alpha_2\beta_1$	Κολλαγόνο	Προσκόλληση αιμοπεταλίων
GPVI	Κολλαγόνο	Προσκόλληση & συσώρευση αιμοπεταλίων
GP/IIb/IIIa (ή GP IIb / IIIa)	Ινωδογόνο	Προσκόλληση & συσώρευση αιμοπεταλίων
P_2X	ATP	Ενίσχυση προσκόλλησης & συσώρευσης αιμοπεταλίων
P_2Y_1 , P_2Y_{12} (Συζευγμένοι με G πρωτεΐνη)	ADP	Ενίσχυση προσκόλλησης & συσώρευσης αιμοπεταλίων
PAR_1 , PAR_4 (Συζευγμένοι με G πρωτεΐνη)	Θρομβίνη	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων & Διαδικασία πήξης
PAF_υποδοχείς (Συζευγμένοι με G πρωτεΐνη)	PAF	Συσώρευση Αιμοπεταλίων

Von Willebrand factor

Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που υπάρχει στο πλάσμα του αίματος και παράγεται στο ενδοθήλιο, στα μεγακαρυοκύτταρα και στον υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Υπάρχει η ικανότητα έκκρισής του και από τα αιμοπετάλια. Είναι διαμεσολαβητής για τη δέσμευση των αιμοπεταλίων στην υποενδοθηλιακή επιφάνεια, δηλαδή στο κολλαγόνο. Μετά από μια βλάβη του αγγειακού τοιχώματος, ο vWF αρχικά συνδέεται στα εκτεθειμένα μόρια

κολλαγόνου, αλλάζει η δομή του και με αυτόν τον τρόπο καθίσταται ικανός να συμβάλλει στην προσκόλληση αιμοπεταλίων, δημιουργώντας μια γέφυρα μεταξύ του διαταραγμένου αγγειακού τοιχώματος και των αιμοπεταλίων.[3] Ο vWF λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος μέσω ειδικών υποδοχέων GPIIb/IX που βρίσκονται τόσο στην επιφάνεια ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων όσο και στο υποενδοθήλιο και ευνοούν τη στρατολόγηση των αιμοπεταλίων.[9] Ο υποδοχέας αυτός, εκτός από θέση πρόσδεσης για τον vWF λειτουργεί ως υποδοχέας και για παράγοντες πήξης, συνδέοντας με αυτόν τον τρόπο την πρωτογενή με τη δευτερογενή αιμόσταση.

Κολλαγόνο

Η αύξηση της διαπερατότητας ενδοθηλίου είναι ο λόγος που τα μόρια κολλαγόνου του συνδετικού ιστού εκτίθενται στην επιφάνεια προς το αίμα. Σε πρώτη φάση, το κολλαγόνο προσελκύει και δεσμεύει αιμοπετάλια. Αυτή η σύνδεση πυροδοτεί την απελευθέρωση διάφορων χημικών παραγόντων που περιέχονται στα κοκκία των αιμοπεταλίων.[3] Το κολλαγόνο είναι το πιο θρομβογενές συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας και συνδέεται άμεσα με υποδοχείς που μεσολαβούν στην προσκόλληση αιμοπεταλίων (υποδοχείς $\alpha_2\beta_1$) και επάγουν την ενεργοποίηση και συσώρευσή τους (υποδοχείς GPVI). [10] Η γλυκοπρωτεΐνη VI (GPVI) που εκφράζεται στα αιμοπετάλια είναι ένας από τους σημαντικότερους υποδοχείς για το κολλαγόνο και είναι συνδεδεμένη με κινάση τυροσίνης.[11]

Ινωδογόνο

Το ινωδογόνο είναι μια απαραίτητη πρωτεΐνη πήξης του πλάσματος που παράγεται από το ήπαρ και είναι πρόδρομο μόριο του ινώδους.[8, 11] Έχει σημαντικό ρόλο στη συσώρευση αιμοπεταλίων καθώς δρα ως γέφυρα μεταξύ συναθροιζόμενων αιμοπεταλίων, δεσμευόμενος στους υποδοχείς επιφανείας GP IIb / IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$). Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και επάγουν την προσκόλληση όσο και για τη συσώρευση αιμοπεταλίων.[9]

Παράγοντας III ή TF

Είναι μία προπηκτική γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με μεμβράνη. Μικρή ποσότητα κυκλοφορούντος TF βρίσκεται στα μονοκύτταρα. Δεν εκτίθεται στο αίμα παρά μόνο σε

τραυματισμό του αγγείου. Είναι ο κύριος εκκινητής της πήξης *in vivo*. Ο ιστικός παράγοντας μπορεί να ενεργοποιηθεί από φυσική βλάβη (ενεργοποίηση TF του τοιχώματος του αγγείου), από άμεση αγγειακή βλάβη ή λειτουργική βλάβη (ενεργοποίηση των κυκλοφορούντων TF), από υποξία, σήψη, κακοήθεια, φλεγμονή, κα.[8]

PAF

Ο PAF είναι ένας μεσολαβητής ζωτικής σημασίας για τη φλεγμονώδη απόκριση, τις ανοσολογικές διαταραχές και τις ισχαιμικές ασθένειες. Συντίθεται, απελευθερώνεται και μεταβολίζεται από αρκετούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων κατά την ενεργοποίησή τους, όπως τα μακροφάγα, τα αφρώδη κύτταρα, τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNL), τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και από τα αιμοπετάλια που όλα συμμετέχουν στην αθηροσκλήρωση.[12] Ενεργοποιεί κύτταρα, μέσω ενός υποδοχέα συζευγμένου με μια G πρωτεΐνη (GPCR), του PAF υποδοχέα.[13] Η κοινή ονομασία του PAF είναι 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη. Ανήκει σε μια οικογένεια λιποειδικών μορίων. Τα PAF-like lipids είναι οξειδωτικά τροποποιημένες φωσφατιδυλοχολίνες που ανήκουν στην οικογένεια του PAF, μιμούνται τη δομή του και μπορούν να συνδεθούν στους υποδοχείς του.[12]

Τα επίπεδα του PAF ρυθμίζονται μέσω της ισορροπίας μεταξύ της βιοσύνθεσης και του καταβολισμού του. Τα μεταβολικά ένζυμα του PAF πιστεύεται ότι παίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία εμφάνισης αθηροσκλήρωσης.

Έχουν περιγραφεί δύο ανεξάρτητες οδοί βιοσύνθεσης PAF. Η πρώτη είναι *de novo* οδός που θεωρείται ότι είναι η κυρίως υπεύθυνη για τη διατήρηση των επιπέδων PAF σε ηρεμία, σε διάφορους ιστούς και στο αίμα, υπό μη φλεγμονώδεις συνθήκες.

Υπό φλεγμονώδεις συνθήκες, η παραγωγή του PAF συμβαίνει κυρίως μέσω της οδού αναδιαμορφώσεως (*remodelling pathway*), η οποία θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την ταχεία σύνθεση του PAF. Περιλαμβάνει μια διαδικασία δύο σταδίων, η οποία μετατρέπει τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια σε PAF.[14]

Δεδομένου ότι ο PAF προωθεί τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και αυτή η συσσώρευση συμβαίνει μέσω σηματοδότησης από την ιντεγκρίνη GP IIb / IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta 3$) με επακόλουθο τη δέσμευση του ινωδογόνου, φαίνεται ότι ο υποδοχέας PAF συνδέεται με αυτό το ενδοκυτταρικό μονοπάτι.[12]

Χημικοί παράγοντες των κοκκίων των αιμοπεταλίων

Οι παράγοντες αυτοί, που απελευθερώνονται αμέσως μετά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο, ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια αφού δρουν τοπικά, μεταβάλλοντας το μεταβολισμό, το σχήμα και τις πρωτεΐνες επιφανείας τους. Επιπρόσθετα, συμβάλλουν και στη συσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς κάποιες από τις μεταβολές ασκούν θετική ανατροφοδότηση και προκαλούν προσκόλληση νέων αιμοπεταλίων στα παλιά.

Οι περισσότεροι διαλυτοί αγωνιστές των αιμοπεταλίων όπως το ADP και η θρομβίνη που απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα κύτταρα, δρουν στα αιμοπετάλια, μέσω ενός υποδοχέα συζευγμένου με μια G πρωτεΐνη (GPCR).[11, 15] Μέσω αλληλεπίδρασης με αυτές τις πρωτεΐνες G, διεγείρουν τη φωσφολιπάση C (PLC) και τη φωσφολιπάση A₂ και αναστέλλουν τον εξαρτώμενο από την αδενυλική κυκλάση σχηματισμό cAMP. Όλα αυτά αποτελούν έναυσμα για περαιτέρω ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.[16]

Ο σχηματισμός θρόμβων ρυθμίζεται από τη συντονισμένη δράση τόσο των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης όσο και των GPCR.[11]

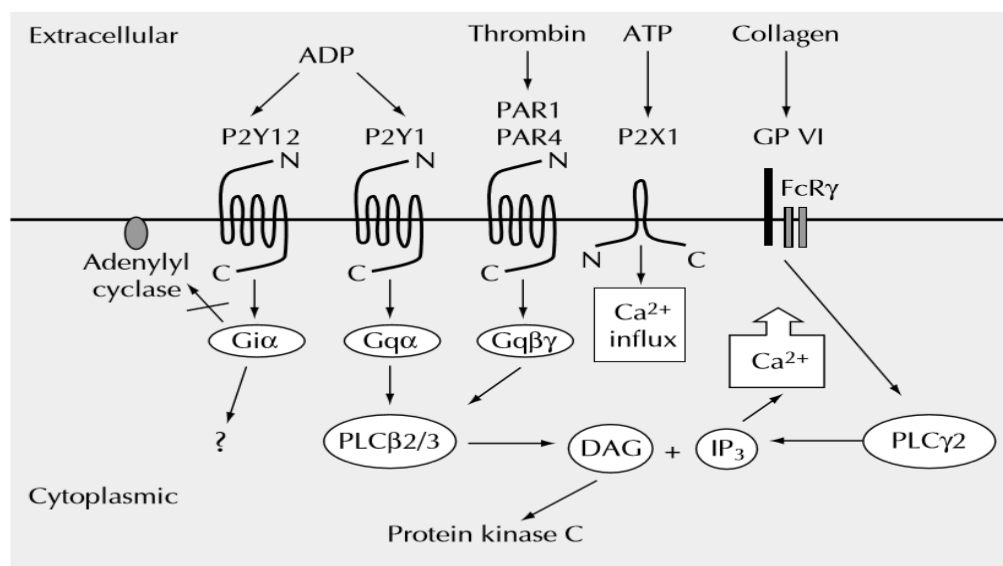
Το ADP απελευθερώνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη και από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, δρώντας στους P₂Y₁ και P₂Y₁₂ GPCR υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Η σύνδεση του ADP με τους υποδοχείς προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και απελευθέρωση ADP.[15]

Η προθρομβίνη είναι μια πρωτεΐνη πλάσματος που σχηματίζεται από το ήπαρ. Είναι ένα ασταθές μόριο, ο διαχωρισμός του οποίου απελευθερώνει μικρότερες πρωτεΐνες μια από τις οποίες είναι η θρομβίνη. Η θρομβίνη που παράγεται από την προθρομβίνη έχει επίσης προ-φλεγμονώδη δράση που ασκείται από υποδοχείς που είναι παρόντες σε μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ενδοθήλιο και δενδριτικά κύτταρα.[8] Οι υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια PAR είναι υπεύθυνοι για την ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στη θρομβίνη. Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, είναι παρόντες οι επιφανειακοί υποδοχείς PAR-1 και PAR-4. Οι υποδοχείς PAR είναι μέλη της οικογένειας υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες. Η θρομβίνη ασκεί τη δράση της μέσω αυτών των υποδοχέων.[10] [15] [17] Είναι ο πιο ισχυρός αγωνιστής των αιμοπεταλίων που διεγείρει

την ενεργοποίησή τους, η οποία εν συνεχεία εκκινεί την αποκοκκίωση, την προσκόλληση και τη συσώρευσή τους, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβου.[9]

Η θρομβίνη διασπά τον υποδοχέα της, απελευθερώνοντας ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων και δημιουργώντας ένα νέο αμινοτελικό άκρο που δρα ως προσδέτης για τον υποδοχέα. Αυτό το πεπτίδιο αντικατοπτρίζει τον TRAP ο οποίος είναι ένας ισχυρός αγωνιστής των αιμοπεταλίων.[16] Ο TRAP είναι σταθερό ανάλογο της θρομβίνης και μιμείται κάποιες δράσεις της όπως τη συσώρευση αιμοπεταλίων, την αναστολή cAMP και την αύξηση του κυτταροσολικού ασβεστίου.[18]

Στην εικόνα 1, απεικονίζεται ο τρόπος δράσης των αγωνιστών αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων τους.



Εικόνα 1: Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση υποδοχέων (πηγή: [10])

Ενεργοποίηση P_2Y_1 , $PAR1$, $PAR4$ από ADP + θρομβίνη, αντίστοιχα → Ενεργοποίηση PLC → Αύξηση κυτταροπλασματικού Ca^{2+}

Ενεργοποίηση P_2Y_{12} με ADP → Αναστολή αδενυλικής κυκλάσης → ↓ cAMP

Ενεργοποίηση P_2X_1 από ATP → Αύξηση Ca^{2+}

Ενεργοποίηση GPVI από κολλαγόνο → Ενεργοποίηση τυροσινικής κινάσης που ρυθμίζει τη λειτουργία της PLC

PLC → Παραγωγή δεύτερων αγγελιοφόρων (DAG + IP_3) → Ενεργοποίηση πρωτεϊνικής κινάσης C → Αύξηση κυτταροσολικού Ca^{2+}

1.3.2 Αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα

Ο τραυματισμός ενός ιστού ή η εισαγωγή ξένων σωμάτων μέσα στο αγγείο είναι ο πιο άμεσος τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια και διάφορα παθογόνα μπορούν να εισβάλουν στο σώμα. Επομένως, είναι φανερό ότι οι αντιμικροβιακές και αιμοστατικές απαντήσεις του οργανισμού συνδέονται στενά. Τα αιμοπετάλια ως τα κύτταρα που φτάνουν πρώτα στο σημείο του τραυματισμού, έχουν ολοένα και περισσότερο εμφανή ρόλο στην καταπολέμηση παθογόνων. Το 2002 αποδείχθηκε ότι πολλές από τις κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια έχουν άμεση μικροβιοκτόνο δράση και ότι εκείνα μπορούν να δεσμεύουν και να παγιδεύουν άμεσα παθογόνα.[7]

Η πληθώρα λειτουργικά ενεργών πρωτεϊνών που βρίσκονται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, εκτός του ότι διευκολύνουν την προσκόλληση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, ευνοούν και την επικοινωνία και αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα του αίματος και των αγγείων, που συμμετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν τη δυνατότητα να προσκολλώνται σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, να δημιουργούν συσσωματώματα και να αλληλεπιδρούν με λεμφοκύτταρα, συνεισφέροντας στην προσέλκυσή τους στο σημείο της βλάβης. Τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με το αγγειακό ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα και με αυτό τον τρόπο λειτουργούν ως σύνδεσμος μεταξύ φλεγμονής, θρόμβωσης και αθηρογένεσης. Πρόσφατα, φάνηκε πως η σεροτονίνη που απελευθερώνεται από τα δ-κοκκία των αιμοπεταλίων έχει σημαντική θέση στην προσκόλληση ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. Η δέσμευση των αιμοπεταλίων με άλλα είδη κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω υποδοχέων P-σελεκτίνης. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνειά τους μεγάλες ποσότητες P-σελεκτίνης η οποία κινητοποιείται ταχέως από τα α-κοκκία τους.

Η P-σελεκτίνη, μέσω του συνδέτη της, PSGL-1, έχει κεντρικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς τα κύτταρα αυτά έχει αναφερθεί πως εκφράζουν τον PSGL-1. Είναι μείζον διαμεσολαβητής για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων, την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και την προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης και τον προσδέτη CD40L ο οποίος αλληλεπιδρά με το CD40 που υπάρχει στα ενδοθηλιακά κύτταρα και έτσι προάγεται η έκκριση χυμοκινών και η έκφραση μορίων προσκόλλησης.

Ο προσδέτης PF4 είναι μια από τις μεγαλύτερες σε αφθονία πρωτεΐνες των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων, που εκτός από το ρόλο που έχει στην αιμόσταση και τη θρόμβωση έχει και ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων που σχετίζεται με τη φυσική ανοσία. Μέσα στις δράσεις του συμπεριλαμβάνονται η προώθηση της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), γεγονότα που αποτελούν αρχικά στάδια αθηρογένεσης.[15]

Επομένως, είναι φανερό ότι τα αιμοπετάλια έχουν κεντρική θέση στην έναρξη και εξέλιξη της αθηρογένεσης, μέσω των ουσιών που παράγουν και της αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα. Στην συνέχεια ακολουθεί λεπτομερής ανάλυση της εμπλοκής τους αυτής.

1.4 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση και σε άλλες νοσηρές καταστάσεις

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων σε παθολογικές καταστάσεις

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια έχουν κρίσιμο ρόλο στα καρδιαγγειακά νοσήματα (καρδιακή προσβολή, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια κ.α.).[7, 19] Τα καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) είναι η πρώτη αιτία θανάτου στον δυτικό κόσμο και προβλέπεται ότι το 2020 θα είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως.[20] Μεταξύ των κυριότερων και σοβαρότερων καρδιαγγειακών παθήσεων συγκαταλέγεται και η στεφανιαία νόσος (CHD), η οποία είναι απόρροια της αθηροσκλήρωσης. Όλες αυτές οι καταστάσεις προκύπτουν από το σχηματισμό θρόμβου που αποφράσει την κυκλοφορία του αίματος (θρομβωτικές διαταραχές). Στη στεφανιαία νόσο, παρουσιάζονται στενωτικές βλάβες των στεφανιαίων αρτηριών που οφείλονται στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών.[7, 19]

Υποθέσεις προαγωγής αθηροσκλήρωσης

Με το πέρασμα των χρόνων δημιουργήθηκαν ποικίλες υποθέσεις σχετικά με το εναρκτήριο έναυσμα της αθηρογένεσης. Οι πιο πρόσφατες από αυτές παρουσιάζονται

στη συνέχεια. Το 1973, οι Ross και Glomset ανέλυσαν μια σειρά από παρατηρήσεις και πρότειναν ως πρώτο βήμα της αθηρογένεσης την ενδοθηλιακή βλάβη, που ακολουθείται από διάφορες απαντήσεις που μεταβάλλουν τις φυσιολογικές ομοιοστατικές ιδιότητες των αγγείων.[21] Το 1977 ο Ross πρότεινε μια ενοποιημένη υπόθεση που στήριζε ότι η “ανταπόκριση στον τραυματισμό ενός αγγείου” είναι υπεύθυνη για την αθηροσκλήρωση όπου συμβαίνουν προσκόλληση, συσσώρευση και απελευθέρωση αιμοπεταλίων στο σημείο όπου έχει εκτεθεί ο υποενδοθηλιακός συνδετικός ιστός και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων.[22] Η υπόθεση αυτή έδωσε τη θέση της στην έως και σήμερα πιθανώς αποδεκτή υπόθεση της “οξειδωτικής τροποποίησης”, σύμφωνα με την οποία το σημείο-κλειδί της αθηροσκλήρωσης είναι η οξείδωση της LDL χοληστερόλης.[23] Ενώ, θεωρεία που έχει αναπτυχθεί από μέλη της ερευνητικής μας ομάδας τονίζει το σημαντικό ρόλο του PAF στην έναρξη και την εξέλιξη της νόσου.[12]

Περιγραφή της αθηροσκλήρωσης

Το μυοκάρδιο αιματώνεται με τη βοήθεια στεφανιαίων αρτηριών. Μεταβολές σε μία ή περισσότερες από τις στεφανιαίες αρτηρίες προκαλούν ανεπαρκή παροχή αίματος στην καρδιά (ισχαιμία), βλάβη του μυοκαρδίου στην πάσχουσα περιοχή και σε σοβαρή κατάσταση θάνατο αυτού του τμήματος της καρδιάς (έμφραγμα του μυοκαρδίου). Αυτά τα συμβάντα συναποτελούν τη στεφανιαία νόσο. Το κύριο αίτιό της είναι η παρουσία αθηροσκλήρωσης στα αγγεία.[3]

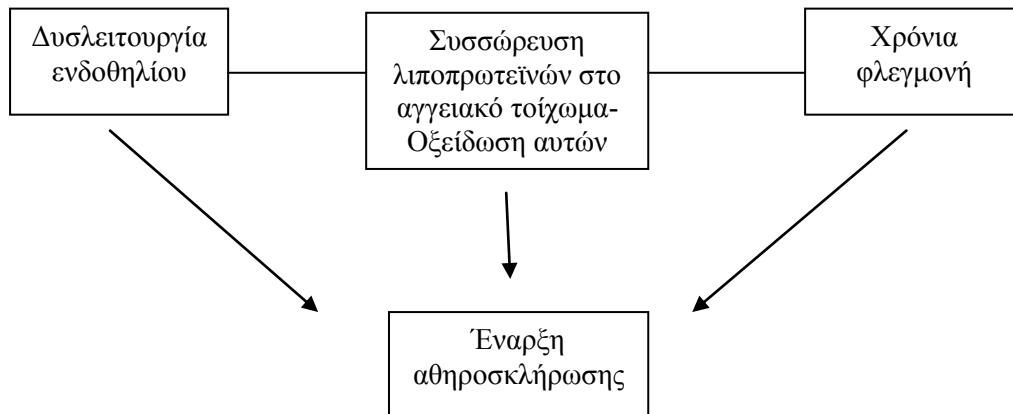
Η αθηροσκλήρωση είναι η σημαντικότερη πάθηση των αρτηριών. Πρόκειται για μια φλεγμονώδη νόσο του αρτηριακού τοιχώματος που χαρακτηρίζεται από προοδευτική συσσώρευση λιπιδίων και φλεγμονωδών κυττάρων, εντός του έσω χιτώνα των μεγάλων αρτηριών. Χρόνια εναπόθεση οδηγεί στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Η πλάκα αποτελείται από ένα εξωτερικό ινώδες περίβλημα που συνίσταται από λεία μυϊκά κύτταρα, κολλαγόνο και λιπίδια και από ένα νεκρωτικό πυρήνα με κυτταρικά αποθέματα, χοληστερόλη και ασβέστιο ως περιεχόμενο.[24] Η δημιουργία πλάκας συνεπάγεται πάχυνση του αιμοφόρου αγγείου λόγω συσσώρευσης παθολογικών κυττάρων λείων μυϊκών ινών, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων, εναποτιθέμενης χοληστερόλης και άλλων λιπαρών ουσιών και πυκνού συνδετικού ιστού στη θεμέλια ουσία των κυττάρων. Η χρόνια εναπόθεση των συστατικών της πλάκας έχει ως αποτέλεσμα την αγγειακή στένωση και την ανεπαρκή στεφανιαία ροή αίματος.

Η διαδικασία της αθηρογένεσης ξεκινά από μικρή ηλικία, περίπου κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής σε σημεία όπου το αγγειακό-αρτηριακό τοίχωμα έχει υποστεί μικροτραυματισμούς. Ωστόσο, φαίνεται πως η εναπόθεση λίπους στις αρτηρίες ξεκινά στην πρώτη δεκαετία της ζωής και εξελίσσεται ασυμπτωματικά έως ότου η πλάκα γίνει εμφανής στη δεύτερη δεκαετία.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε φυσιολογικές συνθήκες το ενδοθήλιο λειτουργεί ως φραγμός, προκειμένου τα συστατικά του αίματος να μην έρχονται σε επαφή με τους υποενδοθηλιακούς ιστούς και απελευθερώνει πρωτεΐνες στην επιφάνειά του, που αποτρέπουν την πήξη και διατηρούν μια φυσιολογική ροή αίματος. Ωστόσο, η ύπαρξη ορισμένων παραγόντων (αυξημένη αρτηριακή πίεση, τοξίνες στο αίμα εξ αιτίας του καπνίσματος, κ.α) μπορεί να διακόψει τη φυσιολογική συνέχεια του ενδοθηλίου με επακόλουθο τη δυσλειτουργία του και την απώλεια των φυσιολογικών λειτουργιών του (ενεργοποιημένο ενδοθήλιο).

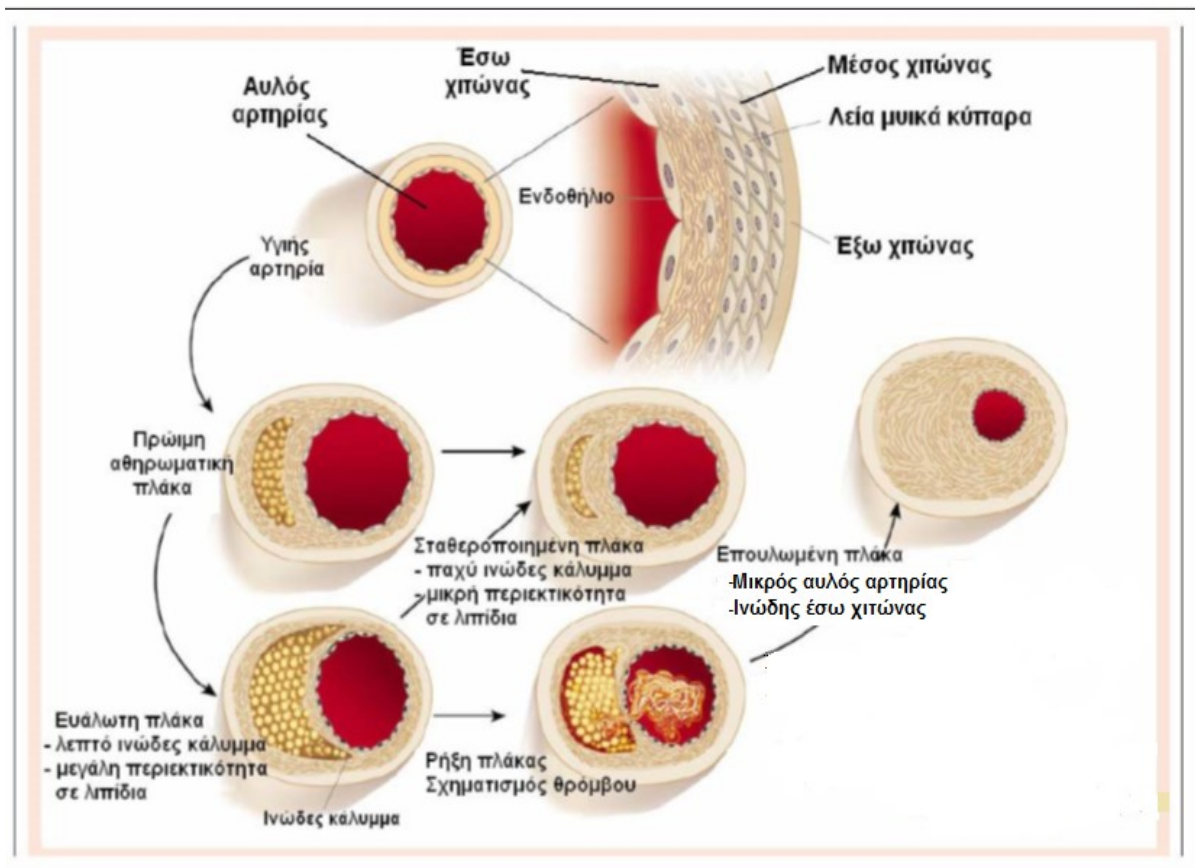
Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου αποτελεί και το πρώτο βήμα της αθηροσκλήρωσης. Η αθηροσκλήρωση αρχίζει υπό τη μορφή λιπαρών γραμμώσεων στην εσωτερική επιφάνεια των αρτηριών οι οποίες δημιουργούνται από ενδοκυτταρική εναπόθεση λιπιδίων. Τα σωματίδια της LDL διεισδύουν και συσσωρεύονται στην εξωκυτταρική μήτρα (ECM) κάτω από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο. Η LDL με αυτόν τον τρόπο καθίσταται στόχος για οξειδωτικές και ενζυματικές τροποποιήσεις.

Το ενδοθήλιο εκθέτει διάφορα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης γεγονός που συμβάλλει στην προσέλκυση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στην κατεστραμμένη περιοχή. Η οξειδωμένη LDL ενισχύει μια σειρά προ-φλεγμονωδών αντιδράσεων μέσω διαφορετικών μεσολαβητών (TNF- α , IL-1, κλπ), διαιωνίζοντας την ενεργοποίηση, μετανάστευση και στρατολόγηση των μονοκυττάρων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. T-λεμφοκύτταρα) κατά μήκος της ενδοθηλιακής στιβάδας. Επιπρόσθετα, διεγείρεται η συσσώρευση, ο πολλαπλασιασμός και η μετακίνηση των λείων μυϊκών κυττάρων (VSMC) και των λευκοκυττάρων από το μέσο χιτώνα προς τον αυλό του αγγείου (υποενδοθηλιακό χώρο), συμβάλλοντας στην εξέλιξη της δομής της πλάκας. Στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων συνεισφέρει και η ιντερλευκίνη 1 β (IL-1 β) μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη.



Σχήμα 1: Έναρξη αθηροσκλήρωσης

Όταν η πλάκα αναπτυχθεί πολύ, έχοντας μη λεία επιφάνεια και αρχίζοντας να διαρρηγνύεται, αποτελεί τόπο προσκόλλησης αιμοπεταλίων δημιουργώντας ένα πήγμα-θρόμβο. Ο θρόμβος αυτός έχει εναποτιθέμενο ινωδογόνο και παγιδεύει και διάφορα άλλα κύτταρα του αίματος με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται συνεχώς μέχρι να αποφράξει το αγγείο. Ωστόσο, το πήγμα δύναται να αποκοπεί από το σημείο δημιουργίας του και να μεταφερθεί με τη ροή του αίματος σε ένα πιο περιφερικό σημείο της στεφανιαίας αρτηρίας προκαλώντας επίσης απόφραξη στο σημείο αυτό.[24]



Εικόνα 2: Σταδιακή εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας (πηγή: [25])

Υπάρχουν ουσιαστικά δεδομένα που δείχνουν ότι ο PAF είναι από τους πιο ισχυρούς μεσολαβητές της αθηροσκλήρωσης και της φλεγμονής, καθώς συμβάλλει στην αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, παίζει σημαντικό ρόλο στις θρομβωτικές επιπλοκές, επάγει την απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου, προωθεί την οξείδωση της LDL ενώ παράγεται και κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL.

Τα υψηλά επίπεδα LDL και συνεπώς και οξειδωμένης LDL έχουν ως επακόλουθο την αύξηση των επιπέδων PAF και PAF-like lipids, καθώς αυτά παράγονται κατά τη διάρκεια της οξείδωσής της και οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Το ίδιο συμβαίνει και στη συστηματική φλεγμονή. Τα PAF και PAF-like lipids, στη συνέχεια, πυροδοτούν την ενεργοποίηση των κυττάρων, κατά βάση αιμοπεταλίων, τα οποία με τη σειρά τους αυξάνουν περαιτέρω τα επίπεδα του PAF.

Τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς PAF και ως εκ τούτου ενεργοποιούνται από τον PAF. Αυτοί οι υποδοχείς, δρώντας ως σηματοδότες για την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, έχουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της

αθηροσκλήρωσης. Ο PAF φαίνεται να είναι το συνδετικό μόριο για την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων-δυσλειτουργικού ενδοθηλίου.

Αυξημένα επίπεδα του PAF στο αίμα μπορεί να προωθήσουν μια ταχεία φλεγμονώδη απόκριση στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς αυξάνονται σε αυτά υποδοχείς του PAF. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου γεγονός κρίσιμο στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, επίσης, δύνανται να παράγουν και να εκφράζουν τον PAF στις επιφάνειές τους (μεμβρανοσύνδετος). Οι παραπάνω διαδικασίες οδηγούν στην απελευθέρωση διάφορων λιποειδικών μεσολαβητών, κυτταροκινών, ενζύμων και στην έκφραση μορίων προσκόλλησης, προϊόντα που συμβάλλουν στη διάδοση της αθηροσκλήρωσης. Το ενδοθήλιο ενεργοποιείται, δυσλειτουργεί και δημιουργούνται διάκενα διακόπτοντας τη συνέχεια του ενδοθηλιακών κυττάρων.[12]

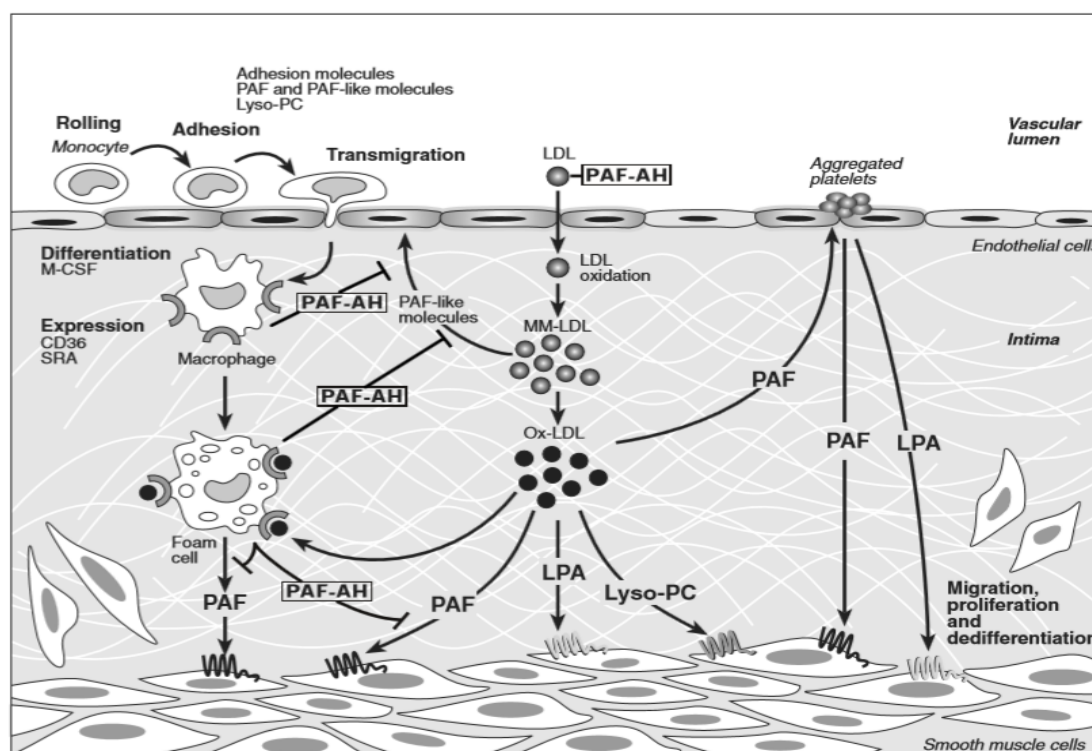
Τα επίπεδα του PAF και των λιποειδικών αναλόγων του στο πλάσμα ελέγχονται από ένζυμα που βρίσκονται συνδεδεμένα στις λιποπρωτεΐνες (LDL, HDL), τα οποία αποικοδομούν αυτά τα μόρια. Ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα είναι η ακετοϋδρολάση του PAF (PAF-AH), την οποία έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν τα ώριμα μακροφάγα και τα αιμοπετάλια. Η PAF-AH υδρολύει τον PAF και τον μετατρέπει στην ανενεργή του μορφή, το lyso-PAF. Είναι συνδεδεμένη κυρίως με την LDL παρά με την HDL, αποικοδομεί τον PAF και έτσι αναστέλλει τις προφλεγμονώδεις ιδιότητές του.[13] Είναι ικανή να καταστέλλει αθηρογόνες αλλαγές της LDL, τη φλεγμονή, την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, δρώντας ενάντια των μηχανισμών αθηρογένεσης. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η υπερέκφρασή της μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης.[12] Ωστόσο, όταν η LDL οξειδωθεί, η PAF-AH απενεργοποιείται γεγονός που δίνει πρόσφορο έδαφος για φλεγμονώδεις, αθηρογόνες και άλλες παθολογικές καταστάσεις, καθώς χάνεται η ικανότητα αποικοδόμησης του PAF.[13]

Εκτός από τα ένζυμα αποικοδόμησης, κάποιες μελέτες σε ζώα υποδεικνύουν ότι διάφοροι ανταγωνιστές του PAF έχουν επίσης προστατευτική δράση έναντι της αθηροσκλήρωσης.[26]

Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το ισοένζυμο της PAF-AH στο πλάσμα, δηλαδή η σχετιζόμενη με λιποπρωτεΐνη φωσφολιπάση A2 (LpPLA2), έχει προταθεί από ορισμένες

ερευνητικές ομάδες ως παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις, λόγω της προσκόλλησής της στις λιποπρωτεΐνες και κυρίως στα σωματίδια LDL.[27, 28]

Εκτός από τον PAF, έχει φανεί πως υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία φωσφολιπιδικών μεσολαβητών που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και την αθηροσκλήρωση. Οι μεσολαβητές αυτοί παράγονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και προκαλούν κυτταρική σηματοδότηση μέσω υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες. Στην πλειοψηφία τους συμμετέχουν στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και τη μετανάστευσή τους στο αγγειακό τοίχωμα, στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων.



Εικόνα 3: Ο ρόλος των φωσφολιπιδικών μεσολαβητών στην αθηροσκλήρωση (πηγή: [13])

Εμπλοκή αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση

Με την πάροδο των χρόνων, γίνεται όλο και πιο σαφές ότι τα αιμοπετάλια εκτός από το ρόλο που έχουν στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, ρυθμίζουν επίσης μια ποικιλία από φλεγμονώδεις απαντήσεις και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.[15, 29, 30] Τα αιμοπετάλια φαίνεται να έχουν διττό ρόλο καθώς

εμπλέκονται στις σοβαρές κλινικές επιπτώσεις της ρήξης της πλάκας σε εγκατεστημένη αθηροσκλήρωση (τελικό στάδιο), αλλά επίσης διαμεσολαβούν και επηρεάζουν την πρόωμη ανάπτυξη της νόσου.[29]

Αρχικά στάδια αθηροσκλήρωσης

Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αθηρογένεση με απελευθέρωση χυμοκινών, αλληλεπίδραση με οξειδωμένη LDL, άμεση αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα, απελευθέρωση μικροσωματιδίων και παροχή φλεγμονωδών μεσολαβητών.[31]

Δεδομένης της σημασίας των λιπαρών οξέων στη γένεση της αρτηριοσκλήρωσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η οξειδωμένη LDL -ένας από τους σημαντικότερους μεσολαβητές της αθηροσκλήρωσης- μπορεί να δεσμεύεται και να αλληλεπιδρά με τα αιμοπετάλια και να προκαλείται αλλαγή στη λειτουργία τους.[30]

Στα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης, η φλεγμονή που υφίσταται το αγγειακό τοίχωμα εξασθενεί τις λειτουργίες και επηρεάζει την ακεραιότητα του ενδοθηλίου. Τα αιμοπετάλια προσελκύονται προς την περιοχή που φλεγμαίνει ακόμα και αν δεν έχει διακοπεί η συνέχεια του ενδοθηλίου. Αυτό συμβαίνει γιατί εκφράζουν στην επιφάνειά τους διάφορους φλεγμονώδεις υποδοχείς.

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η επιφάνειά τους υπερεκφράζει διάφορα μόρια προσκόλλησης και δείκτες ενεργοποίησης, όπως P-σελεκτίνη, CD40L, PF4 και GP IIb/IIIa τα οποία έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με την παρουσία φλεγμονής και αθηροσκλήρωσης.[15] Αυτά συμβάλλουν στην προσέλκυση λευκοκυττάρων (PF4), συμπεριλαμβανομένων και των μονοκυττάρων που αποτελούν και έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την πρόωθηση της αθηρογένεσης αλλά και στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο (CD40L). Η P-σελεκτίνη αναγνωρίζει στα λευκοκύτταρα τον PSGL-1 ο οποίος συμβάλλει στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων. Η πληθώρα των βιοδραστικών μορίων, φλεγμονωδών μεσολαβητών και αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται από τα κοκκία των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίησή τους ωθεί και υποστηρίζει τις φλεγμονώδεις διεργασίες στο αρτηριακό τοίχωμα.[19, 30]

Παράλληλα, ένα ευρύ φάσμα μορίων προσκόλλησης και ενεργοποίησης αιμοπεταλίων εκφράζεται και στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, συμπεριλαμβανομένων σελεκτινών (P-

σελεκτίνη), κυτταρικών μορίων προσκόλλησης και χυμοκινών τα οποία συμβάλλουν στη προσέλκυση και δέσμευση αιμοπεταλίων στην περιοχή αυτή. Στο δυσλειτουργικό ενδοθήλιο εκφράζονται προφλεγμονώδεις μεσολαβητές ενώ ταυτόχρονα εξασθενεί η τοπική παραγωγή των αναστολέων αιμοπεταλίων, συμβάντα που ενισχύουν περαιτέρω την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.[19, 30]

Ταυτόχρονα, οι παράγοντες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια αφού αλληλεπιδράσουν με το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο, εκτός από τα λευκοκύτταρα, προσελκύουν λεία μυϊκά κύτταρα στον υποενδοθηλιακό ιστό, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό τους και συμβάλλοντας στην εξέλιξη της πλάκας.[20]

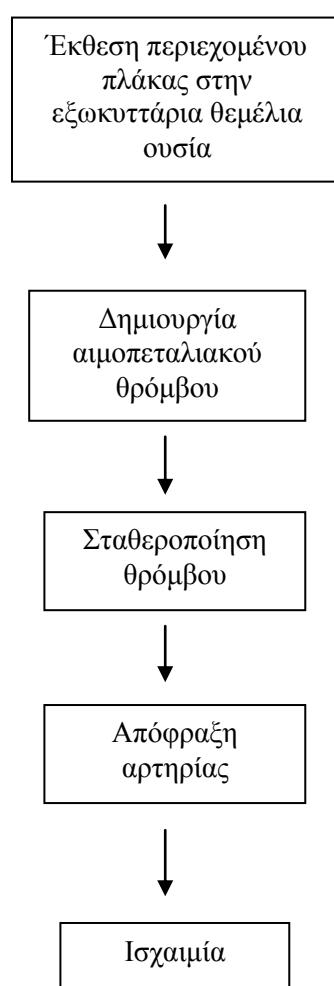
Εφόσον η αθηροσκλήρωση έχει αναγνωρισθεί ως μια φλεγμονώδης ασθένεια, το ανοσοποιητικό σύστημα καθίσταται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Το σύστημα του συμπληρώματος, ως μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος, έχει σημαντικές προστατευτικές λειτουργίες στην ανοσολογική άμυνα, αλλά μπορεί επίσης να είναι η κινητήρια δύναμη πίσω από τις παθολογικές διαδικασίες της χρόνιας φλεγμονής.[30] Ένας αγγειακός τραυματισμός μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για το σύστημα του συμπληρώματος και αυτό να οδηγήσει σε συνθήκες φλεγμονής. Φαίνεται πως τα αιμοπετάλια εκφράζουν έναν αριθμό υποδοχέων για το σύστημα του συμπληρώματος, συμβάλλοντας έτσι στην όλη διαδικασία.[31]

Τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους απελευθερώνουν μικροσωματίδια διαμέτρου 0.1 με 1.0μm τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια και RNA και μπορούν να επηρεάσουν άλλα κύτταρα.[15] Τα μικροσωματίδια αυτά είναι προφλεγμονώδεις παράγοντες που έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν τη λειτουργία του αγγειακού τοιχώματος και των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων.[19]

Επίσης, τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με ουδετερόφιλα και ωθούν την απελευθέρωση NET από αυτά, δίκτυα που χρησιμεύουν για την παγίδευση, συγκράτηση και εξουδετέρωση των εισερχόμενων μικροβίων.[15]

Τελικό στάδιο αθηροσκλήρωσης (Ρήξη πλάκας)

Στα μεταγενέστερα στάδια της αθηρωματικής διαδικασίας, η πλάκα αποσταθεροποιείται και διαρρηγνύεται το ινώδες κάλυμμά της. Τα θρομβογόνα συστατικά της, εκτίθενται στον αυλό και έτσι εκκινείται η παραγωγή ινώδους. Παράλληλα, ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια καθώς και η αλληλουχία πήξης.[31] Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην εκτεθειμένη υποενδοθηλιακή επιφάνεια του αγγείου, που περιλαμβάνει τη συντονισμένη δράση των υποδοχέων GPVI, GPIIb και των ιντεγκρινών $\alpha_2\beta_1$, $\alpha\text{IIb}\beta_3$ [19] και η ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης, οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβου και στις σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκληρωτικής νόσου.[20]



Σχήμα 2: Συμβάντα μετά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας

1.5 Επίδραση της διατροφής στα αιμοπετάλια και κατ' επέκταση στην αθηροσκλήρωση

Η ανθυγιεινή διατροφή θεωρείται μια από τις κύριες αιτίες της αυξημένης επίπτωσης της αθηρωματικής νόσου στις βιομηχανικές χώρες. Παράλληλα, επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν την εξέχουσα σημασία μιας καλά ισορροπημένης διατροφής πλούσιας σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, λαχανικά, φρούτα και ποτά πλούσια σε πολυφαινόλες (Μεσογειακή Δίαιτα) ενάντια στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου. Πολλαπλά δεδομένα έχουν αποδείξει ότι τα διαιτητικά συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας εμφανίζουν σημαντικές αντι-αθηροσκληρωτικές και αντι-θρομβωτικές ιδιότητες, συμβάλλουν στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και της αγγειακής λειτουργίας, καθώς και στη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής. Αυτό σημαίνει ότι ελέγχουν βασικά σημεία-κλειδιά για την παθογένεια αθηροσκλήρωσης. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένα τρόφιμα ή/και τα βιοενεργά συστατικά τους, έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στη μείωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών, γεγονός που εξασθενεί το μελλοντικό κίνδυνο για θρόμβωση. Παρ' όλα αυτά, τα περισσότερα στοιχεία βασίζονται σε *in vitro* πειράματα, μόνο λίγα από αυτά στηρίζονται σε μελέτες σε πειραματικά πρότυπα και ακόμα πιο λίγα σε ανθρώπους.

Στη συνέχεια αναλύονται κάποια συστατικά/τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας που φαίνεται ότι έχουν αντιαιμοπεταλιακές δράσεις στον οργανισμό καθώς και ο προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο τις επιτελούν.[20]

Ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)

Η παρατήρηση ότι οι Εσκιμώοι της Γροιλανδίας είχαν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, με την πιο πιθανή εξήγηση να είναι η υψηλή πρόσληψη θαλασσινών που περιέχουν ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, έδωσε έναυσμα για να μελετηθούν περαιτέρω οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των διαιτητικών ω3 PUFA (εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA C20: 5 n-3) και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ DHA C22:6 n-3). Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι μια αύξηση της πρόσληψης ψαριών κατά 20g ανά ημέρα, έχει συσχετιστεί με 7% χαμηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο. Οι κύριοι προτεινόμενοι μηχανισμοί που εξηγούν αυτές τις ιδιότητες των ω3 περιλαμβάνουν τη βελτίωση στο προφίλ των λιπιδίων (κυρίως μέσω της μείωσης των

επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα), την εκδήλωση αντι-φλεγμονωδών αντιδράσεων, τη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας (μειωμένη διήθηση μονοκυττάρων) και τη μειωμένη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες των $\omega 3$ λιπαρών οξέων που προέρχονται από τα ψάρια αποδίδονται κυρίως στην ενσωμάτωση των $\omega 3$ πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη φωσφολιπιδική μεμβράνη, τροποποιώντας το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, με επακόλουθο τη μείωση της απελευθέρωσης TXA_2 . Η ενσωμάτωση των $\omega 3$ PUFA στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης τελικά αλλάζει τις ισορροπίες παραγωγής εικοσανοειδών προς ένα αντι-θρομβωτικό προφίλ.

Έχει επίσης αποδειχθεί, ότι τα $\omega 3$ πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βελτιώνουν την αγγειακή λειτουργία και ενισχύουν την απελευθέρωση NO, διαμορφώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Το α -λινολενικό οξύ (ALA), ένα $\omega 3$ πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που βρίσκεται σε φυτικά έλαια, έχει επίσης αποδειχθεί ότι ασκεί αντιαιμοπεταλιακή δράση.

Ελαιόλαδο

Έχει αποδειχθεί ότι το ελαιόλαδο αναστέλλει μερικώς τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP, το κολλαγόνο και το αραχιδονικό οξύ, με αποτέλεσμα μικρότερη απελευθέρωση TXA_2 . Οι προστατευτικές ιδιότητες του ελαιολάδου αποδίδονται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητα του σε $\omega 9$ μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA 70-85% περιεκτικότητα), συνηθέστερα με τη μορφή ελαϊκού οξέος αλλά και στα διάφορα μικροθρεπτικά συστατικά του (π.χ. φαινολικές ενώσεις).

Κρεμμύδι και σκόρδο (ajoene)

Τα φυτά αυτά ανήκουν στο ίδιο γένος, Allium. Το κρεμμύδι (Allium cepa) και το σκόρδο (Allium sativum) ασκούν διάφορες ευεργετικές δράσεις στον οργανισμό.

Η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων φανερώνεται κατά βάση όταν είναι ωμά παρά μαγειρεμένα. Το κρεμμύδι, όπως και το σκόρδο, μειώνει τη σύνθεση της TXA_2 , αλλά η αντιαιμοπεταλιακή του δράση είναι 13 φορές ασθενέστερη σε σχέση με εκείνο. Πολλά συστατικά του είδους Allium, όπως η αλισίνη, τα παραφινικά, το υδρόθειο και η αδενοσίνη φαίνεται να μπορούν να αναστείλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το κοινό στοιχείο αυτών των ενώσεων είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε

θείο το οποίο ίσως είναι και ο λόγος που ασκούν αντιαιμοπεταλιακή δράση. Η ajoene, ένα προϊόν της αλισίνης, πιστεύεται ότι είναι η κύρια υπεύθυνη ουσία που υπάρχει στο σκόρδο και εμποδίζει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ajoene εμποδίζει τη δέσμευση του ινωδογόνου και του vWF στον υποδοχέα GPIIb/IIIa. Μία ακόμα δράση της ajoene είναι η μείωση της παραγωγής TXA_2 μετά από μεταβολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Κάποια παραφινικά σουλφίδια του Allium φανερώνουν επίσης αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες μέσω αναστολής της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και της κινητοποίησης Ca^{2+} (που επάγεται από τη θρομβίνη) καθώς και διακοπής σύνθεσης TXA_2 .

Τομάτα

Έρευνες έχουν φανερώσει ότι η τομάτα έχει διάφορες ευεργετικές ιδιότητες (π.χ. μείωση των επιπέδων των λιπιδίων, αντιοξειδωτικές και αντιαιμοπεταλιακές δράσεις) τόσο ως φρέσκο όσο και ως τυποποιημένο-επεξεργασμένο προϊόν. Η πιθανότερη εκδοχή για την αντιαιμοπεταλιακή της δράση είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ της αδενοσίνης (και άλλων νουκλεοσιδίων) με 3 υποδοχείς αιμοπεταλίων ($GPVI$, P_2Y_1 και P_2Y_{12}). Βιοδραστικά συστατικά της τομάτας αντιδρούν με εσωτερικά μονοπάτια σηματοδότησης που λειτουργούν στα αιμοπετάλια, εξασθενώντας τη δράση αυτών των υποδοχέων. Οι έρευνες διχάζονται για το αν το λυκοπένιο, που εμπεριέχεται στην τομάτα, είναι το υπεύθυνο συστατικό που επηρεάζει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων.

Μανιτάρια

Τα μανιτάρια περιέχουν πολλά βιοδραστικά συστατικά τα οποία χαρακτηρίζονται από αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, νευροπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές, αντι-υπερτασικές, αντιδιαβητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Την τελευταία δεκαετία, έχει φανεί ότι τα μανιτάρια δύνανται να επηρεάζουν τα μεταβολικά μονοπάτια και να αλληλεπιδρούν με διάφορους υποδοχείς αιμοπεταλίων, κάτι που τα καθιστά ικανά να εκδηλώνουν αντιαιμοπεταλιακή δράση. Η αντιαιμοπεταλιακή ιδιότητά τους παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς τα μανιτάρια έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω πολλαπλών πιθανών στόχων, αλληλεπιδρώντας με ποικίλους υποδοχείς και συσσωρευτικούς παράγοντες (ADP, θρομβίνη, κολλαγόνο).

Κακάο

Μελέτες έχουν αναδείξει τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις του κακάο και της σοκολάτας καθώς και τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιυπερτασικές τους ιδιότητες. Η κατανάλωσή τους σε μέτρια συχνότητα φαίνεται να βελτιώνει την αγγειακή λειτουργία και να μειώνει την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων. Αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες της σοκολάτας οφείλονται, εν μέρει, στο πλούσιο περιεχόμενό της σε φαινολικά συστατικά (κερκετίνη, επικατεχίνη, προκυανιδίνη). Μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι μια μέτρια κατανάλωση κακάο ή μαύρης σοκολάτας (σε οξεία ή χρόνια βάση) αναστέλλουν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων με προτεινόμενο μηχανισμό τη μείωση των ADP, επινεφρίνης, αδρεναλίνης, κάτι που συνεπάγεται τη μείωση της ενεργοποίησης του GPIIb/IIIa, της έκφρασης της P-σελεκτίνης και της δραστηριότητας των PLA₂ και COX. Επιπλέον, φαίνεται να συνεισφέρουν στην αύξηση της παραγωγής NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ποτά - Αλκοόλ

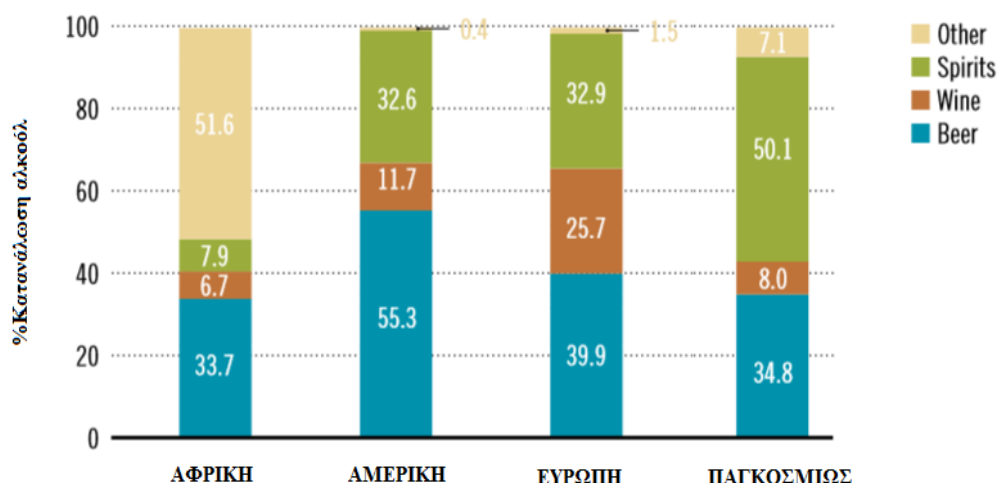
Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει πως η κατανάλωση αλκοόλ έχει ποικίλες ευεργετικές επιδράσεις για τον οργανισμό και δύναται να μειώσει τη συχνότητα κάποιων χρόνιων παθήσεων με σημαντικότερη τη μείωση του κινδύνου για CVD. Οι εξαιρετικά επωφελείς ιδιότητές του, οφείλονται είτε στην αιθανόλη, είτε σε κάποια χρήσιμα συστατικά του, είτε στο συνδυασμό των δράσεων αυτών. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί, θα αναλυθούν με λεπτομέρειες οι δράσεις του και οι μηχανισμοί του.[20, 32]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΩΦΕΛΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΚΑΤΆΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

2.1 Εισαγωγή

Επιδημιολογικά δεδομένα κατανάλωσης αλκοόλ

Η χρήση οινοπνευματωδών ποτών αποτελεί αναπόσπαστο μέρος πολλών πολιτισμών εδώ και χιλιάδες χρόνια. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (WHO), σε παγκόσμιο επίπεδο κατά μέσο όρο, η ετήσια κατανάλωση αλκοόλ είναι 6,2 λίτρα ανά άτομο, ηλικίας 15 ετών και άνω, το οποίο μεταφράζεται σε 13,5 γραμμάρια καθαρής αλκοόλης ανά ημέρα.[33] Ο WHO εκτιμά ότι ετησίως το 38% όλων των ατόμων ηλικίας 15 ετών και άνω σε όλο τον κόσμο καταναλώνει αλκοόλ.[34] Τα υψηλότερα επίπεδα κατανάλωσης κατέχουν οι ανεπτυγμένες χώρες, ιδίως στην ευρωπαϊκή και αμερικανική περιφέρεια, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά παρατηρούνται στις περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και ειδικότερα στην περιφέρεια της ανατολικής Μεσογείου. Αξιοσημείωτες είναι οι διαφορές που υπάρχουν στο είδος του ποτού που καταναλώνεται ανάλογα τη γεωγραφική περιοχή. Σε παγκόσμιο επίπεδο, το 50,1% της συνολικής κατανάλωσης που καταγράφηκε αφορά τα βαριά οινοπνευματώδη ποτά. Στη συνέχεια ακολουθούν η μπύρα με ποσοστό 34,8% και το κρασί με 8% το οποίο ωστόσο, αντιπροσωπεύει το ένα τέταρτο της συνολικής κατανάλωσης στην ευρωπαϊκή περιφέρεια.



Εικόνα 4: Ποσοστά κατανάλωσης αλκοόλ με τη μορφή μύρας, κρασιού, βαριά οиноπνευματωδών και άλλων σε Αφρική, Αμερική, Ευρώπη και σε παγκόσμιο επίπεδο το 2010 (πηγή:[33])

Το αλκοόλ μπορεί να θεωρηθεί επιβλαβές και η κατανάλωσή του μπορεί να έχει αντίκτυπο στη συχνότητα εμφάνισης ασθενειών και γενικά σε προβλήματα υγείας. Φαίνεται πως έχει τοξικές επιδράσεις στα όργανα και τους ιστούς, προκαλεί δηλητηριάσεις, αλλοιώνει το συντονισμό, τα αντανακλαστικά, τη συνείδηση, τη γνωστική λειτουργία, την αντίληψη, επηρεάζει τη συμπεριφορά και μπορεί να οδηγήσει σε εξάρτηση. Ωστόσο, το αλκοόλ δύναται να αποτελέσει ευεργετικό ερέθισμα και να συμβάλλει στην καλή υγεία και ευεξία του ανθρώπου, έπειτα από την σωστή ρύθμιση και επιλογή δύο παραγόντων: του μοτίβου κατανάλωσης και της ποιότητας του ποτού.[33]

Μεταβολισμός της αιθανόλης

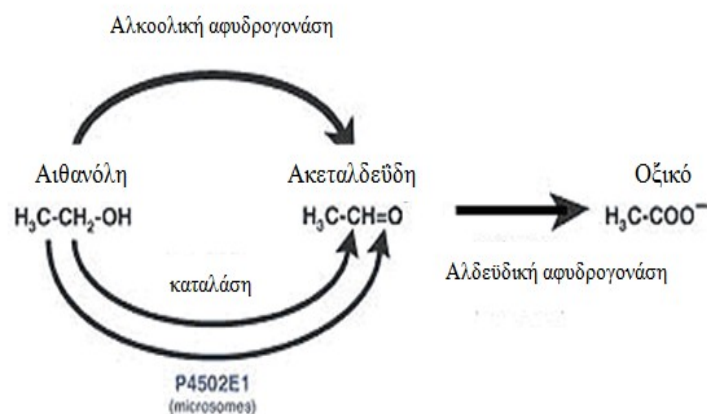
Η αιθανόλη είναι ένα διαφανές, άχρωμο υγρό το οποίο παράγεται από τη ζύμωση σακχάρων-υδατανθράκων που περιέχονται σε φυτικά προϊόντα όπως φρούτα, λαχανικά και σιτηρά. Η κατανάλωση ενός ποτού ισοδυναμεί με λήψη 13-14 γραμμαρίων καθαρού οινόπνευματος. Ως ένα ποτό μπορούν να χαρακτηρισθούν 360ml μύρας, 120ml κρασιού, 38ml υψηλόβαθμου ποτού, ποσότητες οι οποίες περιέχουν περίπου ίσες δόσεις αλκοόλ. Το οινόπνευμα παρέχει ενέργεια και συγκεκριμένα περιέχει και δίνει 7 θερμίδες ανά γραμμάριο. Ωστόσο, οι θερμίδες των οινόπνευματωδών ποτών χαρακτηρίζονται ως

κενές θερμίδες, καθώς τα αλκοολούχα ποτά δεν περιέχουν σημαντικές ποσότητες πρωτεϊνών, βιταμινών κα ανόργανων συστατικών. Το αλκοόλ απορροφάται γρήγορα και πλήρως από το στομάχι (κατά 20%) και από το έντερο.[35]

Ο μεταβολισμός πρώτης διόδου του αλκοόλ από το στομάχι φαίνεται να είναι πιο αποδοτικός στους άνδρες, ενώ αντίθετα στις γυναίκες μπορεί να επιφέρει υψηλότερα επίπεδα αλκοόλ στο αίμα.[36]

Η κατανάλωση αλκοόλ όταν η πεπτική οδός είναι άδεια συμβάλλει στην αύξηση της ταχύτητας απορρόφησης. Αντιθέτως, η κατανάλωση κατά τη διάρκεια ή μετά το γεύμα μειώνει το ρυθμό απορρόφησης.[35]

Το οινόπνευμα εισέρχεται στο αίμα και διανέμεται στους διάφορους ιστούς αραιωμένο στα υγρά του σώματος, κατά αναλογία με τη σχετική περιεκτικότητά τους σε νερό. Η εξισορρόπηση του αλκοόλ εντός ενός ιστού εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητά του σε νερό. Η αιθανόλη είναι πρακτικά αδιάλυτη σε λίπη και έλαια, αν και σαν το νερό, μπορεί να περάσει μέσα από τις βιολογικές μεμβράνες. Η ίδια δόση οиноπνεύματος ανά μονάδα σωματικού βάρους μπορεί να παράγει πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις οινόπνεύματος στο αίμα σε διαφορετικά άτομα, λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων στις αναλογίες λίπους και νερού στο σώμα τους. Για παράδειγμα, οι γυναίκες έχουν γενικά μικρότερο όγκο κατανομής για το αλκοόλ από τους άνδρες λόγω του υψηλότερου ποσοστού σωματικού λίπους.[36] Μια μικρή ποσότητα αλκοόλ (3-10%) απεκκρίνεται μέσω της αναπνοής, των ούρων ή του ιδρώτα με το μεγαλύτερο ποσοστό να μεταβολίζεται στο συκώτι. Όμως, ο ρυθμός με τον οποίο το ήπαρ δύναται να διασπά το αλκοόλ είναι περιορισμένος καθώς μεταβολίζει περίπου ένα ποτό την ώρα. Έτσι, αν ο ρυθμός κατανάλωσης γίνει μεγαλύτερος, τα επίπεδα αλκοόλ στο αίμα αυξάνονται συνεχώς, συσσωρεύονται και μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα στον οργανισμό. Ανάμεσα στα προϊόντα του μεταβολισμού της αιθανόλης από το ήπαρ συμπεριλαμβάνονται το γαλακτικό οξύ, η ακεταλδεΐδη και το οξικό οξύ, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να μεταφερθούν στο αίμα και να αξιοποιηθούν για ενέργεια. Επιπλέον, το ήπαρ μετατρέπει τα μεταβολικά υποπροϊόντα του οινόπνεύματος σε λιπαρά οξέα που είτε αποθηκεύονται στο συκώτι είτε μεταφέρονται στο αίμα. [35]



Εικόνα 5: Προϊόντα μεταβολισμού αιθανόλης (πηγή: [37])

2.2 Η θέση του αλκοόλ στα καρδιαγγειακά νοσήματα

Επιδημιολογικές μελέτες

Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι η μέτρια κατανάλωση οινοπνεύματος μειώνει την επίπτωση της πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου, έχοντας για αυτή περισσότερες ενδείξεις-αποδείξεις από κάθε άλλη ασθένεια. [24, 34, 38, 39] Το αλκοόλ ασκεί άμεσες δράσεις σε συγκεκριμένες παθογενετικές οδούς της στεφανιαίας νόσου.[40]

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 υποβλήθηκαν οι πρώτες μελέτες παρατήρησης που αναφέρονταν στο πιθανό όφελος της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ, ενώ απομονωμένες μη δημοσιευμένες αναφορές χρονολογούνταν από πολύ πιο πριν. Μία από τις καλύτερα τεκμηριωμένες ασθένειες που επισημάνθηκε ο ευεργετικός ρόλος του αλκοόλ, ήταν το έμφραγμα του μυοκαρδίου (έκβαση αθηροσκλήρωσης) βάσει δεκάδων προοπτικών μελετών μεγάλης κλίμακας. Η κατανάλωση αλκοόλ έχει επίσης συσχετιστεί με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου μεταξύ ατόμων υψηλού κινδύνου, όπως τα διαβητικά άτομα.[41]

Από τη μελέτη Kaiser Permanente το 1974 και μετά, περισσότερες από 100 μελέτες παρατήρησης, επιδημιολογικές, case-control και προοπτικές έχουν δείξει ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μειώνει τον κίνδυνο νέας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, στηθάγχης και εμφράγματος του μυοκαρδίου, όπως και την καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Αυτή η

μείωση του κινδύνου, σε σχέση με όσους απέχουν από το αλκοόλ, βρίσκεται μεταξύ 25% και 35% των ενηλίκων.[42]

Συστηματικές μελέτες ανασκόπησης και μετα-αναλύσεις έχουν ασχοληθεί με τη συσχέτιση της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ και τον κίνδυνο για CHD. Σε 29 μελέτες, ο σχετικός κίνδυνος για CHD σε όσους πίνουν σε σχέση με όσους δεν πίνουν κυμάνθηκε από 0,49 έως 0,97. Αυτή η ευεργετική επίδραση του αλκοόλ εξαφανίζεται σε υψηλές δόσεις.[42]

Μια προοπτική μελέτη που περιελάμβανε 51.529 άνδρες εξέτασε τη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και του κινδύνου στεφανιαίας νόσου σε άνδρες χωρίς προϋπάρχουσες καρδιαγγειακές διαταραχές. Μετά από 12 χρόνια παρακολούθησης, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση αιθανόλης τουλάχιστον 3 με 4 φορές την εβδομάδα συνδέεται αντιστρόφως με την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου. [43-45]

Ο Klatsky και οι συνεργάτες του σε μια προοπτική μελέτη, έδειξαν ότι τα άτομα που κατανάλωναν καθημερινά 1-2 ποτά, είχαν μικρότερο κίνδυνο για θάνατο από CVD (Σχετικός κίνδυνος = 0,7). Η μεγαλύτερη μείωση κινδύνου εντοπίστηκε στον πληθυσμό των ηλικιωμένων.[46]

Σε 52 χώρες που συμμετείχαν στη μελέτη INTERHEART, η χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ βρέθηκε να σχετίζεται με μια σημαντική μείωση του ποσοστού εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ενήλικες, ανεξάρτητα από την ηλικία.[42]

Επίδραση της αιθανόλης στο βιοχημικό προφίλ

Γλυκόζη/Ινσουλίνη

Ορισμένες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι μια μικρή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της ινσουλίνης νηστείας, η οποία σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.[47] Επιπρόσθετα, αρκετοί άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει ευεργετικά αποτελέσματα της μέτριας κατανάλωσης στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στο μεταβολισμό της γλυκόζης.[40, 48]

Η αιθανόλη έχει επίσης βρεθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα αδιπνονεκτίνης ορού η οποία φαίνεται να αυξάνει περαιτέρω την ευαισθησία στην ινσουλίνη, αυξάνοντας την οξείδωση των λιπών των μυών και έτσι μειώνοντας το λιπώδη ιστό. Αυτές οι διαδικασίες

πιθανόν να μειώνουν και τη φλεγμονή. Επιπλέον, το αλκοόλ μειώνει την υπεργλυκαιμία μέσω αναστολής της ηπατικής γλυκονεογένεσης, με προκύπτουσα μείωση στα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος. Αυτό έχει ως απόρροια μείωση της επίπτωσης υπεργλυκαιμίας και υπερινσουλιναϊμίας, οι οποίες είναι δείκτες κινδύνου για CHD. [40]

Λιποειδή

Η πιο καλά τεκμηριωμένη ευεργετική επίδραση του αλκοόλ, ανεξαρτήτως τύπου αλκοολούχου ποτού, είναι η αύξηση των επιπέδων της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL-C) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Αυτό πιθανόν να συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο μέσω προστασίας από το σχηματισμό αθηρώματος στις στεφανιαίες αρτηρίες.[34] Πιο συγκεκριμένα, ο ρόλος της HDL είναι η μεταφορά της χοληστερόλης από τις αρτηρίες στο ήπαρ που έχει ως επακόλουθο την απέκκριση αυτής, εμποδίζοντας έτσι τη συσσώρευσή της και ως εκ τούτου την αθηροσκλήρωση.[49] Μέχρι πρόσφατα θεωρούταν ότι η αύξηση της HDL ήταν η κύρια καρδιοπροστατευτική ρύθμιση της κατανάλωσης αλκοόλ. Ωστόσο, τρέχουσες μελέτες αναφέρουν ότι η αύξηση στην HDLc δεν είναι από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς με τους οποίους η αιθανόλη ασκεί τη δράση της ενάντια στην αθηροσκλήρωση, αλλά το αλκοόλ επιδρά και στα ακόλουθα: τριγλυκερίδια, LDLc, VLDLc, απολιποπρωτεΐνες (Apo) και λιποπρωτεΐνη α (ιδιαίτερα αθηρογόνο και αντι-ινωδολυτικό σωματίδιο λιποπρωτεΐνης).[41] Συγκεκριμένα, η αιθανόλη φαίνεται πως αυξάνει την κύρια πρωτεΐνη της HDL-C, την απολιποπρωτεΐνη A1 και μειώνει την LDL.[34, 40, 50]

Οι Sharpe et al (1995) έδειξαν ότι 200ml κόκκινου κρασιού την ημέρα για 10 ημέρες είναι αποτελεσματικά στη μείωση της συγκέντρωσης της λιποπρωτεΐνης α στο πλάσμα έως και κατά 12%. Φαίνεται πως η μείωση της λιποπρωτεΐνης α από την τακτική κατανάλωση αλκοόλ, μπορεί να επηρεάσει και να μειώσει την καρδιαγγειακή νοσηρότητα.[48]

Τα αποτελέσματα της αιθανόλης κυρίως στην HDL-c, αντιπροσωπεύουν το 50% της ευεργετικής επίδρασης της κατανάλωσης αλκοόλ στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, δηλαδή μπορούν να εξηγήσουν μόνο κατά το ήμισυ την προστασία έναντι της στεφανιαίας νόσου που παρέχεται από το αλκοόλ.[40, 51] Το υπόλοιπο ποσοστό που σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για CHD, πιστεύεται ότι οφείλεται στις αντι-θρομβωτικές επιδράσεις του αλκοόλ μέσω της μείωσης των επιπέδων ινωδογόνου και της αύξησης των επιπέδων αδιπονεκτίνης ορού.[40]

Αιμοπετάλια

Προοπτικές μελέτες (κοορτής) έχουν δείξει ότι η πρόσληψη αλκοόλ μειώνει αρκετούς υποκινητές της πήξης όπως τα κυκλοφορούντα επίπεδα ινωδογόνου, παράγοντες πήξης, το ιξώδες του αίματος και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων μειώνοντας την υπερπηκτικότητα και επομένως το σχετικό κίνδυνο για CHD. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις μειώσεις δεν είναι γνωστοί.[40, 41] Το αλκοόλ αυξάνει επίσης την ικανότητα εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα, η οποία έχει συσχετισθεί με χαμηλότερη επίπτωση στεφανιαίας νόσου.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση του αλκοόλ στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Έχει φανεί ότι η αιθανόλη αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που συμβαίνει λόγω απόκρισης σε διάφορους αγωνιστές όπως κολλαγόνο, θρομβίνη, ADP και παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), σε ανθρώπους καθώς και σε ζώα. Όλα τα δεδομένα in vitro τείνουν να αποδείξουν ότι το οινόπνευμα οδηγεί σε σημαντική μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από θρομβίνη, κολλαγόνο και ADP.

Στην Caerphilly Prospective Heart Disease Study (1992) φάνηκε ότι η κατανάλωση αλκοόλ συσχετίζεται αντίστροφα με την ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στη συσσωμάτωση που προκαλείται από κολλαγόνο και ADP. Το αλκοόλ φαίνεται επίσης να αναστέλλει την απελευθέρωση της TXA_2 που προκαλείται από διαφορετικούς αγωνιστές, αναστέλλοντας τη δράση της φωσφολιπάσης A_2 των αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, φαίνεται ότι σε μη επιλεγμένους πληθυσμούς η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ δεν ασκεί ανασταλτική επίδραση στη συσσωμάτωση που προκαλείται από θρομβίνη. Σε ορισμένες μελέτες, φαίνεται πως η αιθανόλη έχει ανασταλτική επίδραση επί της ενεργοποίησης ή/και της δραστηριότητας της φωσφολιπάσης C, η οποία θεωρείται ο δεύτερος τύπος ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.[52]

Επιπλέον, επηρεάζει το ινωδολυτικό σύστημα, μειώνει τη CRP και πιθανόν και άλλους δείκτες φλεγμονής, επομένως και τη φλεγμονή.[34] Συνδέεται επίσης με αύξηση της προστακυκλίνης στο αγγειακό τοίχωμα αυξάνοντας την αγγειοδιαστολή και απελευθέρωση οξειδίου του αζώτου από το ενδοθήλιο[40, 41], αποτρέποντας έτσι το σχηματισμό θρόμβου στις στεφανιαίες αρτηρίες.

Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ, η ίδια φαίνεται να επηρεάζει και διάφορους βιοδείκτες της προσκόλλησης σε κύτταρα που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση.[41]

Προϋποθέσεις εκδήλωσης ευεργετικών δράσεων

Προκειμένου να εμφανιστούν όλες οι παραπάνω ευεργετικές επιδράσεις του αλκοόλ είναι σημαντική η ρύθμιση δύο παραμέτρων: του προτύπου κατανάλωσης και του είδους του αλκοολούχου ποτού.

Πρότυπο κατανάλωσης αλκοόλ

Η βέλτιστη ποσότητα αλκοόλ που είναι ωφέλιμη για τον οργανισμό και ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τους κινδύνους για την υγεία που προέρχονται από αυτό, δεν μπορεί να αποτυπωθεί με ακρίβεια, λόγω των μεγάλων διαφορών μεταξύ των ατόμων. Γι' αυτό το λόγο, οι διεθνείς συστάσεις δίνουν έναν εύρος όπου έχει φανεί ότι το αλκοόλ ασκεί θετικές δράσεις στην υγεία του ανθρώπου, που αντανακλά στον όρο “μέτρια κατανάλωση”. [53] Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, ο ορισμός της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ έχει αλλάξει και τείνει να μειώνει την ποσότητα του αλκοόλ. [41] Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα ως μέτρια κατανάλωση, με βάση πολυάριθμες επιδημιολογικές και παρεμβατικές μελέτες, θεωρείται η πρόσληψη 20–30g αλκοόλ (αιθανόλης) ή δύο ποτά ανά ημέρα για τους άντρες και 10-15g αλκοόλ ή 1 ποτό για τις γυναίκες. [40, 53]

Αυτές οι διαφορετικές συνιστώμενες ημερήσιες δόσεις αλκοόλ μεταξύ των φύλων εξηγούνται από το γεγονός ότι οι γυναίκες είναι πιο ευαίσθητες στις επιδράσεις του αλκοόλ στο σώμα. Η ιδανική ποσότητα για κάθε άτομο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, τη γενετική, τον τύπο σώματος και τη χρήση συμπληρωμάτων. [51]

Φαίνεται ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και οι ενήλικες άνδρες έχουν τη μεγαλύτερη καρδιαγγειακή προστασία από τη μέτρια κατανάλωση αλκοόλ. [41] Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και υπάρχουν αδιαμφισβήτητες αποδείξεις όσον αφορά τις ευεργετικές καρδιαγγειακές επιδράσεις της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ στους περισσότερους πληθυσμούς, η παρότρυνση όσων απέχουν από το αλκοόλ να το ξεκινήσουν σε καθημερινή βάση δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί στη βιβλιογραφία, οπότε δε θα πρέπει να αποτελεί συμβουλή. [48] Αν και η καθημερινή μέτρια πρόσληψη αλκοόλ έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, διαφορετικά πρότυπα κατανάλωσης που συνηθίζουν να έχουν τα άτομα φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο για σοβαρές καταστάσεις. [40, 41] Στο τέταρτο αιώνα π.Χ., ο Ιπποκράτης υπογράμμισε τις βλαβερές συνέπειες της κατάχρησης αλκοόλ για την καρδιά, και συνέστησε αποφυγή

κατανάλωσης σε άτομα με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Η σύγχρονη επιστημονική αναγνώριση των αρνητικών επιδράσεων της αυξημένης πρόσληψης αλκοόλ στις καρδιακές νόσους εμφανίστηκε το δέκατο όγδοο αιώνα και η περιγραφή των πρόσθετων βλαβερών επιπτώσεων σε εγκέφαλο, αρτηριακά αγγεία, αρτηριακή υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη συνέβη στις αρχές του εικοστού αιώνα. Προς το παρόν, ένας αριθμός ασθενειών που περιλαμβάνουν την καρδιά και το καρδιαγγειακό σύστημα είναι γνωστό ότι σχετίζονται με οξεία ή χρόνια κατάχρηση αλκοόλ. Η έκταση της βλάβης που προκαλείται στα όργανα σχετίζεται με τη δόση του αλκοόλ με τα πιο δυσμενή αποτελέσματα να προέρχονται από την υψηλή δόση και το binge drinking.[42]

Τρία ή περισσότερα ποτά την ημέρα (ή περισσότερο από 30g αλκοόλ ανά ημέρα) μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο καρδιακής νόσου, υπέρτασης, εγκεφαλικού επεισοδίου, το ιξώδες του αίματος, την παχυσαρκία, την υπερτριγλυκεριδαμία, τον καρκίνο του μαστού, το νευροεκφυλισμό, τις καταθλιπτικές διαταραχές και την εξασθένηση των οστών και να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου και την ινωδολυτική ικανότητα.[40, 41] Όπως προαναφέρθηκε, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ αναστέλλει την ηπατική γλυκονογένεση και μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος, μειώνοντας την υπεργλυκαιμία. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι η βαριά χρήση αλκοόλ ρυθμίζει υπερβολικά τη συγκεκριμένη οδό, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπογλυκαιμία.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα προήλθε από τη μελέτη του Imhof και των συναδέλφων του, που διαπίστωσαν ότι η υπερβολική αλλά και η μηδενική κατανάλωση αλκοόλ, οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα CRP ορού σε σύγκριση με τη μέτρια κατανάλωση αλκοόλ.[40]

Η European Comparative Alcohol Study (ECAS), εξετάζοντας τις τάσεις στην κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών μεταξύ των ενηλίκων, ανέφερε χαμηλότερα ποσοστά ευκαιριακής άμετρης κατανάλωσης (δηλαδή >5 ποτά ανά περίπτωση)[42] στις παραδοσιακές χώρες της Νότιας Ευρώπης που πίνουν κρασί, από ότι στη Βόρεια και Κεντρική Ευρώπη, όπου η μπίρα και τα υπόλοιπα οινοπνευματώδη ποτά είναι τα προτεινόμενα.[53]

Είδος αλκοολούχου ποτού

Παρά το γεγονός ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ από οποιοδήποτε είδος αλκοολούχου ποτού φαίνεται να είναι ευεργετική για το καρδιαγγειακό σύστημα, πολλά στοιχεία δείχνουν ότι το κόκκινο κρασί μπορεί να προσδώσει επιπλέον καρδιαγγειακά οφέλη.

Προοπτικές μελέτες έχουν δείξει επανειλημμένα, ότι η ελαφριά έως μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού συνδέεται στενά με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών προβλημάτων σε σύγκριση και με τους απέχοντες και με εκείνους που πίνουν περιστασιακά. Η υπερίσχυσή του σε σύγκριση με άλλα ποτά οφείλεται στα πολύτιμα ευεργετικά συστατικά του τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια.

2.3 Υπεροχή κρασιού έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών

Γαλλικό παράδοξο

Ο όρος Γαλλικό παράδοξο επινοήθηκε από την επιδημιολογική παρατήρηση ότι ο γαλλικός πληθυσμός είχε σχετικά χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και χαμηλή θνησιμότητα, παρά τη σχετικά υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων και την παρουσία και άλλων διαδεδομένων καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου. Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε πρώτα το 1819 από έναν Ιρλανδό γιατρό, τον Samuel Black και αργότερα, το 1992 ονομάστηκε από τον Dr. Renaud, επιστήμονα στη Γαλλία, «Γαλλικό παράδοξο».[48, 54] Σε αυτό το επίμαχο άρθρο του 1992, ο Renaud απέδωσε το Γαλλικό παράδοξο στη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού που παρατηρήθηκε στο γαλλικό πληθυσμό σε πιο αξιοσημείωτο βαθμό από ότι σε άλλες χώρες. Ακολούθησαν επιδημιολογικές μελέτες που έδειξαν ότι η κατανάλωση αλκοόλ στο επίπεδο πρόσληψης της Γαλλίας (μέτρια κατανάλωση, 20-30g ανά ημέρα) μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για CHD κατά τουλάχιστον 40%. Παρά το γεγονός ότι είχε γίνει η υπόθεση πως η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μειώνει την αθηροσκλήρωση, αποτρέποντας τη στεφανιαία νόσο μέσω ευεργετικών επιδράσεων στην HDLc, ο Renaud επέμεινε ότι τα επίπεδα HDL-C πλάσματος δεν ήταν σημαντικά υψηλότερα στο γαλλικό πληθυσμό σε σχέση με άλλες δυτικές χώρες. Μετά από επαναξιολόγηση προηγούμενων δημοσιευμένων μελετών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μείωση της στεφανιαίας νόσου δεν οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων της HDL-C, αλλά μάλλον στη μείωση της συσσώρευσης

αιμοπεταλίων και τη βελτίωση της αιμοστατικής ισορροπίας.[48] Η αναστολή της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων από το κρασί προτασσόταν ως μια εξήγηση για την προστασία από στεφανιαία νόσο στη Γαλλία, αφού πιλοτικές μελέτες είχαν δείξει ότι η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων είναι χαμηλότερη στη Γαλλία από ότι στη Σκωτία.[49] Τα δεδομένα αυτά είναι πλέον τεκμηριωμένα για την εγκυρότητα τους.

Μελέτες σύγκρισης κρασιού με άλλα ποτά

Παρόλο που καλά σχεδιασμένες μελέτες βρήκαν συσχετίσεις μεταξύ συνολικής πρόσληψης αλκοόλ και θνησιμότητας από κάθε αιτία, ακόμη και στη μύρα και σε άλλα ποτά, κατά την ανάλυση των καρδιαγγειακών επιδράσεων διαφόρων αλκοολούχων ποτών, οι περισσότερες από τις μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο κόκκινο κρασί και σε πολύ μικρότερο βαθμό στο λευκό κρασί, τη μύρα ή άλλα ποτά.

Εκτός από την αιθανόλη, στο κρασί υπάρχουν και άλλα συστατικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις που ασκούν επίσης καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα. Σε αυτές τις βιοδραστικές ενώσεις αποδίδεται η επιπλέον επίδραση του κρασιού έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών.

Μετά την περιγραφή του Γαλλικού παραδόξου πριν από 25 χρόνια, μέρος της έρευνας επικεντρώθηκε στις διάφορες επιδράσεις της κατανάλωσης κρασιού σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά. Εκτεταμένες μελέτες εξέτασαν τις επιδράσεις διάφορων συστατικών του κόκκινου κρασιού προκειμένου να εξηγήσουν αυτό το παράδοξο και αναζητούσαν το είδος του αλκοολούχου ποτού που είναι πιο καρδιοπροστατευτικό.[41]

Η πρώτη υποστήριξη της εντονότερης καρδιο-προστατευτικής δράσης του κόκκινου κρασιού σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά προέκυψε από την Copenhagen City Heart Study στην οποία παρακολουθήθηκαν για 12 χρόνια 13.285 άντρες και γυναίκες (30 έως 70 ετών) και επιβεβαιώθηκε ότι ο κίνδυνος καρδιαγγειακής θνησιμότητας μειώνεται σταθερά με την αύξηση της πρόσληψης κόκκινου κρασιού, (από ένα σχετικό κίνδυνο (RR) 1.00 για εκείνους που δεν έπιναν κρασί σε 0.5-0,8 για εκείνους που έπιναν τρία με πέντε ποτήρια ανά ημέρα.) Επίσης, παρατηρήθηκε μια μη σημαντική επίδραση στον κίνδυνο θνησιμότητας σε εκείνους που έπιναν μύρα σε σύγκριση με όσους δεν έπιναν.

Ο St. Legar (1979) ήταν επίσης από τους πρώτους που περιέγραψε μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης οίνου και θνησιμότητας από ισχαιμική καρδιοπάθεια και μια αδύναμη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης μύρας ή άλλων οινοπνευματωδών ποτών

και θνησιμότητας, βασισμένος σε δεδομένα από 18 διαφορετικές ευρωπαϊκές και αμερικάνικες χώρες.[26, 45]

Σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχει βρεθεί μια υψηλή συσχέτιση μεταξύ χαμηλής ή μέτριας κατανάλωσης κρασιού και χαμηλότερης θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα σε σύγκριση με άλλα είδη ποτών. Σε μια μετα-ανάλυση του Di Castelnuovo et al., το 2010, αναφέρθηκαν οι επιπτώσεις της κατανάλωσης κρασιού στο καρδιαγγειακό κίνδυνο, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι ο σχετικός κίνδυνος αγγειακής νόσου σε όσους κατανάλωναν κρασί ήταν 0,68 (προστατευτική δράση) σε σύγκριση με τους μη πότες.[51]

Μια από τις ισχυρότερες συγκρίσεις ανάμεσα στο κόκκινο κρασί και άλλα είδη αλκοολούχων ποτών στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης ήταν η μελέτη των Klurfield και Kritchevsky που έγινε σε κουνέλια. Έδειξαν ότι μόνο το κόκκινο κρασί, μεταξύ άλλων αλκοολούχων ποτών, όπως η μπύρα, ο λευκός οίνος και το ουίσκι, ήταν πιο αποτελεσματικό από την σκέτη αιθανόλη (με νερό) στη μείωση της αθηροσκλήρωσης.[55]

Σε άλλες προοπτικές μελέτες, έχει παρατηρηθεί ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών με υψηλό αλκοολικό βαθμό (λικέρ και αποστάγματα) έχουν επίσης μια καρδιοπροστατευτική επίδραση. Το γεγονός αυτό εξηγεί ότι μέρος από τα ευεργετικά αποτελέσματα των αλκοολούχων ποτών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αιθανόλη.

Ο Estruch et al. το 2011 σε μια κλινική δοκιμή, έδειξε ότι η ίδια η αιθανόλη μπορεί να ασκήσει σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Ωστόσο, το κόκκινο κρασί παρέχει πρόσθετα οφέλη λόγω των υψηλότερης αντιοξειδωτικής δράσης του.[56]

Δεδομένου ότι η αθηροσκλήρωση θεωρείται μια φλεγμονώδης νόσος, άλλες μελέτες έχουν αναλύσει τα αποτελέσματα της μέτριας κατανάλωσης κρασιού και τζιν σε φλεγμονώδεις βιοδείκτες. Τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες που συμπεριλαμβάνουν κρασί και άλλα αλκοολούχα ποτά, έδειξαν αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις, με μείωση του ινωδογόνου του πλάσματος και των επιπέδων IL-1α. Και πάλι, ωστόσο, το κρασί έδειξε πρόσθετα οφέλη με μείωση της CRP, των μονοκυττάρων και των μορίων προσκόλλησης του ενδοθηλίου.[51]

Μια μετα-ανάλυση 23 μελετών για τις καρδιαγγειακές επιδράσεις του κρασιού και 22 μελετών για τις καρδιαγγειακές επιδράσεις της μπύρας ανέφερε μια αντίστροφη σχέση

μεταξύ της μέτριας κατανάλωσης κρασιού και του αγγειακού κινδύνου. Αυτή η μετα-ανάλυση έδειξε μια σημαντική μείωση 32% της συνολικού αγγειακού κινδύνου που σχετίζεται με την κατανάλωση κρασιού και μειωμένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα στα άτομα που έπιναν κρασί. Η κατανάλωση μπύρας συσχετίστηκε επίσης με μειωμένο κίνδυνο αγγειακών επεισοδίων, όμως σε μικρότερο βαθμό από αυτή που παρατηρήθηκε με το κρασί.[41, 57]

Επίσης, μελέτες που συνέκριναν το κόκκινο και το λευκό κρασί, σημείωσαν ότι το κόκκινο ανέδειξε μεγαλύτερες επιδράσεις στην καρδιαγγειακή προστασία. Στα περισσότερα πειράματα το κόκκινο κρασί φαίνεται να είναι ένα πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό με την εξήγηση ότι το λευκό έχει χαμηλότερη συγκέντρωση ευεργετικών ενώσεων λόγω του τρόπου παρασκευής του. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές μελέτες που δεν έχουν δείξει καμία διαφορά μεταξύ κόκκινων και λευκών κρασιών.[58] Και από αυτό φαίνεται ότι η ποικιλία του σταφυλιού είναι εκείνη που έχει καθοριστική σημασία για τη βιολογική του δραστηριότητα, παρά το χρώμα. [26]

2.4 Ο προστατευτικός ρόλος των συστατικών του κρασιού σε επίπεδο μηχανισμού

Συστατικά του κρασιού

Το κρασί είναι ένα παραδοσιακό αλκοολούχο ποτό μεγάλης εμπορικής σημασίας, που λαμβάνεται από τη ζύμωση του γλεύκους των σταφυλιών (μούστου). Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, η ποιότητα του κρασιού σχετίζεται με τη σύνθεση και την ποικιλία των σταφυλιών. Τα κρασί μπορεί να διακριθεί ανάλογα με τη γεωγραφική θέση των αμπελώνων, τις διακυμάνσεις στα αμπέλια, τις διαφορετικές αμπελουργικές πρακτικές και τις διάφορες τεχνικές οινοποίησης (μετατροπή των σταφυλιών σε κρασί) και γήρανσης. Σε γενικές γραμμές, τα κύρια συστατικά του κρασιού είναι νερό, αιθανόλη, γλυκερόλη (από την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του μούστου ή πρόσθετη) και πολυσακχαρίτες, διάφοροι τύποι οξέων και πτητικές ενώσεις, τα οποία κυμαίνονται στις ακόλουθες μέσες συγκεντρώσεις: 86% νερό, 12% αιθανόλη, 1% γλυκερόλη (που προσθέτει γλυκύτητα[48]) και πολυσακχαρίτες ή άλλα ιχνοστοιχεία, 0,5% διάφοροι τύποι οξέων και 0,5% πτητικές ενώσεις. Συστατικά του κρασιού αποτελούν επίσης και τα λιποειδή (γλυκο- και φωσδολιποειδή).[28, 59]

Το κρασί μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε κόκκινο, λευκό και ροζέ (ξηρό, ημίγλυκο και γλυκό) με βάση τη γλυκύτητα, την περιεκτικότητα σε αλκοόλ, την περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα, το χρώμα, την ποικιλία των σταφυλιών, τη ζύμωση, τη διαδικασία ωρίμανσης ή τη γεωγραφική προέλευση.[60]

Ίχνη υπολειμματικών σακχάρων (0,1%) μπορεί να βρεθούν σε ξηρά κρασιά, ενώ τα γλυκά κρασιά μπορούν να περιέχουν έως και 10% σάκχαρα. Αρωματικές και χρωστικές ουσίες (0,01% έως 0,5%) αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις και αυτές είναι που σχετίζονται με το χρώμα και τις διαφορές στη γεύση μεταξύ κόκκινων και λευκών κρασιών. Η συγκέντρωσή τους στο λευκό κρασί είναι πολύ χαμηλότερη από ότι στο κόκκινο.[48]

Το κρασί διαφέρει από όλες τις άλλες μορφές οينوπνευματωδών ποτών στο περιεχόμενο φαινολικών ουσιών. Γι' αυτό και η καρδιοπροστατευτική του δράση, έχει αποδοθεί, εκτός από την αιθανόλη, ιδιαίτερα στα φαινολικά συστατικά. Αυτά τα συστατικά δρουν με συμπληρωματικό τρόπο στη χοληστερόλη, την πήξη και τη ροή του αίματος και συμβάλλουν στην καλή λειτουργία του ενδοθηλίου. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν επίσης και οι μεταβολίτες των πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού.[53] Αρκετές μελέτες *in vitro* και σε ζωικά πρότυπα έχουν εστιάσει στις καρδιαγγειακές δράσεις των πολυφαινολών.[41]

Οι πολυφαινόλες αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα συστατικά που περιλαμβάνονται στο κρασί και αποτελούν ένα πολύπλοκο μείγμα φλαβονοειδών και μη φλαβονοειδών. Είναι γνωστό ότι το κόκκινο κρασί περιέχει 10 φορές περισσότερες πολυφαινόλες από το λευκό κρασί, επειδή κατά τη διάρκεια της οينوποίησης, το κόκκινο κρασί σε αντίθεση με το λευκό, είναι μουλιασμένο για εβδομάδες με τις φλούδες, ένα από τα τμήματα του σταφυλιού με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων. Το συνολικό ποσό των πολυφαινολών στα κόκκινα κρασιά έχει εκτιμηθεί ότι κυμαίνεται από 2 έως 6g/L.[60]

Μελέτες έχουν δείξει ότι μετά την κατανάλωση κρασιού οι συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων που μετρώνται στο ανθρώπινο αίμα είναι χαμηλές. Παρόλα αυτά έχουν αξιοσημείωτες θετικές επιδράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό και την υγεία.[53]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχουν πειράματα που χρησιμοποιούν καθαρά φαινολικά (*purified*) τα οποία και δίνουν λιγότερο σημαντικά αποτελέσματα για τον οργανισμό από ότι το κόκκινο κρασί. Ακόμα, σε ορισμένες περιπτώσεις, το λευκό και το

κόκκινο κρασί φαίνεται να έχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα, αν και η μόνη σταθερή διαφορά μεταξύ τους είναι το φαινολικό περιεχόμενο. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν ενώσεις στο κρασί, εκτός από τις φαινολικές, που επίσης φαίνονται να είναι υπεύθυνες για τον προστατευτικό του ρόλο καθώς και ότι η ποιότητα των φαινολικών ενώσεων είναι σημαντική για την εκδήλωση της προστατευτικής δράσης και όχι η ποσότητά τους.[59]

Λεπτομερής περιγραφή των φαινολικών συστατικών του κρασιού

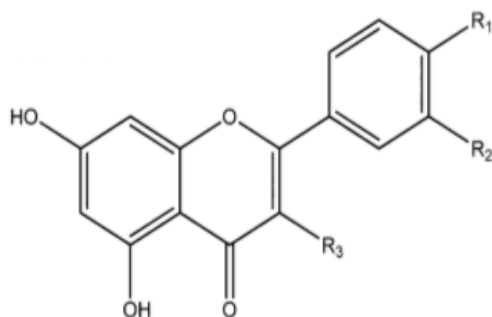
Τα φαινολικά συστατικά (ή πολυφαινόλες) είναι τα κύρια βιοενεργά μικρο-συστατικά του κρασιού. Προέρχονται από τα σταφύλια κατά τη διαδικασία της οινοποίησης και κυρίως από τις φλούδες, τους σπόρους και το τσάμπουρο του αμπελιού. Αρχικά λαμβάνονται από την σύνθλιψη του καρπού και εντείνονται από την διαβροχή και άλλες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.[60]

Μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση, τη γεύση, την αίσθηση στο στόμα, το άρωμα και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του ποτού. Οι δύο κύριες ομάδες φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στο κρασί είναι τα флаβονοειδή και τα μη флаβονοειδή (απλές φαινόλες).[48, 61]

Φλαβονοειδή

Τα флаβονοειδή, τα οποία αντιπροσωπεύουν πάνω από το 85% των φαινολικών συστατικών στο κρασί, περιλαμβάνουν διάφορες μοριακές οικογένειες, όπως τις флаβονόλες [π.χ. μονομερείς (κατεχίνη, επικατεχίνη), ολιγομερείς και πολυμερείς ενώσεις (προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες)], τις флаβόνες, τις ανθοκυανίνες και τις 1 флаβον-3-όλες.[60] Οι τανίνες και οι ανθοκυανίνες είναι αποκλειστικά παρούσες στα κόκκινα κρασιά.[48]

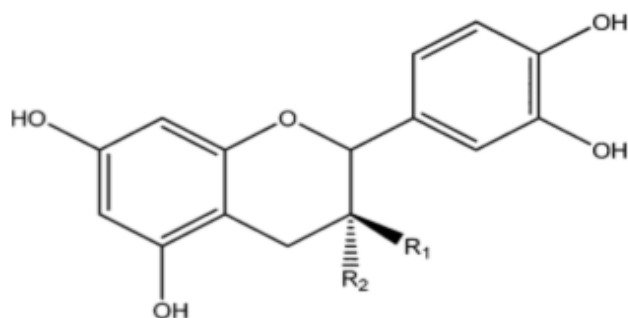
Φλαβονόλες



Ένωση	R1	R2	R3
Κερκετίνη	OH	OH	H

Εικόνα 6: Σκελετός флаβονολών (Πηγή: [62])

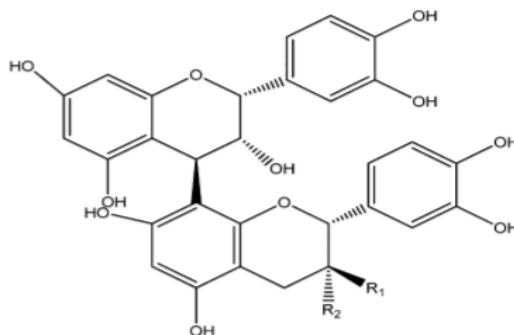
Μονομερείς και πολυμερείς φλαβονόλες



Ένωση	R1	R2
Κατεχίνη	OH	H
Επικατεχίνη	H	OH

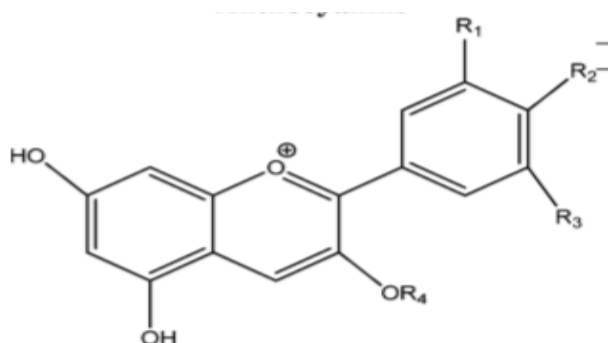
Εικόνα 7: Σκελετός μονομερών και πολυμερών φλαβονολών (Πηγή: [62])

Προανθοκυανιδίνες



Εικόνα 8: Σκελετός προανθοκυανιδινών (Πηγή: [62])

Ανθοκυανίνες



Ένωση	R1	R2	R3	R4
Κυανιδίνη	OH	OH	H	H
Δελφινιδίνη	OH	OH	OH	H
Μαλβιδίνη	OCH3	OH	OCH3	H
Πεονιδίνη	OCH3	OH	H	H
Πετουνιδίνη	OCH3	OH	OH	H

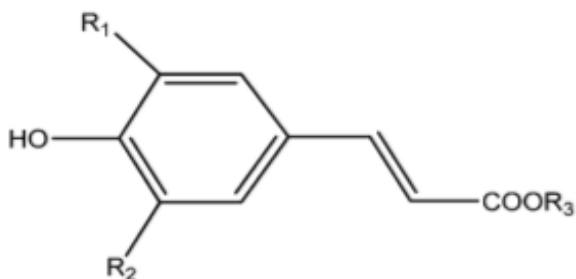
Εικόνα 9: Σκελετός ανθοκυανινών (Πηγή: [62])

Τα κόκκινα κρασιά από τα σταφύλια ποικιλίας Cabernet Sauvignon και Refosco φαίνεται να παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα πολυφαινόλων και κατεχινών. Οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους αποτελούν σημαντικά συστατικά του οίνου λόγω των επιδράσεών τους στο χρώμα, τη γεύση και την υγεία. Οι ανθοκυανίνες είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα των οίνων και εξάγονται από τις φλούδες των σταφυλιών κατά τη διαδικασία οινοποίησης.[60]

Απλές φαινόλες- Μη φλαβονοειδή

Οι απλές φαινόλες που υπάρχουν στο σταφύλι αρχικά συντίθενται από τη φαινυλαλανίνη, ενώ εκείνες που προκύπτουν από τη ζύμωση προέρχονται από το οξικό οξύ. Πρόκειται για φαινολικά οξέα, παράγωγα υδροξυκινναμωμικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, είναι συνήθως εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ παρά ελεύθερα και βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο κρασί, σε σύγκριση με τα υδροξυβενζοϊκά οξέα.

Υδροξυκινναμωμικά οξέα

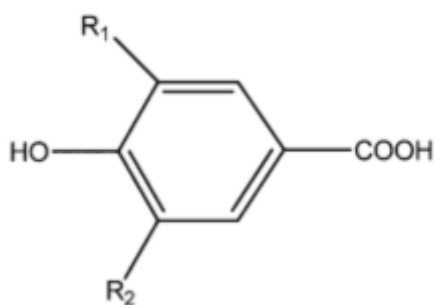


Εικόνα 10:

Σκελετός υδροξυκινναμωμικών οξέων
(Πηγή: [62])

Ένωση	R1	R2	R3
Καφεϊκό οξύ	OH	H	H
p-κουμαρικό οξύ	H	H	H
Φερουλικό οξύ	OCH3	H	H
Σιναπικό οξύ	OCH3	OCH3	H
Καφταρικό οξύ	OH	H	Ταρταρικό οξύ
Κουταρικό οξύ	H	H	Ταρταρικό οξύ
Φερταρικό οξύ	OCH3	H	Ταρταρικό οξύ

Υδροξυβενζοϊκά οξέα

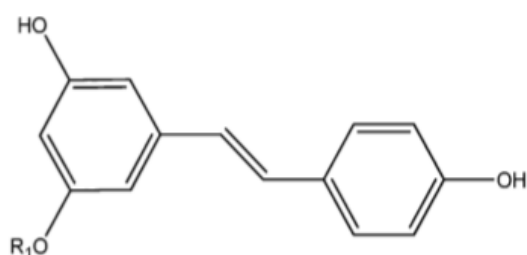


Ένωση	R1	R2
Γαλλικό οξύ	OH	OH
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	H	H
Πρωτεκατεχουϊκό οξύ	OH	H
Συριγγικό οξύ	OCH3	OCH3

Εικόνα 11: Σκελετός υδροξυβενζοϊκών οξέων(Πηγή: [62])

Η ρεσβερατρόλη είναι μια φαινολική ένωση της οικογένειας του στιλβενίου που υπάρχει στη φλούδα και στους σπόρους των σταφυλιών και ως εκ τούτου, αποτελεί συστατικό του κρασιού. Αν και η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο κρασί είναι χαμηλότερη από άλλες πολυφαινόλες, εκείνη έχει θεωρηθεί ως η κύρια λειτουργική ένωση στο κόκκινο κρασί. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή της είναι ο χρόνος ζύμωσης. Γι' αυτό το λόγο, λόγω της διαδικασίας παραγωγής, το λευκό κρασί έχει μόνο μικρές ποσότητες ρεσβερατρόλης σε σύγκριση με το κόκκινο.[48]

Στιλβένια



Ένωση	R1	R2
Trans-ρεσβερατρόλη	H	H
Trans-πολυδατίνη	Γλυκόζη	OH

Εικόνα 12: Σκελετός στιλβενίων (Πηγή: [62])

Οι τανίνες, μια άλλη υποομάδα των φαινολών, βρίσκονται στις φλούδες και τους σπόρους των σταφυλιών και έχουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του κρασιού. Η συμβολή τους φανερώνεται στο χρώμα, την πικρή γεύση, τη στυπτικότητα και τη δομή του κρασιού.

Η σύνθεση του κρασιού εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία του σταφυλιού και στη συνέχεια από τις τεχνικές οινοποίησης. Τα περιεχόμενα σάκχαρα, οξέα, τανίνες, ανθοκυανίνες, φαινολικές και αρωματικές ενώσεις στα σταφύλια και οι αλληλεπιδράσεις αυτών, παίζουν σημαντικό ρόλο στο περιεχόμενο των κρασιών σε θρεπτικά συστατικά. Οι πρακτικές οινοποίησης, ακολούθως, μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή, τη σύνθεση και την ποιότητα του κρασιού.[60]

Επίδραση των μικρο-συστατικών του κρασιού στις βιολογικές λειτουργίες

Οι ευεργετικές επιδράσεις του κρασιού στοχεύουν σε όλες τις φάσεις της αθηρωματικής διαδικασίας, από την αθηρογένεση (πρώιμη ανάπτυξη της πλάκας) μέχρι την απόφραξη του αγγείου.

In vitro μελέτες έχουν αποδείξει μια σειρά από ευεργετικές επιδράσεις του κόκκινου κρασιού στην ενδοθηλιακή λειτουργία.

Τα συστατικά του κόκκινου κρασιού μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου και έτσι να ανταγωνισθούν την προαγωγή της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Δρώντας επί των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, το κρασί προκαλεί αγγειοδιαστολή, εξασθενεί το οξειδωτικό στρες, ενισχύει την εκροή χοληστερόλης από τα αγγεία, αναστέλλει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, τη συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, βελτιώνοντας την καρδιακή λειτουργία. Άλλες δράσεις του κόκκινου κρασιού είναι η μείωση του ιξώδους του αίματος, η βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, η αναστολή της προσκόλλησης αιμοπεταλίων και η μείωση του παράγοντα von Willebrand και του ινωδογόνου πλάσματος. Η ελαφριά έως μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού συνδέεται επίσης με ευνοϊκή γενετική τροποποίηση των ινωδολυτικών πρωτεϊνών που αυξάνει την ινωδολυτική δραστηριότητα.[48]

Πιθανοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τα ευεργετικά αποτελέσματα του οίνου στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου είναι η τροποποίηση του μεταβολισμού των εικοσανοειδών και η χαλάρωση των αιμοφόρων αγγείων που εξαρτώνται από το ενδοθήλιο.[63]

Μελέτες που διεξήχθησαν σε ανθρώπους έχουν αποδείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις, πέρα από την αιθανόλη που υπάρχει στο κόκκινο κρασί, μπορούν να έχουν ωφέλιμα

αποτελέσματα στην υγεία, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντι-φλεγμονωδών ιδιοτήτων τους και του ρόλου τους στις διαδικασίες επιδιόρθωσης ιστών.[60, 64] Αν και η αιθανόλη και τα φαινολικά δεν φαίνεται να δρουν συνεργιστικά, το άθροισμα των επιδράσεών τους είναι μεγαλύτερο από τις επιδράσεις που έχει το αλκοόλ από μόνο του.

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, έρευνες έχουν δείξει ότι η επιγαλλοκατεχίνη δύναται να μετριάσει τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, που προκαλείται από την IL-1β (ισχυρή προφλεγμονώδης κυτταροκίνη) και έτσι έχει μια συμβολή στην αθηροσκλήρωση. Επιπρόσθετα, φαίνεται να μειώνει την απελευθέρωση των ROS και να ενεργοποιεί τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Τα φλαβονοειδή (ιδιαίτερα η κερκετίνη, οι κατεχίνες, οι τανίνες) και η ρεσβερατρόλη, δρουν ενάντια της παραγωγής ελευθέρων ριζών, της φλεγμονής, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και των όγκων, επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα και μειώνουν τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων και εγκεφαλικού επεισοδίου. Επιπλέον, τα μόρια αυτά που είναι παρόντα σχεδόν σε όλες τις ποικιλίες του κόκκινου κρασιού, ασκούν δράσεις σε κύτταρα και ιστούς, κυρίως στο ενδοθήλιο.[48, 60]

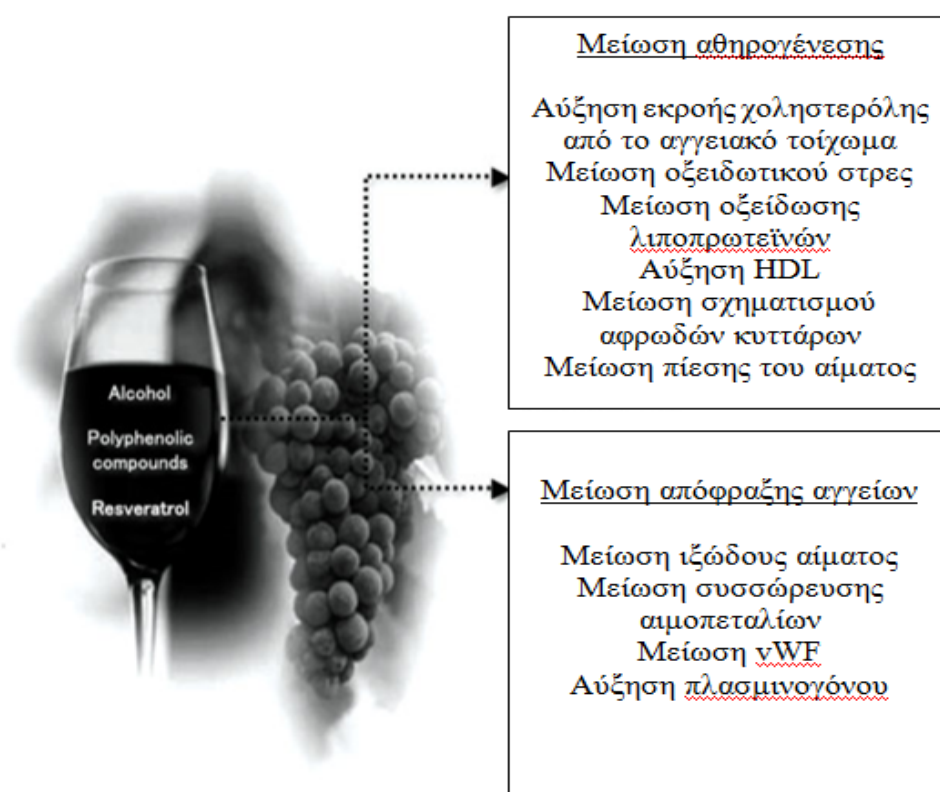
Οι προανθοκυανιδίνες έχουν επίσης ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία, εξ αιτίας των αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και αντιαλλεργικών ιδιοτήτων τους.

Η ευεργετική επίδραση του κόκκινου κρασιού κατά του οξειδωτικού στρες, έχει αποδοθεί κυρίως στη ρεσβερατρόλη.[48] Η ρεσβερατρόλη είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία, τόσο σε μοντέλα ζώων όσο και σε κλινικές δοκιμές. Είναι ένας βασικός ρυθμιστής της ομοιόστασης που συμβάλλει στη σύνθεση πρωτεϊνών, στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και στη ρύθμιση της ενζυμικής λειτουργίας, της απόπτωσης, της μεταγωγής σήματος και της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου. Επηρεάζοντας όλα τα παραπάνω, φαίνεται πως έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τη φλεγμονώδη απόκριση με ισορροπημένο τρόπο δηλαδή, ανάλογα την ανάγκη επάγει ή καταστέλλει φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως τον TNF-α, την IL-1β και την IL-6.

Ο Peltz και οι συνεργάτες του, απέδειξαν το 2012 τη δυναμική δράση της ρεσβερατρόλης και στην επιδιόρθωση των ιστών.[60] Σε πειραματικές μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την οξείδωση της LDL και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε μελέτες σε ζώα. Αναστέλλει επίσης την ανάπτυξη ορισμένων τύπων όγκων και εμφανίζει

αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντι-ιική, νευροπροστατευτική και αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα.[51] Μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη μειώνει την εισροή χοληστερόλης και την πρόσληψή της από τα μακροφάγα, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την εκροή της.

Η βινιφερίνη, η κατεχίνη και η ρεσβερατρόλη απομονώνονται από τη φλούδα σταφυλιών και φαίνεται να αναστέλλουν ισχυρά διάφορες ισομορφές του ενζύμου κυκλοοξυγενάση, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης.[48]



Εικόνα 13: Ευνοϊκές επιδράσεις των συστατικών του κρασιού για την παρεμπόδιση της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας (πηγή:[48])

Σημαντική παράμετρο αποτελεί η ύπαρξη αναστολέων PAF στο κρασί γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει την προστατευτική του δράση κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς μείωση των επιπέδων PAF συνεπάγεται εξασθένηση φλεγμονής και αθηρογόνων διαδικασιών. Η δράση του αυτή οφείλεται κυρίως στα μικρο-συστατικά του, παρά στην αλκοόλη.

Τα λιπίδια που περιέχονται στο κόκκινο κρασί φαίνεται επίσης να ασκούν μια αντιθρομβωτική και αντιαθηρογενετική δράση σε *in vitro* πειράματα.[59] Επιπλέον, τα λιπίδια αυτά έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση του PAF.[26]

Οι επιδράσεις του κρασιού σε μεταβολικές, φλεγμονώδεις και καρδιαγγειακές παραμέτρους εξαρτώνται και από τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων. Η διαθεσιμότητα μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες, την επεξεργασία των τροφίμων, διαιτητικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν, συγκεντρώσεις τους στα τρόφιμα και από διάφορους άλλους παράγοντες που σχετίζονται με το άτομο που τις καταναλώνει.[60]

Τα αποτελέσματα επιστημόνων που έχουν εξετάσει τη βιοδιαθεσιμότητα των παραπάνω συστατικών, δείχνουν μεγάλη μεταβλητότητα εκείνης ανάμεσα στις διάφορες πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες που απορροφώνται σε μεγαλύτερο βαθμό στον άνθρωπο είναι οι ισοφλαβόνες και το γαλλικό οξύ. Ακολουθώντας, είναι οι κατεχίνες, οι φλαβανόνες, η κερκετίνη και τέλος οι λιγότερο απορροφήσιμες προανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες.[51]

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα της μέτριας κατανάλωσης κρασιού προκύπτουν εξ αιτίας του συνολικού πλούσιου περιεχομένου του σε βιοενεργά-ωφέλημα συστατικά και όχι μόνο στη συγκεκριμένη δράση ενός από όλα αυτά.

Μερικά πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι η καρδιοπροστατευτική δράση του κρασιού είναι πιο εμφανής σε άτομα που καταναλώνουν κρασί μαζί με το φαγητό. Τα ευρήματα ορισμένων παρεμβατικών μελετών δείχνουν ότι η κατανάλωση μέτριας ποσότητας κόκκινου κρασιού μετριάζει το οξειδωτικό στρες και την αγγειακή ενδοθηλιακή βλάβη που προκαλείται από ένα γεύμα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και έτσι μειώνει την οξείδωση της LDL. Το κόκκινο κρασί παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση που επηρεάζεται από δύο ξεχωριστούς μηχανισμούς. Ο ένας σχετίζεται με τα συστατικά του (κυρίως φαινολικά συστατικά) και ο δεύτερος με την αύξηση του ουρικού οξέος πλάσματος (ενδογενή αντιοξειδωτικό). Αν το κρασί καταναλώνεται με τα γεύματα, η έναρξη της αύξησης του ουρικού οξέος στο πλάσμα συμπίπτει με την περίοδο του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στις

προστατευτικές επιδράσεις του κρασιού. Ένα άλλο σημαντικό επιχείρημα υπέρ της κατανάλωσης κρασιού με το φαγητό είναι η μείωση της συγκέντρωσης αλκοόλ στο αίμα (BAC). Έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση κρασιού με γεμάτο στομάχι, μειώνει την BAC, αλλά και ενισχύει το ρυθμό μεταβολισμού της αιθανόλης και την αποβολή της.[53]

2.5 Αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες κρασιού-πολυφαινολών

Στοιχεία από τους Caerphilly, Wales δείχνουν ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία σχετίζεται με CHD, αναστέλλεται σημαντικά από την κατανάλωση αλκοόλ σε μέτρια επίπεδα.[49]

Η αντιαιμοπεταλιακή δράση του κρασιού εξηγείται από την αιθανόλη, αλλά και από τα πολυφαινολικά συστατικά με τα οποία είναι πλούσιο. Αρκετές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους και ζώα έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις του κρασιού μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους, μειώνοντας τη σύνθεση προστανοειδών (μια υποκατηγορία των εικοσανοειδών που αποτελείται από τις προσταγλανδίνες, τις θρομβοξάνες και τις προστακυκλίνες) από το αραχιδονικό οξύ και τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, ένα rebound φαινόμενο υπέρ-συσσώρευσης αιμοπεταλίων παρατηρείται μετά από οξεία κατανάλωση αλκοόλ, το οποίο όμως δεν παρατηρείται με την κατανάλωση κρασιού.

Φαίνεται ότι το κρασί έχει πιο ισχυρή ανασταλτική επίδραση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε σχέση με τα άλλα ποτά, εξ αιτίας του πλούσιου περιεχομένου του σε φαινολικά συστατικά και αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει, εν μέρει, την υπόθεση ότι το κόκκινο κρασί είναι περισσότερο προστατευτικό έναντι της αθηροσκλήρωσης και της στεφανιαίας νόσου.[52]

Οι Pace-Asciak et al. (1996) σε ανθρώπινα πειράματα έδειξαν μια σημαντική αντι-συσσωρευτική επίδραση από το κόκκινο και το λευκό κρασί.

Το κόκκινο και το λευκό κρασί φαίνεται να επηρεάζουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων με διαφορετικό τρόπο κάτι που πιθανόν συμβαίνει λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης πολυφαινολών στα δύο είδη κρασιών. Συγκεκριμένα, μελέτη του 2002 που χρησιμοποίησε και τα δύο είδη κρασιού τα οποία είχαν ίδια περιεκτικότητα σε οινόπνευμα, έδειξε υψηλότερη αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μετά

από πρόσληψη κόκκινου κρασιού, γεγονός που απέδωσε στη διαφορετική συγκέντρωση πολυφαινολών.[65]

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη ήταν ο κύριος συντελεστής για τη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (δοσοεξαρτώμενα), τη συσσώρευση και την έκκριση αιμοπεταλίων που διεγείρονται από θρομβίνη, ADP και κολλαγόνο.[20, 54]

Υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ρεσβερατρόλη έχει αντιθρομβωτική δράση που φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της μείωσης της ευαισθησίας ενεργοποίησης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων, της μείωσης της σύνθεσης προθρομβωτικών μεσολαβητών (σύνθεση εικοσανοειδών) και της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου του ιστικού παράγοντα. Δείχνει να μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} , μειώνοντας έτσι την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ακόμα, αναστέλλοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και ρυθμίζοντας την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μειώνει την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων.[20]

Οι Olas και Wachowicz το 2005 έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη είναι ικανή να αναστέλλει τη σύνθεση θρομβοξανθής και να μειώνει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων.[60]

Οι Lin et al το 2009 έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει πλήρως τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που διεγείρεται από το κολλαγόνο, δηλαδή επηρεάζει την πρωτογενή αιμόσταση.

Αρκετές μελέτες in vitro υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού μπορεί να ασκήσει ευεργετικές επιδράσεις στην ινωδόλυση, προκαλώντας μια ευνοϊκή γενετική διαμόρφωση των ινωδολυτικών πρωτεϊνών.[48]

Υπάρχουν πολλές αναφορές που δείχνουν ότι το κρασί και ιδιαίτερα το κόκκινο, μαζί με τα φλαβονοειδή και τη ρεσβερατρόλη που περιέχει, μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και σε ζώα.

Φαίνεται ότι η επικατεχίνη είναι πιο αποτελεσματική από την κατεχίνη στην αναστολή της επαγόμενης από το αραχιδονικό οξύ συσσώρευσης αιμοπεταλίων και η δράση της είναι δοσοεξαρτώμενη. Ορισμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι μεταξύ των φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στο κρασί, η κατεχίνη και η επικατεχίνη έχουν μικρή επίδραση, αλλά η κερκετίνη και η trans-ρεσβερατρόλη αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται και από τη θρομβίνη και από το ADP. Επίσης, η κερκετίνη

φάνηκε *in vitro* πως ενισχύει τα αντιθρομβωτικά αποτελέσματα της προστακυκλίνης.[66] Άλλες μελέτες έδειξαν ότι μετά από τη κατανάλωση αλκοόλ σκέτου και αλκοόλ με προστιθέμενες πολυφαινόλες σταφυλιού, τα αιμοπετάλια είχαν μια σημαντική μείωση στην ικανότητα συσσωμάτωσης ως απόκριση στη θρομβίνη, η οποία ήταν μεγαλύτερη μετά την πρόσληψη αλκοόλης συμπληρωμένης με πολυφαινόλες. Οι Tzeng et al. (1991) έδειξαν ότι η συσσώρευση αιμοπεταλίων που διεγείρεται από ADP, επινεφρίνη ή αραχιδονικό οξύ αναστέλλεται από διάφορα φαινολικά συστατικά του κρασιού, όπως η μυρικετίνη και η κερκετίνη, αποτελέσματα τα οποία έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλες έρευνες. [67-69]

Τα αντι-συσσωρευτικά αποτελέσματα του κρασιού διαμεσολαβούνται μέσω της ικανότητας των φαινολικών του ενώσεων (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη, κερκετίνη, ρεσβερατρόλη κ.α.) να αναστέλλουν το μονοπάτι βιοσύνθεσης εικοσανοειδών, π.χ αναστέλλοντας τη φωσφολιπάση A₂. [63] Έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη θα μπορούσε να αναστείλει τη κυκλοοξυγενάση και τη λιποξυγενάση, μειώνοντας έτσι την παραγωγή TXA₂ και η κερκετίνη μπλοκάρει τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τη θρομβίνη με απευθείας αναστολή της δραστηριότητας της φωσφολιπάσης C.

Οι φαινολικές ενώσεις και τα φλαβονοειδή έχουν ανασταλτική δράση σε πολλαπλά σημεία της οδού των εικοσανοειδών. Μπορούν να ενισχύσουν την αντισυσσωρευτική δράση της προστακυκλίνης και επίσης να μπλοκάρουν τους υποδοχείς της θρομβοξάνης στα αιμοπετάλια.

Επίσης, μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού έχει παρατηρηθεί μείωση των συνολικών κορεσμένων λιπαρών οξέων της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (πολυ και μονοακόρεστων). Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να έχουν συνεργιστική δράση στη μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Μερικές μελέτες παρέχουν αποδείξεις ότι τα φαινολικά συστατικά του κρασιού ενισχύουν την ενδοθηλιακή σύνθεση NO και συμβάλλουν ώστε το ενδοθήλιο να ασκήσει χαλαρωτική δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, μηχανισμός που πιθανόν να εμπλέκεται στην αντισυσσωρευτική επίδραση των φαινολικών ενώσεων του κρασιού. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων του κρασιού επίσης συμμετέχουν στην αντιαιμοπεταλιακή του δράση.[52]

Εκχυλίσματα από λευκό και κόκκινο κρασί έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα σε μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας βρέθηκε ότι τόσο τα ερυθρά κρασιά όσο και τα λευκά περιέχουν αναστολείς του PAF.[26, 59, 63, 70]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

3.1 Εισαγωγή

Το σταφύλι, από όπου προέρχεται και το κρασί, είναι μια από τις πιο παραδοσιακές και πολύτιμες καλλιέργειες στον κόσμο και το *Vitis vinifera* είναι το κυριότερο είδος που καλλιεργείται ευρέως για την παραγωγή κρασιού στη βιομηχανία οίνου. Τα σταφύλια και τα προϊόντα που παράγονται από αυτά, όπως το κρασί, ο χυμός σταφυλιού, οι μαρμελάδες και οι σταφίδες, έχουν μεγάλη οικονομική σημασία. Παραδοσιακά, η αμπελοκαλλιέργεια ήταν χαρακτηριστικό του ευρωπαϊκού πολιτισμού, όμως, σήμερα είναι διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο. Σύμφωνα με τον FAO 3 από τις 5 χώρες, παγκοσμίως, που παράγουν σταφύλια ανήκουν στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ιταλία, Ισπανία και Γαλλία) μαζί με τις Κίνα και Η.Π.Α.[71]

Ένα σημαντικό ποσοστό των σταφυλιών κατευθύνεται προς οινοποίηση, η οποία συνδέεται με την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανεπιθύμητων παραπροϊόντων.

Τα παραπροϊόντα οινοποίησης περιλαμβάνουν οργανικά απόβλητα (σπόρους, σάρκα, φλούδα, τσάμπουρο, φύλλα), λύματα, εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (CO₂, πτητικές οργανικές ενώσεις, κ.λπ.) και ανόργανα απόβλητα (γη διατόμων, άργιλο μπεντονίτη και περλίτη). Εκτιμάται ότι μόνο στην Ευρώπη, παράγονται 14,5 εκατομμύρια τόνοι υποπροϊόντων σταφυλιών ετησίως.[72] Τα οργανικά παραπροϊόντα έχουν αξιολογηθεί για το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικές ενώσεις και φαίνεται ότι περιέχουν πληθώρα ευεργετικών συστατικών τα οποία προέρχονται από το σταφύλι. Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, μέρος των ωφέλιμων συστατικών του σταφυλιού μεταφέρεται στο κρασί, αλλά σημαντική ποσότητα μένει και στα παραπροϊόντα. Πολλοί παράγοντες, όπως η ποικιλία, οι αγρο-κλιματολογικές συνθήκες και ο βαθμός ωρίμανσης, μεταξύ άλλων, είναι υπεύθυνοι για τις μεγάλες διακυμάνσεις στο φυτοχημικό προφίλ τους.

Η σημασία της σύνθεσης των τροφίμων σε μικρο- και μακρο-θρεπτικά συστατικά για την υγεία του ανθρώπου έχει αυξήσει το ενδιαφέρον των καταναλωτών για κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, καθώς και για τρόφιμα εμπλουτισμένα με βιοδραστικές ενώσεις και φυσικά φαρμακευτικά προϊόντα διατροφής. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει σε μια

αυξανόμενη προσοχή των προμηθευτών για την επαναχρησιμοποίηση των αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων που είναι πλούσια σε υγιεινά συστατικά των φυτών.

Η ανακύκλωση των παραπροϊόντων του οινοποιείου αποτελεί μια ευκαιρία για την παροχή πολύτιμων υλικών σε βιομηχανίες φαρμακευτικές, καλλυντικών και τροφίμων, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους και των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που συνδέονται με τη διάθεση αυτών των υποπροϊόντων στις περιοχές παραγωγής.[72, 73]

3.2 Είδη αξιοποιήσιμων παραπροϊόντων και συστατικά τους

Τα πλέον μελετημένα παραπροϊόντα του οινοποιείου περιλαμβάνουν βιοδιασπώμενα στερεά και συγκεκριμένα σπόρους, φλούδες και τσάμπουρα σταφυλιών. Οι σπόροι και οι φλούδες συναποτελούν το grape pomace (GP). Οι βιοδραστικές ενώσεις που εντοπίζονται σε αυτά, έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την προαγωγή της υγείας, γεγονός που φαίνεται από δραστηριότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. [73]

Σπόροι

Οι σπόροι του σταφυλιού αποτελούν το 13% του βάρους των σταφυλιών [71] και κατά μέσο όρο το 52% του ξηρού βάρους του GP, ποσοστό που ποικίλλει ανάλογα τη διαδικασία οινοποίησης. [74, 75]

Οι πληροφορίες που διατίθενται για τη σύνθεση των σπόρων του σταφυλιού επισημαίνουν το περιεχόμενό τους σε 40% ίνες, 16% αιθέριο έλαιο, 11% πρωτεΐνη και 7% ουσίες όπως σάκχαρα και ανόργανα άλατα. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην (πολυ) φαινολική περιεκτικότητα των σπόρων σταφυλιού, που κυμαίνεται από 60% έως 70% του συνόλου των εκχυλίσμων ενώσεων. Αυτή η υψηλή συγκέντρωση έχει μεγάλο ενδιαφέρον, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι κατά τη συμπίεση των σταφυλιών και την οινοποίηση, εξάγεται μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτές τις ενώσεις. Άρα, το υπόλοιπο παραμένει στα παραπροϊόντα.

Το γαλλικό οξύ (πρόδρομο τανινών) περιγράφεται ως το αφθονότερο παράγωγο υδροξυβενζοϊκού οξέος στους σπόρους, το οποίο ακολουθείται από το πρωτοκατεχικό, κάτι που συμβαίνει και στις λευκές και στις κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών. [73, 76]

Φλούδες

Οι φλούδες των σταφυλιών είναι το πιο άφθονο απόβλητο της βιομηχανίας οίνου και αποτελούνται κυρίως από λιγνοκυτταρινικό υλικό. Αυτό το παραπροϊόν λαμβάνεται μετά την πίεση και ζύμωση των σταφυλιών και αντιπροσωπεύει περίπου το 20% κατά βάρος των συνολικών επεξεργασμένων σταφυλιών[71] και το 65% του συνολικού υλικού του GP κατά μέσο όρο. Η φλούδα έχει αναφερθεί ως μια πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων, ακόμη και αν η τελική απόδοση εξαρτάται από τη συγκεκριμένη διαδικασία οινοποίησης και τη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται (διαλύτη, θερμοκρασία, χρόνο και άλλους παράγοντες).[73] Το πρωτοκατεχικό και το γαλλικό οξύ είναι τα κυρίαρχα υδροξυβενζοϊκά οξέα στη φλούδα.[77]

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα βρίσκονται σε όλα τα μέρη του σταφυλιού, αλλά το υψηλότερο περιεχόμενο έχει καταγραφεί στους εξωτερικούς ιστούς των ώριμων φρούτων, δηλαδή στις φλούδες. Η συγκέντρωση σε υδροξυκινναμωμικά οξέα γενικά μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ωστόσο, το συνολικό ποσό αυτής της φαινολικής κατηγορίας αυξάνεται αναλογικά με το μέγεθος του φρούτου.[73] Οι φλούδες φαίνεται να περιέχουν διάφορα φλαβονοειδή με κύριο αντιπρόσωπο τις ανθοκυανίνες.[78]

Τα στυλβένια αποτελούν επίσης ένα συστατικό των παραπροϊόντων που βρίσκεται κυρίως στις φλούδες.[73]

Grape pomace (Στέμφυλα-Μίγμα από σπόρους και φλούδες)

Το «grape pomace» είναι ένα από τα υποπροϊόντα που έχει λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή από τους επιστήμονες τροφίμων, λόγω της μεγάλης ποικιλίας από ενδιαφέρουσες ενώσεις που παραμένουν μετά τη διαδικασία της οινοποίησης. Πρόκειται για τα απόβλητα του οινοποιείου που προέρχονται από την παραγωγή του μούστου (χυμός σταφυλιού) με έκθλιψη ολόκληρων σταφυλιών.[73] Όταν οι ρώγες του σταφυλιού επεξεργάζονται για τη δημιουργία του κόκκινου κρασιού, οι φλούδες και οι σπόροι βρίσκονται συνήθως σε επαφή για αρκετές ημέρες με το ζυμό της ζύμωσης. Το υπόλειμμα που απομένει μετά τη ζύμωση είναι το GP το οποίο αποτελείται κυρίως από φλούδες και σπόρους και εξακολουθεί να περιέχει υψηλά επίπεδα πολυφαινόλων. Για αυτό το λόγο θα μπορούσε να έχει σημαντικά αποτελέσματα στην προαγωγή της υγείας.[62]

Το GP αποτελεί το 20% της μάζας των επεξεργασμένων σταφυλιών. Η παραγωγή 6L κρασιού αποφέρει περίπου 1Kg GP.[72] Όσον αφορά τη γενική σύνθεσή του, το ποσοστό υγρασίας κυμαίνεται από 50% έως 72% ανάλογα με την ποικιλία σταφυλιών και την ωρίμανσή τους. Τα αδιάλυτα υπολείμματα αυτού, έχουν ένα περιεχόμενο λιγνίνης που κυμαίνεται από 16,8% έως 24,2%, ενώ η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι μικρότερη από 4%. Σε γενικές γραμμές, το κύριο πολυμερές συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων που υπάρχει στο GP είναι οι πεπτικές ουσίες που κυμαίνονται από 37% έως 54%. Η κυτταρίνη είναι ο δεύτερος τύπος πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος που βρίσκεται σε αφθονία στα GP, με περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 27% έως 37%.[73] Στο GP έχουν ταυτοποιηθεί πολλά φαινολικά συστατικά και αυτά που υπερέχουν σε ποσότητα είναι οι ανθοκυανίνες, τα υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμωμικά οξέα, οι φλαβον-3-όλες, οι φλαβονόλες και τα στυλβένια.[62] Είναι ενδιαφέρον, ότι η ανάλυση του GP ανέδειξε το πρωτοκατεχικό οξύ ως το αφθονότερο υδροξυβενζοϊκού οξύ σε κάποιες κόκκινες ποικιλίες.[73]



Εικόνα 14: Grape pomace

Τσάμπουρα (Κοτσάνια)

Αυτό το υπόλειμμα καθίσταται πηγή στυπτικών ενώσεων, κυρίως προανθοκυανιδινών. Αφαιρείται πριν από τα στάδια της οινοποίησης για να αποφευχθεί η υπερβολική στυφή γεύση του κρασιού και η αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Ως εκ τούτου, η εξέτασή του στο πλαίσιο της διαδικασίας οινοποίησης δεν ενδείκνυται, αν

και αυτό αποτελεί ένα αδιαμφισβήτητο υπόλειμμα που παράγεται από το οινοποιείο. Το μέσο ποσοστό υγρασίας του τσάμπουρου έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 55% έως 80%, με τη μεγάλη μεταβλητότητα να αποδίδεται στην ποικιλία του σταφυλιού. Τα αλκοολούχα αδιάλυτα κατάλοιπα είναι 71%, κατά μέσο όρο, της ξηράς ουσίας και δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ κόκκινων και λευκών ποικιλιών. Τα κύρια φαινολικά συστατικά που περιέχει είναι φλαβον-3-όλες, υδροξικιναμωμικά οξέα, φλαβονόλες και στυλβένια.[72]

Τα φαινολικά οξέα στο τσάμπουρο αποτελούν περίπου το 5,8% του ξηρού βάρους.

Το γαλλικό οξύ φαίνεται να είναι το αφθονότερο παράγωγο υδροξυβενζοϊκού οξέος στα τσάμπουρα και ακολουθείται από συριγγικό οξύ.[72, 73]

Συνοψίζοντας, τα φαινολικά συστατικά είναι τα κύρια βιοενεργά που είναι παρόντα τόσο στο κρασί όσο και στα παραπροϊόντα του.

Τα παραπροϊόντα περιέχουν μεγάλες ποσότητες φαινολικών οξέων, φλαβονόλες, προανθοκυανιδίνες, ανθοκυανίνες και στυλβένια.[79]

Τα κύρια φλαβονοειδή αποτελούν οι φλαβονόλες, προανθοκυανιδίνες, φλαβόνες και ανθοκυανίνες, ενώ όσον αφορά τα παράγωγα στυλβενίου η κύρια υπάρχουσα ένωση είναι η ρεσβερατρόλη και τα παράγωγά της.[72, 80]

Η βιοσύνθεση φλαβονολών λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών. Η σύγκριση της σύνθεσης φλαβονοειδών μεταξύ των υπολειμμάτων της οινοποίησης έδειξε ότι οι φλαβον-3-όλες βρίσκονται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις στη φλούδα και τους σπόρους, ενώ οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στις φλούδες.[73, 81]

Παραπροϊόντα από ερυθρές ποικιλίες παρουσιάζουν υψηλότερες ποσότητες φλαβονολών από ότι οι λευκές ποικιλίες. Το προφίλ φλαβονολών στο GP, ως σύνολο (σπόροι, φλούδες και λίγος πολτός), παρέχει αποδεικτικά στοιχεία για υψηλότερα ποσά φαινολικών σε σχέση με την εξέταση των επιμέρους υλικών του.

Η κατεχίνη είναι η κυριότερη από τις φλαβον-3-όλες που υπάρχει σε όλα τα παραπροϊόντα που προκύπτουν τόσο από κόκκινα όσο και από λευκά σταφύλια. Οι συγκεντρώσεις της στα τσάμπουρα είναι υψηλότερες από αυτές που περιγράφονται στη φλούδα και τους σπόρους.

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι η πιο άφθονη τάξη φαινολικών οξέων στα υποπροϊόντα οίνου.

Παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέος είναι κυρίως Ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτεκατεχικό οξύ, ταννικό οξύ, βανιλικό οξύ, γαλλικό, συριγγικό. Το γαλλικό οξύ περιγράφεται ως το αφθονότερο παράγωγο υδροξυβενζοϊκού οξέος σε τσάμπουρα, φλούδες και σπόρους, ακολουθείται από συριγγικό οξύ σε τσάμπουρα και πρωτοκατεχικό οξύ σε σπόρους και φλούδες σταφυλιών.

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα βρίσκονται σε όλα τα μέρη του σταφυλιού, με το υψηλότερο περιεχόμενο να έχει καταγραφεί στις φλούδες.

Τα στιλβένια μπορούν να βρεθούν στα παραπροϊόντα, κυρίως στη φλούδα, αλλά και σε τσάμπουρα και σπόρους, σε μικρότερη αφθονία. Η περιεκτικότητα των στιλβενίων παρουσιάζει ένα διαφορετικό προφίλ ανάμεσα σε κόκκινα και λευκά σταφύλια. Παράγωγα στιλβενίου παρουσιάζονται σε τσάμπουρα, σπόρους, GP και φύλλα από ερυθρές ποικιλίες ενώ μόνο σε τσάμπουρα και φλούδες από λευκές ποικιλίες.[73]

Στους πίνακες που ακολουθούν, καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των κύριων φαινολικών συστατικών ξεχωριστά στη φλούδα, στους σπόρους, στο τσάμπουρο και στο GP. Ανάλογα τη μέθοδο ανάλυσης (HPLC-DAD ή HPLC-DAD-Esi-MSn) των συστατικών προκύπτουν διαφορετικές ποσότητες καθώς κάθε μέθοδος γίνεται σε διαφορετικές συνθήκες.

Πίνακας 2: Φαινολικά οξέα παραπροϊόντων (πηγή:[82])

ΕΝΩΣΗ	ΦΛΟΥΔΑ	ΣΠΟΡΟΙ	ΤΣΑΜΠΟΥΡΟ	MARC (GP)	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΙΚΑ ΟΞΕΑ					
Γαλλικό	2,20-82	6,5-224	70,4-469	10,5-459	HPLC-DAD
	0,38-0,74	-	-	-	HPLC-DAD-Esi-MSn
Γεντισικό	1,1-1,61	-	-	-	HPLC-DAD-Esi-MSn
Υδροξυβενζοϊκό	0,02-0,43	-	-	-	HPLC-DAD-Esi-MSn
Πρωτοκατεχικό	6-13	2-10	66-115	0,5-4,2	HPLC-DAD
	0,08-0,13	-	-	-	HPLC-DAD-Esi-MSn
Συριγγικό	1,6-3,3	-	-	-	HPLC-DAD
ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΑΜΜΩΜΙΚΑ ΟΞΕΑ					
Καφεϊκό	1-21	2-9	5-40	-	HPLC-DAD
	0,15-2,72	-	-	-	HPLC-DAD-Esi-MSn
Καφταρικό	0,6-24	2-11	15,1-274	2,6-277,2	HPLC-DAD
	-	11,8-40,4	8,2-70,6	0,2-1,6	HPLC-DAD-Esi-MSn

*Συγκέντρωση σε ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)

HPLC-DAD: High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector

HPLC-DAD-ESI-MSn: High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector, Electro Spray Ionization and Mass Spectrometer

Πίνακας 3: Φλαβονόλες και στυλβένια παραπροϊόντων (πηγή:[82])

ΕΝΩΣΗ	ΦΛΟΥΔΑ	ΣΠΟΡΟΙ	ΤΣΑΜΠΟΥΡΟ (STEM)	MARC	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ					
Κατεχίνη	0,5-1300	158-4540	60-1858	87,7- 2635,4	HPLC-DAD
	-	-	-	19,6- 89,7	HPLC-DAD-Esi- MSn
Επικατεχίνη	2-850	100-2700	5-189	57,1- 864,7	HPLC-DAD
	-	-	2200,9-3181,5	17,3- 112,8	HPLC-DAD-Esi- MSn
Κερκετίνη	-	-	-	≤15,3	HPLC-DAD
	-	-	-	93- 163,6	HPLC-DAD-Esi- MSn
ΣΤΥΛΒΕΝΙΑ					
Trans- ρεσβερατρόλη	90- 124.100	-	-	5,8-64	HPLC-DAD
	-	-	-	29-53	HPLC-DAD-Esi- MSn

*Συγκέντρωση σε ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$)

HPLC-DAD: High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector

HPLC-DAD-ESI-MSn: High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector, Electro Spray Ionization, and Mass Spectrometer

3.3 Οι ευεργετικές ιδιότητες των παραπροϊόντων

Μέχρι σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός αποδεικτικών στοιχείων σχετικά με τις βιολογικές δραστηριότητες των φαινολικών ενώσεων των παραπροϊόντων, στις οποίες περιλαμβάνονται αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές

και καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των φαινολικών συστατικών των παραπροϊόντων εμφανίζονται κυρίως λόγω των φλαβονολών και των προκυανιδινών.[83] Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι αντιοξειδωτικές και αντιθρομβωτικές δράσεις τους, οι οποίες θα αναλυθούν και στη συνέχεια.

Αντιοξειδωτική δράση

Η περιεκτικότητα των παραπροϊόντων οينوποιίας σε φυτοχημικά συστατικά, παρόμοια με εκείνα του κρασιού, σχετίζεται με πρόληψη οξειδωτικών αντιδράσεων, καρδιαγγειακών προβλημάτων, φλεγμονωδών διεργασιών και εκφυλιστικών παθοφυσιολογικών καταστάσεων που αναπτύσσονται στους ενήλικες.[83]

Τα φυσικά φλαβονοειδή μπορούν να δίνουν υδρογόνο ή/και να αντιδρούν με ανιόντα υπεροξειδίου και ρίζες υδροξυλίου και έτσι να αναστέλλουν *in vitro* την οξείδωση λιπιδίων που αυτά προκαλούν και κατ' επέκταση να εμποδίζουν την οξείδωση της LDL που εμπλέκεται στην αθηροσκλήρωση.[84] Δεδομένου ότι το GP περιέχει σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών ανθοκυανινών, κατεχίνη, επικατεχίνη, κερκετίνη και φαινολικά οξέα, το φυσικό αυτό υλικό έχει προταθεί ως ευεργετικό για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες και των φλεγμονωδών καταστάσεων.[85, 86]

Οι Chidambara Murthy et al, σε μια μελέτη τους το 2002, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από GP είναι σαρωτές ελευθέρων ριζών και πρωτογενή αντιοξειδωτικά, τα οποία αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες.[87]

Τα σταφύλια, ειδικά οι σπόροι, έχει βρεθεί να έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και μάλιστα οι Ky et al, το 2014, έδειξαν ότι οι σπόροι έχουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις φλούδες και το GP.[78] Πρόσφατες αναφορές έδειξαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των σπόρων σταφυλιού τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, οι οποίες κατά κύριο λόγο αποδίδονται στα φλαβονοειδή αλλά και σε άλλα φαινολικά συστατικά και εξαρτώνται στενά από τη χημική δομή των σπόρων όταν είναι παρόντα στο φυτικό υλικό.[88]

Τα εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού (ως πηγή πολυφαινολών) φαίνεται να μειώνουν τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων μέσω της αναστολής της οξείδωσης της LDL, τη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και τη μείωση της φλεγμονής.[73]

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των σπόρων έχει φανεί και σε μελέτες σε ζώα που έχουν τραφεί με αυτό το είδος του παραπροϊόντος.[84, 89]

Οι φλούδες των σταφυλιών έχουν επίσης επισημανθεί έντονα για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες λόγω των ανθοκυανινών και του περιεχομένου τους σε προανθοκυανιδίνες.[90]

Οι ανθοκυανίνες συμβάλλουν περισσότερο στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φρούτων (90%) από ότι οι φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες και τα φαινολικά οξέα (10%).[83]

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων τσάμπουρων συσχετίζεται με την ικανότητα να εμποδίζουν την οξείδωση των LDL, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινόλων. Έτσι, τα εκχυλίσματα αυτά έχουν προταθεί για το πιθανό δυναμικό τους στη μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS.

Όσον αφορά την κατανομή της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα διάφορα μέρη του σταφυλιού κατά μέσο όρο, το υψηλότερο ποσοστό εντοπίστηκε στους σπόρους σταφυλιών, μετά στις φλούδες και το μικρότερο στη σάρκα.[90]

Αντιαιμοπεταλιακή δράση

Οι επιδράσεις των παραπροϊόντων των σταφυλιών στη λειτουργία των αιμοπεταλίων έχουν γίνει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιού φάνηκε ότι μπορούν να αναστείλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Ακόμα, η ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση προκυανιδινών (που απομονώνονται από σπόρους σταφυλιού) είχαν ως αποτέλεσμα σημαντική αναστολή του σχηματισμού θρόμβου σε μοντέλα ποντικών.[73]

Τα υπάρχοντα δεδομένα για την ικανότητα των παραπροϊόντων να αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων στηρίζονται σε in vivo, in vitro και ex vivo πειράματα.

Πρόσφατα, μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι τα πλούσια σε πολυφαινόλες ακατέργαστα εκχυλίσματα από σπόρους ή φλούδες σταφυλιού αναστέλλουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον TRAP ή το κολλαγόνο. Επίσης, η κατάποση εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού αναστέλλει την προκαλούμενη από ADP ή κολλαγόνο συσσωμάτωση αιμοπεταλίων σε ανθρώπους.

Οι Olas et al, στα αρχικά πειράματά τους, έδειξαν πως τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιού έχουν αντι-αιμοπεταλιακές ιδιότητες καθώς εμποδίζουν την προσκόλληση των διεγερμένων από θρομβίνη αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο αλλά και τη συσώρευσή τους.[91]

Σε μια νέα μελέτη τους το 2012, με σκοπό τη διερεύνηση του τρόπου δράσης των παραπροϊόντων έναντι της αιμοπεταλιακής συσώρευσης μετά από διέγερση με TRAP ή θρομβίνη, έδειξαν ότι η παρουσία εκχυλισμάτων από σπόρους σταφυλιού (τα οποία προστέθηκαν στα δείγματα πριν από οποιοδήποτε συσσωρευτικό παράγοντα) έχει πολλαπλές επιδράσεις στα αιμοπετάλια. Φάνηκε πως αναστέλλουν τη δράση τόσο της πρωτεολυτικής διάσπασης του PAR που μεσολαβείται από θρομβίνη όσο και του μη πρωτεολυτικού αγωνιστή TRAP. Μάλιστα, ισχυρότερη αναστολή συσώρευσης παρατηρήθηκε στα αιμοπετάλια που είχαν συσσωρευτεί από θρομβίνη παρά από TRAP.[16]

Τα αποτελέσματα του Vitseva et al το 2005, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από σπόρους και φλούδες σταφυλιών προκαλούν αναστολή στη συσώρευση αιμοπεταλίων από TRAP, κολλαγόνο, θρομβίνη, ADP in vitro με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ βελτιώνουν την απελευθέρωση NO και εμποδίζουν την παραγωγή υπεροξειδίου. Το υπεροξείδιο αυξάνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενώ παράγεται και κατά τη συσώρευση αυτών. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με in vitro μελέτες σε ανθρώπινα αιμοπετάλια καθώς και με ex vivo μελέτες σε σκύλους και ανθρώπους.[81]

Σε μια μελέτη του 2002, εξετάστηκαν in vitro και ex vivo οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων σπόρων και φλούδας σταφυλιού επί της συσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από κολλαγόνο. Ήταν γνωστό ότι τα εκχυλίσματα σπόρων και φλούδας σταφυλιών είναι αποτελεσματικά ως αναστολείς αιμοπεταλίων όταν χρησιμοποιούνται μεμονωμένα. Εδώ, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα συστατικά των σπόρων και της φλούδας, όταν υπάρχουν σε συνδυασμό, όπως π.χ. σε ένα εμπορικό παρασκεύασμα, έχουν μεγαλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση από όταν υπάρχουν μεμονωμένα.[88, 92]

Ενώ φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα από σπόρους και φλούδες σταφυλιού αναστέλλουν τις δράσεις των αιμοπεταλίων, ο ακριβής μηχανισμός των ευεργετικών τους επιδράσεων δεν είναι γνωστός.

Ο Bijak et al, το 2011, επισήμανε ότι τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιών έχουν αντιπηκτικές ιδιότητες σε ανθρώπινο αίμα και ότι ο πιθανός υπεύθυνος μηχανισμός για αυτό, είναι η επίδρασή τους στις δραστηριότητες της θρομβίνης, όπως στην πήξη του ινωδογόνου και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.[93]

Σε ένα πιο πρόσφατο *in vitro* πείραμά τους, εξέτασαν τις επιδράσεις των σπόρων *Vitis vinifera* στη δράση της θρομβίνης και τα πιθανά συστατικά τους που είναι υπεύθυνα για αυτές. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή όπως κατεχίνη, επικατεχίνη, κυανιδίνη και κερκετίνη είχαν ανασταλτική επίδραση στη δράση της θρομβίνης, με τα ισχυρότερα αποτελέσματα να εμφανίζουν η κυανιδίνη και η κερκετίνη. Επιπλέον, μετά από επώαση με θρομβίνη, τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιού ανέστειλαν την πρωτεολυτική δραστηριότητά της και συγκεκριμένα την ικανότητά της να διεγείρει τον πολυμερισμό του ινωδογόνου, να σταθεροποιεί το ινώδες και να συσσωρεύει αιμοπετάλια.[17]

Ο Jin et al. το 2014 εξέτασε τον πιθανό μηχανισμό με τον οποίο συμβαίνουν τα παραπάνω και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιών αναστέλλουν τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων που προκαλείται από κολλαγόνο και TRAP με αναστολή της πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφατάσης (PTP). Ακατέργαστα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιών αναφέρθηκαν επίσης ότι αναστέλλουν την απελευθέρωση υπεροξειδίου και ενισχύουν την παραγωγή NO.[11]

Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των παραπροϊόντων οινοποίησης-πολυφαινολών στα αιμοπετάλια.

Πίνακας 4: Δράσεις παραπροϊόντων οινοποίησης-πολυφαινολών στα αιμοπετάλια

Παραπροϊόν	Ποσότητα εκχυλίσματος-φαινολικών συστατικών	Δείγμα αιμοπεταλίων	Συσσωρευτικός παράγοντας	Αποτέλεσμα στα αιμοπετάλια	Πηγή
Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού	5-50μg/ml εκχυλίσματος σπόρων	Πλυμένα αιμοπετάλια (3×10^8 /ml)	20μL Θρομβίνη (4U/ml)	Αναστολή προσκόλλησης διεγερμένων από θρομβίνη αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο Αναστολή συσσώρευσης 50μg/ml → 70% αναστολή	[91]
Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού	1,25-50μg/ml εκχυλίσματος: Συνολική συγκέντρωση φαινολικών συστατικών → 500 mg/g εκχυλίσματος	Αιμοπετάλια απομονωμένα με μοριακή διήθηση	Θρομβίνη (0,1U/ml) TRAP (20μM)	Αναστολή συσσώρευσης	[16]
Εκχύλισμα σπόρων και εκχύλισμα φλούδων σταφυλιού	<u>Φλούδες:</u> υδροξικιναμονικά οξέα, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες και PGPF <u>Σπόροι:</u> PGPF <u>Φαινολικές ενώσεις σε ισοδύναμο γαλλικού οξέος</u> <u>Φλούδες:</u> 0,29mg/mg <u>Σπόροι:</u> 0,75mg/mg	Πλήρες αίμα	Κολλαγόνο 2mg/L	Σπόροι (50mg/L) και φλούδες (250, 500mg/L) μεμονωμένα → Καμία επίδραση στη συσσώρευση 100mg/L σπόροι → Μέτρια αναστολή συσσώρευσης Συνδυασμοί σπόρων (50mg/L) + φλούδων (250mg/L) και σπόροι (100mg/L) + φλούδες (500mg/L) → Αναστολή συσσώρευσης κατά $40,5 \pm 10,1\%$ ($P < 0,005$) και $96,5 \pm 3,1\%$ ($P < 0,001$), αντίστοιχα.	[92]
Σπόροι σταφυλιών	0,5-5-50μg/ml εκχυλίσματος σπόρων	Αιμοπετάλια απομονωμένα με μοριακή διήθηση	Θρομβίνη (0.75 U/mL)	Επαφή θρομβίνης με όλες τις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος (0,5-5-50mg/mL) → δόσοεξαρτώμενη αναστολή συσσώρευσης ($p < 0,001$)	[17]
Εκχύλισμα	100mg/l εκχύλισμα	Πλυμένα	20μM TRAP,		[81]

σπόρων και εκχύλισμα φλουδών σταφυλιού	σπόρων 250,500mg/l εκχύλισμα φλούδας	α αιμοπεταλία $2,5 \times 10^5 / \mu\text{l}$	κολλαγόν ο, θρομβίνη, ADP	Αναστολή συσσώρευσης	
Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιών από πειραματικό αμπελώνα. CS	10μg/ml εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού CS	Πλυμένα αιμοπεταλία $2 \times 10^8 / \text{ml}$	Κολλαγόν ο, TRAP	Αναστολή συσσώρευσης	[11]
Εκχύλισμα σταφυλιού	Φαινολικό περιεχόμενο: $50 \pm 3\%$, Ανθοκυανιδίνες: 3-4%	Πλυμένα αιμοπεταλία	5μM TRAP, ADP	$>20 \mu\text{g/ml}$ εκχύλισμα σταφυλιού $\rightarrow$ Αναστολή συσσώρευσης $50 \mu\text{g/ml} \rightarrow 60\%$ αναστολή επαγόμενη από TRAP	[94]
Εκχύλισμα φλούδας σταφυλιού	<u>Δημιουργία κλασμάτων:</u> <u>Κλάσμα με νερό:</u> ολιγοσακχαρίδες και υδροξυκινναμονικά <u>Κλάσμα με νερό/αιθανόλη:</u> υδροξυκινναμονικά οξέα, ανθοκυανίνες, φλαβονόλες, μονομερείς φλαβονόλες και PGPF <u>Κλάσμα με αιθανόλη:</u> υδροξυκινναμονικά, φλαβονόλες, μονομερείς φλαβονόλες, PGPFs <u>Κλάσμα με αιθανόλη/μεθανόλη, μεθανόλη και 80% υδατική ακετόνη:</u> PGPF	Πλήρες αίμα	Κολλαγόν ο	Κλάσμα με νερό, νερό/αιθανόλη και αιθανόλη $\rightarrow$ ενεργοποίηση συσσώρευσης κατά $3,8 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$), $7,2 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$) και $23,8 \pm 4,2\%$ ($p < 0,001$), αντίστοιχα. Κλάσμα με αιθανόλη/μεθανόλη, μεθανόλη και 80% υδατική ακετόνη $\rightarrow$ αναστολή συσσώρευσης κατά $48,4 \pm 11,4\%$ ($p < 0,005$), $89,6 \pm 5,3\%$ ($p < 0,001$) και $72,5 \pm 8,3\%$ ($p < 0,001$), αντίστοιχα. Το μη κλασματοποιημένο εκχύλισμα φλουδών σταφυλιού $\rightarrow$ ήπια αναστολή συσσώρευσης ($12 \pm 3,8\%$ ($p < 0,01$))	[95]
Φλαβονοειδή (ως καθαρή ουσία)	20μl διαλύματος φλαβονοειδών	Πλήρες αίμα	6,5μM ADP	Αναστολή συσσώρευσης (εκφρασμένη ως περιοχή κάτω από την καμπύλη, AUC) από όλα τα αναλυόμενα φλαβονοειδή (119nM-122μM)	[96]

3.4 Αξιοποίηση παραπροϊόντων

Οι σύγχρονες βιομηχανίες επικεντρωμένες στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούν τα παραπροϊόντα τους, δίνουν μεγάλη προσοχή στην ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση αυτών και των βιοδραστικών τους ενώσεων.[62] Στην Ελλάδα, τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας συνήθως απορρίπτονται σε χώρους υγειονομικής ταφής γεγονός που έχει αρνητικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο.[72] Η χρήση ή η επαναχρησιμοποίηση των παραπροϊόντων, ειδικά εκείνων που προέρχονται από υλικά φυτικής προέλευσης, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος αυτών, το μειωμένο κόστος αποθήκευσης και εξάλειψης και το φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα τους.[62]

Τα παραπροϊόντα μπορούν να αξιοποιηθούν με ποικίλους τρόπους.

Λιπάσματα και ζωοτροφές

Το τελικό στερεό υπόλειμμα που προκύπτει μετά την οινοποίηση, μερικές φορές χρησιμοποιείται ως λίπασμα. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα φαινολικών ενώσεων σε αυτό, αποτελούν πρόβλημα επειδή αναστέλλουν τη βλάστηση των σπόρων.

Το GP έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στην τροφή των ζώων. Όμως, η παρουσία πολυμερών πολυφαινολών μειώνει την πεπτικότητα, καθώς αναστέλλει διάφορα πρωτεολυτικά και άλλα ένζυμα. Όταν αυτό το υλικό είναι ενσωματωμένο εντός των ζωοτροφών ως μορφή αξιοποίησης, ίσως απαιτούνται επιπρόσθετες διαδικασίες ζύμωσης για να αποφευχθούν γαστρεντερικές διαταραχές λόγω της παρουσίας μη εύπεπτων πολυσακχαριτών.

Το φυτοχημικό προφίλ της φλούδας των σταφυλιών υποστηρίζει τη χρήση του ως μια ενδιαφέρουσα πηγή βιοενεργών φυτοχημικών και άλλων συστατικών. Παρ' όλα αυτά, η έλλειψη κατάλληλων διαδικασιών αξιοποίησης ωθεί αυτό να χρησιμοποιείται κυρίως ως λίπασμα ή να απορρίπτεται σε ανοικτές περιοχές που δυνητικά προκαλεί περιβαλλοντικά προβλήματα.[73]

Ο Μανιός και οι συνεργάτες του, το 2004, διερεύνησαν την πιθανή χρήση των φλουδών ως ένα υπόστρωμα για την καλλιέργεια φράουλας, προσπάθεια που είχε θετική έκβαση. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα παραπροϊόντα οινοποιίας θα μπορούσαν να

χρησιμοποιηθούν ως βελτιωτικά εδάφους και προσροφητικά για βαρέα μέταλλα από υδατικά διαλύματα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ορισμένα παραπροϊόντα περιέχουν βαρέα μέταλλα γεγονός που αποτρέπει τη χρήση τους στο έδαφος.[84, 97]

Τέλος, η εμπορική αξία του τσάμπουρου είναι χαμηλή και χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή ή σε τροποποιήσεις του εδάφους. Θα μπορούσε να είναι μια πολύτιμη και ενδιαφέρουσα πηγή διαιτητικών ινών και αντιοξειδωτικών, αν και τα δεδομένα είναι περιορισμένα.[73]

Βιομηχανίες τροφίμων

Η οξείδωση των λιπιδίων αποτελεί κρίσιμο πρόβλημα για τα προϊόντα τροφίμων προκαλώντας απώλεια λιποδιαλυτών βιταμινών και απαραίτητων λιπαρών οξέων, παράγοντας ενώσεις με τοξικές επιδράσεις και επομένως επηρεάζοντας την ποιότητα, σταθερότητα, ασφάλεια κα χρόνο ζωής των τροφίμων.[71]

Τα παραπροϊόντα οινοποίησης αποτελούν μια εναλλακτική πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και θεωρούνται απολύτως ασφαλή σε σύγκριση με συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις. Γι' αυτό και η χρήση τους σε λειτουργικά προϊόντα και συμπληρώματα διατροφής συνεχώς επεκτείνεται.[62, 73, 84, 98] Λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων τους, τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τα απόβλητα των σταφυλιών, θα δρουν μειώνοντας την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών και αναστέλλοντας την οξείδωση των λιπιδίων εξασφαλίζοντας ποιότητα και ασφάλεια στα τρόφιμα. Αυτό είναι σημαντικό από τεχνολογικής άποψης, καθώς υπάρχει μια αυξανόμενη ζήτηση για την ανάπτυξη προϊόντων με εκτεταμένη διάρκεια ζωής στο ράφι.[71]

Τόσο οι σπόροι όσο και οι φλούδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολύτιμες πηγές για την ανάκτηση αντιοξειδωτικών. Οι σπόροι, ωστόσο, κερδίζουν έδαφος ως κατάλληλοι για δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής.

Οι φλούδες θεωρούνται ως το καλύτερο υπόστρωμα για την παραγωγή της πουλουλάνης (pullulan), ενός πολυσακχαριδικού πολυμερούς με μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον. Χρησιμοποιείται ως ένα συστατικό χαμηλών θερμίδων σε τρόφιμα, σε μικροκάψουλες που προσδίδουν γεύση και για ενίσχυση του ιξώδους.[84]

Το GP ξεχωρίζει στη βιομηχανία ως ένα κατάλληλο υλικό για να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες διαδικασίες όπως στην εκχύλιση ελαίου από τους σπόρους και πολυφαινολών, στην παραγωγή κιτρικού οξέος, τρυγικού οξέος, μεθανόλης, αιθανόλης και κόμμι μέσω ζύμωσης και στην παραγωγή ενέργειας από μεθανοποίηση. Για αυτά τα απόβλητα έχουν επίσης περιγραφεί πρόσθετες χρήσεις για την απόκτηση αλκοολούχων ποτών από σύντομες ζυμώσεις και απόσταξη. Από αυτό λαμβάνονται προϊόντα φιλικά προς το περιβάλλον και οικονομικά προσιτά για τη βιομηχανία τροφίμων.[73]

Το GP με τις διαιτητικές ίνες (γλυκάνες, κυτταρίνη και πηκτίνες) που περιέχει, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε συμπληρώματα διατροφής συνδυάζοντας τα οφέλη των διαιτητικών ινών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας προλαμβάνοντας έτσι τις καρδιαγγειακές παθήσεις.

Μελέτες δείχνουν ότι το GP από λευκές ποικιλίες σταφυλιού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων προϊόντων και συγκεκριμένα για τη δημιουργία μπισκότων, ως εναλλακτική πηγή διαιτητικών ινών και πολυφαινολών. Επιπλέον, εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε διαιτητικές ίνες, πιθανολογείται ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως λειτουργικό συστατικό σε βρώσιμα θαλασσινά προϊόντα.[99]

Βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών

Το GP αποτελεί μια φθηνή πηγή για την εκχύλιση φυτοχημικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών.[62] Η αξιοποίησή των παραπροϊόντων ως πηγή βιοδραστικών φυτοχημικών και η εφαρμογή τους στις βιομηχανίες αυτές αποτελεί αποτελεσματική, κερδοφόρα και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση για αυτά.[71]

Το pullulan που αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να αξιοποιηθεί και στη βιομηχανία φαρμάκων. Χρησιμοποιείται στην παρασκευή βρώσιμων μεμβρανών και πόσιμων προϊόντων υγιεινής (αποσμητικά αναπνοής, στοματικά διαλύματα) και στη δημιουργία ταμπλετών ως παράγοντας που εμποδίζει την οξείδωση.[84]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την επίδραση που έχουν τα παραπροϊόντα της οινοποίησης, στις βιολογικές δράσεις αιμοπεταλίων ανθρώπου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα με δυο διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιού, εκχυλίστηκαν τα βιοδραστικά συστατικά με διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης και εξετάστηκε η ικανότητα τους να τροποποιούν την συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Εκχυλίσματα παραπροϊόντων οινοποίησης

Δείγματα

Τα παραπροϊόντα οινοποιίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονταν από κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών και συγκεκριμένα από την Cabernet Sauvignon (CS) και τη Syrah (S). Συλλέχθηκε ο πολτός από φλούδες, σπόρους και λίγη σάρκα σταφυλιών και από αυτόν δημιουργήθηκαν τα δείγματα εκχυλισμάτων με ειδικές μεθόδους εκχύλισης.



Cabernet Sauvignon



Syrah

Εικόνα 15: Σταφύλια ποικιλίας Cabernet Sauvignon και Syrah (πηγή: [100])

Περιγραφή μεθόδων εκχύλισης

Τα παραπροϊόντα και από τις 2 ποικιλίες σταφυλιών υποβλήθηκαν σε 4 διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, κάθε μία από τις οποίες παρείχε διαφορετικού είδους συστατικά των παραπροϊόντων. Με την πρώτη μέθοδο εκχύλισης λήφθηκαν τα λιποδιαλυτά συστατικά αλλά και κάποια υδατοδιαλυτά, με τη δεύτερη τα ενδιάμεσης πολικότητας λιποδιαλυτά συστατικά, με την τρίτη τα χαμηλής πολικότητας λιποδιαλυτά και με την τέταρτη τα υδατοδιαλυτά συστατικά των παραπροϊόντων. Οι 4 αυτές μέθοδοι επαναλήφθηκαν 3 φορές για κάθε μία από τις ποικιλίες σταφυλιού. Επομένως, στο τέλος προέκυψαν 3 διαφορετικές σειρές εκχυλίσεων για κάθε ποικιλία.

1^η μέθοδος: Bligh Dyer

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, είχαν χρησιμοποιήσει αυτή τη μέθοδο και είχε φανεί ότι συμβάλλει στην καλύτερη ανίχνευση βιοδραστικών συστατικών στο κρασί. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκε και στα παραπροϊόντα.

Αρχή της μεθόδου

Είναι γνωστό ότι τα λιποειδή διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών ενός βιολογικού δείγματος, καθώς και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών όπως αλάτων, αμινοξέων ή σακχάρων. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος στο διφασικό $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v), στη χλωροφορμική φάση κατανέμονται μόνο τα λιποειδή ενώ στη δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του βιολογικού δείγματος.

Πειραματική διαδικασία

Σε ένα δοχείο του 1L προστέθηκαν 25g παραπροϊόντων και 65,8ml μεθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή για 10min. Συμπληρώθηκαν 32,9ml χλωροφορμίου και το μίγμα αναδεύτηκε και παρέμεινε για 10min. Τέλος, προστέθηκαν 26,3ml νερού για να προκύψει μονοφασικό σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) και όλα αναδεύτηκαν ισχυρά. Το σύστημα παρέμεινε και αναδεύτηκε στα 120rpm για 18-20 ώρες στους 45°C.

Μετά το πέρας των ωρών, το μίγμα διηθήθηκε από ηθμό με κενό αέρος (Buchner) με σκοπό να απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια. Το διήθημα συλλέχθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και ο όγκος του καταγράφηκε.

Το διήθημα μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη του 0,5L και στη συνέχεια σε περιστρεφόμενη συσκευή υπό πίεση (flash evaporator) για να εξατμιστούν οι διαλύτες και συγκεκριμένα το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη (200 έως 60mbar). Το διήθημα, που πλέον περιείχε μόνο νερό, μεταφέρθηκε σε κυλινδρικό σωλήνα ώστε να υπολογιστεί ο όγκος του. Μεταφέρθηκε έπειτα σε διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες χλωροφορμίου και μεθανόλης ώστε να προκύψει το διφασικό σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και το μίγμα αφέθηκε

σε ηρεμία μέχρι που αποκαταστάθηκε η ισορροπία και επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Εν συνεχεία, παραλήφθηκε η χλωροφορμική (κάτω) φάση σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη του 0,5L, πραγματοποιήθηκε εξάτμιση στο flash, ζύγιση, προσθήκη 10ml χλωροφορμίου, παραλαβή με πιπέτα Pasteur σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα (με αλουμινόχαρτο στο καπάκι) και αποθήκευση στους -20 °C

Παραλήφθηκε επίσης και η υδατική (πάνω) φάση σε σφαιρική φιάλη, έγινε εξάτμιση στο flash και μόλις εξατμίστηκε η μεθανόλη, το μίγμα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένους ουροσυλλέκτες, αποθηκεύτηκε στους -20 °C και λυοφιλοποιήθηκε.

2^η μέθοδος: 80% αιθανόλη

Αρχή της μεθόδου

Με τη βοήθειά της, παραλαμβάνονται τα ενδιάμεσης πολικότητας λιποδιαλυτά συστατικά του μίγματος.

Πειραματική διαδικασία

Σε ένα δοχείο του 1L προστέθηκαν 25g παραπροϊόντων και 125ml αιθανόλης 80%. Το όλον παρέμεινε και αναδεύτηκε στα 120rpm για 18-20 ώρες στους 45°C. Το μίγμα διηθήθηκε από Buchner έως ότου απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια. Το διήθημα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Πραγματοποιήθηκε εξάτμιση στο flash, ζύγιση, προσθήκη 17mL 80% αιθανόλης, παραλαβή με πιπέτα Pasteur σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (με αλουμινόχαρτο στο καπάκι) και αποθήκευση στους -20 °C.

3^η μέθοδος: Εξάνιο

Αρχή της μεθόδου

Με αυτή τη μέθοδο παραλαμβάνονται τα χαμηλής πολικότητας λιποδιαλυτά συστατικά του μίγματος.

Πειραματική διαδικασία

Σε ένα δοχείο του 1L προστέθηκαν 25g παραπροϊόντων και 125ml εξάνιου. Το μίγμα παρέμεινε και αναδεύτηκε στα 120rpm για 18-20 ώρες, στους 45°C. Διηθήθηκε από Buchner έως ότου απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια και μεταφέρθηκε σε

προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Πραγματοποιήθηκε εξάτμιση στο flash, ζύγιση, προσθήκη 10mL εξανίου με πιπέτα Pasteur σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (με αλουμινόχαρτο στο καπάκι) και αποθήκευση στους -20 °C.

4^η μέθοδος: Νερό

Αρχή της μεθόδου

Με τη μέθοδο αυτή παραλαμβάνονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του μίγματος.

Πειραματική διαδικασία

Σε ένα δοχείο του 1L προστέθηκαν 25g παραπροϊόντων και 125ml νερού. Το μίγμα παρέμεινε και αναδεύτηκε στα 120rpm για 18-20 ώρες, στους 45°C. Στη συνέχεια, διηθήθηκε από Buchner ώστε να απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια. Το διήθημα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένους ουροσυλλέκτες, αποθηκεύτηκε στους -20°C και λυοφιλιοποιήθηκε.

Οι 4 μέθοδοι εκχύλισης που περιγράφηκαν επαναλήφθηκαν 3 φορές τόσο για τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon όσο και της Syrah. Στο τέλος, για κάθε ποικιλία υπήρχαν 3 σειρές εκχυλισμάτων. Κάθε σειρά αποτελούταν από 4 σωληνάκια και κάθε ένα από αυτά περιείχε τα συστατικά που είχαν εκχυλιστεί με την εκάστοτε μέθοδο εκχύλισης μαζί με τον αντίστοιχο διαλύτη τους. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

5.2 Βιολογικά δείγματα

5.2.1 Πρωτόκολλο παραλαβής αίματος

Χαρακτηριστικά εθελοντών

Οι εθελοντές που επιλέχθηκαν ήταν φαινομενικά υγιή άτομα, χωρίς χρόνιες παθήσεις, που δεν λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή. Η λήψη αίματος πραγματοποιήθηκε έπειτα από 12ωρη νηστεία των εθελοντών.

Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Βάσει του πρωτοκόλλου, χρειάστηκε η παραλαβή 55ml αίματος από κάθε εθελοντή. Οι αιμοληψίες έγιναν από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Το ληφθέν αίμα τοποθετούνταν άμεσα σε 4 πλαστικά σωληνάκια των 14ml. Κάθε σωληνάκι περιείχε ήδη 1,4ml αντιπηκτικού παράγοντα. Το αντιπηκτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα κιτρικού οξέος σε αναλογία αίματος/αντιπηκτικού 10/1. Ουσιαστικά, το κιτρικό δεσμεύει το Ca^{2+} και έτσι αναστέλλει την πήξη του αίματος. Επομένως, κάθε σωληνάκι στο τέλος αποτελούνταν από 1,4ml κιτρικού οξέος και 12,6ml αίματος.

Ακολουθούσε ανάδευση αναποδογυρίζοντας το κάθε σωληνάκι με το αίμα 4-5 φορές απαλά προσέχοντας να μην αφρίσει.

Εν συνεχεία, για την απομόνωση των αιμοπεταλίων, τα 4 σωληνάκια τοποθετούνταν για φυγοκέντρηση στις 1300 στροφές για 16 λεπτά στους 20°C χωρίς φρένο. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο που προέκυπτε και από τα 4 σωληνάκια συλλεγόταν με πιπέτα σε πλαστικό σωλήνα με προσοχή. Σε αυτές τις συνθήκες γινόταν καθίζηση των ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων. Επομένως, στο υπερκείμενο παρέμενε το πλάσμα που ήταν πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Το PRP αφηνόταν στον πάγκο έως ότου να παραληφθεί και το PPP. Τα 4 σωληνάκια τοποθετούνταν για 2^η φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 20°C. Με την αύξηση των στροφών, το αποτέλεσμα ήταν η καθίζηση όλων των κυττάρων και των αιμοπεταλίων. Το υπερκείμενο, λοιπόν, μετά τη 2^η φυγοκέντρηση αποτελούσε το πλάσμα που ήταν φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP), το οποίο επίσης συλλεγόταν με πιπέτα σε έναν άλλο πλαστικό σωλήνα. Η συλλογή του PPP ήταν χρήσιμη όταν ήταν απαραίτητο να αραιωθεί το PRP ούτως ώστε να φτάσει στην επιθυμητή απορρόφηση.

Υπολογισμός αριθμού αιμοπεταλίων

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αιμοπεταλίων στο αίμα κάθε εθελοντή, γινόταν φωτομέτρηση του PRP στα 530nm με τυφλό το PPP. Ήταν γνωστό, ότι απορρόφηση στα 530nm ίση με 0,8 αντιστοιχεί σε 500.000 αιμοπετάλια/μL. Εάν η τιμή απορρόφησης, που προέκυπτε από τη φωτομέτρηση, ήταν μεγαλύτερη από 0,8, η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ρυθμιζόταν στα 500.000 αιμοπετάλια/μL με προσθήκη ποσότητας PPP από τον ίδιο εθελοντή, σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης. ($\text{Ααρχ} \times \text{Ναρχ} = \text{Ατελ} \times \text{Ντελ}$). Με

αυτόν τον τρόπο εξασφαλιζόταν ότι όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν από όλους τους εθελοντές είχαν την ίδια συγκέντρωση αιμοπεταλίων.

5.2.2 Προετοιμασία συσσωρευτικών παραγόντων

PAF

Για την προετοιμασία του PAF ένα σωληνάκι από το stock τοποθετούταν σε άζωτο για να εξατμιστεί ο διαλύτης. Αφού συνέβαινε αυτό, προσθέτονταν με πιπέτα BSA, γινόταν Vortex και το σωληνάκι αφηνόταν στον πάγκο για 10 λεπτά για να δεσμευτεί η BSA με τον PAF. Η BSA αποτελεί διαλύτη για τα λιποειδή και είναι μη τοξική για τα κύτταρα. Σε erppendorf φτιάχνονταν δεκαδικές αραιώσεις από το σωληνάκι, με διαλύτη BSA. Στο τέλος είχαμε διάφορες αραιώσεις του PAF οι οποίες χρειαζόνταν γιατί τα αιμοπετάλια κάθε εθελοντή απαιτούσαν διαφορετική συγκέντρωση PAF για να φτάσουν στο επιθυμητό επίπεδο συσσώρευσης. Στο ψυγείο φυλάσσονταν σωληνάκια με PAF διαλυμένο σε BSA. Οι συγκεντρώσεις PAF που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν της τάξης των 10^{-4} - 10^{-6} M.

ADP

Για την προετοιμασία του ADP δημιουργούνταν επίσης δεκαδικές αραιώσεις του, με διαλύτη φυσιολογικό ορό. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5mM, 0,5mM και 0,05mM.

TRAP

Οι δεκαδικές αραιώσεις του TRAP φτιάχνονταν, επίσης, με διαλύτη φυσιολογικό ορό και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν τα 1mM και τα 0,1mM.

5.3 Έλεγχος επίδρασης εκχυλισμάτων στις βιολογικές δράσεις των αιμοπεταλίων

Μέτρηση συσσώρευσης αιμοπεταλίων με δράση διάφορων αγωνιστών

Χρησιμοποιήθηκε ειδικό τετρακάναλο μηχάνημα (Chrono-log) για την καταγραφή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων.

Στην ειδική θέση του 1^{ου} καναλιού τοποθετούνταν μία κυψελίδα με 1mL PPP, που αποτελούσε το τυφλό-διάλυμα αναφοράς. Και τα 4 κανάλια ρυθμίζονταν ώστε να αναγνωρίζουν ως τυφλό εκείνο που ήταν στο κανάλι 1. Αρχικά, γινόταν προσθήκη 250μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιείχε 5×10^5 κύτταρα/μL σε 4 γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου, του 0,5mL η κάθε μία. Τα αιμοπετάλια επώάζονταν για 10 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Στη συνέχεια, στις κυψελίδες με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων, τοποθετούνταν μικροί μαγνητικοί αναδευτήρες που περιστρέφονταν με 1200 στροφές το λεπτό (rpm, rounds per min). Με το πέρας των 10 λεπτών, οι 4 κυψελίδες τοποθετούνταν στις ειδικές θέσεις του συσσωρευματομέτρου, δηλαδή στα 4 διαφορετικά κανάλια και γινόταν προσθήκη με πιπέτα 2μL διαλύτη DMSO σε κάθε κυψελίδα. Τα 2μL ήταν η μέγιστη ποσότητα που μπορούσε να προστεθεί γιατί το DMSO σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τοξικό για τα κύτταρα. Μετά από άλλα 5 λεπτά επώασης εισαγόταν και ο συσσωρευτικός παράγοντας (PAF, ADP ή TRAP) ορισμένης τελικής συγκέντρωσης, αφού πρώτα είχαν μηδενιστεί τα 4 κανάλια.

Στη συνέχεια, καταγραφόταν η καμπύλη συσσώρευσης ως αύξηση της διαπερατότητας. Η καμπύλη είχε μια κλίμακα από 0% - 100% συσσώρευση. Όσο η καμπύλη κατευθυνόταν προς τα κάτω τόσο μεγαλύτερο ήταν και το μέγεθος της συσσώρευσης που είχε προκαλέσει ο κάθε συσσωρευτικός παράγοντας.

Στα πρώτα δευτερόλεπτα μετά την ανάμειξη του συσσωρευτικού παράγοντα με το PRP, όπου τα αιμοπετάλια αλλάζουν σχήμα και αυξάνουν σε διάμετρο, η διαπερατότητα ακτινοβολίας μέσα από τις κυψελίδες με το PRP μειωνόταν. Αυτή η μείωση, αποτυπωνόταν με μια αύξηση της καμπύλης προς τα πάνω.

Η αύξηση της διαπερατότητας που συνέβαινε στη συνέχεια, στηριζόταν στο γεγονός ότι κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγαζόταν το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διερχόταν η δέσμη ακτινοβολίας. Δηλαδή, η δίοδος ακτινοβολίας

αυξανόταν και το γεγονός αυτό αποτυπωνόταν με ροή της καμπύλης με κατεύθυνση προς τα κάτω.

Το ύψος και η μορφή της καμπύλης ήταν ανάλογα με τη συσσώρευση. Όσο μεγαλύτερη συσσώρευση προκαλούνταν, τόσο περισσότερη ακτινοβολία περνούσε μέσα από την κυψελίδα και τόσο πιο χαμηλά κατέβαινε η καμπύλη, κατευθυνόμενη προς το 100% συσσώρευσης.

Γενικά, το φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται και από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχει ένα σημείο πλατό, όπου μετά από αυτό, ακόμα και αν γίνει προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας συσσωρευτικού παράγοντα η καμπύλη δεν θα πάει πιο κάτω, δηλαδή η συσσώρευση δεν θα αυξηθεί άλλο.

Με κάθε συσσωρευτικό παράγοντα που χρησιμοποιούταν στο παρόν πείραμα, γινόταν καμπύλη αναφοράς προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωσή του, που έδινε συσσώρευση της τάξης του 50% (στην κλίμακα του Chrono-log). Για το σκοπό αυτό, στις 4 πρώτες κυψελίδες του 1^{ου} πειράματος, εισάγονταν διαφορετικές ποσότητες και αραιώσεις συσσωρευτικού παράγοντα προκειμένου να δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη. Η συγκέντρωση που έδινε περίπου 50% συσσώρευση χρησιμοποιούνταν σε όλα τα πειράματα που ακολουθούσαν στο αίμα του ίδιου εθελοντή.

Προσδιορισμός %αναστολής αιμοπεταλίων μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων

Παράλληλα με το πρώτο πείραμα αναφοράς προετοιμάζονταν τα δείγματα των εκχυλισμάτων. Αφού αφήνονταν στον πάγκο να ξεπαγώσουν, γινόταν Vortex και ακολουθούσε δημιουργία διάφορων συγκεντρώσεων εκχυλίσματος, σε κάθε μέθοδο εκχύλισης και για τις 3 σειρές εκχυλίσεων. Ο σκοπός αυτού του βήματος ήταν να δημιουργηθεί για κάθε μέθοδο εκχύλισης και συσσωρευτικό παράγοντα, καμπύλη, με σημεία συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων που προκαλούν αναστολή από 20 έως 80% στα αιμοπετάλια. Μέσω της καμπύλης, θα προσδιοριζόταν η συγκέντρωση εκχυλίσματος που είναι ικανή να επιφέρει 50% αναστολή (IC₅₀).

Επομένως, μετά τον εντοπισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης συσσωρευτικού παράγοντα, που έδινε συσσώρευση μεγέθους 50% η οποία χρησιμοποιούνταν για να έχουμε ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα όσον αφορά την αναστολή, ακολουθούσε ο υπολογισμός της

αναστολής που προκαλούσαν τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων οينوποιίας στη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα στάδια. Αρχικά, 250μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων τοποθετούνταν σε κάθε μία από τις 4 γυάλινες κυψελίδες του συσσωρευματομέτρου. Μετά από 10 λεπτά επώασης, προσθέτονταν οι μικροί μαγνητικοί αναδευτήρες και οι κυψελίδες τοποθετούνταν στις ειδικές θέσεις του συσσωρευματομέτρου. Στο πρώτο σωληνάκι προσθέτονταν πάντα 2μL DMSO και λειτουργούσε ως πρότυπο. Στα επόμενα τρία έμπαιναν 2μL διάφορων συγκεντρώσεων από κάθε ένα από τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων που είχαν απομονωθεί από την κάθε μέθοδο εκχύλισης, αφού πρώτα είχε γίνει Vortex. Αυτά επωάζονταν για 5 λεπτά. Με το πέρας των 5 λεπτών εισαγόταν ο εκάστοτε συσσωρευτικός παράγοντας στη βέλτιστη συγκέντρωση που έχει βρεθεί από την καμπύλη αναφοράς ότι δίνει 50% συσσώρευση και ελεγχόταν η δράση του για 4 λεπτά. Και στις 4 κυψελίδες κάθε σειράς (1 πρότυπο με DMSO + 3 με εκχυλίσματα) προσθέτονταν η ίδια ποσότητα συσσωρευτικού παράγοντα. Κάθε τριάδα που περιείχε εκχύλισμα συγκρινόταν με το αντίστοιχο πρότυπο δείγμα με DMSO της ίδιας σειράς, προκειμένου να καταγραφεί η μεταβολή που επέφερε στη δράση των αιμοπεταλίων, η επώαση με παραπροϊόντα, σε σχέση με το πρότυπο που δεν είχε.

Οι ίδιες διαδικασίες επιτελέστηκαν για κάθε συνδυασμό συσσωρευτικού παράγοντα και διαφόρων συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων από κάθε μέθοδο εκχύλισης και των 2 ποικιλιών σταφυλιών. Οι χειρισμοί που εκτελούνταν με το αίμα του κάθε εθελοντή ήταν απαραίτητο να γίνονται με γρήγορο ρυθμό, καθώς τα αιμοπετάλια ως ευαίσθητα κύτταρα, εξασθενούσαν με το πέρασμα κάποιων ωρών μετά τη λήψη του αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Απόδοση εκχυλίσεων

Τα παραπροϊόντα των δύο ποικιλιών υποβλήθηκαν στις 4 διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, που επαναλήφθηκαν 3 φορές για κάθε ποικιλία, όπως αναλύθηκε παραπάνω. Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται οι μάζες των εκχυλισμάτων που προέκυψαν μετά από την κάθε εκχύλιση ανά γραμμάριο παραπροϊόντος.

Πίνακας 5: Μάζες εκχυλισμάτων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon ανά μέθοδο εκχύλισης

g εκχυλίσματος/g παραπροϊόντος					
	BLIGH DYER				
	CHCl ₃	W-BD	Eth	Hex	W
CS1	0,051	0,042	0,016	0,002	0,060
CS2	0,016	0,033	0,010	0,002	0,060
CS3	0,021	0,039	0,043	0,002	0,074

Πίνακας 6: Μάζες εκχυλισμάτων της ποικιλίας Syrah ανά μέθοδο εκχύλισης

g εκχυλίσματος/g παραπροϊόντος					
	BLIGH DYER				
	CHCl ₃	W-BD	Eth	Hex	W
S1	0,023	0,038	0,040	0,003	0,068
S2	0,040	0,042	0,011	0,003	0,062
S3	0,015	0,042	0,032	0,002	0,063

6.2 Μάζες εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Για τη διεξαγωγή ενός αξιόπιστου συμπεράσματος όσον αφορά την τιμή του IC₅₀ ήταν απαραίτητο να δημιουργηθεί καμπύλη αναφοράς με μάζες εκχυλισμάτων που

προκαλούσαν αναστολή σε αιμοπετάλια διεγερμένα από PAF, ADP ή TRAP από 20-80%. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων. Όλα τα εκχυλίσματα από κάθε εκχύλιση δοκιμάστηκαν ως πυκνά αλλά και αραιωμένα. Το εύρος των μαζών εκχυλισμάτων παραπροϊόντων Cabernet Sauvignon και Syrah που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 7: Μάζες εκχυλισμάτων Cabernet Sauvignon που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Εύρος συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (μg/κυψελίδα)				
		PAF	ADP	TRAP
CHCl₃	CS1	9-312	31-624	83-624
	CS2	24-250	19-250	39-199
	CS3	25-300	25-300	25-300
W-BD	CS1	0,13-79,5	0,13-79,5	0,13-79,5
	CS2	0,09-54,4	0,09-54,4	0,09-54,4
	CS3	0,2-60,5	0,1-60,5	0,2-60,5
Eth	CS1	38-116	38-116	38-116
	CS2	48-196	9-391	44-391
	CS3	39-159	21-159	21-220
Hex	CS1	3-240	3-240	5-240
	CS2	2-240	2-240	2-240
	CS3	4-240	2-240	2-240
W	CS1	0,12-100,8	0,12-100,8	0,11-100,8
	CS2	0,18-156,9	0,18-156,9	0,26-156,9
	CS3	0,49-148,4	0,25-148,4	0,49-148,4

Πίνακας 8: Μάζες εκχυλισμάτων Syrah που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Εύρος συγκεντρώσεων εκχυλίσματος (μg/κυψελίδα)				
		PAF	ADP	TRAP
CHCl₃	S1	50-250	50-250	50-250
	S3	50-250	50-125	50-250
W-BD	S1	0,12-75,7	0,12-75,7	0,12-75,7
	S3	0,12-83,4	0,12-83,4	0,12-83,4
Eth	S1	22-220	55-220	22-220
	S3	88-220	88-220	88-220
Hex	S1	30-240	12-240	7-240
	S3	240	12-240	240
W	S1	0,17-169,7	0,17-169,7	0,17-169,7
	S3	0,17-158,4	0,26-158,4	0,17-158,4

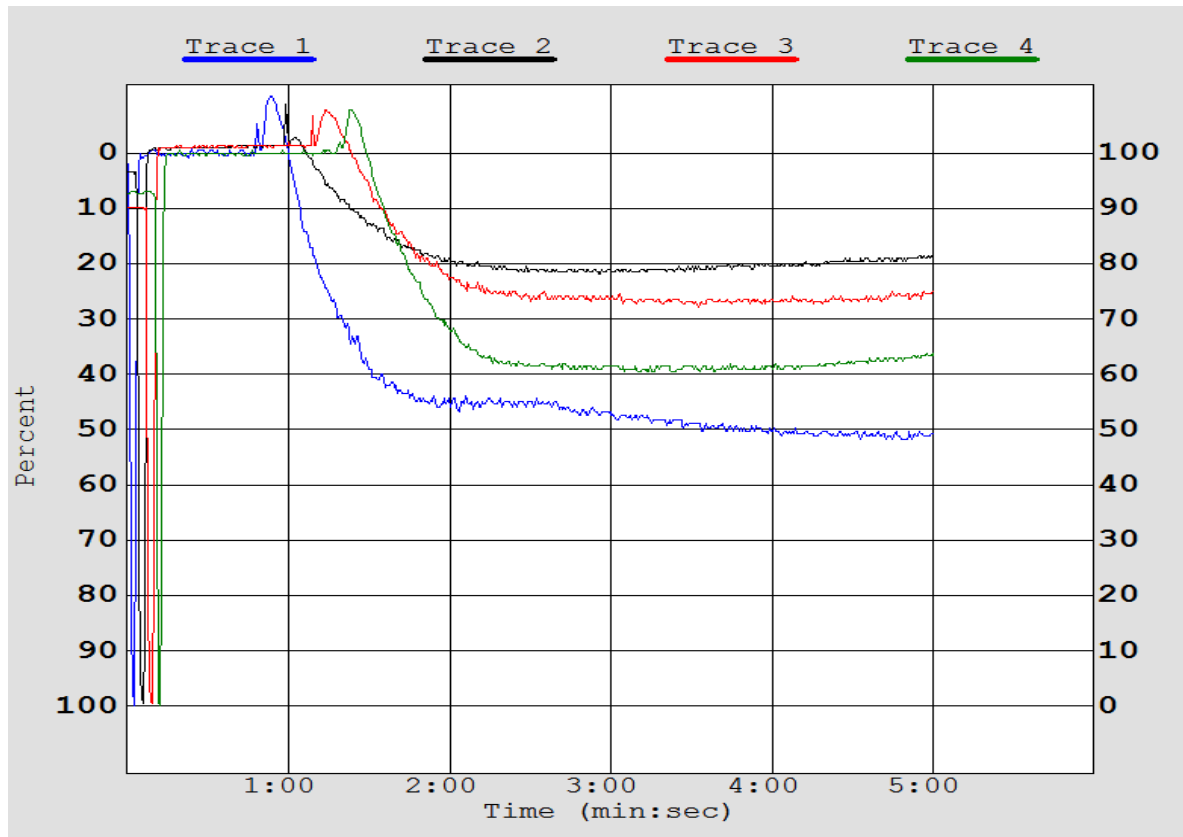
6.3 Αντ αιμοπεταλιακή δράση Cabernet Sauvignon

Εξετάστηκε η δράση που επιφέρει στα αιμοπετάλια η επώασή τους με διάφορες ποσότητες εκχυλισμάτων παραπροϊόντων από κάθε μέθοδο εκχύλισης (Κάθε μέθοδος είχε επαναληφθεί 3 φορές: CS1,CS2,CS3). Τα αιμοπετάλια διεγείρονταν με PAF, ADP ή TRAP.

Η σύγκριση των δράσεων των παραπροϊόντων στα αιμοπετάλια σε σχέση με το πρότυπο (αιμοπετάλια με DMSO) έγινε με βάση τη διαφορά ύψους συσσώρευσης και εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC) που είχαν, στα 4 λεπτά δράσης του συσσωρευτικού παράγοντα.

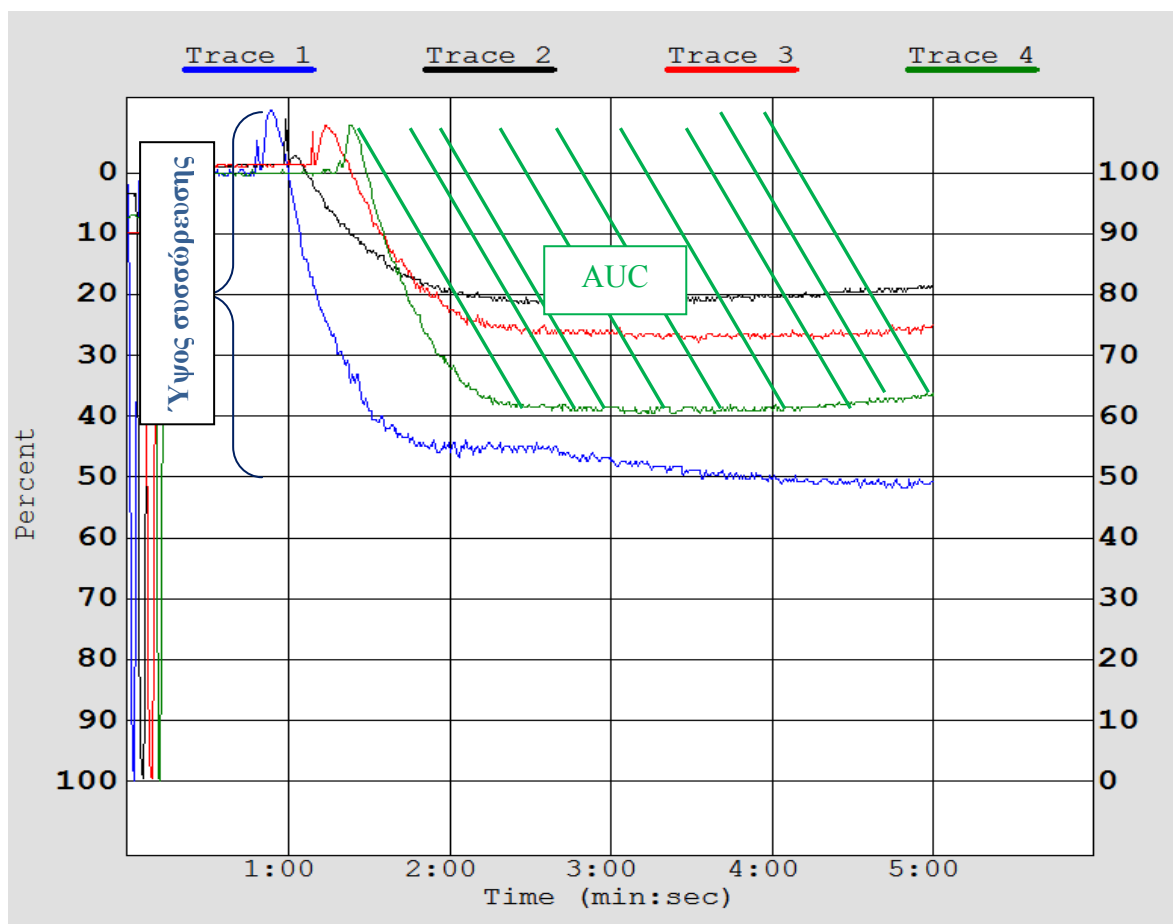
Η μορφή των καμπυλών συσσώρευσης που καταγράφονταν από το μηχάνημα φαίνεται στην εικόνα 16. Στο trace 1 αποτυπώνεται το πρότυπο, που έπειτα από διέγερση με τον συσσωρευτικό παράγοντα φτάνει σε ύψος συσσώρευσης περίπου στο 50%. Στα Trace 2,3

και 4 αποτυπώνονται οι ανασταλτικές δράσεις των παραπροϊόντων (σε σύγκριση με το trace 1) που μειώνουν δόσοεξαρτώμενα τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.



Εικόνα 16: Μορφή καμπυλών συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Το ύψος συσσώρευσης και το AUC για κάθε συσσώρευση (εικόνα 17), υπολογίζονταν από το συσσωρευματομέτρο.



Εικόνα 17: Απεικόνιση ύψους συσσώρευσης και AUC

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν την επίδραση που είχαν τα εκχυλίσματα (μάζες σε μg εκχυλίσματος/κυψελίδα) κάθε μεθόδου εκχύλισης της ποικιλίας Cabernet Sauvignon σε αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF, ADP ή TRAP.

1^{ος} τρόπος εκχύλισης Bligh Dyer

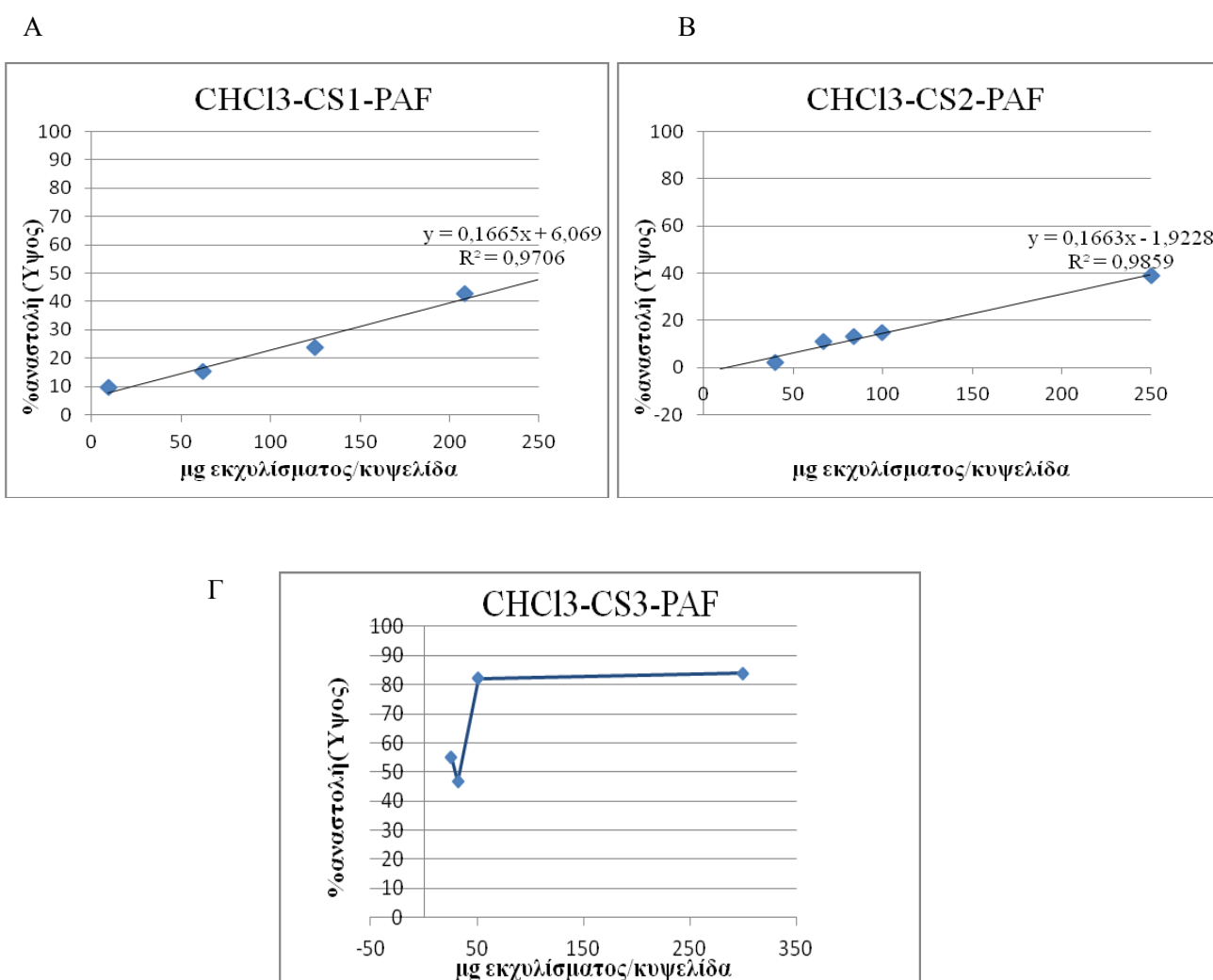
CHCl₃ CS (Εκχυλίσσεις 1,2,3)

– PAF

Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 1)

- Από το πρώτο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 9-312 μg . Η μεγαλύτερη αναστολή όσον αφορά το ύψος συσσώρευσης, επιτεύχθηκε με 209 μg εκχυλίσματος και ήταν της τάξης του 42%. Ωστόσο, μικρότερες ποσότητες εκχυλίσματος προκαλούσαν αναστολή με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Γι' αυτό το λόγο υπολογίστηκε το IC_{50} μέσω της καμπύλης στα 264 μg .

- Το δεύτερο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκε σε μάζες από 24-250μg. Η μεγαλύτερη αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν μικρότερη του 50% αλλά και πάλι μικρότερες ποσότητες εκχυλίσματος προκαλούσαν αναστολή με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Άρα, το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 313μg.
- Το τρίτο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκε σε μάζες εκχυλίσματος από 25-300μg. Οι διάφορες ποσότητες εκχυλίσματος προκαλούσαν αναστολή. Μετά τα 52μg παρατηρήθηκε ένα πλατό δράσης του εκχυλίσματος. Το IC₅₀ υπολογίστηκε στα 27μg, από τα τρία πρώτα σημεία του διαγράμματος που σχηματίζουν ευθεία.

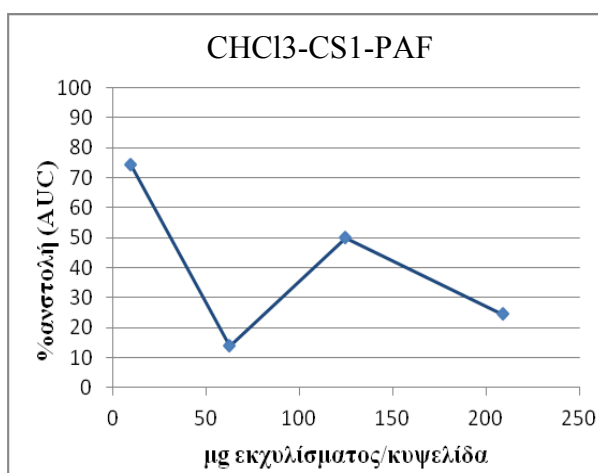


Διάγραμμα 1: % αναστολής του ύψους συσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με PAF σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS2, Γ) CS3

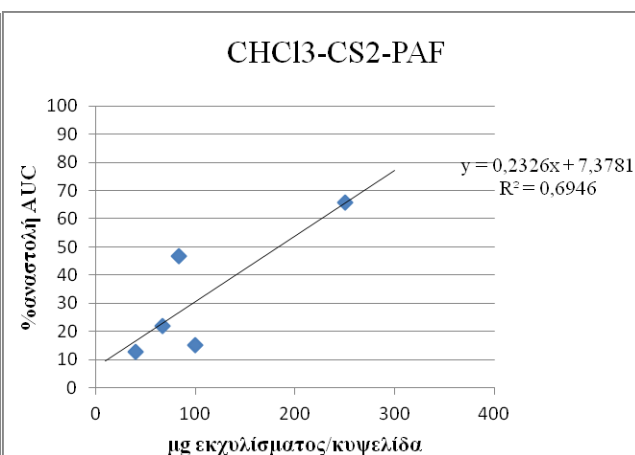
AUC (Διάγραμμα 2)

- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς με μάζες 9-312μg προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς με μάζες 24-250μg προκάλεσαν αναστολή από 12-66% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επομένως, από την καμπύλη Β του διαγράμματος 2, μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα εκχυλίσματος που δίνει 50% αναστολή (IC_{50}), το οποίο ισούται με 183,7μg.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς με μάζες 25-300μg προκάλεσαν αναστολή. Ωστόσο, όλες οι ποσότητες που δοκιμάστηκαν επέφεραν αναστολή AUC άνω του 50%.

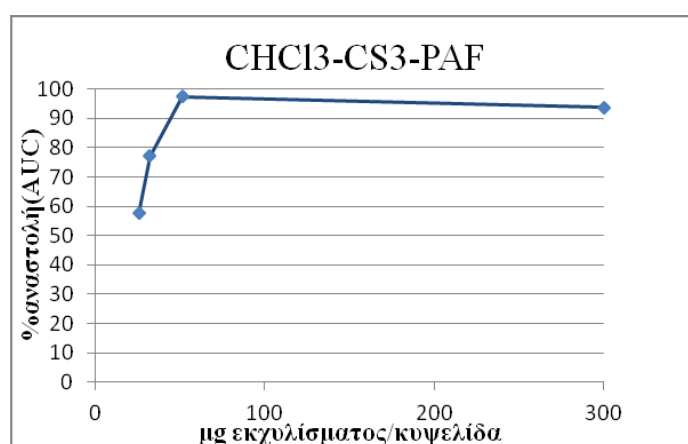
A



B



Γ



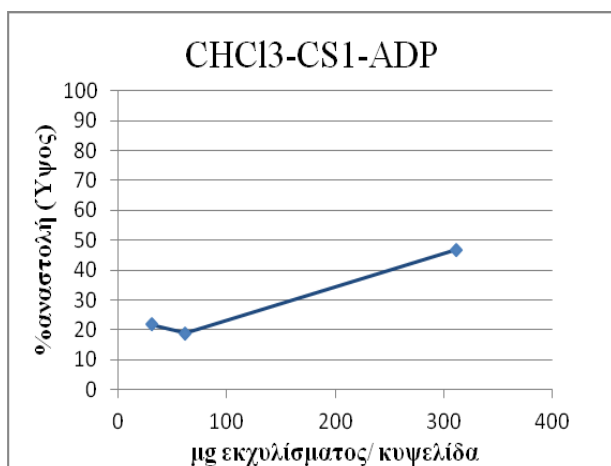
Διάγραμμα 2: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS2, Γ) CS3

– ADP

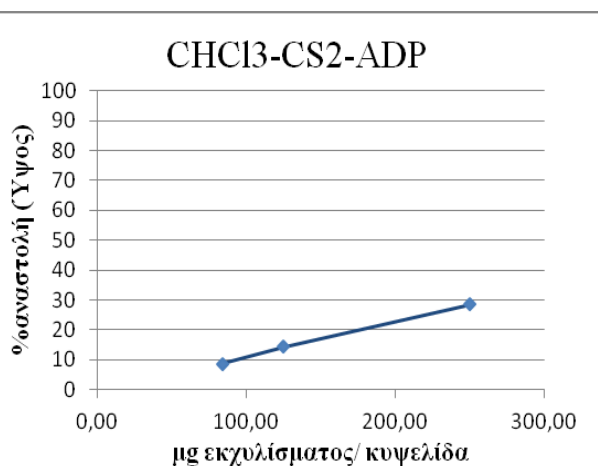
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 3)

- Από το πρώτο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν ποσότητες εκχυλίσματος από 31-624μg. Οι ποσότητες αυτές προκαλούσαν αναστολή. Η μέγιστη αναστολή επιτεύχθηκε από 311μg εκχυλίσματος και ήταν 47%.
- Από το δεύτερο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες από 19-250μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μέγιστη αναστολή που παρουσιάστηκε ήταν 29% με 250μg εκχυλίσματος.
- Από το τρίτο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν ποσότητες εκχυλίσματος από 25-300μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Μετά τα 86μg παραπροϊόντων παρατηρήθηκε πλατό δράσης εκχυλίσματος. Το IC₅₀ υπολογίστηκε στα 30μg από τα τέσσερα πρώτα σημεία του διαγράμματος που σχηματίζουν ευθεία.

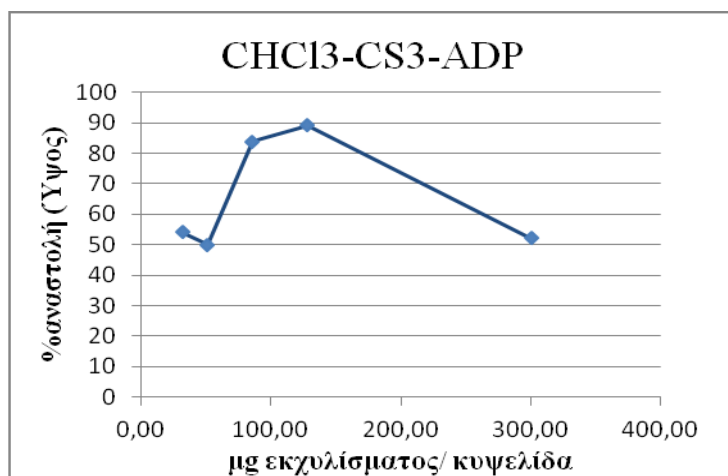
A



B



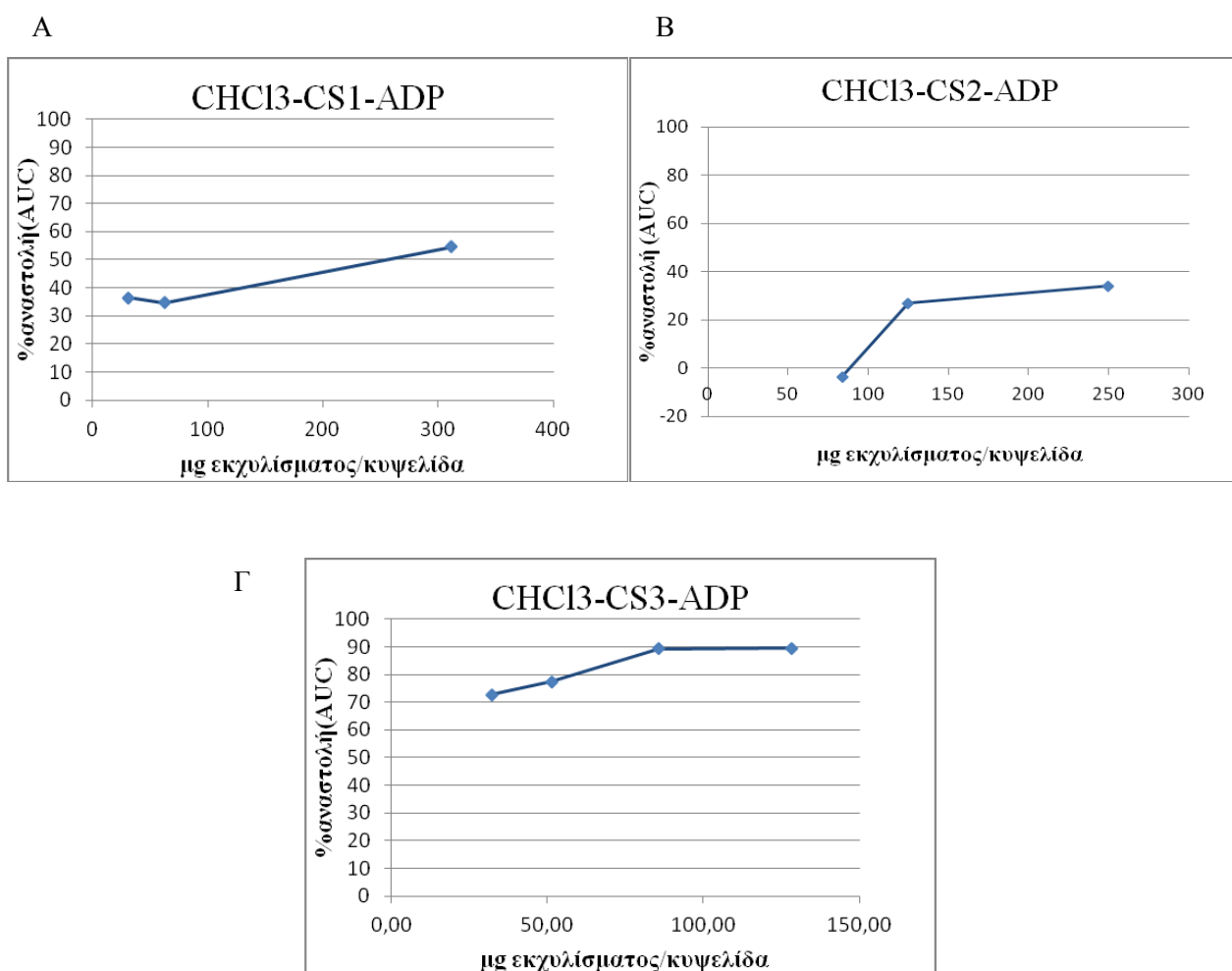
Γ



Διάγραμμα 3: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με ADP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS2, Γ) CS3

AUC (Διάγραμμα 4)

- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς με μάζες 31-624μg προκάλεσαν αναστολή.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς με μάζες 19-250μg προκάλεσαν αναστολή. Μέγιστη αναστολή προκλήθηκε με τα 250μg και ήταν 34%.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς με μάζες 25-300μg προκάλεσαν αναστολές άνω του 50%.



Διάγραμμα 4: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με ADP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS2, Γ) CS3

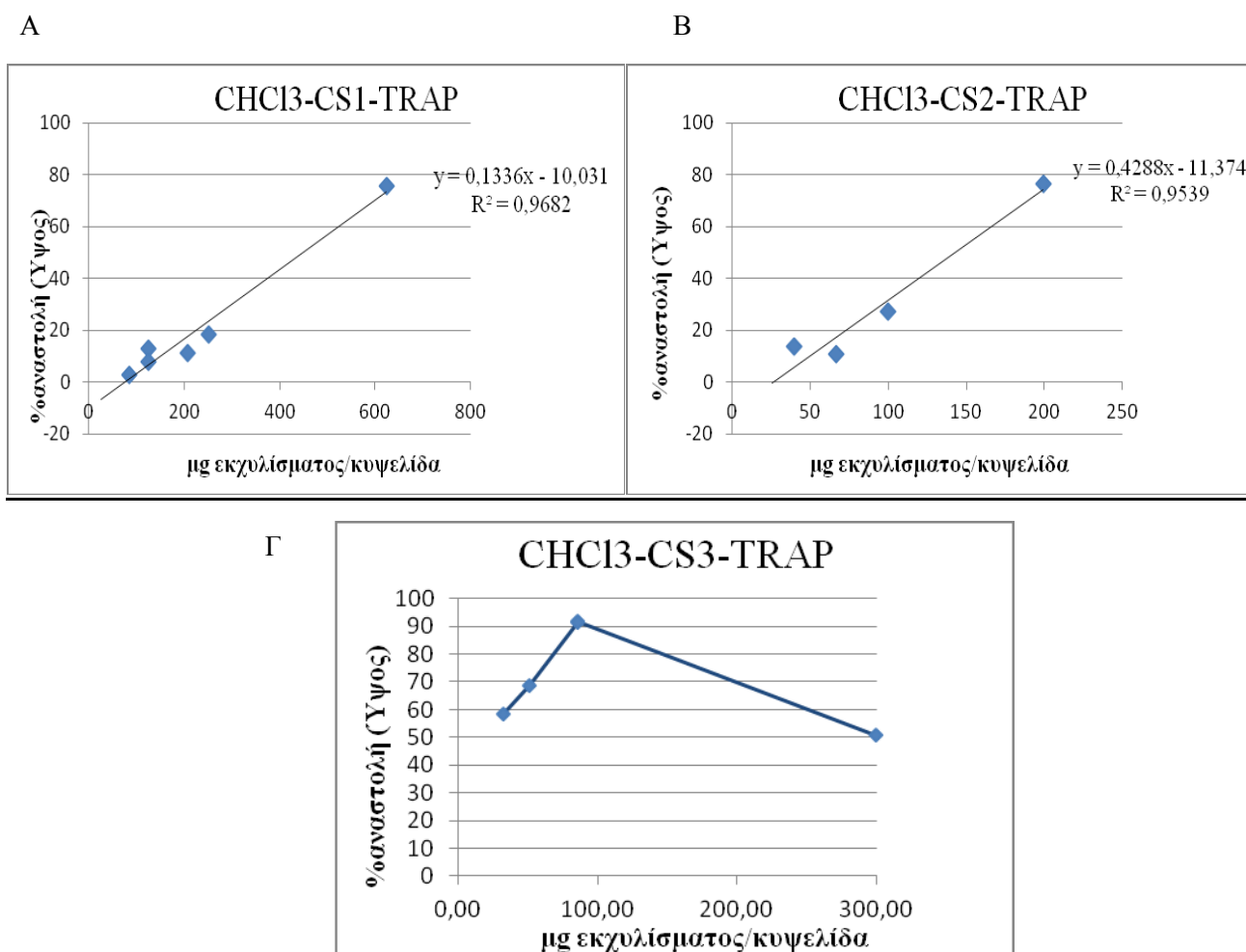
— TRAP

Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 5)

- Από το πρώτο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 83-624μg. Οι ποσότητες αυτές προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης

αιμοπεταλίων κατά 10-80% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Από την εξίσωση υπολογίστηκε το IC_{50} που είναι ίσο με 451μg.

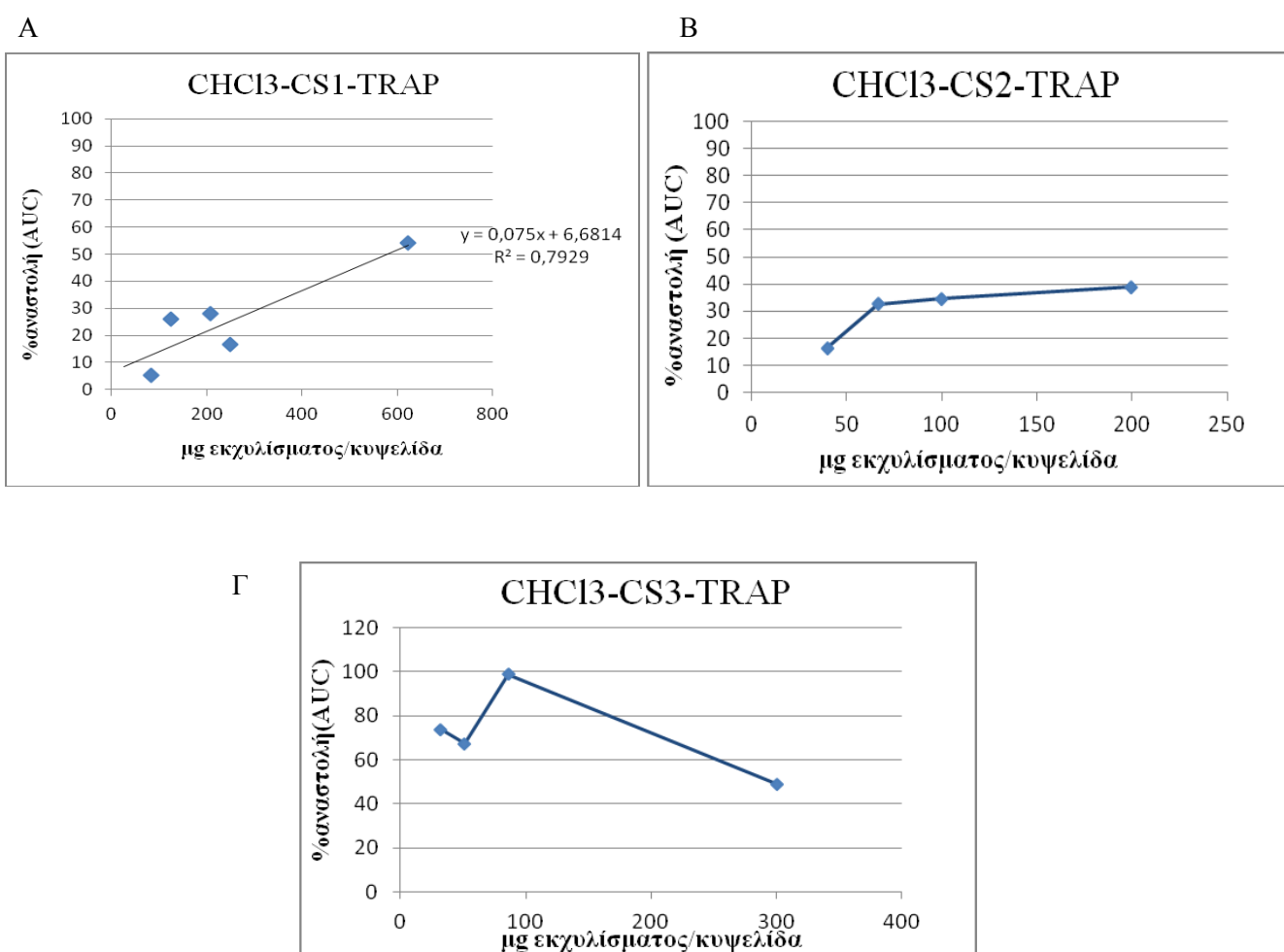
- Από το δεύτερο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 39-199μg οι οποίες επέφεραν αναστολή αιμοπεταλίων κατά 10-80% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC_{50} υπολογίστηκε από την εξίσωση και ισούται με 143μg.
- Από το τρίτο χλωροφορμικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 25-300μg και οι αναστολές που προκάλεσαν ήταν μεγαλύτερες από 50%. Δεδομένου όμως, ότι οι αναστολές στα CS1 και CS2 ήταν δοσοεξαρτώμενες, υποθέτουμε ότι το ίδιο συμβαίνει και στο CS3. Επομένως, το IC_{50} υπολογίζεται από τα 3 πρώτα σημεία της καμπύλης Γ, που σχηματίζουν ευθεία και ισούται με 20μg.



Διάγραμμα 5: % αναστολής του ύψους συσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος Α) CS1, Β) CS2, Γ) CS3

AUC (Διάγραμμα 6)

- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς με μάζες 83-624μg προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε από την εξίσωση και ισούται με 577μg.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων 39-199μg έδωσαν αναστολή που δεν έφτασε το 50%, με τη μεγαλύτερη να είναι της τάξης του 40% με τα 199μg.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς με μάζες 25-300μg προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων.



Διάγραμμα 6: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS2, Γ) CS3

W-BD

- PAF, ADP και TRAP (Εκχυλίσματα CS 1,2,3)

Ύψος συσσώρευσης και AUC

Στα πειράματα που διεξήχθησαν, χρησιμοποιήθηκε ένα μεγάλο εύρος μαζών εκχυλίσματος παραπροϊόντων από νερό μεθανόλης (W-BD). Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν μάζες από 0,09 έως 79,58μg/κυψελίδα. Ωστόσο, η επώαση των αιμοπεταλίων με το εκχύλισμα αυτό, σε όλες τις ποσότητες, είχε ως αποτέλεσμα διάχυτη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Αυτό συνέβη και με τους 3 συσσωρευτικούς παράγοντες.

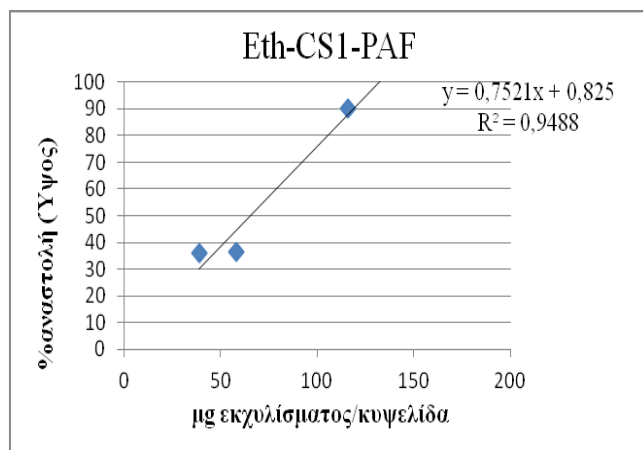
2^{ος} τρόπος 80% αιθανόλη

- PAF

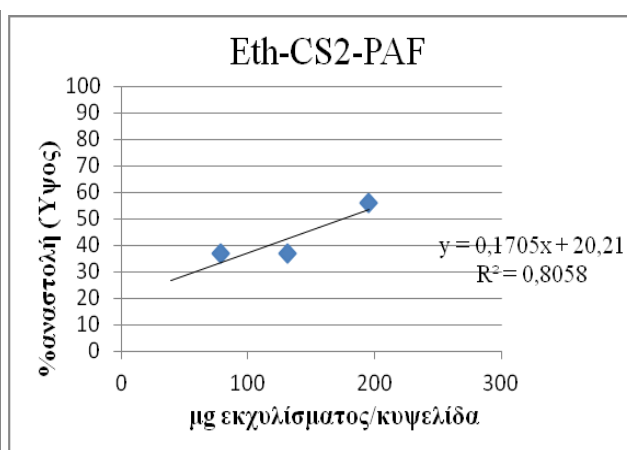
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 7)

- Από το πρώτο αιθανολικό εκχύλισμα, στο πείραμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 38-116μg και προκάλεσαν αναστολή κατά 35-90% Το IC₅₀ υπολογίστηκε στα 65μg.
- Από το δεύτερο αιθανολικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 48-196μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε στα 175μg.
- Από το τρίτο αιθανολικό εκχύλισμα οι μάζες εκχυλίσματος παραπροϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 39-159μg. Οι ποσότητες αυτές προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 30-90% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε στα 80μg.

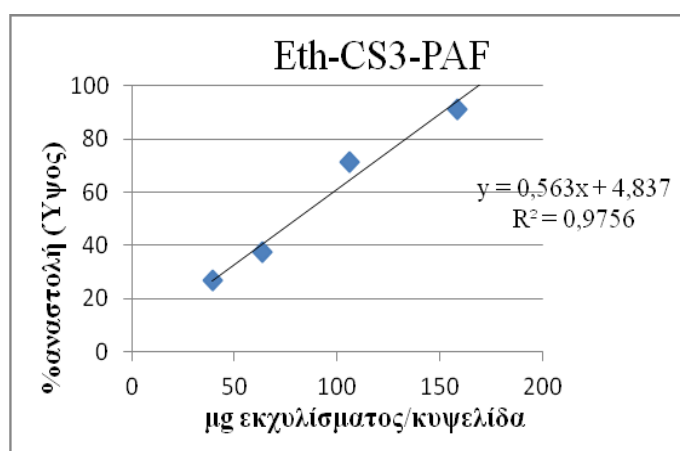
A



B



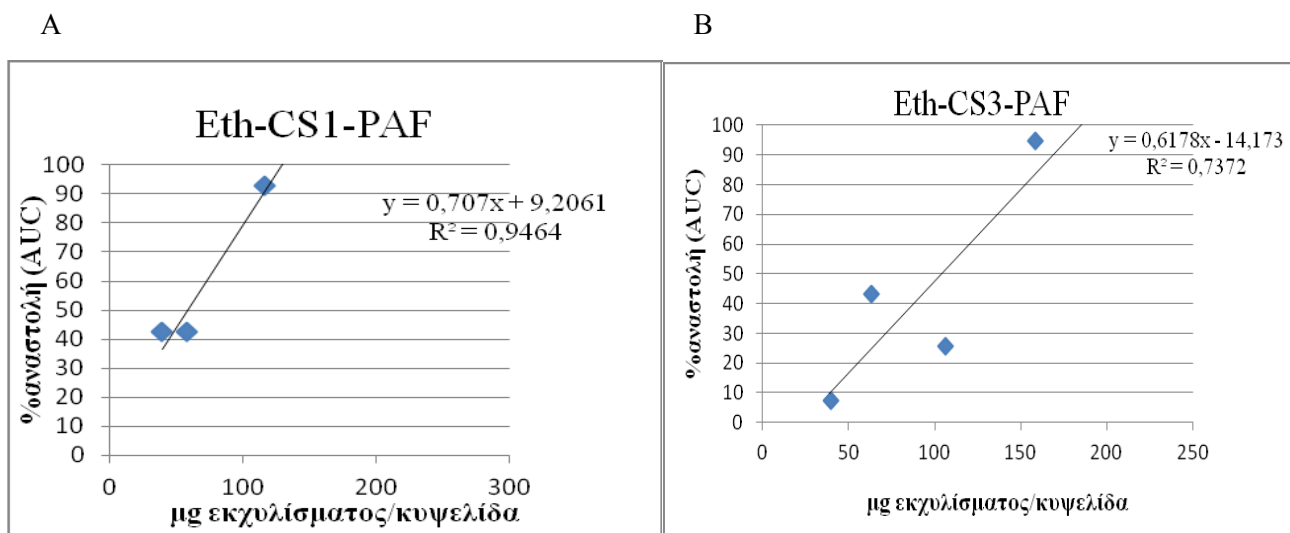
Γ



Διάγραμμα 7: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με PAF σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος Α) CS1, Β) CS2, Γ) CS3

AUC (Διάγραμμα 8)

- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων από 38-116μg προκάλεσαν αναστολή. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης και ισούται με 57,7μg.
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων από 48-196μg προκάλεσαν επίσης αναστολή αλλά μη δοσοεξαρτώμενη (αρνητική κλίση καμπύλης). Το γεγονός ότι στο ύψος προκλήθηκε αναστολή, ενώ στο AUC ενεργοποίηση συνέβη λόγω του ότι η καμπύλη συσσώρευσης με το εκχύλισμα ήταν μη αντιστρεπτή, ενώ η καμπύλη συσσώρευσης χωρίς το εκχύλισμα ήταν αντιστρεπτή. Παρακάτω θα αναλυθεί με εικόνα η συγκεκριμένη πληροφορία.
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων από 39-159μg έδωσαν αναστολή και το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 103μg.



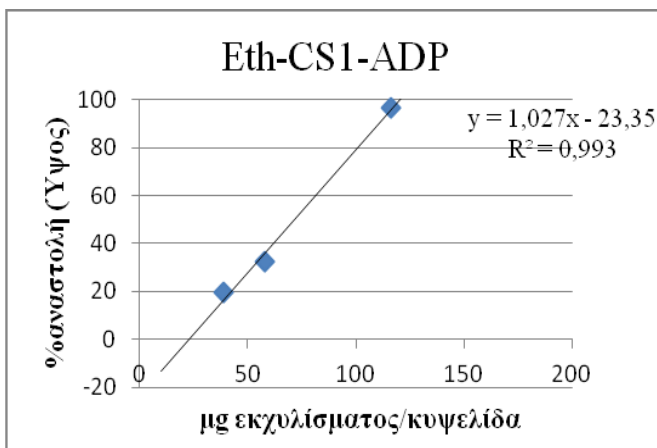
Διάγραμμα 8: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS3

— ADP

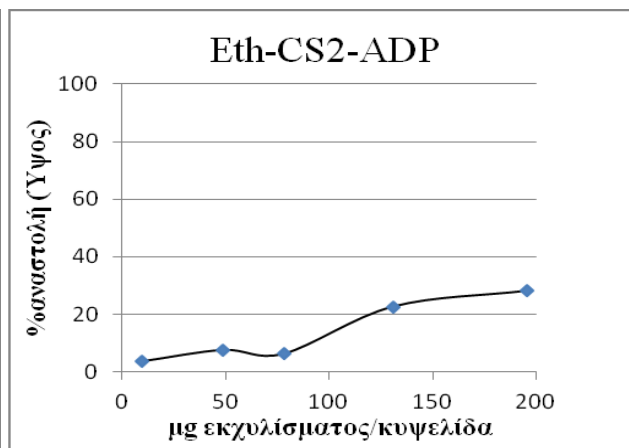
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 9)

- Από το πρώτο αιθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 38-116μg. Οι ποσότητες αυτές προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων κατά 20-95% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 71,5μg.
- Από το δεύτερο αιθανολικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 9-391μg και προκάλεσαν αναστολή με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μέγιστη αναστολή που παρουσιάστηκε ήταν της τάξης του 30% από τα 195μg εκχυλίσματος. Ωστόσο, φαίνεται από τις καμπύλες A και Γ ότι οι αναστολές είναι δοσοεξαρτώμενες, άρα υποθέτουμε ότι η αναστολή είναι δοσοεξαρτώμενη και στο B. Επομένως, το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης με τα τρία τελευταία σημεία, που σχηματίζουν ευθεία, στα 325μg.
- Από το δεύτερο αιθανολικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 21-159μg και προκάλεσαν αναστολή κατά 20-70% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 120μg.

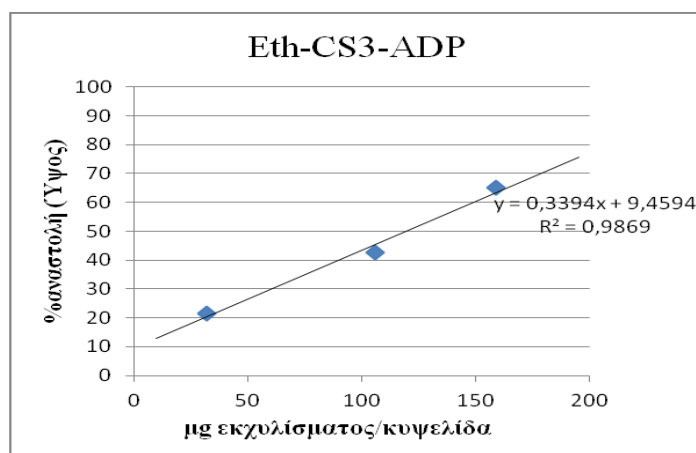
A



B



Γ

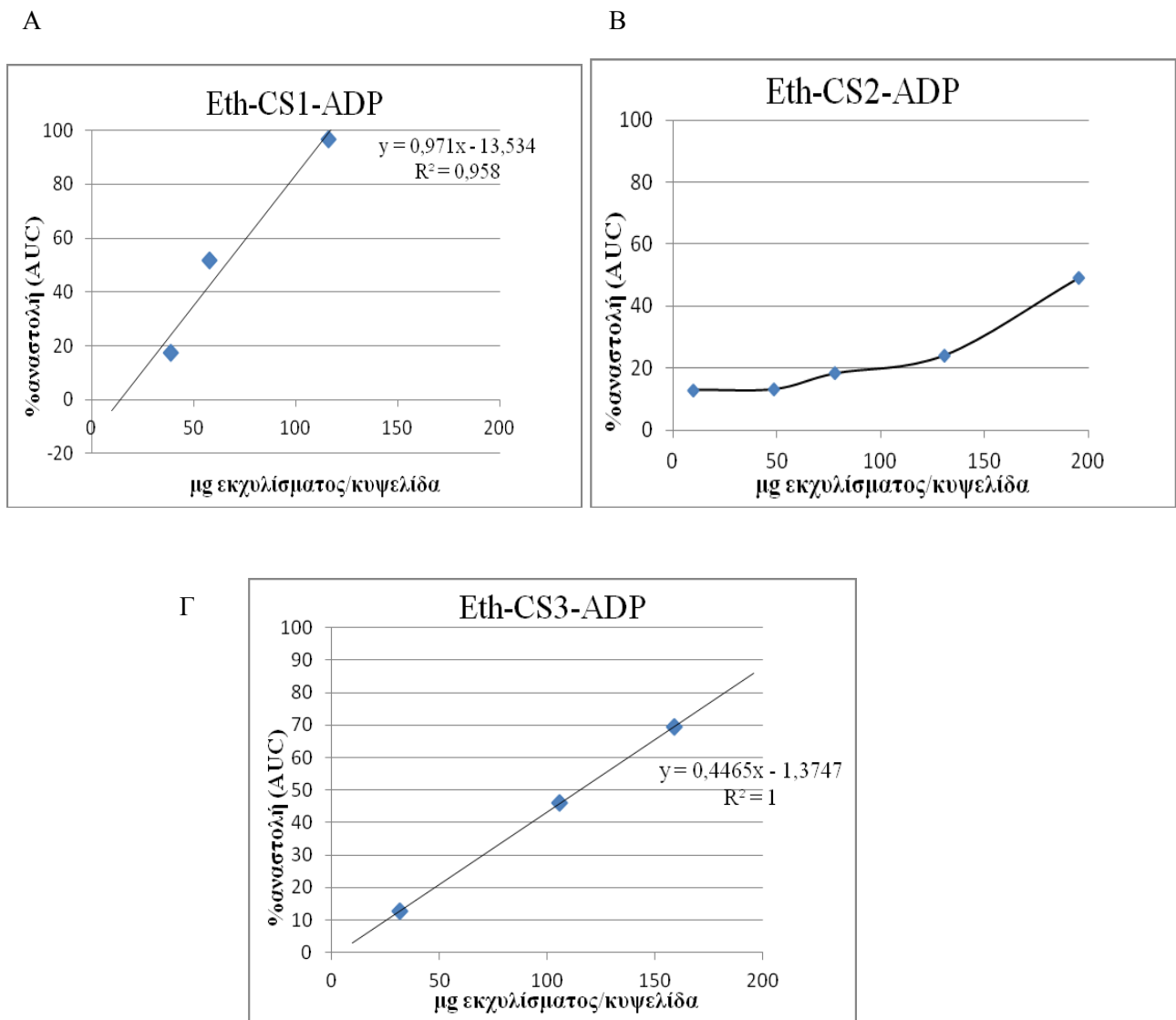


Διάγραμμα 9: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με ADP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος Α) CS1, Β) CS2, Γ) CS3

AUC (Διάγραμμα 10)

- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς με μάζες από 38-116μg προκάλεσαν αναστολή στα αιμοπετάλια με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 65μg.
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς με μάζες από 9-391μg προκάλεσαν αναστολή στα αιμοπετάλια με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μέγιστη αναστολή που παρουσιάστηκε ήταν της τάξης του 49% από τα 195μg εκχυλίσματος. Ωστόσο, δεδομένου ότι στις καμπύλες Α και Γ οι αναστολές είναι δοσοεξαρτώμενες, υποθέτουμε ότι η αναστολή και στη Β είναι δοσοεξαρτώμενη. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης από τα 3 τελευταία σημεία στα 207μg.

- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς με μάζες από 21-159μg προκάλεσαν αναστολή στα αιμοπετάλια με δοσοεξαρτώμενο τρόπο κατά 10-70%. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 115μg.



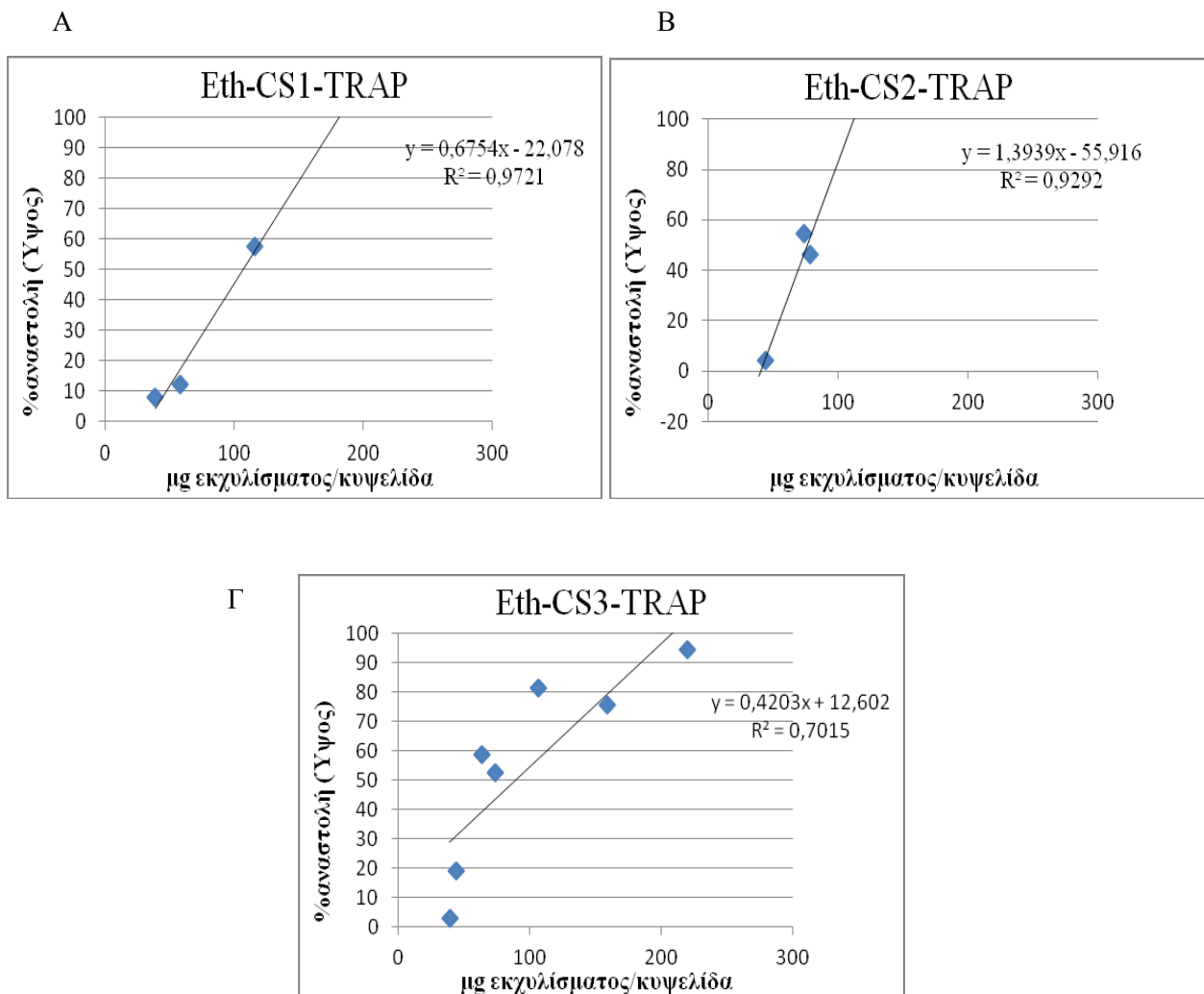
Διάγραμμα 10: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με ADP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος Α) CS1, Β) CS2, Γ) CS3

– TRAP

Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 11)

- Από το πρώτο αιθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 38-116μg, οι οποίες προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 107μg.

- Από το δεύτερο αιθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 44-391μg, ποσότητες οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 76μg.
- Από το τρίτο αιθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 39-220μg, οι οποίες προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 89μg.



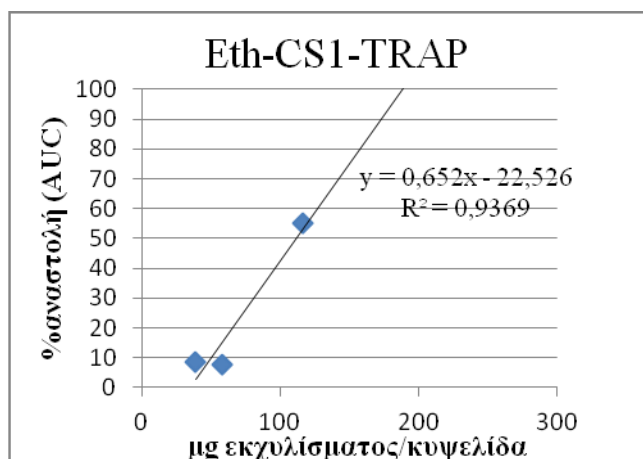
Διάγραμμα 11: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) CS1, B) CS2, Γ) CS3

AUC (Διάγραμμα12)

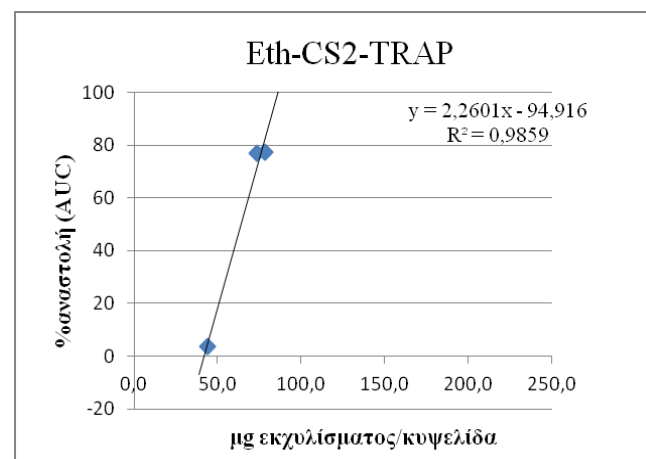
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων από 38-116μg προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 111μg.

- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων από 44-78μg προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 64μg.
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς με μάζες εκχυλισμάτων από 39-220μg προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων και το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 65μg.

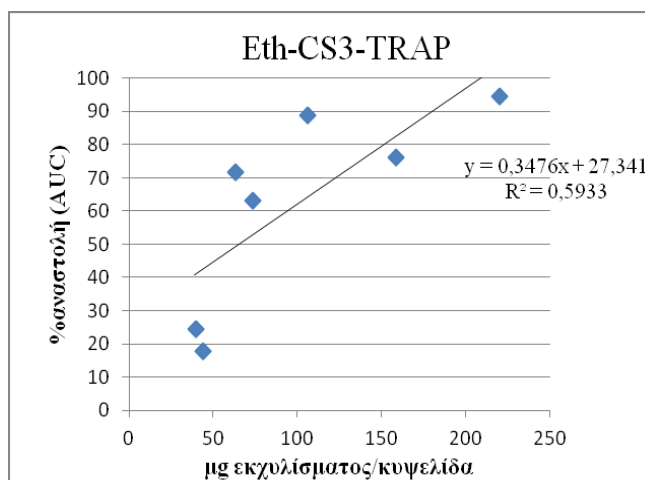
A



B



Γ



Διάγραμμα 12: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) CS2, B) CS2, Γ) CS3

3^{ος} τρόπος Hex

Η επώαση του PRP με τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων από τη μέθοδο με το εξάνιο είχε ποικίλα αποτελέσματα στα αιμοπετάλια. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν τόσο αναστολές όσο και ενεργοποιήσεις αιμοπεταλίων διεγερμένων με PAF, ADP ή TRAP. Στη

συνέχεια, παρουσιάζονται οι ποσότητες εκχυλίσματος που προκάλεσαν κάποιες αναστολές.

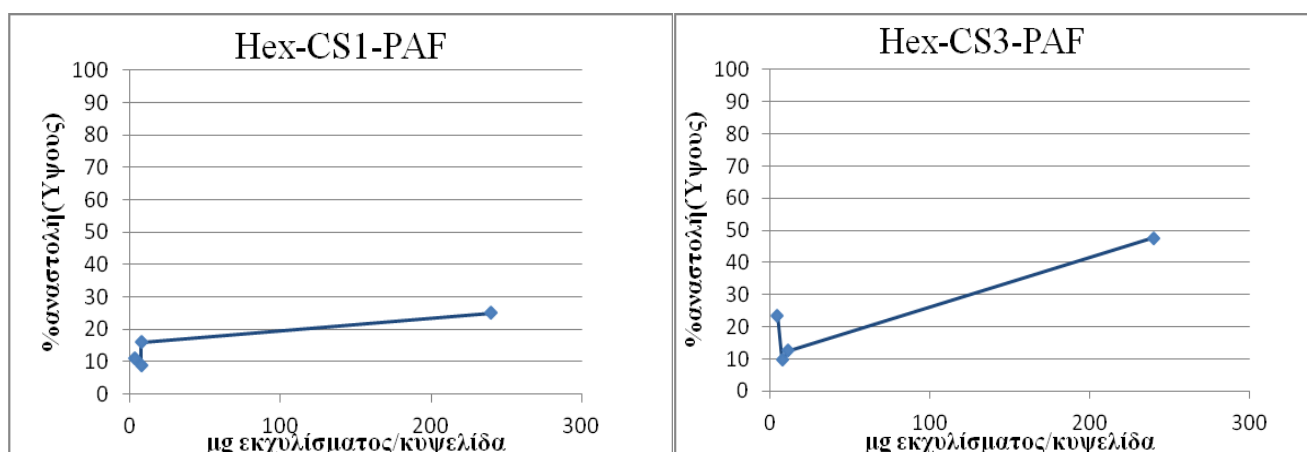
– PAF

Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 13)

- Από το πρώτο εκχύλισμα εξανίου, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 3-240μg. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 240μg και ήταν της τάξης του 25%.
- Από το δεύτερο εκχύλισμα εξανίου, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 2-240μg. Τα 240μg εκχυλίσματος προκάλεσαν αναστολή της τάξης του 18%.
- Από το τρίτο εκχύλισμα εξανίου, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 4-240μg. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 240μg και ήταν της τάξης του 48%.

A

B



Διάγραμμα 13: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με PAF σε σχέση με τα μg εκχυλίσματος εξανίου A) CS1, B) CS3

AUC

- Τα εκχυλίσματα της πρώτης σειράς προκάλεσαν κάποιες αναστολές και κάποιες ενεργοποιήσεις. Τα 240μg εκχυλίσματος προκάλεσαν αναστολή της τάξης του 20%.
- Τα εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς είχαν μια παρόμοια πορεία.
- Τέλος, στα εκχυλίσματα της τρίτης σειράς, μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 240μg και ήταν της τάξης του 55%.

– ADP

Ύψος συσσώρευσης

Και από τα τρία εκχυλίσματα εξανίου, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 2-240μg οι οποίες προκάλεσαν μικρές αναστολές αιμοπεταλίων.

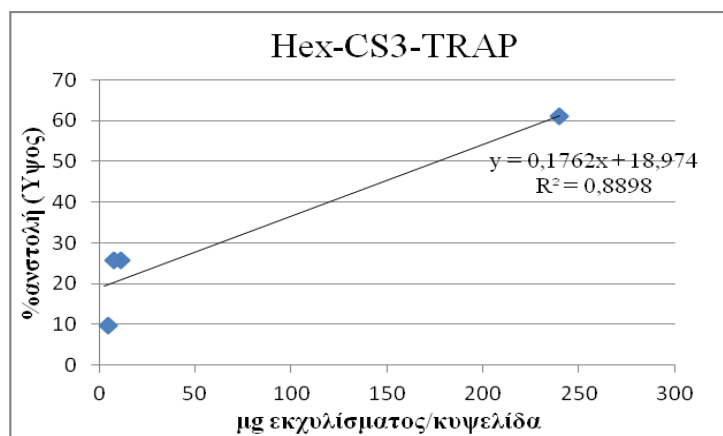
AUC

- Τα δύο από τα εκχυλίσματα εξανίου, προκάλεσαν μικρές αναστολές αιμοπεταλίων με μη δόσοεξαρτώμενο τρόπο.
- Με το τρίτο εκχύλισμα εξανίου, η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 240μg και ήταν της τάξης του 30%.

– TRAP

Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 14)

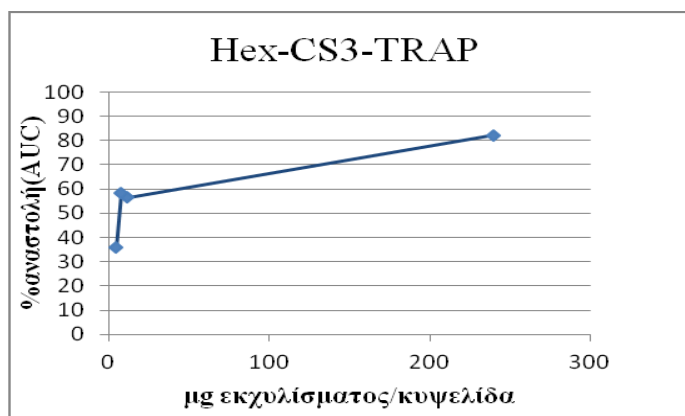
Και τα τρία εκχυλίσματα εξανίου, δοκιμάστηκαν σε μάζες εκχυλισμάτων από 2-240μg. Τα δύο από τα εκχυλίσματα προκάλεσαν μικρές αναστολές αιμοπεταλίων. Με το τρίτο εκχύλισμα, το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 176μg.



Διάγραμμα 14: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP σε σχέση με τα μg εκχυλίσματος εξανίου (CS3)

AUC

- Τα δύο από τα εκχυλίσματα εξανίου, προκάλεσαν μικρές αναστολές αιμοπεταλίων με μη δόσοεξαρτώμενο τρόπο.
- Με το τρίτο εκχύλισμα εξανίου, η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 240μg και ήταν της τάξης του 82%. (Διάγραμμα 15)



Διάγραμμα 15: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP σε σχέση με τα μg εκχυλίσματος εξανίου (CS3)

4^{ος} τρόπος W

- PAF, ADP και TRAP(Εκχυλίσματα 1,2,3)

Ύψος συσσώρευσης και AUC

Το εύρος των μαζών εκχυλίσματος παραπροϊόντων, από τη μέθοδο με το ζεστό νερό, που επώαστηκε με αιμοπετάλια, ήταν από 0,11-156,9 μg/κυψελίδα. Η επίδραση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση με νερό στα αιμοπετάλια ήταν η εκτεταμένη ενεργοποίηση αυτών. Κοινό το αποτέλεσμα και για τους 3 συσσωρευτικούς παράγοντες.

Πίνακας 9: IC₅₀ για εκχυλίσματα (χλωροφορμίου, αιθανόλης, εξανίου) της ποικιλίας Cabernet Sauvignon έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP και TRAP.

ΥΨΟΣ	CHCl ₃ IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
CS1	264	<50%	451
CS2	313	<50%	143
CS3	27	30	20

AUC	CHCl ₃ IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
CS1	-	-	577
CS2	183,7	<50%	<50%
CS3	>50%	>50%	-

ΥΨΟΣ	Eth IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
CS1	65	71,5	107
CS2	175	325	76
CS3	80	120	89

AUC	Eth IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
CS1	57,7	65	111
CS2	-	207	64
CS3	103	115	65

ΥΨΟΣ	Hex IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
CS1	<50%	<50%	<50%
CS2	<50%	<50%	<50%
CS3	<50%	<50%	176

6.4 Αντιαιμοπεταλιακή δράση Syrah

Στην ποικιλία Syrah επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν τα εκχυλίσματα της 1^{ης} και της 3^{ης} σειράς εκχυλίσεων (S1,S3) (μάζες σε μg εκχυλίσματος/κυψελίδα).

1^{ος} τρόπος εκχύλισης Bligh Dyer

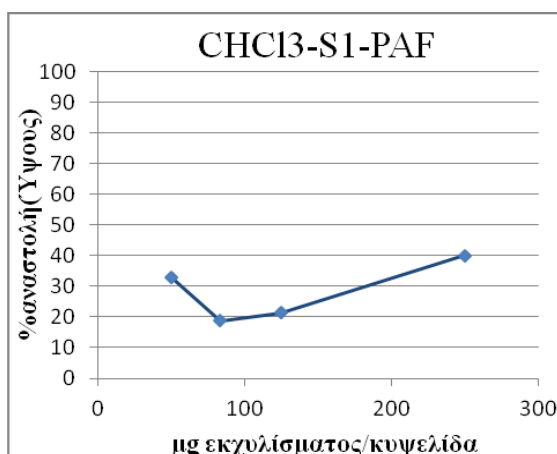
CHCl₃ (Εκχυλίσματα 1,3)

– PAF

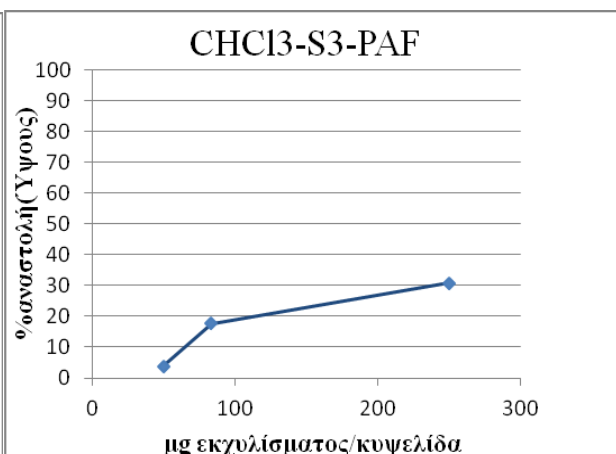
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 16)

- Από το πρώτο χλωροφορμικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 50-250μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων που δεν έφτασε το 50%. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 250μg και ήταν της τάξης του 40%.
- Από το τρίτο χλωροφορμικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 50-250μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 250μg και ήταν της τάξης του 31%.

A



B



Διάγραμμα 16: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με PAF σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

AUC

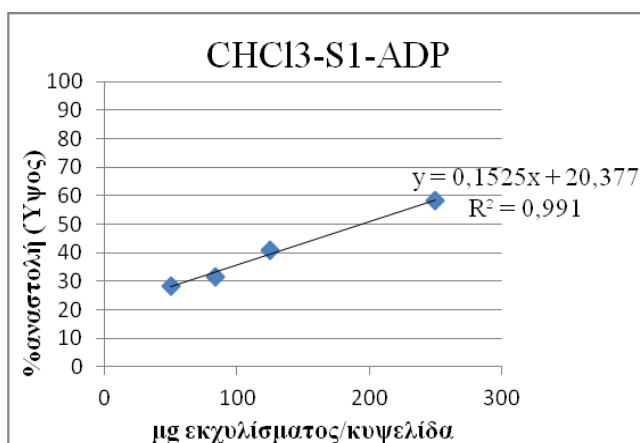
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς έδωσαν αναστολή με μη δοσοεξαρτώμενο τρόπο (φθίνουσα καμπύλη). Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τα 50μg και ήταν της τάξης του 53%.
- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς προκάλεσαν αύξηση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων.

– ADP

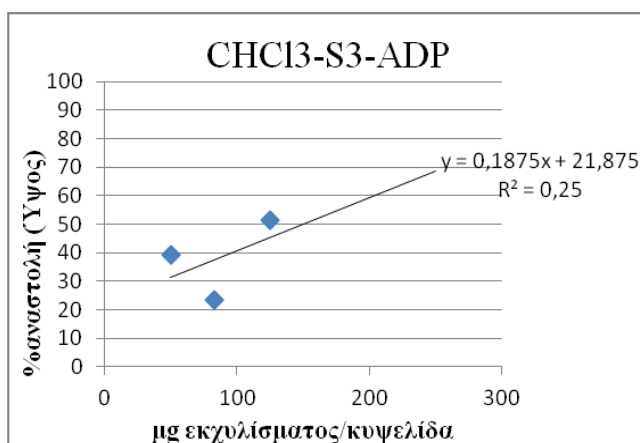
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 17)

- Από το πρώτο χλωροφορμικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 50-250μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 28-60% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 194μg.
- Από το τρίτο χλωροφορμικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 50-125μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Λαμβάνοντας υπόψη την καμπύλη A, θεωρούμε ότι και η B θα είναι δοσοεξαρτώμενη. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 150μg.

A



B



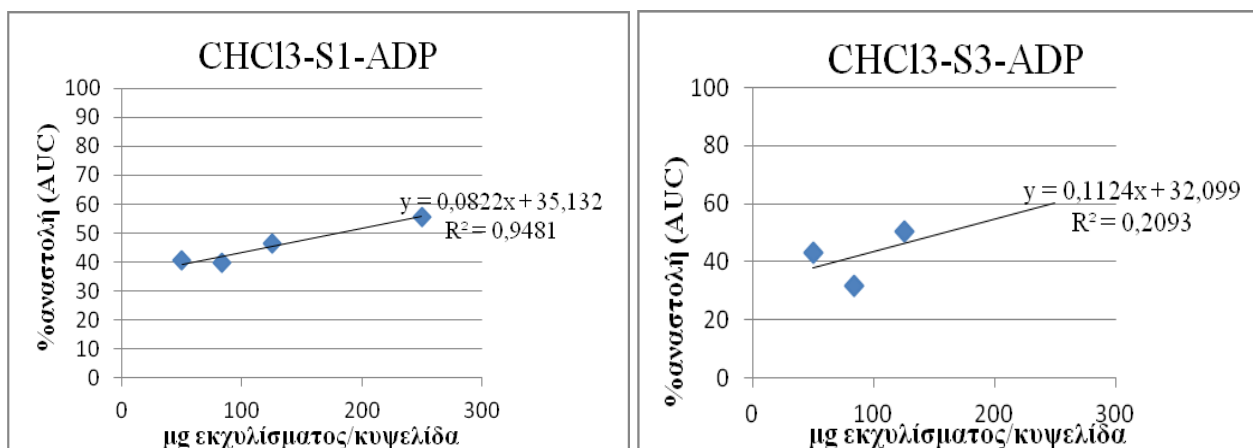
Διάγραμμα 17: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με ADP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

AUC (Διάγραμμα 18)

- Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς έδωσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 180μg.
- Τα εκχυλίσματα της τρίτης σειράς προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 159μg.

A

B



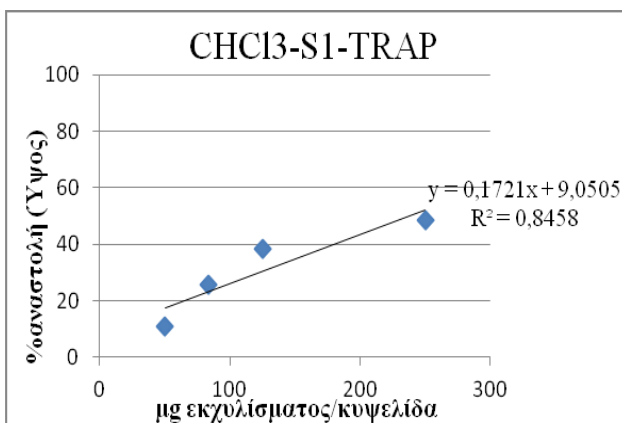
Διάγραμμα 18: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με ADP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

— TRAP

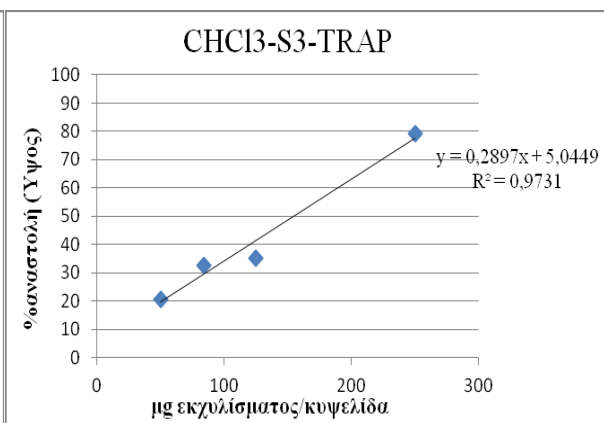
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 19)

- Από το πρώτο χλωροφορμικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 50-250μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, η μεγαλύτερη αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν 49% που προέκυψε από 250μg εκχυλίσματος. Λαμβάνοντα υπόψη την καμπύλη B που είναι δοσοεξαρτώμενη, θεωρούμε ότι και η A είναι. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 237μg.
- Από το τρίτο χλωροφορμικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 50-250μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 20-80% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 155,5μg.

A



B

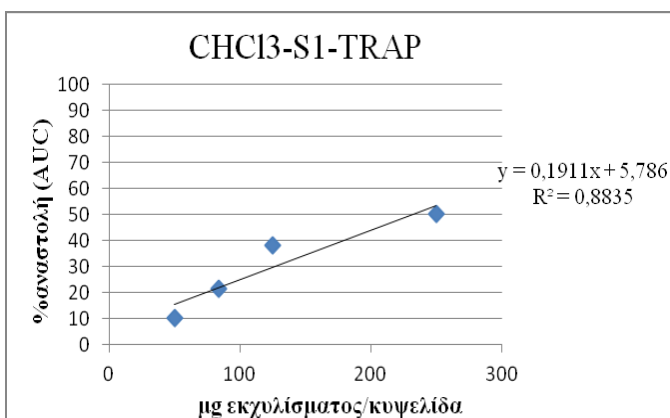


Διάγραμμα 19: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

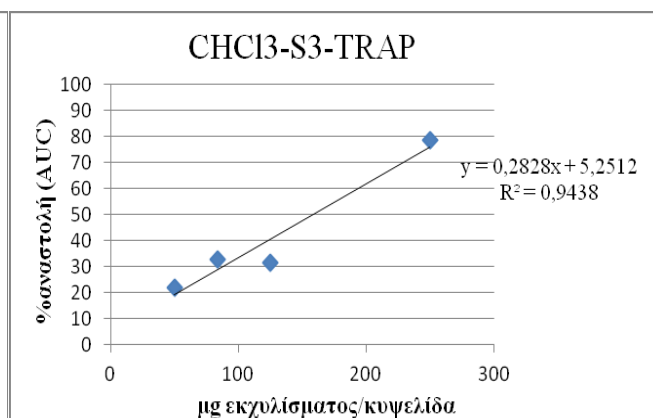
AUC (Διάγραμμα 20)

- Τα εκχυλίσματα της πρώτης σειράς προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 231μg.
- Τα εκχυλίσματα της τρίτης σειράς προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 20-80%. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 158μg.

A



B



Διάγραμμα 20: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP σε σχέση με τα μg χλωροφορμικού εκχυλίσματος A) S1 B) S3

W-BD

- PAF, ADP και TRAP(Εκχυλίσματα 1,3)

Ύψος συσσώρευσης και AUC

Το εύρος των μαζών εκχυλίσματος που εξετάστηκε ήταν από 0,12-83,4 μg/κυψελίδα.

Η επώαση των εκχυλισμάτων με τα αιμοπετάλια είχε το ίδιο αποτέλεσμα με εκείνο της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, δηλαδή φάνηκε πως τα εκχυλίσματα ενεργοποιούσαν τα αιμοπετάλια. Η επίδραση αυτή ήταν κοινή ύστερα από τη δράση και των 3 παραγόντων συσσώρευσης.

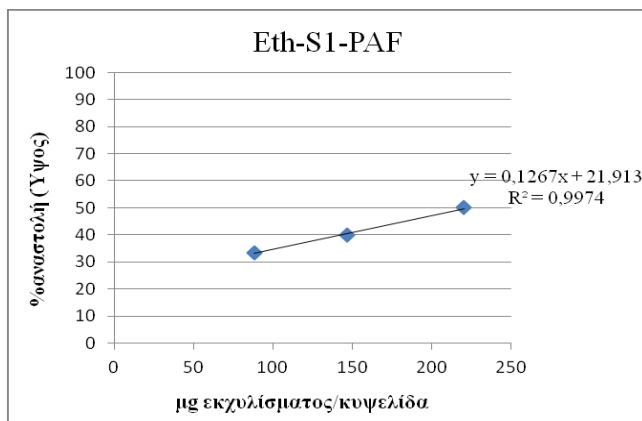
2^{ος} τρόπος 80% αιθανόλη

— PAF

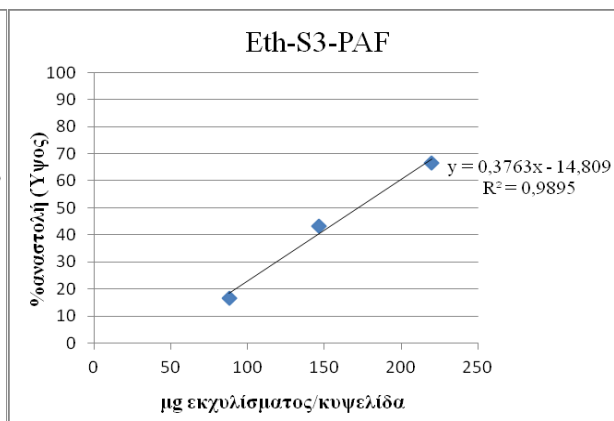
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 21)

- Από το πρώτο αιθανολικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 22-220μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 221μg.
- Από το τρίτο αιθανολικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 88-220μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 15-70% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 172μg.

A



B



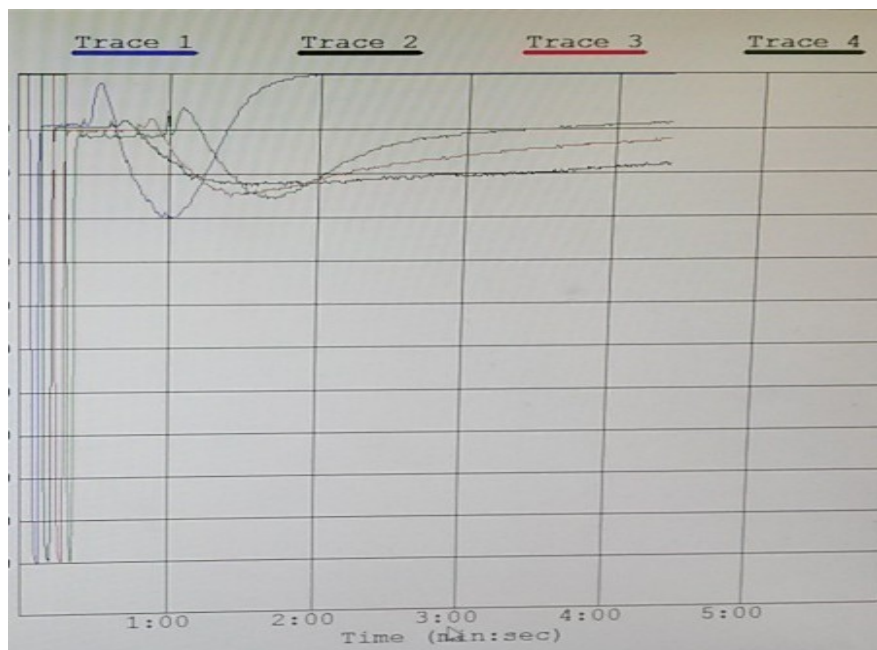
Διάγραμμα 21: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με PAF σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

AUC

Και από τα δύο αιθανολικά εκχυλίσματα, όλες οι ποσότητες που δοκιμάστηκαν προκάλεσαν διάχυτη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.

Με τη βοήθεια της εικόνας 16, μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι παρόλο που τα εκχυλίσματα προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων λαμβάνοντας υπόψη το

ύψος συσσώρευσης, τα ίδια έδειξαν να αυξάνουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, αν συγκριθούν με βάση το AUC. Αυτό συμβαίνει γιατί όπως φαίνεται από το πρότυπο (trace 1) της εικόνας 18, η δράση του PAF είναι αντιστρεπτή. Αντιθέτως, τα εκχυλίσματα αναστέλλουν τις δράσεις του PAF μη αντιστρεπτά. Αυτό συνεπάγεται, ότι αν και με βάση το ύψος υπάρχει αναστολή, το εμβαδό που καλύπτουν οι καμπύλες με τα εκχυλίσματα (ως μη αντιστρεπτές) είναι μεγαλύτερο από εκείνο του προτύπου (αντιστρεπτό). Άρα, λαμβάνοντας υπόψη το AUC, φανερώνεται ενεργοποίηση.



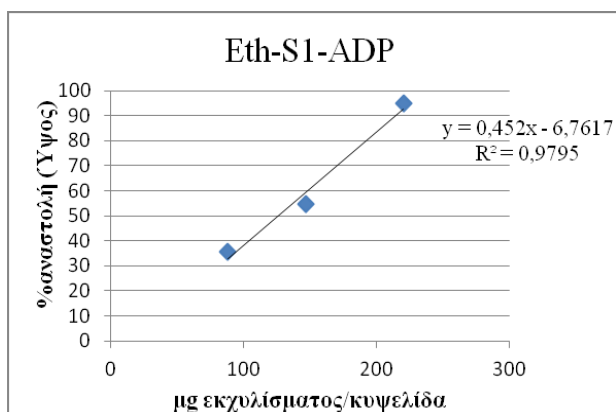
Εικόνα 18: Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων

– ADP

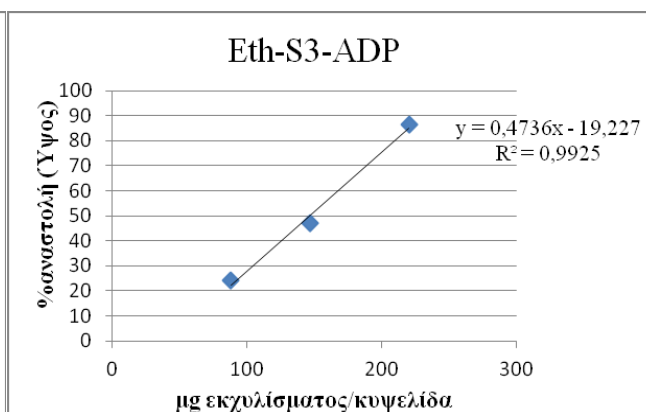
Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 22)

- Από το πρώτο αιθανολικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 55-220μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 35-94% με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 125,5μg.
- Από το τρίτο αιθανολικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 88-220μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 25-86% με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 146μg.

A



B

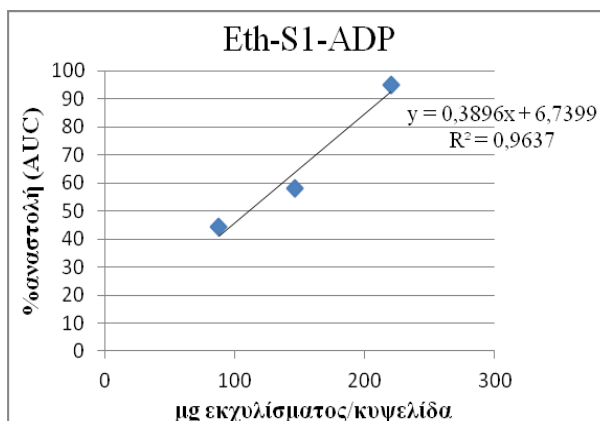


Διάγραμμα 22: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με ADP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

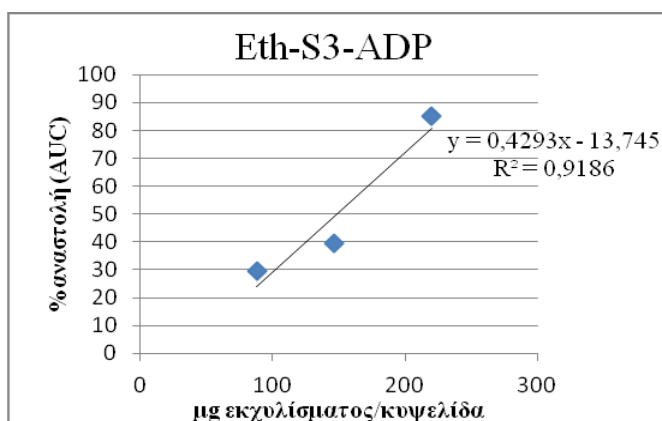
AUC (Διάγραμμα 23)

- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 111μg.
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC_{50} υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 148,5μg.

A



B



Διάγραμμα 23: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με ADP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) S1 B) S3

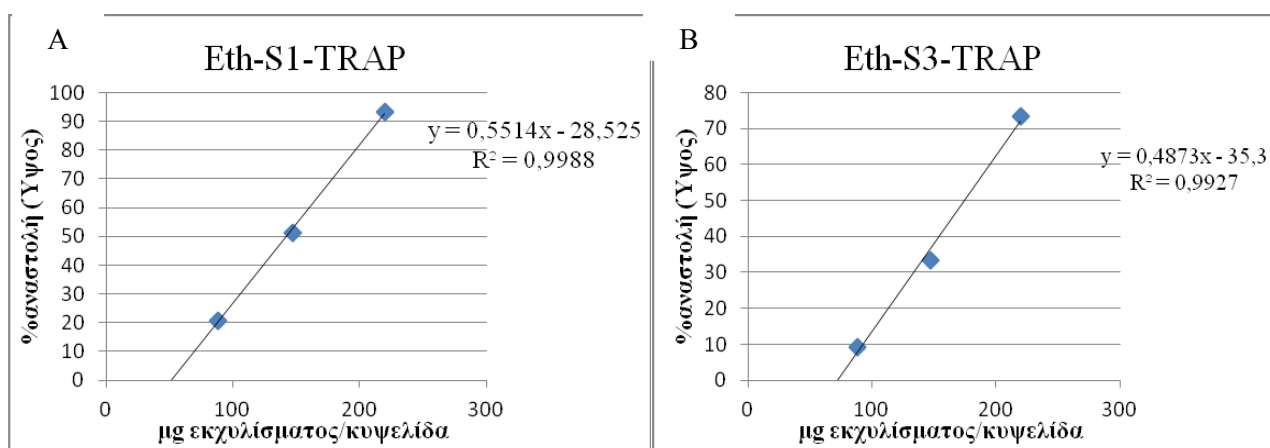
— TRAP

Ύψος συσσώρευσης (Διάγραμμα 24)

- Από το πρώτο αιθανολικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 22-220μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά

20-93% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 142μg.

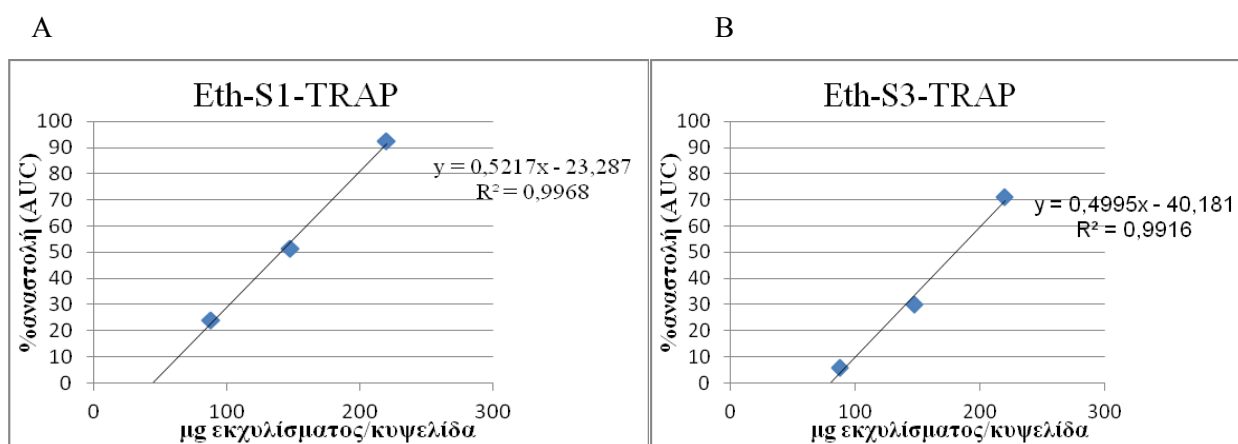
- Από το τρίτο αιθανολικό εκχύλισμα, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 88-220μg οι οποίες προκάλεσαν αναστολή ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά 10-73% με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 175μg.



Διάγραμμα 24: % αναστολής του ύψους συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) S1, B) S3

AUC (Διάγραμμα 25)

- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της πρώτης σειράς προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 140μg.
- Τα αιθανολικά εκχυλίσματα της τρίτης σειράς προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 180μg.



Διάγραμμα 25: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP σε σχέση με τα μg αιθανολικού εκχυλίσματος A) S1 B) S3

3^{ος} τρόπος Hex

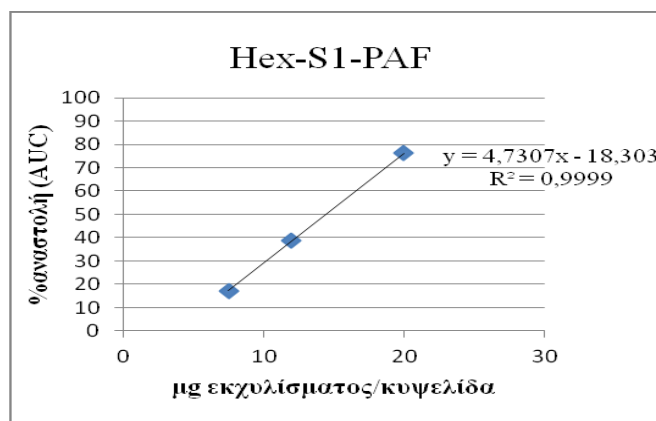
– PAF

Ύψος συσσώρευσης

- Από το πρώτο εκχύλισμα εξανίου, δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλίσματος από 30-240μg, οι οποίες επωάστηκαν με το PRP. Οι ποσότητες αυτές προκάλεσαν αναστολή στο ύψος συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Η μεγαλύτερη αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν 40% με 240μg εκχυλίσματος.
- Από το τρίτο εκχύλισμα εξανίου, δοκιμάστηκαν 240μg εκχυλίσματος τα οποία προκάλεσαν 7% αναστολή.

AUC

- Τα εκχυλίσματα εξανίου της πρώτης σειράς προκάλεσαν αναστολή αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ υπολογίστηκε μέσω της καμπύλης στα 15μg. (Διάγραμμα 26)
- Από τα εκχυλίσματα εξανίου της τρίτης σειράς τα 240μg εκχυλίσματος προκάλεσαν 10% αναστολή.



Διάγραμμα 26: % αναστολής του AUC σε αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF σε σχέση με τα μg εκχυλίσματος εξανίου (S1)

– ADP

Ύψος συσσώρευσης και AUC

Και από τα δύο εκχυλίσματα εξανίου (1 και 3) δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 12-240μg οι οποίες προκάλεσαν μικρές αναστολές αιμοπεταλίων (<40%), αλλά και κάποιες ενεργοποιήσεις.

- TRAP

Ύψος συσσώρευσης και AUC

Και από τα δύο εκχυλίσματα εξανίου (1 και 3) δοκιμάστηκαν μάζες εκχυλισμάτων από 7-240μg οι οποίες προκάλεσαν διάχυτη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.

4^{ος} τρόπος W

- PAF, ADP και TRAP(Εκχυλίσματα 1,3)

Ύψος συσσώρευσης και AUC

Τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων από τη μέθοδο εκχύλισης με ζεστό νερό δοκιμάστηκαν σε ποσότητες από 0,17-169,78μg/κυψελίδα. Το αποτέλεσμα της επώασης των αιμοπεταλίων με αυτά τα εκχυλίσματα και για όλους τους συσσωρευτικούς παράγοντες ήταν παρόμοιο με αυτό της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, δηλαδή διάχυτη ενεργοποίηση.

Πίνακας 10: IC₅₀ για εκχυλίσματα (χλωροφορμίου, αιθανόλης, εξανίου) της ποικιλίας Syrah έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP και TRAP.

ΎΨΟΣ	CHCl ₃ IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
S1	<50%	194	237
S3	<50%	150	155

AUC	CHCl ₃ IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
S1	-	180	231
S3	-	159	158

ΎΨΟΣ	Eth IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
S1	221	125,5	142
S3	172	146	175

AUC	Eth IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
S1	-	111	140
S3	-	148,5	180

ΎΨΟΣ	Hex IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
S1	<50%	<50%	-
S3	<50%	<50%	-

AUC	Hex IC ₅₀ (μg εκχ/κυψελίδα)		
	PAF	ADP	TRAP
S1	15	-	-
S3	<50%	-	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γεγονός ότι τα αιμοπετάλια έχουν μείζον ρόλο στη φυσιολογία διάφορων φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία λειτουργιών. Η παρουσία τους είναι σημαντική για τις διαδικασίες της αιμόστασης και της πήξης αλλά και για την εξέλιξη της φλεγμονής και της αθηροσκλήρωσης.

Πολλοί παράγοντες δύνανται να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια, όταν ένα αιμοφόρο αγγείο υπόκειται σε βλάβη. Αυτοί οι αγωνιστές δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και συμβάλλουν στην ταχύτατη προσκόλληση και συσσώρευσή τους στις περιοχές της αλλοίωσης.

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και έπειτα, η εξωτερική τους μεμβράνη λειτουργεί ως η κατάλληλη επιφάνεια για τη συνάθροιση ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης. Οι λειτουργικά ενεργές πρωτεΐνες της μεμβράνης τους, διευκολύνουν επίσης και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα κύτταρα. Τα αιμοπετάλια, αλληλεπιδρούν με διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως λευκοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα συνεισφέροντας στην προσέλκυσή τους στην τραυματισμένη περιοχή, μέσω των παραγόντων που απελευθερώνουν. Επίσης, συνθέτουν, περιέχουν και απελευθερώνουν φλεγμονώδεις και αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, χυμοκίνες και λιποειδικούς μεσολαβητές, που υποστηρίζουν τη φλεγμονή αλλά και την αθηροσκλήρωση σε όλα τα στάδιά της.

Πολλοί παράγοντες της διατροφής επιδρούν στις δράσεις των αιμοπεταλίων, ωστόσο το ενδιαφέρον έχει κεντρίσει η επίδραση του αλκοόλ-κρασιού σε αυτά καθώς και στις αθηρωματικές συνθήκες που συμμετέχουν.

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι η ελαφρά έως μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού (ένα έως δύο ποτά την ημέρα, 10 έως 30g αλκοόλ) συνδέεται στενά με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης CVD σε σύγκριση με την αποχή ή την περιστασιακή κατανάλωση αλκοόλ. Το κρασί οδηγεί σε αυτές τις θετικές εκβάσεις μέσω αναστολής της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων, της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και επίδρασης στη λειτουργία του ενδοθηλίου. Εκτός από την αιθανόλη, υπάρχουν μερικά άλλα συστατικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο κρασί που ασκούν επίσης προστατευτικά αποτελέσματα. Σε αυτές τις

βιοδραστικές ενώσεις αποδίδεται η επιπλέον επίδραση του κρασιού έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών. Η κύρια κατηγορία αυτών των ενώσεων στο κρασί είναι τα φαινολικά συστατικά. Η προστατευτική επίδραση των πολυφαινολών αποδίδεται κυρίως στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, αλλά αυτά τα συστατικά ασκούν επίσης ισχυρές αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντιαιμοπεταλιακές δράσεις.

Εκχυλίσματα από λευκό και κόκκινο κρασί έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα σε μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας βρέθηκε ότι τόσο τα ερυθρά κρασιά όσο και τα λευκά, περιέχουν αναστολείς του PAF. [26, 59, 63, 70]

Τα φαινολικά συστατικά προέρχονται κυρίως από τις φλούδες, τους σπόρους και το τσάμπουρο σταφυλιών και κατά τη διαδικασία της οινοποίησης αυτές οι ενώσεις περνούν στο κρασί. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα παραπροϊόντα που απομένουν από τη διαδικασία αυτή (σπόροι, φλούδες, στέμφυλα, τσάμπουρα), παραμένει μια σημαντική ποσότητα βιοενεργών ενώσεων. Τα παραπροϊόντα περιέχουν μεγάλες ποσότητες φαινολικών οξέων, φλαβονόλες, προανθοκυανιδίνες, ανθοκυανίνες και στιλβένια (ρεσβερατρόλη). Δηλαδή, ποσότητα των ωφέλιμων συστατικών που είναι παρόντα στο κρασί, υπάρχουν και στα παραπροϊόντα, καθιστώντας τα ως μια φθηνή πηγή φαινολικών ενώσεων με πολλές ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό. Πέρα από τη χρήση τους για άντληση δραστικών ενώσεων, η αξιοποίησή τους προσφέρει περαιτέρω εναλλακτικές λύσεις για τη μείωση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου των δραστηριοτήτων του οινοποιείου.

Έχουν περιγραφεί ποικίλες προστατευτικές δράσεις των συστατικών των παραπροϊόντων για τον άνθρωπο, όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Μέσα στις ιδιότητές τους, συγκαταλέγεται και η εμπλοκή τους στην αναστολή των βιολογικών δράσεων των αιμοπεταλίων. Οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των παραπροϊόντων οινοποίησης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι περιορισμένες. Οι περισσότερες από αυτές διεξάγονται σε πλυμένα αιμοπετάλια και οι συσσωρευτικοί παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί για να διεγείρουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι ο ADP, η θρομβίνη, το κολλαγόνο και ο TRAP, ενώ μέχρι στιγμής δεν είχε χρησιμοποιηθεί ο PAF.

Στη μελέτη μας εξετάστηκε η επίδραση παραπροϊόντων (στέμφυλων: σπόρων και φλουδών) στη συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) (5×10^5 αιμοπετάλια/μl). Άλλες μελέτες είχαν χρησιμοποιήσει για τον ίδιο σκοπό πλυμένα αιμοπετάλια [11, 91, 94], πλήρες αίμα [92, 95, 96] και αιμοπετάλια που απομονώθηκαν με μοριακή διήθηση [16, 17].

Το PRP προεπελάζονταν για 10 λεπτά και στη συνέχεια επώαζονταν μαζί με τα παραπροϊόντα στους 37°C για 5 λεπτά. Η επώαση αιμοπεταλίων και παραπροϊόντων στις περισσότερες μελέτες γινόταν επίσης στους 37 °C και διαρκούσε 5 λεπτά. Οι Bijak et al. ξεκίνησαν το πείραμά τους με επώαση των εκχυλισμάτων με το συσσωρευτικό παράγοντα θρομβίνη και έπειτα διέγερση των αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση αιμοπεταλίων αναστάλθηκε από όλες τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού (0,5, 5 και 50μg/ml). [17]

Στο πείραμά μας, ως παραπροϊόντα οινοποίησης χρησιμοποιήθηκαν 25γρ από στέμφυλα σε κάθε μέθοδο εκχύλισης και ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων ευεργετικών ουσιών. Τα εκχυλίσματα από τις μεθόδους εκχύλισης με χλωροφόρμιο και αιθανόλη στην πλειονότητά τους οδήγησαν σε αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων.

Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, ισχυρότερη και δόσοεξαρτώμενη αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων παρουσίασαν τα εκχυλίσματα αιθανόλης και ακολούθως τα εκχυλίσματα της λιποειδικής φάσης της Bligh-Dyer, δηλαδή εκείνα του χλωροφορμίου.

- Όσον αφορά το **αιθανολικό εκχύλισμα** παραπροϊόντων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, το IC₅₀ για αιμοπετάλια που είχαν διεγερθεί με PAF, ήταν στα 107±60μg/κυψελίδα (μέσος όρος από τις 3 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος συσσώρευσης και 81±30μg/κυψελίδα (250μl) (μέσος όρος 1^{ης} και 3^{ης} σειράς εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το AUC. Για το αιθανολικό εκχύλισμα της ποικιλίας Syrah το IC₅₀ (σε αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF) υπολογίστηκε στα 196,5±35μg/κυψελίδα (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος συσσώρευσης.

Τα IC₅₀ για αιμοπετάλια διεγερμένα με ADP, για την ποικιλία Cabernet Sauvignon, ήταν 96±34μg και 90±35μg/κυψελίδα (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων, CS1 και CS3)

λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC , αντίστοιχα. Για την ποικιλία Syrah ήταν στα $135\pm 14\mu\text{g}$ και $130\pm 26\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC, αντίστοιχα.

Τέλος, το IC_{50} για αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP, για την ποικιλία Cabernet Sauvignon, ήταν $90\pm 15\mu\text{g}$ και $80\pm 26\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 3 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC , αντίστοιχα. Για την ποικιλία Syrah ήταν στα $158,5\pm 23\mu\text{g}$ και $160\pm 28\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC , αντίστοιχα.

- Όσον αφορά τα **εκχυλίσματα χλωροφορμίου** της Cabernet Sauvignon, το IC_{50} για αιμοπετάλια που είχαν διεγερθεί με PAF ισούται με $288\pm 35\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και $183,7\mu\text{g/κυψελίδα}$ (τιμή από την 2^η σειρά εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το AUC. Για τα εκχυλίσματα χλωροφορμίου της Syrah, σε αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF δε μπορεί να υπολογιστεί IC_{50} , καθώς οι αναστολές δεν έφτασαν το 50%

Το IC_{50} από τη Cabernet Sauvignon για αιμοπετάλια που είχαν διεγερθεί με ADP βρέθηκε λαμβάνοντας υπόψη το ύψος συσσώρευσης που προέκυψε από εκχυλίσματα της 3^η σειράς εκχυλίσεων και ήταν ίσο με $30\mu\text{g}$.

Το IC_{50} για αιμοπετάλια διεγερμένα με ADP, για την ποικιλία Syrah, ήταν $172\pm 31\mu\text{g}$ και $170\pm 15\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC, αντίστοιχα.

Το IC_{50} από τη Cabernet Sauvignon για αιμοπετάλια που είχαν διεγερθεί με TRAP ήταν στα $82\pm 87\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων, CS2 και CS3) και $577\mu\text{g/κυψελίδα}$ (τιμή από την 1^η σειρά εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC, αντίστοιχα.

Το IC_{50} για αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP, για την ποικιλία Syrah, ήταν $196\pm 57\mu\text{g}$ και $194\pm 51\mu\text{g/κυψελίδα}$ (μέσος όρος από τις 2 σειρές εκχυλίσεων) λαμβάνοντας υπόψη το ύψος και το AUC, αντίστοιχα.

- Τα **εκχυλίσματα εξανίου** δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις από $2\text{-}240\mu\text{g/κυψελίδα}$ και φάνηκε να προκαλούν μικρή αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων (συνήθως μη δοσοεξαρτώμενη) που δεν έφτανε μέχρι το 50%. Επίσης, επέφεραν και αρκετές

ενεργοποιήσεις. Ωστόσο, υπολογίστηκε το IC_{50} από εκχυλίσματα της 3^{ης} σειράς στα 176μg/κυψελίδα (λαμβάνοντας υπόψη το ύψος) για την Cabernet Sauvignon και για αιμοπετάλια διεγερμένα με TRAP.

Για τη Syrah το IC_{50} υπολογίστηκε από εκχυλίσματα της 1^{ης} σειράς στα 15μg/κυψελίδα (λαμβάνοντας υπόψη το AUC) για αιμοπετάλια διεγερμένα με PAF.

- Τα **υδατικά** από τη μέθοδο Bligh-Dyer και από τη μέθοδο με το ζεστό νερό, σε όλες τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις (0,1-170μg παραπροϊόντων/κυψελίδα) προκάλεσαν διάχυτη ενεργοποίηση. Τα ευρήματα αυτά αφορούν και τις δύο ποικιλίες.

Συγκρίνοντας τις δύο ποικιλίες φαίνεται πως τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων ποικιλίας Syrah πιθανόν να είναι καλύτεροι αναστολείς συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε σχέση με τα παραπροϊόντα της Cabernet Sauvignon, δεδομένου ότι στο σύνολο τους προκάλεσαν περισσότερες δοσοεξαρτώμενες αναστολές, τα IC_{50} των εκχυλισμάτων της (ανά μέθοδο εκχύλισης) είχαν παρόμοιες τιμές και με τους δύο τρόπους που υπολογίστηκαν (μέσω ύψους συσσώρευσης και AUC) και επίσης τα επαναληπτικά εκχυλίσματα κάθε μεθόδου εκχύλισης έναντι του κάθε συσσωρευτικού παράγοντα, είχαν μικρές αποκλίσεις IC_{50} .

Οι Olas et al. χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιών σε συγκεντρώσεις 5-50μg εκχ/ml εναιωρήματος αιμοπεταλίων. Τα 50μg/ml έδωσαν 70% αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων επαγόμενων από θρομβίνη. Σε μια νέα μελέτη τους το 2012 χρησιμοποίησαν 1,25-50μg/ml εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού με συνολική συγκέντρωση φαινολικών συστατικών 500mg/g εκχυλίσματος. Η επαγόμενη από θρομβίνη και TRAP συσσώρευση αιμοπεταλίων αναστάλθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος.[16, 91]

Στο πείραμά τους, οι Vitseva et al., χρησιμοποίησαν 100mg/l εκχύλισμα σπόρων (ή 25μg εκχυλίσματος/κυψελίδα) και 250,500mg/l εκχύλισμα φλουδών (ή 62,5, 125μg/κυψελίδα). Η επώαση παραπροϊόντων και πλυμένων αιμοπεταλίων έγινε στους 24°C και διήρκησε 30 λεπτά και το αποτέλεσμα ήταν η αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP κατά 68,8±19,8% έως 45±3,6% από το εκχύλισμα σπόρων και κατά 27±7,2% από το εκχύλισμα φλουδών.[81] Στα πειράματα της μελέτης μας, αναστολή συσσώρευσης

αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP, μεγαλύτερη από 30%, επιτεύχθηκε με 100μg εκχυλίσμάτων παραπροϊόντων/κυψελίδα και πάνω.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μας, χρησιμοποιήσαμε παραπροϊόντα δύο ποικιλιών σταφυλιών, Cabernet Sauvignon και Syrah. Οι Jin et al, χρησιμοποίησαν στο πείραμά τους εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιών από την ποικιλία Cabernet Sauvignon. 10μg/ml εκχυλίσματος σπόρων (ή 2,5μg/κυψελίδα) προκάλεσαν αναστολή συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων διεγερμένων από κολλαγόνο και TRAP. Συγκεκριμένα, το IC₅₀ έναντι TRAP υπολογίστηκε στα 2,5μg/κυψελίδα.[11] Στο πείραμά μας, το IC₅₀ έναντι TRAP υπολογίστηκε από 65μg εκχυλίσματος παραπροϊόντων/κυψελίδα και πάνω, ανάλογα την ποικιλία και τη μέθοδο εκχύλισης. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, καθώς χρησιμοποιήσαμε PRP, στο οποίο χρειάζονται μεγαλύτερες ποσότητες παραπροϊόντων για να φανεί μια βιολογική δράση, σε σχέση με τα πλυμένα αιμοπετάλια.

Οι Lange et al. χρησιμοποίησαν εκχύλισμα από σταφύλι με περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά 50% της σύστασής του, το οποίο προκάλεσε αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων με TRAP και ADP. Τα 50μg αυτού του εκχυλίσματος έδωσαν 60% αναστολή σε αιμοπετάλια που είχαν διεγερθεί με TRAP.[94]

Οι Bojic et al, εξέτασαν την επίδραση που έχει στα αιμοπετάλια η επώασή τους με 30 διαφορετικά φλαβονοειδή (ως καθαρές ουσίες), που φυσιολογικά περιέχονται στα παραπροϊόντα οινοποίησης. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι όλα τα αναλυόμενα φλαβονοειδή ανέστειλαν τη συσσώρευση των διεγερμένων με ADP αιμοπεταλίων.[96]

Οι Shanmuganaya et al (2002), απέδειξαν ότι το αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα των δράσεων των συστατικών των σπόρων και της φλούδας σταφυλιών όταν συνδυαστούν είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το αποτέλεσμα της δράσης του καθενός μεμονωμένα.[92]

Στα πειράματά μας, η επώαση PRP με τα συστατικά παραπροϊόντων που είχαν εκχυλιστεί με νερό επέφερε διάχυτη ενεργοποίηση συσσώρευσης αιμοπεταλίων διεγερμένων από PAF, ADP και TRAP. Σε ένα πιο πρόσφατο πείραμά τους, οι Shanmuganaya et al, εξετάζοντας τις επιδράσεις εκχυλίσμάτων φλούδων σταφυλιών (που είχαν εκχυλιστεί με

νερό, νερό/αιθανόλη, αιθανόλη και αιθανόλη/μεθανόλη) σε πλήρες αίμα παρατήρησαν ότι τα κλάσματα με νερό, νερό/αιθανόλη και αιθανόλη αύξησαν την προκαλούμενη από κολλαγόνο συσσώρευση αιμοπεταλίων κατά $3,8 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$), $7,2 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$) και $23,8 \pm 4,2\%$ ($p < 0,001$) αντίστοιχα. Και τα τρία αυτά κλάσματα περιείχαν υδροξικινναμωμικά οξέα. Το δεύτερο κλάσμα περιείχε ανθοκυανίνες και το δεύτερο και το τρίτο μονομερείς φλαβον-3-όλες.[95] Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το φαινολικό κλάσμα από χυμό σταφυλιών που περιείχε ανθοκυανίνες, κινναμωμικά οξέα και μονομερείς φλαβον-3-όλες αύξησε επίσης τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.[101] Οι Lill et al παρατήρησαν επίσης ότι οι μονομερείς φλαβον-3-όλες αυξάνουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση.[102]

Επομένως, είναι πιθανόν όλα τα συστατικά που προαναφέρθηκαν να ευθύνονται για την επαγωγή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και ίσως οι ενώσεις αυτές να περιέχονταν και στα δικά μας εκχυλίσματα από νερό, νερό μεθανόλης και εξάνιο.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης αποτελούν ένδειξη ότι τα παραπροϊόντα οινοποίησης, αν αξιοποιηθούν, δύνανται να συμβάλλουν στην εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού, δεδομένου ότι εμφανίζουν αντι-αιμοπεταλιακή και επομένως αντιθρομβωτική δράση. Μια μορφή αξιοποίησής τους με προοπτικές για το μέλλον, είναι η άντληση δραστικών συστατικών από αυτά και η παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με καρδιο-προστατευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να εντοπιστεί η βέλτιστη συγκέντρωσή τους που επιφέρει θετικές εκβάσεις αλλά και να χαρακτηρισθούν οι ευεργετικές ενώσεις τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brown, R.A., et al., *Current Understanding of Atherogenesis*. Am J Med, 2017. **130**(3): p. 268-282.
2. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation*. Thromb Haemost, 2015. **114**(3): p. 449-58.
3. Vander, A., *Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού*. 2011.
4. Chan, A.K. and N. Paredes, *The coagulation system in humans*. Methods Mol Biol, 2013. **992**: p. 3-12.
5. Haley, K.M., M. Recht, and O.J. McCarty, *Neonatal platelets: mediators of primary hemostasis in the developing hemostatic system*. Pediatr Res, 2014. **76**(3): p. 230-7.
6. Faggio, C., et al., *Flavonoids and platelet aggregation: A brief review*. Eur J Pharmacol, 2017. **807**: p. 91-101.
7. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
8. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. Indian J Anaesth, 2014. **58**(5): p. 515-23.
9. Swanepoel, A.C., V.G. Nielsen, and E. Pretorius, *Viscoelasticity and Ultrastructure in Coagulation and Inflammation: Two Diverse Techniques, One Conclusion*. Inflammation, 2015. **38**(4): p. 1707-26.
10. Savage, B., M. Cattaneo, and Z.M. Ruggeri, *Mechanisms of platelet aggregation*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(5): p. 270-6.
11. Jin, J.W., et al., *Grape seed extracts inhibit platelet aggregation by inhibiting protein tyrosine phosphatase*. Clin Appl Thromb Hemost, 2014. **20**(3): p. 278-84.
12. Demopoulos, C.A., *Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2003.
13. Ninio, E., *Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(2): p. 123-31.
14. Snyder, F., *Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes*. Biochem J, 1995. **305 (Pt 3)**: p. 689-705.
15. Yun, S.H., et al., *Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 9060143.
16. Olas, B., et al., *The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists*. Platelets, 2012. **23**(4): p. 282-9.
17. Bijak, M., et al., *Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds*. Phytother Res, 2013. **27**(1): p. 71-6.
18. Landesberg, R., et al., *Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide*. J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(4): p. 529-35.
19. Schulz, C. and S. Massberg, *Platelets in atherosclerosis and thrombosis*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 111-33.
20. Vilahur, G. and L. Badimon, *Antiplatelet properties of natural products*. Vascul Pharmacol, 2013. **59**(3-4): p. 67-75.
21. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 1973. **180**(4093): p. 1332-9.
22. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.

23. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
24. Ζαμπέλας, Α., *Κλινική διαιτολογία & διατροφή με στοιχεία παθολογίας*. 2014.
25. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
26. Fragopoulou, E., et al., *Biological activity of total lipids from red and white wine/must*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(11): p. 5186-93.
27. Argyrou, C., et al., *Postprandial effects of wine consumption on Platelet Activating Factor metabolic enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017. **130**: p. 23-29.
28. Xanthopoulou, M.N., et al., *Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells*. Food Chem, 2014. **165**: p. 50-9.
29. Projahn, D. and R.R. Koenen, *Platelets: key players in vascular inflammation*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(6): p. 1167-75.
30. Patzelt, J., A. Verschoor, and H.F. Langer, *Platelets and the complement cascade in atherosclerosis*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 49.
31. Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 98.
32. McEwen, B.J., *The influence of diet and nutrients on platelet function*. Semin Thromb Hemost, 2014. **40**(2): p. 214-26.
33. WHO, *Global status report on alcohol and health 2014*. 2014.
34. Mukamal, K.J., et al., *Moderate Alcohol Consumption and Chronic Disease: The Case for a Long-Term Trial*. Alcohol Clin Exp Res, 2016. **40**(11): p. 2283-2291.
35. Williams, M.H., *Διατροφή & Υγεία, Ευρωστία, Αθλητική απόδοση* 2014.
36. Cederbaum, A.I., *Alcohol metabolism*. Clin Liver Dis, 2012. **16**(4): p. 667-85.
37. NIH, 2007.
38. Rimm, E.B., et al., *Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits*. BMJ, 1996. **312**(7033): p. 731-6.
39. Marmot, M.G., *Alcohol and coronary heart disease*. Int J Epidemiol, 2001. **30**(4): p. 724-9.
40. Mathews, M.J., L. Liebenberg, and E.H. Mathews, *The mechanism by which moderate alcohol consumption influences coronary heart disease*. Nutr J, 2015. **14**: p. 33.
41. Chiva-Blanch, G., et al., *Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies*. Alcohol Alcohol, 2013. **48**(3): p. 270-7.
42. Fernandez-Sola, J., *Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(10): p. 576-87.
43. Rimm, E.B., et al., *Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men*. Lancet, 1991. **338**(8765): p. 464-8.
44. Mukamal, K.J., et al., *Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men*. N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 109-18.
45. Cordova, A.C., et al., *The cardiovascular protective effect of red wine*. J Am Coll Surg, 2005. **200**(3): p. 428-39.
46. Klatsky, A.L., M.A. Armstrong, and G.D. Friedman, *Alcohol and mortality*. Ann Intern Med, 1992. **117**(8): p. 646-54.
47. Zhang, X.Y., et al., *Dietary Patterns, Alcohol Consumption and Risk of Coronary Heart Disease in Adults: A Meta-Analysis*. Nutrients, 2015. **7**(8): p. 6582-605.
48. Lippi, G., et al., *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(1): p. 59-70.
49. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
50. Costanzo, S., et al., *Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis*. Eur J Epidemiol, 2011. **26**(11): p. 833-50.
51. Arranz, S., et al., *Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer*. Nutrients, 2012. **4**(7): p. 759-81.

52. Ruf, J.C., *Alcohol, wine and platelet function*. Biol Res, 2004. **37**(2): p. 209-15.
53. Boban, M., et al., *Drinking pattern of wine and effects on human health: why should we drink moderately and with meals?* Food Funct, 2016. **7**(7): p. 2937-42.
54. Wang, Z., et al., *Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro*. Int J Mol Med, 2002. **9**(1): p. 77-9.
55. Klurfeld, D.M. and D. Kritchevsky, *Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits*. Exp Mol Pathol, 1981. **34**(1): p. 62-71.
56. Estruch, R., et al., *Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: a randomised cross-over trial*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011. **21**(1): p. 46-53.
57. Di Castelnuovo, A., et al., *Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk*. Circulation, 2002. **105**(24): p. 2836-44.
58. Goldberg, D.M., et al., *Wine: does the colour count?* Clin Chim Acta, 1996. **246**(1-2): p. 183-93.
59. Fragopoulou, E., et al., *Separation of biologically active lipids from red wine*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(4): p. 1234-8.
60. Markoski, M.M., et al., *Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits*. Nutr Metab Insights, 2016. **9**: p. 51-7.
61. Ali, K., et al., *Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products*. Phytochem Rev, 2010. **9**(3): p. 357-378.
62. Fontana, A.R., A. Antonioli, and R. Bottini, *Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(38): p. 8987-9003.
63. Fragopoulou, E., S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(9): p. 2684-94.
64. Waterhouse, A.L., *Wine phenolics*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **957**: p. 21-36.
65. Pignatelli, P., et al., *Red and white wine differently affect collagen-induced platelet aggregation*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. **32**(5-6): p. 356-8.
66. Beretz, A., et al., *Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin*. Biochem Pharmacol, 1982. **31**(22): p. 3597-600.
67. Subbaramaiah, K., et al., *Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21875-82.
68. Pace-Asciak, C.R., et al., *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*. Clin Chim Acta, 1995. **235**(2): p. 207-19.
69. Pace-Asciak, C.R., et al., *Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects*. Clin Chim Acta, 1996. **246**(1-2): p. 163-82.
70. Fragopoulou, E., et al., *Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1632**(1-3): p. 90-9.
71. Mattos, G.N., et al., *Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review*. J Sci Food Agric, 2017. **97**(4): p. 1055-1064.
72. Galanakis, C., *Handbook of Grape Processing By-Products*. 2017.
73. Teixeira, A., et al., *Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 15638-78.
74. Ghafoor, K., et al., *Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(11): p. 4988-94.

75. Nawaz, H., *Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration*. Separation and Purification Technology, 2006.
76. Rodriguez Montealegre, R., *Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape Vitis vinifera varieties grown in a warm climate*. 2006.
77. Di Lecce, G., et al., *Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albarino grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry*. Food Chem, 2014. **145**: p. 874-82.
78. Ky, I., et al., *Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties*. Molecules, 2014. **19**(1): p. 482-506.
79. M.Corrales, *Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008.
80. Cvejic, J.M., et al., *Determination of trans- and cis-resveratrol in Serbian commercial wines*. J Chromatogr Sci, 2010. **48**(3): p. 229-34.
81. Vitseva, O., et al., *Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **46**(4): p. 445-51.
82. Machado, N.F. and R. Dominguez-Perles, *Addressing Facts and Gaps in the Phenolics Chemistry of Winery By-Products*. Molecules, 2017. **22**(2).
83. Balasundram, N., *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 2006.
84. Arvanitoyannis, I.S., *Potential uses and applications of treated wine waste: a review*. International Journal of Food Science & Technology, 2006.
85. Rockenbach, I.I., *Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (Vitis vinifera L. and Vitis labrusca L.) widely produced in Brazil*. Food Chemistry, 2011.
86. Ruberto, G., *Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars*. 2007.
87. Chidambara Murthy, K.N., R.P. Singh, and G.K. Jayaprakasha, *Antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) pomace extracts*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(21): p. 5909-14.
88. Yang, J. and Y.Y. Xiao, *Grape phytochemicals and associated health benefits*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2013. **53**(11): p. 1202-25.
89. Tebib, K., *Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E-deficient diet*. 1997.
90. Pastrana-Bonilla, E., et al., *Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(18): p. 5497-503.
91. Olas, B., et al., *Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of Aronia melanocarpa, seeds of grape and bark of Yucca schidigera in vitro*. Platelets, 2008. **19**(1): p. 70-7.
92. Shanmuganayagam, D., et al., *Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans*. J Nutr, 2002. **132**(12): p. 3592-8.
93. Bijak, M., et al., *Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds*. Fitoterapia, 2011. **82**(6): p. 811-7.
94. de Lange, D.W., et al., *Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(8): p. 1308-14.
95. Shanmuganayagam, D., et al., *Differential effects of grape (Vitis vinifera) skin polyphenolics on human platelet aggregation and low-density lipoprotein oxidation*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(23): p. 5787-94.

96. Bojic, M., et al., *Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series*. Nutr J, 2011. **10**: p. 73.
97. Manios, T., *The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete*. Environ Int, 2004. **29**(8): p. 1079-89.
98. Gonzalez-Paramas, A.M., et al., *Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(2): p. 234-8.
99. Zhu, F., et al., *Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace*. Food Chem, 2015. **186**: p. 207-12.
100. Weiskirchen, S. and R. Weiskirchen, *Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy?* Adv Nutr, 2016. **7**(4): p. 706-18.
101. Freedman, J.E., et al., *Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release*. Circulation, 2001. **103**(23): p. 2792-8.
102. Lill, G., et al., *Complex effects of different green tea catechins on human platelets*. FEBS Lett, 2003. **546**(2-3): p. 265-70.