ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης στις λειτουργίες μονοκυττάρων σε κατάσταση φλεγμονής

Τσώτα Μαρία

Αθήνα, 2019

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ (Επιβλέπουσα)
Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τέντα Ρωξάνη
Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνοπούλου Σμαραγδή
Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Μαρία Τσώτα

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κυρία Φραγκοπούλου Ελισάβετ, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφερε. Οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις της, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, αλλά και της συγγραφής της εργασίας μου, υπήρξαν πολύτιμες.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη στην υποψήφια διδάκτορα Χολέβα Μαρία, με την οποία συνεργάστηκα άψογα καθ΄ όλη τη διάρκεια της εκπόνησης των πειραμάτων της διπλωματικής μου. Η αφοσίωση, η υπομονή και η φιλική της διάθεση συνετέλεσαν στην ανάπτυξη των εργαστηριακών μου ικανοτήτων και στη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος μέσα στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Πετσίνη Φυλιώ και Ντετοπούλου Μαρία, για την βοήθεια που προσέφεραν, όποτε τους ζητήθηκε, καθώς και όλους τους εθελοντές που προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο και δέχθηκαν να συμμετέχουν στη μελέτη.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την αγάπη και τη στήριξη που μου προσέφεραν, καθώς και για την πίστη τους σ' εμένα.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη....8
Abstract....9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ....10
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ....11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ....11
Συντομογραφίες....12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ....14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Φλεγμονή....14
1.1 Εισαγωγή....14
1.2Κύτταρα φλεγμονής....16
1.3 Αναγνώριση μικροβίων και κατεστραμμένων κυττάρων....19
1.4 Οργάνωση μικροαγγειακού συστήματος....19
1.5 Φλεγμονή σε επίπεδο αγγείου....20
1.5.1 Αλλαγές στην αγγειακή ροή και διάμετρο....21
1.5.2 Αλλαγές στην αγγειακή διαπερατότητα....22
1.5.3 Διατήρηση αιματικής ροής....23
1.5.4 Τριχοειδή αγγεία-Στρατολόγηση λευκοκυττάρων....23
1.5.5 Προσκόλληση Λευκοκυττάρων....24
1.6 Μεσολαβητές της φλεγμονής....26
1.6.1 Αγγειοδραστικές αμίνες....26
1.6.2 Κυτταροκίνες φλεγμονής....27
1.6.2.1 Ιντερλευκίνη-1....30
1.6.2.2 Ιντερλευκίνη-6....30
1.6.2.3 Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων α (TNFα)....31
1.6.3 Χημειοκίνες....32
1.6.4 Κινίνες....32
1.6.5 Νευροπεπτίδια....32
1.6.6 Σύστημα Συμπληρώματος....32
1.7 Μεσολαβητές λιπιδικής φύσης....34
1.7.1 Μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος....34
1.7.2 Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)....35
1.7.2.1 ‘Ενζυμα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του PAF....36
1.7.3 Λυσο-φωσφατιδικό οξύ....37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Κρασί....38
2.1 Εισαγωγή....38
2.1 Κρασί και φαινολικές ενώσεις....39

2.2 Φαινολικά συστατικά.....40
2.2.1Φαινολικά οξέα.....40
2.2.2Υδροξυβενζοϊκά οξέα.....41
2.2.3Υδροξυκιναμικά οξέα.....41
2.2.4Φλαβονοειδή.....42
2.2.4.1 Φλαβονόλες.....43
2.2.4.2 Φλαβανόλες.....43
2.2.4.3 Φλαβόνες.....44
2.2.4.4 Ανθοκυανίνες.....45
2.2.5Στιλβένια.....46
2.3 Αντι-φλεγμονώδης δράση συστατικών κρασιού.....47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Παραπροϊόντα οινοποίησης.....57
3.1Στέμφυλα.....57
3.2Κοτσάνια σταφυλιών.....58
3.3Φύλλα σταφυλιών.....58
3.4Οινολάσπες.....59
3.5 Αξιοποίηση παρα-προϊόντων οινοποίησης.....59
3.6 Παραλαβή συστατικών-Εκχύλιση.....61
3.7 Αντι-φλεγμονώδης δράση εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης. In vitro μελέτες.....62
4. Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας.....66
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μεθοδολογία.....67
5.1 Εκχύλιση παραπροϊόντων οινοποιίας.....67
5.2 Bligh-Dyer.....67
5.3 Προσδιορισμός Φαινολικών Συστατικών.....68
5.4 Απομόνωση PBMCs.....70
5.5 Μέτρηση Κυττάρων στο μικροσκόπιο.....71
5.6 Επίδραση εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οινοποίησης στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.....72
5.7 Επίδραση εκχυλισμάτων στην έκκριση κυτταροκινών από τα PBMCs.....73
5.7.1 Επώαση PBMCs με εκχυλίσματα.....73
5.7.2Παραλαβή υπερκειμένων για τον προσδιορισμό της PAF CPT.....73
5.8 Μέθοδος Bradford-Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου.....73
5.9 Ποσοτικός προσδιορισμός κυτταροκινών.....74
5.10 Προσδιορισμός δραστικότητας PAF CPT.....76
5.11 Στατιστική Ανάλυση.....79
6.Αποτελέσματα.....80
6.1 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του συνολικού εκχυλίσματος των ποικιλιών κρασιού80

6.2 Εκχύλιση Bligh-Dyer του αιθανολικού εκχυλίσματος.....80
6.3 Επίδραση εκχυλίσματος στη βιωσιμότητα των PBMCs.....81
6.3.1 MTT.....81
6.3.2 Μέτρηση κυττάρων.....84
6.4 Έκκριση κυτταροκινών.....86
6.4.1 Επίδραση LPS.....86
6.4.2 Επίδραση εκχυλισμάτων στην έκκριση TNFα.....87
6.4.3 Επίδραση εκχυλισμάτων στην έκκριση Il-1β.....90
5.5 Ενζυμική κινητική.....92
5.6 Επίδραση LPS στη δραστικότητα της PAF CPT.....94
7.Συζήτηση.....96
7.1 Περιορισμοί.....100
7.2 Συμπεράσματα.....100
8.Βιβλιογραφία.....101

Περίληψη

Η μέτρια κατανάλωση κρασιού έχει συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται στην ύπαρξη βιοδραστικών συστατικών στο κρασί, τα οποία εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Παρόλα αυτά, λόγω της ύπαρξης της αιθανόλης, η οποία έχει και επιβλαβή για τον οργανισμό δράση, δεν μπορεί να καταναλωθεί μεγάλη ποσότητα κρασιού. Τα παραπροϊόντα οινοποίησης αποτελούν μια φθηνή πηγή ανάλογων συστατικών, η οποία παραμένει ανεκμετάλλευτη και θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για την παραλαβή τους.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της αντι-φλεγμονώδους δράσης εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οινοποίησης.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε εκχύλιση παραπροϊόντων οινοποίησης (στέμφυλα) από τέσσερις ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Syrah, Ξινόμαυρο), με υδατικό διάλυμα αιθανόλης και με τη μέθοδο Bligh-Dyer, με την οποία πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των υδατο-διαλυτών και λιποδιαλυτών συστατικών. Έγινε προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων. Ως κυτταρική σειρά, χρησιμοποιήθηκαν περιφερικά μονοπύρηνα μονοκύτταρα του αίματος (PBMCs), τα οποία είχαν απομονωθεί από υγιείς εθελοντές. Ακολούθησε δοκιμασία κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων στα PBMCs. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην έκκριση των κυτταροκινών TNFα και IL-1β από PBMCs που είχαν διεγερθεί με LPS και διερευνήθηκε η δραστικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), PAF CPT.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ποσότητα εκχυλισμάτων μικρότερη από 1500 μg/ml, δεν είναι κυτταροτοξική για τα PBMCs. Ακόμη, παρατηρήθηκε μείωση των υπό μελέτη κυτταροκινων, όταν τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες με LPS, παρουσία των εκχυλισμάτων και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου PAF CPT.

Φάνηκε, συνεπώς, ότι τα εκχυλίσματα των παρα-προϊόντων οινοποίησης μπορούν να έχουν αντιφλεγμονώδη δράση σε κύτταρα PBMC.

Λέξεις κλειδιά: φλεγμονή, περιφερικά κύτταρα αίματος, παραπροϊόντα οινοποίησης, PAF, κυτταροκίνες

Abstract

Moderate wine consumption has been correlated with low risk of cardiovascular disease incidence. This has been attributed to the existence of bioactive compounds in wine, which display anti-inflammatory activity. However, due to its content in ethanol, which has harmful effects for the organism, wine can't be consumed in great amounts. Wine by-products are a cheap source of such compounds, which remains unexploitable and could possibly be used as a source for their isolation.

The purpose of the present experimental study was the investigation of wine by-products extracts' anti-inflammatory activity.

Therefore, wine by-products (grape pomace) origining from four red grape varieties (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Syrah, Sour Black) were extracted with aqueous ethanol solution, and using Bligh-Dyer method, water-soluble and lipid-soluble components were separated. The total phenolic content of each extract was measured. The cellular line used in this experiment was PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), isolated from healthy volunteers. The extracts were examined, in order to determine the maximum concentration that would not be toxic for PBMCs. Finally, PBMCs stimulated with LPS, were incubated in medium containing the extracts, in order to evaluate the effect of each extract on the efflux of cytokines TNFα and IL-1β and PAF CPT, the biosynthetic enzyme of PAF (Platelet Activating Factor) was studied, in order to determine the optimal conditions of its activity.

Results showed that when extracts were added in the medium in concentrations lower than 1500 μg/ml, were not tocix for PBMCs. Furthermore, there was observed a decline of the studied cytokines, when cells were stimulated with LPS and incubated for four hours with the extracts and the optimal conditions for PAF CPT activity were determined.

Consequently, it was shown that extracts from wine by-products could display anti-inflammatory activity on PBMCs.

Keywords: inflammation, peripheral blood mononuclear cells, wine by-products, PAF, cytokines

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1. Στάδια εξέλιξης φλεγμονής (Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster - Robbins Basic Pathology, chapter 3, p.58, 2017, Elsevier, 10th edition)……σ.15

Εικ.2. Κύτταρα φλεγμονής (http://www.gluegrant.org/immunecells.htm).....σ.18

Εικ.3. Εξίδρωμα (Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster - Robbins Basic Pathology, chapter 3, p.61, 2017, Elsevier, 10th edition)……σ.21

Εικ.4. Μεταβολές αγγειακής διαπερατότητας (Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster - Robbins Basic Pathology, chapter 3, p.61, 2017, Elsevier, 10th edition)……σ.22

Εικ.5. Μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Markiewski, M. & Lambris, J. (2007), 'The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight', American Journal of Pathology 171(3), 715-727.)….σ.33

Εικ.6. Βιοσυνθετικά μονοπάτια PAF (Xanthopoulou, M.; Asimakopoulos, D.; Antonopoulou, S.; Demopoulos, C. & Fragopoulou, E. (2014), 'Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells', Food Chemistry 165, 50-59.)……σ.36

Εικ.7. Δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων (https://www.researchgate.net/profile/Ali_Khoddami/publication/235689961/figure/fig1)……σ.41

Εικ.8. Δομή υδροξυκιναμικών οξέων (https://www.researchgate.net/profile/Ali_Khoddami/publication/235689961/figure/fig1)……σ.42

Εικ.9. Φλαβονοειδή (https://www.researchgate.net/profile/Rie_Mukai)……σ.43

Εικ.10. Δομή φλαβονολών (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d6/Flavonol_structure.svg/1005px-Flavonol_structure.svg.png)……..σ.43

Εικ.11. Δομή φλαβανολών (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6e/Flavan-3-ol.svg/375px-Flavan-3-ol.svg.png)……σ.44

Εικ.12. Δομή φλαβονών (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/28/Flavon_num.svg/1024px-Flavon_num.svg.png)……..σ.45

Εικ.13. Δομή ανθοκυανινών (https://www.intechopen.com/media/chapter/44143/media/image1.jpeg)……σ.45

Εικ.14. Αλλαγή χρώματος ανθοκυανινών ανάλογα με το pH (https://www.intechopen.com/media/chapter/44143/media/image3.jpeg)……σ.46

Εικ.15. Δομή στιλβενίων (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1e/Cis-trans-stilbene.svg/1920px-Cis-trans-stilbene.svg.png)……σ.47

Εικ.16. Στέμφυλα……..σ.50

Εικ.17. Οινολάσπη……σ.61

Εικ.18. Μέθοδοι εκχύλισης (Barba, F.; Zhu, Z.; Koubaa, M.; Sant'Ana, A. & Orlien, V. (2016), 'Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review', *Trends in Food Science and Technology* **49**, 96-109.)……..σ.64

Εικ.19. Δείγμα στεμφύλων……σ.69

Εικ.20. Αιματοκυτταρόμετρο……σ.73

Εικ.21. ELISA (https://www.rndsystems.com/products/duoset-elisa-development-systems) ……..σ.77

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος
Διάγραμμα 2. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων
Διάγραμμα 3. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT-24ωρη επώαση
Διάγραμμα 4. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT-3ωρη επώαση
Διάγραμμα 5. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT (αιθανολικό εκχύλισμα και κλάσματα αιθανολικού)-24ωρη επώαση
Διάγραμμα 6. Μέτρηση κυττάρων-3ωρη επώαση
Διάγραμμα 7. Μέτρηση κυττάρων-24ωρη επώαση
Διάγραμμα 8. Μέτρηση κυττάρων (αιθανολικό εκχύλισμα και κλάσματα)-24ωρη επώαση
Διάγραμμα 9. α.Επίδραση LPS στην έκκριση TNFα ύστερα από 4ωρη και 24ωρη επώαση, β.Αποτελέσματα επίδρασης LPS στην έκκριση TNFα από 3 ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης
Διάγραμμα 10. α.Επίδραση LPS στην έκκριση Il-1β ύστερα από 4ωρη και 24ωρη επώαση, β.Αποτελέσματα επίδρασης LPS στην έκκριση Il-1β από 3 ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης
Διάγραμμα 11. Έκκριση TNFα
Διάγραμμα 12. %Αναστολή LPS-Έκκριση TNFα (0→δείγμα που επωάστηκε μόνο με LPS, 1→χλωροφορμικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 2→ χλωροφορμικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 3→αιθανολικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 4→αιθανολικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 5→υδατική φάση 500 μg/ml, 6→υδατική φάση 1000 μg/ml, 7→χλωροφορμική φάση 500 μg/ml, 8→χλωροφορμική φάση 1000 μg/ml)
Διάγραμμα 13. Αναστολή δράσης LPS (έκκριση Il-1β) από τα εκχυλίσματα
Διάγραμμα 14. %Αναστολή LPS-Έκκριση IL-1β(0→δείγμα που επωάστηκε μόνο με LPS, 1→χλωροφορμικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 2→ χλωροφορμικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 3→αιθανολικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 4→αιθανολικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 5→υδατική φάση 500 μg/ml, 6→υδατική φάση 1000 μg/ml, 7→χλωροφορμική φάση 500 μg/ml, 8→χλωροφορμική φάση 1000 μg/ml)
Διάγραμμα 15. Πρότυπη καμπύλη PAF
Διάγραμμα 16. Ποσότητα PAF- χρόνος
Διάγραμμα 17. Ποσότητα PAF-ποσότητα πρωτεΐνης
Διάγραμμα 18. Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης-ποσότητα πρωτεΐνης
Διάγραμμα 19. Επίδραση LPS στη δραστικότητα της PAF CPT

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Διάκριση κυτταροκινών βάσει ανοσολογικής απόκρισης
Πίνακας 2. Ανοσολογική προέλευση και δράση κυτταροκινών
Πίνακας 3. In vitro μελέτες-Κρασί και φαινολικά συστατικά
Πίνακας 4. In vitro μελέτες-Παρα-προϊόντα οινοποίησης
Πίνακας 5. Προκαλούμενη από LPS έκκριση TNFα παρουσία των εκχυλισμάτων
Πίνακας 6. %Αναστολή από τα εκχυλίσματα στην έκκριση TNFα που προκαλεί ο LPS
Πίνακας 7. Προκαλούμενη από LPS έκκριση IL-1β παρουσία των εκχυλισμάτων
Πίνακας 8. %Αναστολή από τα εκχυλίσματα στην έκκριση IL-1β που προκαλεί ο LPS

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Απόδοση	Συντομογραφία	Απόδοση	Συντομογραφία	Απόδοση
AAG	alcylacylated glycerol	**IFN**	Interferon	**PLAD**	Pre-Ligand Assembly Domain
AAPA	1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerophosphoric acid	**IgE**	Immunoglobulin E	**PMN**	Polymorphonuclear neutrophils
ADP	Adenosine di-phosphate	**IκB**	Inhibitor of kappa B	**RASMCS**	Rat Aortic Smooth Muscle Cells
ALPA	1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycerophosphate	**IL**	Interleukin	**RBL**	Rat Basophilic Leukemia cells
ATP	Adenosine tri-phosphate	**LOX**	Lipooxygenase	**ROS**	Riactive Oxygen Species
Caco2	human epithelial colorectal adenocarcinoma	**LPA**	Lys-Phosphatidic Acid	**RPMI**	Roswell Park Memorial Institute medium
COX	Cyclooxygenase	**LPS**	Lipopolysaccharide	**SFE**	Supercritical Fuids Extraction
DAMPS	Damage-Associated Molecular Patterns	**LTA**	Lipoteichoic acid	**SLE**	Solid/Liquid Extraction
Edg	Endothelial differentiation gene	**LTB4**	Leukotriene B4	**SMC**	Smooth Muscle Cell
EDTA	(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetic acid	**MAC**	Membrane Attack Complex	**SPPL**	Signal Peptide Peptidases Ligand
FcεRI	Fc-region high-affinity Receptor for Immunoglobulin E	**MAPK**	Mitogen Activated Protein Kinase	**TH**	T Helper Cells
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine	**MAE**	Microwave Associated Extraction	**TLR**	Toll-Like Receptor
GA	Gallic Acid	**MCP-1**	Monocyte Chemoattractant Protein 1	**TNF**	Tumor Necrosis Factor
Gp130	Glycoprotein 130	**MKK**	MAPK Kinase	**Treg**	T regulatory cells
GPCR	G Protein-Coupled Receptor	**NCS**	Newborn Calf Serum	**UAE**	Ultarsound Assisted Extraction
H_2O_2	Hydrogen Peroxide	**NFκB**	Nuclear Factor Kappa B	**VASP**	Vasodilator-Activated

Συντομογραφία	Απόδοση	Συντομογραφία	Απόδοση	Συντομογραφία	Απόδοση
HASMCs	Human Aortic Smooth Muscle Cells	**NK**	Natural Killer Cells	**VCAM**	Protein Vascular Cell Adhesion Molecule 1
HepG2	Human liver cancer cell line	**NOS**	Nitric Oxide Species	**VEGF**	Vascular Endothelial Growth Factor
HMVEC	Human Micro Vascular Cells	**PAF**	Platelet Activating Factor	**Vwf**	Von Willebrand factor
HPETE	Hydro-PeroxyEicosaTetraenoic acid	**PAF AH**	PAF Acetylhydrolase	**WPB**	WeibelPalade Bodies
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	**PAF CPT**	DTT-insensitive CDP-choline1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol cholinephosphotransferase		
HPTE	High Pressure and Temperature Extraction	**PAMPS**	Pathogen-Associated Molecular Patterns		
Hutu80	Human duodenum adenocarcinoma cell line	**PBMCs**	Peripheral Blood Mononuclear Cells		
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	**PBS**	Phosphate Buffered Saline		
IC50	Half maximal inhibitory concentration	**PDGE**	Platelet-Derived Growth Factor		
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1	**PI3K**	Phosphoinositide 3-Kinase		
ICD	IntraCellular Domain	**PLA_2**	Phospholipase A_2		

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

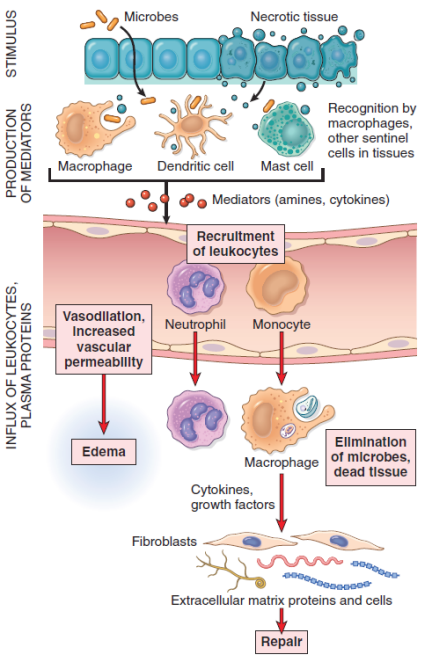
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Φλεγμονή

1.1 Εισαγωγή

Η φλεγμονή αποτελεί φυσιολογική απόκριση σε μολύνσεις και βλάβες ιστών που φέρουν αγγεία και περιλαμβάνει τη στρατολόγηση κυττάρων και μορίων της άμυνας του ξενιστή από την κυκλοφορία στα σημεία όπου είναι απαραίτητα, με στόχο την εξάλειψη των βλαβερών παραγόντων [1,2,3]. Οι αμυντικοί παράγοντες, οι οποίοι δρουν ως μεσολαβητές της φλεγμονής, μπορεί να είναι φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα, αντισώματα και άλλες πρωτεΐνες. Η πλειοψηφία αυτών των μεσολαβητών υπάρχουν φυσιολογικά στην κυκλοφορία του αίματος, όπου είναι απομονωμένοι και δεν μπορούν να βλάψουν τους υγιείς ιστούς, ενώ μπορούν να προσεγγίσουν πολύ γρήγορα οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Ορισμένα από τα κύτταρα που συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις είναι πιθανό να εντοπίζονται σε ιστούς, όπου λειτουργούν ως ανιχνευτές απειλών. Η διαδικασία της φλεγμονής προκαλεί τη μεταφορά λευκοκυττάρων και πρωτεϊνών προς τους εισβολείς, όπως είναι τα μικρόβια και οι ιστοί που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν νεκρωθεί [2].

Η τυπική αντίδραση της φλεγμονής περιλαμβάνει τα ακόλουθα διαδοχικά βήματα: ο εξωγενής παράγοντας που προσβάλλει εξωκυτταρικούς ιστούς, αναγνωρίζεται από κύτταρα και μόρια του ξενιστή. Στη συνέχεια, λευκοκύτταρα και πρωτεΐνες του πλάσματος μετακινούνται από την κυκλοφορία προς το σημείο εντοπισμού του επιβλαβούς παράγοντα. Τα λευκοκύτταρα και οι πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και δρουν συνεργιστικά, έτσι ώστε να καταστρέψουν και να απομακρύνουν την βλαβερή ουσία. Τέλος, αφού ελεγχθεί η αντίδραση, επέρχεται τερματισμός και επιδιόρθωση του κατεστραμμένου ιστού [4].

Όταν προκληθεί μόλυνση ή βλάβη σε ένα κύτταρο ή ιστό, ανιχνεύεται από κύτταρα του οργανισμού, όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά, τα μαστικά και άλλα κύτταρα. Αυτοί οι τύποι κυττάρων εκκρίνουν μόρια (μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως οι κυτταροκίνες), τα οποία επάγουν και ρυθμίζουν την επικείμενη φλεγμονώδη απόκριση [5]. Οι μεσολαβητές της φλεγμονής παράγονται επίσης και από πρωτεΐνες του πλάσματος, οι οποίες αντιδρούν στην παρουσία μικροβίων ή προϊόντων νεκρών κυττάρων.



Εικόνα 1. Στάδια εξέλιξης φλεγμονής

Τα ερεθίσματα που μπορούν τελικά να οδηγήσουν σε φλεγμονή είναι ποικίλα. Οι συχνότερες και πιο σοβαρές αιτίες της φλεγμονής είναι οι μολύνσεις από μικροοργανισμούς (βακτήρια, ιοί, μύκητες) και οι μικροβιακές τοξίνες. Διαφορετικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί προκαλούν διαφορετικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Σημαντικό αίτιο της φλεγμονής αποτελεί και η νέκρωση ιστού, ανεξάρτητα από το λόγο του κυτταρικού θανάτου, ο οποίος μπορεί να οφείλεται σε ισχαιμία, τραύμα, φυσικά και χημική βλάβη. Φλεγμονή μπορεί να εκδηλωθεί και από την εισβολή ξένων σωμάτων (θραύσματα, βρωμιά, ράμματα), καθώς και από την πρόκληση τραύματος ή τη μεταφορά μικροβίων από ξένα σώματα. Τέλος, πιθανή αιτία της φλεγμονής είναι και κάποιες ανοσολογικές αποκρίσεις, οι οποίες, ενώ φυσιολογικά δρουν προστατευτικά, καταστρέφουν τους ιστούς του ίδιου του οργανισμού (υπερευαισθησία). Οι ανοσοαποκρίσεις, στην περίπτωση βλαβών, μπορεί να δράσουν έναντι εαυτών αντιγόνων, προκαλώντας αυτοάνοσες ασθένειες, ή να είναι ακατάλληλες για την αντιμετώπιση κάποιων περιβαλλοντικών ουσιών (αλλεργίες) ή κάποιων μικροβίων [6].

Μέχρι σήμερα, έχουν μελετηθεί, κυρίως, δύο τύποι φλεγμονής, η οξεία [7] και η χρόνια [8]. Η αρχική, ταχεία απόκριση σε μολύνσεις και βλάβες ιστών ονομάζεται οξεία φλεγμονή. Συνήθως εκδηλώνεται μέσα σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών ή ωρών και έχει μικρή διάρκεια, μερικών ωρών ή λίγων ημερών. Τα βασικά χαρακτηριστικά αυτού του είδους φλεγμονής είναι η έκκριση υγρού και πρωτεϊνών του πλάσματος, καθώς και η μετανάστευση λευκοκυττάρων, κυρίως ουδετερόφιλων. Αν οι αντιδράσεις της οξείας φλεγμονής αποτύχουν να εξαλείψουν τον επιβλαβή πα-

ράγοντα και να επαναφέρει την ομοιόσταση του οργανισμού, λαμβάνει χώρα ένας παρατεταμένος τύπος φλεγμονής, ο οποίος χαρακτηρίζεται χρόνια φλεγμονή. Η χρόνια φλεγμονή μπορεί να εκδηλωθεί αμέσως μετά την οξεία, καθώς και να εμφανιστεί εκ νέου.

Αν και φυσιολογικά, η φλεγμονή έχει προστατευτικό ρόλο, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να αποτελέσει και την αιτία της ασθένειας, οδηγώντας σε έντονη βλάβη. Ακόμη, είναι πιθανό η αναποτελεσματικότητα της φλεγμονής να είναι υπεύθυνη για την πρόκληση σοβαρών ασθενειών. Η πολύ μικρή ενεργοποίηση της φλεγμονής, η οποία τυπικά εκδηλώνεται ως αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, προκαλείται συνήθως από το μειωμένο αριθμό λευκοκυττάρων, εξαιτίας της αντικατάστασης του μυελού των οστών από καρκινικά κύτταρα [9] και της καταστολής του μυελού από αντικαρκινικές θεραπείας και απόρριψη μοσχεύματος [10]. Είναι λογικό, επομένως, αφού τα λευκοκύτταρα προκύπτουν από προγονικά κύτταρα στο μυελό των οστών, οποιαδήποτε δυσλειτουργία του μυελού, να οδηγεί σε μείωση των ώριμων λευκοκυττάρων.

Η αντίδραση της φλεγμονής ολοκληρώνεται όταν ο επιβλαβής παράγοντας εξαλείφεται. Η λήξη της φλεγμονής οφείλεται στη διάσπαση και τη διάχυση των μεσολαβητών, καθώς και στο μικρό χρόνο ζωής των λευκοκυττάρων στους ιστούς. Αφού επιτευχθεί ο σκοπός της φλεγμονής, ξεκινά η διαδικασία της επιδιόρθωσης του πληγέντος ιστού [3]. Σε αυτό το στάδιο, ο ιστός αντικαθίσταται μέσω αναγέννησης των κυττάρων που έχουν επιβιώσει και αναπλήρωση των απολεσθέντων τμημάτων με συνδετικό ιστό (σχηματισμός ουλής).

1.2Κύτταρα φλεγμονής

Μακροφάγα/Μονοκύτταρα

Τα μονοκύτταρα αναγνωρίζονται ως τα πιο ενεργητικά κύτταρα της ανοσίας [11]. Εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς [12]. Τα μονοκύτταρα παίζουν κεντρικό ρόλο, καθώς αλληλεπιδρούν με κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, όπως τα Τ και τα Β λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK)[13]. Κατά τη διάρκεια των φλεγμονωδών αντιδράσεων, τα προγονικά κύτταρα στο μυελό των οστών παράγουν μονοκύτταρα, τα οποία εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία, μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η είσοδος των μονοκυττάρων του αίματος στους ιστούς ελέγχεται από τους ίδιους παράγοντες που εμπλέκονται στην μετανάστευση των ουδετερόφιλων, όπως τα μόρια προσκόλλησης και οι χημειοκίνες. Τα προϊόντα των ενεργοποιημένων μακροφάγων μειώνουν τους επιβλαβείς παράγοντες, όπως τα μικρόβια και εκκινούν τη διαδικασία της επιδιόρθωσης, αλλά είναι και υπεύθυνα για ένα μεγάλο μέρος της ιστικής βλάβης στη χρόνια φλεγμονή.

Οι βασικές λειτουργίες των μακροφάγων είναι η έκκριση μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως κυτταροκίνες και εικοσανοειδή, καθώς και η παρουσίαση αντιγόνων στα Τ λεμφοκύτταρα και η απόκριση σε σηματοδοτικά μηνύματα από τα Τ λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση αυτή με τα Τ λεμφοκύτταρα δημιουργεί έναν βρόχο ανατροφοδότησης, ο οποίος είναι απαραίτητος στις κυτταρομεσολαβούμενες ανοσοαποκρίσεις για την άμυνα έναντι πολλών μικροβίων [14].

Λεμφοκύτταρα

Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από μικρόβια και άλλα περιβαλλοντικά αντιγόνα. Αν και η φυσιολογική λειτουργία αυτών των κυττάρων είναι να δρουν ως μεσολαβητές της προσαρμοστικής ανοσίας και να εξασφαλίζουν την άμυνα εναντίον μολυσματικών παθογόνων, παίζουν συχνά σημαντικό ρόλο και στη χρόνια φλεγμονή και όταν ενεργοποιούνται, η φλεγμονώδης απόκριση τείνει να γίνει πιο επίμονη και σοβαρή.

Μια ειδική κατηγορία Τ λεμφοκυττάρων είναι τα $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα. Λόγω της ικανότητάς τους να εκκρίνουν κυτταροκίνες, τα $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα προωθούν τη φλεγμονή και επηρεάζουν τη φύση της φλεγμονώδους απόκρισης. Αυτή η κατηγορία Τ κυττάρων ενισχύουν σε μεγάλο βαθμό την πρώιμη φλεγμονώδη απόκριση, η οποία επάγεται από την αναγνώριση μικροβίων και νεκρών κυττάρων, ως μέρος της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Έχουν βρεθεί τρεις υποκατηγορίες $CD4^+$ Τ κυττάρων, βάσει της έκκρισης διαφορετικών κυτταροκινών και της επαγωγής διαφορετικών τύπων φλεγμονής: 1) TH1 κύτταρα που παράγουν την κυτταροκίνη Ιντερφερόνη-γ, η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα μέσω του κλασσικού μονοπατιού, 2) TH2 κύτταρα που εκκρίνουν Ιντερλευκίνη 4, 5 και 13, οι οποίες στρατολογούν και ενεργοποιούν εωσινόφιλα και είναι υπεύθυνες για το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης των μακροφάγων και 3) TH17 κύτταρα που εκκρίνουν Ιντερελευκίνη 17 και άλλες κυτταροκκίνες, οι οποίες επάγουν την έκκριση χημειοκινών που ευθύνονται για τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων στην αντίδραση [15].

Εωσινόφιλα

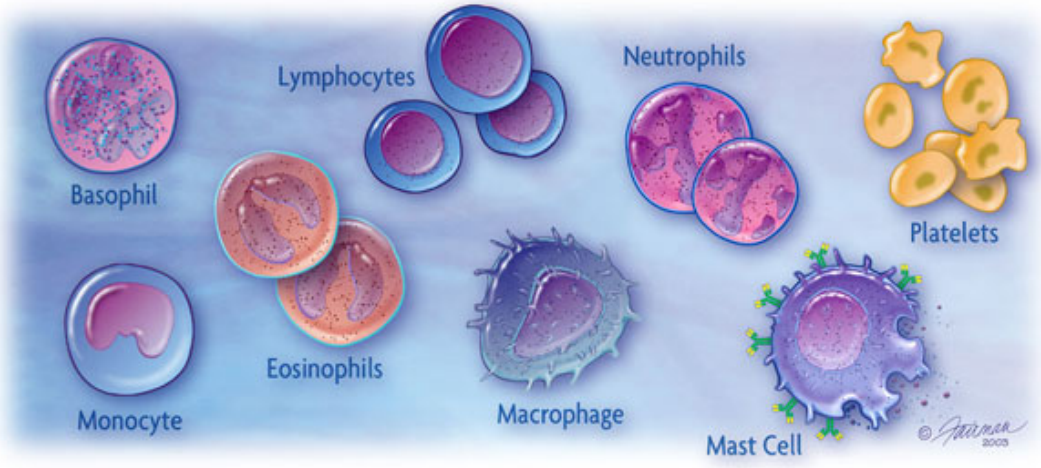
Τα εωσινόφιλα βρίσκονται σε αφθονία στις αντιδράσεις του ανοσολογικού συστήματος που μεσολαβούνται από IgE αντισώματα, στις παρασιτικές μολύνσεις. Η στρατολόγησή τους επάγεται από μόρια προσκόλλησης, παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται από ουδετερόφιλα και από συγκεκριμένες χημειοκίνες, οι οποίες προέρχονται από λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα εωσινόφιλα διαθέτουν κοκκία, τα οποία περιέχουν μια εξαιρετικά κατιονική πρωτεΐνη, η οποία είναι τοξική για τα παράσιτα, αλλά τραυματίζει και τα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Για τον παραπάνω λόγο, τα εωσινόφιλα συμβάλλουν στον έλεγχο των παρασιτικών μολύνσεων. Ωστόσο, συμμετέχουν και στην βλάβη των ιστών σε ανοσολογικές αντιδράσεις, όπως οι αλλεργίες [16].

Μαστοκύτταρα

Τα μαστοκύτταρα είναι ευρέως κατανεμημένα σε συνδετικούς ιστούς και συμμετέχουν τόσο στην οξεία, όσο και στη χρόνια φλεγμονή. Τα μαστοκύτταρα προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα στο μυελό των οστών και εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τα βασεόφιλα της κυκλοφορίας [17]. Ακόμη, σημαντική είναι η συμμετοχή των μαστοκυττάρων στην ανοσολογική απόκριση της αλλεργίας [18]. Στην επιφάνειά τους εκφράζεται ο υποδοχέας FceRI, στον οποίο προσδένεται το τμήμα Fc των IgE αντισωμάτων, ενώ εκκρίνεται μια πληθώρα κυτταροκινών, οι οποίες προωθούν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις [19].

Ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα αποτελούν την πρώτη ομάδα κυττάρων που στρατολογείται κατά τη φλεγμονή. Παρόλο που τα ουδετερόφιλα χαρακτηρίζουν την οξεία φλεγμονή, πολλοί τύποι χρόνιας φλεγμονής, οι οποίοι διαρκούν για μήνες, έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό ουδετερόφιλων [20]. Η ύπαρξη των ουδετερόφιλων στις παραπάνω αντιδράσεις επάγεται είτε από μικρόβια που εμμένουν, είτε από κυτταροκίνες και άλλους μεσολαβητές που παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και Τ λεμφοκύτταρα [21].



Εικόνα 2.Κύτταρα φλεγμονής
http://www.gluegrant.org/immunecells.htm

1.3 Αναγνώριση μικροβίων και κατεστραμμένων κυττάρων

Το πρώτο βήμα για την εκδήλωση της φλεγμονώδους απόκρισης είναι η αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών ή των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Η αναγνώριση αυτή μεσολαβείται από διάφορα μόρια που βρίσκονται είτε εκτός είτε εντός του κυττάρου. Η ανίχνευση της παρουσίας βλαβερών παθογόνων μπορεί να γίνει από υποδοχείς που εκφράζονται σε φαγοκύτταρα, δενδριτικά και άλλα κύτταρα. Η πιο καλά μελετημένη κατηγορία τέτοιων υποδοχέων είναι η οικογένεια των υποδοχέων Toll-like (Toll-like receptors, TLRs), οι οποίοι πήραν το όνομά τους από το γονίδιο Toll που ανακαλύφθηκε στη Drosophila. Οι υποδοχείς TLR εντοπίζονται στις πλασματικές μεμβράνες και στα ενδοσώματα και είναι ικανοί να ανιχνεύουν εξωκυτταρικά μικρόβια ή μικρόβια που προέρχονται από κατάποση [22]. Οι παραπάνω υποδοχείς αναγνωρίζουν μοτίβα κοινά σε πολλούς μικροοργανισμούς, τα οποία συχνά ονομάζονται μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [6].

Οι κυτταρικές βλάβες γίνονται αντιληπτές από διάφορα μόρια που δρουν ως αισθητήρες. Όλα τα κύτταρα διαθέτουν κυτταροπλασματικούς υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν μόρια που απελευθερώνονται ή μεταβάλλονται ως συνέπεια της κυτταρικής βλάβης και για το λόγο αυτό ονομάζονται μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβες (damage-associated molecular patterns, DAMPs) [6]. Στα μόρια αυτά περιλαμβάνονται το ουρικό οξύ, το ATP, η μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση K^+, το DNA (όταν απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, αντί να βρίσκεται στον πυρήνα) και πολλά άλλα. Οι υποδοχείς ενεργοποιούν ένα κυτταροπλασματικό σύμπλοκο, το οποίο ονομάζεται φλεγμονώσωμα και επάγει την παραγωγή μια κυτταροκίνης, της Ιντερλευκίνης-1, η οποία στρατολογεί λευκοκύτταρα. Τέλος, ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος αναγνωρίζουν

παθογόνα και δρουν καταστρέφοντας μικρόβια που μεταδίδονται μέσω του αίματος και επάγοντας τη φλεγμονή στα σημεία μόλυνσης του ιστού. Το σύστημα του συμπληρώματος, είναι εξαιρετικής σημασίας για τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, αφού δρα ενάντια μικροβίων και παράγει μεσολαβητές της φλεγμονής [14].

1.4 Οργάνωση μικροαγγειακού συστήματος

Το αγγειακό σύστημα αποτελείται από δύο κλειστούς βρόχους, το συστημικό και τον πνευμονικό. Οι μεγάλες ελαστικές αρτηρίες που ξεκινούν από την καρδιά καταλήγουν σε μικρότερες μυϊκές αρτηρίες, οι οποίες μεταφέρουν αίμα σε συγκεκριμένα όργανα. Τα αρτηρίδια, τα πιο κοντινά τμήματα του μικροαγγειακού ιστού, είναι εσωτερικά επενδεδυμένα με μία μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με στενούς συνδέσμους και περιβάλλονται από στρώματα λείων μυϊκών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαχωρίζονται από τα στρώματα των λείων μυϊκών κυττάρων με ένα συμπυκνωμένο στρώμα εξωκυτταρικής μήτρας, η οποία είναι εμπλουτισμένη με κολλαγόνο τύπου IV και λαμινίνη, γνωστή και ως βασική μεμβράνη. Βαθιά στη βασική μεμβράνη, ο διαχωρισμός γίνεται από μια παχιά λωρίδα συνδετικού ιστού, εμπλουτισμένη με ίνες ελαστίνης, η οποία είναι γνωστή και ως εσωτερικός ελαστικός υμένας.

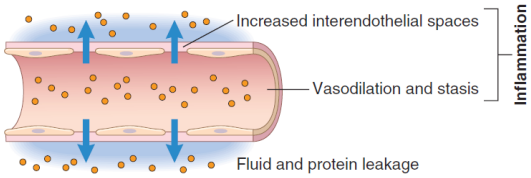
Στο πιο απομακρυσμένο τους άκρο, τα αρτηρίδια διακλαδίζονται περαιτέρω σε τριχοειδή αγγεία [23,24]. Η δομή των τριχοειδών αγγείων ποικίλει από ιστό σε ιστό, διατηρώντας ως κοινό χαρακτηριστικό τον σχηματισμό τους από μια μονή στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, καθένα από τα οποία καμπυλώνει, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας σωληνοειδής αυλός, με διάμετρο μικρότερη από 10 mm [25]. Οι πρωτεϊνες μπορούν να περάσουν είτε μέσω των συνδέσμων που βρίσκονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών (παρακυτταρική μεταφορά), είτε μέσω των ίδιων των ενδοθηλιακών κυττάρων (διακυτταρική μεταφορά μέσω κυστιδίων, καναλιών).

Τα τριχοειδή που έχουν μικρή διαπερατότητα, όπως αυτά του κεντρικού νευρικού συστήματος, σχηματίζουν πολλούς περισσότερους στενούς συνδέσμους ανάμεσα στα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, σε σχέση με άλλα τριχοειδή. Με αυτό τον τρόπο, περιορίζουν τη διέλευση πρωτεϊνών, ενώ, λόγω της έλλειψης καναλιών, όλες οι ανταλλαγές ουσιών γίνονται μέσω ενός περιορισμένου συστήματος κυστιδίων. Τα τριχοειδή επενδύονται και υποστηρίζονται από ένα μονό, ασυνεχές στρώμα συμπαγών κυττάρων, τα οποία είναι γνωστά ως περικύτταρα [26], καθένα από τα οποία μπορεί να είναι σε επαφή με πολλά ενδοθηλιακά κύτταρα. Στο τελικό τους άκρο, τα τριχοειδή,

συγκλίνουν και αφήνουν το περιεχόμενό τους σε αγγεία μεγαλύτερης διαμέτρου, γνωστά ως φλεβίδια [27]. Τα φλεβίδια αυτά, συγκλίνουν περαιτέρω σε μεγαλύτερα αγγεία συλλογής, τα οποία τελικά συνδέουν το μικροαγγειακό σύστημα με τις φλέβες και αυτές, με τη σειρά τους, απορροφούν το αίμα από τα όργανα και το επαναδιοχετεύουν στην καρδιά.

1.5 Φλεγμονή σε επίπεδο αγγείου

Οι αγγειακές αντιδράσεις κατά την οξεία φλεγμονή περιλαμβάνουν αλλαγές στη ροή του αίματος και τη διαπερατότητα των αγγείων, με στόχο την μεγιστοποίηση της κινητικότητας των πρωτεϊνών και των λευκοκυττάρων του πλάσματος, έτσι ώστε να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία και να προσεγγίσουν το σημείο της μόλυνσης ή της βλάβης. Η διαφυγή πρωτεϊνών και κυττάρων του αίματος από το αγγειακό σύστημα προς τους ενδιάμεσους ιστούς ή τις κοιλότητες του σώματος είναι γνωστή ως εξίδρωμα (ή έκχυση). Το εξίδρωμα είναι ένα εξωαγγειακό υγρό, το οποίο έχει υψηλή συγκέντρωση σε πρωτεΐνες και περιέχει κυτταρικά υπολείμματα. Αντιθέτως, το διίδρωμα είναι ένα υγρό με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίγα ή καθόλου κυτταρικά υλικά. Το οίδημα υποδηλώνει μια υπερβολή υγρών στους ενδιάμεσους ιστούς ή σε κοιλότητες που περιέχουν ορό και μπορεί να είναι είτε εξίδρωμα είτε διίδρωμα [14].



Εικόνα 3. Εξίδρωμα

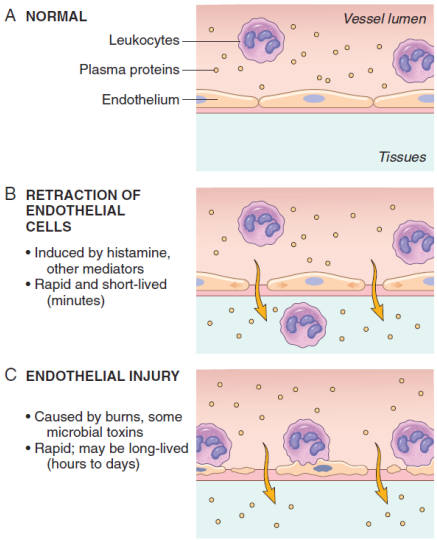
1.5.1 Αλλαγές στην αγγειακή ροή και διάμετρο

Αμέσως μετά τη βλάβη ενός ιστού πυροδοτούνται αλλαγές στα αιμοφόρα αγγεία, ξεκινώντας με την αγγειοδιαστολή, η οποία επάγεται από τη δράση ορισμένων μεσολαβητών, όπως η ισταμίνη, στους λείους μύες των αγγείων. Η αγγειοδιαστολή αρχικά ξεκινά από τα αρτηρίδια και στη συνέχεια, οδηγεί στο άνοιγμα νέων αγγειακών στρωμάτων στην περιοχή. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η αύξηση της αιματικής ροής, η οποία αποτελεί αιτία της θερμότητας και της ευθρότητας στο σημείο της φλεγμονής. Η αγγειοδιαστολή ακολουθείται από αύξηση της διαπερατότητας του μικροαγγειακού συστήματος, με έκχυση ενός υγρού πλούσιου σε πρωτεΐνες προς του εξωαγγειακούς ιστούς [23]. Η απώλεια υγρού και η αυξημένη αγγειακή διάμετρος οδηγούν

σε μείωση της ροής του αίματος, της συγκέντρωσης των ερυθροκυττάρων στα μικρά αγγεία και αύξηση του ιξώδους του αίματος. Αυτές οι μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα τη στάση της αιματικής ροής και συμφόρηση των μικρών αγγείων, τα οποία έχουν μπλοκαριστεί από ερυθρά αιμοσφαίρια που κινούνται αργά. Και τα δύο αυτά αποτελέσματα γίνονται αντιληπτά ιστολογικά ως αγγειακή συμφόρηση και εξωτερικά ως τοπική ερυθρότητα του εμπλεκόμενου ιστού. Καθώς αναπτύσσεται η στάση του αίματος, προκαλείται συσσώρευση λευκών αιμοσφαιρίων και κυρίως, ουδετερόφιλων, στο ενδοθήλιο των αγγείων. Ταυτόχρονα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από μεσολαβητές, οι οποίοι παράγονται στα σημεία της μόλυνσης και της ιστικής βλάβης και επάγουν την έκφραση υψηλών επιπέδων μορίων προσκόλλησης. Τα λευκοκύτταρα, ακολούθως, προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και πολύ σύντομα, μεταναστεύουν προς τους ενδιάμεσους ιστούς, μέσω του αγγειακού τοιχώματος [28].

1.5.2 Αλλαγές στην αγγειακή διαπερατότητα

Οι αλλαγές στη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων προκύπτουν από τρεις, κυρίως, μηχανισμούς. Ένας βασικός μηχανισμός είναι η συστολή των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία οδηγεί στη διάνοιξη των διακυτταρικών χώρων. Η απόκριση αυτή επάγεται από την ισταμίνη, τη βραδυκινίνη, τα λευκοτριένια και άλλους χημικούς μεσολαβητές [23]. Πραγματοποιείται άμεσα, έπειτα από έκθεση στο μεσολαβητή (μέσα σε 15 έως 30 λεπτά) και έχει μικρή διάρκεια. Η ενδοθηλιακή βλάβη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη νέκρωση και την αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι ένας επιπλέον μηχανισμός μεταβολής της αγγειακής διαπερατότητας. Η άμεση καταστροφή του ενδοθηλίου συναντάται σε σοβαρούς τραυματισμούς, όπως τα εγκαύματα ή επάγεται από δράσεις των μικροβίων και των μικροβιακών τοξινών που στοχεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ουδετερόφιλα που προσκολλώνται στο ενδοθήλιο κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, είναι πιθανό να τραυματίσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και έτσι, να ενεργοποιήσουν το μηχανισμό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η διαρροή ξεκινά κατευθείαν μετά τον τραυματισμό και διατηρείται για μερικές ώρες, μέχρι να ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση ή η θρόμβωση των αγγείων [14]. Τέλος, η αυξημένη μεταφορά υγρών και πρωτεϊνών διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα ενός μηχανισμού που ονομάζεται διακυττάρωση [29]. Η διαδικασία αυτή είναι πιθανό να περιλαμβάνει τη διάνοιξη ενδοκυτταρικών καναλιών ως απόκριση σε συγκεκριμένους παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF), οι οποίοι προάγουν την αγγειακή διαρροή.



Εικόνα 4. Μεταβολές αγγειακής διαπερατότητας

1.5.3 Διατήρηση αιματικής ροής

Οι βασικές αρμοδιότητες των αρτηριδίων είναι ο έλεγχος της πίεσης, της ροής και της διανομής θρεπτικών συστατικών στα τριχοειδή αγγεία. Καθώς αυξάνεται η πίεση στα εγγύς αρτηρίδια, κατά την καρδιακή συστολή, τα απομακρυσμένα αρτηρίδια θα αγγειοσυσταλλούν, προκειμένου να περιορίσουν την πίεση και τη ροή στην μικροκυκλοφορία, μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται μυογενής αγγειοσυστολή. Αυτή η εσωτερική απόκριση των λείων μυών είναι άκρως σημαντική για τη διατήρηση σταθερής ροής προς ζωτικά όργανα, όπως ο εγκέφαλος, οι νεφροί και η καρδιά. Εκτός από τη μυογενή αγγειοσυστολή στα αρτηρίδια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στη ροή και να απελευθερώσουν μόρια, όπως NO, λιπιδικούς μεταβολίτες και άλλους μεσολαβητές, με σκοπό την αύξηση ή τη μείωση της διαμέτρου των αγγείων. Κατά την οξεία φλεγμονή, οι μεσολαβητές που προέρχονται από λευκοκύτταρα, όπως η ισταμίνη και η βραδυκινίνη, θα προκαλέσουν αρτηριακή διαστολή, αυξάνοντας την αιματική ροή και οδηγώντας, τελικά, σε ερυθρότητα. [23].

1.5.4 Τριχοειδή αγγεία-Στρατολόγηση λευκοκυττάρων

Κατά την ηρεμία, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων δεν μπορούν να στρατολογήσουν λευκοκύτταρα, κυρίως λόγω της απουσίας μορίων που μπορούν να δεσμεύσουν αυτά τα κύτταρα από την κυκλοφορία. Κατά τον ίδιο τρόπο, στερούνται χημειοκινών που ενεργοποιούν τα λευκοκύτταρα [30]. Αλλαγές στα φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγούν σε μεταβολές των παραπάνω κυττάρων, έτσι ώστε να πυροδοτηθεί η φλεγμονή. Αυτές οι αλλαγές είναι γνωστές ως ενεργοποίηση τύπου I ή/και τύπου II [31].

Πολλοί μεσολαβητές της τύπου Ι ενεργοποίησης, όπως η ισταμίνη, ενεργοποιούν καταρράκτες σηματοδότησης μέσω υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεϊνες. Οι υποδοχείς ισταμίνης εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα, σε σχέση με αυτά των αρτηριδίων ή των τριχοειδών [32]. Οι αποκρίσεις των φλεβικών ενδοθηλιακών κυττάρων στην ισταμίνη περιλαμβάνουν: α)παροδική συστολή των επιθηλιακών κυττάρων και δημιουργία διακυτταρικών χασμάτων, μέσω των οποίων ευνοείται η παρακυτταρική διαφυγή των πρωτεϊνών του πλάσματος [29], β)ρυθμιζόμενη εξωκυττάρωση των περιεχομένων των σωματίων Weibel-Palade (WPB), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μορίων, όπως ο παράγοντας von Willebrand (vWf), η σελεκτίνη και ορισμένες αποθηκευμένες χημειοκίνες, στην επιφάνεια των κυττάρων του αυλού και γ)σύνθεση μεσολαβητών λιπιδικής φύσης, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor) [28].

Το παρατεταμένης διάρκειας οίδημα του ιστού και η έντονη στρατολόγηση λευκοκυττάρων εξαρτώνται από την ενεργοποίηση τύπου ΙΙ των φλεβικών ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία μεσολαβείται από κυτταροκίνες της φλεγμονής. Παραδείγματα τέτοιων κυτταροκινών είναι η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τόσο τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1R1), όσο και τον υποδοχέα 1 του TNF (TNFR1) [33]. Η πρόσδεση, είτε της IL-1 είτε του TNF σε αυτούς τους υποδοχείς, ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες, αυξάνοντας έτσι την έκφραση mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύουν και ενεργοποιούν λευκοκύτταρα [31].

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την IL-1, ενεργοποιούνται επίσης και από υποδοχείς τύπου Toll (Toll-Like Receptors), με εξαίρεση τον TLR3. Επίσης, τα ανθρώπινα φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, και TLR9 και επομένως, σύνδεση αυτών των υποδοχέων με τους κατάλληλους προσδέτες, μοριακά πρότυπα που σχετίζονται συνήθως με κάποιο παθογόνο ή με κυτταρική βλάβη, μπορούν να προκαλέσουν αποκρίσεις της τύπου ΙΙ ενεργοποίησης [34].

1.5.5 Προσκόλληση Λευκοκυττάρων

Όταν το αίμα ρέει από τα τριχοειδή προς τα μετατριχοειδή φλεβίδια, τα κύτταρα της κυκλοφορίας παρασύρονται από την επιφανειακή ροή προς το αγγειακό τοίχωμα. Τα ερυθροκύτταρα, όντας μικρότερα σε μέγεθος, τείνουν να κινούνται ταχύτερα σε σχέση με τα μεγαλύτερα λευκοκύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ερυθροκύτταρα να περιορίζονται στην κεντρική αξονική στήλη, ενώ τα λευκοκύτταρα να ωθούνται προς το τοίχωμα του αγγείου. Ωστόσο, η ροή παρεμποδίζει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Καθώς η αιματική ροή επιβραδύνεται νωρίς

κατά τη φλεγμονή, οι αιμοδυναμικές συνθήκες μεταβάλλονται και περισσότερα λευκά αιμοσφαίρια καταλαμβάνουν μια περιφερική θέση κατά μήκος της ενδοθηλιακής επιφάνειας. Αυτή η διαδικασία της ανακατανομής των λευκοκυττάρων ονομάζεται περιθωριοποίηση. Στην περίπτωση που τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιηθούν από κυτταροκίνες και παραχθούν τοπικά άλλοι μεσολαβητές, εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, στα οποία γίνεται χαλαρή πρόσδεση των λευκοκυττάρων. Τα κύτταρα, τελικά, θα επέλθουν σε μια κατάσταση ηρεμίας, κατά την οποία προσκολλώνται πολύ ισχυρά στο ενδοθήλιο [35].

Υπάρχουν δύο βασικές οικογένειες μορίων, οι οποίες εμπλέκονται στην προσκόλληση και τη μετανάστευση, οι σελεκτίνες [36] και οι ιντεγκρίνες [37]. Τα μόρια αυτά εκφράζονται στα λευκοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως και οι υποδοχείς τους. Οι σελεκτίνες μεσολαβούν τις αρχικές ανίσχυρες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευκοκυττάρων και του ενδοθηλίου. Πρόκειται για υποδοχείς που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και περιλαμβάνουν μια εξωκυττάρια επικράτεια, η οποία προσδένει σάκχαρα. Η οικογένεια των σελεκτινών απαρτίζεται από τρία μέλη, την Ε-σελεκτίνη, η οποία εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, την Ρ-σελεκτίνη, η οποία εντοπίζεται σε αιμοπετάλια και στο ενδοθήλιο και την L-σελεκτίνη, η οποία υπάρχει στην επιφάνεια των περισσότερων λευκοκυττάρων [38]. Όταν το ενδοθήλιο είναι ανενεργό, οι σελεκτίνες εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα ή καθόλου, ενώ η έκφρασή τους ρυθμίζεται ανοδικά ύστερα από σηματοδότηση μέσω κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών [39]. Επομένως, η πρόσδεση των λευκοκυττάρων περιορίζεται μόνο σε σημείο που έχουν υποστεί βλάβη ή μόλυνση.

Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων που μεσολαβούνται από σελεκτίνες είναι χαμηλής συγγένειας με γρήγορο ρυθμό απενεργοποίησης και διαταράσσονται εύκολα από το αίμα που ρέει. Συνεπώς, τα προσκολλημένα λευκοκύτταρα, συνδέονται, αποκολλώνται και επανασυνδέονται, με αποτέλεσμα να ολισθαίνουν κατά μήκος της επιφάνειας του ενδοθηλίου. Αυτές οι αδύναμες αλληλεπιδράσεις ολίσθησης επιβραδύνουν τα λευκοκύτταρα και τους δίνουν τη δυνατότητα να αναγνωρίσουν κι άλλα μόρια προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων [40].

Η ισχυρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο επιτυγχάνεται χάρις σε μια οικογένεια πρωτεϊνών επιφανείας, οι οποίες ονομάζονται ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες δύο αλυσίδων, οι οποίες μεσολαβούν την προσκόλληση τόσο των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, όσο και ποικίλων κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα. Φυσιολογικά εκφράζονται στις πλασματικές μεμβράνες των λευκοκυττάρων, σε μια μορφή χαμηλής συνάφειας και δεν προσδένονται με τους ειδικούς προσδέτες τους μέχρι να γίνει ενεργοποίηση των

λευκοκυττάρων από χημειοκίνες. Όταν τα ολισθαίνοντα λευκοκύτταρα συναντούν τις χημειοκίνες που υπάρχουν στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται και οι ιντεγκρίνες τους υφίστανται μετασχηματιστικές αλλαγές και συσσωματώνονται, μεταπίπτοντας έτσι σε μια μορφή υψηλής συνάφειας. Η επαγωγή της έκφρασης των υποδοχέων των ιντεγκρινών στο ενδοθήλιο από τις κυτταροκίνες, σε συνδυασμό με την αυξημένη συγγένεια των ιντεγκρινών στα λευκοκύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή πρόσδεση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, στο σημείο της φλεγμονής. Τα λευκοκύτταρα παύουν να ολισθαίνουν και η σύνδεση των ιντεγκρινών με τους προσδέτες τους σηματοδοτεί την έναρξη κυτταροσκελετικών αλλαγών που ακινητοποιούν τα λευκοκύτταρα και τα προσκολλούν ισχυρά στο ενδοθήλιο [14,37].

1.6 Μεσολαβητές της φλεγμονής

Στους πιο σημαντικούς μεσολαβητές της φλεγμονής περιλαμβάνονται βιοδραστικές αμίνες, λιποειδικοί μεσολαβητές, κυτταροκίνες [41], καθώς και προϊόντα ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Οι μεσολαβητές μπορεί να παραχθούν τοπικά από κύτταρα στο σημείο της φλεγμονής, ή μπορεί να προέρχονται από ανενεργά πρόδρομα μόρια της κυκλοφορίας, τα οποία ενεργοποιούνται στο σημείο της φλεγμονής. Οι μεσολαβητές που παράγονται από κύτταρα απελευθερώνονται γρήγορα από ενδοκυτταρικά κοκκία ή συντίθενται εκ νέου, ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα. Οι βασικοί τύποι κυττάρων που παράγουν μεσολαβητές οξείας φλεγμονής είναι τα μακροφάγα, τα μαστοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Ωστόσο, κάποιοι μεσολαβητές μπορούν να παραχθούν και από αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα [14].

Οι μεσολαβητές που προέρχονται από το πλάσμα εντοπίζονται στην κυκλοφορία ως ανενεργά πρόδρομα μόρια, τα οποία πρέπει να διασπαστούν, συνήθως μέσω μιας σειράς πρωτεολυτικών πέψεων, προκειμένου να αποκτήσουν τις βιολογικές τους ιδιότητες. Παράγονται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και δρουν εναντίον μικροβίων της κυκλοφορίας, ενώ μπορούν να στρατολογηθούν και σε ιστούς. Οι ενεργοί μεσολαβητές σχηματίζονται μόνο ως απόκριση σε διάφορα μόρια που επάγουν τη φλεγμονή, όπως μικροβιακά προϊόντα και ουσίες που απελευθερώνονται από νεκρά κύτταρα. Ένας μεσολαβητής είναι πιθανό να επάγει την απελευθέρωση άλλων μεσολαβητών. Οι δευτερογενείς μεσολαβητές μπορεί να έχουν ίδια ή αντίθετη δράση από τον πρωτογενή μεσολαβητή. Τα περισσότερα μόρια-μεσολαβητές έχουν μικρή διάρκεια ζωής [41].

1.6.1 Αγγειοδραστικές αμίνες

Οι δύο βασικές αγγειοδραστικές αμίνες είναι η ισταμίνη και η σεροτονίνη. Οι δύο αυτές αμίνες είναι αποθηκευμένες στα κύτταρα ως προσχηματισμένα μόρια και γι’ αυτό το λόγο είναι από

τους πρώτους μεσολαβητές που απελευθερώνονται κατά τη φλεγμονή. Πλούσιες πηγές ισταμίνης αποτελούν τα μαστοκύτταρα, τα οποία είναι φυσιολογικά εντοπίζονται στο συνδετικό ιστό που είναι δίπλα στα αιμοφόρα αγγεία. Ισταμίνη υπάρχει, επίσης, σε βασεόφιλα και αιμοπετάλια. Κατά κύριο λόγο, είναι αποθηκευμένη σε κοκκία των μαστοκυττάρων και απελευθερώνεται ως απόκριση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων. Στα ερεθίσματα αυτά περιλαμβάνονται φυσικές βλάβες, όπως το τραύμα, το κρύο ή η ζέστη, η πρόσδεση αντισωμάτων σε μαστοκύτταρα, καθώς και προϊόντα του συμπληρώματος, τα οποία ονομάζονται αναφυλατοξίνες. Η ισταμίνη θεωρείται ο βασικός μεσολαβητής της παροδικής φάσης της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, παράγοντας διενδοθηλιακά κενά στα τριχοειδή αγγεία. Η σεροτονίνη είναι ένας προσχηματισμένος αγγειοδραστικός μεσολαβητής, ο οποίος υπάρχει στα αιμοπετάλια και σε ορισμένα νευροενδοκρινικά κύτταρα, όπως αυτά που βρίσκονται στη γαστρεντερική οδό. Η πρωταρχική της λειτουργία είναι να δρα ως νευροδιαβιβαστής στη γαστρεντερική οδό [8,14].

1.6.2 Κυτταροκίνες φλεγμονής

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από πολλούς κυτταρικούς τύπους (κυρίως ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, αλλά και από ενδοθηλιακά και από κύτταρα του συνδετικού ιστού), των οποίων ο ρόλος είναι να ρυθμίζουν την ανοσία και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Κατά σύμβαση, οι αυξητικοί παράγοντες που επιδρούν στα επιθηλιακά και στα μεσεγχυματικά κύτταρα δεν συγκαταλέγονται στις κυτταροκίνες.

Οι κυτταροκίνες μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με τη φύση της ανοσολογικής απόκρισης (Πίνακας 1), καθώς και ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και την τοπολογία (Πίνακας 2). Από το σύνολο των κυτταροκινών, αξιοσημείωτος είναι ο ρόλος των IL-1, IL-6 και TNFα.

Πίνακας 1. Διάκριση κυτταροκινών βάσει ανοσολογικής απόκρισης [42]

Τύπος ανοσολογικής απόκρισης	Υπεροικογένεια	Κυτταροκίνες
Προσαρμοστική ανοσία	Common γ chain receptor ligands Common β chain (CD131) receptor ligands Shared IL-2β chain (CD122) Shared receptors	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 IL-3, IL-5, GM-CSF IL-2, IL-15 IL-13 (IL-13R–IL-4R complex) TSLP (TSLPR–IL-7R complex)
Προ-φλεγμονώδης σηματοδότηση	IL-1 IL-6 TNF IL-17 IFN τύπου I IFN τύπου II IFN τύπου III	IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β, IL-36γ, IL-36Ra, IL-37 και IL-1Hγ2 IL-6, IL-11, IL-31, CNTF, CT-1, LIF, OPN, OSM TNFα, TNFβ, BAFF, APRIL IL-17A-F, IL-25 (IL-17E) IFNα, IFNβ, IFNω, IFNκ, Limitin IFNγ IFNλ1 (IL-29), IFNλ2 (IL-28A), IFNλ3 (IL-28B)
Αντι-φλεγμονώδης σηματοδότηση	IL-12 IL-10	IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29

Πίνακας 2. Ανοσολογική προέλευση και δράση κυτταροκινών [42]

Κυτταροκίνη	Ανοσολογική προέλευση	Κύρια κύτταρα-στόχοι	Κύρια δράση
IL-1α IL-1β	μακροφάγα, Β κύτταρα, LGL	Τ κύτταρα, Β κύτταρα, μακροφάγα, ενδοθήλιο, κύτταρα ιστών	ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων, διέγερση μακροφάγων, αύξηση προσκόλλησης Τ λεμφοκυττάρων/ενδοθηλίου, πυρετός, πρωτεΐνες οξείας φάσης
IL-2	Τ κύτταρα	Τ κύτταρα	πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση Τ κυττάρων, ενεργοποίηση τοξικών λεμφοκυττάρων και μακροφάγων
IL-3	Τ κύτταρα	-	multilineage παράγοντας διέγερσης αποικιών
IL-4	Τ κύτταρα	Τ κύτταρα, Β κύτταρα	παράγοντας ανάπτυξης Β κυττάρων, επιλογή ισοτύπου, IgE, IgG1
IL-5	Τ κύτταρα	Β κύτταρα	ανάπτυξη και διαφοροποίηση Β κυττάρων, IgA επιλογή
IL-6	Τ κύτταρα, Β κύτταρα	Β κύτταρα, ηπατοκύτταρα	διαφοροποίηση Β κυττάρων, επαγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης

Κυτταροκίνη	Ανοσολογική προέλευση	Κύρια κύτταρα-στόχοι	Κύρια δράση
IL-7	-	προ-Β κύτταρα, Τ κύτταρα	πολλαπλασιασμός Β και Τ κυττάρων
IL-8	μονοκύτταρα	ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, Τ κύτταρα, κερατινοκύτταρα	χημειοταξία, αγγειογένεση, απελευθέρωση υπεροξειδίων, απελευθέρωση κοκκίων
IL-9	Τ κύτταρα	-	ενισχύει την επιβίωση των Τ κυττάρων, συνεργάζεται με την ερυθροποιητίνη
IL-10	Τ κύτταρα	Τ1 κύτταρα	αναστολή σύνθεσης κυτταροκινών
IL-11	-	αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, οστεοκλάστες	σχηματισμός οστεοκλαστών, παράγοντας διέγερσης αποικιών, αύξηση αριθμού αιμοπεταλίων in vivo, αναστέλλει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών
IL-12	-	Τ κύτταρα	επαγωγή των Τ1 κυττάρων
IL-13	Τ κύτταρα	μονοκύτταρα, Β κύτταρα	ανάπτυξη και διαφοροποίηση Β κυττάρων, αναστέλλει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών
IL-14	Τ κύτταρα	-	διεγείρει τον πολλαπλασιασμό ενεργοποιημένων Β κυττάρων, αναστέλλει την έκκριση Ig
IL-15	μονοκύτταρα	Τ κύτταρα, ενεργοποιημένα Β κύτταρα	πολλαπλασιασμός
IL-16	ηωσινόφιλα, $CD8^+$ Τ κύτταρα	$CD4^+$ Τ κύτταρα	χημειοελκτικό μόριο των $CD4^+$ Τ κυττάρων
IL-17	$CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα	επιθήλιο, ινοβλάστες, ενδοθήλιο	απελευθέρωση IL-6, IL-8, G-CSF, PGE_2, ενίσχυση ICAM-1, διεγείρει τους ινοβλάστες διατηρώντας τα $CD34^+$ προγονικά κύτταρα
IL-18	μακροφάγα	PBMC, συμπαράγοντας στην επαγωγή Τ1	επάγει την παραγωγή IFNγ, ενισχύει τη δράση των NK κυττάρων
IL-21	Τ κύτταρα	Τ κύτταρα, Β κύτταρα, ηωσινόφιλα, ηπατοκύτταρα	επάγει μόρια οξείας φάσης, αυξημένα επίπεδα μετά από LPS
IL-22	ενεργοποιημένα Τ κύτταρα	Τ2 κύτταρα	αναστέλλει την παραγωγή IL-4
TGFβ1	-	οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι	μειώνει το ρυθμό παραγωγής κυτταροκινών, προάγει την επούλωση πληγών και τον σχηματισμό ουλώδους ιστού, ανασταλτικό της αύξησης
TNFα	μακροφάγα, λεμφοκύτταρα	μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα,	ενεργοποίηση μακροφάγων, κοκκιοκυττάρων και κυτταροτοξικών

Κυτταροκίνη	Ανοσολογική προέλευση	Κύρια κύτταρα-στόχοι	Κύρια δράση
		κύτταρα ιστών	κυττάρων, προσκόλληση λευκοκυττάρων/ενδοθηλιακών κυττάρων, καχεξία, πυρετός, επαγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, διέγερση αγγειογένεσης
TNFβ	λεμφοκύτταρα	-	παρόμοια με TNFα
IFNα	λευκοκύτταρα	κύτταρα ιστών	αντι-ιική δράση, διέγερση των NK κυττάρων, αντι-πολλαπλασιαστικό μόριο, επαγωγή παραγωγής IL-12 και κυττάρων T1
IFNβ	ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα	κύτταρα ιστών, λευκοκύτταρα	αντι-ιική δράση, αντι-πολλαπλασιαστικό μόριο
IFNγ	T κύτταρα, NK κύτταρα	λευκοκύτταρα, κύτταρα ιστών, T2 κύτταρα	ενεργοποίηση μακροφάγων, αύξηση προσκόλλησης T ενδοθηλιακών κυττάρων/λεμφοκυττάρων, αντι-ιική δράση, αντι-πολλαπλασιαστικό μόριο
M-CSF	μονοκύτταρα	-	πολλαπλασιασμός πρόδρομων κυττάρων των μακροφάγων
G-CSF	μακροφάγα	προγονικά κύτταρα	διεγείρει τη διέγερση και τη διαφοροποίηση
GM-CSF	T κύτταρα, μακροφάγα	-	πολλαπλασιασμός πρόδρομων κυττάρων των μακροφάγων και των κοκκιοκυττάρων
MIF	T κύτταρα, μακροφάγα	Μακροφάγα	αναστολή της μετανάστευσης, ενεργοποίηση μακροφάγων, ενίσχυση της ενεργοποίησης των T κυττάρων

1.6.2.1 Ιντερλευκίνη-1

Η οικογένεια κυτταροκινών της Ιντερλευκίνης-1 (Interleukin-1, IL-1) περιλαμβάνει 11 μέλη : την Ιντερλευκίνη-1α (IL-1α), την Ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1, την Ιντερλευκίνη-18, την Ιντερλευκίνη-33, την Ιντερλευκίνη-36α, την Ιντερλευκίνη-36β, την Ιντερλευκίνη 36-γ, την Ιντερλευκίνη-36Ra, την Ιντερλευκίνη-37 και την Ιντερλευκίνη-1Hy2 [43]. Η ομάδα της IL-1 απαρτίζεται τόσο από προ-φλεγμονώδεις, όσο και από αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η Ιντερλευκίνη-1β είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη, η οποία επιδρά ως ερέθισμα στα CD4+ T κύτταρα και προάγει τη διαφοροποίησή τους σε T βοηθητικά κύτταρα (Th1, Th17) [44]. Οι κυτταροκίνες Ιντερλευκίνη-1α και Ιντερλευκίνη-1β παράγονται από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ηπατοκύτταρα [45]. Η Ιντερλευκίνη-1α εκφράζεται ιδιοστατικά, σε αντίθεση με την Ιντερλευκίνη-1β, της οποίας η έκφραση επάγεται από μικροβιακά μόρια. Παράλληλα, η Ιντερλευκίνη-1β παράγεται ως πρόδρομο μόριο και στη συνέχεια πέπτεται,

προκειμένου να γίνει ενεργή κυτταροκίνη [46]. Αντίθετα, η Ιντερλευκίνη-1α είναι ενεργή και στην πρόδρομη και στην ώριμη μορφή, αλλά γενικά εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή στην πλασματική μεμβράνη. Και τα δύο μόρια έχουν την ίδια συγγένεια για τους δύο υποδοχείς IL-1, καθώς και για τους IL-1R1 και IL-1R2 [47].

1.6.2.2 Ιντερλευκίνη-6

Η οικογένεια της Ιντερλευκίνης-6 αποτελείται από τις πλειοτροπικές κυτταροκίνες Ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6) και Ιντερλευκίνη-11 (Interleukin-11) [48]. Η Ιντερλευκίνη-6 εκφράζεται από ποικίλα κύτταρα, όπως μονοπύρηνα φαγοκύτταρα, Τ και Β κύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα και κύτταρα του μυελού των οστών [49]. Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη εμπλέκεται στην αιμοποίηση και στην ωρίμανση των Β-κυττάρων [50], στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων και στη ρύθμιση των φαινοτύπων Th2 και Treg [51,52], ενώ είναι σημαντική για την έκκριση πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ [53]. Παράλληλα, συμμετέχει στην μετάδοση του σήματος μέσω της αλυσίδας του υποδοχέα IL-6R και του συστατικού gp130 [48], με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το μονοπάτι JAK-STAT [43]. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η φωσφορυλίωση του παράγοντα STAT3 και η μετατόπισή του στον πυρήνα, όπου και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Για τη λήξη της σηματοδότησης μέσω Ιντερλευκίνης-6 απαιτείται πέψη του gp130 από ένα μόριο κασπάσης, έτσι ώστε να παραχθεί ένα καρβοξυ-τελικό κλάσμα, μεγέθους 18 kDa [54].

1.6.2.3 Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων α (TNFα)

Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων α (Tumor Necrosis Factor α- TNFα) αποτελεί μεσολαβητή της φλεγμονής και επάγει την παραγωγή κυτταροκινών, την ενεργοποίηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και την αύξηση του κυττάρου [55,56,57]. Ο TNFα παράγεται από λεμφοκύτταρα, σε αντίθεση με τον TNFβ, ο οποίος παράγεται από μονοκύτταρα [43]. Ο παράγοντας αυτός συντίθεται ως πρόδρομο διαμεμβρανικό μόριο [58] (membrane-bound TNFα) και ακολούθως, μεταφέρεται μέσω του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, του συστήματος Golgi και του ενδδοσώματος στην κυτταρική μεμβράνη [59]. Τα μονομερή του TNFα συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη και σχηματίζουν ομοιοπολικά τριμερή, προτού κοπούν από τη μεταλλοπρωτεάση TACE (TNFα Converting Enzyme) [60]. Μετά την πέψη προκύπτει μια διαλυτή μορφή του TNFα, ενώ το μεμβρανικό στέλεχος υφίσταται πρωτεόλυση από τις πεπτιδάσες SPPL2a και SPPL2b (Signal Peptide Peptidases). Έπειτα από αυτή τη διαδικασία παράγεται ένα ενδοκυτταρικό στέλεχος, το οποίο ονομάζεται ICD (Intracellular Domain) και μεταφέρεται στον

πυρήνα, όπου επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι για την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και κυρίως, Ιντερλευκίνης-12 [61].

Εξωκυτταρικά, ο TNFα δρα μέσω πρόσδεσης σε δύο υποδοχείς, τους TNFRR1 και TNFR2 [58]. Ο TNFRR1 εκφράζεται ευρέως, σε αντίθεση με τον TNFRR2, ο οποίος εκφράζεται κυρίως σε λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα [61]. Από knockout πειράματα σε ποντίκια, έχει φανεί ότι ο ρόλος του TNFRR1 είναι εξαιρετικά σημαντικός για τη σηματοδότηση μέσω TNFα [62]. Οι δύο υποδοχείς του TNFα αποτελούνται από διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεϊνες, με ομολογία εξωκυτταρικών επικρατειών 28%. Οι επικράτειες που εντοπίζονται έξω από το κύτταρο απαρτίζονται από τέσσερις περιοχές, πλούσιες σε κατάλοιπα Κυστεϊνης, κάθε μια από τις οποίες έχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των Κυστεϊνών. Ακόμη, διαθέτουν την περιοχή PLAD (Pre-Ligand Assembly Domain), η οποία ευθύνεται για τον τριμερισμό του υποδοχέα. Οι παραπάνω δύο τύποι υποδοχέων διαφέρουν ενδοκυτταρικά, αφού ο TNFRR1 διαθέτει στο καρβοξυ-τελικό του άκρο μια Επικράτεια Θανάτου (Death Domain). Έχει βρεθεί ότι η μορφή του TNFα που είναι συνδεδεμένη με τη μεμβράνη ενεργοποιεί πιο ισχυρά τον TNFRR2, σε σχέση με τη διαλυτή μορφή [63]. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του TNFRR1 προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση του παράγοντα NfκB, σε αντίθεση με τον TNFRR2 [64].

1.6.3 Χημειοκίνες

Οι χημειοκίνες είναι μια οικογένεια μικρών πρωτεϊνών (8-10 kDa), οι οποίες δρουν πρωτίστως ως χημειοτακτικά μόρια για συγκεκριμένους τύπους λευκοκυττάρων. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 40 διαφορετικές χημειοκίνες και 20 διαφορετικοί υποδοχείς χημειοκινών. Οι χημειοκίνες δρουν μέσω πρόσδεσης σε 7 διαμεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Οι υποδοχείς αυτοί συνήθως έχουν αλληλεπικαλυπτόμενη ειδικότητα για τους προσδέτες τους [14,65].

1.6.4 Κινίνες

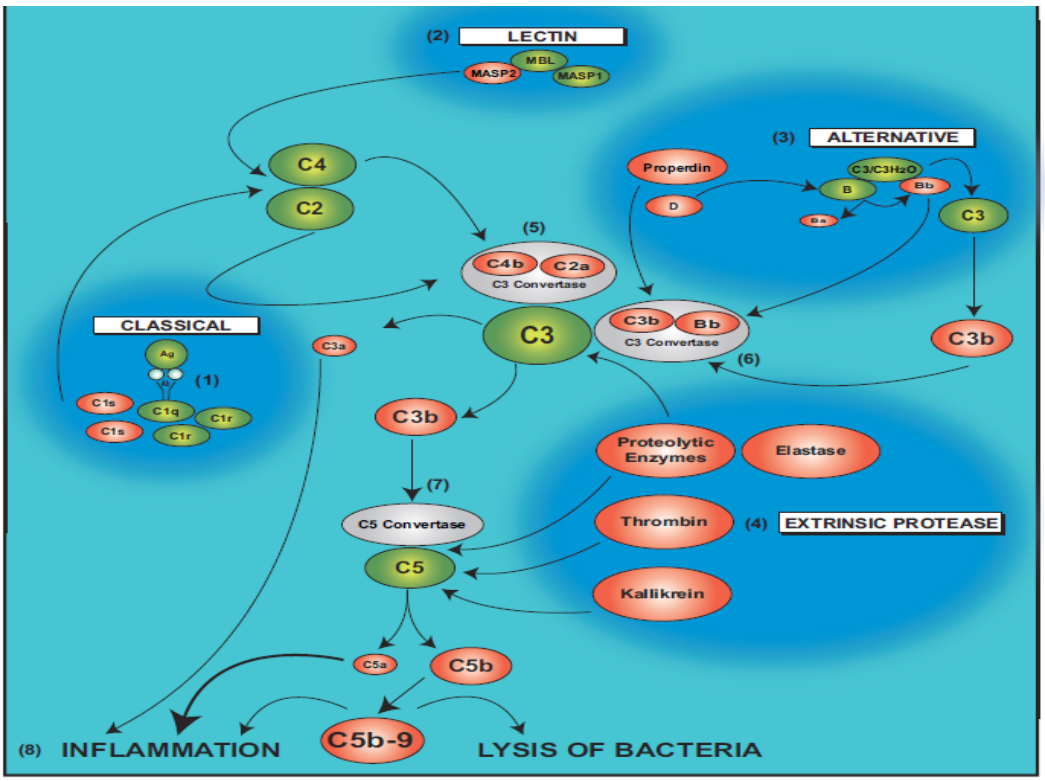
Οι κινίνες είναι αγγειοδραστικά πεπτίδια, τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες του πλάσματος που ονομάζονται κινινογόνα, μέσω της δράσης ειδικών πρωτεασών που ονομάζονται καλλικρεΐνες [66]. Το ένζυμο καλλικρεΐνη πέπτει μια πρόδρομη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος, με υψηλό μοριακό βάρος, το κινινογόνο, προκειμένου να παραχθεί βραδυκινίνη. Η βραδυκινίνη αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και προκαλεί συστολή των λείων μυών, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και πόνο [67] όταν χορηγηθεί με ένεση στο δέρμα.

1.6.5 Νευροπεπτίδια

Τα νευροπεπτίδια εκκρίνονται από αισθητικούς νευρώνες και ποικίλα λεμφοκύτταρα και είναι πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Τα μικρά αυτά πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων της ουσίας P και της νευροκινίνης A, παράγονται στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Η ουσία P έχει πολλές βιολογικές δράσεις, όπως η μετάδοση των σημάτων του πόνου, η ρύθμιση της πίεσης του αίματος, η επαγωγή της έκκρισης ορμονών από ενδοκρινικά κύτταρα και η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας [14,68].

1.6.6 Σύστημα Συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος είναι ένας συνδυασμός διαλυτών πρωτεϊνών και των μεμβρανικών υποδοχέων τους, ο οποίος ενεργοποιείται, κυρίως, κατά την άμυνα του ξενιστή ενάντια σε μικρόβια και σε παθολογικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις [69]. Υπάρχουν περισσότερες από 20 πρωτεΐνες του συμπληρώματος, κάποιες από τις οποίες φέρουν αρίθμηση από το C1 έως το C9. Τα μέλη του συμπληρώματος υπάρχουν σε ανενεργές μορφές στο πλάσμα και πολλά από αυτά ενεργοποιούνται προκειμένου να μετατραπούν σε πρωτεολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν άλλες πρωτεΐνες του συστήματος, σχηματίζοντας έτσι έναν ενζυματικό καταρράκτη με μεγάλη ικανότητα ενίσχυσης. Το κρίσιμο βήμα για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι η πρωτεόλυση του τρίτου συστατικού, το οποίο ονομάζεται C3. Η πέψη του C3 μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών μονοπατιών: 1)Το κλασσικό μονοπάτι, το οποίο επάγεται από την σύνδεση του C1 σε κάποιο αντίσωμα, το οποίο έχει συνδεθεί με αντιγόνο. 2)Το εναλλακτικό μονοπάτι, το οποίο επάγεται από μόρια της επιφάνειας των μικροβίων, σύνθετους πολυσακχαρίτες και άλλες ουσίες, απουσία αντισώματος. 3)Το μονοπάτι της λεκτίνης, στο οποίο η λεκτίνη του πλάσματος που είναι συνδεδεμένη με μανόζη, συνδέεται με υδατάνθρακες τα μικρόβια και ενεργοποιεί άμεσα το C1 [14]. Και τα τρία μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος οδηγούν στο σχηματισμό ενός ενζύμου που ονομάζεται C3 κονβερτάση, το οποίο κόβει το C3 σε λειτουργικά διακριτά κλάσματα, C3a και C3b [70].



Εικόνα 5. Μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος [70]

Το σύστημα του συμπληρώματος επιτελεί τρεις βασικές λειτουργίες. Πρώτον, συμμετέχει στη φλεγμονή. Το κλάσμα C5a και σε μικρότερο βαθμό, τα κλάσματα C4a και C3a, είναι προϊόντα πέψης των αντίστοιχων συστατικών του συμπληρώματος που επάγουν την απελευθέρωση ισταμίνης από μαστοκύτταρα και επομένως, την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και την αγγειοδιαστολή [71]. Ονομάζονται αναφυλατοξίνες, επειδή έχουν παρόμοιες επιδράσεις με αυτές των μεσολαβητών των μαστοκυττάρων που εμπλέκονται στην αντίδραση της αναφυλαξίας. Δεύτερον, εμπλέκεται στην κυτταρική λύση. Το σύμπλεγμα MAC (Membrane Attack Complex), το οποίο συντίθεται από πολλές υπομονάδες C9, εγκαθίσταται στα κύτταρα και ανοίγει οπές, καθιστώντας την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή σε νερό και ιόντα, με αποτέλεσμα να επέρχεται ωσμωτικός θάνατος [72]. Τρίτον, ορισμένα κλάσματα του συμπληρώματος δρουν ως οψονίνες και προάγουν τη φαγοκυττάρωση σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα, τα οποία διαθέτουν κατάλληλους υποδοχείς. Διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες αναστέλλουν την παραγωγή ενεργών κλασμάτων του συμπληρώματος ή απομακρύνουν κλάσματα που συσσωρεύονται στα κύτταρα [14].

1.7 Μεσολαβητές λιπιδικής φύσης

Πολλά προφλεγμονώδη κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν μεσολαβητές λιπιδικής φύσης, συμπεριλαμβανομένου του PAF, του φωσφατιδικού οξέος, του λυσοφωσφατιδικού οξέος, της σφιγγοσυλφωσφορυλοχολίνης και της φωσφορικής σφιγγοσίνης-1.

Οι φωσφολιπιδικοί μεσολαβητές παράγονται κυρίως από την ανακατασκευή των προϋπαρχόντων φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, από κυτταρικές φωσφολιπάσες και τρανσακυλάσες. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαιτέρως ταχεία, καθώς δεν απαιτείται de novo πρωτεϊνοσύνθεση.

1.7.1 Μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος

Οι λιπιδικοί μεσολαβητές, προσταγλανδίνες και λευκοτριένια, παράγονται από το αραχιδονικό οξύ που υπάρχει στα μεμβρανικά φωσφολιπίδια και επάγουν αγγειακές και κυτταρικές αντιδράσεις στην οξεία φλεγμονή [73]. Το αραχιδονικό οξύ είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με 20 άνθρακες και προέρχεται από τη διατροφή ή από τη μετατροπή του απαραίτητου λινολεϊκού οξέος [74]. Το μεγαλύτερο ποσοστό αραχιδονικού οξέος της μεμβράνης είναι σε εστεροποιημένη μορφή και ενσωματώνεται σε μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις μεμβράνες επάγεται από φυσικά, χημικά και μηχανικά ερεθίσματα ή από άλλους μεσολαβητές, μέσω της ενεργοποίησης κυτταρικών φωσφολιπασών και κυρίως, της φωσφολιπάσης A2. Αμέσως μόλις απελευθερωθεί από τη μεμβράνη, το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε βιοενεργούς μεσολαβητές, οι οποίοι ονομάζονται και εικοσανοειδή και συντίθενται από δύο βασικές ομάδες ενζύμων, τις κυκλοοξυγενάσες και τις λιποξυγενάσες.

Οι προσταγλανδίνες παράγονται από μαστοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και από πολλά άλλα κύτταρα και εμπλέκονται στις αγγειακές και συστημικές αντιδράσεις της φλεγμονής. Η παραγωγή τους επιτυγχάνεται μέσω της δράσης δύο κυκλοοξυγενασών, των COX-1 και COX-2 [66]. Η COX-1 παράγεται ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα, αλλά εκφράζεται και ιδιοστατικά στους περισσότερους ιστούς, όπου πιθανόν να εξυπηρετεί κάποια ομοιοστατική λειτουργία. Αντιθέτως, η COX-2 επάγεται από ερεθίσματα φλεγμονής και επομένως παράγει προσταγλανδίνες που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Ωστόσο, βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα ή απουσιάζει από τους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς.

Τα λευκοτριένια παράγονται σε λευκοκύτταρα και μαστοκύτταρα μέσω της δράσης λιποξυγενασών και συμμετέχουν σε αντιδράσεις των αγγειακών και των λείων μυϊκών κυττάρων, καθώς και στη στρατολόγηση λευκοκυττάρων. Οι λιποξίνες παράγονται, επίσης, από αραχιδονικό οξύ, διαμέσου του μονοπατιού των λιποξυγενασών, αλλά σε αντίθεση με τις προσταγλανδίνες και τα λευ-

κοτριένια, οι μεταβολίτες αυτοί καταστέλλουν τη φλεγμονή, αποτρέποντας τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων.

1.7.2 Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)

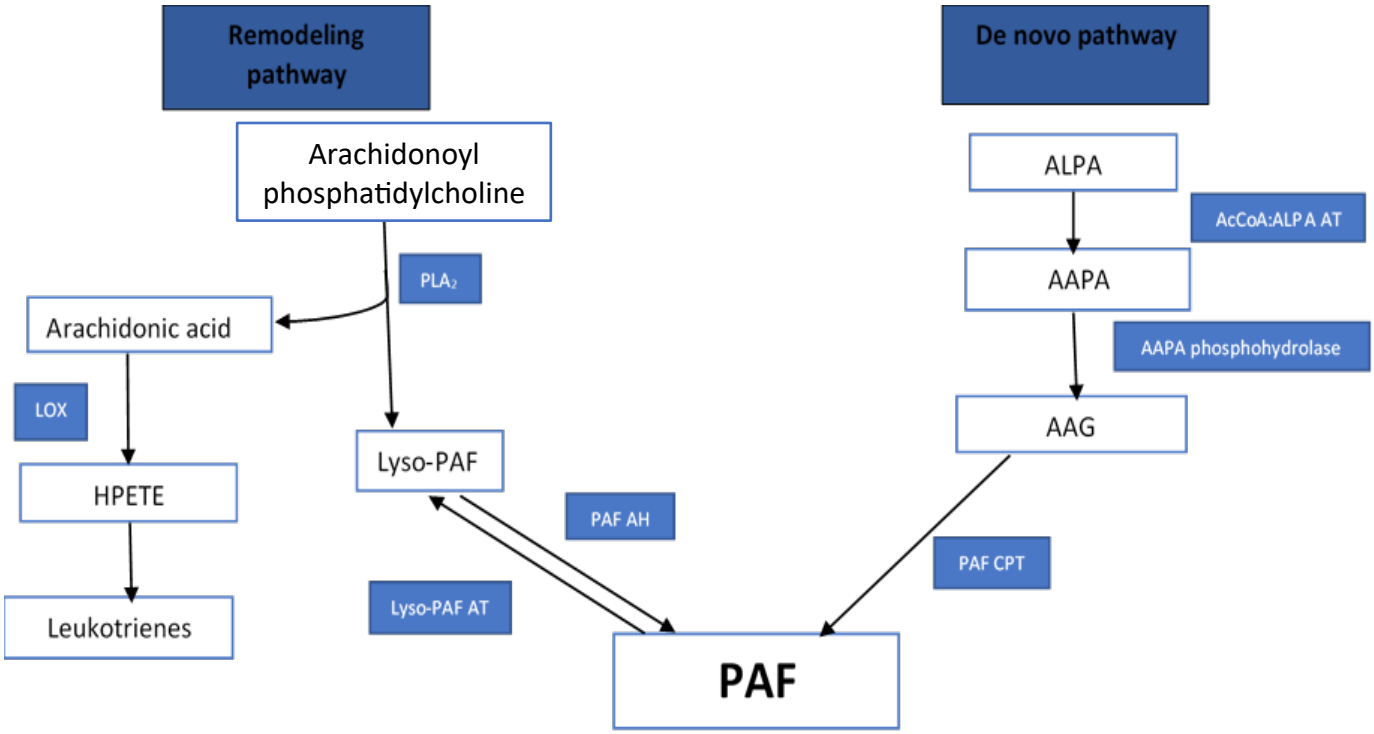
Ο PAF αποτελεί έναν από τους πρωτότυπους μεσολαβητές της φλεγμονής, ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1970 [75] και παράγεται από ευαισθητοποιημένα βασεώφιλα, μέσω ερεθισμού με μη εξειδικευμένο αντιγόνο. Αργότερα, φάνηκε ότι ο PAF παράγεται από την πλεοψηφία των προ-φλεγμονωδών κυττάρων, ύστερα από συγκεκριμένο ερέθισμα και ενεργοποιεί αποκριτικά κύτταρα μέσω ενός μοναδικού υποδοχέα που συνδέεται με G πρωτεϊνη και ονομάζεται υποδοχέας του PAF([76]. Τόσο ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (1-0-αλκυλο-2-ακετυλο-σν-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη), όσο και τα προϊόντα οξείδωσης της φωσφατιδυλοχολίνης, έχουν μελετηθεί εκτενώς από την επιστημονική κοινότητα. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η φωσφατιδυλοχολίνη προάγει την έκκριση χοληστερόλης από αφρώδη κύτταρα ποντικού και έτσι, μπορεί να θεωρηθεί αντι-αθηρογενής [77].

Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν PAF και αποτελούν στόχο για τις δράσεις του PAF [78]. Η διέγερση με PAF επάγει αλλαγές στη δομή του κυτταροσκελετού, οδηγώντας σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα [79]. Μέσω της πρόσδεσης στον υποδοχέα του, ο PAF επάγει ποικίλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, στα οποία περιλαμβάνεται και ο κύκλος των φωσφολιπιδίων, μέσω της ενεργοποίησης των φωσφολιπασών C, A2 και D και της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Ακόμη, ο PAF εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των MAP κινασών και επάγει τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης πολλών σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως η κινάση $p125^{FAK}$ και η src, μόρια που ενεργοποιούν τον μεταγραφικό μηχανισμό που ρυθμίζεται μέσω STAT3 [80]. Πιο πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν την εμπλοκή του PAF στην ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης της VE-καδερίνης και τη σύνδεση της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, η οποία οδηγεί στο αποσύνδεση των συνδέσμων προσκόλλησης [81].

1.7.2.1 ‘Ενζυμα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του PAF

Τα επίπεδα του PAF μέσα στον οργανισμό καθορίζονται από της πορείες βιοσύνθεσης και καταβολισμού του. Έχουν βρεθεί δύο μονοπάτια βιοσύνθεσης του PAF, τα οποία ενεργοποιούνται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο [82](Εικόνα 6). Το ένα μονοπάτι καταλήγει στην εκ νέου βιοσύνθεση του PAF και χρησιμεύει, κυρίως, στη διατήρηση των επιπέδων ηρεμίας του

εν λόγω παράγοντα, σε μη φλεγμονώδη κατάσταση. Το τελικό στάδιο της *de novo* βιοσύνθεσης καταλύεται από το ένζυμο PAF CPT (Dithiothreitol-insensitive CDP-cholinne: alkylacetylglycerol cholinephosphotransferase). Σε συνθήκες φλεγμονής ενεργοποιείται το μονοπάτι ανασχηματισμού του PAF, προκειμένου να επιτευχθεί ταχεία σύνθεση. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται σε δύο βήματα, μέσω των οποίων τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών μετατρέπονται στον παράγοντα PAF. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την άμεση υδρόλυση της αλκυλοακυλογλυκεροφωσφοχολίνης από το ένζυμο Φωσφολιπάση A_2 (PLA_2), ενώ το δεύτερο στάδιο καταλύεται από το ένζυμο Ακετυλο-συνένζυμοΑ: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF AT) [83,84,85].



Εικόνα 6. Βιοσυνθετικά μονοπάτια PAF [84]

Η αποικοδόμηση του PAF μεσολαβείται από μια ειδική ομάδα ενζύμων, τα οποία ονομάζονται PAF-ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AHs). Τα συγκεκριμένα ένζυμα υδρολύουν τον PAF, μετατρέποντάς τον στην ανενεργή του μορφή, τον lyso-PAF.

1.7.3 Λυσο-φωσφατιδικό οξύ

Κατά τη δεκαετία του 1990 βρέθηκε ότι το λυσο-φωσφατιδικό οξύ (Lys-Phosphatidic Acid), το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στις ήπια οξειδωμένες λιποπρωτεϊνες και απελευθερώνεται από

ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την επιβίωση των κυττάρων [86]. Οι βιολογικές αποκρίσεις του LPA μεσολαβούνται στα θηλαστικά από τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεϊνες (GPCR), οι οποίοι έχουν υψηλή συγγένεια μεταξύ τους και ανήκουν στην υποοικογένεια γονιδίων Edg (Endothelial differentiation gene) : LPA1, LPA2, LPA3. Οι παραπάνω πρωτεϊνες έχουν τουλάχιστον 50% ομολογία στην αλληλουχία του DNA των γονιδίων που τις κωδικοποιούν [87,88].

Ακόρεστες ενώσεις LPA που υπάρχουν φυσικά επάγουν την αναδιαμόρφωση των αγγείων *in vivo* [89] και έχει βρεθεί ότι είναι ικανοί επαγωγείς της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων, μέσω των μονοπατιών της κινάσης του p38 που ενεργοποιείται από μιτογόνα [90]. Παράλληλα, έχει φανεί ότι η ποσότητα LPA που περιέχεται στον ορό αυξάνεται σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια, ενισχύοντας την πιθανότητα να εμπλέκεται στην αθηροσκλήρωση, μέσω της δράσης του στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο [91].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Κρασί

2.1 Εισαγωγή

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, επιστημονικές έρευνες έχουν φέρει στο φως πολλά στοιχεία που υποστηρίζουν την άποψη ότι η διατροφή συμβάλλει τα μέγιστα στην ανθρώπινη υγεία. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι υπάρχουν ορισμένες ομάδες τροφίμων, καθώς και συνήθειες που προωθούν την υγεία. Παραδείγματα αποτελούν η υψηλή κατανάλωση λαχανικών, φρούτων, οσπρίων και δημητριακών, η μέτρια κατανάλωση ψαριού, γάλακτος και γαλακτομικών προϊόντων (π.χ. τυρί), χαμηλή κατανάλωση κρέατος και κορεσμένου λίπους και η υψηλή κατανάλωση μονοακόρεστου λίπους. Τέλος, έχει συσταθεί η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, κυρίως με τη μορφή κρασιού, ως συνοδευτικό του γεύματος [92].

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει τη σχέση κατανάλωσης κρασιού με τη μείωση εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, ορισμένων καρκίνων, καθώς και του σακχαρώδους διαβήτη και της άνοιας [93,94,95]. Παρόλο που η χρήση του στην αρχαία ιατρική παραμένει αδιαμφισβήτητη, σήμερα η επιστήμη απαιτεί ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία και το κρασί θα πρέπει να επιβεβαιώσει και πάλι την αξία του για την ανθρώπινη υγεία.

Στην πρώτη επιδημιολογική μελέτη που έγινε για το κρασί, κατά τον 20° αιώνα [96], βρέθηκε μια γραμμική σχέση μεταξύ ποσότητας κατανάλωσης και επιπολασμού υπέρτασης, ενώ οι έρευνες του Klatsky [97] και άλλων επιστημόνων, υπέδειξαν μια σχέση σχήματος “J”. Φάνηκε, δηλαδή, πως η μέτρια κατανάλωση κρασιού μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης [98,99]. Επίσης, σε μεταγενέστερες πληθυσμιακές μελέτες παρατηρήθηκε συσχέτιση της κατανάλωσης κρασιού με μειωμένο κίνδυνο θανάτου και από άλλες αιτίες (π.χ. καρκίνος, [100,101]).

Αντιθέτως, ένα διαιτολόγιο με υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο θεωρείτο ανθυγιεινό. Παλαιότερα, οι διατροφολόγοι συνιστούσαν μειωμένη κατανάλωση κορεσμένου λίπους, trans λιπαρών και χοληστερόλης, έτσι ώστε να επιτευχθεί κάποιο όφελος για την υγεία. Ωστόσο, αργότερα απεδείχθη ότι άλλα συστατικά της δίαιτας μπορούν να μειώσουν το κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, ανεξάρτητα από τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης [92].

Επιστημονικές έρευνες έχουν συνδέσει ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση και η στεφανιαία νόσος, με την υπερβολική κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων [102]. Ωστόσο, επιδημιολογικά δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας φανερώνουν πως υπάρχουν διακριτές διαφορές στα ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο, σε κάποιες χώρες και περιοχές. Κατά τη δεκαετία του 1990, η επιστημονική κοινότητα έκανε μια σημαντική παρατήρηση, η οποία χαρακτηρίστηκε ως «Γαλλικό Παράδοξο» [103]. Συγκεκριμένα,

παρατηρήθηκε ότι, ενώ Γάλλοι και Αμερικάνοι είχαν παρόμοια επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος, στη Γαλλία είχαν σημειωθεί σημαντικά λιγότερα περιστατικά θανάτου από στεφανιαία νόσο, σε σχέση με την Αμερική. Εξίσου σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι τα επίπεδα κατανάλωσης κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν υψηλότερα στη Γαλλία. Θα ήταν, επομένως, αναμενόμενο οι Γάλλοι να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά προσβολής από καρδιαγγειακά νοσήματα. Φάνηκε, όμως, ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού στη Γαλλία ήταν ο μόνος διαιτητικός παράγοντας, ο οποίος αντιστάθμιζε τις επιπτώσεις του κορεσμένου λίπους στον οργανισμό των Γάλλων. Η διαφορά αυτή στις δίαιτες των δύο λαών αποτέλεσε την ερμηνεία της διαφοράς στα περιστατικά θανάτου από στεφανιαία νόσο.

Το «Γαλλικό Παράδοξο» και η απόδοση καρδιοπροστατευτικής δράσης στο κόκκινο κρασί, πυροδότησαν μια σειρά ερευνών. Σημαντική ήταν η έρευνα του Πανεπιστημίου Davis της Καλιφόρνια, μέσω της οποίας συσχετίστηκε η δράση των φαινολικών ενώσεων του κόκκινου κρασιού με την αναστολή της οξείδωσης της LDL χοληστερόλης [104]. Στις *in vitro* έρευνες του Frankel και των συνεργατών του [105], επιβεβαιώθηκε η ικανότητα 20 διαφορετικών ποικιλιών κόκκινου κρασιού να παρεμποδίζουν την οξείδωση της LDL. Το 1997, ο Meyer και οι συνεργάτες του [106] εξέτασαν την ικανότητα φαινολικών εκχυλισμάτων από 14 διαφορετικούς τύπους φρέσκων σταφυλιών να αναστέλλουν την οξείδωση της ανθρώπινης LDL *in vitro*. Η ίδια ομάδα επιστημόνων παρατήρησε ότι η σχετική δραστικότητα των εκχυλισμάτων αυξανόταν όταν οι σπόροι του σταφυλιού συνθλίβονταν, καθώς και όταν αυξανόταν ο χρόνος εκχύλισης.

2.1 Κρασί και φαινολικές ενώσεις

Είναι γνωστό ότι το κρασί αποτελείται από νερό, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, γλυκερόλη, σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, ανώτερες αλκοόλες, οξέα και φαινολικές ενώσεις [107]. Η συσχέτιση της διατροφής με την υγεία έχει αποτελέσει ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο τα τελευταία χρόνια και συνεπώς, η ποσοτική και ποιοτική σύσταση των φυτικών προϊόντων είναι μεγίστης σημασίας. Τα βιοδραστικά συστατικά των φυτών είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται σε συνθήκες στρες, όπως σε περιπτώσεις τραυματισμού, μολύνσεων και υπεριώδους ακτινοβολίας και επομένως, αποτελούν φυσιολογικό εργαλείο που χρησιμοποιείται από τους φυτικούς οργανισμούς προκειμένου να διατηρηθούν υγιή [108]. Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ουσίες που υπάρχουν στο κρασί αντιπροσωπεύονται, κυρίως, από πολυφαινόλες, οι οποίες βιογενετικά προέρχονται από δύο βασικά βιοσυνθετικά μονοπάτια: τα μονοπάτια του σικιμικού και του οξικού οξέος. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται δομικά από έναν ή περισσότερους αρωματικούς

δακτυλίους, συνδεδεμένους σε διακριτές ομάδες. Βάσει των χημικών τους δομών, ποικίλουν από απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, έως και σύνθετες πολυμερείς δομές, όπως οι τανίνες [109]. Όσον αφορά τις βιολογικές τους ιδιότητες, στα σταφύλια, οι ενώσεις αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση αισθητικών χαρακτηριστικών (χρώμα, άρωμα, γεύση, πικρία ή στυπτικότητα) και γι' αυτό το λόγο, αποτελούν ενδιαφέρον ερευνητικό αντικείμενο ως πηγή συστατικών και πρόσθετων ουσιών ή τεχνολογικών βοηθημάτων [110] και είναι εξαιρετικής σημασίας για ερευνητές, παραγωγούς, μεταποιητές και καταναλωτές [111]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια *Vitis vinifera* και το κρασί [107].

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο κρασί μπορεί να προέρχονται από τα σταφύλια, από τους ζυμομύκητες (διαδικασία παραγωγής), καθώς και από τα δρύινα βαρέλια, μέσα στα οποία αποθηκεύεται [107]. Η χημική δομή των φαινολικών ενώσεων συνίσταται από ένα δακτύλιο βενζενίου με μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες, ενωμένο με έναν αρωματικό δακτύλιο και είναι ενδεικτική της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Ο καρπός του σταφυλιού έχει την ακόλουθη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις: 1% σε μορφή συμπιεσμένου πολτού, 5% σε μορφή χυμού, 50% στο φλοιό των κόκκινων σταφυλιών, 25% στο φλοιό των λευκών σταφυλιών και 46-69% στα κουκούτσια [112,113]. Γενικά, έχει βρεθεί ότι το κόκκινο κρασί περιέχει πολλά περισσότερα φαινολικά συστατικά (περίπου 1.732-1.842 mg/L), σε σχέση με το λευκό (209,5-285,5 mg/L) [114].

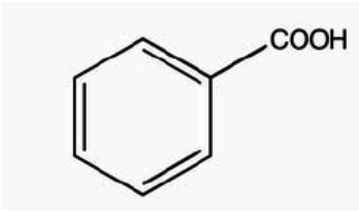
2.2 Φαινολικά συστατικά

2.2.1Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα περιλαμβάνουν παράγωγα βενζοϊκού και κινναμικού οξέος, ενώ κυρίαρχη τάξη στα παραπροϊόντα της οινοποίησης αποτελούν τα υδροξυκινναμικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται συχνά σε συζευγμένη μορφή, δηλαδή ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα ή εστέρες κινικού, σικιμικού και ταρταρικού οξέος [115]. Μέχρι σήμερα, η σχετική αναλογία φαινολικών ενώσεων στα παραπροϊόντα οινοποίησης έχει υπολογιστεί από ανάλυση HPLC και τα δεδομένα από υπολείμματα κόκκινων και λευκών ποικιλιών αποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ διαφορετικών τύπων σταφυλιών [116], καθώς και μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του σταφυλιού, όπως τα κοτσάνια, ο φλοιός, οι καρποί, τα στέμφυλα και τα φύλλα. Ο γονότυπος φαίνεται να αποτελεί το βασικότερο παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει τις σχετικές συγκεντρώσεις των διαφόρων φαινολικών ενώσεων [117].

2.2.2Υδροξυβενζοϊκά οξέα

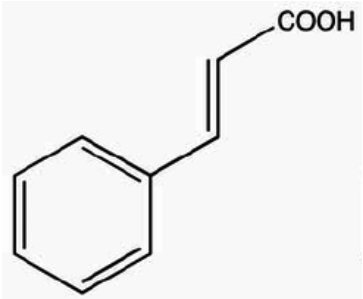
Τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος που έχουν ταυτοποιηθεί σε βιομηχανικά κατάλοιπα οινοποίησης, αντιπροσωπεύονται κυρίως από παράγωγα p-υδροξυβενζοϊού, πρωτοκατεχικού, τανικού και συριγγικού οξέος [115]. Οι μέχρι τώρα αναλύσεις έχουν δείξει ότι το γαλλικό οξύ είναι το παράγωγο του υδροβενζοϊκού οξέος με τη μεγαλύτερη αφθονία στα κοτσάνια, τις φλούδες και τους καρπούς των σταφυλιών, ενώ ακολουθεί το συριγγικό οξύ στα κοτσάνια και το πρωτοκατεχικό οξύ στους καρπούς και τον φλοιό [108,118]. Περεταίρω ανάλυση των καρπών και των στεμφύλων από κόκκινες ποικιλίες ανέδειξε το πρωτοκατεχικό οξύ ως το πιο άφθονο υδροξυβενζοϊκό οξύ, αφού είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο [116].



Εικόνα 7. Δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων

2.2.3Υδροξυκιναμικά οξέα

Τα υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται σε όλα τα μέρη του σταφυλιού, με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα να καταγράφεται στους εξωτερικούς ιστούς του ώριμου φρούτου (φλούδες). Η συγκέντρωση των υδροξυκιναμικών οξέων μειώνεται κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης. Ωστόσο, η συνολική ποσότητα της συγκεκριμένης φαινολικής ένωσης αυξάνεται ανάλογα με το μέγεθος του φρούτου. Οι κύριες κατηγορίες υδροξυκιναμικών οξέων που συναντώνται στα σταφύλια και τα κρασιά είναι το καφταρικό, το p-κουταρικό και το φερταρικό οξύ. Τα καφταρικό και το φερταρικό οξύ απαντώνται κυρίως σε trans διαμόρφωση, ενώ μια αμελητέα ποσότητα του p-κουταρικού οξέος συναντάται και στη cis διαμόρφωση [116]. Όσον αφορά τις φλούδες των σταφυλιών, τα δεδομένα που υπάρχουν για τα υδροξυκιναμικά οξέα σε ποικιλίες λευκών και κόκκινων κρασιών, υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών. Ενώ στις φλούδες από τα λευκά σταφύλια κυριαρχούν το cis-κουταρικό οξύ και το trans-καφταρικό οξύ [118], το ίδιο τμήμα από κόκκινα σταφύλια, εκτός του ότι διαθέτει πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση των συγκεκριμένων φαινολικών, περιέχει κυρίως χλωρογενικό οξύ. Παράλληλα, δεν έχουν ανιχνευθεί υδροξυκιναμικά οξέα σε φλούδες από λευκές ποικιλίες, ενώ σε φλούδες από κόκκινες ποικιλίες έχουν βρεθεί χλωρογενικά οξέα σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από 2.9 έως 6.8 mg/g ξηρού βάρους [119].

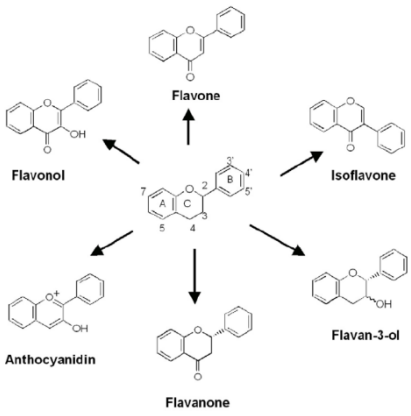


Εικόνα 8. Δομή υδροξυκιναμικών οξέων

2.2.4Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος, οι οποίες δομικά αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα [120]. Τα φλαβονοειδή του κρασιού έχουν δομή τριών δακτυλίων, δύο φαινόλες (δακτύλιοι Α και Β) που συνδέονται με έναν πυρανικό ή έναν εξαγωνικό δακτύλιο (δακτύλιος Γ). Στις θέσεις 5 και 7 του δακτυλίου Α υπάρχουν υδροξυλικές ομάδες ως υποκαταστάτες. Οι διαφορετικές τάξεις των φλαβονοειδών χαρακτηρίζονται από διαφορές στο στάδιο της οξείδωσης και της υποκατάστασης στο δακτύλιο Γ. Τα φλαβονοειδή μπορεί να συναντώνται είτε ελεύθερα είτε συνδεδεμένα με άλλα φλαβονοειδή, σάκχαρα, μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμό αυτών των ενώσεων.

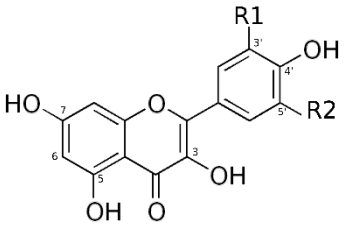
Επιστημονικά δεδομένα έχουν δείξει ότι τα βιομηχανικά κατάλοιπα των σταφυλιών είναι πλούσια σε φλαβαν-3-όλες, προανθοκυανιδίνες, φλαβόνες, φλαβανόλες και ανθοκυανίνες [110]. Οι διακριτές τάξεις των φλαβονοειδών διαφέρουν ως προς το βαθμό της οξείδωσης του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου [121]. Σημαντικό μέρος της βιοσύνθεσης των φλαβονολών πραγματοποιείται κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση των σταφυλιών. Τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης των φλαβονολών στα σταφύλια έχουν ανιχνευθεί 3-4 εβδομάδες μετά τον περκασμό (γυάλισμα) [122]. Η σύγκριση της σύνθεσης των παραπροϊόντων της οινοποιίας σε φλαβονοειδή έδειξε ότι οι φλαβαν-3-όλες υπάρχουν σε παρόμοιες συγκεντρώσεις στις φλούδες και τους καρπούς, ενώ οι ανθοκυανίνες εντοπίστηκαν, κυρίως, στις φλούδες [123].



Εικόνα 9. Φλαβονοειδή

2.2.4.1 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι φλαβονοειδή που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα C2 και C3 και μιας υδροξυλικής ομάδας στον άνθρακα C3 [124]. Διαφορετικά είδη σακχάρων μπορούν να προσδεθούν στις φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες μπορούν να αντιδράσουν με ανθοκυανίνες, με αποτέλεσμα την παραγωγή πιο σταθερών χρωστικών ουσιών και με φαινολικά οξέα [125]. Σε παραπροϊόντα οινοποίησης έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη μιας ποικιλίας φλαβονολών. Πιο αξιοσημείωτη φαίνεται να είναι η περιεκτικότητα σε παράγωγα κερκετίνης και κυρίως, του 3-Ο-γλυκορουνιδίου της κερκετίνης [126].



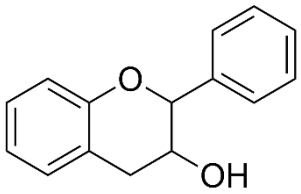
Εικόνα 10. Δομή φλαβονολών

Η παρουσία των φλαβονολών ενγγελετίνη, μυριστίνη και λαρικιτρίνη δεν έχει ανιχνευθεί σε οργανικά κατάλοιπα λευκών ποικιλιών σταφυλιού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην απουσία του ενζύμου 3’-, 5’-υδροξυλάση των φλαβονειδών στις λευκές ποικιλίες [127]. Οι υπάρχουσες μελέτες σχετικά με την σύνθεση των φύλλων σε φλαβονόλες, τονίζουν την ύπαρξη γλυκοζιτών σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες ξεπερνούν την περιεκτικότητα που έχει καταγραφεί σε άλλα παραπροϊόντα οινοποίησης.

2.2.4.2 Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες ή φλαβανο-3-όλες, είναι ενώσεις της ομάδας των φλαβονοειδών, οι οποίες έχουν μια υδροξυλική ομάδα στη θέση του τρίτου ατόμου άνθρακα, αλλά δεν έχουν καρβονυλική

ομάδα στο τέταρτο άτομο άνθρακα [116]. Οι φλαβανόλες είναι οι κύριες ενώσεις που ευθύνονται για τη στυπτικότητα και την πικρή επίγευση των κρασιών [128]. Αντίθετα, οι τανίνες είναι σύνθετες φαινολικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, οι οποίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις συμπυκνωμένες τανίνες και τις υδρολυώμενες τανίνες [122]. Οι συμπυκνωμένες τανίνες, γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες, αποτελούνται από υπομονάδες μονομερών φλαβανολών και οι δομές τους ποικίλουν ανάλογα με τις δομικές τους υπομονάδες, το βαθμό του πολυμερισμού και τη θέση σύνδεσής τους, ενώ οι υδρολυώμενες τανίνες είναι σύνθετες πολυφαινόλες, οι οποίες μπορούν να διασπαστούν σε δύο μικρότερα κλάσματα, κυρίως σάκχαρα και φαινολικά οξέα [123].



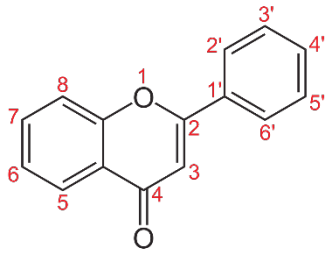
Εικόνα 11. Δομή φλαβανολών

Η σύγκριση των συγκεντρώσεων διαφόρων τύπων κρασιού σε φλαβανόλες έδειξε ότι η κατεχίνη είναι η βασική ένωση, τόσο σε κόκκινες, όσο και σε λευκές ποικιλίες σταφυλιών. Επίσης, η συγκέντρωση της συγκεκριμένης ένωσης βρέθηκε σε υψηλότερη στα κοτσάνια, σε σχέση με τις φλούδες και τους καρπούς. Οι συμπυκνωμένες τανίνες αντιπροσωπεύουν ένα εξίσου σημαντικό μέρος των βιοενεργών φυτοχημικών σε παραπροϊόντα της οινοποίησης και δεδομένα από αναλύσεις αποδεικνύουν την παρουσία διμερών και τριμερών των προκυανιδινών. Όσον αφορά τις κόκκινες ποικιλίες, έχει φανεί ότι η συμπυκνωμένη τανίνη που υπάρχει σε υψηλότερη περιεκτικότητα είναι το B3 διμερές της προκυανιδίνης, ενώ βρίσκεται σε σχεδόν μηδενικά επίπεδα στις φλούδες και τους καρπούς [129]. Άλλα δεδομένα από κατάλοιπα λευκών σταφυλιών δείχνουν ότι παρόλο που η μεγαλύτερη περιεκτικότητα ανιχνεύεται στα κοτσάνια, οι συγκεντρώσεις είναι πολύ υψηλότερες σε σχέση με αυτές που έχουν βρεθεί σε κόκκινες ποικιλίες, καθιστώντας έτσι την προκυανιδίνη B1 τη βασικότερη ένωση στα λευκά σταφύλια. Τέλος, οι φλούδες και οι καρποί φάνηκε να περιέχουν σε μεγαλύτερη αφθονία το B2 διμερές της προκυανιδίνης [116].

2.2.4.3 Φλαβόνες

Οι φλαβόνες είναι ενώσεις με έναν διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα 2 και 3, οι οποίες διαφέρουν από τις φλαβονόλες λόγω της απουσίας της υδροξυλικής ομάδας στον άνθρακα 3. Οι φυτοχημικές αυτές ενώσεις έχουν ανιχνευθεί σε μικρές συγκεντρώσεις στα σταφύλια, με εξαίρεση τη λουτεολίνη. Επομένως, η παρουσία της συγκεκριμένης ένωσης έχει επιβεβαιωθεί και σε

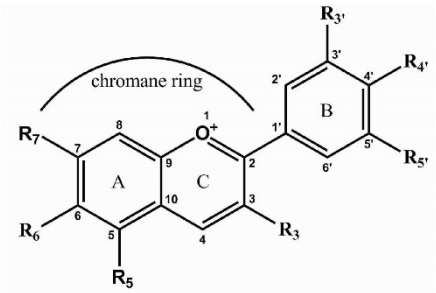
παραπροϊόντα της οινοποίησης, χωρίς ωστόσο να σημειώνονται σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητά της στα διάφορα μέρη του σταφυλιού [110].



Εικόνα 12. Δομή φλαβονών

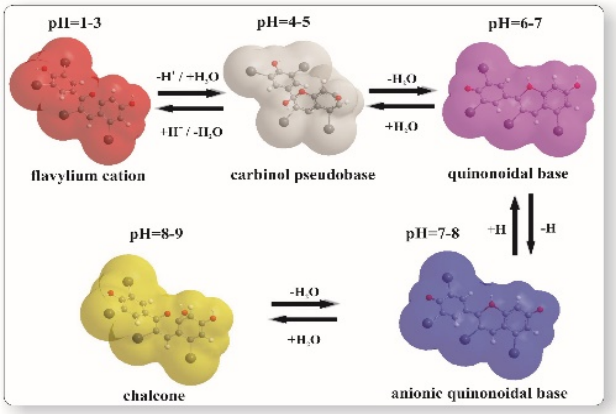
2.2.4.4 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι φλαβονοειδή με ιδιαίτερα υψηλή διαλυτότητα και ευθύνονται για το χρώμα των κόκκινων σταφυλιών και των κρασιών. Τα χαρακτηριστικά τους καθορίζονται από τη χημική τους δομή (συναντώνται κυρίως στην κόκκινη μορφή σε χαμηλά επίπεδα pH), το βαθμό της υδροξυλίωσης, της μεθυλίωσης και της γλυκοζυλίωσης [110]. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από την ανθοκυανιδίνη της αγλυκόνης, έναν αρωματικό δακτύλιο (A) συνδεδεμένο σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο (C), ο οποίος περιέχει οξυγόνο, ο οποίος είναι επίσης συνδεδεμένος μέσω ενός δεσμού άνθρακα-άνθρακα με έναν τρίτο αρωματικό δακτύλιο (B). Ο αρωματικός δακτύλιος B σχηματίζει δεσμούς με σάκχαρα και οργανικά οξέα, προκειμένου να παραχθούν διάφορες ανθοκυανίνες διαφορετικών χρωμάτων.



Εικόνα 13. Δομή ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες είναι σχετικά ασταθείς ενώσεις και οξειδώνονται εύκολα. Ακόμη, είναι ευαίσθητες στη δράση πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του pH, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα και το χρώμα τους, καθώς και της θερμοκρασίας και της υπεριώδους ακτινοβολίας [130]. Οι φλούδες αποτελούν το τμήμα του σταφυλιού με το μέγιστο περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες και είναι ο βασικός ιστός που ευθύνεται για τη μεταφορά των χρωστικών στο κρασί [131].



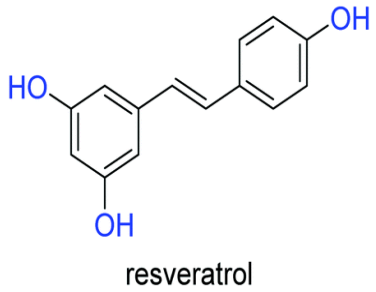
Εικόνα 14. Αλλαγή χρώματος ανθοκυανινών ανάλογα με το pH

2.2.5Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι φαινολικές ενώσεις, δομικά αποτελούμενες από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με μια γέφυρα αιθυλενίου [110]. Είναι γνωστό ότι τα σταφύλια παράγουν στιλβένια ως απόκριση σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, όπως το όζον και η υπεριώδης ακτινοβολία, αυξάνοντας την παραγωγή τους σε εκατονταπλάσιο βαθμό στα κοτσάνια και τα φύλλα. Έχουν ανιχνευθεί σε παραπροϊόντα οινοποίησης και κυρίως στη φλούδα, αλλά και στα κοτσάνια και τους καρπούς σε χαμηλότερα επίπεδα [132]. Η περιεκτικότητα σε στιλβένια διαφέρει μεταξύ κόκκινων και λευκών σταφυλιών. Συγκεκριμένα, έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία παραγώγων στιλβενίων στα κοτσάνια, τους καρπούς, τις οινολάσπες και τα φύλλα κόκκινων ποικιλιών, σε λευκές ποικιλίες έχουν βρεθεί μόνο στα κοτσάνια και τις φλούδες [116]. Η απουσία των στιλβενίων από τις φλούδες των κόκκινων σταφυλιών, καθώς και η παρουσία τους μόνο ως trans ισομερή στις φλούδες των λευκών σταφυλιών, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας εκχύλισης (σκοτάδι), αφού η έκθεση των σταφυλιών σε υπεριώδη ακτινοβολία μετατρέπει τα trans ισομερή σε cis [118].

Τα βασικότερα στιλβένια που έχουν βρεθεί σε σταφύλια είναι η trans-ρεσβερατρόλη, ο 3-O-γλυκοζίτης της trans-ρεσβερατρόλης, ο 3-O-γλυκοζίτης της cis-ρεσβερατρόλης και η ε-βινιφερίνη. Η ρεσβερατρόλη είναι παρούσα σε διάφορα οργανικά κατάλοιπα των διαδικασιών της οινοπαραγωγής και η συγκέντρωσή της στο τελικό προϊόν εξαρτάται από τις μεθόδους παραγωγής του κρασιού. Η ρεσβερατρόλη δρα ως φυτοαλεξίνη και παράγεται με τη δράση του ενζύμου συνθάση της ρεσβερατρόλης από τον φλοιό και τα φύλλα των σταφυλιών, ως απόκριση στη μόλυνση από *Botrytis cinerea*, αλλά και σε άλλες μυκητιάσεις [110] ή σε φυσικούς τραυματισμούς του φυτού. Εντοπίζεται στο κρασί, τόσο σε cis, όσο και σε trans διαμόρφωση και μπορεί να είναι είτε ελεύθερη, είτε συνδεδεμένη με γλυκόζη. Αντίθετα, στα σταφύλια κυριαρχεί η trans διαμόρφωση. Η συ-

γκέντρωσή της φτάνει τα 7 mg/L στο κόκκινο, 2 mg/L στο ροζέ και 0.5 mg/L στο λευκό κρασί [107].



Εικόνα 15. Δομή ρεσβερατρόλης

2.3 Αντι-φλεγμονώδης δράση συστατικών κρασιού

Τα τελευταία τριάντα χρόνια έχει δημοσιευθεί ένα πλήθος επιστημονικών μελετών, οι οποίες εξετάζουν τις in vitro δράσεις, τόσο ολικού εκχυλίσματος κρασιού, όσο και μεμονωμένων φαινολικών συστατικών που απομονώνονται από αυτό, σε αποκρίσεις κυττάρων του αίματος και ειδικότερα, στην έκκριση κυτταροκινών.

Το 1996, ο Yanoshita [133] και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις ορισμένων φλαβονοειδών, τα οποία είναι ευρέως κατανεμημένα σε φυτικά προϊόντα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η in vitro επίδραση της λουτεολίνης, της κερκετίνης, της απιγενίνης και της καμπφερόλης στη δραστικότητα του ενζύμου lyso-PAF AT σε κύτταρα ποντικών RBL-2H3 και στην παραγωγή PAF από περιφερικά λευκοκύτταρα που είχαν διεγερθεί με το ιονοφόρο ασβεστίου 23187. Η λουτεολίνη και η κερκετίνη ανέστειλαν τη δραστικότητα της lyso-PAF AT. Ακόμη, η λουτεολίνη ανέστειλε την παραγωγή PAF από τα περιφερικά λευκοκύτταρα.

Η ερευνητική ομάδα του Youdim [135] διερεύνησε το αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες δυναμικό ανθοκυανινών και υδροξυκιναμικών οξέων από μύρτιλα και κράνμπερι έναντι της βλάβης που προκαλείται από το H_2O_2 και τον TNFα, στα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HMVEC). Φάνηκε ότι ο εμπλουτισμός του θρεπτικού με ανθοκυανίνες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS, ενώ ύστερα από έκθεση στον TNFα, τα κύτταρα που δεν είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό με ανθοκυανίνες και υδροξυκιναμικά οξέα, εμφάνισαν αυξημένη απελευθέρωση IL-8, MCP-1 και ICAM-1 στο μέσο καλλιέργειας. Αντίθετα, τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε εμπλουτισμένο θρεπτικό, ήταν λιγότερο ευαίσθητα στη δράση του TNFα.

Η Neurateur και οι συνεργάτες της [136] μελέτησαν τις επιδράσεις του κρασιού και του χυμού σταφυλιών στην παραγωγή νεοπτερίνης, ενός προγνωστικού δείκτη για τη στεφανιαία νόσο και

την αθηρογενετική διαδικασία, από περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος. Συγκεκριμένα, PBMC διεγέρθηκαν με τις μιτογόνες ουσίες φυατοαιματογλουτινίνη και κονκαναβαλίνη Α και στη συνέχεια, εκτέθηκαν σε κόκκινα και λευκά κρασιά, σε αιθανόλη και σε χυμό σταφυλιού (ως δείγμα ελέγχου που δεν περιέχει αιθανόλη). Ακολούθως, μετρήθηκε η παραγωγή νεοπτερίνης και ο ρυθμός αποδόμησης της τρυπτοφάνης στα υπερκείμενα. Παρατηρήθηκε ότι στα PBMC που είχαν διεγερθεί αυξήθηκε η παραγωγή της νεοπτερίνης και ο ρυθμός αποδόμησης της τρυπτοφάνης. Παράλληλα, φάνηκε ότι τα κόκκινα και τα λευκά κρασιά, καθώς και ο χυμός σταφυλιού ανέστειλαν τις επιδράσεις της διέγερσης με μιτογόνα και μάλιστα, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η αιθανόλη είχε σχετικά μικρή ή καθόλου επίδραση. Επομένως, μέσω του συγκεκριμένου πειράματος έγινε φανερό ότι τα κόκκινα και τα λευκά κρασιά και ο χυμός σταφυλιού περιείχαν ουσίες, οι οποίες ρυθμίζουν καθοδικά επιδράσεις των κυτταροκινών στα PBMC. Η IL-8 αποτελεί κεντρικό μόριο, τόσο για την έναρξη, όσο και για τη διατήρηση της φλεγμονής.

Το 2009, ο Oh και οι συνεργάτες του [137] εξέτασαν την επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από LPS παραγωγή IL-8 από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μονοκυττάρων THP-1. Παράλληλα, έγινε μέτρηση της ενεργοποίησης της MAPK, της αποικοδόμησης του IκB, της ενεργοποίησης του NFκB και της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2. Η ρεσβερατρόλη ανέστειλε την επαγόμενη από τον LPS παραγωγή IL-8 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Είναι πιθανό η αναστολή της έκκρισης της IL-8 να είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης της MAPK και της ενεργοποίησης του NFκB. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις, ίσως να εξηγούν το μηχανισμό μέσω του οποίου η ρεσβερατρόλη ρυθμίζει την ενεργοποίηση των THP-1 κυττάρων σε συνθήκες φλεγμονής.

Η ερευνητική ομάδα της Xanthopoulou και των συνεργατών της [84], μελέτησε την επίδραση εκχυλισμάτων κόκκινης (Cabernet Sauvignon) και λευκής (Robola) ποικιλίας κρασιού, καθώς των φαινολικών ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, lyso-PAF-AT και PAF-CPT και στο βασικό ένζυμο που καταβολίζει τον PAF, την PAF-AH, σε κύτταρα της σειράς U937. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα των κρασιών και οι φαινολικές ενώσεις ανέστειλαν τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF στα δείγματα που δεν περιείχαν κύτταρα. Επίσης, τα υδατικά εκχυλίσματα που εξετάστηκαν, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποίησαν και τα δύο ένζυμα, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανέστειλαν μόνο την PAF-CPT. Όσον αφορά την PAF AH, φάνηκε ότι όλα τα κλάσματα είχαν μικρή ή καθόλου επίδραση στα επίπεδά της.

Η σύνθεση του PAF αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης και για τη Vlachogianni και τους συνεργάτες της [138], οι οποίοι εξέτασαν την in vitro επίδραση της τυροσόλης, της ρεσβερατρόλης και των οξειδωμένων παραγώγων τους στη σύνθεση του PAF, ύστερα από διέγερση U937 κυττάρων με IL-

1β. Βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις τυροσόλης και Ρεσβερατρόλης που επάγουν 50% αναστολή της επίδρασης της IL-1β στη lyso PAF-AT ήταν 48 μM±11 και 157 μM±77, στην PAF-CPT 246 μM±61 και 294 μM±102, αντίστοιχα. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η τυροσόλη είναι πιο ικανός αναστολέας από την ρεσβερατρόλη, καθώς επίσης και ότι τα παράγωγα της τυροσόλης διατήρησαν την αναστολτική δραστηριότητα της μητρικής ένωσης.

Εξίσου σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φλεγμονωδών αποκρίσεων παίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Ο Iijima και η ομάδα του [139] ασχολήθηκαν με την in vitro επίδραση πολυφαινολικών συστατικών κόκκινου κρασιού στην επαγόμενη από PDGF μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (SMC) των αγγείων και στην ενεργοποίηση μονοπατιών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που μεσολαβούν την κυτταρική μετανάστευση. Χρησιμοποιήθηκαν λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινης αορτής (HASMCs) και λεία μυϊκά κύτταρα αορτής αραουραίου (RASMCs). Τα πειράματα έδειξαν ότι τα πολυφαινολικά συστατικά του κρασιού ανέστειλαν με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από PDGF μετανάστευση των SMCs. Η αναστολή αυτή φαίνεται να οφείλεται σε δύο διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια: 1)Τα πολυφαινολικά ανέστειλαν τη δραστηριότητα της PI3K και τη φωσφορυλίωση της p38MAPK με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και 2)Τα πολυφαινολικά ανέστειλαν τη φωσφορυλίωση της MKK3/6, μιας ανοδικής κινάσης στο μονοπάτι της p38MAPK.

Η ομάδα του De Lange και των συνεργατών του [140] εξέτασε την in vitro επίδραση καθαρής αλκοόλης (96%), πολυφαινολικών συστατικών κόκκινου κρασιού (ποικιλία Rioja) και εκχυλίσματος σταφυλιού στη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, ύστερα από προσθήκη ADP. Βρέθηκε ότι η αλκοόλη, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν ανέστειλε τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Το εκχύλισμα σταφυλιού ανέστειλε τη συσσωμάτωση με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και σε σημαντικό βαθμό σε συγκεντρώσεις από 45 mg/l και πάνω. Το κόκκινο κρασί ανέστειλε τη συσσωμάτωση μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις.

Ένα από τα συστατικά του κρασιού, το οποίο φαίνεται να έχει αντι-φλεγμονώδη δράση και έχει μελετηθεί εκτενώς, είναι η ρεσβερατρόλη. Το 1998, η Ferrero και οι συνεργάτες της [141], επειδή η ρεσβερατρόλη δρα ως αναστολέας τυροσινικών κινασών, υπέθεσαν ότι έχει την ικανότητα να καταστέλλει την έκφραση του ενδοκυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1 (ICAM-1) και του μορίου προσκόλλησης 1 των αγγειακών κυττάρων (VCAM-1) σε διεγερμένα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs, HSVECs). Εξέτασαν, συνεπώς, την επίδραση της ρεασβερατρόλης στην έκφραση μορίων προσκόλλησης και στην προσκόλληση των μονοκυττάρων U937 και των κοκκιοκυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Από την πειραματική διαδικασία φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη σε

συγκεντρώσεις από 1 mmol/L έως 100 nmol/L, προκαλούσε σημαντική αναστολή της έκφρασης των ICAM-1 και VCAM-1 σε κύτταρα HUVEC που είχαν διεγερθεί με TNFα και σε κύτταρα HSVEC που είχαν διεγερθεί με LPS. Ακόμη, φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη κατέστειλε σε σημαντικό βαθμό την προσκόλληση U937 μονοκυττάρων σε κύτταρα HSVEC που είχαν διεγερθεί με LPS.

Στην εργασία του Falchetti και των συνεργατών του [142], αξιολογήθηκε in vitro η επίδραση της ρεσβερατρόλης σε τρία μοντέλα ανοσολογικής απόκρισης: 1)ανάπτυξη CD4+ και CD8+ T κυττάρων που παράγουν κυτταροκίνες, μέσω ερεθίσματος των PBMC με αντισώματα anti-CD3/anti-CD28, 2)εξειδικευμένη αντιγονο-επαγόμενη γένεση κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων και 3)δράση των PBMC ως NK (Natural Killers). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η in vitro έκθεση στη ρεσβερατρόλη έχει διπλή επίδραση στην ανάπτυξη των CD4+ και CD8+ T κυττάρων που παράγουν Ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), Ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και Ιντερλευκίνη-4 (IL-4), η οποία επάγεται από αντισώματα anti-CD3/anti-CD28. Συγκεκριμένα, βρέθηκε επαγωγή σε χαμηλά επίπεδα ρεσβερατρόλης και αναστολή σε υψηλά επίπεδα ρεσβερατρόλης. Ακόμη, παρατηρήθηκε ενίσχυση της δραστικότητας των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και των κυττάρων Φυσικών Φονέων σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης και μείωση δραστικότητας σε υψηλά επίπεδα ρεσβερατρόλης.

Αργότερα, στην επιστημονική έρευνα της Lanzilli και των συνεργατών της [143], εξετάστηκαν οι επιδράσεις της ρεσβερατρόλης και της πολυδατίνης, η οποία αποτελεί παράγωγο της ρεσβερατρόλης, στην in vitro παραγωγή Ιντερλευκίνης-17 (IL-17). Η IL-17 παράγεται από τα T βοηθητικά 17 λεμφοκύτταρα και δρα ως προφλεγμονώδης κυτταροκίνη. Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD3/anti-CD8, έτσι ώστε να διεγερθούν τα περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος (PBMC). Επίσης, έγιναν επιδράσεις και με πολυφαινολικές ενώσεις. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή IL-17 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Η ερευνητική εργασία της Rotondo και των συνεργατών της [144] διερεύνησε τις επιδράσεις της trans-ρεσβερατρόλης, μιας πολυφαινόλης που ανιχνεύεται στα περισσότερα κόκκινα κρασιά, στις λειτουργικές και βιοχημικές αποκρίσεις των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (PMN), ύστερα από in vitro ενεργοποίηση. Η trans-ρεσβερατρόλη φάνηκε ότι έχει σημαντική ανασταλτική επίδραση στις δραστικές ρίζες οξυγόνου που παράγονται από τα PMNs. Ακόμη, εμπόδισε την απελευθέρωση ελαστάσης και β-γλυκουρονιδάσης από PMNs που είχαν διεγερθεί με Fmlp (formyl methionyl leucyl phenylalamine) και C5a. Ανέστειλε την έκκριση ελαστάσης και β-γλυκουρονιδάσης και την παραγωγή των μεταβολιτών της 5-λιποξυγενάσης, LTB4, 6-trans-LTB4 και 12-trans-epi-LTB4 σε PMN που είχαν διεγερθεί με το ιονοφόρο του ασβεστίου A23187. Τα

παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι η trans-ρεσβερατρόλη εμπλέκεται στην απελευθέρωση μεσολαβητών της φλεγμονής από ενεργοποιημένα PMNs.

Σε παρόμοια έρευνα του Zhong και των συνεργατών του [145] εξετάστηκε η in vitro επίδραση της ρεσβερατρόλης στην απελευθέρωση IL-6 στο υπερκείμενο περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού διεγερμένων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και fMLP. Βρέθηκε ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις από $5x10^{-6}$ έως $4x10^{-5}$ mol/l αναστέλλει με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την απελευθέρωση IL-6 από τα μακροφάγα που εξετάσθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι παρεμπόδιση της εισροής ασβεστίου μέσα στα κύτταρα είναι ένας πιθανός μηχανισμός αναστολής της βιοσύνθεσης της IL-6 από τη δράση της ρεσβερατρόλης.

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών, καθώς και μίγματα πολυφαινολών που περιέχονται στα κρασιά, έχει φανεί ότι αυξάνουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου. Ο Gresele και η ερευνητική του ομάδα [146] αξιολόγησαν την in vitro επίδραση των επιπέδων της ρεσβερατρόλης ύστερα από μέτρια κατανάλωση κρασιού στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα αιμοπετάλια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη αύξησε σημαντικά την παραγωγή NO από τα διεγερμένα αιμοπετάλια, τη δραστικότητα της συνθάσης NO των αιμοπεταλίων, τη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης B, η οποία ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση των NOS και τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης VASP (Vasodilator-Activated Protein).

Το 2016, ο Martin και οι συνεργάτες του [147], εξέτασαν in vitro εάν η ρεσβερατρόλη είχε ανασταλτική επίδραση στην παραγωγή του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) σε καλλιέργεια ολικού αίματος ίππων, ύστερα από ερέθισμα με μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs). Ως PAMPs χρησιμοποιήθηκαν ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) των βακτηρίων και το λιποτεϊχοϊκό οξύ (LTA). Η μέτρηση της βιοδραστικότητας του TNF έγινε παρουσία φωσφορικού άλατος (δείγμα ελέγχου), αιθανόλης (δείγμα ελέγχου με διαλύτη), δεξαμεθαζόνης (αντιφλεγμονώδες δείγμα ελέγχου), LPS, LTA και τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης. Από τα αποτελέσματα, έγινε φανερό ότι η προσθήκη LPS και LTA στην κυτταροκαλλιέργεια ενεργοποιούσε την παραγωγή TNF. Αντίθετα, η προσθήκη δεξαμεθαζόνης φάνηκε ότι δρούσε ανασταλτικά, ενώ δεν παρατηρήθηκε αντι-φλεγμονώδης δράση της ρεσβερατρόλης.

Πίνακας 3. In vitro μελέτες-Κρασί και φαινολικά συστατικά

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
Λουτεολίνη Κερκετίνη Απιγενίνη Καμπφερόλη	IC_{50}(λουτεολίνη) →45μM IC_{50}(κερσετίνη) →80μM	• κύτταρα ποντικών RBL-2H3 • περιφερικά λευκοκύτταρα που είχαν διεγερθεί με το ινονοφόρο ασβεστίου A23187	In vitro επίδραση στη δραστικότητα της Acetyl CoA:lyso PAF ακετυλοτρανσφεράσης και στην παραγωγή PAF	⬇ δραστικότητας της lyso-PAF AT από τη λουτεολίνη και την κερσετίνη, αναστολή παραγωγής PAF από τα περιφερικά λευκοκύτταρα	Yanoshita et al, 1996
Ρεσβερατρόλη	1 mmol/L και 100 nmol/L	• διεγερμένα με LPS κύτταρα HUVEC • διεγερμένα με TNFα κύτταρα HSVEC • μονοκύτταρα U937	• επίδραση της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του ICAM-1 και του VCAM-1 • επίδραση στην προσκόλληση μονοκυττάρων U937	• ⬇ έκφρασης των ICAM-1 και VCAM-1 στα HUVEC και HSVEC • ⬇ προσκόλληση των μονοκυττάρων U937 σε HSVEC κύτταρα που είχαν διεγερθεί με LPS	Ferrero et al, 1998
Trans-ρεσβερατρόλη	IC_{50} (fMLP) →18.4μM ±1.8 (ελαστάση), 31μM±1.8 (γλυκουρονιδάση) IC_{50} (C5a)→41.6 μM±3.5 (ελαστάση), 42μM±3.8 (γλυκουρονιδάση)	Πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα (PMN) που είχαν διεγερθεί με το ιονοφόρο του ασβεστίου A23187	Επίδραση της ρεσβερατρόλης στις λειτουργικές και βιοχημικές αποκρίσεις	• ⬇ απελευθέρωσης ελαστάσης και β-γλυκουρονιδάσης από PMN που είχαν διεγερθεί με fMLP και C5a • ⬇ έκκριση ελαστάσης και β-γλυκουρονιδάσης και την παραγωγή των μεταβολιτών της 5-λιποξυγενάσης, LTB4, 6-trans-LTB4 και 12-trans-epi-LTB4	Rotondo et al, 1998
Ρεσβερατρόλη	$5x10^{-6}$ - $4x10^{-5}$ mol/l	περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού διεγερμένα με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και fMLP	In vitro επίδραση της ρεσβερατρόλης στην απελευθέρωση IL-6	⬇ απελευθέρωσης IL-6 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο	Zhong et al, 1999

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
Ρεσβερα-τρόλη	100mM	• CD4+ και CD8+ Τ κύτ-ταρα που παράγουν κυτταροκί-νες • CTLs	In vitro επίδραση στην ανάπτυξη των υπό μελέτη κυττάρων	• ↑ ανάπτυξης σε χαμηλά επίπε-δα και αναστο-λή ανάπτυξης σε υψηλά επί-πεδα ρεσβερα-τρόλης • ↑ κυτταροτοξικής δραστικότητας των CTLs και NK σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σε υψηλές συ-γκεντρώσεις ρεσβερατρόλης ↓	Falchetti et al, 2001
Ανθοκυανί-νες και υδροξυκινα-μικά οξέα από μύρτιλα και κράνμπε-ρι	1.1 mg/ml και 0.01 mg/ml	Κύτταρα του μικρο-αγγειακού ενδοθη-λίου (HMVEC)	• In vitro διε-ρεύνηση του αντιοξειδωτι-κού και αντι-φλεγμο-νώδους δυνα-μικού ανθο-κυανινών και υδροξυκινα-μικών οξέων • επίδραση στην βλάβη από το H_2O_2 και τον TNFα.	• Επώαση με αν-θοκυανίνες → ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS ↓ • Έκθεση στον TNFα και θρε-πτικό χωρίς αν-θοκυανίνες και υδροξυκιναμι-κά οξέα → απελευθέρωση IL-8, MCP-1 και ICAM-1 στο μέσο καλλιέρ-γειας ↑ • Κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε εμπλουτι-σμένο θρεπτι-κό→ ευαισθη-σία στον TNFα ↓	Youdim et al, 2002
Πολυφαινο-λικά συστα-τικά κόκκι-νου κρασιού	1, 3, 10, 30 και 100 μg/ml	• Λεία μυϊκά κύτταρα αν-θρώπινης αορτής (HASMCs) • Λεία μυϊκά κύτταρα αορτής αρα-ουραίου	In vitro επίδραση στην επαγόμενη από PDGF μετανάστευση των υπό μελέτη λείων μυϊκών κυττάρων και στην ενεργοποίηση μονοπατιών ενδοκυτ-ταρικής σηματοδότη-σης που μεσολαβούν την κυτταρική μετα-	• ↓ επαγόμενης από PDGF με-τανάστευσης των SMCs με δοσο-εξαρ-τώμενο τρόπο • Δύο πιθανά ση-ματοδοτικά μο-νοπάτια: ↓δρα-	Iijima et al, 2002

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
		(RASMCs)	νάστευση.	στηριότητας της PI3K και της φωσφορυλίωσης της p38MAPK με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο • ⬇φωσφορυλίωσης της MKK3/6, μιας ανοδικής κινάσης στο μονοπάτι της p38MAPK.	
Κόκκινο κρασί ποικιλίας *Rioja* Εκχύλισμα σταφυλιού *Vitis vinifera* Αλκοόλη (96%)	Κρασί → >0.24% περιεκτικότητα σε αλκοόλη, >0.15 mg πολυφαινολών/ λίτρο Εκχύλισμα σταφυλιού: >45 mg/l	Αιμοπετάλια	In vitro επίδραση της αλκοόλης, των πολυφαινολικών συστατικών του κόκκινου κρασιού και του εκχυλίσματος σταφυλιού στη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, ύστερα από προσθήκη ADP.	• Καμία επίδραση στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων από την αλκοόλη • ⬇Συσσωμάτωσης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο από το εκχύλισμα • ⬇Συσσωμάτωσης μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του κρασιού	De Lange et al, 2003
Κόκκινο και λευκό κρασί Χυμός σταφυλιού Αιθανόλη	100 μl και 200μl δείγματος σε τελικό όγκο διαλύματος RPMI 1 lt	PBMCs που είχαν διεγερθεί με μιτογόνες ουσίες (φυτοαιμαγλουτινίνη, κονκαναβαλίνη A)	Επίδραση στην παραγωγή νεοπτερίνης και την αποικοδόμηση τρυπτοφάνης που επάγονται από την IFN-γ	• ⬆ παραγωγής νεοπτερίνης και της αποικοδόμησης τρυπτοφάνης • Επίδραση με κρασιά και χυμό σταφυλιού → ⬇επιδράσεων της διέγερσης με μιτογόνα	Neurateur et al, 2004
Ρεσβερατρόλη	Κρασί →300 ml/ ημέρα, 15 ημέρες Ρεσβερατρόλη → 0.5 mmol/L	Αιμοπετάλια	In vitro επίδραση των επιπέδων της ρεσβερατρόλης ύστερα από μέτρια κατανάλωση κρασιού στην παρα-	⬆παραγωγής NO, δραστικότητας της συνθάσης NO των αιμοπεταλίων, φωσφορυλίωσης της	Gresele et al, 2008

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
			γωγή NO	πρωτεϊνικής κινάσης B	
Ρεσβερα-τρόλη	0.1, 1, 10 και 100 μg/ml	Μονοκύτταρα THP-1 που είχαν διεγερθεί με LPS	In vitro επίδραση στην παραγωγή IL-8 και στην ενεργοποίη-ση της MAPK, την αποικοδόμηση του IκBa, την ενεργοποίη-ση του NFκB και την έκφραση της COX-2.	• ⬇ παραγωγής IL-8 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο • ⬇ φωσφορυλίω-σης της MAPK και της ενεργο-ποίησης του NFκB	Oh et al, 2009
Ρεσβερα-τρόλη, Πολυ-δατίνη	0.01, 0.1, 1, 2.5, 5, 10 και 20 μg/ml	PBMCs	Επίδραση στην in vitro παραγωγή IL-17	⬇ παραγωγής IL-17 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο	Lanzilli et al, 2011
Κόκκινη ποι-κιλία κρα-σιού (Cabernet Suvignon) Λευκή ποικι-λία κρασιού (Robola) Ρεσβερα-τρόλη, κερ-κετίνη	• Λιπιδικό κλάσμα (Robola) → 1.75 ± 0.90 mg/ml(lyso-PAF AT), 2.91 ± 1.3 mg/ml(PAF CPT) (Caber-net Sauvi-gnon) → 1.61 ± 1.20 mg/ml(lyso-PAF AT), 2.84 ± 0.9 mg/ml(PAF CPT) • Υδατικό κλάσμα (Caber-net Sauvi-gnon) → 0.050 ± 0.010 mg/ml	Κύτταρα U937	In vitro επίδραση στα ένζυμα βιοσύνθεσης του PAF lyso-PAF-AT, PAF-CPT και στο ένζυ-μο αποικοδόμησης του PAF, PAF AH	• ⬇ Δραστικότη-τας lyso-PAF-AT, PAF-CPT στα δείγματα που δεν περιεί-χαν κύτταρα • ⬆ Δραστικότητας lyso-PAF-AT, PAF-CPT σε χα-μηλές συγκε-ντρώσεις των υδατικών εκχυ-λισμάτων • ⬇ Δραστικότητας της PAF-CPT σε υψηλές συγκε-ντρώσεις • Όλα τα κλάσματα είχαν μικρή ή κα-θόλου επίδρα-ση στην PAF AH.	Xan-thopoulou et al, 2014

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
	• P →0.136 ± 0.070 mg/ml (lyso-PAF AT), 0.090 ± 0.032 mg/ml (PAF CPT) • K →>0.2 mg/ml (lyso-PAF AT), 0.037 mg/ml (PAF CPT)				
Τυροσόλη, Ρεσβερα-τρόλη και τα οξειδωμένα παράγωγά τους	• T →48 μM ±11 (lyso PAF-AT), 246 μM ±61 (PAF-CPT) • P →157 μM±77(lyso PAF-AT), 294 μM ±102 (PAF-CPT)	Κύτταρα U937 διε-γερμένα με IL-1β	In vitro επίδραση στη σύνθεση του PAF	• ⬇ 50% της επί-δρασης της IL-1β στη lyso PAF-AT και την-PAF-CPT • Παράγωγα T→παρόμοια ανασταλτική δραστηριότητα με T	Vla-chogianni et al, 2015
Ρεσβερα-τρόλη	22.8, 2.28 και 0.228 μg/ml	Καλλιέργεια ολικού αίματος ίππων, ύστερα από επίδρα-ση με LPS και LTA	In vitro επίδραση στην παραγωγή TNF	Δεν παρατηρήθηκε αντιφλεγμονώδης επί-δραση της ρεσβερα-τρόλης	Martin et al, 2016

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Παραπροϊόντα οινοποίησης

Τα κυριότερα παραπροϊόντα από την οινοπαραγωγική διαδικασία αντιπροσωπεύονται από: οργανικά απόβλητα (στέμφυλα, που περιέχουν σπόρους, πολτό και δέρματα, στελέχη σταφυλιών και φύλλα σταφυλιών), απόβλητα, εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (CO_2, πτητικές οργανικές ενώσεις) και ανόργανα απόβλητα [148].

3.1Στέμφυλα

Όσον αφορά τη γενική σύνθεση των στεμφύλων, το ποσοστό υγρασίας κυμαίνεται από 50% έως 72%, ανάλογα με την εξεταζόμενη ποικιλία σταφυλιών και την κατάσταση ωρίμανσης. Τα αδιάλυτα υπολείμματα από αυτό το υλικό περιέχουν λιγνίνη σε ποσοστό που κυμαίνεται από 16,8% έως 24,2% και πρωτεΐνες σε ποσοστό μικρότερο από 4%. Γενικά, οι πεπτικές ουσίες είναι το κύριο συστατικό πολυμερούς τύπου των κυτταρικών τοιχωμάτων των στεμφύλων και κυμαίνονται σε ποσοστό από 37% έως 54% του συνόλου των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Η κυτταρίνη είναι ο δεύτερος σε αφθονία τύπος πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος στα στέμφυλα, κυμαινόμενη από 27% έως 37% [149]. Λόγω αυτής της περιεκτικότητας σε μη εύπεπτους πολυσακχαρίτες, μπορεί να απαιτούνται επιπρόσθετες διεργασίες ζύμωσης για την αποφυγή γαστρεντερικών διαταραχών όταν το υλικό αυτό αξιοποιείται ως πρόσθετο πολύπλοκων τροφών [116].

Λαμβάνοντας υπ’ όψιν τα διακριτά μέρη των στεμφύλων (σπόροι και φλούδες), η σχετική αναλογία των σπόρων ποικίλει από 38% έως 52% του ξηρού υλικού [150]. Από την ανάλυση της σύστασης των σπόρων του σταφυλιού έχει φανεί ότι περιέχουν 40% ίνες, 16% αιθέρια έλαια, 11% πρωτεΐνη, 7% σύνθετα φαινολικά συστατικά, όπως οι τανίνες, καθώς και άλλες ουσίες, όπως σάκχαρα και μέταλλα [151]. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στο περιεχόμενο των σπόρων σε πολυφαινόλες, οι οποίες κυμαίνονται από 60% έως 70% των συνολικών συστατικών που μπορούν να απομονωθούν. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων, δεδομένου ότι κατά τη συμπίεση των σταφυλιών εξάγεται μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών των ενώσεων [149].

Οι φλούδες των σταφυλιών αποτελούν το 65% του συνολικού υλικού των στεμφύλων. Έχουν αναφερθεί ως πλούσια πηγή σε φαινολικά συστατικά, παρόλο που η τελική απόδοση εξαρτάται από την ειδική διαδικασία οινοποίησης και τη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε [126,152].

Εικόνα 16. Στέμφυλα

3.2Κοτσάνια σταφυλιών

Τα κοτσάνια των σταφυλιών αποτελούν ένα παραπροϊόν της βιομηχανίας οινοποίησης, το οποίο είναι γνωστό για την περιεκτικότητά του σε στυπτικές ενώσεις, κυρίως προανθοκυανιδίνες [153]. Το υλικό αυτό απομακρύνεται πριν τη διαδικασία της οινοποίησης, προκειμένου να αποφευχθεί η στυπτικότητα του κρασιού ή η αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Ωστόσο, μπορεί να συμπεριληφθεί στα παραπροϊόντα της οινοποίησης. Η ποσότητα των κοτσανιών ποικίλει μεταξύ 1.4% και 7% του συνόλου της επεξεργασμένης πρώτης ύλης. Η εμπορική αξία των κοτσανιών των σταφυλιών είναι χαμηλή και χρησιμοποιούνται, κατά κύριο λόγο, ως ζωοτροφή ή λίπασμα εδάφους. Το μέσο ποσοστό υγρασίας των κοτσανιών κυμαίνεται μεταξύ 55% και 80%. Η έντονη διακύμανση του ποσοστού υγρασίας αποδίδεται στις διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών. Η περιεκτικότητα των κοτσανιών σε αδιάλυτα αλκοολικά κατάλοιπα είναι, κατά μέσο όρο, 71% της συνολικής ξηρής ύλης, ενώ δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές ανάμεσα σε κόκκινες και λευκές ποικιλίες [149]. Όσον αφορά τη σύστασή τους σε φαινολικές ενώσεις, έχει επιβεβαιωθεί ότι τα κοτσάνια περιέχουν φλαβαν-3-όλες, υδροξυκιναμικά οξέα, μονομερείς και ολιγομερείς φλαβονόλες, αλλά και στιλβένια [154].

3.3Φύλλα σταφυλιών

Τα φύλα είναι από τα λιγότερο μελετημένα μέλη των σταφυλιών, ωστόσο, από την ανάλυση της σύστασής τους, έχει φανεί ότι περιέχουν οργανικά και φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, τανίνες, προκυανιδίνες, λιπίδια, ένζυμα, βιταμίνες, καροτενοειδή, τερπένια και σάκχαρα [155]. Η πλούσια χημική σύσταση των φύλλων έχει εγείρει το ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο φυτικό υλικό, καθώς φαίνεται να είναι μια πιθανή πηγή ενώσεων με θρεπτικές ιδιότητες και βιολογικό δυναμικό.

3.4Οινολάσπες

Οι οινολάσπες είναι τα κατάλοιπα που σχηματίζονται στον πυθμένα των δοχείων που περιέχουν κρασί, μετά τη ζύμωση, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή έπειτα από συγκεκριμένες μεθόδους επεξεργασίας. Μπορούν, όμως, να προκύψουν και ύστερα από τη διήθηση ή τη φυγοκέντρηση του προϊόντος. Οι οινολάσπες αποτελούνται, κατά κύριο λόγο, από μικροοργανισμούς (κυρίως ζυμομύκητες), ταρταρικό οξύ, ανόργανη ύλη και φαινολικές ενώσεις [156]. Τα κατάλοιπα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του κρασιού, αφού αντιδρούν με πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες συσχετίζονται άμεσα με το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τις απορροφούν. Ακόμη, οι οινολάσπες απελευθερώνουν ένζυμα, τα οποία ευνοούν την υδρόλυση και τον μετασχηματισμό των πολυφαινολικών υποστρωμάτων σε φαινολικά οξέα με μεγάλη σημασία, όπως το γαλλικό ή το ελλαγικό οξύ [157]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι περιέχουν ανθοκυανίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις [158].

Εικόνα 17. Οινολάσπη

3.5 Αξιοποίηση παρα-προϊόντων οινοποίησης

Οι καλλιέργειες σταφυλιών είναι μια από τις πιο αναπτυγμένες αγρο-οικονομικές δραστηριότητες στον κόσμο, με περισσότερους από 60 εκατομμύρια τόνους παραγωγής κάθε χρόνο παγκοσμίως [116]. Η παραγωγή αυτή αφορά, κυρίως, την άμεση κατανάλωση με τη μορφή επιτραπέζιου φρούτου, χυμού και σταφίδων. Εκτός από τις κύριες αυτές χρήσεις, ένα μεγάλο μέρος της παραγωγής σταφυλιών προορίζεται για διαδικασίες οινοποίησης, οι οποίες αποτελούν παραδοσιακή δραστηριότητα σε πολλές χώρες της νοτιοδυτικής Ευρώπης (Γαλλία, Ελλάδα, Ιταλία, Πορτογαλία και Ισπανία) [159].

Μετά την εξαγωγή του χυμού των σταφυλιών, ο εναπομείνας πολτός και τα κοτσάνια δεν αξιοποιούνται ως επικερδή απόβλητα, αλλά καταλήγουν, κατά κύριο λόγο, στην κομποστοποίηση ή απορρίπτονται, δημιουργώντας πιθανώς περιβαλλοντικά προβλήματα [160]. Η διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη για βιομηχανική παραγωγή φιλική προς το περιβάλλον, σε συνδυασμό με

την απαίτηση για αποτελεσματικότερο χειρισμό και ελαχιστοποίηση του κόστους των παραπροϊόντων της βιομηχανίας οινοποίησης έχουν οδηγήσει στην υιοθέτηση προσεγγίσεων ολοκληρωμένης διαχείρισης αποβλήτων [161,162]. Η ανάπτυξη καινοτόμων διαδικασιών ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης τέτοιων καταλοίπων συνάδει με τη χρήση οικολογικών υλικών, ανανεώσιμων πηγών θρεπτικών και βιοενεργών συστατικών για τους τομείς τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

Υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί για τις τρέχουσες διαθέσιμες επιλογές για επαναχρησιμοποίηση αυτών των μη κερδοφόρων υλικών. Για παράδειγμα όταν χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή, ορισμένα ζώα εμφανίζουν δυσανεξία σε κάποια συστατικά, όπως οι συμπυκνωμένες τανίνες, οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά την διαδικασία της πέψης [116].

Ωστόσο, ορισμένες πολυφαινόλες που υπάρχουν στα παραπροϊόντα των οινοποιήσεων είναι γνωστό ότι είναι φυτοτοξικές και εμφανίζουν αντιμικροβιακές επιδράσεις. Ως εκ τούτου, η αξιοποίησή τους ως πηγή βιοενεργών φυτοχημικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές, καλλυντικές και βιομηχανίες τροφίμων μπορούν να αποτελέσουν μια αποδοτική, κερδοφόρα και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση για τα υπολείμματα [163].

Από τη σύνθεσή τους, τα στέμφυλα ξεχωρίζουν ως ένα κατάλληλο υλικό για χρήση σε διάφορες διεργασίες, ιδιαίτερα για την εξαγωγή ελαίου από το σπόρο του σταφυλιού και πολυφαινολών (κυρίως ανθοκυανίνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φαινολικά οξέα και ρεσβερατρόλη), την παραγωγή κιτρικού οξέος, μεθανόλης, αιθανόλης και ξανθάνης μέσω ζύμωσης και την παραγωγή ενέργειας με μεθανοποίηση. Με βάση το περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι τα συγκεκριμένα παραπροϊόντα χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και τα συνιστούν ως μια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών για βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων [164].

Η πλούσια ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με το αντιοξειδωτικό δυναμικό των εκχυλισμάτων κρασιού συνετέλεσε στην ανάπτυξη μιας βιομηχανίας που παράγει εκχυλίσματα σπόρων και φλοιού, από απόβλητα οινοποιείων και τα προωθεί ως συμπληρώματα διατροφής [125]. Περαιτέρω έρευνα απέδειξε ότι οι σπόροι του σταφυλιού έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, σε σχέση με το φλοιό. Συνήθως, οι σπόροι και ο φλοιός απορρίπτονται πριν την κατεργασία του λευκού κρασιού. Κατά συνέπεια, αποτελούν μια καλή πρώτη ύλη για την απομόνωση πολυφαινολών [165]. Η HPLC (High-performance liquid chromatography) ανάλυση φαινολικών συστατικών εκχυλίσματος κόκκινου κρασιού και φλοιού σταφυλιών έδειξε ότι είναι πιθανότερο να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε παράγωγα κιναμικού οξέος, φλαβονόλες και

προκυανιδίνες. Οι προκυανιδίνες βρίσκονται σε αφθονία στους σπόρους και μεταφέρονται στο κόκκινο κρασί, κατά τη ζύμωση του μούστου. Σε αντίθεση με τους σπόρους, τα εκχυλίσματα του φλοιού έχουν σχετικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε προκυανιδίνες και ανθοκυανίνες και μικρότερη περιεκτικότητα σε κιναμικά οξέα [166].

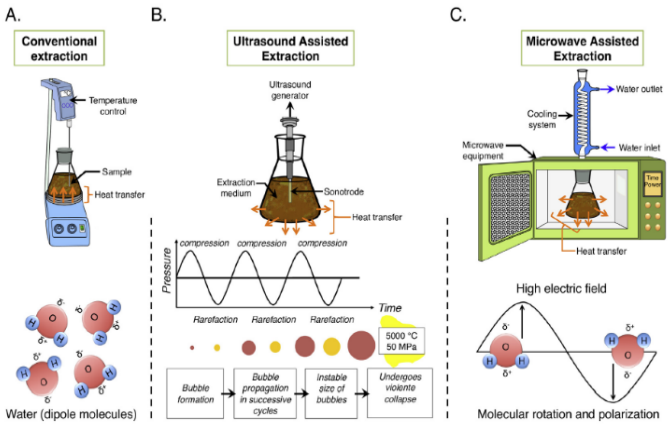
Αν και οι in vitro έρευνες φαίνεται να επιβεβαιώνουν τον ευεργετικό ρόλο της κατανάλωσης κρασιού (Πίνακας 3) και την υψηλή περιεκτικότητα των παραπροϊόντων της οινοποιίας σε φαινολικές ενώσεις, οι κλινικές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους είναι ελάχιστες. Επίσης, καλό θα ήταν να προσδιοριστούν και οι ασφαλείς δόσεις αυτών των ουσιών. Σε μελέτη τοξικότητας δύο εβδομάδων σε ποντίκια, από τις εταιρείες Polyphenolics και Canandaigua Wine, βρέθηκε ότι η κατανάλωση πολυφαινολών από σπόρους σταφυλιού σε δόσεις έως 3 g/kg σωματικού βάρους, είναι ασφαλής [125].

3.6 Παραλαβή συστατικών-Εκχύλιση

Υψίστης σημασίας ζήτημα για τη σωστή αξιοποίηση των παρα-προϊόντων της οινοποίησης αποτελεί η μέθοδος εκχύλισης που επιλέγεται κάθε φορά. Επομένως, η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των εκχυλισμάτων πολυφαινολών από παραπροϊόντα της οινοποιίας εξαρτάται, όχι μόνο από την πηγή του φυτικού υλικού της εκάστοτε ποικιλίας, τις αγρο-κλιματικές συνθήκες της περιοχής παραγωγής και τον ιστό που μελετάται, αλλά και από τις φυσικο-χημικές συνθήκες της βιομηχανικής διαδικασίας, καθώς και από το συνδυασμό διαλυτών και των διαδικασιών εκχύλισης που χρησιμοποιούνται. Άλλοι παράγοντες, όπως η ποιότητα του φυτικού υλικού, οι συνθήκες αποθήκευσης και η προεπεξεργασία του παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του βιοχημικού προφίλ των φαινολικών εκχυλισμάτων και συνεπώς της δυνητικής βιολογικής τους δραστικότητας. Δεδομένου ο τελικός στόχος της χρήσης των παρα-προϊόντων είναι η αξιοποίηση της δραστικότητας των βιοενεργών ενώσεων που περιέχουν, είναι απαραίτητο να γίνει αυστηρός καθαρισμός του εκχυλίσματος, μέσω του οποίου θα απομακρυνθούν όλα τα αδρανή και ανεπιθύμητα συστατικά, τα οποία πιθανώς να επηρεάζουν την τελική βιολογική δράση των εκχυλισμάτων [116].

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πολλές τεχνικές εκχύλισης, ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην απομόνωση φαινολικών ενώσεων από παρα-προϊόντα οινοποίησης. Η πιο διαδεδομένη τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πολυφαινολικών συστατικών είναι η εκχύλιση στερεού/υγρού διαλύτη (Solid/Liquid Extraction, SLE). Παραδείγματα άλλων αποτελεσματικών τεχνικών

αποτελούν η εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical Fluids Extraction, SFE), η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση (Ultrasound Assisted Extraction, UAE), η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (Microwave Assisted Extraction, MAE) και η εκχύλιση υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας (High Pressure and Temperature Extraction, HPTE) [167]. Όσον αφορά τη μέθοδο SLE, η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως ο τύπος του διαλύτη, οι σχετικές αναλογίες των διαλυτών, ο λόγος διαλύτη/δείγματος, ο τύπος των φαινολικών ενώσεων που μελετώνται, η θερμοκρασία και ο χρόνος της εκχύλισης και επομένως, δεν υπάρχει μια μόνο συνθήκη ή διαδικασία εκχύλισης, ιδανική για όλους τους τύπους παραπροϊόντων οινοποίησης.



Εικόνα 18. Μέθοδοι εκχύλισης [168]

3.7 Αντι-φλεγμονώδης δράση εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης. In vitro μελέτες

Οι επιστημονικές δημοσιεύσεις, στις οποίες εξετάζονται οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης είναι περιορισμένες.

Η Leifert και οι συνεργάτες της [168] διερεύνησαν την πιθανότητα οι ήδη γνωστές πλειοτροπικές ιδιότητες ορισμένων φαινολικών εκχυλισμάτων να περιλαμβάνουν και την αναστολή της πρόσληψης χοληστερόλης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης, εξετάστηκε η ικανότητά τους να καταστέλλουν έναν συγκεκριμένο στόχο της φλεγμονώδους απόκρισης, την 5-λιποοξυγενάση (5-LOX). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν υγρό εκχύλισμα καρπού σταφυλιού, ολικό εκχύλισμα καρπού σταφυλιού, μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή κλάσματα του ολικού εκχυλίσματος και πολυφαινολικές ενώσεις κόκκινου κρασιού. Πραγματοποιήθηκε In vitro εξέταση της επίδρασης εκχυλισμάτων καρπού σταφυλιού στην πρόσληψη χοληστερόλης, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναστολή της 5-λιποοξυγενάσης (5-LOX) σε κύτταρα HT29, Caco2, HepG2 και

HuTu80 που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό είτε με εκχύλισμα καρπών σταφυλιού είτε με πολυφαινολικές ενώσεις. Επώαση των κυττάρων HT29, Caco2, HepG2 και HuTu80 σε θρεπτικό μέσο που περιείχε χοληστερόλη, παρουσία εκχυλίσματος καρπών σταφυλιού ή πολυφαινολικών ενώσεων κρασιού, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρόσληψης χοληστερόλης κατά 66%. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αύξηση της απόπτωσης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα HT29, καθώς και αναστολή της δραστικότητας της 5-λιποοξυγενάσης.

Ο Rodríguez-Morgado και οι συνεργάτες του [169], με τη χρήση πρωτεασών παρασκεύασαν ένα ενζυμικό εκχύλισμα από στέμφυλα και εξέτασαν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποίησαν N13 μικρογλοιακά κύτταρα, τα οποία διεγέρθηκαν με LPS και ακολούθως μέτρησαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων φλεγμονωδών μορίων, όπως η συνθάση του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS), ο TNFα, η IL-1β, το μόριο πρόσδεσης σε ιονισμένο α-σβέστιο-1 (Iba-1) και ο TLR-4. Το εκχύλισμα δοκιμάστηκε σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 10 μg/ml. Φάνηκε ότι, σε όλες τις συγκεντρώσεις, η επώαση των κυττάρων με το εκχύλισμα οδηγούσε σε μείωση των επιπέδων των mRNAs όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν.

Η ερευνητική ομάδα της Magrone [170] απομόνωσε πολυφαινόλες από καρπούς κόκκινων σταφυλιών και εξέτασε την ικανότητά τους να ρυθμίζουν τις αποκρίσεις κυτταροκινών από τα PBMCs παχύσαρκων ατόμων, σε σύγκριση με ίδιο αριθμό υγιών ατόμων. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι οι πολυφαινόλες δεν επηρέασαν τα επίπεδα Ιντερφερόνης-γ (IFN-γ), Ιντερλευκίνης-4 (IL-4) και Ιντερλευκίνης-17 (IL-17). Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων Ιντερλευκίνης-2 (IL-2) στους υγιείς εθελοντές και μείωση στους παχύσαρκους. Σημαντικό εύρημα της παρούσας έρευνας ήταν η αδυναμία των πολυφαινολών να επάγουν την παραγωγή Ιντερλευκίνης-21 (IL-21) σε παχύσαρκα άτομα, δρώντας προστατευτικά για τον ξενιστή, σε αντίθεση με τα υγιή, στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της συγκεκριμένης κυτταροκίνης.

Και η εργασία του Nieto και των συνεργατών του [171] εστιάστηκε στην αντι-φλεγμονώδη δράση παρα-προϊόντων οινοποίησης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση στερεού/υγρού από κοτσάνια και καρπούς σταφυλιών και εξετάστηκε η επίδραση τους στην έκκριση των κυτταροκινών TNF-α, IL-1β και IL-6, από THP-1 ανθρώπινα μακροφάγα. Προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις, τα κύτταρα διεγείρονταν είτε με LPS είτε με ανθρώπινη οξειδωμένη LDL χοληστερόλη (OX-LDL). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν γινόταν διέγερση των μακροφάγων με OX-LDL, τα εκχυλίσματα, σε συγκέντρωση 10 μg/mL, προκαλούσαν αναστολή της έκκρισης όλων των κυτταροκινών. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα διεγείρονταν με LPS, μόνο το εκχύλισμα

των κοτσανιών μπορούσε να προκαλέσει αναστολή της έκκρισης της IL-6. Για να κατανοηθεί περαιτέρω η δράση των εκχυλισμάτων, πραγματοποιήθηκε HPLC ανάλυση, μέσω της οποίας φάνηκε ότι το εκχύλισμα των καρπών περιείχε, κυρίως, προανθοκυανιδίνες. Το εκχύλισμα των κοτσανιών, το οποίο εμφάνισε και πιο ισχυρή αντι-φλεγμονώδη δράση, περιείχε σημαντική ποσότητα trans ρεσβερατρόλης και παραγώγων κερκετίνης.

Πίνακας 4. In vitro μελέτες-Παρα-προϊόντα οινοποίησης

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
Υγρό εκχύλισμα καρπού σταφυλιού **Ολικό εκχύλισμα καρπού σταφυλιού** **Μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή κλάσματα του ολικού εκχυλίσματος** **Πολυφαινολικές ενώσεις κόκκινου κρασιού**	500 μg/mL	HT29, Caco2, HepG2 και HuTu80 που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό είτε με εκχύλισμα καρπών σταφυλιού είτε με πολυφαινολικές ενώσεις	In vitro εξέταση της επίδρασης εκχυλισμάτων καρπού σταφυλιού στην πρόσληψη χοληστερόλης, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναστολή της 5-λιποοξυγενάσης (5-LOX)	• ⬇ πρόσληψης χοληστερόλης • ⬇ κυτταρικού πολλαπλασιασμού • ⬆ απόπτωσης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα HT29 • ⬇ δραστικότητας της 5-λιποοξυγενάσης	Leifert et al, 2008
Ενζυμικό εκχύλισμα στεμφύλων	1, 5 και 10 μg/ml	N13 μικρογλοιακά κύτταρα	Επίδραση στην έκφραση γονιδίων: • της συνθάσης Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) • TNFα • IL-1β • Μόριο πρόσδεσης σε ιονισμένο ασβέστιο-1 (Iba-1) • TLR-4 από κύτταρα που είχαν διεγερθεί με LPS	⬇ Των επιπέδων mRNA όλων των μορίων	Rodríguez-Morgado et al, 2015
Εκχύλισμα καρ-	1, 3 και 5 μg πολυ-	PBMCs παχύ-	In vitro επίδραση	• ⬆ έκκριση IL-10 σε ⬇	Magrone

Υπό εξέταση συστατικό	Ποσότητα	Είδος κυττάρου	Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αναφορά
πών από την ποικιλία κόκκινων σταφυλιών *Canosina*	φαινολικών/ml εκχυλίσματος	σαρκων ατόμων	πολυφαινολικών συστατικών από εκχυλίσματα καρπών σταφυλιού στην έκκριση κυτταροκινών	υγιείς, αλλά ↓ στους παχύσαρκους • ↑ των επιπέδων IL-21 σε υγιείς	et al, 2017
Εκχυλίσματα από κοτσάνια και καρπούς σταφυλιού	10 μg/mL και για τα δύο εκχυλίσματα	THP-1 ανθρώπινα μακροφάγα	Επίδραση στην έκκριση κυτταροκινώνTNF-a, IL-1β, IL-6 και IL-10 από THP-1 ανθρώπινα μακροφάγα που είχαν διεγερθεί με LPS ή με ανθρώπινη οξειδωμένη χοληστερόλη LDL	• Διέγερση κυττάρων με OX-LDL→ ↓ έκκριση κυτταροκινών και από τα δύο εκχυλίσματα • Διέγερση κυττάρων με LPS→ ↓ έκκριση Il-6, μόνο από το εκχύλισμα των κοτσανιών	Nieto et al, 2017

4. Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσει την αντι-φλεγμονώδη δράση των εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης. Για το σκοπό αυτό εκχυλίστηκαν τα βιοδραστικά συστατικά παραπροϊόντων οινοποίησης από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού με διάλυμα υδατικής αιθανόλης και με τη μέθοδο Bligh Dyer, προσδιορίστηκε το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά συστατικά και εξετάσθηκε η κυτταροτοξικότητά τους καθώς και η ικανότητά τους να αναστέλλουν την προκαλούμενη από LPS έκκριση κυτταροκινών από περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs) υγιών εθελοντών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μεθοδολογία

5.1 Εκχύλιση παραπροϊόντων οινοποιίας

Για την παρασκευή εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οινοποιίας χρησιμοποιήθηκαν παρα-προϊόντα από τέσσερις ποικιλίες κόκκινου κρασιού: 1)Ξινόμαυρο, 2)Syrah, 3)Cabernet Franc και 4)Cabernet Sauvignon. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, με 80% αιθανόλη και με Bligh-Dyer. Για την εκχύλιση σε αιθανόλη παρελήφθησαν 25 γραμμάρια στεμφύλων από κάθε ποικιλία, τα οποία διαλύθηκαν σε 125 ml αιθανόλη 80% (αναλογία 1:5). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες: 45 ^{o}C, 120 rpm, για 20 ώρες. Από τις δύο εκχυλίσεις, προέκυψαν ένα αιθανολικό εκχύλισμα και ένα χλωροφορμικό εκχύλισμα.

Εικόνα 19. Δείγμα στεμφύλων

5.2 Bligh-Dyer

Αρχή της Μεθόδου [172]

Τα λιποειδή διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύ-στημα διαλυτών $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O (1:2:0.8, v/v/v) επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών ενός δείγματος, καθώς και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών, όπως αλάτων, αμινοξέων ή σακχάρων. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O (1:1:0.9, v/v/v), στη χλωροφορμική φάση κατανέμονται μόνο τα λιποειδή, ενώ στην υδατική φάση κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του βιολογικού δείγματος.

Αναλυτική Πορεία:

1^{η} Ημέρα → Σε δοχείο ενός λίτρου προστέθηκαν 1000 mg αιθανολικού εκχυλίσματος και 7,27 ml μεθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή για 10 λεπτά. Συμπληρώθηκαν 3,63 ml χλωρο-φορμίου και το μίγμα αναδεύτηκε και αφέθηκε για 10 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 1,086 ml νερό,

ώστε να προκύψει μονοφασικό σύστημα $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O (1:2:0.8, v/v/v) και το μίγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Παρέμεινε στους 45 °C, υπό ανάδευση σε 120 rpm, για 20 ώρες.

2η Ημέρα → Το μίγμα διηθήθηκε από ηθμό με κενό αέρος (Buchner), ώστε να απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη (0.5 lt) και έπειτα σε σφαιρική φιάλη, σε περιστρεφόμενη συσκευή, υπό πίεση (flash evaporator), προκειμένου να εξατμιστούν οι διαλύτες (200 έως 60 mbar). Το διήθημα (που πλέον περιείχε μόνο νερό) μεταφέρθηκε σε κυλινδρικό σωλήνα, ώστε να υπολογιστεί ο όγκος του. Ακολούθως, μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν 3,63 ml χλωροφορμίου και 3,6408 ml νερό, ώστε να προκύψει το διφασικό σύστημα $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O (1:1:0.9, v/v/v). Μετά από ισχυρή ανάδευση, το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία, μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Τέλος, παρελήφθη η χλωροφορμική φάση (κάτω) σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη (0.5 lt) και πραγματοποιήθηκε εξάτμιση στο flash evaporator. Η ποσότητα της χλωροφορμικής φάσης που παρελήφθη ήταν 217 mg. Πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση αιθανόλη 80%, παραλαβή με πιπέτα Pasteur σε πλαστικό σωλήνα και αποθήκευση στους -20 °C. Η υδατική φάση παρελήφθη σε σφαιρική φιάλη και πραγματοποιήθηκε εξάτμιση. Ακολούθησε επαναδιάλυση με νερό και λυοφιλιοποίηση. Από την υδατική φάση, ζυγίστηκαν 439,2 mg και έγινε επαναδιάλυση σε αιθανόλη 80%.

Σημείωση: Κατά τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δεν χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη, αλλά αιθανόλη 80%.

5.3 Προσδιορισμός Φαινολικών Συστατικών

Αρχή της Μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα οξέα ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μίγμα ενώσεων με σθένος +6 και +5, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου με μπλε χρώμα, το οποίο φωτομετρείται στα 725nm.

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα Folin-Ciocalteu
- Πρότυπο διάλυμα Γαλλικού Οξέος : Για την παρασκευή διαλύματος γαλλικού οξέος, έγινε προσθήκη 0.005 γραμμαρίων σκόνης γαλλικού οξέος σε προζυγισμένο σωληνάκι και 5 ml αιθανόλης

- Διάλυμα Na_2CO_3 35% v/w : Ζυγίστηκαν 35 γραμμάρια Na_2CO_3 και διαλύθηκαν σε 100 ml νερό
- Διαλύματα εκχυλισμάτων : Έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων στους διαλύτες

Αναλυτική πορεία

Για τη διαμόρφωση της καμπύλης γαλλικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση γαλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, το σημείο Τ ήταν το τυφλό δείγμα ελέγχου (0 μl GA), ενώ τα δείγματα Σ1, Σ2, Σ3, Σ4, Σ5 και Σ6 αποτελούσαν σημεία διαδοχικής αύξησης της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος (2 μl, 5 μl, 25 μl, 30 μl, 45 μl και 60 μl αντίστοιχα). Τα δείγματα εκχυλισμάτων στα οποία έγινε προσδιορισμός φαινολικών οξέων ήταν το ολικό αιθανολικό εκχύλισμα (EtR), το χλωροφορμικό κλάσμα του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος (EtR C) και το υδατικό κλάσμα του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος (EtR W). Τα παραπάνω δείγματα εξετάστηκαν χωρίς αραίωση, αλλά και αραιωμένα με αιθανόλη σε αναλογίες 1:10, 1:100 και 1:1000.

Οι διαλύτες όλων των δειγμάτων εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 3.5 ml νερού και 100 μl του Folin-Ciocalteu. Μετά το πέρας τριών λεπτών από την προσθήκη Folin-Ciocalteu, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 400 μl Na_2CO_3 και έγινε ισχυρή ανάδευση. Τα σωληνάκια που περιείχαν τα δείγματα αφέθηκαν στη σκιά για μία ώρα. Μετά τη μία ώρα παρατηρήθηκε η εμφάνιση μπλε χρώματος στα δείγματα, η ένταση του οποίου διέφερε ανάλογα με τη συγκέντρωση των φαινολικών.

Ακολούθως, 200 μl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν στο αντίστοιχο πηγαδάκι ενός 96 well plate και έγινε μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 725nm. Τέλος, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς απορρόφησης-μg γαλλικού οξέος. Στην εξίσωση της καμπύλης εισήχθησαν οι τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων και υπολογίζεται η ποσότητα των φαινολικών ενώσεών τους. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg γαλλικού οξέος/mg παραπροϊόντων.

5.4 Απομόνωση PBMCs

Διαλύματα:

Παρασκευή διαλύματος λύσης

Για την παρασκευή του διαλύματος λύσης, πραγματοποιήθηκε διάλυση 8.29 γραμμαρίων NH_4Cl, 1.0012 γραμμαρίων $KHCO_3$ και 0.038 γραμμαρίων EDTA σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Πριν από τη χρήση πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα του διαλύματος.

Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Για την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού, πραγματοποιήθηκε ανάμειξη 44 ml RPMI, 5 ml NCS, Ο.5 ml γλουταμίνης και 0.5 ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης, σε πλαστικό σωλήνα, με τελικό όγκο 50 ml. Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού έγινε σε στείρες συνθήκες.

Αιμοληψία

Οι εκάστοτε εθελοντές προσέρχονταν στη Μεταβολική Μονάδα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου την ημέρα του πειράματος στις 9-10 π.μ., ύστερα από 9ωρη νηστεία. Όλοι οι εθελοντές ήταν φαινομενικά υγιείς και είχαν δηλώσει ότι δεν είχαν λάβει φαρμακευτική αγωγή τις τελευταίες 20 ημέρες.

Από κάθε εθελοντή παρελήφθησαν 45 ml αίματος, τα οποία χωρίστηκαν σε ίσες ποσότητες μοιράστηκαν σε πλαστικούς σωλήνες των 50 ml, οι οποίοι περιείχαν 1 ml EDTA. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν ελαφρώς, προκειμένου να αποφευχθεί η πήξη του αίματος. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε θάλαμο laminar (στείρες συνθήκες).

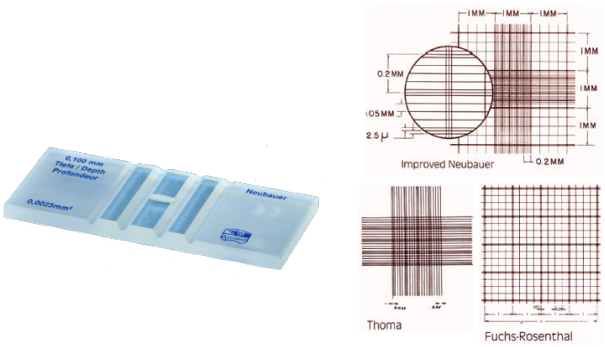
Διαδικασία Απομόνωσης

Σε κάθε σωλήνα που περιείχε αίμα (15 ml), προστέθηκε ίση ποσότητα PBS (15 ml) και έγινε ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση 20 ml αίματος-PBS σε 15 ml ficol, τα οποία είχαν ήδη τοποθετηθεί σε 4 νέους σωλήνες, όγκου 50 ml. Για την επίστρωση του αίματος χρησιμοποιήθηκε σιφώνι, το οποίο τοποθετήθηκε με κλίση επάνω στο τοίχωμα του σωλήνα, προκειμένου να αποφευχθεί η διάχυση των κυττάρων του αίματος μέσα στο ficol. Δημιουργήθηκαν, έτσι, δύο διακριτές στιβάδες. Η κάτω στιβάδα ήταν διάφανη και περιείχε ficol και η πάνω στιβάδα ήταν κόκκινη και περιείχε το διάλυμα του αίματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 1800 rpm, στους 20 ^{o}C, για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης ήταν ευδιάκριτες τρεις διαφορετικές στιβάδες: η επάνω στιβάδα περιείχε πλάσμα (κιτρινωπό χρώμα), η ενδιάμεση λεπτή στιβάδα περιείχε τα PBMCs (αχνό γκρι χρώμα) και η κάτω στιβάδα περιείχε ευρθροκύτταρα και ficol (κόκκινο χρώμα). Η επάνω στιβάδα απορρίφθηκε, ενώ η ενδιάμεση στιβάδα των PBMCs μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα, ο οποίος περιείχε 10 ml RPMI. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε

1800 rpm, στους 20 °C, για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ έγινε αποκόλληση του ιζήματος με έντονη ανακίνηση του σωλήνα, προκείμενου να επιτευχθεί αναδιασπορά των κυττάρων. Στα κύτταρα που είχαν αναδιασπαρεί έγινε προσθήκη 5 ml διαλύματος λύσης και ισχυρή ανάδευση. Οι σωλήνες παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 1800 rpm, στους 20 °C, για 20 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ έγινε εκ νέου αναδιασπορά του ιζήματος και επαναδιάλυση σε 10 ml RPMI. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 1800 rpm, στους 20 °C, για 20 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, αναδιασπορά των κυττάρων του ιζήματος και επαναδιάλυση σε 2 ml θρεπτικού υλικού.

5.5 Μέτρηση Κυττάρων στο μικροσκόπιο

Από το εναιώρημα κυττάρων που είχε παρασκευαστεί 20 μl μεταφέρθηκαν σε μικρό σωληνάκι, το οποίο περιείχε 20 μl από τη χρωστική Trypan Blue. Το διάλυμα αναμίχθηκε και στη συνέχεια, 20 μl προστέθηκαν στην επιφάνεια αιματοκυτταρομέτρου Neubauer, στο οποίο είχε τοποθετηθεί και γυάλινη καλυπτρίδα. Το δείγμα παρατηρήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με φακό εστίασης 10x, προκειμένου να γίνει καταμέτρηση των κυττάρων του εναιωρήματος. Η μέτρηση των κυττάρων έγινε στα δύο κεντρικά τετράγωνα που βρίσκονται στο μέσο των σταυρών που υπάρχουν στο επάνω και κάτω μέρος της αντικειμενοφόρου πλάκας. Από τις δύο μετρήσεις, υπολογίστηκε ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων, ο οποίος στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκε επί 2 x 10^6, προκειμένου να βρεθεί ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος.



Εικόνα 20. Αιματοκυτταρόμετρο

5.6 Επίδραση εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οινοποίησης στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

Αρχή της Μεθόδου [173]

Η μέθοδος MTT είναι εργαστηριακό τεστ που μετράει την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από φάρμακα η άλλους τοξικούς παράγοντες. Στηρίζεται στην δραστικότητα των ενζύμων των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα μετρά τη δραστικότητα των μιτοχοδριακών αναγωγασών, οι οποίες λειτουργούν όταν τα κύτταρα είναι ζωντανά. Το κίτρινο MTT μετατρέπεται σε χρώμα μωβ που οφείλεται στην φορμαζάνη, όταν τα κύτταρα είναι ζωντανά. Χρησιμοποιείται ένα διαλυτό μίγμα ούτως ώστε να διαλυθεί η στερεή μωβ φορμαζάνη και να δημιουργηθεί ένα έγχρωμο διάλυμα. Η απορρόφηση αυτού του διαλύματος μετράται σε μήκος κύματος 500-600 nm.

Προετοιμασία δειγμάτων για MTT

Η τελική συγκέντρωση του εναιωρήματος των κυττάρων ρυθμίστηκε στα $2x10^6$ cells/ml. Χρησιμοποιήθηκε cell culture 96 well plate και ο τελικός όγκος των δειγμάτων ήταν 100 μl. Τα δείγματα επωάστηκαν παρουσία και απουσία (δείγματα αναφοράς) των εκχυλισμάτων σε διαφορετικές ποσότητες. Τα δείγματα αναφοράς περιείχαν το διαλύτη κάθε εκχυλίσματος στην ίδια ποσότητα. Τέλος, προετοιμάστηκαν δείγματα παρουσία εκχυλισμάτων και απουσία MTT, με σκοπό να γίνει διόρθωση της απορρόφησης ακτινοβολίας από τα δείγματα. Το εύρος των συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν ήταν από 500 έως 1500 μg/μl.

Το plate παρέμεινε σε επωαστικό θάλαμο, στους 37 °C, για 24 ώρες. Μετά το πέρας του 24ώρου προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι 20 μl MTT συγκέντρωσης 2,5 mg/ml. Ακολούθησε 4ωρη επώαση στους 37 °C, για 4 ώρες και στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μl οξινισμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αναδεύτηκαν με πλαστικό tip μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570 nm σε κατάλληλο φωτόμετρο.

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας με MTT, πραγματοποιήθηκε και μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, με τον τρόπο που προαναφέρθηκε (ενότητα 5.5).

5.7 Επίδραση εκχυλισμάτων στην έκκριση κυτταροκινών από τα PBMCs

5.7.1 Επώαση PBMCs με εκχυλίσματα

Για τη διαδικασία αυτή προετοιμάστηκαν δείγματα που περιείχαν κύτταρα από το εναιώρημα των PBMCs στο θρεπτικό υλικό, παρουσία και απουσία LPS, καθώς και παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων. Ο τελικός όγκος ήταν 500 μl σε αντίστοιχες θέσεις ενός 48 well cell culture plate. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε προεπώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα για μία ώρα σε επωαστήρα στους 37 °C και CO_2 5%. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μl

LPS τελικής συγκέντρωσης 10 ng/ml σε όλα τα δείγματα, εκτός από το δείγμα ελέγχου, το οποίο περιείχε PBS. Ακολούθησε 4ωρη και 24ωρη επώαση στους 37 °C.

5.7.2Παραλαβή υπερκειμένων για τον προσδιορισμό της PAF CPT

Μετά το πέρας της επώασης έγινε παραλαβή των κυττάρων από κάθε πηγαδάκι, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μικρά πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 1000 g, 4 °C, για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, περίπου 460 μl υπερκειμένου, το οποίο περιείχε τις εκκρινόμενες κυτταροκίνες, ισομοιράστηκαν (230 + 230) σε ειδικά πλαστικά σωληνάκια, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών.

Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml PBS και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 g, 4 °C, για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγινε προσθήκη 50 μl PBS και 50 μl NaOH. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης.

5.8 Μέθοδος Bradford-Προσδιορισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου

Αρχή της μεθόδου [174]

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδένεται σε πρωτεΐνες. Η πρόσδεση της χρωστικής στις πρωτεΐνες προκαλεί μια αύξηση της μέγιστης απορρόφησης από 465 σε 595 nm, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί και να καταγραφεί. Η βασική ιδιότητα της Coomassie Brilliant Blue, η οποία την καθιστά κατάλληλη χρωστική, είναι ότι παίρνει δύο χρώματα, κόκκινο και μπλε. Το κόκκινο χρώμα μετατρέπεται σε μπλε όταν η χρωστική προσδένεται σε πρωτεΐνη. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης έχει έναν πολύ υψηλό συντελεστή απόσβεσης, με αποτέλεσμα η μέτρηση της πρωτεΐνης να γίνεται με μεγάλη ευαισθησία. Η πειραματική διαδικασία έχει μεγάλη επαναληψιμότητα και είναι γρήγορη, καθώς η πρόσδεση χρωστικής-πρωτεΐνης ολοκληρώνεται σε περίπου δύο λεπτά και το χρώμα διατηρείται σταθερό για μία ώρα.

Αναλυτική Διαδικασία

Στην συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα 1-20 (Δ1-Δ20) τα οποία περιείχαν το επαναδιαλυμένο ίζημα της διαδικασίας που περιεγράφηκε παραπάνω. Στα δείγματα αυτά, τα οποία είχαν όγκο 100 μl, έγινε αραίωση 1:100 με προσθήκη 900 μl PBS. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η BSA (Bovine Serum Albumin) 0,1 mg/ml. Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς, επελέγησαν επτά διαφορετικά σημεία με αυξανόμενη ποσότητα BSA, τα Τ (0 μg), Σ1 (0,2

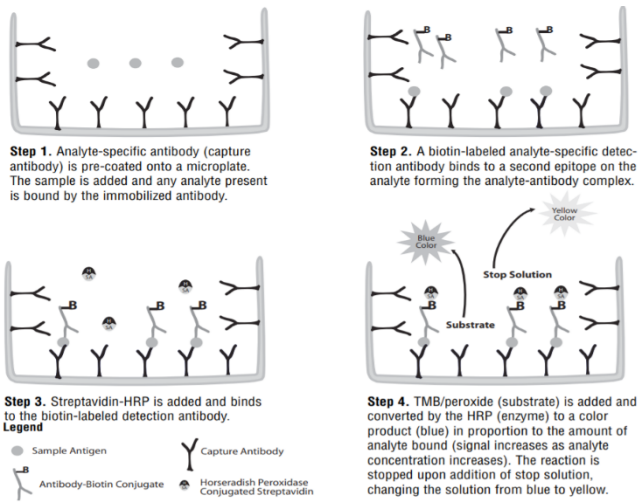
μg), Σ2 (0,5 μg), Σ3 (1 μg), Σ4 (1,5 μg), Σ5 (2 μg) και Σ6 (2,5 μg). 10 μl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε αντίστοιχο πηγαδάκι ενός 96 well cell culture plate, ενώ για τα σημεία Σ1-Σ6 προστέθηκαν 2, 5, 10, 15, 20, 25 μl BSA αντίστοιχα. Σε όλα τα πηγαδάκια προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 200 μl. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αραιώθηκε σε 4 ml απιονισμένου νερού με αναλογία 1:5 (1 ml χρωστικής, 4 ml νερό). 50 μl της αραιωμένης χρωστικής προστέθηκαν σε όλα τα πηγαδάκια του plate που περιείχαν δείγματα, με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας. Το plate με τα δείγματα και τη χρωστική αφέθηκε για 10 λεπτά και στη συνέχεια, έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm σε ELISA reader. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς και η συγκέντρωση πρωτεΐνης κάθε δείγματος.

5.9 Ποσοτικός προσδιορισμός κυτταροκινών

ELISA

Αρχή της μεθόδου (https://www.rndsystems.com/products/duoset-elisa-development-systems)

Η τεχνική της ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) βασίζεται στην αρχή του σχηματισμού «σάντουιτς» μεταξύ αντισωμάτων. Αρχικά, ένα δεσμευτικό αντίσωμα, το οποίο είναι εξειδικευμένο για τον αναλύτη που μελετάται, δεσμεύεται σε μια πλάκα μικροτιτλοδότητσης, προκείμενου να παραχθεί μια στερεή φάση. Τα αντισώματα που δεν έχουν δεσμευτεί απομακρύνονται μέσω πλύσεων του πλακιδίου και προστίθεται ένα αντιδραστήριο αποκλεισμού. Μετά τις πλύσεις, τα υπό μελέτη δείγματα, τα πρότυπα και τα δείγματα ελέγχου επωάζονται με το αντίσωμα της στερεής φάσης, το οποίο δεσμεύει τον αναλύτη. Ύστερα από την έκπλυση του αδέσμευτου αναλύτη, πορστίθεται ένα συζευγμένο αντίσωμα ανίχνευσης (π.χ. δεσμευμένη βιοτίνη). Το αντίσωμα ανίχνευσης προσδένεται σε διαφορετικούς επιτόπους το μορίου που προσδιορίζεται, δημιουργώντας ένα μοτίβο σάντουιτς. Μόλις γίνει έκπλυση και απομακρυνθεί το αδέσμευτο αντίσωμα ανίχνευσης, προστίθεται ένα αντιδραστήριο ανίχνευσης (π.χ. στρεπταβιδίνη-HRP). Το πλακίδιο πλένεται, προστίθεται το διάλυμα υποστρώματος και παρατηρείται εμφάνιση χρώματος, ανάλογη του ποσοστού του διαλύτη που έχει δεσμευτεί. Η ανάπτυξη του χρώματος διακόπτεται και η έντασή του ποσοτικοποιείται. Η πειραματική διαδικασία της ELISA συνήθως πραγματοποιείται σε 96 well plates, έτσι ώστε να επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλών δειγμάτων σε ένα μόνο πείραμα.



Εικόνα 21. ELISA

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) →137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH 7.2-7.4
- Διάλυμα πλύσεων (Wash buffer) →0.05% Tween σε διάλυμα PBS pH 7.2-7.4
- Διαλύτης αντιδραστηρίου (Reagent Diluent, RD) →1% BSA σε διάλυμα PBS pH 7.2-7.4
- Διάλυμα υποστρώματος (Substrate Solution) →Color Reagent A (H_2O_2) και Color Reagent B (Tetramethyl benzidine) σε αναλογία 1:1
- Αντίσωμα Ανίχνευσης (Detection Antibody, DA) →10 ml RD και 100 μl DA (παρέχεται ως stock από το αντίστοιχο kit)
- Διάλυμα Τερματισμού (Stop Solution) →2N H_2SO_4
- Δεσμευτικό Αντίσωμα (Capture Antibody, CA) →10 ml PBS και 100 μl CA (παρέχεται ως stock από το αντίστοιχο kit)
- Υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP) →10 ml RD και 50 μl HRP

Να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα kit (DuoSet® ELISA Development Systems), ένα για τον TNFα και ένα για την IL-1β. Επομένως, η αναλυτική πορεία που περιγράφεται παρακάτω, αφορά τη διαδικασία της ELISA που ακολουθήθηκε για τη μελέτη και των δύο κυτταροκινών.

Αναλυτική πορεία

Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας προστέθηκαν 100 μl CA στα πηγαδάκια ενός ειδικού για ELISA 96 well plate. Το πιάτο αφέθηκε με το αντίσωμα για μια νύκτα. Το επόμενο πρωί έγιναν 6 πλύσεις με 200 μl Wash buffer σε κάθε πηγαδάκι του plate. Ύστερα από κάθε πλύση, το plate τιναζόταν

ισχυρά πάνω σε απορροφητικό χαρτί. Ακολούθησε προσθήκη 300 μl RD σε κάθε πηγαδάκι και επώαση σε σκοτεινό μέρος για μία ώρα. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκαν 6 πλύσεις με 200 μl Wash buffer και τίναγμα του πιάτου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα αντίστοιχα πηγαδάκια του plate 100 μl από κάθε δείγμα, καθώς και 100 μl από τις αραιώσεις του standard διαλύματος πρωτεΐνης, βάσει του οποίου θα δημιουργηθεί η καμπύλη αναφοράς. Έγινε διπλή καμπύλη για κάθε δείγμα, ενώ οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς ήταν 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 και 500 pg/ml.

Μετά την προσθήκη των δειγμάτων, προστέθηκαν 100 μl DA σε κάθε πηγαδάκι και το plate αφέθηκε για 2 ώρες σε σκοτεινό μέρος. Όταν ολοκληρώθηκε η δίωρη επώαση, έγιναν εκ νέου 6 πλύσεις με 200 μl Wash buffer, τίναγμα του πιάτου και προσθήκη 100 μl HRP σε κάθε πηγαδάκι και επώαση σε σκοτεινό μέρος για 20 λεπτά. Ύστερα από την επώαση με HRP, πραγματοποιήθηκαν 6 πλύσεις με 200 μl Wash buffer, τίναγμα του πιάτου και προσθήκη 100 μl Substrate Solution σε κάθε πηγαδάκι. Τα δείγματα επωάστηκαν με το Substrate Solution για 20 λεπτά, σε σκοτεινό μέρος και αμέσως μετά την επώαση παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος των δειγμάτων σε μπλε. Τέλος, προστέθηκαν 50 μl Stop Solution σε κάθε πηγαδάκι, οπότε και παρατηρήθηκε νέα αλλαγή χρώματος από μπλε σε κίτρινο και ακολούθως το plate τοποθετήθηκε σε ELISA reader, προκειμένου να μετρηθεί η απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 και 570 nm.

Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση την πρωτεΐνη που μετρήθηκε σε κάθε πηγαδάκι και εκφράστηκαν ως pg κυτταροκίνης/mg ολικής πρωτεΐνης.

5.10 Προσδιορισμός δραστικότητας PAF CPT

<u>Παραλαβή Ομογενοποιήματος PBMCs</u>

Από το εναιώρημα των PBMCs σε θρεπτικό υλικό, 25 ml χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του ενζύμου PAF CPT. Η ποσότητα αυτή μεταφέρθηκε σε πλαστικό σωληνάκι όγκου 15 ml και έγινε φυγοκέντρηση σε 1800 rpm, θερμοκρασία 20 °C, για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml HCl Tris pH=8. Ακολούθησε επεξεργασία με συσκευή υπερήχων (4 διαστήματα των 10 δευτερολέπτων), προκειμένου να διασπαστούν οι μεμβράνες των κυττάρων. Έγινε ακόμη μια φυγοκέντρηση σε 500 g, θερμοκρασία 4 °C και για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο (ομογενοποίημα) μεταφέρθηκε σε τρία aliquots των 300 μl και αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Προκειμένου να προσδιοριστεί το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του ομογενοποιήματος πουυ περιείχε το

ένζυμο PAF CPT, εφαρμόσθηκε η μέθοδος Bradford, η οποία περιγράφηκε παραπάνω (Ενότητα 5.8).

Ενζυμική Δοκιμασία PAF CPT

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της PAF-CPT βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με CDP-χολίνη και αλκυλο-ακετυλο-γλυκε-ρόλη (AAG) παρουσία BSA-σε κατάλληλες συνθήκες.

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100 mM-pH 8,0): Διαλύθηκαν 1,2114 g Tris σε απεσταγμένο νερό και ρυθμίστηκε το pH με HCl 1 M στο 8.0. Έγινε αραίωση του διαλύματος σε 100 ml νερό.
- EDTA 0,02 M σε Tris-HCl pH: 8.0. Mr: 416.20, ζυγίστηκαν 41,62mg EDTA και διαλύθηκαν σε 5ml Tris-HCl pH: 8.0.
- $MgCl_2$ 0,8 M σε Tris-HCl pH: 8.0. Mr: 203.31, ζυγίστηκαν 162.65mg $MgCl_2$ και διαλύθηκαν σε 1ml Tris-HCl pH: 8.0.
- DTT 0,6 M σε νερό: Mr: 154,25, ζυγίστηκαν 92,55mg DTT και διαλύθηκαν σε 1ml νερό.
- Διάλυμα AAG 10mM : Διαλύθηκαν τα 5 mg του φιαλιδίου σε 1324 μL EtOH. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε βιδωτό σωλήνα στους -20 ^{o}C (σταθερό για 6 μήνες). Πριν γίνει αναδιάλυση, ελέγχθηκε η καθαρότητα του προϊόντος.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Choline 100mM : Διαλύθηκε το στερεό σε απεσταγμένο νερό (ανάλογα την καθαρότητα του αντιδραστηρίου).
- Διάλυμα εργασίας (working) CDP-Choline 4mM, έγινε αραίωση από το stock διάλυμα με Tris-HCl (100 mM-pH 8,0).
- Διάλυμα BSA 40 mg/ml : Διαλύθηκαν 200 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM).

Αναλυτική πορεία

Η προετοιμασία του μίγματος αντίδρασης σε Tris-HCl (100 mM-pH 8,0) πραγματοποιήθηκε την ημέρα του πειράματος: Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο όγκος Tris-HCl που θα χρειαστεί, 5μl DTT

0,6M (τελική συγκέντρωση 11,25mM), 5μl $MgCl_2$ 0,8M (τελική συγκέντρωση 7,5mM), 3.75 μl EDTA 0,02M (τελική συγκέντρωση 0,375mM), 5 μL διαλύματος CDP-choline 4 mM (τελική συγκέντρωση 100 μM), 5 μL διαλύματος BSA 40mg/ml (τελική συγκέντρωσης 1mg/ml). Το μείγμα προστέθηκε σε σωλήνες προπυλενίου στον κατάλληλο όγκο.

Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος ήταν διαλυμένη σε Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), μπορούσε να κυμαίνεται από 10-50 μL. Δηλαδή προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν το ανώτερο 50 μL. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης ήταν 200 μL. Έγινε προεπώαση για 5 min στους 37 ^{o}C, στη συνέχεια προστέθηκε το ενζυμικό παρασκεύασμα (5, 10, 15 και 20 μg πρωτεΐνης) και η αντίδραση ξεκίνησε 30 δευτερόλεπτα μετά την προσθήκη 2 μL διαλύματος AAG 10mM σε DMSO (τελική συγκέντρωση 100 μM). Η επώαση της αντίδρασης έγινε σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37 ^{o}C για 2, 5, 10, 15 και 20 min. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 1 ml C:M 1:1 (2% οξικό οξύ).

Η αντίδραση δοκιμάστηκε σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους, 5, 10, 15 και 20 λεπτά και για 4 διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης, τόσο για κανονικά δείγματα, όσο και για δείγματα ελέγχου. Στην τυφλή δοκιμασία δεν προστέθηκε AAG, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η ενδογενής παραγωγή του PAF. Επίσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση για τα δείγματα Control και LPS, που είχαν συλλεχθεί ύστερα από 4ωρη και 24ωρη επώαση, για χρόνο 10 λεπτών και με ποσότητα πρωτεΐνης 10 μg.

Εκχύλιση και Ποσοτικοποίηση παραγόμενου PAF

Μετά τον τερματισμό της ενζυμικής δοκιμασίας, σε κάθε σωληνάκια προστέθηκαν 130 μl C:M 1:1 (2% οξικό οξύ) και 300 μl απεσταγμένο νερό, ώστε να πραγματοποιηθεί εκχύλιση Bligh-Dyer. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός δύο διαφορετικών φάσεων και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 3000 rpm, σε θερμοκρασία 4 ^{o}C, για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση) παρελήφθη με γυάλινη πιπέτα Pasteur και μεταφέρθηκε σε νέο, καθαρό σωληνάκι. Η υδατική φάση ξεπλύθηκε με 500 μl χλωροφορμίου και πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Η χλωροφορμική φάση που υπήρχε στο κάτω μέρος του σωλήνα μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέρθηκε στο ίδιο σωληνάκι με την προηγούμενη. Ακολούθησε εξάτμιση των δειγμάτων σε συσκευή speed vac, προσθήκη 60 μl αιθανόλης LCMS και μεταφορά σε φιαλίδιο vial, προκειμένου να γίνει ανάλυση LCMS.

Τα δείγματα, στη συνέχεια, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS), για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου PAF. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hypersil GOLD™ (5 μm, 150 × 4.6 mm; Thermo Scientific). Η κινητή φάση περιείχε 98% μεθανόλη LC-MS, 2% 1 mM υδατικό οξικό αμμώνιο και ο ρυθμός της ροής ήταν 0.1 mL/min. Η ανάλυση του MS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός Exactive™ Plus Orbitrap Φασματομέτρου Μάζας (Thermo Scientific), με μια πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας m/z 524.37, με χρόνο έκλουσης 6-7 λεπτά. Κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη με συγκεντρώσεις του PAF από 1,6 έως 24 pmol. Σε κάθε πείραμα πραγματοποιείτο μέτρηση της πρότυπης καμπύλης του PAF, ενώ σε κάθε παρτίδα δειγμάτων υπήρχε και δείγμα ελέγχου με συγκεκριμένη συγκέντρωση PAF. Ανάμεσα στις διαφορετικές ημέρες (inter-day assay) και εντός της ημέρας (intra-day assay), η ακρίβεια ήταν 15,9% και 11,8%, αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των φασμάτων μάζας με το λογισμικό Xcalibur 4.0 (Thermo Scientific).

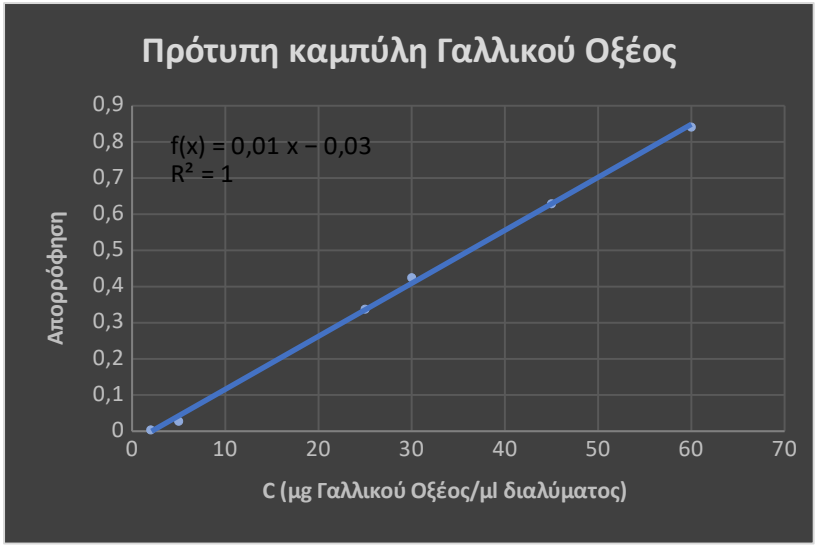
5.11 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics V21.0. Αρχικά, ελέγχθηκε η κανονικότητα των μεγεθών με βάση το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση ή ως διάμεσος (25ο-75ο τεταρτημόριο) ανάλογα με την κανονικότητα ή μη της κατανομής τους, αντίστοιχα. Η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών του πειράματος έγινε με Kruskal Wallis, επειδή τα μεγέθη ήταν μη κανονικά. Για τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των δεικτών πραγματοποιήθηκε έλεγχος συσχέτισης κατά Spearman. Παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με το συντελεστή του Spearman σε παρένθεση (ρ). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p<0,05$).

6.Αποτελέσματα

6.1 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του συνολικού εκχυλίσματος των ποικιλιών κρασιού

Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών του αιθανολικού εκχυλίσματος από τα παραπροϊόντα οινοποίησης και των τεσσάρων ερυθρών ποικιλιών, με βάση την πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος (GA), η οποία παρουσιάζεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



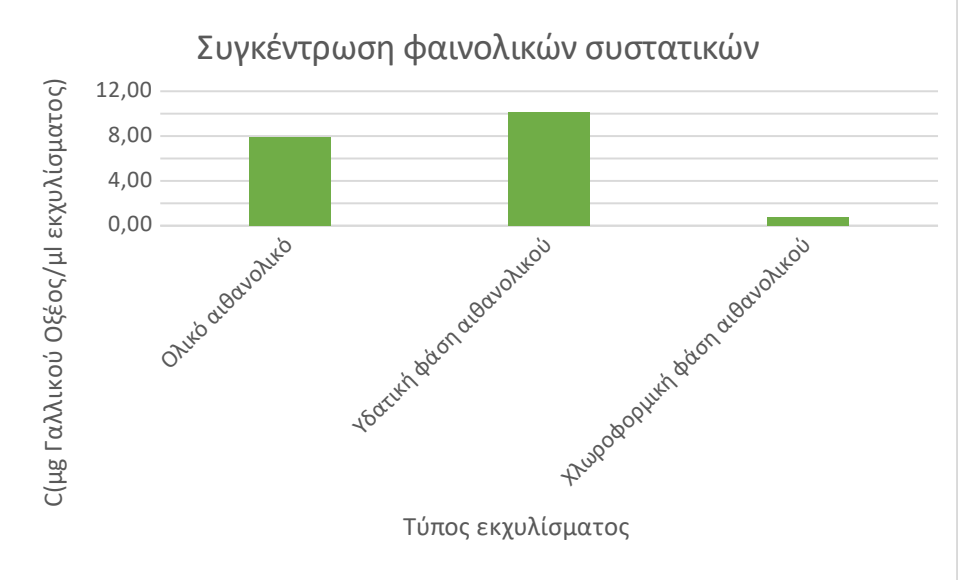
Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

Με βάση τα αποτελέσματα της μέτρησης, η συγκέντρωση του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά βρέθηκε 7,9 μg GA/μl εκχυλίσματος ή 15,8 μg GA/ mg εκχυλίσματος ή 965,4 μg GA/ g παρα-προιόντων.

6.2 Εκχύλιση Bligh-Dyer του αιθανολικού εκχυλίσματος

Με σκοπό να μελετήσουμε εάν η δράση των συστατικών του αιθανολικού εκχυλίσματος οφείλεται περισσότερο στα υδατοδιαλυτά ή οργανικά συστατικά του πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Οπότε, προέκυψαν δύο φάσεις, η υδατική και η χλωροφορμική, στις οποίες έγινε επίσης προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών. Συγκεκριμένα 1000 mg από το αιθανολικό εκχύλισμα διαχωρίστηκαν σε 439,2 mg στην υδατική φάση και 217 mg στην χλωροφορμική φάση. Άρα το 43.9 % των συστατικών βρέθηκε στην υδατική φάση και το 21.7% στην χλωροφορμική φάση. Ενώ περίπου το 20% των συστατικών που υπολείπεται ήταν στη μεσόφαση που την απορρίψαμε ώστε να μην έχουμε επιμόλυνση της μιας φάσης με την άλλη. Όπως φαίνεται και

στο ακόλουθο διάγραμμα, η συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στην υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος βρέθηκε 10,1 μg/μl εκχυλίσματος ή 45,9 μg GA/ mg εκχυλίσματος, ενώ στη χλωροφορμική φάση βρέθηκε 0,76 μg/μl εκχυλίσματος ή 7 μg GA/ mg εκχυλίσματος.

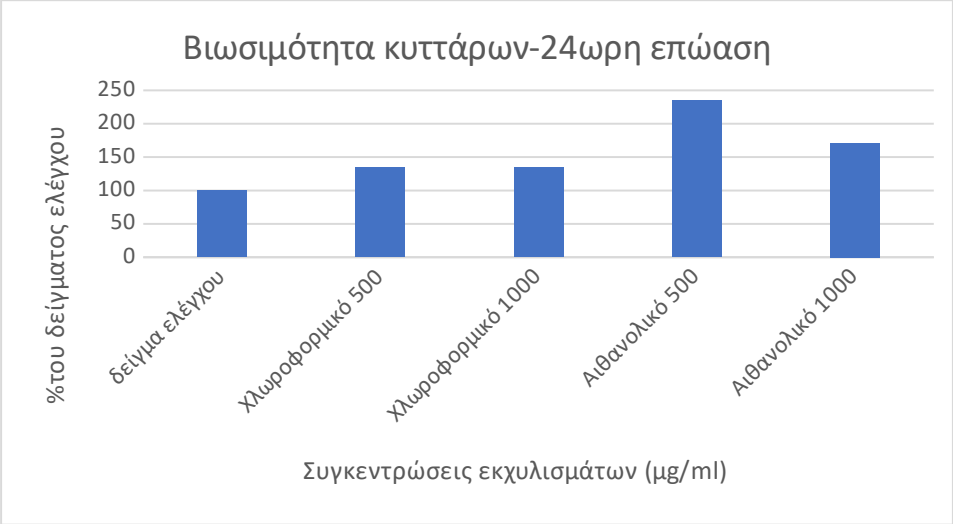


Διάγραμμα 2. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων

6.3 Επίδραση εκχυλίσματος στη βιωσιμότητα των PBMCs

6.3.1 MTT

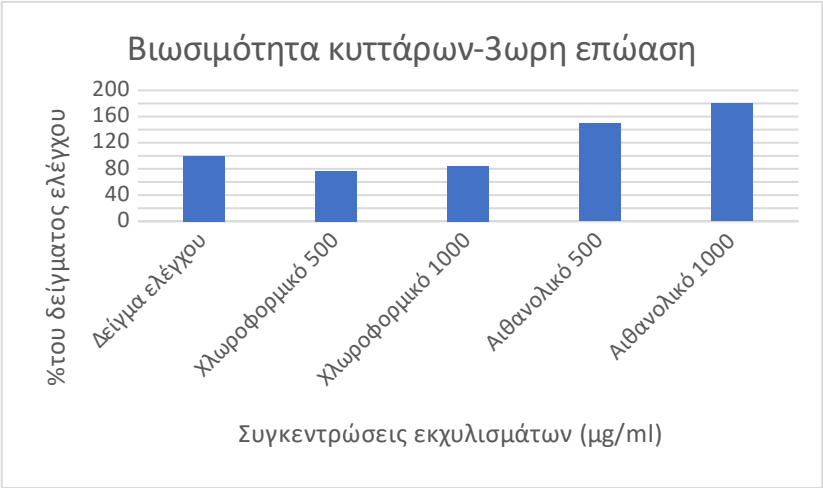
Προκειμένου να προσδιοριστεί εάν τα εκχυλίσματα είναι κυτταροτοξικά για τα PBMCs, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κυτταροτοξικότητας με MTT για διαφορετικές συγκεντρώσεις του αιθανολικού και του χλωροφορμικού εκχυλίσματος των παρα-προϊόντων. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τα δύο εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 μg/ml..



Διάγραμμα 3. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT-24ωρη επώαση

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε σε όλα τα δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Συγκεκριμένα, και στις δύο συγκεντρώσεις του χλωροφορμικού εκχυλίσματος παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των κυττάρων κατά 34% περίπου, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Στα κύτταρα που επωάστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 500 μg/ml, παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη αύξηση, της τάξης του 134%, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Τέλος, τα κύτταρα που επωάστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 1000 μg/ml αυξήθηκαν κατά 71%.

Επειδή ήταν πιθανό το χρώμα των εκχυλισμάτων να επηρεάζει την απορρόφηση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ένα επιπλέον πείραμα με τα ίδια εκχυλίσματα, στις ίδιες συγκεντρώσεις, με και χωρίς MTT. Σε αυτό το πείραμα, τα κύτταρα επωάστηκαν για 3 ώρες με τα εκχυλίσματα.

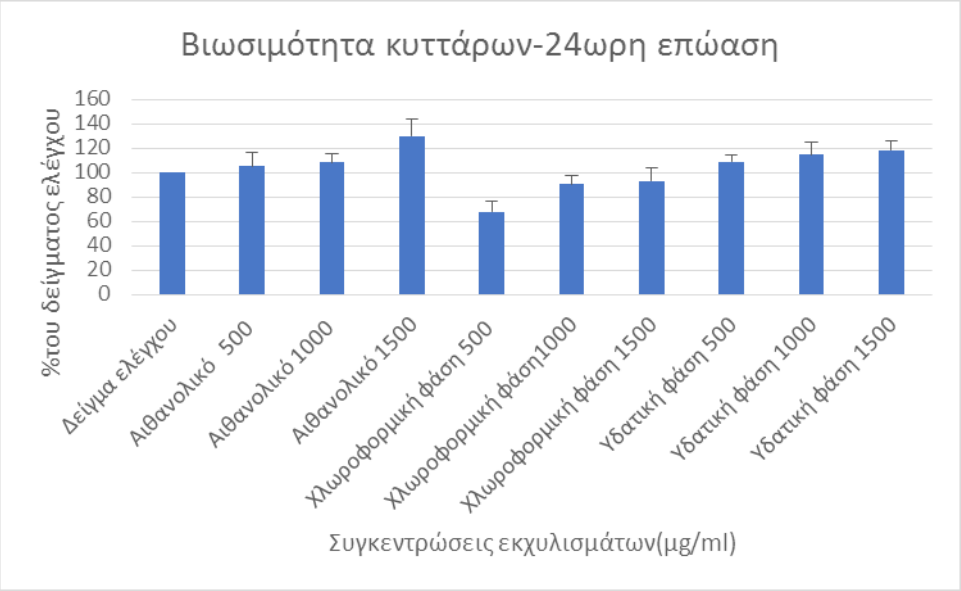


Διάγραμμα 4. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT-3ωρη επώαση

Ύστερα από αφαίρεση των απορροφήσεων των δειγμάτων που είχαν επωαστεί με εκχυλίσματα χωρίς MTT από τις απορροφήσεις των αντίστοιχων δειγμάτων που είχαν επωαστεί σε εκχυλίσματα με MTT, φάνηκε πως τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα προκαλούσαν μείωση του

αριθμού των κυττάρων, ενώ τα αιθανολικά προκαλούσαν αύξηση. Συγκεκριμένα, επώαση των κυττάρων στο χλωροφορμικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 500 μg/ml οδήγησε σε μικρή μείωση 24%, ενώ επώαση στο χλωροφορμικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 1000 μg/ml προκάλεσε μείωση 16% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Αντίθετα, η επώαση τω κυττάρων στις συγκεντρώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος 500 και 1000 μg/ml, οδήγησε σε αύξηση 49% και 79%, αντίστοιχα.

Μετά την εκχύλιση του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος με Bligh-Dyer, προσδιορίστηκε και η κυτταροτοξικότητα των επιμέρους φάσεων με MTT. Αναλυτικότερα, έγινε 24ωρη επώαση των κυττάρων με το αιθανολικό εκχύλισμα, τη χλωροφορμική και την υδατική φάση, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, 500 μg/ml, 1000 μg/ml και 1500 μg/ml. Προκειμένου να αποφευχθεί η αλλοίωση της μετρούμενης απορρόφησης από τα χρώματα των εκχυλισμάτων, έγινε μέτρηση σε δείγματα που περιείχαν τα εκχυλίσματα με και χωρίς MTT.



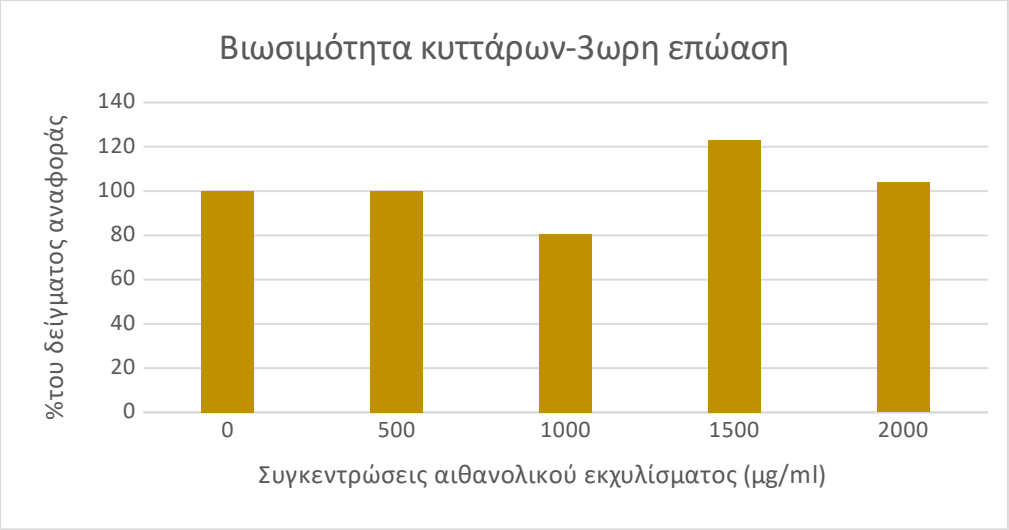
Διάγραμμα 5. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT (αιθανολικό εκχύλισμα και κλάσματα αιθανολικού)-24ωρη επώαση

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, σε κάποια εκχυλίσματα παρατηρήθηκε μείωση, σε άλλα αύξηση και σε κάποια, σχεδόν καμία επίδραση στον αριθμό των κυττάρων. Συγκεκριμένα, στις συγκεντρώσεις του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος 500 μg/ml και 1000 μg/ml παρατηρήθηκε πολύ μικρή αύξηση, 5% και 8% αντίστοιχα. Επίσης, αύξηση του αριθμού των κυττάρων, κατά 29%, παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 1500 μg/ml του αιθανολικού. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση των κυττάρων κατά 33% στο εκχύλισμα της χλωροφορμικής φάσης συγκέντρωσης 500 μg/ml, ενώ στα αντίστοιχα εκχυλίσματα με συγκεντρώσεις 1000 μg/ml και

1500 μg/ml παρατηρήθηκε μικρότερη μείωση, 10% και 7%, αντίστοιχα. Τέλος, στο εκχύλισμα της υδατικής φάσης συγκέντρωσης 500 μg/ml παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των κυττάρων, κατά 8%, ενώ στις συγκεντρώσεις 1000 μg/ml και 1500 μg/ml, ο αριθμός των κυττάρων εμφάνισε μικρή μείωση κατά 7% περίπου.

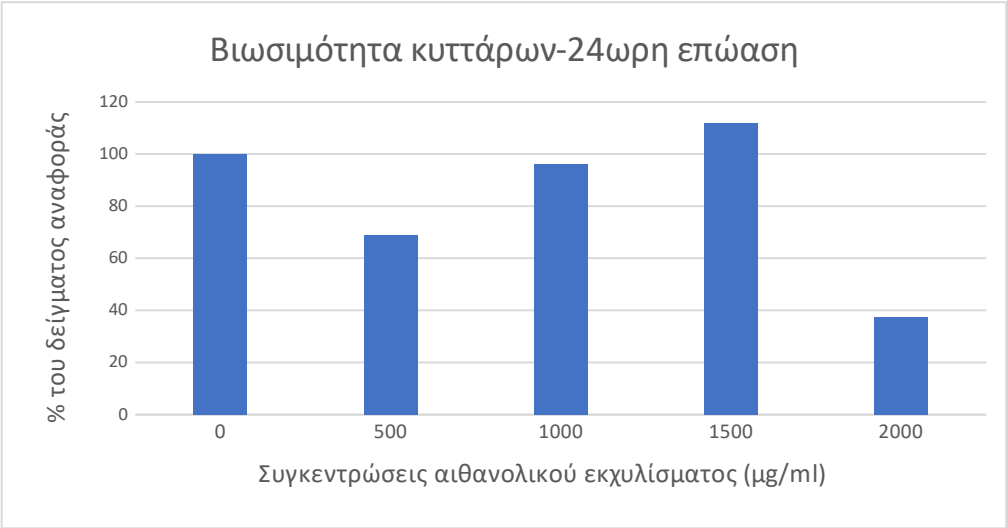
6.3.2 Μέτρηση κυττάρων

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας με MTT, έγινε προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων, με μέτρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε δοκιμή με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος: 500, 1000, 1500 και 2000 μg/ml. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 3 και 24 ώρες με εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν και στη συνέχεια έγινε μέτρηση σε αιματοκυτταρόμετρο.



Διάγραμμα 6. Μέτρηση κυττάρων-3ωρη επώαση

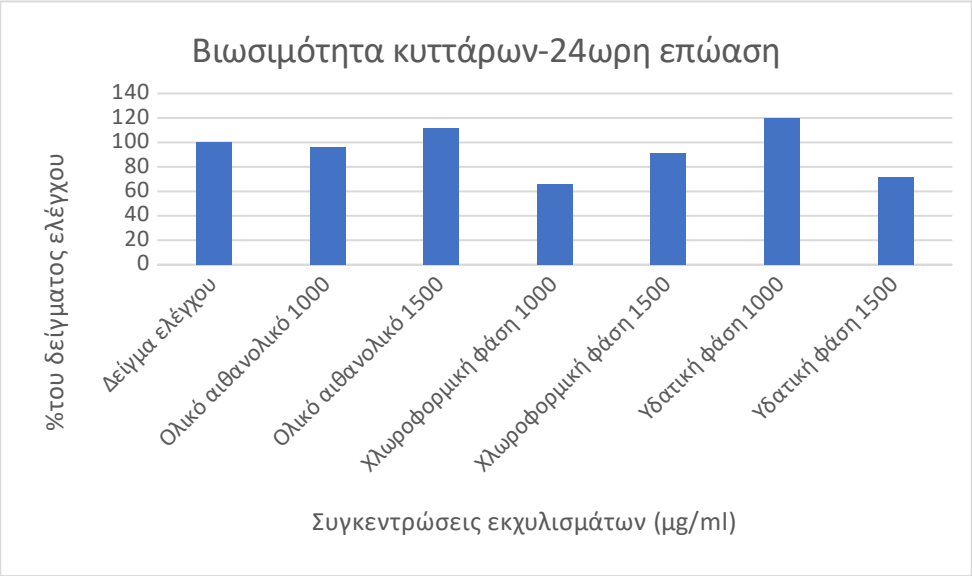
Από τα αποτελέσματα της τρίωρης επώασης, όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρήθηκε μικρή μείωση του αριθμού των κυττάρων που επωάστηκαν με το αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1000 μg/ml, κατά 20%. Αντίθετα, τα κύτταρα που επωάστηκαν σε αιθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 1500 μg/ml αυξήθηκαν κατά 23%. Τα εκχυλίσματα με συγκέντρωση 500 μg/ml και 2000 μg/ml, φάνηκε να μην προκαλούν μεταβολές στον αριθμό των κυττάρων.



Διάγραμμα 7. Μέτρηση κυττάρων-24ωρη επώαση

Από την 24ωρη επώαση, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του αριθμού των κυττάρων, καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος μέχρι τα 1500 μg/ml. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των κυττάρων μειώθηκε κατά 32% όταν επωάστηκαν σε αιθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 500 μg/ml. Το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε 4% στα εκχυλίσματα συγκέντρωσης 1000 μg/ml. Αντίθετα, τα κύτταρα που επωάστηκαν σε εκχύλισμα συγκέντρωσης 1500 μg/ml αυξήθηκαν κατά 11% και τα κύτταρα που επωάστηκαν σε συγκέντρωση 2000 μg/ml μειώθηκαν κατά 62,54%.

Ακόμη, προσδιορίστηκε και η βιωσιμότητα των κυττάρων, έπειτα από 24ωρη επώαση με τις δύο διαφορετικές φάσεις που προέκυψαν από την εκχύλιση του αιθανολικού με Bligh-Dyer. Τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 100 μg/ml και 1500 μg/ml.



Διάγραμμα 8. Μέτρηση κυττάρων (αιθανολικό εκχύλισμα και κλάσματα)-24ωρη επώαση

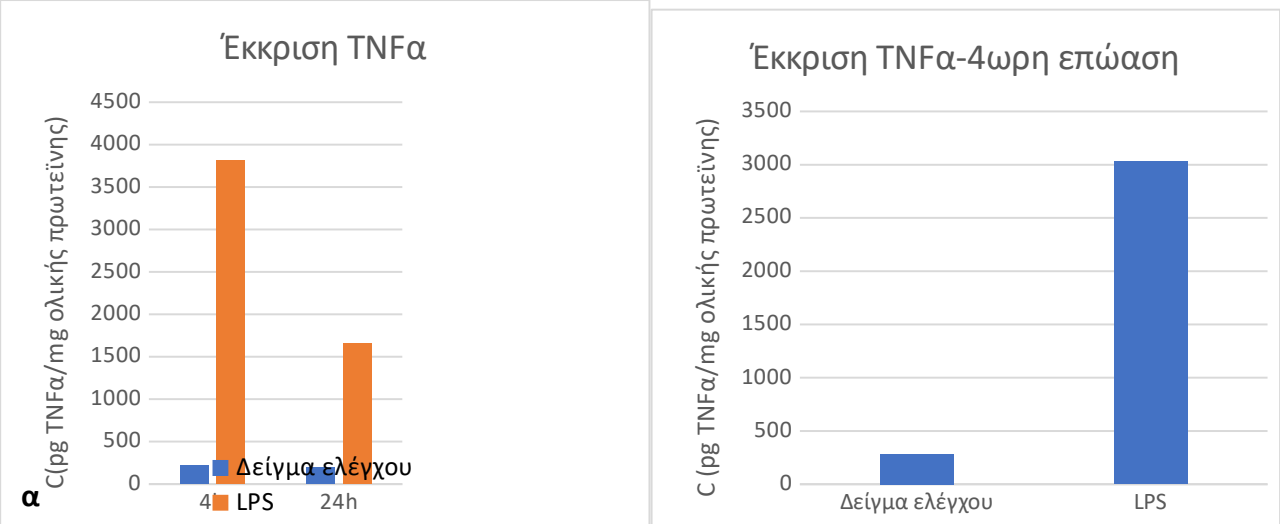
Τα αποτελέσματα του διαγράμματος δείχνουν πολύ μικρή επίδραση στον αριθμό των κυττάρων που επωάστηκαν σε αιθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 1000 μg/ml και συγκεκριμένα, μια μείωση της τάξης του 4%. Αντίθετα, στα κύτταρα που επωάστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 1500 μg/ml, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 11%. Τα κύτταρα που επωάστηκαν στα εκχυλίσματα της χλωροφορμικής φάσης, σε συγκεντρώσεις 1000 και 1500 μg/ml, μειώθηκαν κατά 35% και 9%, αντίστοιχα. Τέλος, η επώαση των κυττάρων σε εκχύλισμα της υδατικής φάσης συγκέντρωσης 1000 μg/ml οδήγησε σε αύξηση κατά 19%, ενώ το εκχύλισμα συγκέντρωσης 1500 μg/ml προκάλεσε μείωση του αριθμού των κυττάρων κατά 29%, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

6.4 Έκκριση κυτταροκινών

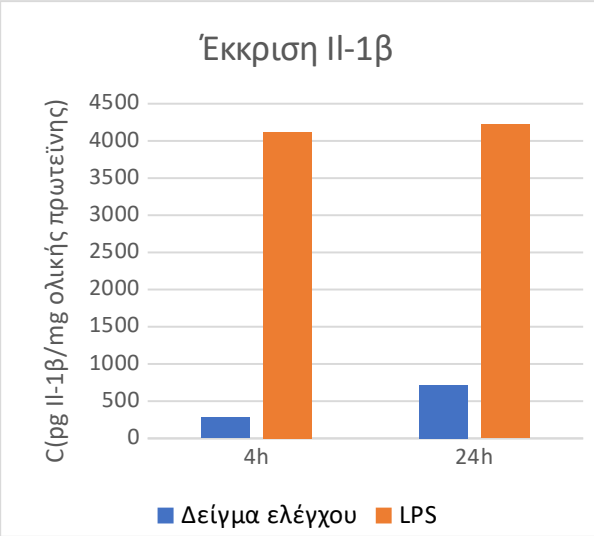
Η αντιφλεγμονώδης δράση των υπό εξέταση εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με βάση την ικανότητά τους να μειώνουν την έκκριση των κυτταροκινών TNFα και Il-1β σε PBMCs που είχαν διεγερθεί με LPS και εκφράστηκε ως ποσοστό % αναστολής του LPS.

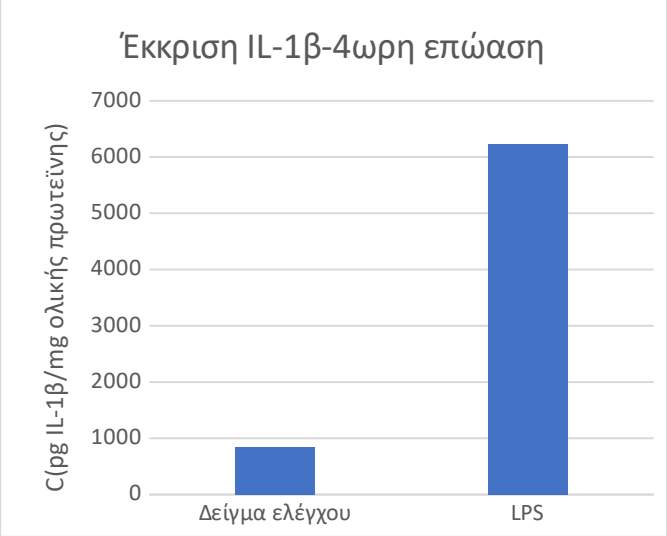
6.4.1 Επίδραση LPS

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επώαση των PBMCs απουσία και παρουσία LPS τελικής συγκέντρωσης 10 ng/ml, για 4 και 24 ώρες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των δύο κυτταροκινών. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία δεν είχαν επωαστεί με LPS.



Διάγραμμα 9. α.Επίδραση LPS στην έκκριση TNFα ύστερα από 4ωρη και 24ωρη επώαση, β.Αποτελέσματα επίδρασης LPS στην έκκριση TNFα από 3 ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης





Διάγραμμα 10. α.Επίδραση LPS στην έκκριση Il-1β ύστερα από 4ωρη και 24ωρη επώαση, β.Αποτελέσματα επίδρασης LPS στην έκκριση Il-1β από 3 ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης

Τόσο στην περίπτωση του TNFα, όσο και στην περίπτωση της Il-1β, φάνηκε ότι τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS για 4 και 24 ώρες, είχαν υψηλότερη έκκριση των δύο κυτταροκινών, σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (Διαγράμματα 9α και 10α). Λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα αποτελέσματα της επιβίωσης των κυττάρων μετά την επώαση με εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης με LPS (Διαγράμματα 9β και 10β). Συνολικά, από τα αποτελέσματα των τριών πειραμάτων, τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS εμφάνισαν 10,6 φορές υψηλότερα επίπεδα TNFα, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ τα επίπεδα της Il-1β ήταν 7,4 φορές υψηλότερα στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

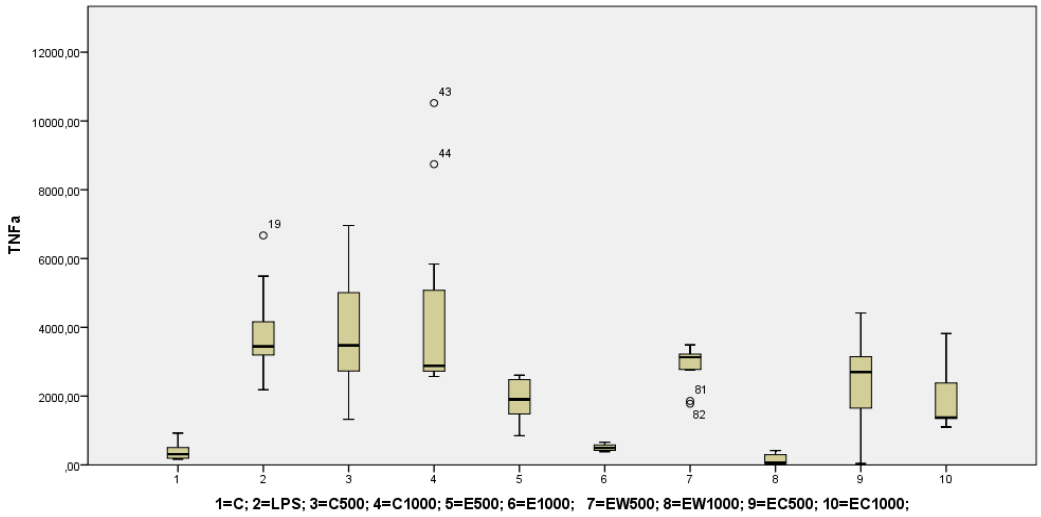
6.4.2 Επίδραση εκχυλισμάτων στην έκκριση TNFα

Πραγματοποιήθηκε επώαση των PBMCs με LPS, προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις και να εκκριθούν κυτταροκίνες, όπως ο TNFα και η Il-1β. Τα κύτταρα είχαν επωαστεί με το αιθανολικό και το χλωροφορμικό εκχύλισμα, καθώς και με την υδατική και χλωροφορμική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκεντρώσεις 500 μg/ml και 1000 μg/ml για 4 και 24 ώρες. Από την ποσότητα της κάθε κυτταροκίνης που μετρήθηκε σε κάθε δείγμα, υπολογίστηκε η %αναστολή της δράσης του LPS. Το πρώτο πείραμα 24ωρης επώασης έδειξε, σε κάποιες περιπτώσεις, ενεργοποιήσεις στη δράση του LPS, σε αντίθεση με την 4ωρη επώαση, όπου η επώαση των κυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων οδήγησε σε αναστολή της δράσης του LPS. Αυτό σε συνδυασμό με τα πειράματα της βιωσιμότητας των

κυττάρων που παρουσιάστηκαν παραπάνω, μας οδήγησαν στο να επιλέξουμε τις 4 ώρες για τα πειράματα επίδρασης των εκχυλισμάτων στην έκκριση κυτταροκινών. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης, με διπλά δείγματα για κάθε συνθήκη και στη συνέχεια, διπλή μέτρηση του κάθε δείγματος στην ELISA. Παρακάτω παρουσιάζονται ο πίνακας (Πίνακας 5) και το διάγραμμα (Διάγραμμα 11), όπου φαίνονται τα επίπεδα έκκρισης του TNFα (pg TNFα/mg ολικής πρωτεΐνης) από τα κύτταρα που επωάστηκαν με τα υπό εξέταση εκχυλίσματα, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (δεν έγινε επώαση με κάποιο εκχύλισμα, ούτε διέγερση με LPS) και με κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία του LPS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως Μέσος (25°-75° τεταρτημόριο), λόγω της μη κανονικότητας των μεγεθών.

Πίνακας 5. Προκαλούμενη από LPS έκκριση TNFα παρουσία των εκχυλισμάτων

Δείγμα	pg TNFα/mg ολικής πρωτεΐνης	p σε σχέση με το control	p σε σχέση με τον LPS
Control	310,6 (189,0-512,6)	--	**0,000-**
LPS	3446,5 (3160,4-4289,9)	**0,000**	-
Χλωροφορμικό 500	3474,6 (2684,4-5224,5)	**0,000**	1,000
Χλωροφορμικό 1000	2882,7 (2686,4-5458,1)	**0,000**	1,000
Αιθανολικό 500	1902,8 (1426,0-2491,4)	0,400	0,215
Αιθανολικό 1000	494,0 (418,0-584,6)	1,000	**0,000**
Υδατική φάση 500	3129,8 (2772,5-3243,5)	**0,000**	1,000
Υδατική φάση 1000	57,1 (49,1- 323,7)	1,000	**0,000**
Χλωροφορμική φάση 500	2698,9 (1586,6-3393,1)	**0,024**	1,000
Χλωροφορμική φάση 1000	1377,5 (1345,3-2441,9)	0,329	0,264



Διάγραμμα 11. Έκκριση TNFα

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κύτταρα που επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα παρουσία του LPS, εμφάνισαν αύξηση της έκκρισης του TNFα, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

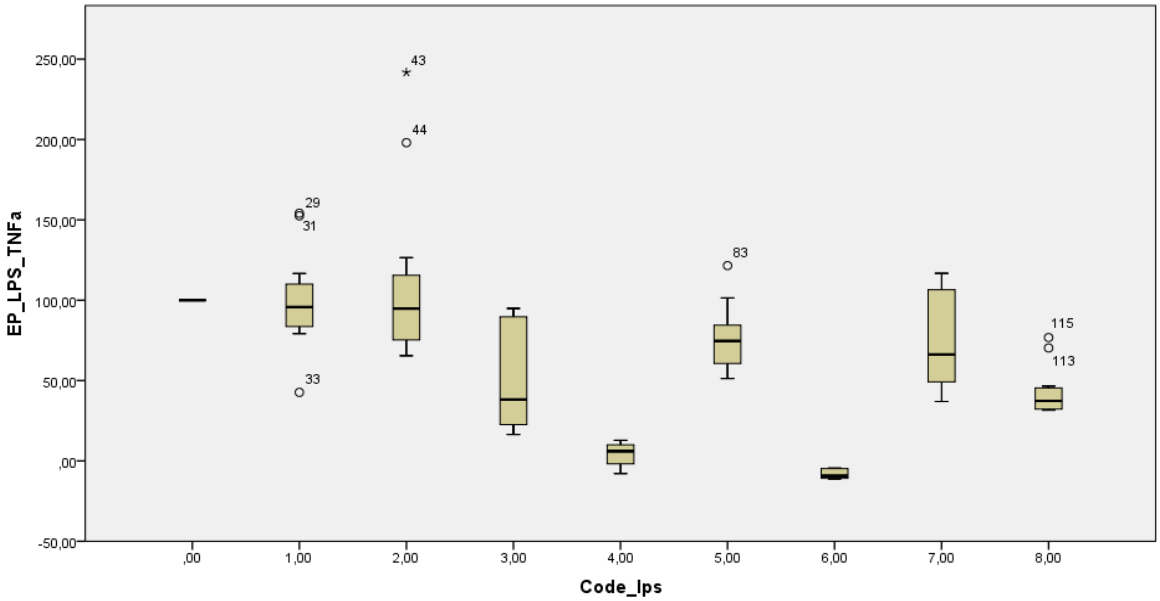
Εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα που επωάστηκαν με την υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml, στα οποία παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης της κυτταροκίνης.

Σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με LPS, όλα τα κύτταρα που επωάστηκαν και με τα εκχυλίσματα εμφάνισαν μειωμένη έκκριση του TNFα, με εξαίρεση τα κύτταρα που επωάστηκαν με το χλωροφορμικό εκχύλισμα, σε συγκέντρωση 500 μg/ml. Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, η μείωση της έκκρισης της κυτταροκίνης ήταν σημαντική μόνο για το αιθανολικό εκχύλισμα, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (494 pg/mg, p<=0,0) και για την υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (57,1 pg/mg, p<=0,0).

Για να διερευνηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων στη δράση του LPS, τα αποτελέσματα παρουσία των εκχυλισμάτων, εκφράστηκαν ως % της δράσης του LPS. Στον παρακάτω πίνακα και διάγραμμα παρουσιάζεται η αναστολή που προκάλεσε το κάθε εκχύλισμα στη δράση του LPS.

Πίνακας 6. %Αναστολή από τα εκχυλίσματα στην έκκριση TNFα που προκαλεί ο LPS

Δείγμα	%LPS	p σε σχέση με τον LPS
LPS	100	-
Χλωροφορμικό 500	95,8 (81,7-113,4)	1,000
Χλωροφορμικό 1000	94,8 (75,2-121,0)	1,000
Αιθανολικό 500	38,2 (22,2-90,1)	**0,049**
Αιθανολικό 1000	6,0 (-2,1-10,0)	**0,000**
Υδατική φάση 500	74,6 (60,4-85,5)	1,000
Υδατική φάση 1000	-9,3 (-10,9--4,7)	**0,000**
Χλωροφορμική φάση 500	66,2 (46,4-108,6)	1,000
Χλωροφορμική φάση 1000	37,4 (32,0-45,9)	**0,011**



Διάγραμμα 12. %Αναστολή LPS-Έκκριση TNFα (0→δείγμα που επωάστηκε μόνο με LPS, 1→χλωροφορμικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 2→ χλωροφορμικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 3→αιθανολικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 4→αιθανολικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 5→υδατική φάση 500 μg/ml, 6→υδατική φάση 1000 μg/ml, 7→χλωροφορμική φάση 500 μg/ml, 8→χλωροφορμική φάση 1000 μg/ml)

Από τον παραπάνω πίνακα και το ακόλουθό του διάγραμμα, φαίνεται ότι όλα τα εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δράση του LPS, όσον αφορά την έκκριση TNFα. Η υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml φάνηκε ότι προκαλεί ότι αναστέλλει πλήρως τη δράση του LPS (-9,3% αναστολή, p<=0,0) και όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, προκλήθηκε μείωση της έκκρισης κάτω από τα βασικά επίπεδα (δείγμα αναφοράς). Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, σημαντική ήταν η αναστολή που προκάλεσε η επώαση των κυττάρων με το αιθανολικό εκχύλισμα, σε συγκέντρωση 500 μg/ml (38,2%, p=0,049) και 1000 μg/ml (6%, p=0,0) και με τη χλωροφορμική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (37,4%, p=0,011).

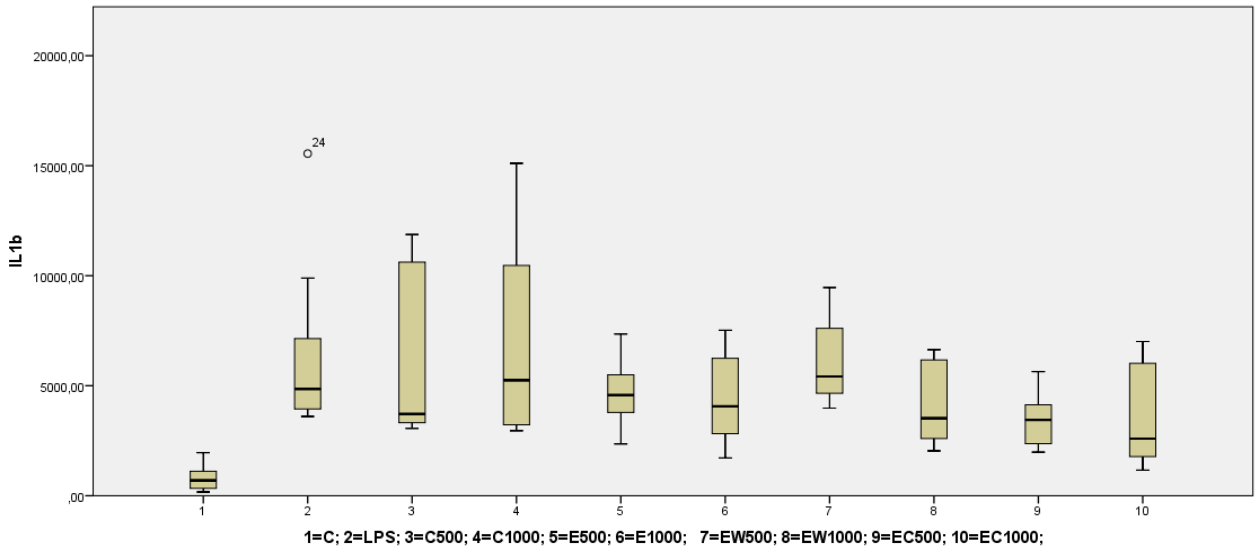
6.4.3 Επίδραση εκχυλισμάτων στην έκκριση Il-1β

Και στην περίπτωση της Il-1β πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα 4ωρης επώασης, σε συγκεντρώσεις 500 μg/ml και 1000 μg/ml κάθε εκχυλίσματος, με διπλά δείγματα για κάθε συνθήκη και στη συνέχεια, διπλή μέτρηση του κάθε δείγματος στην ELISA. Παρακάτω παρουσιάζονται ο πίνακας (Πίνακας 7) και το διάγραμμα (Διάγραμμα 13), όπου φαίνονται τα επίπεδα έκκρισης της IL-1β (pg IL-1β/mg εκχυλίσματος) από κύτταρα που επωάστηκαν με τα υπό εξέταση εκχυλίσματα, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (δεν έγινε επώαση με κάποιο εκχύλισμα, ούτε διέγερση με LPS) και με κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία του LPS. Τα

αποτελέσματα εκφράζονται ως Μέσος (25ο-75ο τεταρτημόριο), λόγω της μη κανονικότητας των μεγεθών.

Πίνακας 7. Προκαλούμενη από LPS έκκριση IL-1β παρουσία των εκχυλισμάτων

Δείγμα	pg IL-1β/mg ολικής πρωτεΐνης	p σε σχέση με το control	p σε σχέση με τον LPS
Control	697,7 (310,4-1115,0)	-	**0,000**
LPS	4850,2 (3906,7-7942,1)	**0,000**	-
Χλωροφορμικό 500	3717,2 (3277,2-10770,2)	**0,001**	1,000
Χλωροφορμικό 1000	5246,8 (3128,2-10895,1)	**0,000**	1,000
Αιθανολικό 500	4574,3 (3760,8-5523,0)	**0,001**	1,000
Αιθανολικό 1000	4062,9 (2282,3-6466,2)	**0,004**	1,000
Υδατική φάση 500	5418,2 (4619,0-7873,2)	**0,000**	1,000
Υδατική φάση 1000	3518,7 (2598,4-6232,1)	**0,030**	1,000
Χλωροφορμική φάση 500	3447,9 (2341,9-4357,8)	0,376	1,000
Χλωροφορμική φάση 1000	2592,6 (1731,3-6145,5)	0,320	0,927



Διάγραμμα 13. Αναστολή δράσης LPS (έκκριση Il-1β) από τα εκχυλίσματα

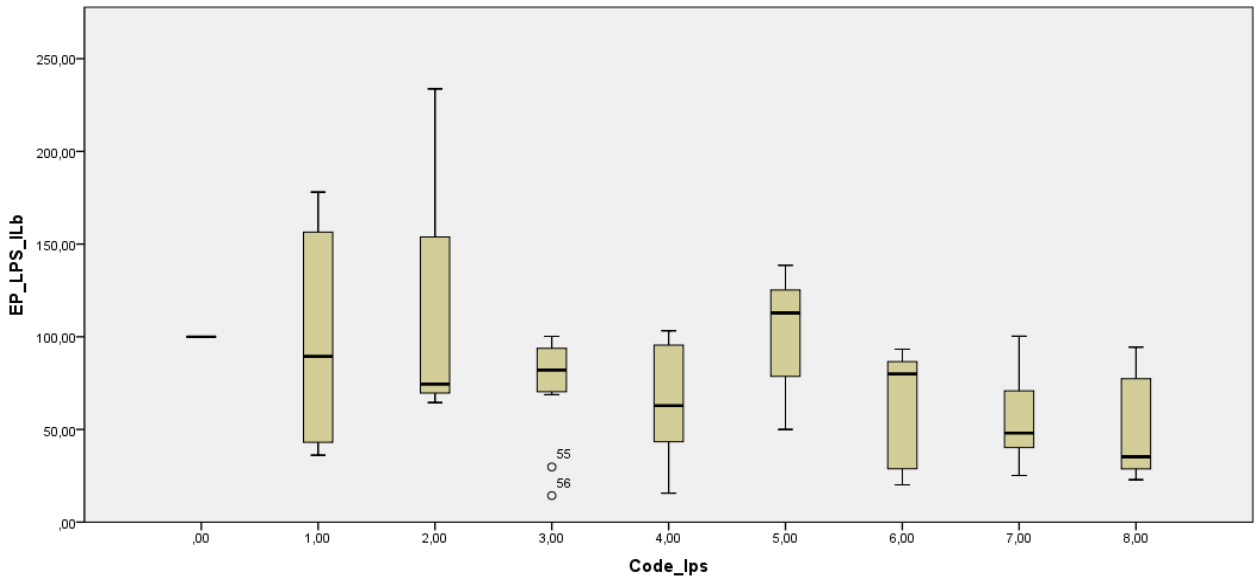
Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω, φαίνεται ότι στα κύτταρα που επωάστηκαν με παρουσία του LPS, αυξήθηκε η έκκριση της IL-1β, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (697,7 pg/mg).

Σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με LPS (4850,2 pg/mg), όλα τα κύτταρα που επωάστηκαν και με τα εκχυλίσματα εμφάνισαν μειωμένη έκκριση της IL-1β, με εξαίρεση το χλωροφορμικό εκχύλισμα, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml και την υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 500 μg/ml.

Για να διερευνηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων στην δράση του LPS τα αποτελέσματα παρουσία των εκχυλισμάτων εκφράστηκαν ως % της δράσης του LPS. Στον παρακάτω πίνακα και διάγραμμα παρουσιάζεται η αναστολή που προκάλεσε κάθε εκχύλισμα στη δράση του LPS.

Πίνακας 8. %Αναστολή από τα εκχυλίσματα στην έκκριση IL-1β που προκαλεί ο LPS

Δείγμα	%LPS	p σε σχέση με τον LPS
LPS	100	-
Χλωροφορμικό 500	89,4 (42,1-159,1)	1,000
Χλωροφορμικό 1000	74,4 (69,6-161,2)	1,000
Αιθανολικό 500	82,1 (69,6-94,3)	0,603
Αιθανολικό 100	62,9 (40,7-96,4)	0,223
Υδατική φάση 500	112,9 (71,2-125,5)	1,000
Υδατική φάση 1000	80,0 (28,8-86,8)	**0,044**
Χλωροφορμική φάση 500	48,1 (37,0-76,1)	**0,016**
Χλωροφορμική φάση 1000	35,3 (27,6-79,5)	**0,001**



Διάγραμμα 14. %Αναστολή LPS-Έκκριση IL-1β(0→δείγμα που επωάστηκε μόνο με LPS, 1→χλωροφορμικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 2→ χλωροφορμικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 3→αιθανολικό εκχύλισμα 500 μg/ml, 4→αιθανολικό εκχύλισμα 1000 μg/ml, 5→υδατική φάση 500 μg/ml, 6→υδατική φάση 1000 μg/ml, 7→χλωροφορμική φάση 500 μg/ml, 8→χλωροφορμική φάση 1000 μg/ml)

Από τον παραπάνω πίνακα και το διάγραμμα φαίνεται ότι σε όλα τα κύτταρα που επωάστηκαν με εκχυλίσματα, προκλήθηκε αναστολή της δράσης του LPS,αναφορικά με την έκκριση IL-1β. Μόνο η

αναστολή που προκλήθηκε από την υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (80%, p=0,044) και από τη χλωροφορμική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, και στις δύο συγκεντρώσεις (500 μg/ml και 1000 μg/ml, 48,1% και 35,3%, p=0,016 και p=0,001, αντίστοιχα), ήταν σημαντική.

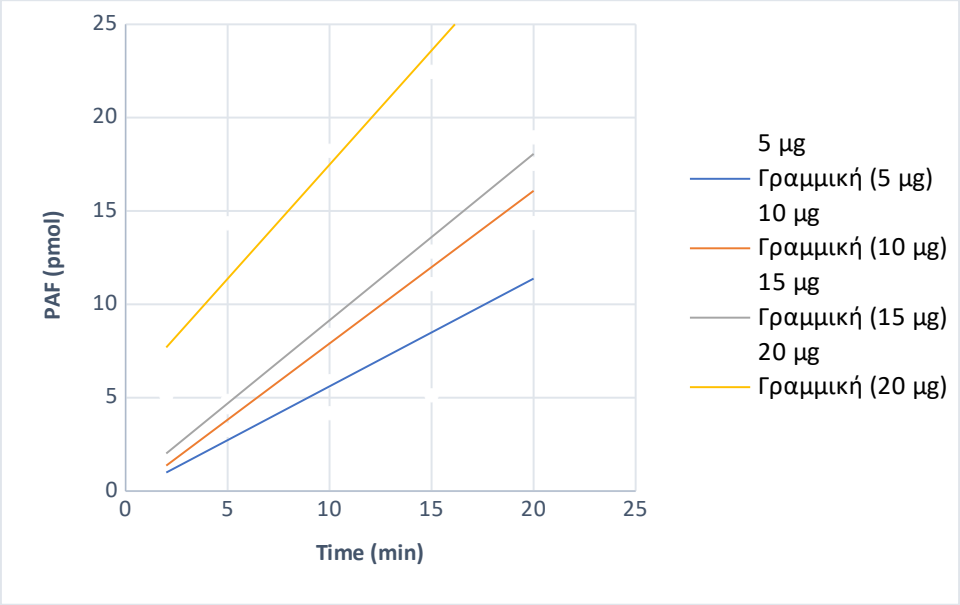
5.5 Ενζυμική κινητική

Με σκοπό να εξετασθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων από τα παρά-προϊόντα οινοποίησης στην δραστικότητα της PAF CPT έπρεπε αρχικά να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου στα PBMCs. Συγκεκριμένα έπρεπε να βρεθεί η κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης, δηλαδή του ενζύμου, και ο κατάλληλος χρόνος διάρκειας της ενζυμικής αντίδρασης ώστε να έχουμε γραμμική σχέση μεταξύ παραγωγής προϊόντος (PAF) και ποσότητας ενζύμου.

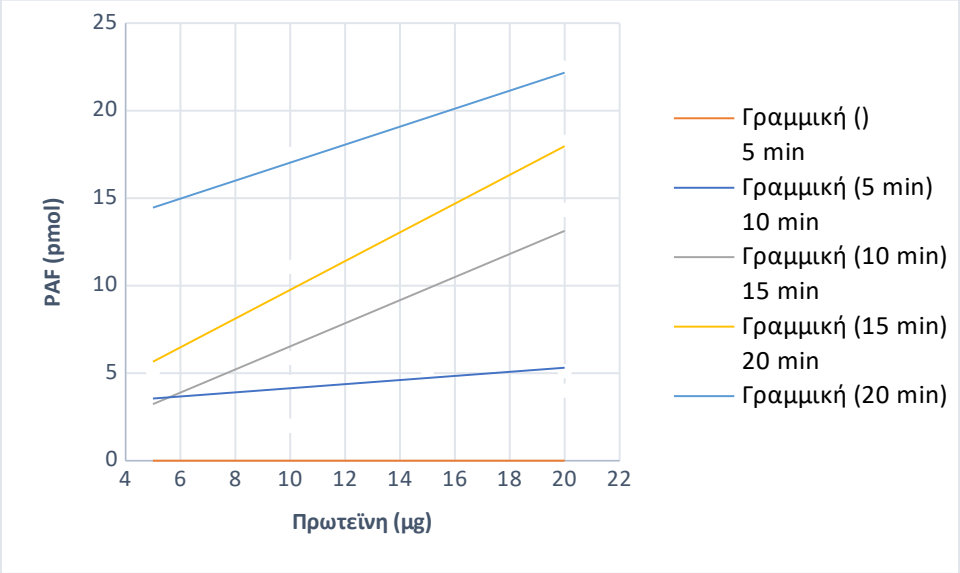
Η δραστικότητα του ενζύμου PAF CPT προσδιορίστηκε σε ομονογενοποίημα από PBMC. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του παραγόμενου PAF έγινε με υγρή χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογραφία μάζας (LCMS). Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη PAF, βάσει της οποίας υπολογίστηκαν τα pmol του παραγόμενου PAF σε κάθε συνθήκη.

Διάγραμμα 15. Πρότυπη καμπύλη PAF

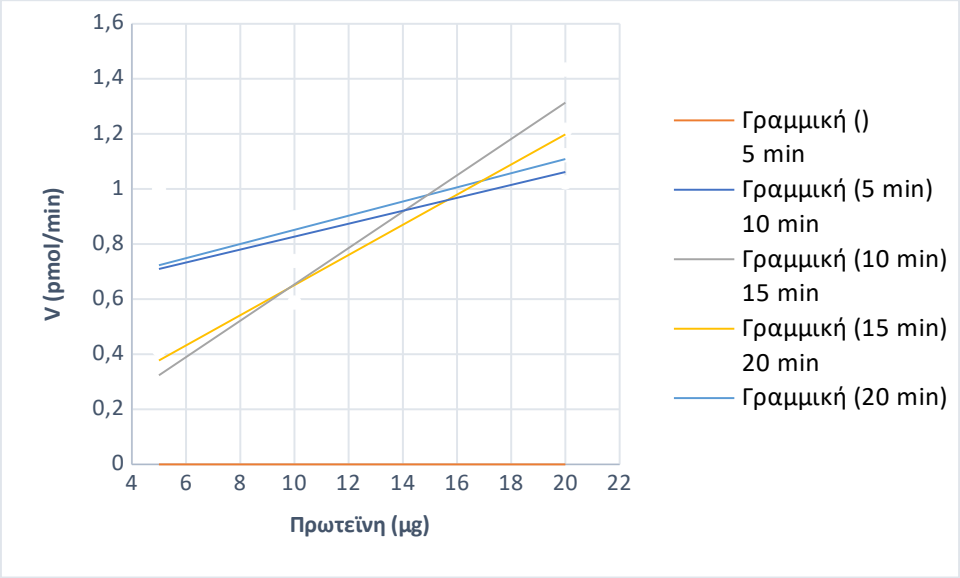
Παρακάτω παρουσιάζονται το διάγραμμα ποσότητας του PAF (pmol PAF) σε συνάρτηση με το χρόνο (min), για διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης (μg), το διάγραμμα ποσότητας του PAF (pmol PAF) σε συνάρτηση με την ποσότητα της πρωτεΐνης (μg), για διαφορετικούς χρόνους (min), καθώς και το διάγραμμα της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης της παραγωγής του PAF (pmol/min) σε συνάρτηση με την ποσότητα της πρωτεΐνης (μg), για διαφορετικούς χρόνους (min).



Διάγραμμα 16. Ποσότητα PAF- χρόνος



Διάγραμμα 17. Ποσότητα PAF-ποσότητα πρωτεΐνης

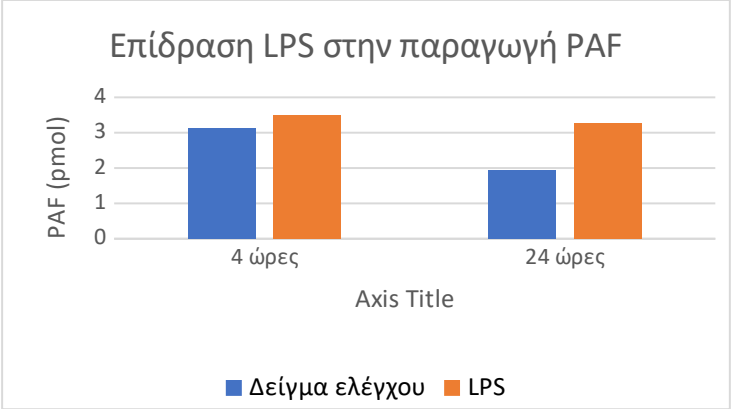


Διάγραμμα 18. Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης-ποσότητα πρωτεΐνης

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα παραπάνω διαγράμματα, θα επιλεγεί η ποσότητα των 15 μg στα 15 λεπτά, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα του ενζύμου PAF CPT.

5.6 Επίδραση LPS στη δραστικότητα της PAF CPT

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και ένα πρόδρομο πείραμα, όπου εξετάστηκε η επίδραση του LPS στη δραστικότητα της PAF CPT, μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων του PAF σε PBMCs που είχαν επωαστεί για 4 και 24 ώρες με LPS. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με δείγματα ελέγχου, δηλαδή κύτταρα που δεν είχαν επωαστεί με LPS.



Διάγραμμα 19. Επίδραση LPS στη δραστικότητα της PAF CPT

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, τα επίπεδα του PAF ήταν υψηλότερα και μετά την 4ωρη και μετά την 24ωρη επώαση στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Συγκεκριμένα, μετά την 4ωρη επώαση, τα επίπεδα του PAF ήταν υψηλότερα κατά 11%, στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ μετά την

24ωρη επώαση, παρατηρήθηκε 70% αύξηση των επιπέδων του PAF στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

7.Συζήτηση

Από τη δεκαετία του 1970, τα αποτελέσματα των πρώτων επιδημιολογικών μελετών [175,96] επιβεβαίωσαν τον ευεργετικό ρόλο της μέτριας κατανάλωσης κρασιού στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η ανάδυση του φαινομένου που ονομάστηκε «Γαλλικό Παράδοξο», στη διάρκεια της δεκαετίας του 1990, πυροδότησε ακόμη μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον σχετικά με τις ιδιότητες του κρασιού [104,105], αλλά και των σταφυλιών. Ωστόσο, την ίδια εποχή άρχισαν να μελετώνται και μεμονώμενα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο κρασί και τα σταφύλια [106], καθώς και να δοκιμάζονται διαφορετικά είδη εκχυλισμάτων και καινοτόμες μέθοδοι εκχύλισης.

Τα τελευταία χρόνια, έχει πραγματοποιηθεί πλήθος μελετών, οι οποίες εξετάζουν την in vitro επίδραση εκχυλισμάτων διαφόρων ποικιλιών λευκού και κόκκινου κρασιού [84,135,139], σταφυλιών [168,170], καθώς και φαινολικών ενώσεων [134,137,138] στις αποκρίσεις πολλαπλών κυτταρικών τύπων. Τα συγκεριμένα εκχυλίσματα εξετάζονται, κυρίως, για το αντιφλεγμονώδες και αντιοξειδωτικό τους δυναμικό. Μια από τις φαινολικές ενώσεις, η οποία έχει μελετηθεί κατά κόρον, είναι η ρεσβερατρόλη [84], η οποία έχει εμφανίσει τόσο αντιφλεγμονώδεις, όσο και αντιοξειδωτικές δράσεις [140,141,142,143,144,145,146]. Άλλη μια φαινολική ένωση, η οποία έχει αποτελέσει αντικείμενο μελετών, είναι η κερκετίνη [133]. Ως κυτταρικές σειρές στις παραπάνω ερευνητικές εργασίες χρησιμοποιήθηκαν, κυρίως, κύτταρα που σχετίζονται άμεσα με τη φλεγμονώδη απόκριση, όπως μακροφάγα [144], αιμοπετάλια [139,145] και περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος [142,170], τα οποία είχαν διεγερθεί με φλεγμονώδεις παράγοντες. Βασικό σημείο στην πειραματική διαδικασία των μέχρι τώρα in vitro μελετών ήταν η ανίχνευση των επιπέδων διαφόρων κυτταροκινών, ύστερα από επώαση των κυττάρων στα υπό μελέτη εκχυλίσματα.

Παρόλα αυτά, λόγω της ύπαρξης της αιθανόλης, η οποία έχει και επιβλαβή για τον οργανισμό δράση, δεν μπορεί να καταναλωθεί μεγάλη ποσότητα κρασιού. Τα παραπροϊόντα οινοποίησης αποτελούν μια φθηνή πηγή ανάλογων συστατικών, η οποία παραμένει ανεκμετάλλευτη και θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για την παραλαβή τους. Πρόκειται για τα διαφορετικά τμήματα του σταφυλιού, όπως τα στέμφυλα, τα κοτσάνια, οι καρποί, τα φύλλα και οι οινολάσπες, τα οποία απορρίπτονται κατά τη διαδιακασία παραγωγής κρασιού. Ωστόσο, οι ιδιότητες των εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς ως προς το αντιφλεγμονώδες δυναμικό τους.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να καλύψει αυτό το κενό της βιβλιογραφίας και να εξετάσει την αντιφλεγμονώδη δράση εκχυλισμάτων παρα-προϊόντων οινοποίησης και συγκεκριμένα, στεμφύλων από τέσσερις ποικιλίες σταφυλιών (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc,

Syrah και Ξινόμαυρο). Πραγματοποίηθηκε αιθανολική εκχύλιση των στεμφύλων και προοέκυψαν ένα αιθανολικό και ένα χλωροφορμικό εκχύλισμα από το συνδυασμό των τεσσάρων ποικιλιών, ενώ έγινε και διαχωρισμός του ολικού εκχυλίσματος σε χλωροφορμική και υδατική φάση, με σκοπό να διερευνηθεί εάν η βιολογική δράση οφείλεται στα υδατοδιαλυτά ή λιποδιαλυτά συστατικά του. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs), τα οποία δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές ερευνητικές εργασίες.

Αρχικά, εξετάστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του αιθανολικού εκχυλίσματος και των δύο κλασμάτων του. Η συγκέντρωση του αιθανολικού εκχυλίσματος βρέθηκε ίση με 15,8 μg GA/ mg εκχυλίσματος, ενώ οι συγκεντρώσεις της υδατικής και χλωροφορμικής φάσης βρέθηκαν ίσες με 45,9 μg GA/ mg εκχυλίσματος και 7 μg GA/ mg εκχυλίσματος. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών ενώσεων εκχυλίζεται στην υδατική στοιβάδα.

Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων με MTT που ακολούθησε, έδειξε, αρχικά, ότι, τόσο το αιθανολικό, όσο και το χλωροφορμικό εκχύλισμα, προκαλούν αύξηση του αριθμού των κυττάρων, ύστερα από 24ωρη επώαση σε συγκεντρώσεις 500 μg/ml και 1000 μg/ml των δύο εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, η επώαση με το αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 500 μg/ml έδειξε μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης (134%), σε σχέση με την αντίστοιχη του χλωροφορμικού εκχυλίσματος (34%). Υποθέσαμε ότι το χρώμα των εκχυλισμάτων ήταν πιθανό να επηρεάζει τις τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων και να οδηγούμαστε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Συνεπώς, ακολούθησε η ίδια δοκιμασία, με 3ωρη επώαση των κυττάρων στα ίδια εκχυλίσματα, με και χωρίς την προσθήκη MTT. Ύστερα από αφαίρεση των απορροφήσεων των δειγμάτων που είχαν επωαστεί σε εκχυλίσματα χωρίς MTT από τις απορροφήσεις των αντίστοιχων δειγμάτων που είχαν επωαστεί σε εκχυλίσματα με MTT, φάνηκε τα αιθανολικά εκχυλίσματα προκαλούσαν αύξηση. Η μεγαλύτερη αύξηση σημειώθηκε κατά την επώαση των κυττάρων με το αιθανολικό εκχύλισμα, σε συγκνέντρωση 1000 μg/ml, όπου ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε κατά 79%.

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, το αιθανολικό εκχύλισμα διαχωρίστηκε σε μία υδατική και μια χλωροφορμική φάση, μέσω της μεθόδου Bligh-Dyer και η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας με MTT πραγματοποιήθηκε και για τα επιμέρους κλάσματα του αρχικού αιθανολικού εκχυλίσματος. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με το ολικό αιθανολικό εκχύλισμα, τη χλωροφορμική και την υδατική φάση, σε συγκεντρώσεις 500 μg/ml, 1000 μg/ml και 1500 μg/ml, με και χωρίς την προσθήκη MTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι συγκεντρώσεις του αιθανολικού εκχυλισμάτος προκαλούσαν μικρή αύξηση του αριθμού των κυττάρων (5%, 8% και 29% για 500 μg/ml,

1000 μg/ml και 1500 μg/ml αντίστοιχα). Όσον αφορά τα επιμέρους κλάσματα του αιθανολικού εκχυλίσματος, η επώαση στο εκχύλισμα της χλωροφορμικής φάσης προκάλεσε μείωση σε όλες τις συγκεντρώσεις και η επώαση στο εκχύλισμα της υδατικής φάσης προκάλεσε αύξηση των κυττάρων μόνο σε συγκέντρωση 500 μg/ml, ενώ σε συγκεντρώσεις 1000 και 1500 μg/ml, προκλήθηκε μικρή μείωση (7%).

Επειδή όμως υπάρχει ακόμα περίπτωση το χρώμα των εκχυλισμάτων σε συνδιασμό με τη χρωστική που περιέχει το θρεπτικό υλικό (κόκκινο της φαινόλης) να επηρεάζει την μέτρηση MTT, προχωρήσαμε σε μέτρηση των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο, σε μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα, ύστερα από 3ωρη επώαση με το αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκεντρώασεις 500 μg/ml, 1000 μg/ml, 1500 μg/ml και 2000 μg/ml, παρατηρήθηκε μια μείωση του αριθμού των κυττάρων που είχαν επωαστεί με το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1000 μg/ml, κατά 20%. Το αποτέλεσμα αυτό δε συνάδει με τη μέτρηση του MTT, όπου η επώαση σε όλες τις συγκεντρώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος οδηγούσε σε αύξηση και είναι πιθανό να αποδίδεται σε σφάλμα κατά τη μέτρηση. Όταν έγινε επανάληψη του ίδιου πειράματος με τις ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά 24ωρη επώαση των κυττάρων, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των κυττάρων ήταν ελαφρώς μειωμένος όταν επωάστηκαν σε συγκέντρωση 500 μg/ml (32%). Το ποσοστό μέιωσης του αριθμού των κυττάρων ελαττώθηκε από 32% σε 4% κατά την επώαση σε εκχύλισμα συγκέντρωσης 1000 μg/ml. Ο αριθμός των κυττάρων παρουσίασε αύξηση μόνο όταν έγινε επώαση σε εκχύλισμα συγκέντρωσης 1500 μg/ml (11%). Ωστόσο, σε συγκέντρωση του εκχυλίσματος 2000 μg/ml παρατηρήθηκε μείωση των κυττάρων κατά 62,54%. Η μείωση αυτή ήταν αναμενόμενη, καθώς ήταν πιθανό η αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος πάνω από κάποιο όριο (1500 μg/ml) να είναι κυτταροτοξική για τα κύτταρα.

Η μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και για τα επιμέρους κλάσματα του αιθανολικού εκχυλίσματος συμφώνησε σε αρκετά σημεία με τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT. Συγκεκριμένα, ύστερα από 24ωρη επώαση των κυττάρων στο αιθανολικό εκχύλισμα, στη χλωροφορμική και την υδατική φάση, σε συγκεντρώσεις 1000 μg/ml και 1500 μg/ml, φάνηκε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα δεν προκαλούσε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων σε συγκέντρωση 1500 μg/ml (11%), ενώ σε συγκέντρωση 1000 μg/ml, προκλήθηκε πολύ μικρή μείωση (4%). Η επώαση σε εκχυλίσματα της χλωροφορμικής φάσης προκάλεσε μείωση του αριθμού των κυττάρων, όπως είχε παρατηρηθεί και στη δοκιμασία με MTT. Τέλος, η επώαση σε εκχύλισμα της υδατικής φάσης έδειξε αύξηση του αριθμού των κυττάρων σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (19%), αλλά μείωση σε

συγκέντρωση 1500 μg/ml (29%). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα υδατικής φάσης είναι κυτταροτοξικό σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 1000 μg/ml.

Προκειμένου να ελεγχθεί η αντιφλεγμονώδης δράση των εκχυλισμάτων εξετάσθηκε η επίδρασή τους στην έκκριση των κυτταροκινών TNFα και Il-1β από PBMCs που είχαν διεγερθεί με LPS. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η ικανότητα του LPS να προκαλεί αύξηση της έκκρισης των κυτταροκινών σε κύτταρα που επωάστηκαν με και χωρίς LPS και χωρίς εκχυλίσματα, για 4 και 24 ώρες. Συγκεκριμένα, στις 4 ώρες επώασης, όσον αφορά τον TNFα, τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS εμφάνισαν 10,6 φορές υψηλότερα επίπεδα τις κυτταροκίνης, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ τα επίπεδα της Il-1β ήταν 7,4 φορές υψηλότερα στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Το επόμενο βήμα ήταν η επώαση κυττάρων παρουσία του LPS και διαφορετικών συγκεντρώσεων (500 μg/ml και 1000 μg/ml) του χλωροφορμικού, του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος, αλλά και των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από το διαχωρισμό του ολικού εκχυλίσματος σε υδατική και χλωροφορμική φάση, για 4 και 24 ώρες. Με βάση και τα πειράματα βιωσιμότητας, επιλέχθηκε να γίνει επώαση στις 4 ώρες παρουσία των εκχυλισμάτων και του LPS.

Όσον αφορά την έκκρισης του TNFα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα ανέστειλαν τη δράση του LPS. Σημαντική ήταν η αναστολή που προκλήθηκε από την επώαση των κυττάρων στο αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 500 μg/ml (38,2%, p=0,049) και 1000 μg/ml (6%, p=0,0) και στη χλωροφορμική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (37,4%, p=0,011). Ακόμη, αξίζει να παρατηρηθεί ότι η υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml, φάνηκε να αναστέλλει πλήρως τη δράση του LPS (-9,3%, p<=0,0), καθώς και να προκαλεί μείωση της έκκρισης της κυτταροκίνης κάτω από τα βασικά επίπεδα (δείγμα αναφοράς).

Αναφορικά με την έκκριση της IL-1β, φάνηκε ότι όλα τα εκχυλίσματα προκάλεσαν αναστολή της δράσης του LPS. Σημαντική ήταν η αναστολή που προκλήθηκε από την υδατική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, σε συγκέντρωση 1000 μg/ml (80%, p=0,044) και από τη χλωροφορμική φάση του αιθανολικού εκχυλίσματος, και στις δύο συγκεντρώσεις (500 μg/ml και 1000 μg/ml, 48,1% και 35,3%, p=0,016 και p=0,001, αντίστοιχα).

Το τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του βιοσυνθετικού ενζύμου του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), PAF CPT. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαφορετι-

κούς χρόνους (2, 5, 10, 15 και 20 λεπτά) και για διαφορετικές ποσότητες πρωτεϊνης (5, 10, 15 και 20 μg). Από τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε διάρκεια της αντίδρασης 15 λεπτά και η ποσότητα πρωτεϊνης 15 μg. Επίσης, μετρήθηκε η παραγωγή του PAF σε κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS για 4 και 24 ώρες. Μετά την 4ωρη επώαση, τα επίπεδα του PAF ήταν υψηλότερα κατά 11%, στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ μετά την 24ωρη επώαση, παρατηρήθηκε 70% αύξηση των επιπέδων του PAF στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με LPS, σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

7.1 Περιορισμοί

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν προέρχονται από in vitro δοκιμασίες και συνεπώς, είναι πιθανό η αντιφλεγμονώδης δράση που παρατηρήθηκε να είναι διαφορετική σε in vivo συνθήκες. Υπάρχει περίπτωση, σε επίπεδο οργανισμού, να μεταβάλλεται η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα των ενεργών συστατικών που μελετώνται.

7.2 Συμπεράσματα

Η παρούσα ερευνητική εργασία είναι η πρώτη που εξετάζει την αντιφλεγμονώδη δράση εκχυλισμάτων στεμφύλων σε PBMCs.

Παρατηρήθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα για 4 ώρες οδηγεί σε αναστολή των φλεγμονωδών αποκρίσεων που επάγει ο LPS. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων, τα οποία θα περιέχουν τέτοιου είδους εκχυλίσματα και θα εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις.

8.Βιβλιογραφία

1. Medzhitov, R. (2008), 'Origin and physiological roles of inflammation', Nature 454(7203), 428-435.
2. Ashley, N. T.; Weil, Z. M. & Nelson, R. J. (2012), 'Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation', Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 43(1), 385-406.
3. Freire, M. & Van Dyke, T. (2013), 'Natural resolution of inflammation', Periodontology 2000 63(1), 149-164.
4. Soehnlein, O. & Lindbom, L. (2010), 'Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation', Nature Reviews Immunology 10(6), 427-439.
5. Kokkas, B. “1st international congress on neurobiology and clinical psychopharmacology and European psychiatric association conference on treatment guidance” Annals of general psychia-try vol. 9,Suppl 1 S1-S237. 22 Apr. 2010.
6. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
7. Serhan, C.N., Dalli, J., Colas, R.A., Winkler, J.W. and Chiang, N. (2015) Protectins and maresins: New pro-re¬solving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metab-olome. Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids, 1851: 397-413.
8. Isailovic, N., Daigo, K., Mantovani, A. and Selmi, C. (2015) Interleukin-17 and innate immu-nity in infections and chronic inflammation. J. Autoimmun., 60: 1-11.
9. Balkwill, F., A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow?. Lancet 357: 539-545.
10. Anderson, J. (1988), 'Inflammatory response to implants', ASAIO transactions 34(2), 101вЂ”107.
11. Lacy, P. (2015) Editorial: Secretion of cytokines and chemo¬kines by innate immune cells. Front Immunol., 6: 190.
12. Nelson, D.S. (2014) Immunobiology of the Macrophage Ed. Academic Press, New York.
13. Murphy, K. and Weaver, C. (2016), Janeway’s Immunobiology. Garland Science, New York.
14. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster - Robbins Basic Pathology, chapter 3, p.61, 2017, Elsevier, 10th edition
15. Abbas, A.; Murphy, K. & Sher, A. (1996), 'Functional diversity of helper T lymphocytes', Na-ture 383(6603), 787-793.
16. Sampson, A. (2000), 'The role of eosinophils and neutrophils in inflammation', Clinical and Ex-perimental Allergy, Supplement 30(1), 22-27.
17. Theoharides, T.; Alysandratos, K.-D.; Angelidou, A.; Delivanis, D.-A.; Sismanopoulos, N.; Zhang, B.; Asadi, S.; Vasiadi, M.; Weng, Z.; Miniati, A. & Kalogeromitros, D. (2012), 'Mast cells and in-flammation', Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 1822(1), 21-33.
18. Sismanopoulos, N.; Delivanis, D.-A.; Alysandratos, K.-D.; Angelidou, A.; Therianou, A.; Kalogero-mitros, D. & Theoharides, T. (2012), 'Mast cells in allergic and inflammatory dis-eases', Current Pharmaceutical Design 18(16), 2261-2277.
19. J. Gong, N.S. Yang, M. Croft, I.C. Weng, L. Sun, F.T. Liu, S.S. Chen, The antigen presentation func-tion of bone marrow-derived mast cells is spatiotemporally restricted to a subset ex-pressing high levels of cell surface FcepsilonRI and MHC II, BMC Immunol. 11 (2010) 34.

20. Curcic, S., Holzer, M., Frei, R., Pasterk, L., Schicho, R., Heinemann, A. and Marsche, G. (2015) Neutrophil effector responses are suppressed by secretory phospholipase A 2 modified HDL. Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids, 1851: 184-193.

21. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. Nat Rev Immunol. 2002; 2:965–975.
22. Roach, J.; Glusman, G.; Rowen, L.; Kaur, A.; Purcell, M.; Smith, K.; Hood, L. & Aderem, A. (2005), 'The evolution of vertebrate Toll-like receptors', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(27), 9577-9582.
23. Pober, J. & Sessa, W. (2015), 'Inflammation and the blood microvascular system', Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 7(1).
24. Braverman, I. (1989), 'Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states', Journal of Investigative Dermatology 93(2 SUPPL.), S2-S9.
25. Aird, W. (2007), 'Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds', Circulation Research 100(2), 174-190.
26. Dore-Duffy P, Cleary K. 2011. Morphology and properties of pericytes. Methods Mol Biol 686: 49–68.
27. Goddard LM, Iruela-Arispe ML. 2013. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. Thromb Haemost 109: 407–415.
28. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. 1991. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: A juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. J Cell Biol 115: 223–234.
29. Majno G, Palade GE, Schoefl GI. 1961. Studies on inflammation: II. The site of action of hista-mine and serotonin along the vascular tree: A topographic study. J Biophys Biochem Cytol 11: 607–626.
30. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. 2006. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 1002–1007
31. Pober, J. & Sessa, W. (2007), 'Evolving functions of endothelial cells in inflammation', Nature Reviews Immunology 7(10), 803-815.
32. Heltianu C, Simionescu M, Simionescu N. 1982. Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: Characteristic high-affinity binding sites in venules. J Cell Biol 93: 357–364.
33. Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, Min W, Pober JS, Bradley JR. 2005. TNFR1- and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury. FASEB J 19: 1637–1645.
34. Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, Suttorp N. 2007. Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. Thromb Haemost 98: 319–326.
35. Leick, M.; Azcutia, V.; Newton, G. & Luscinskas, F. (2014), 'Leukocyte recruitment in inflammation: Basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies', Cell and Tissue Research 355(3), 647-656.
36. Sperandio, M., Smith, M.L., Forlow, S.B., Olson, T.S., Xia, L., McEver, R.P., Ley, K., 2003. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates l-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. Journal of Experimental Medicine 197, 1355–1363.
37. Ginsberg, M.H., Partridge, A., Shattil, S.J., 2005. Integrin regulation. Current Opinion in Cell Biol-ogy 17, 509–516.
38. Vestweber, D., Blanks, J.E., 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. Physiological Reviews 79, 181–213.

39. Ley, K. (2003), 'The role of selectins in inflammation and disease', Trends in Molecular Medicine 9(6), 263-268.
40. Ley, K., Bullard, D.C., Arbones, M.L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T.F., Beaudet, A.L., 1995. Sequential contribution of l- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. Journal of Experimental Medicine 181, 669–675.
41. Abdulkhaleq, L.; Assi, M.; Abdullah, R.; Zamri-Saad, M.; Taufiq-Yap, Y. & Hezmee, M. (2018), 'The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review', Veterinary World 11(5), 627-635.
42. Turner, M.; Nedjai, B.; Hurst, T. & Pennington, D. (2014), 'Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease', Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1843(11), 2563-2582.
43. D. Boraschi, D. Lucchesi, S. Hainzl, M. Leitner, E. Maier, D. Mangelberger, G.J. Oostingh, T. Pfaller, C. Pixner, G. Posselt, P. Italiani, M.F. Nold, C.A. Nold-Petry, P. Bufler, C.A. Dinarello, IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family, Eur. Cytokine Netw. 22 (2011) 127–147.
44. V. Santarlasci, L. Cosmi, L.Maggi, F. Liotta, F. Annunziato, IL-1 and T helper immune responses, Front. Immunol. 4 (2013) 182.
45. W.P. Arend, G. Palmer, C. Gabay, IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines, Immunol. Rev. 223 (2008) 20–38.
46. J.L. Casanova, L. Abel, L. Quintana-Murci, Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics, Annu. Rev. Immunol. 29 (2011) 447–491.
47. L.A. O'Neill, The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress, Immunol. Rev. 226 (2008) 10–18.
48. M. Peters, A.M. Müller, S. Rose-John, Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis, Blood 92 (1998) 3495–3504.
49. M. Jücker, H. Abts,W. Li, R. Schindler, H.Merz, A. Günther, C. von Kalle,M. Schaadt, T. Diamantstein, A.C. Feller, Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease, Blood 77 (1991) 2413–2418.
50. T. Kishimoto, IL-6: from its discovery to clinical applications, Int. Immunol. 22 (2010) 347–352.
51. K.A. Smith, R.M. Maizels, IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo, Eur. J. Immunol. 44 (2014) 150–161
52. K. Takeda, T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, S. Akira, Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice, J. Immunol. 161 (1998) 4652–4660.
53. J. Gauldie, C. Richards,W. Northemann, G. Fey, H. Baumann, IFN beta 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes, Ann. N. Y. Acad. Sci. 557 (1989) 46–58.
54. D. Graf, K. Haselow, I. Münks, J.G. Bode, D. Häussinger, Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130, Arch. Biochem. Biophys. 477 (2008) 330–338.
55. L.A. Tartaglia, D.V. Goeddel, Two TNF receptors, Immunol. Today 13 (1992) 151–153.

56. J. Rothe, G. Gehr, H. Loetscher, W. Lesslauer, Tumor necrosis factor receptors-structure and function, Immunol. Res. 11 (1992) 81–90.
57. C.A. Smith, T. Farrah, R.G. Goodwin, The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death, Cell 76 (1994) 959–962.
58. D. Tracey, L. Klareskog, E.H. Sasso, J.G. Salfeld, P.P. Tak, Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review, Pharmacol. Ther. 117 (2008) 244–279.
59. D.J. MacEwan, TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences, Cell. Signal. 14 (2002) 477–492.
60. R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack,M.F.Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley,M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J.March, D.P. Cerretti, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, Nature 385 (1997) 729–733.
61. E. Friedmann, E. Hauben, K.Maylandt, S. Schleeger, S. Vreugde, S.F. Lichtenthaler, P. H. Kuhn, D. Stauffer, G. Rovelli, B. Martoglio, SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFα in activated dendritic cells to trigger IL-12 production, Nat. Cell Biol. 8 (2006) 843–848.
62. Peschon, J.; Torrance, D.; Stocking, K.; Glaccum, M.; Otten, C.; Willis, C.; Charrier, K.; Morrissey, P.; Ware, C. & Mohler, K. (1998), 'TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation', Journal of Immunology 160(2), 943-952.
63. Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; LÃ¶hden, M.; Clauss, M.; Maxeiner, B.; Georgopoulos, S.; Lesslauer, W.; Kollias, G.; Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. (1995), 'The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor', Cell 83(5), 793-802.
64. McFarlane, S.; Pashmi, G.; Connell, M.; Littlejohn, A.; Tucker, S.; Vandenabeele, P. & MacEwan, D. (2002), 'Differential activation of nuclear factor-ÎºB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly', FEBS Letters 515(1-3), 119-126.
65. Immunology 7th Ed. - D. Male, J. Brostoff, D. Roth, I. Roitt (Elsevier, 2006)
66. Baumann, M.H., Williams, Z., Zolkowska, D. and Rothman, R.B. (2011) Serotonin (5-HT) precur-sor loading with 5-hydroxyl-tryptophan (5-HTP) reduces locomotor activation produced by (+)-amphetamine in the rat. Drug Alcohol. Depend., 114: 147-152.
67. Mak, T.W., Saunders, M.E. and Jett, B.D. (2013) Primer to the Immune Response. Newnes.
68. SchÃffer, M.; Beiter, T.; Becker, H. & Hunt, T. (1998), 'Neuropeptides. Mediators of inflammation and tissue repair?', Archives of Surgery 133(10), 1107-1116.
69. Mastellos D, Morikis D, Isaacs SN, Holland MC, Strey CW, Lambris JD: Complement: structure, functions, evolution, and viral molecular mimicry. Immunol Res 2003, 27:367–385.
70. Markiewski, M. & Lambris, J. (2007), 'The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight', American Journal of Pathology 171(3), 715-727.
71. Clancy RM, Dahinden CA, Hugli TE: Complement-mediated arachidonate metabolism. Prog Bio-chem Pharmacol 1985, 20:120–131.
72. Morgan, B. (2016), 'The membrane attack complex as an inflammatory trigger', Immunobiology 221(6), 747-751.
73. Bailey, J.M., (2013) Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF: Mechanism of Action, Molecular Biology, and Clinical Applications. Springer Science and Business Media, New York.

74. Piomelli, D. (2013) Arachidonic Acid in Cell Signaling. Springer Science and Business Media, New York.
75. Benveniste, J. (1974), 'Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils', Nature 249(5457), 581-582.
76. Honda, Z.-I.; Nakamura, M.; Miki, I.; Minami, M.; Watanabe, T.; Seyama, Y.; Okado, H.; Toh, H.; Ito, K.; Miyamoto, T. & Shimizu, T. (1991), 'Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung', Nature 349(6307), 342-346.
77. Hara, S.; Shike, T.; Takasu, N. & Mizui, T. (1997), 'Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macrophage foam cells', Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17(7), 1258-1266.
78. Montrucchio, G.; Alloatti, G. & Camussi, G. (2000), 'Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology', Physiological Reviews 80(4), 1669-1699.
79. Bussolino, F.; Camussi, G.; Aglietta, M.; Braquet, P.; Bosia, A.; Pescarmona, G.; Sanavio, F.; D'Urso, N. & Marchisio, P. (1987), 'Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures', Journal of Immunology 139(7), 2439-2446.
80. Deo, D.; William Axelrad, T.; Robert, E.; Marcheselli, V.; Bazan, N. & Hunt, J. (2002), 'Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism', Journal of Biological Chemistry 277(24), 21237-21245.
81. Hudry-Clergeon, H.; Stengel, D.; Ninio, E. & Vilgrain, I. (2005), 'Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3â€²-kinase', FASEB Journal 19(6), 512-520.
82. Snyder, F. (1988), 'Metabolism of platelet activating factor and related ether lipids: enzymatic pathways, subcellular sites, regulation, and membrane processing.', Progress in clinical and biological research 282, 57-72.
83. Argyrou, C.; Vlachogianni, I.; Stamatakis, G.; Demopoulos, C.; Antonopoulou, S. & Fragopoulou, E. (2017), 'Postprandial effects of wine consumption on Platelet Activating Factor metabolic enzymes', Prostaglandins and Other Lipid Mediators 130, 23-29.
84. Xanthopoulou, M.; Asimakopoulos, D.; Antonopoulou, S.; Demopoulos, C. & Fragopoulou, E. (2014), 'Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells', Food Chemistry 165, 50-59
85. Ninio, E. (2005), 'Phospholipid mediators in the wall: Involvement in atherosclerosis', Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 8(2), 123-131.
86. Heery, J.; Kozak, M.; Stafforini, D.; Jones, D.; Zimmerman, G.; McIntyre, T. & Prescott, S. (1995), 'Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells', Journal of Clinical Investigation 96(5), 2322-2330.
87. GrÃler, M. & Goetzl, E. (2002), 'Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity', Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 1582(1-3), 168-174.
88. Kostenis, E. (2004), 'Novel clusters of receptors for sphingosine-1-phosphate, sphingosylphosphorylcholine, and (lyso)-phosphatidic acid: New receptors for "old" ligands', Journal of Cellular Biochemistry 92(5), 923-936.

89. Yoshida, K.; Nishida, W.; Hayashi, K.; Ohkawa, Y.; Ogawa, A.; Aoki, J.; Arai, H. & Sobue, K. (2003), 'Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo', Circulation 108(14), 1746-1752.
90. Hayashi, K.; Takahashi, M.; Nishida, W.; Yoshida, K.; Ohkawa, Y.; Kitabatake, A.; Aoki, J.; Arai, H. & Sobue, K. (2001), 'Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids', Circulation Research 89(3), 251-258.
91. Tokumura, A.; Kanaya, Y.; Kitahara, M.; Miyake, M.; Yoshioka, Y. & Fukuzawa, K. (2002), 'Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits', Journal of Lipid Research 43(2), 307-315.
92. Fragopoulou, E.; Demopoulos, C. & Antonopoulou, S. (2009), 'Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox', International Journal of Wine Research 1(1), 131-143.
93. Renaud, S. & de Lorgeril, M. (1992), 'Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease', The Lancet 339(8808), 1523-1526.
94. German, J. & Walzem, R. (2000), 'The health benefits of wine', Annual Review of Nutrition 20, 561-593.
95. Fragopoulou, E.; Choleva, M.; Antonopoulou, S. & Demopoulos, C. (2018), 'Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials', Metabolism: Clinical and Experimental 83, 102-119.
96. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. Lancet. 1979;1(8124):1017–1020.
97. Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Red wine, white wine, liquor, beer, and risk for coronary artery disease hospitalization. Am J Cardiol. 1997; 80:416–420.
98. Klatsky, A. (1999), 'Moderate drinking and reduced risk of heart disease', Alcohol Research and Health 23(1), 15-22.
99. Costanzo, S.; Di Castelnuovo, A.; Donati, M.; Iacoviello, L. & De Gaetano, G. (2011), 'Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: A meta-analysis', European Journal of Epidemiology 26(11), 833-850.
100. Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signaling pathways. Mol. Nutr. Food Res. 2008, 52, 507–526.
101. Arranz, S.; Chiva-Blanch, G.; Valderas-MartÃnez, P.; Medina-RemÃ³n, A.; Lamuela-RaventÃ³s, R. & Estruch, R. (2012), 'Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer', Nutrients 4(7), 759-781.
102. Nettleton, J.; Brouwer, I.; Geleijnse, J. & Hornstra, G. (2017), 'Saturated Fat Consumption and Risk of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke: A Science Update', Annals of Nutrition and Metabolism 70(1), 26-33.
103. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French Paradox for coronary heart disease. Lancet. 1992;339:1523–1526.
104. Frankel, E.; German, J.; Kinsella, J.; Parks, E. & Kanner, J. (1993), 'Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine', The Lancet 341(8843), 454-457.
105. Frankel, E.; Waterhouse, A. & Teissedre, P. (1995), 'Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins', Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(4), 890-894.

106. Meyer, A.; Yi, O.-S.; Pearson, D.; Waterhouse, A. & Frankel, E. (1997), 'Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Relation to Composition of Phenolic Antioxidants in Grapes (Vitis vinifera)', Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(5), 1638-1643.
107. Stockley, C.; Teissedre, P.-L.; Boban, M.; Di Lorenzo, C. & Restani, P. (2012), 'Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: A review', Food and Function 3(10), 995-1007.
108. Anastasiadi, M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Skaltsounis, A.L.; Haroutounian, A. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. Food Sci. Technol. 2012, 48, 316–322, Naczk, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. J. Chrom. A 2004, 1054, 95–111.
109. Kataliníc, V.; Možina, S.S.; Skroza, D.; Generalić, I.; Abramovič, H.; Miloš, M.; Ljubenkov, I.; Piskernik, S.; Terpinc, P.; Boban, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia), Food Chem. 2010, 119, 715–723.
110. Garrido, J.; Borges, F. Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. Food Res. Int. 2013, 54, 1844–1858.
111. Shahidi, F.; Naczk, M. Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health Ef-fects; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004.
112. Singleton, V. & Esau, P. (1969), 'Phenolic substances in grapes and wine, and their significance.', Advances in food research. Supplement 1, 1-261
113. Soleas, G.; Diamandis, E. & Goldberg, D. (1997), 'Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention', Journal of Clinical Laboratory Analysis 11(5), 287-313.
114. Waterhouse, A. (2002), 'Determination Of Total Phenolics', Curr. Protoc. Food Analyt. Chem. 11.1
115. Gharras, H.E. Polyphenols: Food sources, properties and applications—A review. Int. J. Food Sci. Technol. 2009, 44, 2512–2518.
116. Teixeira, A.; Baenas, N.; Dominguez-Perles, R.; Barros, A.; Rosa, E.; Moreno, D. & Garcia-Viguera, C. (2014), 'Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review', International Journal of Molecular Sciences 15(9), 15638-15678.
117. Basha, S.M.; Musingo, M.; Colova Hasna, V.S. Compositional differences in the phenolics com-pounds of muscadine and bunch grape wines. Afr. J. Biotechnol. 2004, 3, 523–528.
118. Di Lecce, G.; Arranz, S.; Jáuregui, O.; Tresserra-Rimbau, A.; Quifer-Rada, P.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. Food Chem. 2014, 145, 874–882.
119. Rockenbach, I.I.; Gonzaga, L.V.; Rizelio, V.M.; Gonçalves, A.E.S.S.; Genovese, M.I.; Fett, R. Phenol-ic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (Vitis vinifera and Vitis labrusca) pomace from Brazilian winemaking. Food Res. Intern. 2011, 44, 897–901.
120. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 2006, 99, 191–203.
121. Baderschneider, B.; Winterhalter, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 2788–2798.
122. Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. Metabolite profiling of grape: Fla-vonols and anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 7692–7702.

123. Cook, N. & Samman, S. (1996), 'Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources', Journal of Nutritional Biochemistry 7(2), 66-76.
124. Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol pro-files of Vitis vinifera red grapes and their single-cultivar wines. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 992–1002.
125. Shrikhande, A. (2000), 'Wine by-products with health benefits', Food Research International 33(6), 469-474.
126. Negro, C.; Tommasi, L.; Miceli, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Bioresour. Technol. 2003, 87, 41–44.
127. Jeffery, D.W.; Parker, M.; Smith, P.A. Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. Aust. J. Grape Wine R. 2008, 14, 153–161.
128. Burdock, G.A. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 5th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.
129. Apostolou, A.; Stagos, D.; Galitsiou, E.; Spyrou, A.; Haroutounian, S.; Portesis, N.; Trizoglou, I.; Hayes, A.W.; Tsatsakis, A.M.; Kouretas, D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant ac-tivity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts. Food Chem. Toxicol. 2013, 61, 60–68.
130. De Pascual-Teresa, S.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovas-cular health: A review of current evidence. Int. J. Mol. Sci. 2010, 11, 1679–1703.
131. Amico, V.; Chillemi, R.; Mangiafico, S.; Spatafora, C.; Tringali, C. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. Bioresour. Technol. 2008, 99, 5960–5966.
132. Jeandet, P.; Bessis, R.; Sbaghi, M.; Meunier, P. & Trollat, P. (1995), 'Resveratrol Content of Wines of Different Ages: Relationship With Fungal Disease Pressure in the Vineyard', American Journal of Enology and Viticulture 46(1), 1--4.
133. Yanoshita, R.; Chang, H.; Son, K.; Kudo, I. & Samejima, Y. (1996), 'Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids', Inflammation Research 45(11), 546-549.
134. Youdim, K.; McDonald, J.; Kalt, W. & Joseph, J. (2002), 'Potential role of dietary flavonoids in re-ducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults', Journal of Nutritional Biochemistry 13(5), 282-288.
135. Neurauter, G.; Wirleitner, B.; Schroecksnadel, K.; Schennach, H. & Fuchs, D. (2004), 'Wine and grape juice modulate interferon-Î³-induced neopterin production and tryptophan degradation in human PBMC', Pteridines 15(1), 1-9.
136. Oh, Y.-C.; Kang, O.-H.; Choi, J.-G.; Chae, H.-S.; Lee, Y.-S.; Brice, O.-O.; Jung, H.; Hong, S.-H.; Lee, Y.-M. & Kwon, D.-Y. (2009), 'Anti-inflammatory effect of resveratrol by inhibition of IL-8 production in LPS-induced THP-1 cells', American Journal of Chinese Medicine 37(6), 1203-1214.
137. Vlachogianni, I.; Fragopoulou, E.; Kostakis, I. & Antonopoulou, S. (2015), 'In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives', Food Chemistry 177, 165-173.
138. Iijima, K.; Yoshizumi, M.; Hashimoto, M.; Akishita, M.; Kozaki, K.; Ako, J.; Watanabe, T.; Ohike, Y.; Son, B.; Yu, J.; Nakahara, K. & Ouchi, Y. (2002), 'Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways', Circulation 105(20), 2404-2410.

139. De Lange, D.; Van Golde, P.; Scholman, W.; Kraaijenhagen, R.; Akkerman, J. & Van De Wiel, A. (2003), 'Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation', European Journal of Internal Medicine 14(6), 361-366.
140. Ferrero, M.; Bertelli, A.; Fulgenzi, A.; Pellegatta, F.; Corsi, M.; Bonfrate, M.; Ferrara, F.; De Caterina, R.; Giovannini, L. & Bertelli, A. (1998), 'Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium', American Journal of Clinical Nutrition 68(6), 1208-1214.
141. Falchetti, R.; Fuggetta, M.; Lanzilli, G.; Tricarico, M. & Ravagnan, G. (2001), 'Effects of resveratrol on human immune cell function', Life Sciences 70(1), 81-96.
142. Lanzilli, G.; Cottarelli, A.; Nicotera, G.; Guida, S.; Ravagnan, G. & Fuggetta, M. (2012), 'Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation', Inflammation 35(1), 240-248.
143. Rotondo, S.; Rajtar, G.; Manarini, S.; Celardo, A.; Rotilio, D.; De Gaetano, G.; Evangelista, V. & Cerletti, C. (1998), 'Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function', British Journal of Pharmacology 123(8), 1691-1699.
144. Zhong, M.; Cheng, G.; Wang, W.; Guo, Y.; Zhu, X. & Zhang, J. (1999), 'Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice', Phytomedicine 6(2), 79-84.
145. Gresele, P.; Pignatelli, P.; Guglielmini, G.; Carnevale, R.; Mezzasoma, A.; Ghiselli, A.; Momi, S. & Violi, F. (2008), 'Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production', Journal of Nutrition 138(9), 1602-1608.
146. Martin, L.; Johnson, P.; Amorim, J.; Honaker, A.; Donaldson, R. & DeClue, A. (2016), 'Investigation of the potential immunomodulatory effects of resveratrol on equine whole blood: An in vitro investigation', Research in Veterinary Science 106, 97-99.
147. Oliveira, D.A.; Salvador, A.A.A.S.; Smânia, E.F.A.; Maraschin, M.; Fereira, S.R.S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *J. Biotechnol*. **2013**, *164*, 423–432.
148. González-Centeno, M.R.; Rosselló, C.; Simal, S.; Garau, M.C.; López, F.; Femenia, A. Physicochemical properties of cell wall materials obtained from tem grape varieties and their byprod-ucts: Grape pomace and stems. LWT–Food Sci. Technol. 2010, 43, 1580–1586.
149. Ghafoor, K.; Choi, Y.H.; Jeon, J.Y.; Jo, I.H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phe-nolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds. J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 4988–4994.
150. Campos, L.M.A.S.; Leimann, F.V.; Pedrosa, R.C.; Ferreira, S.R.S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvingnon (Vitis vinifera). Bioresour. Technol. 2008, 99, 8413−8413.
151. Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A.S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall struc-tural components and extraction techniques for phenol release. Trends Food Sci. Technol. 2006, 17, 579–590.
152. Llobera, A.; Canellas, J. Dietary fiiet content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (Vitis vinifera): Pomace and stem. Food Chem. 2007, 101, 659–666.

153. Karvela, E.; Makris, D.P.; Kalogeropoulos, N.; Karathanos, V.T. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (Vitis vinifera) stem polyphenols. Talanta 2009, 79, 1311–1321.
154. Hebash, K.A.H.; Fadel, H.M.; Soliman, M.M.A. Volatile components of grape leaves. J. Isl. Acad. Sci. 1991, 4, 26–28.
155. Pérez-Serradilla, J.A.; Luque de Castro, M.D. Microwave-assisted extraction of phenolic com-pounds from wine lees and spray-drying of the extract. Food Chem. 2011, 124, 1652–1659.
156. Vattem, D.A.; Shetty, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (Vaccinium macrocarpon) mediated by Lentinus edodes using a solid-state system. Pro-cess Biochem. 2003, 39, 367–379.
157. Tao, Y.; García, J.F.; Sun, D.W. Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014, 54, 817–835.
158. Poudel, P.R.; Tamura, H.; Kataoka, I.; Mochioka, R. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. J. Food Comp. Anal. 2008, 21, 622–625.
159. Rondeau, P.; Gambier, F.; Jolibert, F.; Brosse, N. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. Ind. Crops Prod. 2013, 43, 251–254.
160. Brito, A.G.; Peixoto, J.; Oliveria, J.M.; Oliveria, J.A.; Costa, C.; Nogueira, R.; Rodrigues, A. Brewery and winery wastewater treatment: Some focal points of design and operation. In Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry. Oreopoulou, V., Russ, W., Eds.; Springer Science + Business Media Llc.: New York, NY, USA, 2007; pp. 109–131.
161. Oreopoulou, V., Russ, W., Eds.; Springer Science + Business Media Llc.: New York, NY, USA, 2007; pp. 109–131.
162. Makris, D.P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other Agri-food solid waste extracts. J. Food Comp. Anal. 2007, 20, 125–132.
163. Rockenbach, I.I.; Rodrigues, E.; Gonzaga, L.V.; Caliari, V.; Genovese, M.I.; Gonçalves, A.E.S.S.; Fett, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (Vitis vinifera L. and Vitis labrusca L.) widely produced in Brazil. Food Chem. 2011, 127, 174–179.
164. Amerine, A., & Joslyn, M. A. (1987). Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production. Berkeley: University of California Press (pp. 234±238)
165. Demrow, H.; Slane, P. & Folts, J. (1995), 'Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries', Circulation 91(4), 1182-1188.
166. Fontana, A.R.; Antoniolli, A.; Bottini, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 8987–9003.
167. Barba, F.; Zhu, Z.; Koubaa, M.; Sant'Ana, A. & Orlien, V. (2016), 'Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review', *Trends in Food Science and Technology* **49**, 96-109.

168. Leifert, W. & Abeywardena, M. (2008), 'Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity', Nutrition Research 28(12), 842-850.
169. Rodríguez-Morgado, B.; Candiracci, M.; Santa-María, C.; Revilla, E.; Gordillo, B.; Parrado, J. & Castaco, A. (2015), 'Obtaining from Grape Pomace an Enzymatic Extract with Anti-inflammatory Properties', Plant Foods for Human Nutrition 70(1), 42--49.
170. Magrone, T.; Jirillo, E.; Spagnoletta, A.; Magrone, M.; Russo, M.; Fontana, S.; Laforgia, F.; Donvito, I.; Campanella, A.; Silvestris, F. & De Pergola, G. (2017), 'Immune Profile of Obese People and in Vitro Effects of Red Grape Polyphenols on Peripheral Blood Mononuclear Cells', Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017.
171. Nieto, J. A.; Jaime, L.; Arranz, E.; Reglero, G. & Santoyo, S. (2017), 'Winemaking by-products as anti-inflammatory food ingredients', Food and Agricultural Immunology 28(6), 1507-1518.
172. BLIGH, E. & DYER, W. (1959), 'A rapid method of total lipid extraction and purification.', Canadian journal of biochemistry and physiology 37(8), 911-917.
173. Mosmann, T. (1983), 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', Journal of Immunological Methods 65(1-2), 55-63.
174. Bradford, M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', Analytical Biochemistry 72(1-2), 248-254.
175. Klatsky, A.; Friedman, G. & Siegelaub, A. (1974), 'Alcohol consumption before myocardial infarction. Results from the Kaiser Permanente epidemiologic study of myocardial infarction', Annals of Internal Medicine 81(3), 294-301.