



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ"

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: «Μελέτη επίδρασης υπο-προϊόντων οινοποίησης
στην λειτουργία των αιμοπεταλίων»

ΦΡΟΥΣΙΟΥ ΟΛΥΜΠΙΑ
Α.Μ 4521827

Αθήνα 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ"

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: "Study effect of viticulture by-products on platelet function"

ΦΡΟΥΣΙΟΥ ΟΛΥΜΠΙΑ
Α.Μ 4521827

Αθήνα 2022



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

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΟΡΤΖΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής, Διευθυντής Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών
"Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή", Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-
Διατροφής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Φρούσιου Ολυμπία ,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κ . Φραγκοπούλου Ελισάβετ , που παρόλες τις δυσκολίες μου για συχνή δια ζώσης επαφή λόγω απόστασης και αυξημένου φόρτου εργασίας, έδειξε κατανόηση , ενθάρρυνση και άψογη συνεργασία και καθοδήγηση για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Χολέβα Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια της καθόλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και την προθυμία της για οποιαδήποτε απορία κατά την διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ πολύ όλους τους εθελοντές που προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο και δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους, οι οποίοι ήταν δίπλα μου σε αυτό το δύσκολο έργο να συνδιάσω το φόρτο εργασίας με τις μεταπτυχιακές μου σπουδές αλλά και την ενθάρρυνσή τους καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Νιώθω ευγνώμων για την υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς και τους στόχους της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT.....	10
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	14
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ	15
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	15
1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	18
1.2.1 Ρόλος και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.....	18
1.3 ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ	19
1.3.1 Πρωτογενής Αιμόσταση	20
1.3.2 Δευτερογενής Αιμόσταση.....	20
1.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	22
1.4.1 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην θρόμβωση	23
1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ	
24	
1.5.1 Ιντεργκρίνες	25
1.5.2 Θρομβίνη	25
1.5.3 ADP.....	26
1.5.4 PAF	27
1.5.5 Θρομβοζάνιο (A2).....	28
1.5.6 Κολλαγόνο	28
1.5.7 Επινεφρίνη.....	29

1.5.8	Σεροτονίνη.....	30
1.6	ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ IN VIVO.....	30
1.7	ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ – ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ – ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ.....	32
1.8	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΘΡΟΜΒΩΝ.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΚΡΑΣΙ -ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....		36
2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	36
2.2	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΡΑΣΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	37
2.3	ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ.....	38
2.4	ΕΙΔΗ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	40
2.4.1	Πυρήνας σταφυλίου – Στέμφυλα.....	41
2.4.2	Κοτσάνια (Τσάμπουρα).....	42
2.4.3	Φύλλα.....	42
2.4.4	Οινολάσπες.....	43
2.5	ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	43
2.5.1	Φαινολικές Ενώσεις.....	43
2.6	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ.....		49
3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	49
3.2	ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.....	50
3.3	ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ.....		63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....		64
5.1	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ - ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ.....	64
5.2	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ (80%).....	65
5.3	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	65
5.4	ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	65
5.5	ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		68
6.1	ΕΥΡΕΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	68

6.2	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Ρ – ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ	71
6.3	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Ρ- ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ	75
6.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Ρ-ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ.	79
7.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροθρόμβωση. Το κρασί περιέχει πληθώρα μικρο-συστατικών κατάλληλης ποιότητας και ποσότητας, με καρδιο-προστατευτική δράση. Παρόλα αυτά η κατανάλωση του κρασιού δεν μπορεί να γίνει σε υπέρμετρο βαθμό λόγω της ύπαρξης της αιθανόλης που έχει και επιβλαβή για τον οργανισμό δράση. Εναλλακτικά, τα υπο-προϊόντα οινοποίησης αποτελούν πηγή μικρο-συστατικών παρόμοιων με αυτά που απαντώνται στο κρασί και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον εμπλουτισμό τροφίμων.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη της επίδρασης αιθανολικών εκχυλισμάτων στεμφύλων και πρότυπων φαινολικών ενώσεων στην έκφραση της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια έναντι συσσωρευτικών παραγόντων .

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη αυτή ήταν υδατοαιθανολικά εκχύλισματα από ερυθρές ποικιλίες (Ξινόμαυρο , Syrah , CabernetFranc, CabernetSauvignon) και από λευκές ποικιλίες (Σεμιγιόν, Μαλαγουζιά , Ασύρτικο , Αθήρι). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα φαινολικών ενώσεων (Κατεχίνη, Επικατεχίνη, Κερκετίνη, Ρεσβερατρόλη) λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης τους στα παραπάνω εκχύλιστα. Απομονώθηκε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) και εξετάστηκε η ικανότητά τους, τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των πρότυπων φαινολικών ενώσεων, να αναστέλλουν *invitro* την έκφραση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP, TRAP και κολλαγόνου με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συσσωρευτικός παράγοντας TRAP επάγει, σε μεγαλύτερο ποσοστό έναντι των άλλων συσσωρευτικών παραγόντων, την έκφραση της P – σελεκτίνης. Όσον αφορά τις πρότυπες φαινολικές ενώσεις φάνηκε ότι η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη είναι πιο δραστικές και δοσο-εξαρτώμενα αναστέλλουν την επαγόμενη από TRAP έκφραση της P – σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Το εκχύλισμα των υποπροϊόντων κόκκινων (EtR) στελεχών σταφυλιών φάνηκε να είναι πιο δραστικό σε σχέση με το των υποπροϊόντων λευκών (EtW) στελεχών σταφυλλιών στην αναστολή της απαγόμενης από TRAP έκφραση της P – σελεκτίνης.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τόσο επιμέρους φαινολικές ενώσεις όσο και τα υδατοαιθανολικά εκχύλιστα από υποπροϊόντα ερυθρών και λευκών ποικιλιών σταφυλιού είναι ικανά να επηρεάσουν την έκφραση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων.

ABSTRACT

Platelet accumulation plays an important role in atherothrombosis. Wine contains a plethora of specific ingredients and quantities of micro-ingredients, with cardio-protective action. However, the consumption of wine cannot be excessive due to the presence of ethanol which has a detrimental effect on the body. Alternatively, wine by-products are a source of micro-ingredients similar to those found in wine and could be used in food enrichment.

The purpose of this Master's thesis is to study the effect of ethanol extracts of winery by-products and standard phenolic compounds on the expression of P - selectin in platelets against accumulating factors.

The materials used for this study were water ethanolic extract from red varieties (Xinomavro, Syrah, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon) and from white varieties (Semigion, Malagouzia, Assyrtiko, Athiri). In addition, standards for phenolic compounds (Catechin, Epicatechin, Quercetin, Resveratrol) were used due to their increased concentration in the above extracts. Platelet-rich plasma (PRP) was isolated and ability of extracts and standard phenolic compounds tested, to inhibit the in vitro expression of P-selectin at the platelet surface against co-accumulating factors PAF, ADP, TRAP and collagen using flow cytometry.

The results showed that the accumulating factor TRAP induces, to a greater extent than the other accumulating factors, the expression of P - selectin. Regarding standard phenolic compounds, quercetin and resveratrol have been shown to be more active and dose-dependently inhibit TRAP-induced expression of P-selectin on the platelet surface. Red (EtR) grape strain by-product extract appeared to be more effective than white (EtW) grape stems in inhibiting TRAP-induced P-selectin expression.

In conclusion, it appears that both individual phenolic compounds and water ethanolic extracts from by-products of red and white grape varieties are capable of affecting the expression of P-selectin on the platelet surface.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ADP	adenosinediphosphate, δι-φωσφορική αδενοσίνη
ATP	adenosinetriphosphate, τρι-φωσφορική αδενοσίνη
CCL5	cytokines, κυτοκίνες
CCL5	Κυτοκίνες
CD36	Υποδοχείς ανοσοσφαιρινών
COX	Ένζυμο Κυκλοοξυγονάση
CV	καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου
CXCL7	chemokines, χημειοκίνες
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase, Ενδοθηλιακή συνθάση Μονοξειδίου Αζώτου
EDHF	Υπερπλωτικός Παράγοντας προερχόμενος από ενδοθύλιο
FcγRIIA	Πρωτεΐνες υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών
GAE	Gallic Acid Equivalent, Ισοδυνάμου Γαλλικού Οξέος
Gas-6	growth arrest specific-6, αναστολέας της ανάπτυξης 6
GP	glycoprotein, γλυκοπρωτεΐνη
GPCR	glycoprotein coupled receptor, υποδοχέας συζευγμένος με γλυκοπρωτεΐνη
GPV1	Πρωτεΐνες υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών
GSA	grape seed extract , εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού
GTP	guanine triphosphate, τριφωσφορική γουανίνη
LRR	leucinerichreceptor, υποδοχέας πλούσιος σε λευκίνη
OxLDL	Oxidized low-density lipoprotein , Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
P2Y	Πρωτεϊνικοί Υποδοχείς
PAF	platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAFR	PAF receptor, υποδοχέας του PAF
PAR	protease-activated receptors, υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες

PGI ₂	Προστακυκλίνη
PI3K	κινάση της 3-φωσφατιδυλνινοσιτόλης
PKC	Πρωτεϊνική κινάση
PL	Φωσφολιπάσες
TF	tissue factor, ιστικός παράγοντας
TLR	toll like receptor, υποδοχέας τύπου toll
UTP	uridine triphosphate, τριφωσφορική ουριδίνη
VASP	Vasodilator Stimulated Phosphoprotein, Αγγειοδιασταλτική διεγερμένη φωσφοπρωτεΐνη
VSMCs	Vascular smooth muscle cells, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα
vWF	von Willebrand factor, παράγοντας von Willebrand
NO	Nitric oxide, νιτρικό οξείδιο ή nitrogen monoxide μονοξείδιο του αζώτου
TXA ₂	thromboxane A ₂ , θρομβοξανίο A ₂

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Υποδοχείς των αιμοπεταλίων (Jose Rivera 2009).....	17
Εικόνα 2. Δομή αιμοπεταλίου. (Juan C. Zapata 2014).....	18
Εικόνα 3. Συμμετοχή αιμοπεταλίων στο σχηματισμό θρόμβων (Samantha J. Montague 2020)	19
Εικόνα 4. Διαδικασία Αιμόστασης.....	21
Εικόνα 5. Σημαντικές διαφορές μεταξύ αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης	24
Εικόνα 6. Κύριες αλληλεπιδράσεις υποδοχέα αιμοπεταλίων - προσδέτη (Hoylaerts 2012).....	25
Εικόνα 7. Δομή PAF.....	28
Εικόνα 8. Βήματα προσκόλλησης, ενεργοποίησης και συσώρευσης αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο.	29
Εικόνα 9. Μοντέλο τριών σταδίων ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και σχηματισμού θρόμβων (Stuttgart 2018)	32
Εικόνα 10. Κύριες Φαινολικές Ενώσεις στον πυρήνα του σταφυλλίου.	44
Εικόνα 11 Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικό GP ανά μέθοδο εκχύλισης.	48
Εικόνα 12. Ποσοστό ενεργών στο αντίσωμα CD41a κυττάρων.	68
Εικόνα 13. Ποσοστό ενεργών στο αντίσωμα P-σελεκτίνης κυττάρων.	69
Εικόνα 14 Ποσοστό Ενεργών στο αντίσωμα P- σελεκτίνης κυττάρων.	70
Εικόνα 15. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα ADP.....	71
Εικόνα 16. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα PAF..	72
Εικόνα 17. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα κολλαγόνου.	73
Εικόνα 18. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP.	74
Εικόνα 19. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Ρεσβερατρόλης.	75
Εικόνα 20. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Κατεχίνης	76
Εικόνα 21. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Επικατεχίνης	77
Εικόνα 22. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Κερκετίνης	78
Εικόνα 23. % Ενεργοποιημένων Κυττάρων μέσω της έκφρασης της P – σελεκτίνης επαγόμενης από διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP. σελεκτίνης.	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Οι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στο κλινικό περιβάλλον, υπό κλινικές δοκιμές και υπό εξέλιξη.....	34
Πίνακας 2. Καρδιοπροστατευτική δράση εκχυλισμάτων στεμφύλων	51
Πίνακας 3. Επίδραση πολυφαινολικών υποπροϊόντων οينوποίησης στην λειτουργία των αιμοπεταλίων	58
Πίνακας 4. Προσδιορισμός ποσότητας φαινολικών σε λευκά και κόκκινα στελέχη σταφυλλιών	64

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα αιμοπετάλια , που ονομάζονται επίσης θρομβοκύτταρα , αποτελούν συστατικό του αίματος. Η βασική τους λειτουργία είναι να ενεργοποιούνται στην αιμορραγία κατά τον τραυματισμό των αιμοφόρων αγγείων, δημιουργώντας έτσι θρόμβους αίματος .Τα αιμοπετάλια δεν έχουν πυρήνα.

Τα μεγακαρυοκύτταρα, του μυελού των οστών, είναι η κύρια θέση παραγωγής των αιμοπεταλίων. Η διάμετρος ενός ώριμου αιμοπεταλίου είναι 2-3 μm , το οποίο συνήθως έχει χρόνο ημιζωής 5-9 ημέρες. Περίπου τα 2/3 των αιμοπεταλίων κυκλοφορούν στο αίμα και το 1/3 αποθηκεύεται στον σπλήνα. Ο φυσιολογικός αριθμός αιμοπεταλίων είναι $(150-400) \times 10^3$ ανά μικρόλιτρο αίματος. Κάθε μεγακαρυοκύτταρο μπορεί να παράγει 5000-10000 αιμοπετάλια. Ένας μέσος υγιής ενήλικας μπορεί να παράγει 10^{11} αιμοπετάλια ανά ημέρα. Τα παλιά αιμοπετάλια καταστρέφονται από φαγοκυττάρωση στο σπλήνα και στο ήπαρ (κύτταρα Kupffer) (1) .

Τα αιμοπετάλια σχηματίζονται από τον κατακερματισμό των μεγακαρυοκυττάρων εντός του μυελού των οστών. Τα μεγακαρυοκύτταρα παράγονται στον μυελό χωρίς διαίρεση, με αποτέλεσμα την παραγωγή γιγαντιαίων κυττάρων. Μέσα σε αυτά τα γιγαντιαία κύτταρα, τα οργανίδια οργανώνονται σε διακριτές περιοχές, οι οποίες τελικά θα γίνουν μεμονωμένα αιμοπετάλια, χωρισμένα από ένα δίκτυο μεμβρανών .

Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα σε δισκοειδή μορφή αλλά υφίστανται σημαντικές δομικές αλλαγές μετά την ενεργοποίησή τους , με τη μεσολάβηση της ακτίνης και της μυοσίνης στο κυτταρόπλασμα. Τα αιμοπετάλια μετατρέπονται από δισκοειδείς μορφές σε συμπαγείς σφαίρες με δενδριτικές προεκτάσεις, οι οποίες επιτρέπουν την πρόσφυση των αιμοπεταλίων. Μια ποικιλία υποδοχέων μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών διευκολύνει την πρόσφυση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, τα αιμοπετάλια είναι απύρηνα αλλά περιέχουν RNA, ριβοσώματα, μιτοχόνδρια και διάφορα κοκκία , που είναι σημαντικά στην λειτουργία και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (2).

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι κοκκίων στα αιμοπετάλια:

Τα α- κοκκία είναι τα πιο άφθονα και μεγαλύτερα. Περιέχουν διαλυτές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη και εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης, της πήξης, της φλεγμονής, της κυτταρικής ανάπτυξης και της άμυνας του ξενιστή. Ενδεικτικά, στις παραπάνω πρωτεΐνες συμπεριλαμβάνονται διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες (αIIbβ3, GPIb-IX-V, GPVI, P-σελεκτίνη), παράγοντες πήξης (V, IX, XIII), αντιπηκτικές πρωτεΐνες (αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη S, α2 μακροσφαιρίνη), πρωτεΐνες ινωδόλυσης (πλασμινογόνο), πρωτεΐνες προσκόλλησης (ινωδογόνο, παράγοντας VonWillebrand ή vWF) (2)

Τα πυκνά ή δ-κοκκία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νουκλεοτιδίων αδερίνης (ADP, ATP), ουρακίλης (UTP) και γουανίνης (GTP), ασβέστιο, κάλιο, ισταμίνη και σεροτονίνη.

Λυσοσώματα: περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα που περιλαμβάνουν όξινη φωσφατάση και αρυλοσουλφατάση.

Υπάρχει ένα «ανοικτό σωληνωτό σύστημα» που σχηματίζεται από εγκοιλώσεις στην επιφάνεια της μεμβράνης και διευκολύνει την έκκριση κοκκίων. Αυτό το σύστημα έχει επίσης βασικό ρόλο στη μεταφορά των μεμβρανικών υποδοχέων, επιτρέποντάς τους να συσσωρεύονται, να σταθεροποιούν τις θέσεις προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και να ενισχύουν τη σηματοδότηση (3)

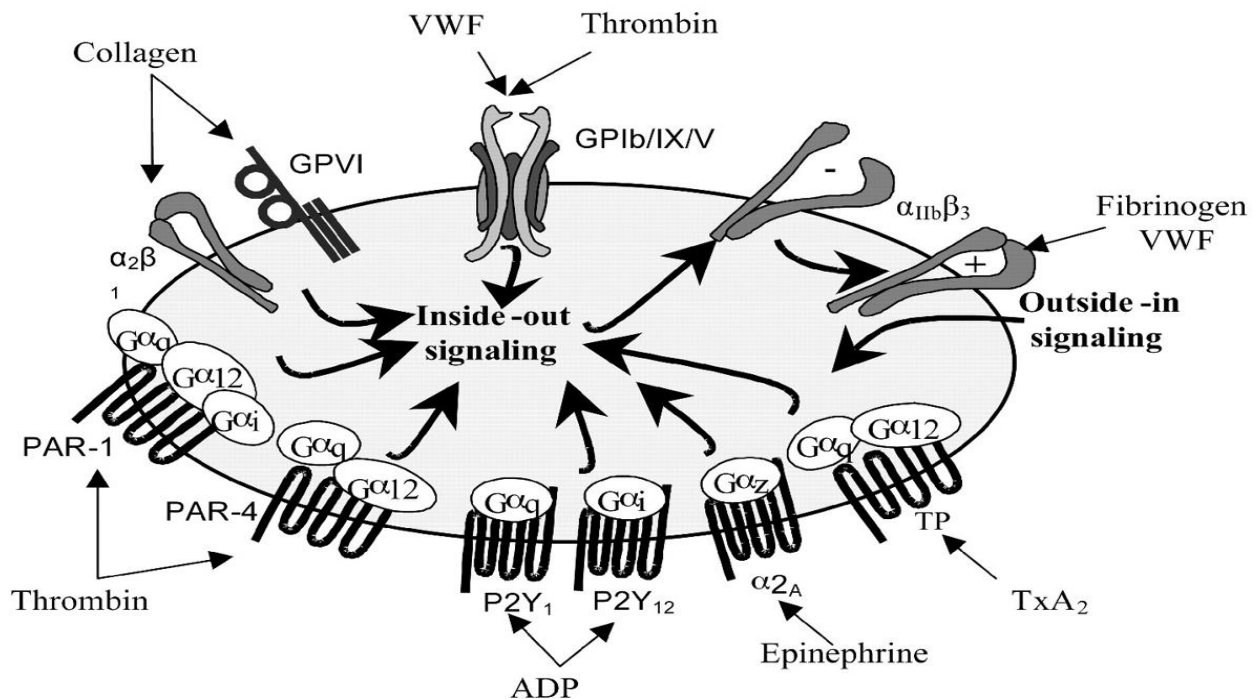
Η κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου έχει παχύτερο γλυκοκάλυκα από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. Περιέχει γλυκοπρωτεΐνες (GP) που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση του κυττάρου με υποενδοθηλιακές δομές του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος, για την ενεργοποίηση, την προσκόλληση, τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, καθώς και για τη λύση του θρόμβου.

Μια ευρεία ποικιλία κινητών διαμεμβρανικών υποδοχέων βρίσκεται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων (Εικόνα 1):

- Ιντεγκρίνες: αIIbβ3 (GPIIb/IIIa), α2β1 (GPIa/IIa), α5β1 (GP Ic/IIa), α6β1, αVβ3
- Υποδοχείς πλούσιοι σε λευκίνη (LRR): GPIb/IX/V, υποδοχείς τύπου Toll (TLR)
- Διαμεμβρανικοί υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (GPCR): υποδοχείς της θρομβίνης (PAR-1, PAR-4), υποδοχείς του ADP (P2Y₁, P2Y₁₂), υποδοχείς του θρομβοξανίου A₂ (TXA₂) (TPa, TPb), υποδοχείς του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor – PAF) (PAFR)
- Πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών: GPVI, FcγRIIA
- Υποδοχείς λεκτίνης τύπου C: P-σελεκτίνη
- Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης: υποδοχέας θρομβοποιητίνης, Gas-6, κινάσες Eph

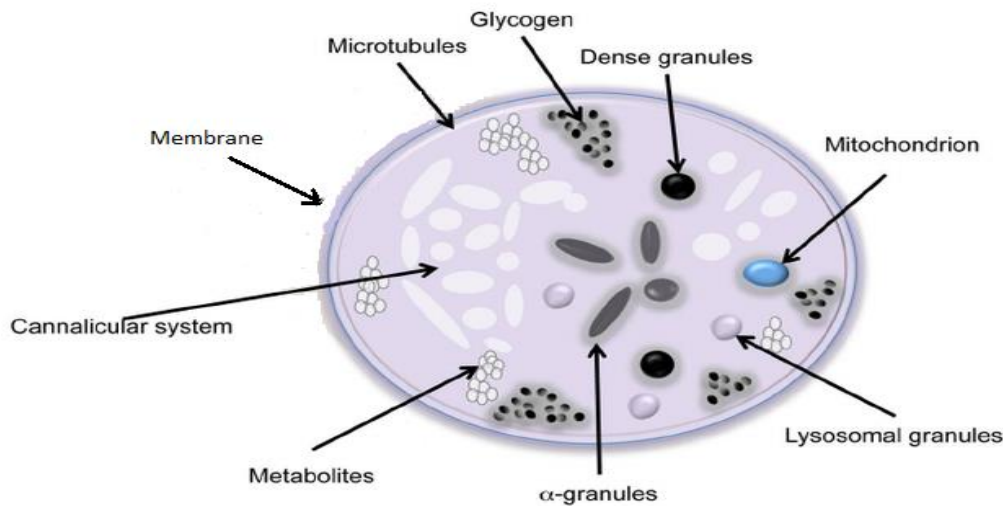
- Υποδοχείς άλλων τύπων: CD36, υποδοχέας τύπου TNF

(4).



Εικόνα 1. Υποδοχείς των αιμοπεταλίων (4)

Κάτω από το γλυκοκάλυκα βρίσκεται η λιποειδική διπλοστιβάδα, που περιέχει ιστικό παράγοντα (TF) και μόρια αρνητικά φορτισμένης φωσφατιδυλοσερίνης. Στην περιοχή κάτω από τη λιποειδική διπλοστιβάδα απαντάται ένα σύστημα λεπτών ινών ακτίνης που απαιτούνται για τη μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου και τη μετατόπιση των υποδοχέων του. Η μήτρα του αιμοπεταλίου περιέχει οργανωμένους μικροσωληνίσκους, τυχαία κατανεμημένο γλυκογόνο, μιτοχόνδρια και εκκριτικά οργανίδια (α-κοκκία, πυκνά ή δ-κοκκία και λυσοσώματα) (Εικόνα 2)



Εικόνα 2. Δομή αιμοπεταλίου. (2)

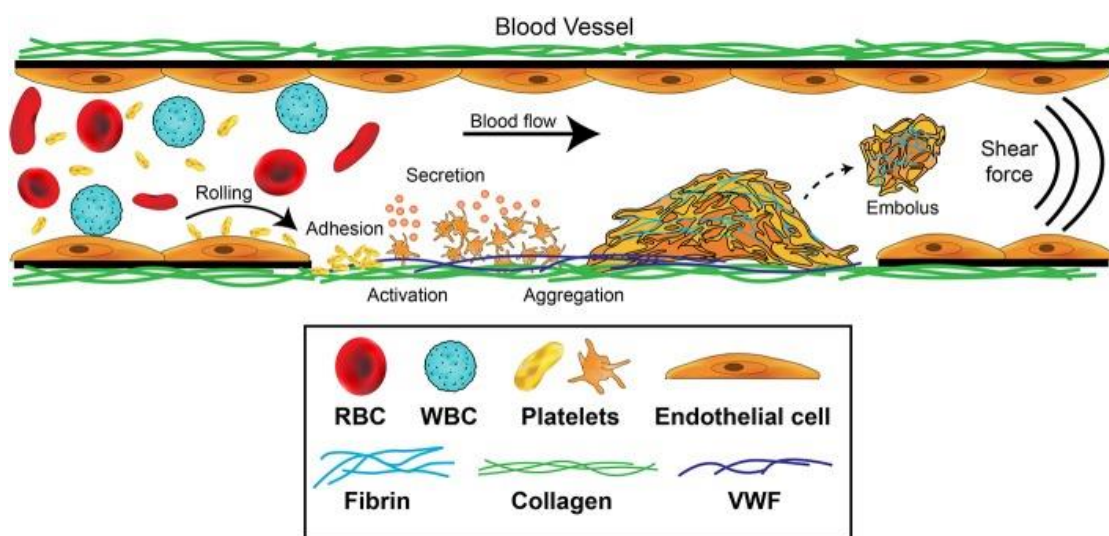
1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

1.2.1 Ρόλος και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια έχουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό θρόμβων και στην αιμόσταση. Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα σε μια μη ενεργοποιημένη δισκοειδή μορφή αλλά μπορεί να ενεργοποιηθούν από την επαφή με τα κατεστραμμένα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων. Μετά από βλάβη των αιμοφόρων αγγείων, ουσίες στην εκτεθειμένη υποενδοθηλιακή εξωκυτταρική μήτρα όπως το κολλαγόνο και ο παράγοντας von Willebrand μπορεί να προσδεθούν στους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια θα προσκολληθούν σε σημεία τραυματισμού και η ενεργοποίηση των υποδοχέων τους θα οδηγήσει στην ενεργοποίησή τους. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, τα αιμοπετάλια υφίστανται δομικό μετασχηματισμό σε αυτό το σημείο και αρχίζουν να εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους για να προάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό βύσματος αιμοπεταλίων. Παράγοντες απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων όπως το ADP, το θρομβοξάνιο A₂ και η θρομβίνη, μπορούν να προάγουν την ενεργοποίηση άλλων γειτονικών αιμοπεταλίων σε έναν μηχανισμό θετικής ανάδρασης. (3).

Η ενεργοποίηση οδηγεί επίσης στην επιφανειακή έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης IIb-IIIa. Αυτή η πρωτεΐνη συνδέεται με το ινωδογόνο, επιτρέποντας τη διασύνδεση των αιμοπεταλίων και τη μεσολάβηση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Μια τελική αλλαγή κατά την ενεργοποίησή τους είναι η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης στην μεμβράνη τους, η οποία δημιουργεί αρνητικό φορτίο στις επιφάνειες των αιμοπεταλίων. Αυτό το αρνητικό φορτίο επιτρέπει στα σύμπλοκα του παράγοντα πήξης να δεσμεύονται στην επιφάνεια, ως μέρος της δευτερογενούς απόκρισης της αιμόστασης (3).

Οι παραπάνω διεργασίες οδηγούν τελικά στην παραγωγή ενός θρόμβου: μια δομή που αποτελείται από συσσωρευμένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, σε συνδυασμό με ένα πλέγμα αδιάλυτου ινώδους και παγιδευμένων ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων. Αυτός ο θρόμβος αποκαθιστά τη δομική ακεραιότητα του κατεστραμμένου αγγειακού τοιχώματος και αποτρέπει την απώλεια αίματος ενώ το αγγείο επουλώνεται. Επιπλέον υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για το ρόλο των αιμοπεταλίων στις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα λευκοκύτταρα στρατολογούνται σε θρόμβους μέσω αλληλεπιδράσεων με P-σελεκτίνη αιμοπεταλίων και τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν μια σειρά προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (3).



Εικόνα 3. Συμμετοχή αιμοπεταλίων στο σχηματισμό θρόμβων (5)

1.3 ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Η αιμόσταση είναι μια κρίσιμη φυσιολογική διαδικασία για τη διακοπή της αιμορραγίας κατά την οποία τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν πολύ κοντά στο ενδοθήλιο χωρίς να σχηματίζουν σταθερές επαφές πρόσφυσης λόγω των αντι-συγκολλητικών ιδιοτήτων των φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ο μηχανισμός της αιμόστασης χωρίζεται σε δύο στάδια:

1. Πρωτογενής αιμόσταση: Σχηματισμός αδύναμου βύσματος αιμοπεταλίων.
2. Δευτερογενής αιμόσταση: Σταθεροποίηση του αδύναμου βύσματος αιμοπεταλίων σε θρόμβο από το δίκτυο ινώδους.

1.3.1 Πρωτογενής Αιμόσταση

Η πρωτογενής αιμόσταση είναι ο σχηματισμός ενός αδύναμου βύσματος αιμοπεταλίων που επιτυγχάνεται σε τέσσερις φάσεις: αγγειοσυστολή, πρόσφυση αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Η αγγειοσυστολή είναι η αρχική απόκριση κάθε φορά που υπάρχει τραυματισμός στα αγγεία. Ο αγγειόσπασμος των αιμοφόρων αγγείων εμφανίζεται πρώτος ως απόκριση σε τραυματισμό του αγγείου. Αυτός ο αγγειόσπασμος, με τη σειρά του, διεγείρει την αγγειοσυστολή. Η αγγειοσυστολή προκαλείται κυρίως από την ενδοθηλίνη-1, ένα ισχυρό αγγειοσυσταλτικό, το οποίο συντίθεται από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο (6).

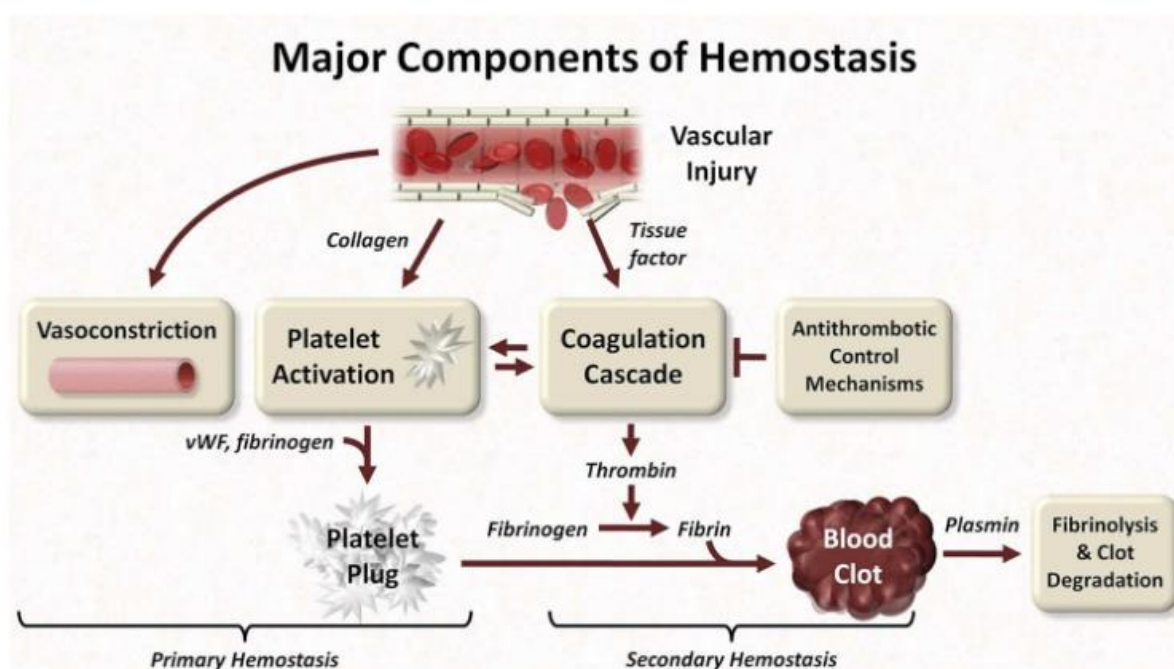
1.3.2 Δευτερογενής Αιμόσταση

Η δευτερογενής αιμόσταση περιλαμβάνει τους παράγοντες πήξης που παράγονται σε έναν καταρράκτη πήξης για να σταθεροποιήσουν τελικά τα αδύναμα αιμοπετάλια.

Αυτό επιτυγχάνεται με την ολοκλήρωση τριών σταδίων: (1) ενεργοποίηση της ενεργοποίησης των παραγόντων πήξης, (2) μετατροπή προθρομβίνης σε θρομβίνη και (3) μετατροπή ινωδογόνου σε ιώδες. Αυτά τα στάδια επιτυγχάνονται μέσω της εξωγενούς και της ενδογενούς οδού, τα οποία συγκλίνουν με την ενεργοποίηση του παράγοντα X και στη συνέχεια ακολουθούν ένα κοινό μονοπάτι. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα ιόντα ασβεστίου απαιτούνται για ολόκληρη τη διαδικασία της δευτερογενούς αιμόστασης.

Η εξωγενής οδός περιλαμβάνει τον ιστικό παράγοντα (TF) και τον παράγοντα VII (FVII). Ξεκινά όταν ο TF συνδέεται με τον FVII, ενεργοποιώντας τον παράγοντα VIIa (FVIIa), σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο TF-FVIIa. Αυτό το σύμπλεγμα, με τη σειρά του, ενεργοποιεί τον παράγοντα X (FX). Το σύμπλεγμα TF-FVIIa μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει τον παράγοντα IX της ενδογενούς οδού, που ονομάζεται εναλλακτική διαδρομή. Μόλις ο παράγοντας X ενεργοποιηθεί σε FXa από το σύμπλεγμα TF-FVIIa, ο καταρράκτης συνεχίζει κάτω από το κοινό μονοπάτι (6).

Η εγγενής διαδρομή περιλαμβάνει τον παράγοντα Hageman (FXII), τον παράγοντα I (FXI), τον παράγοντα IX (FIX) και τον παράγοντα VIII (FVIII). Η διαδικασία ξεκινά όταν το FXII έρχεται σε επαφή με εκτεθειμένο υποενδοθηλιακό κολλαγόνο και ενεργοποιείται στο FXIIa. Στη συνέχεια, το FXIIa ενεργοποιεί το FXI στο FXIa. Και στη συνέχεια ο FXIa ενεργοποιεί το FIX στο FIXa. Το FIXa λειτουργεί σε συνδυασμό με τον ενεργοποιημένο παράγοντα VIII (FVIIIa) για την ενεργοποίηση του παράγοντα X. Μόλις ενεργοποιηθεί ο παράγοντας X από το σύμπλεγμα FIXa-FVIIIa, ο καταρράκτης συνεχίζει κάτω από την κοινή οδό (δείτε παρακάτω). Η κοινή διαδρομή ξεκινά μέσω της ενεργοποίησης του Xa. Το Xa συνδυάζεται με το Va και το ασβέστιο στις επιφάνειες φωσφολιπιδίων για να δημιουργήσει ένα σύμπλοκο προθρομβινάσης ενεργοποιώντας τελικά την προθρομβίνη (II) στη θρομβίνη. Αυτή η ενεργοποίηση της θρομβίνης λαμβάνει χώρα μέσω διάσπασης πρωτεάσης σερίνης της προθρομβίνης. Τώρα, η θρομβίνη ενεργοποιεί τον παράγοντα XIIIa (FXIIIa). Οι σταυροσυνδέσεις FXIIIa με ινώδες σχηματίζουν τον σταθεροποιημένο θρόμβο. (6)



Εικόνα 4. Διαδικασία Αιμόστασης

1.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Λόγω του βασικού ρόλου των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση, η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων μπορεί να σχετίζεται με υπερβολική αιμορραγία. Ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία ή μειωμένη λειτουργία των αιμοπεταλίων τείνουν να παρουσιάζουν βλεννογόνο αιμορραγία. Μετά από μικρές ενδοθηλιακές βλάβες, η πρωτογενής αιμόσταση είναι συχνά αναποτελεσματική και έτσι εμφανίζεται αιμορραγία, όπως επίσταξη, αιμορραγία των ούλων και πορφύρα.

Οι δυσλειτουργίες των αιμοπεταλίων κατηγοριοποιούνται σε ποσοτικές διαταραχές (θρομβοκυτταροπενία ή θρομβοκυττάρωση) και ποιοτικές διαταραχές (θρομβασθένεια). Συχνές αιτίες περιλαμβάνουν υπερσπληνισμό, φάρμακα (π.χ. θρομβοπενία που προκαλείται από ηπαρίνη), λοιμώξεις, εγκυμοσύνη και θρομβοπενία του ανοσοποιητικού. Οι κληρονομικές θρομβοκυτταροπενίες είναι σπάνιες, αλλά αξίζει να εξεταστούν, ειδικά εάν γιγάντια αιμοπετάλια είναι ορατά στο αίμα.

Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν επίσης στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης. Παίζουν έναν προφανή ρόλο στο σχηματισμό θρόμβων στην επιφάνεια της ρήξης μιας πλάκας ως απόκριση στην έκθεση υποενδοθηλιακών δομών. Τα αιμοπετάλια φαίνεται επίσης να εμπλέκονται στη στρατολόγηση λευκοκυττάρων σε αθηρωματικές πλάκες κατά τη διάρκεια του σχηματισμού τους, μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών και αλληλεπιδράσεων υποδοχέων – προσδετών (3).

Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων παίζουν ρόλο στο ευρύτερο πλαίσιο της φλεγμονής και της θρόμβωσης και η αναστολή τους θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια ενδιαφέρουσα ιδέα σε αυτές τις καταστάσεις. (7). Τα ουδετερόφιλα παίζουν ρόλο σε διαφορετικές παθοφυσιολογικές διεργασίες της αθηροσκλήρωσης. Υποστηρίζουν την ανάπτυξη πρώιμων αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων, αλλά έχουν επίσης συσχετιστεί με χαρακτηριστικά ρήξης πλάκας. Μετά τη ρήξη της πλάκας, μαζί με τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα συσσωρεύονται γρήγορα στα σημεία του τραυματισμού και μπορούν να προκαλέσουν και να ενισχύσουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την πήξη του αίματος.

Συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα αντιπροσωπεύουν το πιο άφθονο υποσύνολο λευκοκυττάρων σε αρτηριακούς θρόμβους ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου και διεγείρονται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1β ή ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α, οι οποίοι αυξάνονται στο πλάσμα στην αθηροσκλήρωση. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα εκφράζουν μόρια προσκόλλησης στην επιφάνειά τους, τα οποία προάγουν τη δέσμευσή τους στα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο.

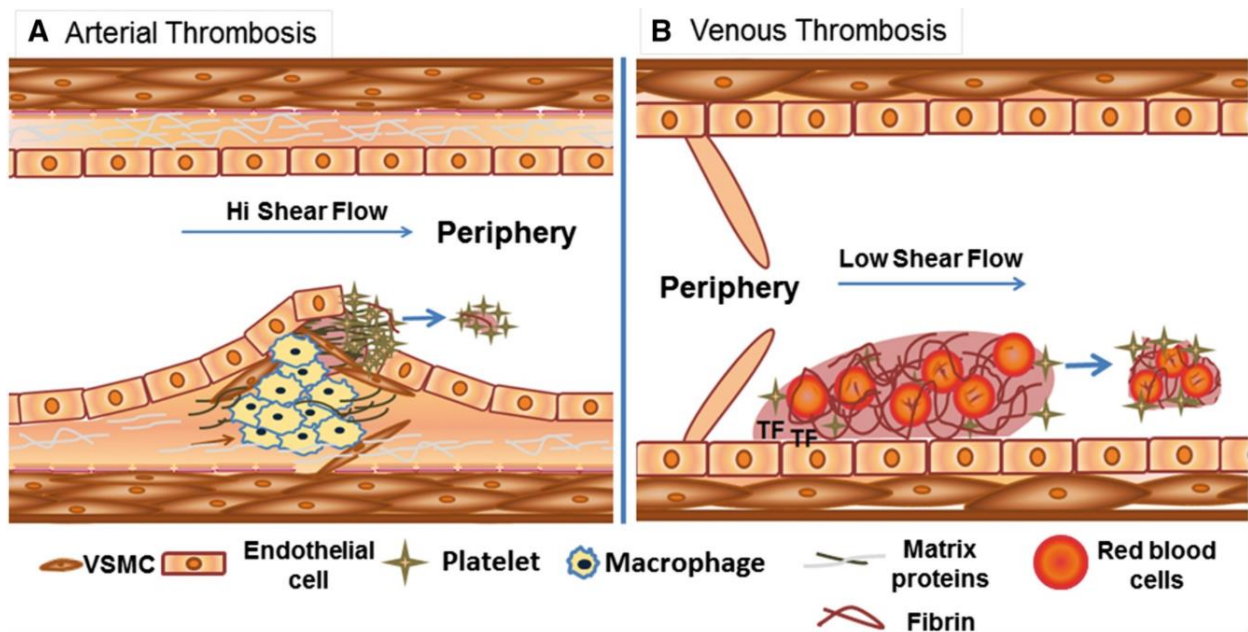
Αντίστροφα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν μόρια προσκόλλησης στην μεμβράνη τους, όπως η Ρ-σελεκτίνη, που μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις με τα ουδετερόφιλα.

Πράγματι, οι Sreeramkumar et al έδειξαν ότι τα ουδετερόφιλα σε καταστάσεις φλεγμονής ανιχνεύουν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και προάγουν την προσκόλλησή τους στο τραυματισμένο τοίχωμα αγγείων.

Σε μοριακό επίπεδο, οι αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων οδηγούν σε αμοιβαία ενεργοποίηση οποιουδήποτε τύπου κυττάρου . Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει πώς τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τις λειτουργίες των λευκοκυττάρων. Τα αιμοπετάλια έχουν ποικιλία κυτταροκινών και χημειοκινών όπως CCL5 (RANTES) και CXCL7, που αποθηκεύονται στα κοκκία τους (κυρίως α-κοκκία) και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Επιπλέον, μικροσωματίδια (PMs) προερχόμενα από τα αιμοπετάλια μπορούν να ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα (3).

1.4.1 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην θρόμβωση

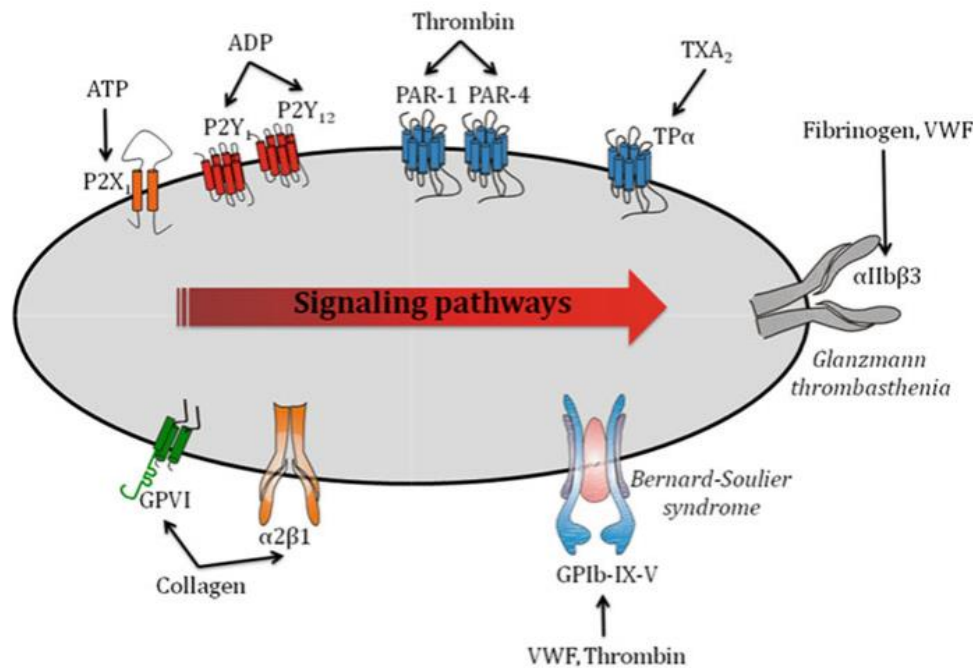
Οι καρδιακές παθήσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες και περίπου το 50% όλων των θανάτων που σχετίζονται με κακοήγη νεοπλάσματα οφείλονται σε θρομβωτικά συμβάντα. Η βλάβη και η εξαγγείωση αίματος από το αγγειακό κυκλοφορικό σύστημα συμβαίνει συνήθως καθ 'όλη τη διάρκεια της ζωής. Η μη φυσιολογική αιμόσταση, θρόμβωση, μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο σχηματισμό θρόμβων και απόφραξη αγγείων είτε στις αρτηρίες είτε στις φλέβες. Τα αιμοπετάλια, μαζί με τα ενδοθηλιακά τους κύτταρα και τις πρωτεΐνες πήξης, είναι κρίσιμοι μεσολαβητές της αιμόστασης των αγγείων και της θρόμβωσης. Η αρτηριακή θρόμβωση είναι η αιτία εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI) και εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ η φλεβική θρόμβωση (VT) οδηγεί σε φλεβική θρομβοεμβολή (VTE) και πνευμονική εμβολή (PE). Δομικά, οι αρτηριακοί και οι φλεβικοί θρόμβοι διακρίνονται. Οι αρτηριακοί θρόμβοι είναι πλούσιοι σε αιμοπετάλια και σχηματίζονται στα πλάγια ή γύρω από ρήξεις αθηρωματικών πλακών. Οι φλεβικοί θρόμβοι είναι πλούσιοι σε ινώδες και ερυθρά αιμοσφαίρια και μπορεί να εμφανιστούν παρά το άθικτο ενδοθηλιακό τοίχωμα. Τέλος, η αρτηριακή θρόμβωση εμφανίζεται σε σημεία υψηλής ροής διάτμησης ενώ η VT εμφανίζεται σε συνθήκες βραδείας ροής διάτμησης (8).



Εικόνα 5. Σημαντικές διαφορές μεταξύ αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης
(8)

1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ

Η ενεργοποίηση αιμοπεταλίων απαιτεί ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος που ξεκινά από υποδοχείς στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων για πρωτεΐνες προσκόλλησης και διαλυτούς αγωνιστές. Ενώ πολλά μονοπάτια σηματοδότησης των αιμοπεταλίων έχουν καθιερωθεί εδώ και πολλά χρόνια, σημαντική πρόσφατη πρόοδος στην έρευνα αποκαλύπτει πολύ πιο περίπλοκα νεα δίκτυα σηματοδότησης και ενίσχυσης.



Εικόνα 6. Κύριες αλληλεπιδράσεις υποδοχέα αιμοπεταλίων - προσδέτη(9)

1.5.1 Ιντεργκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι μόρια προσκόλλησης και σηματοδότησης που υπάρχουν σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων. Αυτά είναι μη ομοιοπολικά δεσμευμένα ετεροδιμερή α και β υπομονάδων. Τα αιμοπετάλια έχουν τρεις τύπους ιντεγκρίνες, δηλαδή β1, β2 και β3 (10).

1.5.2 Θρομβίνη

Η θρομβίνη αποτελεί την κύρια πρωτεάση σερίνης του συστήματος πήξης και ένας από τους πιο αποτελεσματικούς ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων. Η δράση της στα αιμοπετάλια είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής της με διαμεμβρανικούς υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (PAR), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες.

Ο PAR-1 εκφράζεται σε ανθρώπινα αιμοπετάλια και είναι συνδεδεμένος με τις πρωτεΐνες G12/13, Gq και Gi α-υπομονάδες των G12/G13 προωθούν τη δέσμευση του GTP στην πρωτεΐνη RhoA και κατ' επέκταση την ενεργοποίησή της, που οδηγεί στην αλλαγή σχήματος και στην αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων (10).

Η πρωτεΐνη Gq ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC) που οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} ενώ η Gi αναστέλλει τη δράση την αδενυλικής κυκλάσης μειώνοντας τη συγκέντρωση του κυκλικού AMP (cAMP).

Τα αιμοπετάλια (ανθρώπων και ποντικών) εκφράζουν επίσης τον υποδοχέα PAR-4 που απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης για την ενεργοποίησή του. Ο PAR-2 δεν εκφράζεται στα αιμοπετάλια και δεν ενεργοποιείται από τη θρομβίνη. Ο PAR-3 εκφράζεται στα αιμοπετάλια ποντικών και αλληλεπιδρά με τη θρομβίνη, ωστόσο ο λειτουργικός του ρόλος παραμένει αδιευκρίνιστος. Η θρομβίνη δεσμεύεται επίσης στον υποδοχέα GPIIb/IIIa, που φαίνεται να καθιστά τα αιμοπετάλια ευαίσθητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις της. (10)

1.5.3 ADP

Το ADP είναι αποθηκευμένο στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και απελευθερώνεται κατά την ενεργοποίησή των ήδη προσκολλημένων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Μπορεί επίσης να εκκριθεί από κατεστραμμένα κύτταρα σε σημεία αγγειακού τραυματισμού καθώς επίσης και από τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς και υπάρχουν 2 τύποι πουρινεργικών υποδοχέων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Ένας τύπος είναι οι συζευγμένοι με τριφωσφορική γουανωσίνη (GTP) πρωτεϊνικοί υποδοχείς γνωστοί ως P2Y. Ο άλλος τύπος υποδοχέα είναι ένας υποδοχέας καναλιού ιόντων που ονομάζεται P2X₁. Αυτοί οι υποδοχείς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το P2X₁ δεσμεύει την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και μεσολαβεί στην εξωκυτταρική εισροή ασβεστίου οδηγώντας σε μεταβολές στο σχήμα των αιμοπεταλίων.

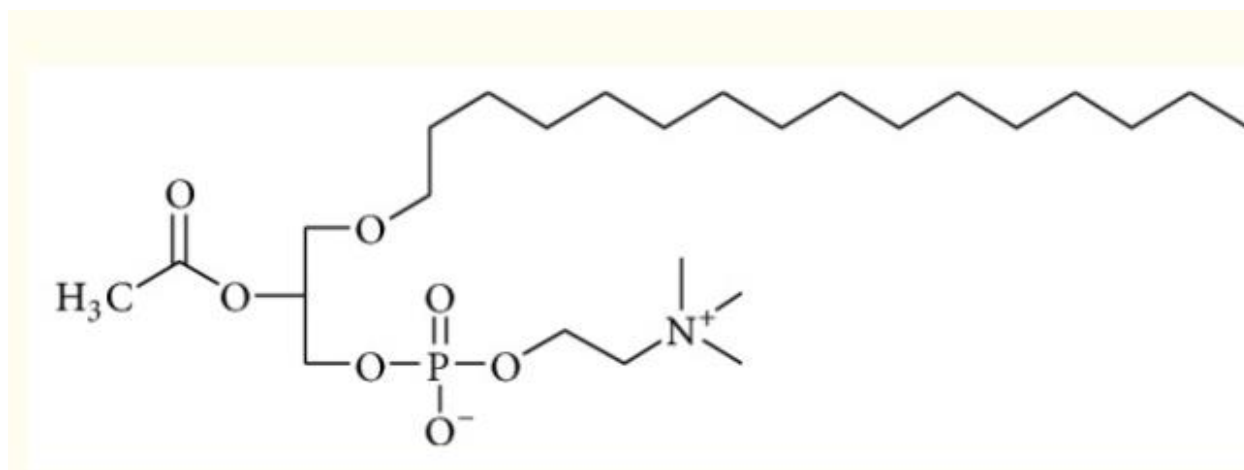
Οι υποδοχείς ADP έχουν δύο ισομορφές, P2Y₁ και P2Y₁₂. Το ADP δεν είναι μόνο ένας σημαντικός φυσιολογικός αγωνιστής, αυξάνει επίσης τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από άλλους αγωνιστές. ADP μέσω δέσμευσης στον P2Y₁ υποδοχέα εκτελεί μια ποικιλία λειτουργιών στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων δηλαδή κινητοποίηση Ca^{2+} , αλλαγή σχήματος, παραγωγή θρομβοξανίου A₂ (TXA₂), ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης αIIbβ3 και συσσώρευση αιμοπεταλίων (11) (4).

1.5.4 PAF

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) ή 1-O-αλκυλ-2-ακετυλ- sn -γλυκερο-3-φωσφοχολίνη αποτελεί ένα φωσφολιποειδές που παράγεται από πληθώρα κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα / μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Έχει πολλούς βιολογικούς ρόλους, τόσο φυσιολογικούς όσο και παθολογικούς, ανάλογα τα επίπεδά του, τα οποία καθορίζονται μέσω του ρυθμού βιοσύνθεσης και αποικοδόμησής του PAF. Ο PAF αποτελεί ένα φωσφολιποειδές που παράγεται είτε μέσω ρυθμιζόμενων ενζυμικών αντιδράσεων μέσω δύο πορειών (remodeling και *de novo*) ή μη ενζυμικά κατά την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (12). Ο PAF είναι ένας διαμεσολαβητής κρίσιμης σημασίας στη φλεγμονώδη απόκριση και συντίθεται κατά την ενεργοποίηση διάφορων τύπων κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αφρώδη και τα ενδοθηλιακά (13)

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαμεμβρανικοί μηχανισμοί σηματοδότησης που επάγονται από τον υποδοχέα του PAF (PAFR) περιλαμβάνουν και G πρωτεΐνες. Ο υποδοχέας του PAF ενεργοποιεί διάφορες φωσφολιπάσες (PL) όπως η PLC, η PLA₂ και η PLD καθώς και κινάσες όπως η κινάση της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K), η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK), οι κινάσες των β-αδρενεργικών υποδοχέων (GRK) και οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PTK). Στα αιμοπετάλια ο PAF φαίνεται επίσης να αναστέλλει τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του PAF με τον υποδοχέα του είναι η απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και των μεταβολιτών του, η βιοσύνθεση TXA₂, η αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺, η φωσφορυλίωση διάφορων υποστρωμάτων, η αποκοκκίωση και η συσσώρευση αιμοπεταλίων (13)



1.5.5 Θρομβοξάνιο (A2)

Το θρομβοξάνιο A2 (TxA2) ανήκει στην οικογένεια των λιπιδίων που είναι γνωστά ως εικοσανοειδή, τα οποία είναι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος που παράγονται από τη διαδοχική δράση τριών ενζύμων - φωσφολιπάση A2, COX-1/COX-2 και TxA2 Synthase (TXAS). Το TxA2 περιγράφηκε αρχικά ότι απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια και είναι πλέον γνωστό ότι απελευθερώνεται από μια ποικιλία άλλων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ονομάστηκε έτσι από τον ρόλο που έχει στη θρόμβωση, το TxA2 έχει προθρομβωτικές ιδιότητες, καθώς διεγείρει την ενεργοποίηση και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το TxA2 είναι επίσης γνωστό αγγειοσυσταλτικό και ενεργοποιείται σε περιόδους τραυματισμού και φλεγμονής. Ενώ η προσταγλανδίνη, προστακυκλίνη (PGI2) εξισορροπεί τις θρομβωτικές και αγγειοσυσταλτικές της ιδιότητες υπάρχουν διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις όπου αυτή η ισορροπία απορυθμίζεται. Τα αυξημένα επίπεδα του TxA2 μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, του εγκεφαλικού επεισοδίου, της αθηροσκλήρωσης και του βρογχικού άσθματος. Τα αυξημένα επίπεδα του TxA2 έχουν επίσης επιπτώσεις σε πνευμονική υπέρταση, νεφρική βλάβη, ηπατική βλάβη, αλλεργίες, αγγειογένεση και μετάσταση καρκινικών κυττάρων. (14)

1.5.6 Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο είναι ένας ισχυρός διεγέρτης της προσκόλλησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Οι πρόσφατες αναζητήσεις στην κατανόηση της προσκόλλησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση του κολλαγόνου οδήγησαν στην ταυτοποίηση δύο σημαντικών υποδοχέων, της γλυκοπρωτεΐνης Ia/IIa (GPIa/IIa ή ιντεγκρίνης άλφα και βήτα της γλυκοπρωτεΐνης VI (GPVI) και της σχετικής ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, που αποτελούν αναμφίβολα τους νέους στόχους για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων αντιθρομβωτικών φαρμάκων. (15)

ισχυρός αγωνιστής καθώς δεν μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα τη PLC ή να προκαλέσει αλλαγή σχήματος στα αιμοπετάλια . Παρ' όλα αυτά, δρα συνεργιστικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις με άλλους αγωνιστές, αυξάνοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητά τους. Η επινεφρίνη δεσμεύεται στον α_2 A-αδρενεργικό υποδοχέα ο οποίος συνδέεται με την πρωτεΐνη Gz που ανήκει στην οικογένεια των Gi. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP και κατά συνέπεια η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (17)

1.5.8 Σεροτονίνη

Η σεροτονίνη (5-HT) είναι ένας νευροδιαβιβαστής που εμπλέκεται στη νευρωνική δραστηριότητα και σε μια ποικιλία νευροψυχολογικών διαδικασιών. Τα αιμοπετάλια προσλαμβάνουν 5-HT από την κυκλοφορία μέσω του μεταφορέα της (5-HTT), την αποθηκεύουν στα δ-κοκκία τους και την εκκρίνουν μετά την ενεργοποίησή τους. Η απελευθερωμένη 5-HT δρα στο ίδιο αιμοπετάλιο από το οποίο εκκρίθηκε (αυτοκρινής δράση) ενώ παράλληλα υποστηρίζει και την πρόσληψη κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης (παρακρινής δράση), συμβάλλοντας με αυτούς τους τρόπους στην ανάπτυξη του θρόμβου. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της 5-HT με τον υποδοχέα της, 5HT_{2A}, που είναι συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Gq. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺ και την ενίσχυση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (18)

1.6 ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ IN VIVO

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες, έχουν γίνει διαθέσιμα άφθονα δεδομένα για το πώς ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια που κυκλοφορούν υπό δυναμικές συνθήκες ροής ως απάντηση στις αγγειακές βλάβες. Για τους πολύπλοκους μηχανισμούς και τις ευέλικτες αλληλεπιδράσεις που προτείνονται, έχει προταθεί ένα μοντέλο τριών σταδίων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Η αρχή αυτού του μοντέλου συνοψίζεται σχηματικά στην Εικόνα 9 όπου απεικονίζονται κύριοι μηχανισμοί και φαινοτυπικές εκδηλώσεις πρόσφυσης, ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης.

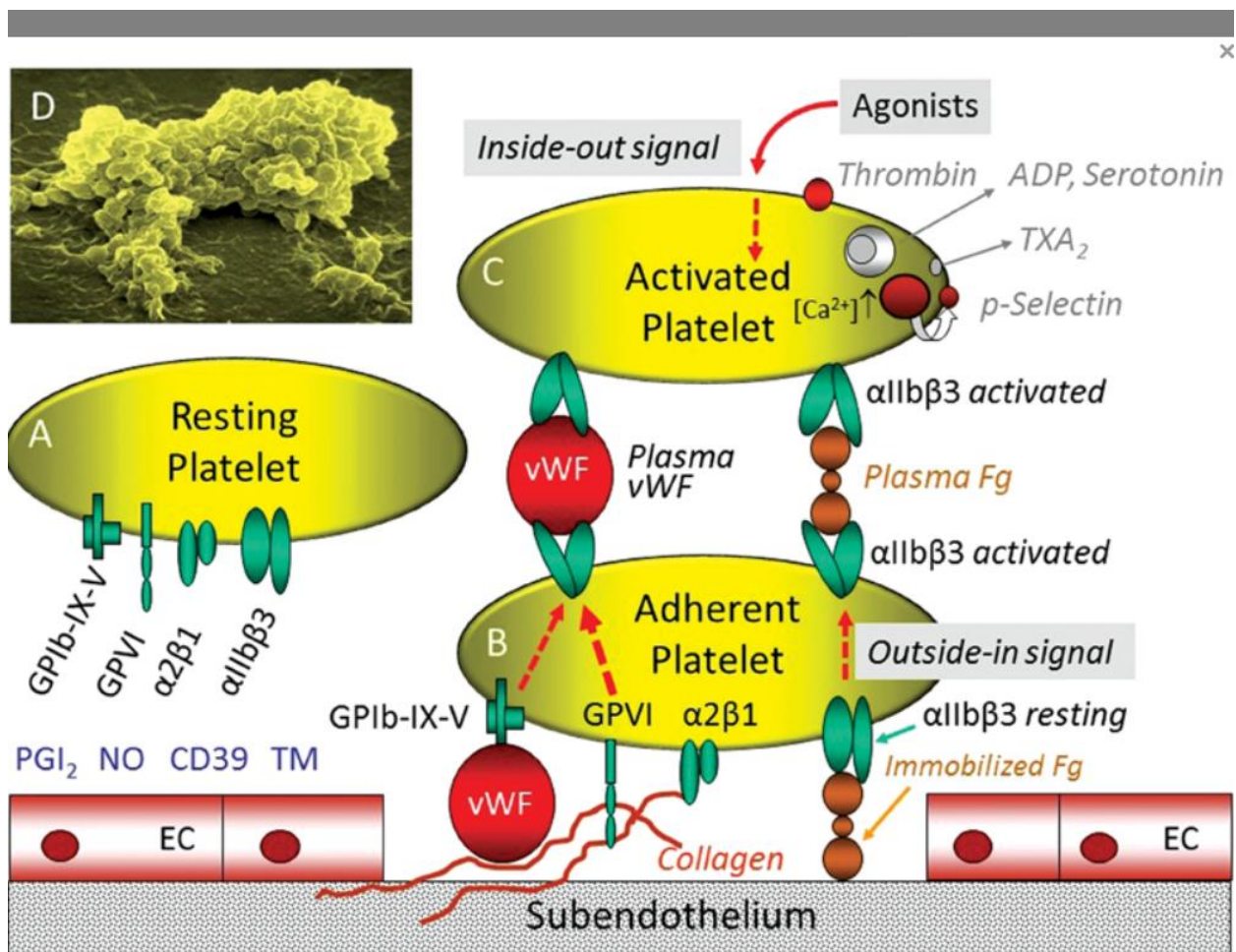
Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τρία στάδια, που περιλαμβάνουν την προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσώρευση αιμοπεταλίων, αναπτύσσονται σε διαδοχικές αλλά μερικώς επικαλυπτόμενες ή στενά ολοκληρωμένες και περιττές διαδικασίες.

Στάδιο 1: Έναρξη (σύνδεση και πρόσφυση) Μετά τον τραυματισμό με απώλεια του ενδοθηλιακού κυτταρικού φραγμού, τα αιμοπετάλια που κυκλοφορούν προσδένονται μέσω σύνδεσης του GPIIb-IX-V με σύμπλεγμα VWF ή VWF – κολλαγόνου. Για αυτό το πρώτο βήμα ,

η έκθεση του υποενδοθηλίου είναι το κύριο σημείο. Το κολλαγόνο είναι ένα ουσιαστικό υπόστρωμα για την πρόσφυση με συντονισμένη αλληλεπίδραση των αιμοπεταλικών υποδοχέων του κολλαγόνου. Τα εξωτερικά σήματα (υποδεικνύονται με διάστικτα βέλη) που προέρχονται από υποδοχείς πρόσφυσης, GPVI και αIIββI, δρουν σε συνέργεια με σήματα διαλυτών αγωνιστών και προκαλούν ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω ενός δικτύου οδών σηματοδότησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα ερεθίσματα λαμβάνουν χώρα μέσα σε δευτερόλεπτα, κυρίως από την θρομβίνη, και ενισχύουν την πρόσφυση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Δεν εμφανίζονται στο σχήμα η ομαδοποίηση των υποδοχέων ιντεργκρίνης και οι κυτταροσκελετικές ανακατατάξεις.

Στάδιο 2: Ενεργοποίηση και συσσώρευση. Η απόκτηση ιδιοτήτων δέσμευσης υψηλής συγγένειας του αII-βII είναι ένα σημαντικό γεγονός σε αυτή την φάση. Η ενεργός διαμόρφωση (υποδεικνύεται με εξάπλωση των ετεροδιμερών ιντεργκρίνης) επιτρέπει τη σύνδεση διαλυτών πρωτεϊνών προσκόλλησης. Όπως υποδεικνύεται για το VWF και το ινωδογόνο (Fg), σχηματίζονται γέφυρες μεταξύ των παρακείμενων αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση είναι το βήμα ενίσχυσης που, μέσα σε λίγα λεπτά, οδηγεί σε συσσώρευση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Απεικονίζονται στο σχήμα αρκετές φαινοτυπικές εκδηλώσεις ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, όπως αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοσολικού $[Ca^{2+}]$, η προπηκτική δράση, η σύνθεση και απελευθέρωση του θρομβοξανίου A_2 (TXA₂), η έκκριση και τα πυκνά κοκκία (ADP, σεροτονίνη) και η έκφραση στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων της P-σελεκτίνης (κατά τη μετατροπή από α- κοκκία). Δεν εμφανίζεται η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση μαζί με τον πολυμερισμό της ακτίνης.

Στάδιο 3: Σταθεροποίηση. Η αγκύρωση και η εδραίωση ενός αυξημένου θρόμβου των αιμοπεταλίων υποστηρίζονται από ένα πλέγμα αδιάλυτων ινών ινώδους (δεν μπορούν να αναγνωριστούν στην εμφανιζόμενη μικρογραφία ηλεκτρονικού ψευδούς χρώματος). Πρόσφατα ευρήματα τεκμηριώνουν τη μικρο-αρχιτεκτονική ετερογένεια στους θρόμβους, εμφανίζοντας πλήρως ενεργοποιημένα (αποκοκκοκοιωμένα, θετικά στην P-σελεκτίνη) αιμοπετάλια στον πυρήνα του θρόμβου αλλά λιγότερο ενεργοποιημένα, αν και προσκολλημένα, αιμοπετάλια στην επιφάνεια του θρόμβου (19).



Εικόνα 9. Μοντέλο τριών σταδίων ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και σχηματισμού θρόμβων (19)

1.7 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ – ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ – ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας στον δυτικό πληθυσμό. Η αθηροσκλήρωση θεωρείται μια προοδευτική φλεγμονώδης συστηματική ασθένεια που επηρεάζει κυρίως το τοίχωμα των μεγάλων και μεσαίων αρτηριών, όπως της αορτής, της καρωτίδας και των στεφανιαίων αρτηριών, σε σημεία επιρρεπή σε χαμηλή, ταραχώδη ή ταλαντευόμενη διάτμηση, όπως κλαδιά, καμπυλότητες ή διακλαδώσεις. Παρόλο που οι κλινικά σχετικές βλάβες γίνονται εμφανείς σε ενήλικες μέσης ηλικίας, έχει αποδειχθεί ότι η συσσώρευση λίπους (γνωστή ως λιπώδεις ραβδώσεις) ξεκινά στην πρώιμη παιδική ηλικία. Η περίοδος καθυστέρησης είναι μεγάλη και οι κλινικές εκδηλώσεις γίνονται εμφανείς αρκετά χρόνια αργότερα. Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου (CV) όπως η υπερχοληστερολαιμία, η υπεργλυκαιμία, η παχυσαρκία, η υπέρταση, το κάπνισμα και η γήρανση προάγουν τη φλεγμονή των αγγείων και την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση.

Ο έλεγχος αυτών των παραγόντων μειώνει τον κίνδυνο οξέων αγγειακών επιπλοκών και θανάτου από CVD. Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας

(ΠΟΥ), οι θάνατοι από μη μεταδοτικές ασθένειες αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 74% και αποδίδονται κυρίως σε CVD. Η επίπτωση της βλάβης των οργάνων -στόχων που σχετίζονται με την CVD αυξάνεται με την ηλικία και οι μελέτες για το φύλο δείχνουν παγκόσμια υψηλότερη επίπτωση στους άνδρες για εγκεφαλικό και στεφανιαία νόσο (CAD). Το παγκόσμιο ποσοστό θνησιμότητας για καρδιαγγειακή νόσο έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, το εγκεφαλικό επεισόδιο και η CAD παραμένουν οι κύριες αιτίες θνησιμότητας για CVD σε ενήλικες. (20)

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί αθηροσκλήρωσης, η κύρια αιτία καρδιαγγειακών παθήσεων, είναι το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και η θρόμβωση. Οι παραπάνω μηχανισμοί αλληλεπιδρούν τόσο στην εμφάνιση όσο και στην εξέλιξη της νόσου.

Η αθηροσκλήρωση ξεκινά όταν η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μαζί με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προκαλούνται από διαταραγμένη διάτμηση ή ανισορροπία στη φλεγμονώδη και οξειδωτική καταπόνηση που μπορεί να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια, τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, μεταναστεύουν στο υποενδοθήλιο και διαφοροποιούνται σε προφλεγμονώδεις μακροφάγα, τα οποία αυξάνουν την πρόσληψη της οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (oxLDL) οδηγεί τα μακροφάγα να μετατραπούν σε αφρώδη κύτταρα, επιδεινώνοντας την φλεγμονώδη σηματοδότηση. Ο (PAF) που παράγεται κατά την οξείδωση της LDL μαζί με τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, είναι υπεύθυνα για τις προθερογενείς επιδράσεις της oxLDL.

Μεταξύ άλλων δράσεων, ο PAF οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενώ εμπλέκεται στη μετανάστευση μονοκυττάρων στο υποενδοθήλιο και τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (21).

1.8 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΘΡΟΜΒΩΝ

Η πρόληψη της αθηροσκλήρωσης εστιάζεται κυρίως στη διαχείριση των λεγόμενων «καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου». Πράγματι, άφθονες μελέτες έχουν αναφέρει την επίδραση υγιεινών συνηθειών στον τρόπο ζωής, όπως άσκηση, σωματικό βάρος, μεσογειακή διατροφή, ελαφριά έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα και άγχος για τον περιορισμό όχι μόνο της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης αλλά και της μείωσης της θρομβογένεσης .

Όσον αφορά την πρόληψη και τη θεραπεία επιπλοκών που σχετίζονται με τη θρόμβωση, η πρόοδος στην κατανόηση των διαδικασιών ενεργοποίησης / συσσώρευσης αιμοπεταλίων και η

ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης οδήγησε στην ευρεία χρήση των αντιαιμοπεταλιακών και αντιπηκτικών παραγόντων καρδιαγγειακής νόσου (22).

Τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, όπως η ασπιρίνη, οι ανταγωνιστές P2Y₁₂ και οι αναστολείς γλυκοπρωτεΐνης (GP) IIb / IIIa, έχουν αποδειχθεί επιτυχημένα στη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας που σχετίζεται με την αρτηριακή θρόμβωση. Αυτοί οι παράγοντες είναι, επομένως, ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας για ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Ωστόσο, όλα αυτά τα φάρμακα ενέχουν εγγενή κίνδυνο αιμορραγίας, ο οποίος σχετίζεται με δυσμενείς καρδιαγγειακές εκβάσεις και θνησιμότητα. Έτσι, τα πιθανά οφέλη από πιο ισχυρά, συμβατικά αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα πιθανώς αντισταθμίζονται από τον αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας. Δεδομένα από πειράματα *in vivo* έχουν επισημάνει δυνητικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της αιμόστασης και της θρόμβωσης, αυξάνοντας την προοπτική ανάπτυξης νέων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που δεν σχετίζονται με αιμορραγία (22).

Πράγματι, σε προκλινικές μελέτες, έχουν εντοπιστεί αρκετές νέες αντιαιμοπεταλιακές θεραπείες που φαίνεται να αναστέλλουν τη θρόμβωση ενώ διατηρούν την αιμόσταση. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν αναστολείς της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης-β (PI3Kβ), πρωτεΐνης δισουλφιδικής-ισομεράσης, ενεργοποιημένης GPIIb / IIIa, GPIIb / IIIa σηματοδότησης, ενεργοποιημένους με πρωτεάση υποδοχείς και οδούς προσκόλλησης μεσολαβούμενης από αιμοπετάλια GPVI. (22)

Πίνακας 1. Οι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στο κλινικό περιβάλλον, υπό κλινικές δοκιμές και υπό εξέλιξη

ΣΤΟΧΟΣ	ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΘΡΟΜΒΟΞΑΝΗΣ	- Aspirin - Triflusal - Terutroban -	- Αναστολέας COX-1 αιμοπεταλίων - Αποκλεισμός υποδοχέα Θρομβοξανής
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ	- Thienopydines ➤ Ticlopidin ➤ Clopidogrel ➤ Prasugrel - Non- Thienopydines	- Απαιτούν ηπατικό μεταβολισμό - Δεσμεύουν τον υποδοχέα ADP

ADP , P2Y	➤ Ticagrelor ➤ Cangrelor	-Δεν απαιτούν ηπατικό μεταβολισμό -Μπλοκάρει τον υποδοχέα P2Y ₁₂ του ADP - Cangrelor: χορηγείται ενδοφλέβια
GPIIb/IIIa ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	• Abciximad • Eptifibatide • Tirofiban	- Μονοκλωνικά Αντισώματα που μπλοκάρουν τον υποδοχέα GPIIb/IIIa - Συνθετικά μόρια που αναστέλλουν ανταγωνιστικά και αναστρέψιμα τον υποδοχέα GPIIb/IIIa
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ	• Varopaxar • Atopaxar	- Απο του στόματος ανταγωνιστής του υποδοχέα θρομβίνης αιμοπεταλίων PAR1
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟ – ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	• Αναστολείς vWF-GPIb • NCX-4016 • SolubleCD39 • Nitric oxid donors	- Αναστέλλει την δράση αιμοπεταλίων προλαμβάνοντας την αλληλεπίδραση των vWF-GPIb -Δότης Αζώτου – Απελευθέρωση Ασπιρίνης - Μεταβολισμός ATP και ADP

Η βελτιστοποίηση της χρήσης των επί του παρόντος διαθέσιμων θεραπειών και οι βελτιώσεις στην κατανόηση των ατομικών διαφορών ως προς την αντιμετώπιση των αντιαιμοπεταλιακών θεραπειών εξακολουθούν να είναι οι πιο αποδοτικές στρατηγικές θεραπείας.

Επιπλέον, η βελτιωμένη κατανόηση των μηχανισμών συσσώρευσης αιμοπεταλίων υπήρξε κρίσιμη για την περαιτέρω ανάπτυξη νέων αντιαιμοπεταλιακών θεραπειών.

Μελλοντικές μελέτες στους τομείς της αθηροθρόμβωσης, της φλεγμονής, του μεταβολικού συνδρόμου, του διαβήτη, του μεταβολισμού των λιπιδίων τα επόμενα χρόνια θα πρέπει να προωθήσουν τις γνώσεις μας και την εφαρμογή αυτών και άλλων νέων αντι-αιμοπεταλιακών αγωγών. Σημειωτέον, οι κλινικές δοκιμές παρέχουν σημαντικά στοιχεία σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Ωστόσο, δυσκολίες όπως τα στενά κριτήρια επιλεξιμότητας, η χαμηλή εγγραφή ασθενών και η ανάγκη δοκιμής των νέων φαρμάκων πάνω από την τρέχουσα διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία (π.χ. ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη), μπορεί να προσθέσουν πολυπλοκότητα στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων και αξίζουν επίσης προσοχή.(23)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΚΡΑΣΙ -ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μελέτες για το αλκοόλ και τις επιπτώσεις του στην υγεία έχουν μακρά ιστορία, που ξεκινάει με αναφορές στη βιβλική εποχή έως πρόσφατες πληθυσμιακές μελέτες με εκατοντάδες χιλιάδες συμμετέχοντες(24). Σε ανασκόπηση 42 πειραματικών μελετών που δημοσιεύτηκαν μεταξύ 1965 και 1998 για το αλκοόλ βρέθηκαν ισχυρά και συνεπή στοιχεία που συνδέουν τη μέτρια πρόσληψη αλκοόλ με υψηλότερες συγκεντρώσεις λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας χοληστερόλης, απολιποπρωτεΐνης ΑΙ και χαμηλότερες συγκεντρώσεις ινωδογόνου. Βρέθηκε επίσης μια ασθενής συσχέτιση μεταξύ της μέτριας πρόσληψης αλκοόλ και της αυξημένης συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων. Με βάση τις δημοσιευμένες συσχετίσεις μεταξύ αυτών των βιοδεικτών και του κινδύνου στεφανιαίας νόσου, υπολογίστηκε μια συνολική προβλεπόμενη μείωση 24,7% στον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου που σχετίζεται με την κατανάλωση 30 g αλκοόλ την ημέρα λόγω αλλαγών σε αυτούς τους δείκτες. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν μια αιτιολογική ερμηνεία της συσχέτισης μεταξύ μέτριας πρόσληψης αλκοόλ και χαμηλότερου κινδύνου στεφανιαίας νόσου. (25).

Από τότε που δημοσιεύθηκε αυτή η συστηματική ανασκόπηση, το εύρος της έρευνας για αυτό το θέμα έχει διευρυνθεί σημαντικά. Η αθηροσκλήρωση, η υποκείμενη αιτία της στεφανιαίας νόσου και του ισχαιμικού εγκεφαλικού, γίνεται όλο και περισσότερο κατανοητό ότι είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης νόσος του αρτηριακού τοιχώματος. Τα αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου. Νέες μελέτες εξέτασαν όχι μόνο την επίδραση του αλκοόλ στα επίπεδα λιπιδίων και τους αιμοστατικούς παράγοντες αλλά και σε άλλες μετρήσεις της φλεγμονής και της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και στα επίπεδα των ορμονών των λιποκυττάρων (26).

Ακολούθησε συστηματική ανασκόπηση, του 2011, μελετών παρέμβασης για τις επιδράσεις της κατανάλωσης αλκοόλ σε 21 βιολογικούς δείκτες που σχετίζονται με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου σε ενήλικες χωρίς γνωστή καρδιαγγειακή νόσο. Από 4690 άρθρα που εξετάστηκαν ως προς την καταλληλότητα, τα πλήρη κείμενα 124 μελετών εξετάστηκαν και επιλέχθηκαν 63 σχετικά άρθρα (1950 έως Οκτώβριος 2009). Αυτή η μετα-ανάλυση έδειξε ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (έως ένα ποτό ή 15 g αλκοόλ την ημέρα για τις γυναίκες και έως δύο ποτά ή 30 g αλκοόλ την ημέρα για τους άνδρες) έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε μια ποικιλία βιοδεικτών που συνδέονται με τον κίνδυνο στεφανιαία νόσου. Οι πειραματικές παρεμβατικές μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση αλκοόλ αύξησε σημαντικά τα κυκλοφορούντα επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας χοληστερόλης, απολιποπρωτεΐνης ΑΙ και αδιπονεκτίνης και μείωσε σημαντικά τα επίπεδα ινωδογόνου ,όλες οι αλλαγές αναφέρθηκαν ως

καρδιοπροστατευτικές (26).

Επιδημιολογικά, μελέτες περιπτώσεων ελέγχου και μετα-αναλύσεις έχουν δείξει μια σχέση τύπου U, έτσι ώστε η χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (ιδιαίτερα κρασιού ή μπύρας) σχετίζεται με μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων και της θνησιμότητας, σε σύγκριση με την αποχή. Βέβαια, υπάρχουν πιθανές συγχυτικές επιρροές ποσοτικοποίησης της δόσης αλκοόλ, της χρήσης καπνού, διαίτας, άσκησης, τρόπου ζωής, κίνδυνου καρκίνου, ατυχήματα και εξαρτήσεις μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα των μελετών κατανάλωσης αλκοόλ τόσο σε χαμηλή όσο και σε υψηλή δόση(27).

Με τη γενική αποδοχή των ευεργετικών αποτελεσμάτων της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ και των τεκμηριωμένων κινδύνων από την αυξημένη κατανάλωση, οι ερευνητικές έστρεψαν το ερευνητικό τους ενδιαφέρον επιδημιολογικά στον εντοπισμό συγκεκριμένων αλκοολούχων ποτών με επιπλέον ευεργετικά χαρακτηριστικά και των προτύπων κατανάλωσης τους (24).

2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΡΑΣΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αξιολογήσει εάν τα διαφορετικά αλκοολούχα ποτά προστατεύουν από καρδιαγγειακές παθήσεις. Έχουν περάσει σχεδόν τρεις δεκαετίες από το 1992, όταν εισήχθη ο όρος «Γαλλικό Παράδοξο». Εκείνη την εποχή, οι Renaud και de Lorgeril με βάση τα ευρήματα του προγράμματος MONICA (Σύστημα MONItoring for Cardiovascular disease), παρατήρησαν ότι οι Γάλλοι παρουσίαζαν σχετικά χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, παρά την πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά διατροφή και παρόμοιους παράγοντες κινδύνου.

Οι συγγραφείς πρότειναν την κατανάλωση κρασιού ως πιθανή εξήγηση, καθώς ήταν πολύ υψηλότερη στη Γαλλία από ό,τι στις περισσότερες δυτικές χώρες. Καμία από τις υπάρχουσες θεωρίες δεν κατάφερε να εξηγήσει πλήρως το γαλλικό παράδοξο που παραμένει υπό συζήτηση. Μελετήθηκε σε βάθος το πλεονέκτημα του κρασιού έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών έναντι της προστασίας των καρδιαγγειακών νοσημάτων (28)

Σε μια μετα-ανάλυση 26 μελετών (24), μελετήθηκε η σχέση κατανάλωσης κρασιού ή μπύρας και του αγγειακού κινδύνου. Από 13 μελέτες στις οποίες συμμετείχαν 209.418 άτομα, ο σχετικός κίνδυνος αγγειακής νόσου που σχετίζεται με την πρόσληψη κρασιού ήταν 0,68 (95% CI: 0,59-0,77) σε σχέση με τους μη πότες. Υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις από 10 μελέτες στις οποίες συμμετείχαν 176.042 άτομα για να υποστηρίξουν μια σχέση σχήματος J μεταξύ των διαφορετικών ποσοτήτων πρόσληψης κρασιού και του αγγειακού κινδύνου. Μια στατιστικά

σημαντική αντίστροφη συσχέτιση βρέθηκε μέχρι την ημερήσια πρόσληψη 150 ml κρασιού (12% αιθανόλη) . Ο συνολικός σχετικός κίνδυνος μέτριας κατανάλωσης μύρας (6% αιθανόλη) , ο οποίος μετρήθηκε σε 15 μελέτες στις οποίες συμμετείχαν 208.036 άτομα, ήταν 0,78 (95% CI: 0,70-0,86). Ωστόσο, δεν βρέθηκε σημαντική σχέση μεταξύ των διαφορετικών ποσοτήτων πρόσληψης μύρας και του αγγειακού κινδύνου μετά από μετα-ανάλυση 7 μελετών στις οποίες συμμετείχαν 136.382 άτομα. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν μια σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ ελαφριάς έως μέτριας κατανάλωσης κρασιού και αγγειακού κινδύνου (24).

Μια μετα-ανάλυση που δημοσιεύθηκε το 2011 επιβεβαίωσε τη σχέση σε σχήμα J μεταξύ της κατανάλωσης κρασιού και των αγγειακών επεισοδίων καθώς και της καρδιαγγειακής θνησιμότητας. Συγκεκριμένα, μέγιστη προστασία παρατηρήθηκε στα 21 g κατανάλωσης αλκοόλ σε μορφή κρασιού την ημέρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι παρόμοια, αλλά ασθενέστερη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης μύρας και των αγγειακών επεισοδίων είχε επίσης αναφερθεί, ενώ δεν βρέθηκε σχέση για άλλα οινοπνευματώδη ποτά και αγγειακά συμβάντα (29)

Συγκεκριμένα, η παρατεταμένη κατανάλωση κρασιού από ελαφριά έως μέτρια έχει συσχετιστεί με χαμηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και θνησιμότητα από όλες τις αιτίες, ενώ η «υπερβολική» κατανάλωση έχει βλαβερές συνέπειες. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού με την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD). Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, εκείνες οι περιοχές με υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού και μεσογειακή διατροφή εμφανίζουν χαμηλό επιπολασμό καρδιαγγειακής νόσου. Τις τελευταίες δεκαετίες έγινε προσπάθεια απομόνωσης και αναγνώρισης των βιολογικών ενεργών ενώσεων που ευθύνονται για την καρδιοπροστασία του. Μεταξύ αυτών, έχει αναφερθεί η παρουσία πολυάριθμων φαινολικών ενώσεων . Τα δεδομένα υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα μικροσυστατικά του κρασιού θα μπορούσαν να ασκήσουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση(21).

2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Το κρασί αποτελείται από ένα σύνθετο μείγμα ενώσεων που προέρχονται τόσο από τη σύνθεση του σταφυλιού όσο και από τη διαδικασία της ζύμωσης. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η ζύμωση του κόκκινου κρασιού γίνεται παρουσία των φλοιών των σταφυλιών ενώ στο λευκό κρασί ερήμην τους. Αυτή η διαφορά έχει ως αποτέλεσμα περίπου δεκαπλάσια περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις στα κόκκινα κρασιά έναντι των λευκών (30). Οι καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις της κατανάλωσης κρασιού έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών πιστεύεται ότι αποδίδονται στα μικροσυστατικά του. Αυτές οι ενώσεις θα μπορούσαν να είναι είτε υδατοδιαλυτές είτε λιποδιαλυτές και επομένως θα μπορούσαν να αποκαλύψουν διάφορες

βιολογικές δράσεις σε διαφορετικές θέσεις-στόχους του ανθρώπινου σώματος (31). Η καρδιοπροστατευτική δράση του κόκκινου κρασιού και των υποπροϊόντων του σχετίζεται με την ικανότητά τους να αποτρέπουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, να τροποποιούν το λιπιδικό προφίλ και να προάγουν τη χαλάρωση των αγγείων(32).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών, οι οποίες εξέτασαν την αναστολή της οξείδωσης της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες) από φαινολικά συστατικά των κρασιών, συμπεριλαμβανομένων των χολικών, καφεϊκών και p-κουμαρικών οξέων, της κατεχίνης, της κερκετίνης και της μυρικετίνης έδειξαν αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων, τροποποίηση του μεταβολισμού των εικοξανοειδών και χαλάρωση των αιμοφόρων αγγείων (31).

Η κερκετίνη αναστέλλει την δράση του ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) και την *in vitro* επαγόμενη συσσώρευση πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων και ενισχύει τις αντισυσσωρευτικές ιδιότητες της προστακυκλίνης. (31). Η ρεσβερατρόλη καθώς και εκχυλίσματα λευκού και ερυθρού κρασιού έχουν αναστείλει την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων. Αρκετές μελέτες ανέφεραν ότι το φαινολικό εκχύλισμα κρασιού, το κόκκινο κρασί χωρίς αλκοόλ και τα κλάσματα κατεχίνης-ανθοκυανιδίνης του ασκούν σημαντική επίδραση στην επαγόμενη από την ADP συσσώρευση αιμοπεταλίων (33).

Επιπλέον, τα λιποειδή εκχυλίσματα κρασιού από διάφορες ποικιλίες σταφυλιού αναστέλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF. Αυτή η επίδραση παρατηρήθηκε τόσο στις λευκές όσο και στις κόκκινες ποικιλίες υποδεικνύοντας ότι η ποικιλία του σταφυλιού ήταν ο κύριος παράγοντας για την παρατηρούμενη βιολογική δραστηριότητα και όχι το χρώμα των σταφυλιών. Πράγματι, ένα κόκκινο κρασί (κύρια ποικιλία cabernet sauvignon) και ένα λευκό κρασί (κύρια ποικιλία Rombola) φάνηκε να είναι τα πιο ισχυρά και εκτός από τις φαινολικές ενώσεις, ως βιοδραστικές ενώσεις, τα φωσφο- και τα γλυκολιπίδια ασκούν επίσης αντιαιμοπεταλιακή δράση (21).

Τα αποτελέσματα από τα αντίστοιχα γλεύκη αποκάλυψαν ότι η διαδικασία ζύμωσης στα κόκκινα κρασιά οδήγησε σε αυξημένη αντιαιμοπεταλιακή δράση ενώ στα λευκά κρασιά η βιολογική δράση παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητη πριν και μετά τη ζύμωση. Προκειμένου να υπάρξει καλύτερη εκτίμηση της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν πέντε αγωνιστές για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, δηλαδή PAF, ADP, TRAP, κολλαγόνο και αραχιδονικό οξύ. Αυτοί οι αγωνιστές δρουν μέσω διαφορετικών υποδοχέων και/ή διαφορετικών οδών σήματος προκαλώντας ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων (Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω) . (21).

Η αντι-αιμοπεταλιακή δράση των εκχυλισμάτων δοκιμάστηκε έναντι και των πέντε αγωνιστών (PAF, ADP, TRAP, κολλαγόνου και αραχιδονικού οξέος (AA)). Όλα τα εκχυλίσματα αποκάλυψαν παρόμοια αντι-αιμοπεταλιακή δράση έναντι του PAF και του TRAP ($p_s >$

0,05). Όταν πραγματοποιήθηκε η ανάλυση σε σχέση με το χρώμα του κρασιού, παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα λευκού κρασιού TL, FII και FIII ήταν πιο ισχυροί αναστολείς της επαγόμενης από τον PAF συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων. Τα εκχυλίσματα TL, FII και FIII ανέστειλαν πιο ισχυρή συσώρευση αιμοπεταλίων έναντι της ADP και του κολλαγόνου (χαμηλότερες τιμές IC_{50}) σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα FI και FIV ($p_s < 0,05$). Όταν πραγματοποιήθηκε η ανάλυση σε σχέση με το χρώμα του κρασιού, παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα λευκού κρασιού TL, FII και FIII ήταν πιο ισχυροί αναστολείς της επαγόμενης από την ADP συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων. Η αντι-αιμοπεταλιακή δράση κατά του AA αποκάλυψε ότι τα λευκά εκχυλίσματα TL, FII και FIII ήταν πιο ισχυροί αναστολείς από τα FI και FIV ($p_s < 0,01$). Η σύγκριση μεταξύ ερυθρών και λευκών κρασιών έδειξε ότι τα εκχυλίσματα FI του κόκκινου κρασιού ήταν πιο ισχυροί αναστολείς της συσώρευσης των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τα λευκά κρασιά ανεξάρτητα από τον αγωνιστή. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα FII και FIV των ερυθρών κρασιών ήταν πιο ισχυροί αναστολείς έναντι της επαγόμενης από το TRAP συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων. (21).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την ιδέα ότι τόσο τα λευκά όσο και τα κόκκινα κρασιά περιέχουν βιολογικά ισχυρά μικροσυστατικά κατά του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής και της θρόμβωσης. Επομένως, η προστατευτική δράση ενός κρασιού είναι ανεξάρτητη από το χρώμα του, αλλά συνδέεται έντονα με το προφίλ των μικροσυστατικών του. (21)

Ωστόσο, η κατανάλωση κρασιού δεν μπορεί να γίνει σε υπερβολικό βαθμό, δεδομένου ότι η παρουσία αιθανόλης είναι περιοριστικός παράγοντας. Επιπλέον, η διαδικασία απομόνωσης αυτών των ευεργετικών μικροσυστατικών του κρασιού χαρακτηρίζεται ως οικονομικά ασύμφορη. Έτσι οι μελέτες έχουν στραφεί στην μελέτη των υποπροϊόντων οινοποίησης με σκοπό να βρεθεί το πιο ισχυρό εκχύλισμα με αντιαιμοπεταλιακή δράση και να χαρακτηριστεί η χημική του σύσταση προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον εμπλουτισμό των τροφίμων. (34) Ο πυρήνας (GP) είναι υποπροϊόν της οινοποιητικής διαδικασίας και αποτελείται κυρίως από φλούδες και σπόρους. Περίπου το 20% του βάρους του σταφυλιού που χρησιμοποιείται στην οινοποιία οδηγεί σε GP (35). Τα GP είναι μια φθηνή και πλούσια πηγή μικροσυστατικών παρόμοιων με το κρασί, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για τον εμπλουτισμό άλλων τροφίμων είτε για να συμπεριληφθούν σε συμπληρώματα διατροφής που στοχεύουν στην πρόληψη ή εν μέρει τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων (35).

2.4 ΕΙΔΗ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Κατά την οиноποίηση, τα σταφύλια θρυμματίζονται και συμπιέζονται, γεγονός που δεν αλλοιώνει τη χημική τους σύσταση. Η ζύμωση, στην επεξεργασία του κόκκινου κρασιού, είναι το μόνο σημαντικό βήμα που συμβαίνει πριν δημιουργηθεί ο πυρήνας, που προάγει τις αλλοιώσεις στη σύνθεση των υδατανθράκων. Ωστόσο, δεν προκαλεί μεγάλες χημικές αλλαγές στην περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις.

Ως εκ τούτου, τόσο στα ερυθρά όσο και στα λευκά σταφύλια, διατηρείται σημαντική ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων. Έχει αναφερθεί ότι περίπου το 70% της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά διατηρείται στον πυρήνα του σταφυλιού μετά την επεξεργασία. Η πιθανή χρήση υποπροϊόντων σταφυλιού μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, όχι μόνο υποκινούμενη από περιβαλλοντικά ζητήματα, αλλά και από τη δυνατότητα βελτίωσης της ποιότητας των τροφίμων και ανάπτυξης συστατικών και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Τα κύρια στερεά υπολείμματα από την οиноποίηση είναι τα υπολείμματα φυτών, τα ιζήματα από τη διαδικασία διαύγασης, ο πυρήνας των σταφυλιών από την έκθλιψη και οι οινολάσπες που είναι βασικά νεκρές ζύμες. Όπως αναφέρθηκε, ο πυρήνας του σταφυλιού αποτελείται από δέρμα, στέλεχος, πολτό και σπόρους. Ο σπόρος και η φλούδα αντιπροσωπεύουν, τα ξηρά υπολείμματα οиноποίησης, το 38-52% και το 5-10% του πυρήνα σταφυλιού αντίστοιχα. (30)

2.4.1 Πυρήνας σταφυλιού – Στέμφυλα

Όσον αφορά τη γενική σύσταση του πυρήνα του σταφυλιού, το ποσοστό υγρασίας κυμαίνεται από 50% έως 72% ανάλογα με την υπό εξέταση ποικιλία σταφυλιού και την κατάσταση ωρίμανσης. Τα αδιάλυτα υπολείμματα από αυτό το υλικό έχουν περιεκτικότητα σε λιγνίνη που κυμαίνεται από 16,8% έως 24,2% και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη μικρότερη από 4%. Γενικά, οι πεπτικές ουσίες είναι το κύριο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων που υπάρχουν στους πυρηνίσκους σταφυλιών, που κυμαίνονται από 37% έως 54% των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Η κυτταρίνη είναι ο δεύτερος τύπος πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και βρίσκεται σε αφθονία στους πυρηνίσκους σταφυλιών, κυμαίνεται από 27% έως 37%. (30)

Όταν ξεετάζονται τα ξεχωριστά κλάσματα του πυρήνα σταφυλιού (σπόροι και φλούδες), η σχετική αναλογία σπόρων κυμαίνεται από 38% έως 52% του ξηρού υλικού. Πρόσθετες αναφορές έχουν επισημάνει πολύ χαμηλότερη αναλογία σπόρων, που θα μπορούσε να είναι σχεδόν το 15% του πυρήνα σταφυλιού. Σε αυτό το θέμα, και πάλι η τεχνολογία και η διαχείριση υλικών θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την τελική σύνθεση αυτών των υπολειμμάτων οиноποίησης. Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση των σπόρων σταφυλιού (w/w) επισημαίνουν την περιεκτικότητα σε 40% φυτικές ίνες, 16% αιθέριο έλαιο, 11%

πρωτεΐνη, 7% σύνθετες φαινολικές ενώσεις όπως τανίνες και άλλες ουσίες όπως σάκχαρα και μέταλλα. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην (πολυ)φαινολική περιεκτικότητα των σπόρων σταφυλιού, η οποία κυμαίνεται από 60% έως 70% των συνολικών εκχυλίσιμων ενώσεων.

(30)

2.4.2 Κοτσάνια (Τσάμπουρα)

Τα τσάμπουρα είναι πηγή στυπτικών ενώσεων, που αντιπροσωπεύονται κυρίως από προανθοκυανιδίνες. Το υλικό αυτό αφαιρείται πριν από τα βήματα της οινοποίησης για να αποφευχθεί η υπερβολική στυπτικότητα του κρασιού ή η αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ως εκ τούτου, η εξέταση τους στο πλαίσιο της διαδικασίας οινοποίησης δεν αντιμετωπίζεται απολύτως, αν και αυτό αποτελεί αναμφισβήτητο υπόλειμμα που παράγεται από τις οινοποιητικές βιομηχανίες.

Η ποσότητα των στελεχών κυμαίνεται μεταξύ 1,4% και 7,0% της επεξεργασμένης πρώτης ύλης. Επί του παρόντος, η εμπορική αξία των στελεχών σταφυλιών είναι χαμηλή και χρησιμοποιούνται κυρίως ως ζωοτροφές ή ως βελτιωτικά εδάφους. Το μέσο ποσοστό υγρασίας των στελεχών του σταφυλιού έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 55% έως 80%, με τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα να αποδίδεται στην ποικιλία σταφυλιού. Η περιεκτικότητα σε αλκοολικά αδιάλυτα υπολείμματα στελεχών σταφυλιού είναι 71%, κατά μέσο όρο, στην ξηρή ουσία και δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ των ερυθρών και λευκών ποικιλιών.

Όσον αφορά τη φαινολική σύνθεση των στελεχών των σταφυλιών, η περιεκτικότητά τους έχει αποδοθεί σε φλαβονόλες, υδροξυκινναμικά οξέα, μονομερείς και oligομερείς φλαβονόλες και στυλβένια. Από αυτή την άποψη, τα φαινολικά από τα στελέχη των σταφυλιών έχει αποδειχθεί ότι είναι περίπου 5,8% σε ξηρό βάρος.

(36)

2.4.3 Φύλλα

Μέχρι σήμερα, τα φύλλα των σταφυλιών αποτελούν το λιγότερο μελετημένο ή αξιοποιημένο υπόλειμμα των καλλιεργειών σταφυλιού και της οινοποίησης. Σύμφωνα με τις λιγοστές πληροφορίες που είναι διαθέσιμες για τα φύλλα αμπελιού, η σύνθεση τους περιλαμβάνει οργανικά οξέα, φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, τανίνες, προκυανιδίνες, ανθοκυανίνες, λιπίδια, ένζυμα, βιταμίνες, καροτενοειδή, τερπένια, και σάκχαρα. Η πλούσια χημική σύνθεση αυτών των φύλλων έχει οδηγήσει σε σημαντικό ενδιαφέρον για αυτό το φυτικό υλικό ως μια πολλά υποσχόμενη πηγή ενώσεων με θρεπτικές και αντισυπτικές ιδιότητες.

(36)

2.4.4 Οινολάσπες

Οι οινολάσπες είναι τα υπολείμματα που σχηματίζονται στον πυθμένα των δοχείων που περιέχουν κρασί, μετά τη ζύμωση, κατά την αποθήκευση ή μετά από εγκεκριμένες επεξεργασίες, καθώς και τα υπολείμματα που λαμβάνονται μετά τη διήθηση ή τη φυγοκέντρωση αυτού του προϊόντος. Οι οινολάσπες αποτελούνται κυρίως από μικροοργανισμούς (κυρίως ζυμομύκητες), τρυγικό οξύ, ανόργανη ύλη και φαινολικές ενώσεις. Οι οινολάσπες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του κρασιού καθώς αλληλεπιδρούν με (πολυ)φαινολικές ενώσεις, που σχετίζονται άμεσα με το χρώμα και άλλες οργανοληπτικές ιδιότητες, και τις προσροφούν. Επιπλέον, οι οινολάσπες απελευθερώνουν ένζυμα που ευνοούν την υδρόλυση και τον μετασχηματισμό των (πολυ)φαινολικών υποστρωμάτων σε φαινολικά με υψηλή προστιθέμενη αξία και ενδιαφέρον όπως το γαλλικό οξύ ή το ελλαγικό οξύ. (36)

2.5 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.5.1 Φαινολικές Ενώσεις

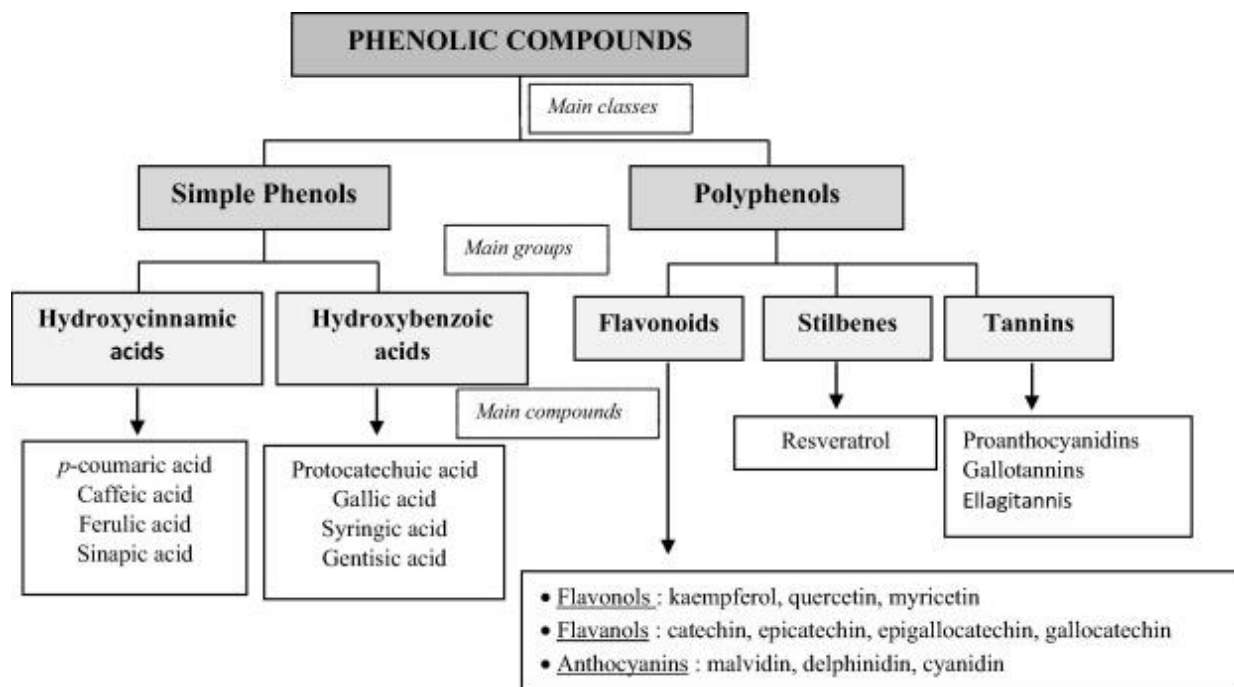
Οι φαινολικές ενώσεις αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο πολυάριθμες, σημαντικές και ευρέως διαδεδομένες ομάδες φυσικών προϊόντων στο φυτικό βασίλειο. Αυτές οι ενώσεις εμφανίζονται συχνά σε συζευγμένη μορφή, συγκεκριμένα ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα ή εστέρες του κινικού οξέος, του σικιμικού οξέος και του τρυγικού οξέος. Παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις.

Το κόκκινο κρασί είναι ένα ρόφημα πλούσιο σε φαινολικά και οι φαινολικές ενώσεις του είναι ευρέως γνωστές για την προστατευτική τους δράση για την υγεία των καταναλωτών.

Κατά την οينوποίηση εξάγεται μόνο το 30–40% των φαινολικών ενώσεων, ανάλογα με τις ποικιλίες σταφυλιών, την τοποθεσία του αμπελώνα και τις τεχνολογικές παραμέτρους της οينوποίησης (αφαίρεση μίσχου, σύνθλιψη, διαβροχή και έκθλιψη).

Δομικά, οι φαινολικές ενώσεις περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει έναν ή περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες και ποικίλλει από στοιχειώδη μονοφαινολικά μόρια έως ενώσεις υψηλού πολυμερισμού. Τα φαινολικά που περιέχονται στα σταφύλια και στο κρασί μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες, ως φαινολικά οξέα,

φλαβονοειδή και τανίνες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Πολλές φαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί στον πυρήνα του σταφυλίου, οι πιο άφθονες είναι οι ανθοκυανίνες, τα υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά οξέα, οι φλαβανόλες, οι φλαβονόλες και τα στυλβένια. (37)



Εικόνα 10. Κύριες Φαινολικές Ενώσεις στον πυρήνα του σταφυλίου.

2.5.1.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα έχουν μια λειτουργική ομάδα καρβοξυλικού οξέος και διακρίνονται σε υδροξυκινναμωμικά οξέα και υδροξυβενζοϊκά οξέα. Το τελευταίο περιλαμβάνει το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό, το συρίγγιο και το βανιλικό οξύ, ενώ τα υδροξυκινναμωμικά οξέα περιλαμβάνουν γαλλικό, καφεϊκό, φερουλικό, π-κουμαρικό, χλωρογενικό και σιναπικό οξύ και αρωματικές ενώσεις με πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων.(12)

2.5.1.2 Φλαβανόλες (φλαβαν-3-όλες)

Οι φλαβανό-3-όλες (δηλαδή οι προανθοκυανιδίνες και οι κατεχίνες) είναι η πιο κοινή ομάδα φλαβονοειδών στην ανθρώπινη διατροφή, που βρίσκονται εύκολα στα φρούτα και τα λαχανικά. Έχουν εξαιρετική σημασία για τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά του κρασιού, καθώς εξάγεται από τα σταφύλια κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, αλλά όχι πλήρως, παραμένοντας σε μεγάλη ποσότητα στα υπολείμματα οινοποίησης. Η υψηλότερη συγκέντρωση αυτών των

ενώσεων βρίσκεται στους σπόρους, αλλά υπάρχουν και στη φλούδα του σταφυλιού. Ωστόσο, οι σπόροι και το δέρμα έχουν διαφορετικές συνθέσεις φλαβαν-3-όλης, όπως κατεχίνες, γαλλοκατεχίνες και προανθοκυανιδίνες που βρίσκονται στο δέρμα, ενώ οι σπόροι περιέχουν μόνο κατεχίνες και προκυανιδίνες (37)

2.5.1.3 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες προέρχονται από το ίδιο βιοσυνθετικό μονοπάτι που παράγει ανθοκυανίνες και συμπυκνωμένες τανίνες στα σταφύλια, που σχετίζονται με τον συνχρωματισμό, προσδίδοντας σταθερότητα στη χρωματική μορφή των ανθοκυανινών, αλλάζοντας ή αυξάνοντας την ένταση του χρώματος. Η καεμπερόλη, η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η ισοραμνετίνη είναι οι κύριοι εκπρόσωποί της (37)

2.5.1.4 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες χαρακτηριστικές του κόκκινου χρώματος και παράγονται κατά την ωρίμανση. Είναι πολύ ευαίσθητα σε χημικούς μετασχηματισμούς λόγω της δράσης παραγόντων όπως το φως, η θερμοκρασία, το οξυγόνο, το pH, οι διαλύτες και τα μεταλλικά ιόντα. Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού, μία από τις μεγάλες έρευνες για την ένωση αυτή είναι η σταθεροποίησή της για χρήση ως φυσική χρωστική στη βιομηχανία τροφίμων.

Οι κύριες ανθοκυανίνες που βρίσκονται στη φλούδα του σταφυλιού είναι: 3-O-γλυκοσίδες της μαλβιδίνης, της πετούνιδίνης, της κυανιδίνης, της πεονιδίνης και της δελφινιδίνης, ωστόσο, παράγοντες όπως η ποικιλία, η ωριμότητα και το κλίμα μπορεί να αλλάξουν την παρουσία αυτών των ενώσεων (37)

2.5.1.5 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι φαινολικές ενώσεις που αποτελούνται χημικά από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια γέφυρα αιθυλενίου (30). Απαντώνται σε βρώσιμα φυτά, ειδικά στα σταφύλια. Το κύριο στιλβένιο που βρίσκεται στο σταφύλι, το κρασί και στα υπολείμματα οινοποίησης είναι η ρεσβερατρόλη και η ποσότητά του ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και την ποικιλία σταφυλιού. Τα πιο σημαντικά στιλβένια των σταφυλιών είναι η ρεσβερατρόλη-3-O-β-d-γλυκοπυρανοσίδη, η cis και η trans ρεσβερατρόλη, τα διμερή της πικεατανόλης και της ρεσβερατρόλης, καθώς και ορισμένες γλυκοζυλιωμένες και ισομερείς μορφές.(37)

2.5.1.6 Υδροξυβενζοϊκά

Τα παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέος που έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής,, αντιπροσωπεύονται κυρίως από π- υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, ταννικό οξύ, βανιλικό οξύ, παράγωγα γαλλικού οξέος και συριγικό οξύ. Το γαλλικό οξύ περιγράφεται ως το πιο άφθονο παράγωγο του υδροξυβενζοϊκού οξέος στους μίσχους, τις φλούδες και τους σπόρους σταφυλιών, ακολουθούμενο από το συριγγικό οξύ στους μίσχους σταφυλιών και το πρωτοκατεκκουϊκό οξύ στους σπόρους και τις φλούδες σταφυλιών . Το γαλλικό οξύ είναι ιδιαίτερα σημαντικό λόγω του ρόλου του ως προδρόμου υδρολυόμενων τανινών. (30)

2.5.1.7 Υδροξυκινναμωμικά Οξέα

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα βρίσκονται σε όλα τα μέρη του καρπού του σταφυλιού, με την υψηλότερη καταγεγραμμένη περιεκτικότητα στους εξωτερικούς ιστούς του ώριμου φρούτου (φλοιοί σταφυλιού).

Η συγκέντρωση στα υδροξυκινναμωμικά οξέα γενικά μειώνεται κατά τη διαδικασία ωρίμανσης, ωστόσο, η συνολική ποσότητα αυτής της φαινολικής κατηγορίας αυξάνεται αναλογικά με το μέγεθος του καρπού. Τα κύρια υδροξυκινναμωμικά οξέα που βρίσκονται στα σταφύλια και τα κρασιά είναι το καφταρικό, το π- κουταρικό και το φερταρικό οξύ. (30)

2.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η εκχύλιση αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των μικροσυστατικών. Η πιο κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται για τα παρα-προϊόντα οινοποίησης είναι η στερεή-υγρή εκχύλιση που ορίζεται ως το φαινόμενο μεταφοράς της μάζας από το στερεό δείγμα στην υγρή φάση του διαλύτη με τον οποίο έρχεται σε επαφή.

Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού, το διαλύτη, το χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία, το pH και την αλληλεπίδραση όλων αυτών των μεταβλητών.(38). Ο τύπος του διαλύτη είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Λόγω της πολικής φύσης των πολυφαινολών, διαλύονται πιο εύκολα σε πολικά διαλύματα όπως αυτά που συνδυάζουν νερό και αλκοόλη.Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ο ιδανικός διαλύτης. Ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης είναι σημαντικές παράμετροι για την ελαχιστοποίηση του ενεργειακού κόστους της διαδικασίας και για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων. Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί τη διαλυτότητα των ουσιών και τη διάχυσή τους στην υγρή φάση. Ωστόσο δεν μπορεί να αυξηθεί επ' αόριστον καθώς πάνω από τους 50°C μειώνεται η σταθερότητα των φαινολικών ενώσεων και

μετουσιώνονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το pH του διαλύματος εκχύλισης επηρεάζει επίσης τη διαδικασία και συνήθως προτιμάται ένα οξυνισμένο μίγμα διαλύτη (0,1-1% HCl) (38) .

Η απόδοση της εκχύλισης μπορεί να μεγιστοποιηθεί σε ένα ή δυο βήματα , συνδυάζοντας παράλληλα και εναλλακτικές διαδικασίες , όπως οι υπέρηχοι που αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης κατά ένα βήμα .(38).

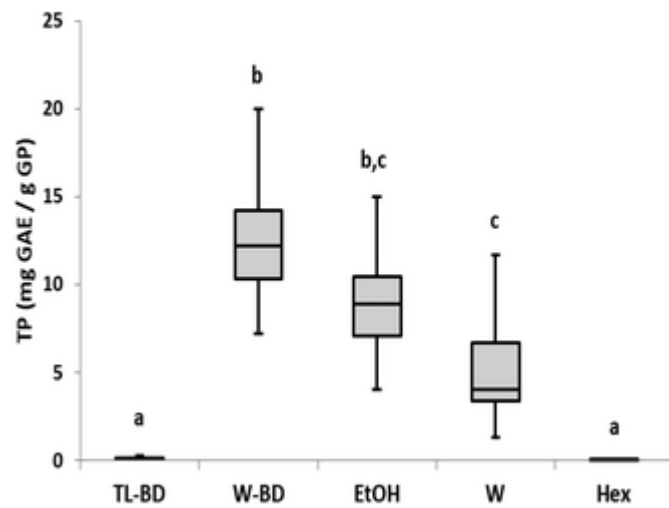
Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με διαφορετικούς διαλύτες. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις τεχνικές εκχύλισης: (α) Η εκχύλιση Bligh–Dyer ,χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των ολικών λιπιδίων (TL-BD) και των υδατοδιαλυτών μορίων (W-BD). (β) χρησιμοποιήθηκε εξαγωγή νερού για τη λήψη των ενώσεων υψηλής πολικότητας (W). (γ) Χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση 80% αιθανόλης για τη λήψη των ενώσεων μέτριας πολικότητας (EtOH) και (δ) χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση με εξάνιο για να ληφθούν οι ενώσεις χαμηλής πολικότητας. Για κάθε εκχύλιση, χρησιμοποιήθηκαν 25 g GP (φλοιοί και σπόροι) σε αναλογία 1 : 5 ((w/v)) GP προς διαλύτη και ανακινήθηκαν στους 45 °C, 120 rpm, για 18 ώρες. Όλες οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα εκχυλίσματα οργανικών διαλυτών εξατμίστηκαν, διαλύθηκαν σε αιθανόλη 80% και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, τα εκχυλίσματα νερού λυοφιλίστηκαν, διαλύθηκαν σε νερό και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Οι συνολικές φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν στα εκχυλίσματα του πυρήνα σταφυλιού. Τα αποτελέσματα δεν αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών σταφυλιών της ίδιας μεθόδου εκχύλισης .Συνεπώς, για λόγους απλότητας, τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης προκειμένου να παρουσιαστούν (Εικόνα 11).

Τα εκχυλίσματα W-BD εμφάνισαν την υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά, 12,9 (10,8–14,3) mg GAE ανά g GP σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα TL-BD, 0,11 (0,07–0,15) mg GAE ανά g GP, εκχυλίσματα W, 5,05 (3,8–7,2)) mg GAE ανά g GP και εκχυλίσματα εξάνιου (Hex), 0,013 (0,005–0,025) mg GAE ανά g GP.

Η διαφορά μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων νερού (W-BD, W) πιθανώς αποδίδεται στην παρουσία μεθανόλης στην υδατική φάση της εκχύλισης Bligh-Dyer. Το φαινολικό περιεχόμενο της εκχύλισης EtOH, 8,7 (7,7-10,2) mg GAE ανά g GP, δεν διέφερε σημαντικά από τα εκχυλίσματα W-BD ή W (34)

Η αναζήτηση της βιβλιογραφίας έχει επισημάνει μελέτες που συνήθως χρησιμοποιούν νερό ως διαλύτη ή συνδυάζουν μεθανόλη με νερό , αιθανόλη με νερό , χλωροφόρμιο και εξάνιο με άλλους διαλύτες υψηλότερης πολικότητας ή χλωροφόρμιο και εξάνιο για τα μη πολικά λιπίδια των δειγμάτων. Παρόμοια με τα παραπάνω αποτελέσματά, τα υδατικά μείγματα αλκοολικής εκχύλισης αυξάνουν την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με την εκχύλιση με νερό . Επίσης, οι αυξανόμενες τιμές του % αλκοόλης, ο χρόνος επώασης και οι αναλογίες

διαλύτη προς στερεό φαίνεται να έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων. (34)



Εικόνα 11 Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικό GP ανά μέθοδο εκχύλισης. (34)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΠΟΠΡΟΙΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ, ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε κλινικές συνθήκες, τα αντιαιμοπεταλιακά και αντιπηκτικά φάρμακα, όπως η ασπιρίνη και η κλοπιδογρέλη, χρησιμοποιούνται στη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων. Αν και η αποτελεσματικότητά τους είναι καλά τεκμηριωμένη, οι επιβλαβείς, απειλητικές για τη ζωή παρενέργειές τους έχουν επίσης τεκμηριωθεί καλά, γεγονός που έχει οδηγήσει σε έρευνες για φυσικές εναλλακτικές λύσεις. Η έρευνα έχει στραφεί σε μια διερευνητική δοκιμή για τον εντοπισμό νέων αντιπηκτικών και αντιαιμοπεταλιακών ουσιών που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά. Τα φυτά είναι μια καλή πηγή για την απομόνωση φυσικών ενώσεων χωρίς δυσμενείς παρενέργειες, ικανά να αναστέλλουν τα ένζυμα της οδού πήξης και να μειώνουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι δίαιτες πλούσιες σε πολυφαινόλες, όπως τα φλαβονοειδή, προστατεύουν από την αγγειακή δυσλειτουργία, προάγουν την αγγειακή υγεία και μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών και εγκεφαλοαγγειακών παθήσεων . (39).

Τα σταφύλια—τα μούρα του *Vitis vinifera*—είναι γνωστά και ευρέως διαδεδομένα ως προς την κατανάλωσή τους από την αρχαιότητα. Οι θρεπτικές και φαρμακευτικές αξίες αυτών των φρούτων έχουν επιβεβαιωθεί τόσο από την παραδοσιακή ιατρική όσο και από έναν αυξανόμενο αριθμό επιστημονικών μελετών. (39). Ο πυρήνας και τα στέμφυλα , υποπροϊόντα των βιομηχανιών κρασιού και χυμών, ως πηγές βιοδραστικών ουσιών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη πρωτοπαθών και δευτερογενών θρομβωτικών διαταραχών και να έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Δεδομένου ότι δεν μεταφέρονται όλες οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα σταφύλια στο κρασί κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, τα στέμφυλα των σταφυλιών θεωρούνται σημαντική πηγή των φαινολικών ενώσεων (32).

Τα τελευταία χρόνια , η οينوποιητική βιομηχανία παρουσίασε σταθερό ρυθμό ανάπτυξης, κυρίως λόγω της αύξησης εσωτερικής κατανάλωσης και εξαγωγής. Γι'αυτό τον λόγο , η αξία των στεμφύλων έχει αυξηθεί , και είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η φαινολική του σύσταση για την προώθηση της χρήσης αυτού του προϊόντος (32)

3.2 ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Τα στέμφυλα είναι το κύριο υποπροϊόν της οινοποιητικής διαδικασίας και παράγονται μεγάλες ποσότητες ετησίως. Το «Romace» αποτελείται από σπόρους, μίσχους και δέρματα. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το υποπροϊόν αυτό είναι μια σημαντική πηγή φαινολικών ενώσεων και έχει πολλές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία (40).

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει σθεναρά τις ευεργετικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων που προέρχονται από το σταφύλι και το κόκκινο κρασί, ειδικά σε καρδιαγγειακές παθήσεις προκαλώντας αντιοξειδωτική, αγγειοδιασταλτική και αντιαιμοπεταλιακή δράση. Τα τελευταία χρόνια, μια αυξανόμενη προσοχή έχει επικεντρωθεί στις θετικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού και των εκχυλισμάτων από δέρμα σταφυλιού στην αγγειακή λειτουργία σε αρτηρίες με στένωση. Τα εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού έχουν επίσης δείξει αγγειοδιασταλτική ιδιότητες στα ενδοθηλιακά κύτταρα και προστασία έναντι βιοδεικτών αθηροσκλήρωσης *in vitro*. Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς με τους οποίους τα προϊόντα που προέρχονται από σταφύλια επάγουν τις περιγραφόμενες αγγειακές δράσεις είναι η αύξηση της παραγωγής του αγγειοδιασταλτικού και αντιαιμοπεταλιακού παράγοντα, του μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, το NO εμπλέκεται στις *in vitro* αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις των πολυφαινολικών ενώσεων του κόκκινου κρασιού (41).

Αν και η χρήση υποπροϊόντων γίνεται όλο και πιο σημαντική, ο αριθμός των μελετών σχετικά με τη χρήση του πυρήνα σταφυλιού ως πρόληψη καρδιαγγειακής νόσου είναι σπάνιος. Ο Πίνακας 2 παρέχει μια περίληψη τέτοιων μελετών (32).

Πίνακας 2. Καρδιοπροστατευτική δράση εκχυλισμάτων στεμφύλων

Προϊόν σταφυλιού	Μέθοδος εκχύλισης	Ποσότητα	Μοντέλο	Αποτελέσματα	Σχόλια	Αναφορά
Πυρήνας από κόκκινα σταφύλια (φλούδες, σπόρους, μίσχους και μίσχους μούρων)	Ενζυματική υδρόλυση (πηκτινάση, α-αμυλάση, ξυλανάση, κυτταρινάση - Αιθανολική εκχύλιση)	142,6 mg GA eq/L έως 346,1 mg GA eq/L	<i>In vitro</i>	~27-υδροξυλάσης της στερόλης, ↑ 7α-υδροξυλάσης λόγω περιεκτικότητας κατεχίνης, επικατεχίνης και κερκετίνης στα εκχυλίσματα	Δοσοεξαρτώμενη ↑ πολυφαινολών → ↑ 7 α-υδρολάσης → ↑ χολικών οξέων → ↓ LDL-C	(42)
Πυρήνας σταφυλιού (φλούδες, σπόρους, στελέχη)	Ενζυματική εκχύλιση (θρυψίνη-χυμοθρυψίνη) *Πλεονέκτημα αποφυγής διαλυτών με δυνητικό κίνδυνο	0,0001 έως 0,03 g/L	ex vivo (αρτηρίες αρουραίων)	-Χαλάρωση αρτηριών με εκχύλισμα - Χαλάρωση ενδοθηλίου με απελευθέρωση NO	Δοσοεξαρτώμενη ↑ πολυφαινολών → ↓ Συστολή των αρτηριών → Αναστολή δράσης ET-1 (↓ συστολή των αρτηριών)	(43)
- Στέμφυλα - Κόκκινο κρασί (χωρίς αλκοόλ)	Δύο τρόποι εκχύλισης: Μεθανόλη 50% Ακετόνη 70%	100 mg/kg/ημέρα Στεμφύλων ή κρασιού	Αρουραίοι Wistar In vivo (30 ημέρες) 3 ομάδες : - Ελέγχου - Κόκκινου κρασιού - Στέμφυλων	↔ Γλυκόζη ↔ TC ↔ LDLC ↓ VLDL ↓ TG	↔ βιοδείκτες για τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου ↓ βιοδεικτών που συμβάλουν στην στεφανιαία νόσο	(44)

Στέμφυλα	Εμπορικό εκχύλισμα (περιείχε μόνο προκυανιδίνες)	25 mg/kg εκχυλίσματος	Χρυσά συριακά χάμστερ (in vino) (30 μέρες + 15 μέρες παρέμβαση με εκχύλισμα)	↔ Γλυκόζη ↔ Ινσουλίνη ↔ Λεπτίνη ↔ TG ↓ Βάρους – Σωματικού λίπους	4 ομάδες: - Τυπική διαίτα - Δίαιτα fat - Τυπική διαίτα + εκχύλισμα - Δίαιτα fat + εκχύλισμα	(45)
Κόκκινα Στέμφυλα	Κάψουλα	100 mg (δύο φορές την ημέρα)	Κλινική δοκιμή (21-64 ετών με υπερλιπιδαιμία) (8 εβδομάδες) -Ομάδα με κάψουλα (200 mg/ημέρα) - Ομάδα Ελέγχου	↔ TG ↔ HDL-C ↓ LDL-C ↔ VLDL-C ↓ *Ox-LDL	↓ *Ox-LDL ↓ Κινδύνου αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακών διαταραχών	(46)

Στην μελέτη (42) , αξιολόγησαν την επίδραση των ενζυματικών φαινολικών εκχυλισμάτων από στέμφυλα *Vitis vinifera* L., μείγμα ποικιλιών Sangiovese και Montepulciano, με την 7 α-υδροξυλάση και τη στερόλη 27-υδροξυλάση χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλο. Αυτά τα δύο ένζυμα σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των χολικών οξέων και την ομοιόσταση της χοληστερόλης στον οργανισμό. Τα στέμφυλα ελήφθησαν με ενζυματική υδρόλυση με πηκτινάση, α-αμυλάση, ξυλανάση και κυτταρινάση και μετά από επεξεργασία με ένζυμα, διεξήχθη αιθανολική εκχύλιση. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η εκχύλιση με κυτταρινάση και αιθανολικό εκχύλισμα (μάρτυρας) παρουσίασε περισσότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά σε σύγκριση με άλλα σχήματα που δοκιμάστηκαν . Αυτά τα εκχυλίσματα περιείχαν κυρίως κερκετίνη, ρουτίνη, κατεχίνη και επικατεχίνη. Η μελέτη ανέφερε ότι τα εκχυλίσματα ελέγχου και τα επεξεργασμένα με κυτταρινάση προκάλεσαν μεταγραφή της 7 α-υδρολάσης, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στη μεταγραφή της 27-υδροξυλάσης. Η ανοδική ρύθμιση στη μεταγραφή της 7 α-υδρολάσης μπορεί να σχετίζεται με την αύξηση της σύνθεσης των χολικών οξέων και μπορεί επίσης να σχετίζεται με την μείωση LDL-C. Αυτή η επίδραση στην ανοδική ρύθμιση της 7 α-υδροξυλάσης αποδίδεται στην κατεχίνη, την επικατεχίνη και την κερκετίνη που υπάρχουν στα εκχυλίσματα. Η περιεκτικότητα σε φαινολικά εκχυλίσματα από υποπροϊόντα κρασιού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η μέθοδος που χρησιμοποιείται (ενζυματική, με μικροκύματα ή υπερήχους), η εκλογή διαλύτη (μεθανόλη, αιθανόλη ή νερό) και ο χρόνος. Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τη συγκέντρωση και το φαινολικό προφίλ των εκχυλισμάτων. Μέχρι στιγμής, δεν είναι διαθέσιμη μια τυποποιημένη μέθοδος για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από υποπροϊόντα κρασιού.

Στην μελέτη (43) , εξέτασαν την καρδιοπροστατευτική επίδραση ενός ενζυματικού φαινολικού εκχυλίσματος από πυρήνα σταφυλιού (*Vitisvinifera* (var. verdejo) που περιείχε φλούδες, πολτό, σπόρους και στελέχη του σταφυλιού) σε ένα μοντέλο *ex-vivo* , χρησιμοποιώντας αρτηρίες αρσενικών αρουραίων. Οι αρτηρίες των αρουραίων υποβλήθηκαν σε αγωγή με εκχύλισμα φαινολικής ένωσης σε συγκεντρώσεις από 0,0001 έως 0,03 g/L. Τα εκχυλίσματα προκάλεσαν χαλάρωση στους αορτικούς δακτυλίους με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Οι συγγραφείς απέδωσαν αυτή τη χαλάρωση στην ενεργοποίηση του ενδοθηλιακής συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το μονοξειδίου του αζώτου (NO). Οι αρτηρίες υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ET-1 (ενδοθηλίνη -1) , το οποίο είναι γνωστό ότι προκαλεί συστολή στις αρτηρίες, παράγοντας υπεροξειδίο ανιόντος O_2^- , η επεξεργασία με εκχύλισμα φαινολικών ενώσεων, ενζυματικό εκχύλισμα πυρηνιού σταφυλιού (GP-EE), προκάλεσε αναστολή στη συστολή των αορτικών δακτυλίων, πιθανώς λόγω της

αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο εκχύλισμα. . Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά που βρέθηκαν στην μελέτη (47), στην οποία χρησιμοποίησαν ένα κόκκινο κρασί εμπλουτισμένο με προκυανιδίνη σε ένα μοντέλο *in vitro* . Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να υποδεικνύουν ότι το ίδιο αποτέλεσμα έναντι της ET-1 μπορεί να παρατηρηθεί κατά τη χρήση κρασιού ή πυρηνικού σταφυλιού, που πιθανώς προκαλείται από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων (κατεχίνη, επικατεχίνη, κερκετίνη, προκυανιδίνες) που υπάρχουν και στα δύο δείγματα. . Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος της βιολογικής έρευνας που διεξήχθη με προϊόντα που προέρχονται από σταφύλι αφορούσε εκχύλιση με διαλύτες όπως αιθανόλη ή μεθανόλη ή εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες. Εδώ δοκιμάστηκε ένα νέο εκχύλισμα πυρηνίσκου σταφυλιού που λαμβάνεται με επεξεργασία με πρωτεάσες. Αυτή η διαδικασία έχει το πλεονέκτημα της αποφυγής διαλυτών με δυνητικό κίνδυνο για την υγεία και το περιβάλλον.

Οι (44) αξιολόγησαν ένα φαινολικό εκχύλισμα από πυρήνα σταφυλιού και ένα εκχύλισμα κόκκινου κρασιού σε *in vivo* μοντέλο, χρησιμοποίησαν αρσενικούς αρουραίους Wistar. Το εκχύλισμα πυρηνικού σταφυλιού ελήφθη με μεθανόλη και ακετόνη και το κόκκινο κρασί απαλκοολίστηκε για να αποφευχθούν παρεμβολές από το αλκοόλ. Οι αρουραίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, μια ομάδα ελέγχου, μια ομάδα κόκκινου κρασιού και μια ομάδα πυρήνων σταφυλιού. Στους αρουραίους χορηγήθηκαν 100 mg/kg/ημέρα πυρηνέλαιου ή κρασιού χωρίς αλκοόλ για 30 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πυρήνας του σταφυλιού παρουσίαζε υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων από το κόκκινο κρασί, καθώς οι κύριες ενώσεις που εντοπίστηκαν ήταν η μαλβιδίνη, η κερσετίνη, το γαλλικό οξύ και ένα διμερές προκυανιδίνης τύπου B. Στο τέλος του πειράματος, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, HDL-C και LDL-C δεν επηρεάστηκαν από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού ή φαινολικού εκχυλίσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου . Ωστόσο, τα επίπεδα VLDL-C και τριακυλογλυκερολών μειώθηκαν με τη θεραπεία με εκχύλισμα από στέμφυλα , πιθανώς λόγω υψηλότερης περιεκτικότητας σε φαινολικά. Η LDL-C και η HDL-C θεωρούνται βιοδείκτες για τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα δεν μπορούν να αποδείξουν ότι η κατανάλωση φαινολικών ενώσεων από στέμφυλα ή κόκκινου κρασιού μειώνουν τα επίπεδα αυτών των βιοδεικτών, ωστόσο η VLDL-C και τα τριακυλογλυκερίδια συμβάλλουν στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου και η μείωση αυτών των μορίων σε αυτή τη μελέτη μπορεί να συμβάλει στη διαλεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο οι φαινολικές ενώσεις από το κόκκινο κρασί και τον πυρήνα του σταφυλιού αποτρέπουν την καρδιαγγειακή νόσο.

Αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με εκείνα των (45) , οι οποίοι δοκίμασαν την επίδραση ενός εμπορικού εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού σε αρσενικά χρυσά συριακά χάμστερ που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Σύμφωνα με αυτούς τους συγγραφείς, το εμπορικό εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού περιείχε κυρίως μονομερείς, διμερείς και ολιγομερείς προκυανιδίνες και φαινολικά οξέα. Τέσσερις πειραματικές ομάδες δοκιμάστηκαν: η πρώτη ομάδα ήταν με τυπική δίαιτα, η δεύτερη ομάδα με τυπική δίαιτα συμπληρωμένη με 25 mg/kg εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού του εμπορίου, η τρίτη ομάδα με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και η τέταρτη ομάδα με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά συμπληρωμένη με 25 mg/kg εκχυλίσματος. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μειώθηκαν σε εκείνα τα χάμστερ που έλαβαν θεραπεία με εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού και στις δύο δίαιτες. Ωστόσο, ούτε τα επίπεδα τριακυλογλυκερίνης ούτε τα επίπεδα γλυκόζης τροποποιήθηκαν από την κατανάλωση αυτού του εκχυλίσματος. Αντίθετα, το επίπεδο λεπτίνης μειώθηκε στις δίαιτες που συμπληρώθηκαν με το εκχύλισμα, σε σύγκριση με τη θεραπεία με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις από το εμπορικό εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού, στη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε, δεν μπορούσαν να αποτρέψουν την υπερτριγλυκεριδαιμία και την υπερχοληστεραιμία. Τα αρνητικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε αυτή τη μελέτη μπορούν να εξηγηθούν από τη δόση που χρησιμοποιήθηκε για τη διατροφή των ποντικών. Επίσης, το φαινολικό εκχύλισμα περιείχε μόνο προκυανιδίνες. Σε σύγκριση με τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους (44) , των οποίου το εκχύλισμα περιείχε άλλες ενώσεις όπως γαλλικό οξύ, κερκετίνη, μαλβιδίνη και προκυανιδίνη Β, αυτό το μείγμα φαινολικών ενώσεων θα μπορούσε να έχει υψηλότερη καρδιοπροστατευτική δράση από ότι μόνο ένα εκχύλισμα πλούσιο σε προκυανιδίνες.

Οι (46) αξιολόγησαν ένα εμπορικό εκχύλισμα φαινολικών ενώσεων πυρηνικού σταφυλιού σε σχέση με την υπερλιπιδαιμική απόκριση. Για αυτό, πραγματοποιήθηκε μια κλινική δοκιμή σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία (21-64 ετών) χρησιμοποιώντας τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη μελέτη . Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, η μία έλαβε φαινολικό εκχύλισμα από πυρήνα σταφυλιού (100 mg δύο φορές την ημέρα) και η άλλη ομάδα έλαβε εικονικό φάρμακο. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της ολικής χοληστερόλης σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές λόγω του φαινολικού εκχυλίσματος του πυρήνα σταφυλιού. Η θεραπεία με φαινολικό εκχύλισμα παρουσίασε επίσης μείωση στα επίπεδα LDL-C και Ox-LDL-C. Τα επίπεδα τρικυλογλυκερολών, HDL-C και VLDL-C δεν τροποποιήθηκαν από την κατανάλωση του εκχυλίσματος. Αυτά τα αποτελέσματα διαφέρουν από αυτά που βρέθηκαν από τους (44) . Οι διαφορές μπορούν να εξηγηθούν πρώτα λαμβάνοντας υπόψη ότι οι (44) χρησιμοποίησαν αρουραίους ως μοντέλα και, δεύτερον, την ποσότητα που χωρήγησαν, καθώς δόθηκαν

υψηλότερες δόσεις στους αρουραίους σε σύγκριση με αυτές που χορηγήθηκαν στους ασθενείς με υπερλιπιδαιμία (32).

3.3 ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Γενικά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις από τη βιβλιογραφία για τις αντιαιμοπεταλιακές επιδράσεις των διατροφικών πολυφαινόλων. Οι πολυφαινόλες από μελέτες που βασίζονται τόσο στη συσσωματομετρία όσο και στην κυτταρομετρία ροής έχουν δείξει τη δυνατότητα να αναστέλλουν πολλές πτυχές της λειτουργίας των αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένης της απελευθέρωσης μικροσωματιδίων αιμοπεταλίων. Ωστόσο, ένας συνδυασμός και των δύο δοκιμών λειτουργίας των αιμοπεταλίων, μαζί με εξειδικευμένες μεθόδους όπως η ELISA (βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία, μπορεί να αποσαφηνίσει λεπτομέρειες των αντιαιμοπεταλιακών επιδράσεων. Επιπλέον, η χρήση των προσδιορισμών συσσωματομετρίας και κυτταρομετρίας ροής θα επιτρέψει την καλύτερη σύγκριση των μελετών και τη χρήση μικροσωματιδίων αιμοπεταλίων ως βιοδείκτη για την αξιολόγηση της αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας των πολυφαινόλων.

Παρά τους περιορισμούς βιοδιαθεσιμότητας, υπάρχουν στοιχεία από επεμβατικές δοκιμές ότι η κατανάλωση διατροφικών πολυφαινόλων μπορεί να βελτιώσει την καρδιαγγειακή υγεία λόγω των αντιαιμοπεταλιακών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, τα κενά στη βιβλιογραφία και οι περιορισμοί προηγούμενων μελετών πρέπει να αντιμετωπιστούν. Καλά ελεγχόμενες μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε διαιτητικές πηγές τροφών πολυφαινόλης θα είναι χρήσιμες για την ανάπτυξη της κατανόησης τυχόν πιθανών αντιαιμοπεταλιακών επιδράσεων από δίαιτες πλούσιες σε πολυφαινόλες (48)

Πίνακας 3. Επίδραση πολυφαινολικών υποπροϊόντων οينوποίησης στην λειτουργία των αιμοπεταλίων

Μοντέλο Σχεδίασης	Πολυφαινόλη/Πηγή	Πηγή αιμοπεταλίων/ Πληθυσμός	Περιγραφή Μελέτης	Συσσωματομετρία (Agg) /Κυτταρομετρία Ροής (Ροή)	Ευρήματα	Αναφορές
In vitro	Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού C= 7,5 ή 15 μg GAE (ισοδύναμο γαλλικού οξέος) /ml DMSO =0,17%	Αιμοπετάλια από υγιή άτομα (Ολικό αίμα)	Συσσώρευση που προκαλείται από ADP και φωσφορυλίωση VASP για την αξιολόγηση της αναστολής από GSE (7,5 μg mL ⁻¹ και 15 μg mL ⁻¹)	Και τα δυο	- ↓ συσσώρευση αιμοπεταλίων (από την ADP) - ↓ διεγερμένης φωσφοπρωτεΐνης VASP - επίδραση στις δοκιμές πήξης σε C=15 μg mL ⁻¹	(39)
In vitro	Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού GSE (0,625–50 μg/ml) Και διάλυμα ρεσβερατρόλης	Αιμοπετάλια από υγιή άτομα (PMPs)	Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων με TRAP και θρομβίνη και σύγκριση της αντιαιμοπεταλιακής ιδιότητας του GSE (1,25–50 μg mL ⁻¹) με διάλυμα ρεσβερατρόλη	Και τα δυο	- ↓ έκφραση P-σελεκτίνης - ↓ σχηματισμός PMP - ↓ συσσωμάτωση αιμοπεταλίων -↓ O ₂ ⁻ στα αιμοπετάλια επαγόμενο από TRAP και Θρομβίνη	(49)
In vivo	Εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού πλούσιο σε πολυφαινόλες (77-80%)	35 άτομα placebo Και 35 άτομα χωρίς θεραπεία . Προ υπέρταση και σταδίου I (35–75 ετών)	Διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο (placebo) , τυχαιοποιημένη παρέμβαση παράλληλης ομάδας με κάψουλα εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού 300 mg/ημέρα. Περίοδος παρέμβασης οκτώ εβδομάδων.	Συσσωματομετρία	↔ΑΠ ↔ ενδοθηλίνη-1 ↔ μεταβολίτες NO ↔ δραστηριότητα ρενίνης ↔ ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη ↔συσσώρευση αιμοπεταλίων	(50)

In vitro	στέμφυλα κόκκινου σταφυλίου, Μέγιστα Φαινολικά (WBD) 12,9 (10,8–14,3) mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος GAE ανά g GP	Υγιή Άτομα PRP (πλάσμα ↑ σε αιμοπετάλια)	Μετρήθηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να ↓ τη συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων έναντι του PAF, ADP και του TRAP.	Συσσωματομετρία	Αντισταμοπεταλιακή Δράση: EtOH (Μέτρια πολικότητα) > TL-BD (Μικρή πολικότητα > W και W-BD (Υδατικά διαλύματα) Φαινολικά Συστατικά (mg GAE/ g GP) : W-BD ≈ EtOH > TL-BD	(34)
----------	---	---	--	------------------------	---	------

Η ομάδα (39) επαλήθευσε τις αντιαιμοπεταλιακές και αντιπηκτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού (GSE) χρησιμοποιώντας μοντέλα *in vitro*. Κατά την ανάλυση, αναλύθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: χρόνοι πήξης, δοκιμασίες θρομβοελαστομετρίας (χρόνος πήξης, χρόνος σχηματισμού θρόμβου και μέγιστη σταθερότητα θρόμβου), συσσώρευση αιμοπεταλίων και φωσφορυλίωση της διεγερμένης από αγγειοδιασταλτικό φωσφοπρωτεΐνης (VASP). Η επαγόμενη από τη διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) συσσώρευση ήταν χαμηλότερη στο GSE 7,5 $\mu\text{g/mL}$ καθώς και στο GSE 15.0 $\mu\text{g/mL}$. Παρόμοια εξάρτηση παρατηρήθηκε σε προσδιορισμούς VASP για GSE 7,5 $\mu\text{g/mL}$ και GSE 15 $\mu\text{g/mL}$. Η επίδραση στις δοκιμές πήξης του πλάσματος ήταν διακριτή μόνο με GSE 15 $\mu\text{g/mL}$. Όλες οι μεταβλητές θρομβοελαστομετρίας ήταν στατιστικά σημαντικές με συγκέντρωση GSE 15,0 $\mu\text{g/mL}$. Τα αποτελέσματά έδειξαν, για πρώτη φορά, την πολυδυναμική επίδραση του εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού στα συστήματα πήξης και σαφώς υποδηλώνουν ότι το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα πολλά υποσχόμενο διατροφικό φάρμακο για την πρόληψη καρδιαγγειακών θρομβωτικών επεισοδίων που προκαλούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς.

Ο στόχος της μελέτης των (49) ήταν να καθορίσουν και να συγκρίνουν την επίδραση του GSE (σε τελική δόση 0,625–50 $\mu\text{g/mL}$) και της ρεσβερατρόλης (3,4',5 – trihydroxystilben), μιας φαινολικής ένωσης που συντίθεται σε σταφύλια και λαχανικά και υπάρχει στο κρασί, το οποίο είναι ευεργετικό για την πρόληψη καρδιαγγειακών επεισοδίων, σε διάφορα στάδια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Μετρήθηκαν οι επιδράσεις του GSE και της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων, η επιφανειακή έκφραση της P-σελεκτίνης, ο σχηματισμός μικροσωματιδίων αιμοπεταλίων (PMP), παραγωγή O_2^- στα αιμοπετάλια του αίματος που διεγείρεται από το TRAP και τη θρομβίνη. Η έκφραση της P-σελεκτίνης και ο σχηματισμός μικροσωματιδίων αιμοπεταλίων (PMP) μετρήθηκαν με κυτταρόμετρία ροής. Σε αιμοπετάλια φιλτραρισμένα που ενεργοποιήθηκαν από θρομβίνη ή TRAP και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις GSE (1,25–50 $\mu\text{g/mL}$) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης της P-σελεκτίνης, του σχηματισμού PMP και της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Η GSE προκάλεσε επίσης δόσοεξαρτώμενη μείωση των O_2^- που παράγονται σε αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται από TRAP ή θρομβίνη. Τα παρόντα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η GSE αναστέλλει τις οδούς σηματοδότησης των αιμοπεταλίων που ενεργοποιούνται τόσο από πρωτεολυτικό (θρομβίνη) όσο και από μη πρωτεολυτικό αγωνιστή (TRAP). Στις συγκριτικές μελέτες, ο GSE βρέθηκε πιο αποτελεσματικός αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας από το διάλυμα της καθαρής ρεσβερατρόλης. Έτσι, και σε αυτή την μελέτη το πλούσιο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα από σπόρους σταφυλιού μπορεί να είναι χρήσιμο ως προστατευτικός παράγοντας έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων.

Η μελέτη των (50) σχεδιάστηκε ως μια διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, τυχαιοποιημένη μελέτη παρέμβασης παράλληλης ομάδας που περιελάμβανε εβδομήντα υγιή άτομα με συστολική ΑΠ μεταξύ 120 και 159 mmHg. Μια περίοδος εκτέλεσης 1 εβδομάδας ακολούθηθηκε από μια περίοδο παρέμβασης 8 εβδομάδων, κατά την οποία τα άτομα κατανάλωναν κάψουλες που περιείχαν είτε 300 mg/ημέρα GSE είτε εικονικό φάρμακο (μικροκρυσταλλική κυτταρίνη). Πριν και μετά την παρέμβαση, λήφθηκαν μετρήσεις περιπατητικής μέτρησης ΑΠ (ABP) κατά τη διάρκεια της ημέρας, δείγματα ούρων 24 ωρών και δείγματα αίματος νηστείας και μη. Η μέση βασική συστολική ΑΠ ήταν 135,8 (S E 1,3) mmHg και η διαστολική ΑΠ ήταν 81,5 (S E 0,9) mmHg. Οι τιμές της ΑΠ επηρεάστηκαν μέτρια, αλλά όχι σημαντικά, από την πλούσια σε πολυφαινόλες θεραπεία GSE έναντι του εικονικού φαρμάκου με επίδραση $-3,0$ mmHg για τη συστολική ΑΠ (95 % CI $-6,5, 0,5$) και $-1,4$ mmHg για τη διαστολική ΑΠ (95 % CI $-3,5, 0,6$). Οι αγγειοδραστικοί δείκτες που περιλαμβάνουν ενδοθηλίνη-1, μεταβολίτες NO και ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη, δραστηριότητα ρενίνης πλάσματος και συσσώρευση αιμοπεταλίων δεν επηρεάστηκαν από την παρέμβαση GSE. Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι η κατανάλωση GSE πλούσιας σε πολυφαινόλες δεν μειώνει σημαντικά την ABP σε άτομα χωρίς θεραπεία με υπέρταση προ και σταδίου I. (50)

Σκοπός της παρούσας μελέτης (34) ήταν η αξιολόγηση διαφορετικών εκχυλισμάτων από στέμφυλα κόκκινου σταφυλιού (GP (φλοιοί και σπόροι)), από τέσσερις ποικιλίες ερυθρών σταφυλιών: Sour Black (SB), Syrah (S), Cabernet Franc (CF), Cabernet Sauvignon (CS), σύμφωνα με την αντιαιμοπεταλιακή τους δράση. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων έναντι του PAF, της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) και του πεπτιδίου ενεργοποίησης του υποδοχέα θρομβίνης (TRAP). Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις τεχνικές εκχύλισης: (α) Η εκχύλιση Bligh–Dyer χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των ολικών λιπιδίων (TL-BD) και των υδατοδιαλυτών μορίων (W-BD). (β) χρησιμοποιήθηκε εξαγωγή νερού για τη λήψη των ενώσεων υψηλής πολικότητας (W). (γ) Χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση 80% αιθανόλης για να ληφθούν οι ενώσεις μέτριας πολικότητας (EtOH) και (δ) χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση με εξάνιο για να ληφθούν οι ενώσεις χαμηλής πολικότητας (Hex). Τα εκχυλίσματα W-BD εμφάνισαν την υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά, 12,9 (10,8–14,3) mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος GAE ανά g GP σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα TL-BD, 0,11 (0,07–0,15) mg GAE ανά g GP, εκχυλίσματα W, 5,05 (3,8–7,2)) mg GAE ανά g GP και εκχυλίσματα Hex, 0,013 (0,005–0,025) mg GAE ανά g GP. Το φαινολικό περιεχόμενο της εκχύλισης EtOH, 8,7 (7,7–10,2) mg GAE ανά g GP, δεν διέφερε σημαντικά από τα εκχυλίσματα W-BD ή W. Η διαφορά

μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων νερού (W-BD, W) πιθανώς αποδίδεται στην παρουσία μεθανόλης στην υδατική φάση της εκχύλισης Bligh-Dyer. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αντι-αιμοπεταλιακό αποτέλεσμα των εκχυλισμάτων δεν εξαρτιόταν από την ποικιλία σταφυλιού (τα δεδομένα δεν φαίνονται) ενώ ο καθοριστικός παράγοντας για την επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση που καθορίζει τα εκχυλισμένα μικροσυστατικά.

Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα EtOH παρουσίασαν την πιο ισχυρή αντι-αιμοπεταλιακή δράση με τιμές IC_{50} $162,1 \pm 66,9$, $181,2 \pm 82,3$ και $156,3 \pm 97,5$ μg εκχυλίσματος έναντι των PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. Λιγότερη αντι-αιμοπεταλιακή δράση (υψηλότερες τιμές IC_{50}) αποκαλύφθηκε από τα εκχυλίσματα TL-BD με τιμές IC_{50} $280,9 \pm 115,9$, $293,2 \pm 102,7$ και $284,8 \pm 131,8$ μg εκχύλιση έναντι PAF, ADP4 και αντίστοιχα. Τα εξαγωγικά εκχυλίσματα (σε ποσότητες που κυμαίνονται μεταξύ 1,0-300 μg εκχυλίσματος) εμφάνισαν ελάχιστη δράση χωρίς να φτάσουν το 50% της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα (W και W-BD, σε ποσότητες που κυμαίνονται μεταξύ 0,1-300 μg εκχυλίσματος) προκάλεσαν ενίσχυση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων έναντι όλων των παραγόντων. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι ήσσονος σημασίας αντι-αιμοπεταλιακή δράση παρουσιάζεται από συστατικά χαμηλής πολικότητας, υψηλή αντι-αιμοπεταλιακή δράση παρουσιάζεται από συστατικά μέτριας πολικότητας και καμία ανασταλτική δράση από συστατικά υψηλής πολικότητας του GP.(34)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροθρόμβωση. Το κρασί περιέχει πληθώρα μικρο-συστατικών κατάλληλης ποιότητας και ποσότητας, με καρδιο-προστατευτική δράση. Παρόλα αυτά η κατανάλωση του κρασιού δεν μπορεί να γίνει σε υπέρμετρο βαθμό λόγω της ύπαρξης της αιθανόλης που έχει και επιβλαβή για τον οργανισμό δράση. Ο σκοπός αυτής της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης υδατοαιθανολικών εκχυλισμάτων στεμφύλων (λευκών και κόκκινων ποικιλιών) και πρότυπων φαινολικών ενώσεων (κερκετίνη, κατεχίνη, ρεσβερατρόλη, επικατεχίνη) στην επαγόμενη από διάφορους συσσωρευτικούς παράγοντες έκφραση της P–σελεκτίνης στα αιμοπετάλια με την χρήση κυτταρομετρίας ροής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ - ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από ερυθρές και λευκές ποικιλίες . Οι ερυθρές ποικιλίες από τις οποίες προέκυψε το τελικό εκχύλισμα των ερυθρών (EtR, Ethanol Total Red) ήταν Ξινόμαυρο, Syrah , CabernetFranc, CabernetSauvignon. Οι λευκές ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για το εκχύλισμα (EtW, Ethanol Total White) των λευκών στεμφύλων της μελέτης ήταν Σεμιγιόν, Μαλαγουζιά, Ασύρτικο, Αθήρι. Από προηγούμενη μελέτη έχει βρεθεί ότι τα εκχυλίσματα αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίαζαν το μεγαλύτερο βιολογικό σκορ ως προς την αντιαιμοπεταλιακή και αντιοξειδωτική τους δράση έναντι εκχυλισμάτων που παραλήφθησαν με άλλους διαλύτες.

Απο την μελέτη των επιμέρους συστατικών στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, βρέθηκαν αυξημένες ποσότητες των παρακάτω φαινολικών συστατικών (Κατεχίνη, επικατεχίνη, Κερκετίνη, Ρεσβερατρόλη). Λόγω αυτής της παρατήρησης, σε αυτή την μελέτη δοκιμάστηκαν επι μέρους και αυτά τα φαινολικά ως προς τον ρόλο τους στην έκφραση της P-Σελεκτίνης στα κύτταρα (αιμοπετάλια) μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP .

Πίνακας 4. Προσδιορισμός ποσότητας φαινολικών συστατικών σε λευκά και κόκκινα στελέχη σταφυλλιών

Αναλυτές	Στελέχη από λευκά σταφύλια (mg/Kg)	Στελέχη από κόκκινα σταφύλια (mg/ Kg)
Επικατεχίνη (Epi.)	562 ±26	1390 ±25
Ρεσβερατρόλη (Resv.)	27.4 ±1.0	61.2 ± 3.8
Κατεχίνη (Catec.)	1134 ±49	3327±114
Κερκετίνη (Querc.)	<6.25	1373±58

Στον πίνακα 5 φαίνεται ότι τα στελέχη από τα κόκκινα σταφύλλια έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων (Επικατεχίνη , Ρεσβερατρόλη, Κατεχίνη και Κερκετίνη) απ'ότι τα λευκά στελέχη σταφυλλιών .

5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ (80%)

Στην πειραματική διαδικασία της εκχύλισης υποπροϊόντων με αιθανόλη (80%) απαιτούνται τα εξής βήματα :

- Τοποθετούνται 25γρ παρα- προϊόντων και 125 mL αιθανόλης 80% σε δοχείο του 1 L . Το μίγμα αφήνεται και αναδεύεται στους 45°C για 18-20 ώρες με ένταση 120 rpm.
- Γίνεται διήθηση στο μίγμα προκειμένου να διαλυθούν και να ομογενοποιηθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια σε συσκευή Buchner.
- Σε μια ζυγισμένη φιάλη μεταφέρεται το διήθημα.
- Το διήθημα εξατμίζεται σε συσκευή Flash Evaporator, ακολουθεί ζύγιση, προσθήκη 17mL 80% αιθανόλης, παραλαβή με πιπέτα Pasteur σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες καλυμένους με καπάκι και αλλουμινόζαρτο και αποθήκευση στους -20°C

5.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

- Η λήψη αίματος γίνεται μετά από 8 ωρη νηστεία σε πλαστικά σωληνάρια των 15 mL που περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα AC (Anticoagulant citrate) 0,104M , pH= 7,34 σε αναλογία αίμα/ αντιπηκτικό 10/1 (12,6 mL αίμα με + 1,4 mL AC). Τα αντιπηκτικά με βάση το κιτρικό εμποδίζουν την πήξη του αίματος λόγω της ικανότητας του κιτρικού ιόντος να δεσμεύει το ιονισμένο ασβέστιο που υπάρχει στο αίμα για να σχηματίσει ένα μη ιονισμένο σύμπλεγμα ασβεστίου-κιτρικού.
- Στην συνέχεια γίνεται φυγοκέντριση του διαλύματος αίμα – αντιπηκτικό στα 140 g ή 1300rpm για 16 min χωρίς φρένο
- Έπειτα γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου (Platelet – rich plasma , PRP) σε πλαστικό σωλήνα.
- Αραίωση του PRP με PBS (φορμαλδεΰδη 0,2%), pH = 7,4 (αποστειρωμένο) σε αναλογία 1/10 (Περίπου 25.000 αιμοπετάλια/ μ L)

5.4 ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κατά την κυτταρομετρική ανάλυση ροής είναι τα εξής:

- CD41a-FITC με PBS (1/9) και προσθήκη 5 μ L στην ανάλυση - δοκιμή: Το μονοκλωνικό αντίσωμα HIP8 αντιδρά με το ανθρώπινο μόριο CD41 (αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη IIb, ITGA2B), την ιντεγκρίνη α IIb, επίσης γνωστή ως GPIIb αιμοπεταλίων. Το CD41 συνδέεται μη ομοιοπολικά με την ιντεγκρίνη βήτα3 (GPIIIa, CD61) και εκφράζεται από μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια. Το σύμπλεγμα CD41/CD61 είναι ένας υποδοχέας για τη φμπρονεκτίνη, το ινωδογόνο, τον παράγοντα von Willebrand, τη βιτρονεκτίνη και τη θρομβοσπονδίνη και μεσολαβεί στη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το HIP8 εμποδίζει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.
- CD62P-APC 5 μ L πυκνού διαλύματος (Χωρίς αραίωση). Το μονοκλωνικό αντίσωμα Psel.KO2.3 αντιδρά με το CD62P (γνωστό και ως P-selectin και GMP-140), ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης 140 kDa που μπορεί να προσκολληθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, αυτή η σελεκτίνη μεσολαβεί στην προσκόλληση των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, καθώς και στην κύλιση λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο κύριος συνδέτης για το CD62P στα ουδετερόφιλα είναι ο συνδέτης-1 της γλυκοπρωτεΐνης P-σελεκτίνης (PSGL-1). Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει έναν τοπο που διατηρείται σε διάφορα είδη (π.χ. ποντίκι, άνθρωπο και αρουραίο) και δεν έχει αναφερθεί ότι εμποδίζει την κυτταρική προσκόλληση.

Επειδή τα αντισώματα παρουσιάζουν φωτοευαισθησία, χρησιμοποιήθηκαν προσεκτικά σε χώρο με χαμηλό φωτισμό

5.5 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται σε μελέτες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. Η τεχνική περιλαμβάνει την ποιοτική και ποσοτική μέτρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα διαφοροποιούνται με βάση το μέγεθος, την εσωτερική πολυπλοκότητα και την έκφραση του επιφανειακού υποδοχέα. Το λέιζερ του οργάνου επιτρέπει την οπτική αξιολόγηση και την αξιολόγηση φθορισμού των επισημασμένων με αντισώματα κυττάρων. Η ένταση του φωτός που εκπέμπεται είναι ανάλογη με τον αριθμό των αντισωμάτων που συνδέονται με τα κύτταρα. Λόγω των διαφορετικών τύπων υποδοχέων στα αιμοπετάλια, μια σειρά από φθορίζοντα αντισώματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επισήμανση.

Οι υποδοχείς που εκφράζονται σε ένα ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο μπορούν να επισημανθούν χρησιμοποιώντας φθορίζοντα συζευγμένα αντισώματα που χρησιμεύουν ως δείκτες ενεργοποίησης (Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD41a-FITC και CD62P-APC) .

Η κυτταρομετρική ανάλυση ροής μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας αιμοπετάλια σε πλήρες αίμα, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (όπως σε αυτή την μελέτη) , ακόμη και σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια πλούσιο σε μικροσωματίδια αιμοπεταλίων (PMPs). Αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές, μπορούν να δένουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο εσωτερικό των κυττάρων. (48).

Πριν από κάθε μέτρηση Κυτταρομετρίας Ροής ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία με διαφορετικές συγκντρώσεις εκχυλισμάτων, αντισσωμάτων και φαινολικών ενώσεων κάθε φορά:

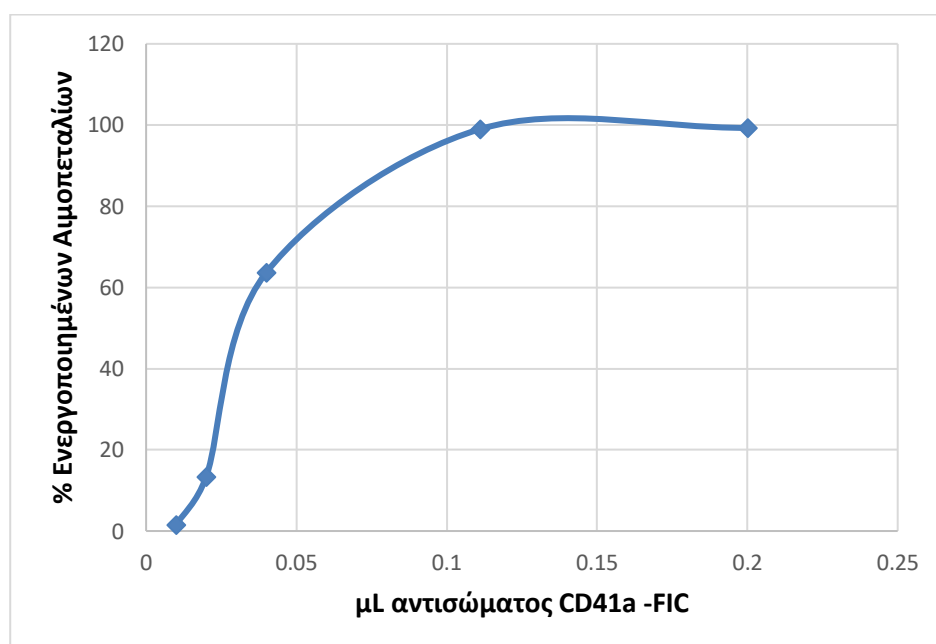
- Ο όγκος αντίδρασης είναι 100 mL
- Αρχικά γίνεται προσθήκη 20mL αραιωμένου PRP και συμπλήρωση με PBS (διαφορετική συγκέντρωση ανάλογη με τα υπόλοιπα συστατικά που ακολουθούν)
- Προσθήκη των διαλυμάτων προς μελέτη (εκχυλίσματα) ή φαινολικών συστατικών (Κερκετίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη , ρεσβερατρόλη) και αναμονή για 5 min
- Προσθήκη συσσωρευτικού παράγοντα (TRAP) και αναμονή 5 min
- Προσθήκη 5 μ L FITC 1/9 και 5 μ L πυκνού (Χωρίς αραιώση) APC και αναμονή 15 min.
- Για τερματισμό της αντίδρασης, μετά το πέρας του χρόνου, προσθέτουμε 500 μ L PBS-formaldehyde 0,2%.
- Συμπλήρωση 20.000 events στην κυτταρομετρία ροής.
- Μετά από κάθε μέτρηση γίνεται πλύσιμο στην κυψελίδα με 80% EtOH και προετοιμασία του επόμενου δείγματος προς μέτρηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΕΥΡΕΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Αρχικός σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης αντισωμάτων CD41a-FITC και CD62P-APC, για χρήση τους στην κυτταρομετρίας ροής. Εξετάστηκαν επομένως διαφορετικές αραιώσεις των αντισωμάτων με σκοπό να βρεθεί η ελάχιστη ποσότητα αντισωμάτων που όμως οδηγεί σε κορεσμό της έκφρασής της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια.

Το αντίσωμα CD41a-FITC προσδένεται με το μόριο CD41 (αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη IIb), και εκφράζεται από τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Προκειμένου να προσδιοριστεί το % των κυττάρων που δεσμεύεται στο συγκεκριμένο αντίσωμα (% ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων), δοκιμάστηκαν οι εξής αραιώσεις στο αντίσωμα CD41a-FITC : $1/100 = 0,01 \mu\text{L}$, $1/50 = 0,02 \mu\text{L}$, $1/25 = 0,04 \mu\text{L}$, $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$ και $1/5 = 0,2 \mu\text{L}$. Από αυτές τις αραιώσεις προέκυψαν τα αντίστοιχα ποσοστά ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων που ήταν 1,6% , 13,4% , 63,7% , 99% και 99,3% . (Εικόνα 12).

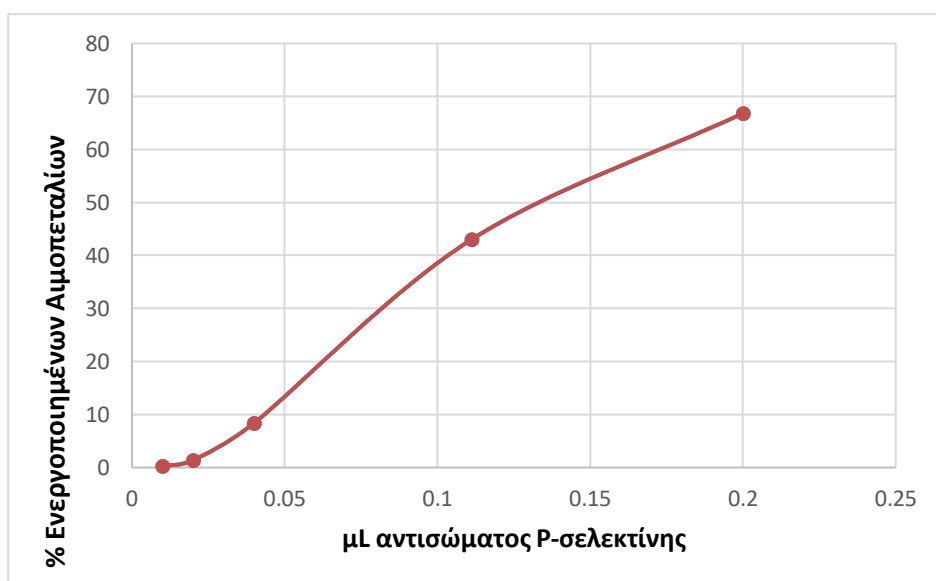


Εικόνα 12. Ποσοστό ενεργών στο αντίσωμα CD41a κυττάρων. % ενεργών κυττάρων σε διαφορετική αραιώση του αντισώματος. Αραιώσεις $1/100 = 0,01 \mu\text{L}$, $1/50 = 0,02 \mu\text{L}$, $1/25 = 0,04 \mu\text{L}$, $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$, $1/5 = 0,2 \mu\text{L}$.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αντισώματος CD41a – FIC , τόσο αυξάνεται και το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων). Στην αραιώση $1/9$ του αντισώματος παρατηρείται ένα μέγιστο ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) και ένας κορεσμός στην αντίδραση (στην αραιώση $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$ αντισώματος CD41a – FIT

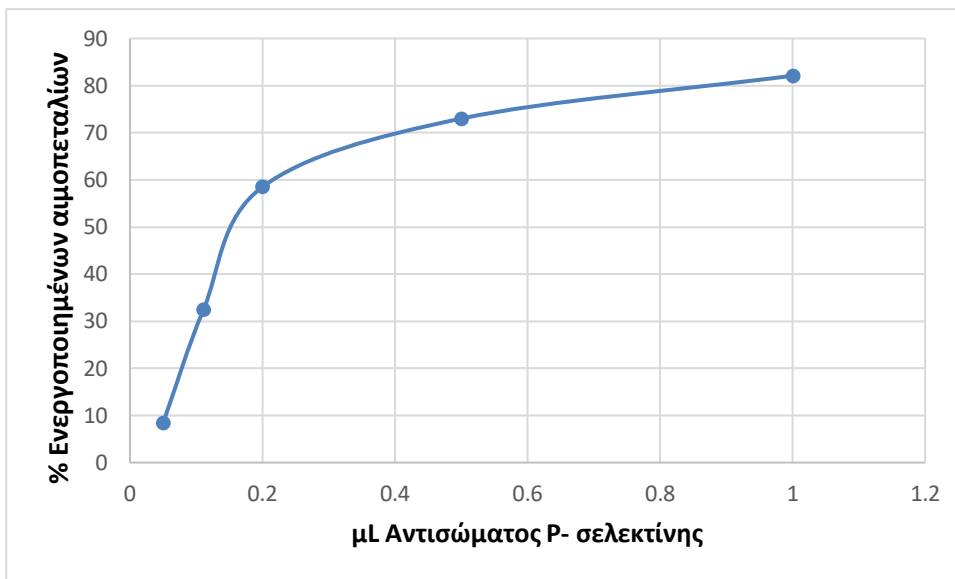
σταματάει η δοσοεξαρτώμενη αύξηση και υπάρχει στασιμότητα στο % ενεργοποιημένων κυττάρων).

Το αντίσωμα CD62P-APC αντιδρά με το CD62P (γνωστό ως P-selectin) και μπορεί να προσκολληθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπεταλία. Προκειμένου να προσδιοριστεί το % των κυττάρων που δεσμεύεται στο συγκεκριμένο αντίσωμα (% ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων), δοκιμάστηκαν οι εξής αραιώσεις στο αντίσωμα CD62P-APC (P – σελεκτίνη) : $1/100 = 0,01 \mu\text{L}$, $1/50 = 0,02 \mu\text{L}$, $1/25 = 0,04 \mu\text{L}$, $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$ και $1/5 = 0,2 \mu\text{L}$. Από αυτές τις αραιώσεις προέκυψαν τα αντίστοιχα ποσοστά ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων που ήταν: 0,3% , 1,4% , 8,4% , 43% και 66,8%. (Εικόνα 13)



Εικόνα 13. Ποσοστό ενεργών στο αντίσωμα P-σελεκτίνης κυττάρων. % Ενεργών κυττάρων σε διαφορετική συγκέντρωση του αντισώματος CD62P-APC(P-σελεκτίνης). Αραιώσεις $1/100 = 0,01 \mu\text{L}$, $1/50 = 0,02 \mu\text{L}$, $1/25 = 0,04 \mu\text{L}$, $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$, $1/5 = 0,2 \mu\text{L}$.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αντισώματος CD62P-APC(P-σελεκτίνης), τόσο αυξάνεται και το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων), σχεδόν γραμμικά, χωρίς να παρατηρείται κάποιος κορεσμός στην αντίδραση. Εξαιτίας αυτής της παρατήρησης, επιχειρήθηκε η αραιώση σε πιο μικρή κλίμακα (Εικόνα 14) προκειμένου να βρεθεί η συγκέντρωση του αντισώματος με το μέγιστο ποσοστό δεσμευμένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) στο αντίσωμα CD62P-APC (P-σελεκτίνης). Οι νέες αραιώσεις που έγιναν ήταν : $1/20 = 0,05 \mu\text{L}$, $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$, $1/5 = 0,2 \mu\text{L}$, $1/2 = 0,5 \mu\text{L}$ και $1 \mu\text{L}$. Από αυτές τις αραιώσεις προέκυψαν τα αντίστοιχα ποσοστά ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων που ήταν: 8,4% , 32,5% , 58,5% , 73% και 82,1% (Εικόνα 14).



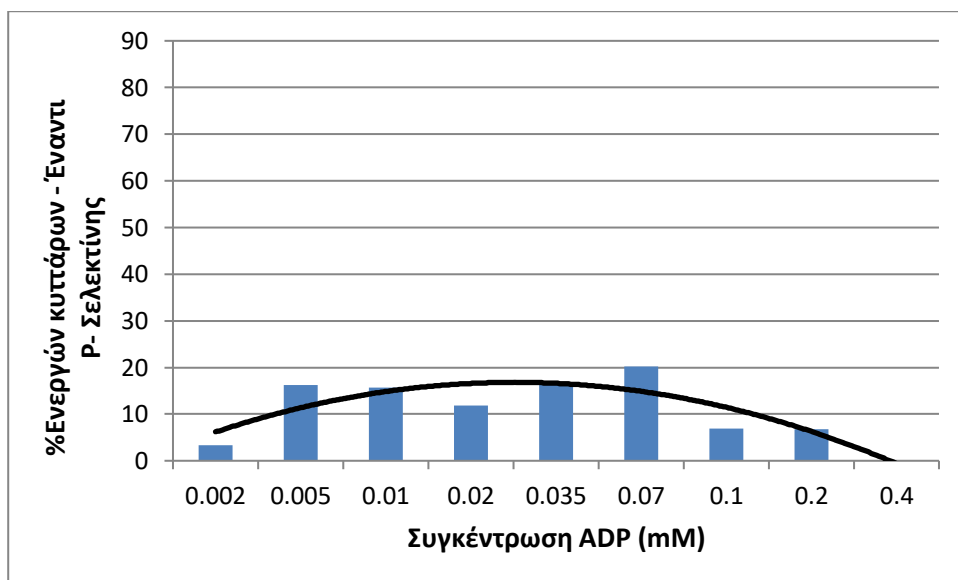
Εικόνα 14 Ποσοστό Ενεργών στο αντίσωμα P-σελεκτίνης κυττάρων. % Ενεργών κυττάρων σε νέες (πιο πυκνές) συγκεντρώσεις του αντισώματος CD62P-APC(P-σελεκτίνης). Αραιώσεις $1/20 = 0,05 \mu\text{L}$, $1/9 = 0,11 \mu\text{L}$, $1/5 = 0,2 \mu\text{L}$, $1/2 = 0,5 \mu\text{L}$, $1 \mu\text{L}$.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αντισώματος CD62P-APC(P-σελεκτίνης), τόσο αυξάνεται και το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων). Εδώ παρατηρήθηκε ότι μέχρι την αραιώση $1/5=0,2 \mu\text{L}$ του αντισώματος, δεν υπήρχε κορεσμός στην αντίδραση. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η πιο πυκνή συγκέντρωση του αντισώματος σε όγκο $1 \mu\text{L}$ (82,1% ενεργοποιημένα αιμοπετάλια).

6.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ P – ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ

Ακολούθησαν πειραματικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό της επίδρασης των συσσωρευτικών παραγόντων (ADP, PAF, κολλαγόνου και TRAP) στην έκφραση της P – Σελεκτίνης με κυτταρομετρία ροής.

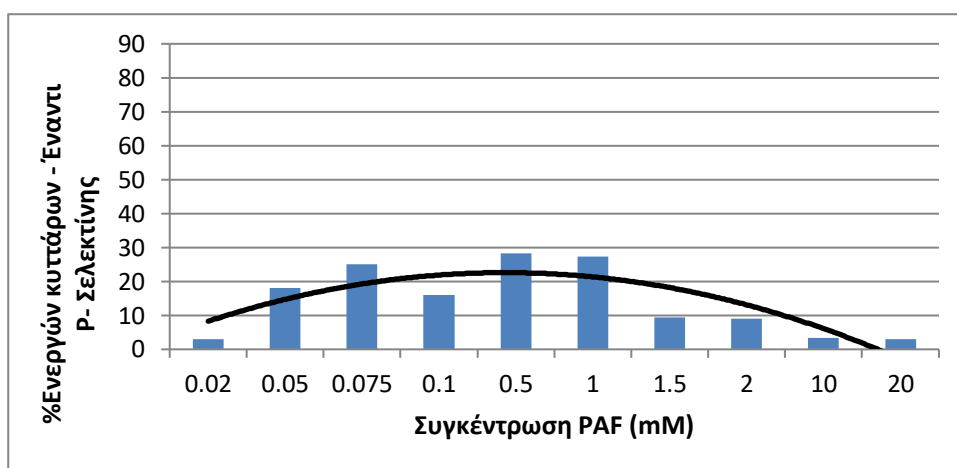
Στον συσσωρευτικό παράγοντα ADP μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις : C1 = 0,002 mM , C2= 0,005 mM, C3 = 0,01 mM, C4 = 0,02 mM, C5= 0,035 mM, C6 = 0,07 mM , C7 = 0,1 mM, C8 = 0,2 mM και C9 = 0,4 mM . Μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκε το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) – Έναντι της P-σελεκτίνης και βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά: 3,3% , 16,3% , 15,7% , 11,9% , 16,4% , 20,2% , 6,88% , 6,8% , 0,1% . (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα ADP. % Ενεργών κυττάρων – Έναντι της P-σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα ADP. Συγκεντρώσεις C1 = 0,002 mM , C2= 0,005 mM, C3 = 0,01 mM, C4 = 0,02 mM, C5= 0,035 mM, C6 = 0,07 mM , C7 = 0,1 mM, C8 = 0,2 mM και C9 = 0,4 mM .

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 15) η καμπύλη παρουσιάζει ένα μικρό ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων και μικρή έκφραση της P – σελεκτίνης έναντι του συσσωρευτικού παράγοντα ADP. Το μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποίησης βρέθηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων (0,005 – 0,07 mM), ωστόσο σε συγκεντρώσεις > 0,07 mM παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της P- σελεκτίνης.

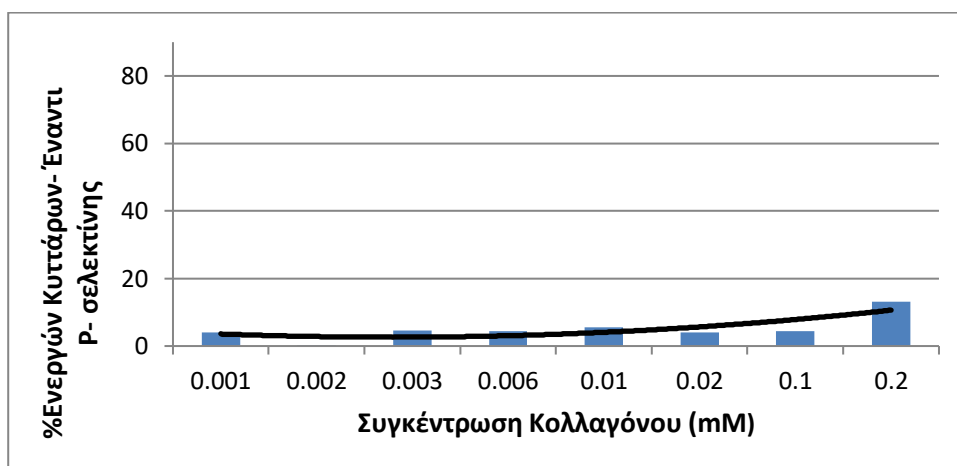
Στον συσσωρευτικό παράγοντα PAF μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις : C1 = 0,02 mM , C2= 0,05 mM, C3 = 0,075 mM, C4 = 0,1 mM, C5= 0,5 mM, C6 = 1 mM , C7 = 1,5 mM, C8 = 2 mM, C9 = 10 mM και C10 = 20 mM. Μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκε το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) – Έναντι της P-σελεκτίνης και βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά: 3% , 18% , 25,1% , 16% , 28,3% , 27,3% , 9,4% , 9,1% , 3,4% και 3% (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα PAF. % Ενεργών κυττάρων – Έναντι της P-σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα PAF. Συγκεντρώσεις C1 = 0,02 mM , C2= 0,05 mM, C3 = 0,075 mM, C4 = 0,1 mM, C5= 0,5 mM, C6 = 1 mM , C7 = 1,5 mM, C8 = 2 mM και C9 = 10 mM και C10 = 20 mM.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 16) η καμπύλη παρουσιάζει ένα μικρό ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων και μικρή έκφραση της P – σελεκτίνης έναντι του συσσωρευτικού παράγοντα PAF . Το μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποίησης βρέθηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων (0,075 – 1 mM), ωστόσο σε συγκεντρώσεις > 1 mM παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της P- σελεκτίνης.

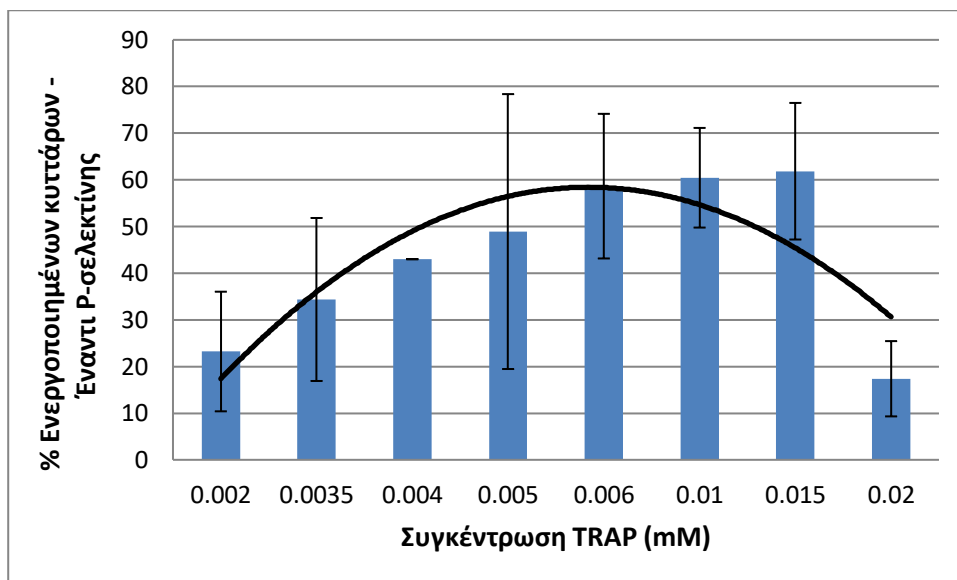
Στον συσσωρευτικό παράγοντα κολλαγόνου μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις : C1 = 0,001 mM , C2= 0,002 mM, C3 = 0,003 mM, C4 = 0,006 mM, C5= 0,01 mM, C6 = 0,02 mM , C7 = 0,1 mM και C8 = 0,2 mM . Μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκε το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) – Έναντι της P-σελεκτίνης και βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά: 4% , 0,2 % , 4,6% , 4,4 % , 5,46 % , 4,1 % , 4,35% , 13,2% . (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα κολλαγόνου. % Ενεργών κυττάρων – Έναντι της P-σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα κολλαγόνου. Συγκεντρώσεις C1 = 0,001 mM , C2= 0,002 mM, C3 = 0,003 Mm, C4 = 0,006 mM, C5= 0,01 mM, C6 = 0,02 mM , C7 = 0,1 mM και C8 = 0,2 mM .

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 17) η καμπύλη παρουσιάζει μια μέγιστη τιμή ποσοστού ενεργών κυττάρων σε C κολλαγόνου = 0,2 mM. Ωστόσο και σε αυτή την συγκέντρωση είναι πολύ μικρό το ποσοστό των ενεργών κυττάρων – έναντι στην P – Σελεκτίνη (% ενεργοποιημένων κυττάρων max = 13,2%).

Στον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP, μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις : C1 = 0,002 mM , C2= 0,0035 mM, C3 = 0,004 Mm, C4 = 0,005 mM, C5= 0,006 mM, C6 = 0,01 mM , C7 = 0,015 mM και C8 = 0,02 mM . Μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκε το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλιών) – Έναντι της P-σελεκτίνης και βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά: 23,2% , 34,3 % , 43% , 48,9 % , 58,6 % , 60,4 % , 61,8% , 17,4% . (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Ποσοστό Ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της έκφρασης της P- Σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP. % Ενεργών κυττάρων – Έναντι της P-σελεκτίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP. Συγκεντρώσεις C1 = 0,002 mM , C2= 0,0035 mM, C3 = 0,004 mM, C4 = 0,005 mM, C5= 0,006 mM, C6 = 0,01 mM , C7 = 0,015 mM και C8 = 0,02 mM.

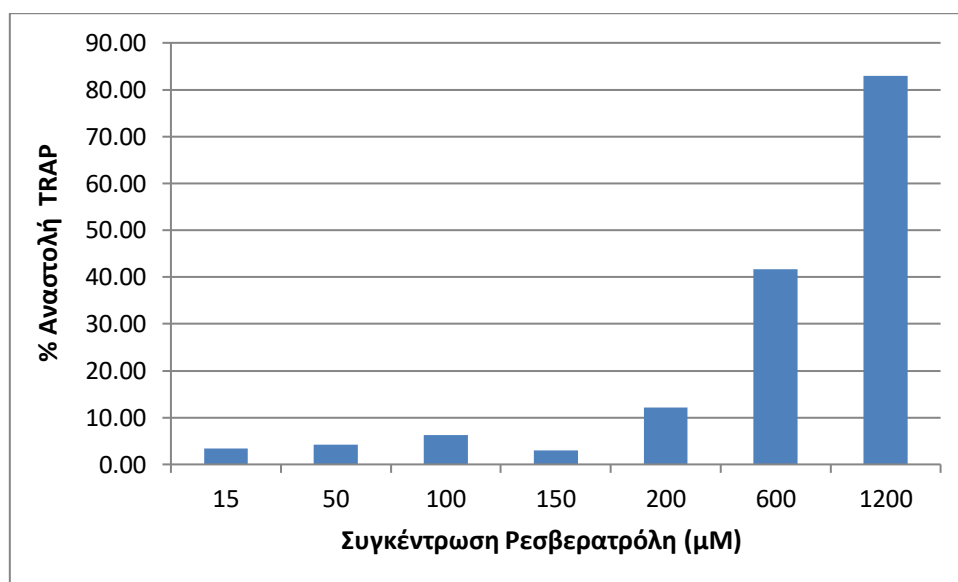
Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 18) η καμπύλη μοιάζει με «Κωδωνοειδή». Παρουσιάζει στις αρχικές συγκεντρώσεις του TRAP (C1 = 0,002 mM έως C3 = 0,004 mM) μικρό ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της P-σελεκτίνης. Το μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποίησης (48,9% - 61,8%) βρέθηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων (C4= 0,005 έως C7 = 0,015 mM), ωστόσο σε συγκεντρώσεις > 0,015 mM παρατηρήθηκε σημαντική και απότομη μείωση στο ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων έναντι της P-σελεκτίνης.

Τα αποτελέσματα των συσσωρευτικών παραγόντων ADP, PAF και κολλαγόνου είναι αποτελέσματα 2 πειραμάτων. Λόγω της μειωμένης έκφρασης αυτών των παραγόντων στην έκφραση της P –σελεκτίνης δεν συνεχίστηκαν οι πειραματικές διαδικασίες με αυτούς τους συσσωρευτικούς παράγοντες. Αντίθετα, ο συσσωρευτικός παράγοντας TRAP χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών καθώς φάνηκε ότι επάγει την έκφραση της P –σελεκτίνης και το ποσοστό των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Η συγκέντρωση του TRAP με το μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) ήταν c= 0,01 mM με 61,8% ενεργοποιημένων κυττάρων. (Εικόνα 18).

6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Ρ-ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ

Ακολούθησαν πειραματικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό της επίδρασης των πρότυπων φαινολικών ενώσεων (Ρεσβερατρόλη, Κατεχίνη, Επικατεχίνη και Κουερσετίνη) στην έκφραση της Ρ-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP, με κυτταριμετρία ροής.

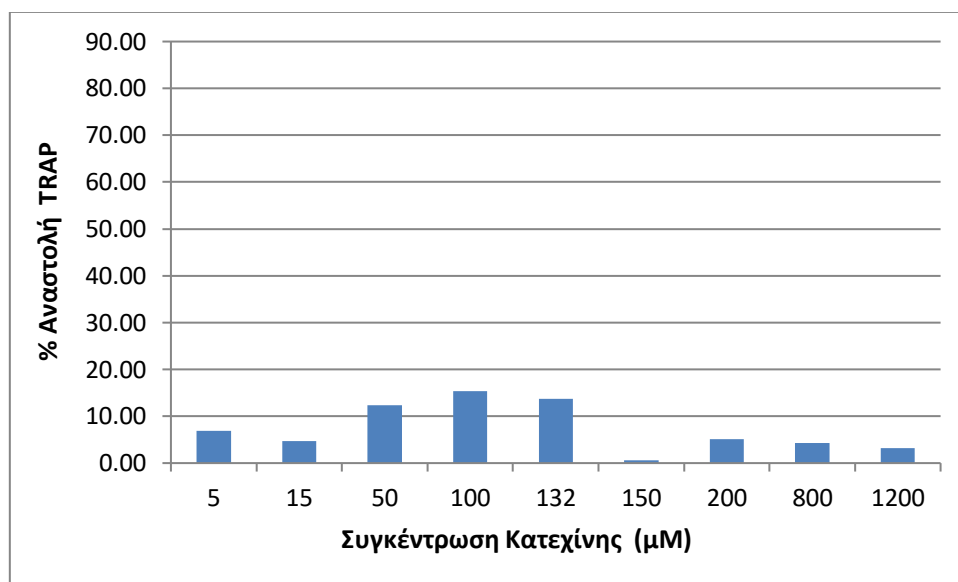
Στην φαινολική ένωση Ρεσβερατρόλη μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: C1 = 15 μ M, C2= 50 μ M, C3=100 μ M, C4 = 150 μ M, C5 = 200 μ M, C6 = 600 μ M, C7= 1200 μ M. Με κυτταρομετρία ροής βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά αναστολής από TRAP έκφρασης της Ρ-Σελεκτίνης : 3,33%, 4,24%, 6,32%, 2,92%, 12,14%, 41,67%, 82,88%. (Εικόνα 19)



Εικόνα 19. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της Ρ – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Ρεσβερατρόλης. Προσδιορισμός της επίδρασης της Ρεσβερατρόλης στην έκφραση της Ρ-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 19) παρατηρείται μια μικρή επίδραση στο ποσοστό αναστολής του TRAP στις συγκεντρώσεις της ρεσβερατρόλης 15 – 200 μ M. Αντίθετα, φαίνεται μια απότομη αύξηση στο ποσοστό αναστολής του TRAP στην συγκέντρωση ρεσβερατρόλης 600 μ M με αναστολή 41,67% και στην συγκέντρωση 1200 μ M με αναστολή 82,88%.

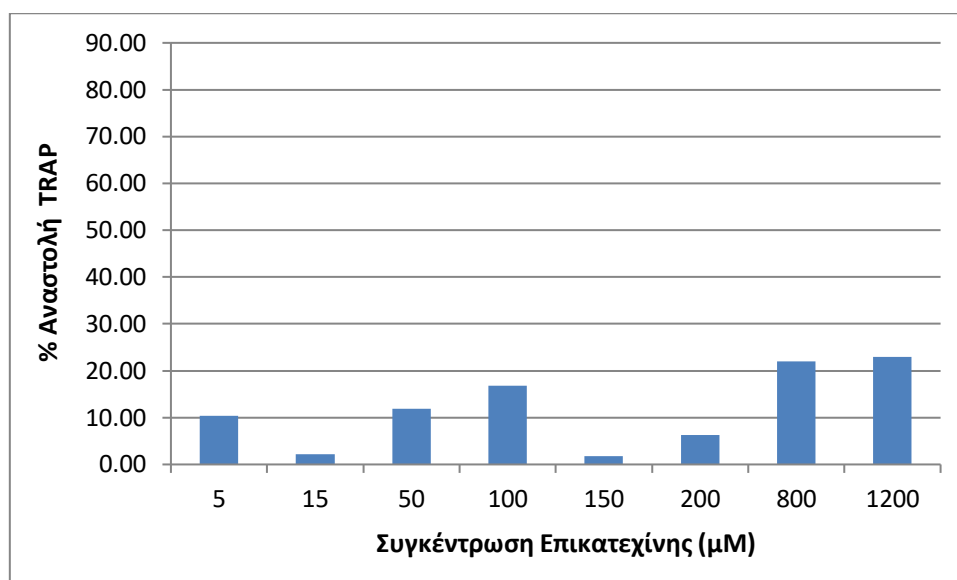
Στην φαινολική ένωση Κατεχίνη μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: C1 = 5 μ M , C2= 15 μ M , C3= 50 μ M , C4 = 100 μ M , C5 = 132 μ M , C6 = 150 μ M , C7= 200 μ M , C8=800 μ M και C9 = 1200 μ M. Με κυτταρομετρία ροής βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά αναστολής από TRAP έκφρασης της P- Σελεκτίνης: 6,85% , 4,70% , 12,41% , 15,40% , 13,72% , 0,61% , 5,12 % , 4,26 % , 3,17% (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Κατεχίνης . Προσδιορισμός της επίδρασης της Κατεχίνης στην έκφραση της P- σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 20) παρατηρείται μια μικρή επίδραση στο ποσοστό αναστολής του TRAP σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις της Κατεχίνης. Ωστόσο παρατηρείται μια μικρή κορύφωση στο ποσοστό αναστολής του TRAP 12,41 – 15,4% στις συγκεντρώσεις 50 – 132 μ M της κατεχίνης με απότομη μείωση ξανά όσο αυξάνεται η συγκέντρωση > 132 μ M κατεχίνης.

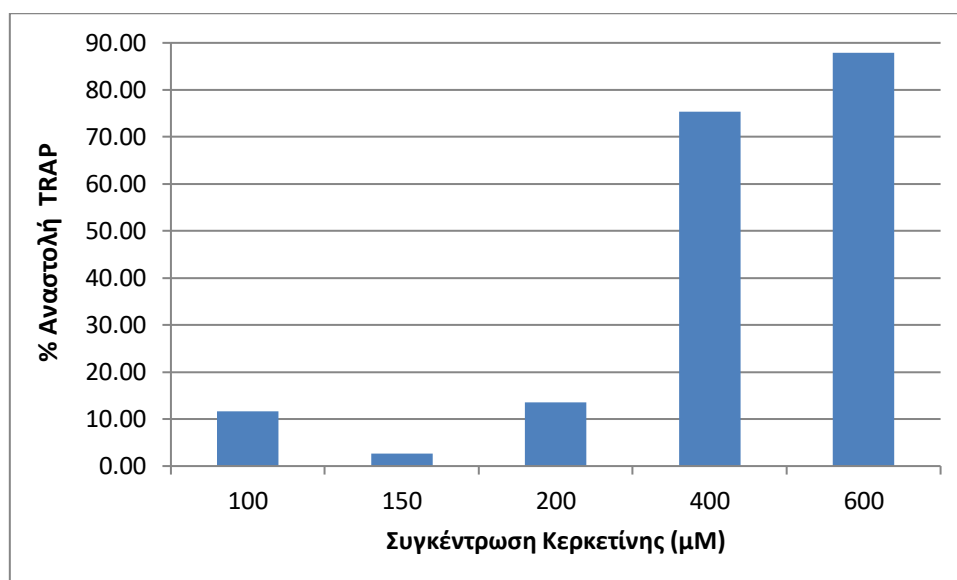
Στην φαινολική ένωση Επικατεχίνη μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: C1 = 5 μ M, C2= 15 μ M, C3= 50 μ M , C4 = 100 μ M , C5 = 150 μ M , C6= 200 μ M , C7=800 μ M και C8 = 1200 μ M. Με κυτταρομετρία ροής βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά αναστολής της επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P- Σελεκτίνης: 10,37% , 2,15% , 11,92% , 16,83% , 1,71% , 6,33% , 22,05 % , 23,02% (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Επικατεχίνης . Προσδιορισμός της επίδρασης της Επικατεχίνης στην έκφραση της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 21) παρατηρείται μια μικρή επίδραση στο ποσοστό αναστολής του TRAP στις συγκεντρώσεις 5-200 μM Επικατεχίνης . Ωστόσο, παρατηρείται μια μεγαλύτερη αύξηση στο ποσοστό αναστολής του TRAP στην συγκεντρώση 800 μM Επικατεχίνης με αναστολή 22,05% και στην συγκέντρωση 1200 μM με αναστολή 23,02%.

Στην φαινολική ένωση Κερκετίνη μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: C1=100 μM , C2= 150 μM , C3= 200 μM , C4= 400 μM , C5 = 600 μM . Με κυτταρομετρία ροής βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά αναστολής στην επογώμενη από TRAP έκφραση της P- Σελεκτίνης: 11,59% , 2,68% , 13,52% , 75,3% , 87,88% (Εικόνα 22).



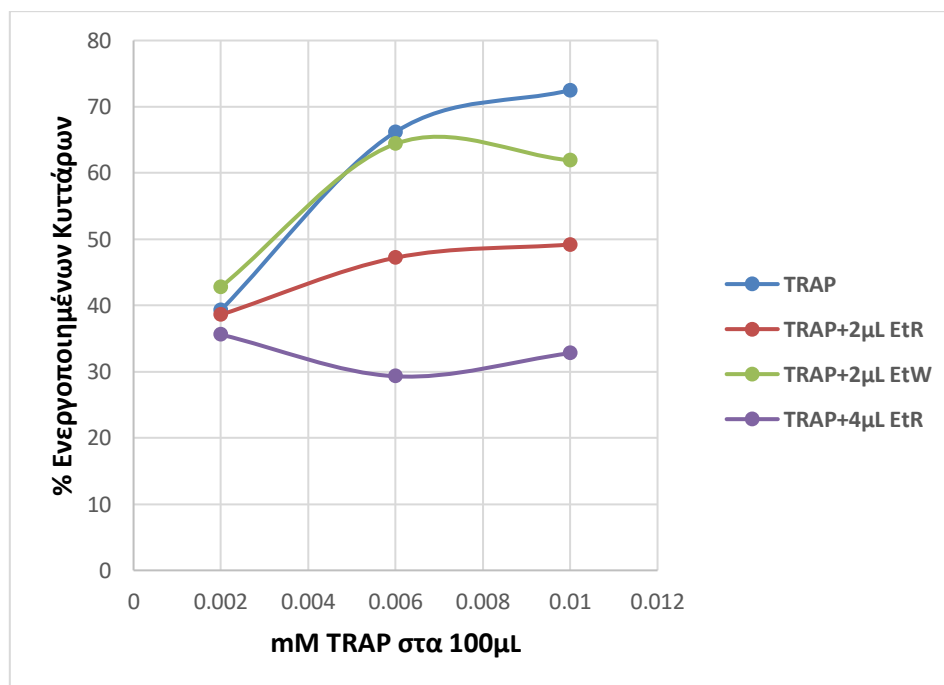
Εικόνα 22. % Αναστολή επαγώμενης από TRAP έκφρασης της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια παρουσία της Κερκετίνης . Προσδιορισμός της επίδρασης της Κερκετίνης στην έκφραση της P- σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 22) παρατηρείται μια μικρή επίδραση στο ποσοστό αναστολής του TRAP στις συγκεντρώσεις της κερκετίνης 100– 200 μM. Αντίθετα φαίνεται μια απότομη αύξηση στο ποσοστό αναστολής του TRAP στην συγκεντρώση Κερκετίνης 400 μM με αναστολή 75,3% και στην συγκέντρωση 600 μM με αναστολή 87,88% .

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα των φαινολικών ενώσεων στην έκφραση της P- σελεκτίνης στα αιμοπετάλια μετά από επώαση με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP προκύπτει αυξημένο ποσοστό αναστολής από την κερκετίνη και την ρεσβερατρόλη με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Δηλαδή όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης (ρεσβερατρόλης και κερκετίνης) στο διάλυμα, τόσο αυξανόταν και η % αναστολή επαγώμενης από τον TRAP έκφραση της P - Σελεκτίνης. Η κατεχίνη εμφάνισε την μεγαλύτερη αναστολή έναντι του TRAP σε συγκεντρώση 600μM (87% αναστολή) και ακολούθησε η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 1200 μM (82,9% αναστολή). Αντίθετα, όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις κατεχίνη και επικατεχίνη έδωσαν πολύ μικρό ποσοστό αναστολής , ενώ και στις δυο δεν υπήρχε δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων και ποσοστού αναστολής έκφρασης της P – Σελεκτίνης.

6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Ρ-ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ.

Πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου σε διάλυμα (τελικού όγκου 100 μL) πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), παρουσία φορμαλεΐδης 0,2% , έγινε επώαση του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) μέσω της έκφρασης της Ρ- Σελεκτίνης (Εικόνα 23). Στη συνέχεια έγινε δοκιμή της επίδρασης των αιθανολικών εκχυλισμάτων, κόκκινων στελεχών (EtR) σε όγκο 2 μL EtR και όγκο 4 μL EtR και δοκιμή της επίδρασης των αιθανολικών εκχυλισμάτων λευκών στελεχών (EtW) με 2 μL EtW, στο ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων μέσω της έκφρασης της Ρ – Σελεκτίνης, επαγόμενης από τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP. (Εικόνα 23)



Εικόνα 23. % Ενεργοποιημένων Κυττάρων μέσω της έκφρασης της Ρ – σελεκτίνης επαγόμενης από διαφορετικές συγκεντρώσεις του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP. Έγινε δοκιμή , μετά από επώαση αιθανολικών εκχυλισμάτων κόκκινων (EtR) και λευκών (EtW) στελεχών σταφυλιών, της επίδρασης των αιθανολικών εκχυλισμάτων στην δράση του TRAP και της επαγόμενης από αυτόν έκφρασης της Ρ – σελεκτίνης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, η πρώτη δοκιμή έγινε με επώαση του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις : C1 = 0,002 mM , C2= 0,006 mM , C3 = 0,01 mM. Μέσω κυτταρομετρίας ροής, μετρήθηκε το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) – έναντι της P-σελεκτίνης και βρέθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά: 39,3% , 66,2% και 72,5%. Φαίνεται δηλαδή, όπως είδαμε και σε προηγούμενα αποτελέσματα (Εικόνα 18) ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP τόσο αυξάνεται και το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) μέσω της έκφρασης της P- σελεκτίνης. Μέγιστο ποσοστό ενεργοποίησης φάνηκε στην συγκέντρωση TRAP 0,01 mM με 72,5% ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου σε διάλυμα (τελικού όγκου 100 μ L) πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), παρουσία φορμαλεΐδης 0,2% , έγινε επώαση αιθανολικού εκχυλίσματος κόκκινων στελεχών σταφυλλιών (EtR) με όγκο 2 μ L (C= 0,4 mM). Στην συνέχεια προστέθηκε ο συσσωρευτικός παράγοντας TRAP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (C1 = 0,002 mM , C2= 0,006 mM , C3 = 0,01 mM) και υπολογίστηκε , μέσω κυτταρομετρίας ροής, η επίδραση του κόκκινου εκχυλίσματος (EtR) στην επαγόμενη από TRAP έκφραση της P – Σελεκτίνης. Τα ποσοστά ενεργοποιημένων κυττάρων βρέθηκαν αντίστοιχα 38,6% , 47,2% και 49,2%. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, η προσθήκη 2 μ L EtR μείωσε το ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων από 39,3% (απουσία εκχυλίσματος) σε 38,6% (παρουσία 2 μ L EtR) , το ποσοστό 66,2% (απουσία εκχυλίσματος) σε 47,2 % (παρουσία 2 μ L EtR) και από 72,5% (απουσία εκχυλίσματος) σε 49,2% (παρουσία 2 μ L EtR).

Στη συνέχεια σε διάλυμα (τελικού όγκου 100 μ L) πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), παρουσία φορμαλεΐδης 0,2% , έγινε επώαση αιθανολικού εκχυλίσματος λευκών στελεχών σταφυλλιών (EtW) με όγκο 2 μ L (C= 0,4 mM). Στην συνέχεια προστέθηκε ο συσσωρευτικός παράγοντας TRAP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (C1 = 0,002 mM , C2= 0,006 mM , C3 = 0,01 mM) και υπολογίστηκε , μέσω κυτταρομετρίας ροής, η επίδραση του λευκού εκχυλίσματος (EtW) στην επαγόμενη από TRAP έκφραση της P – Σελεκτίνης. Τα ποσοστά ενεργοποιημένων κυττάρων βρέθηκαν αντίστοιχα 42,8% , 64,4% και 61,9% . Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, η προσθήκη 2 μ L EtW δεν φάνηκε να επιδρά στην επαγόμενη από τον TRAP έκφραση της P – σελεκτίνης και δεν εμφάνισε μείωση στο ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων μέχρι την συγκέντρωση 0,006 mM TRAP. Μια μικρή επίδραση εμφανίστηκε στην συγκέντρωση 0,01 Mm TRAP όπου το ποσοστό των ενεργοποιημένων κυττάρων μεταβλήθηκε από 72,5% (απουσία εκχυλίσματος) σε 61,9 % (Παρουσία 2 μ L εκχυλίσματος EtW) .

Μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων (ίδιου όγκου 2 mL) φάνηκε ότι το EtR προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση στην επαγόμενη από τον TRAP έκφραση της P – σελεκτίνης έναντι του EtW. Με ποσοστά αναστολής 32,14% (Αναστολή TRAP απο EtR) έναντι 14,62% (αναστολή TRAP από EtW). Φάνηκε λοιπόν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα EtR εμφάνισε διπλάσια αναστολή του TRAP έναντι του εκχυλίσματος EtW.

Λόγω αυτού του ευρήματος, ακολούθησε επώαση μεγαλύτερου όγκου 4 μ L EtR σε διάλυμα (τελικού όγκου 100 μ L) πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), παρουσία φορμαλεΐδης 0,2. Στην συνέχεια προστέθηκε ο συσσωρευτικός παράγοντας TRAP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ($C_1 = 0,002$ mM , $C_2 = 0,006$ mM , $C_3 = 0,01$ mM) και υπολογίστηκε , μέσω κυτταρομετρίας ροής, η επίδραση του κόκκινου εκχυλίσματος (EtR) στην επαγόμενη από TRAP έκφραση της P – Σελεκτίνης. Τα ποσοστά ενεργοποιημένων κυττάρων βρέθηκαν αντίστοιχα 35,6% , 29,3% και 32,8% . Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με διπλάσιο όγκο 4 μ L EtR έναντι 2 μ L σε ίδια συγκέντρωση 0,006 mM TRAP , η αναστολή στην έκφραση της P-Σελεκτίνης είναι διπλάσια με αντίστοιχα ποσοστά αναστολής 55,74% (στα 4 μ L EtR) έναντι 28,7% (στα 2 μ L EtR) . Σε συγκέντρωση 0,01 mM TRAP τα ποσοστά αναστολής της έκφρασης της P – σελεκτίνης είναι 54,76% (στα 4 μ L EtR) έναντι 32,14% (στα 2 μ L EtR).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι το αιθανολικό εκχύλισμα στελεχών κόκκινων ποικιλιών σταφυλλιού εμφανίζει μεγαλύτερη αναστολή (σε όγκο 4 μ L) στην επαγόμενη από τον TRAP έκφραση της P-σελεκτίνης με μέγιστη αναστολή 55,76% , σε συγκέντρωση TRAP 0,006 mM .

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι καρδιακές παθήσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες και περίπου το 50% όλων των θανάτων που σχετίζονται με κακοήγη νεοπλάσματα οφείλονται σε θρομβωτικά επεισόδια. Η βλάβη και η εξαγγείωση του αίματος από το αγγειακό κυκλοφορικό σύστημα συμβαίνει συνήθως σε όλη τη διάρκεια της ζωής (8). Καθώς ο μηχανισμός που προσδιορίζει την καρδιαγγειακή νόσο οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αθηροθρόμβωση, όπου κεντρικό ρόλο παίζει η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι δίαιτες με προστατευτικά αποτελέσματα έναντι της καρδιαγγειακής νόσου ασκούν αντι-αθηροθρομβωτική δράση μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν αρκετές μελέτες, οι οποίες διερεύνησαν εάν μεμονωμένα θρεπτικά συστατικά από δίαιτες που αναγνωρίζονται ότι έχουν καρδιαγγειακή προστασία μπορεί να ασκούν αντιθρομβωτική δράση. (51)

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού με την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD). Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, εκείνες οι περιοχές με υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού και μεσογειακή διατροφή εμφανίζουν χαμηλό επιπολασμό καρδιαγγειακής νόσου (32). Πολλές επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση 20-30 gr αλκοόλ την ημέρα σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα, καρδιακή προσβολή καθώς και θνησιμότητα που σχετίζεται με αυτές τις ασθένειες (52).

Από την εισαγωγή του «γαλλικού παραδόξου» το 1992, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η προστατευτική δράση του κρασιού σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά σε διαφορετικές οδούς της παθογένεσης της αθηροσκλήρωσης αποδίδεται όχι μόνο στην περιεκτικότητά του σε αλκοόλ, αλλά και στα μικροσυστατικά του, τα οποία ασκούν ισχυρά αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση (52).

Πρωτεΐνες και λιπιδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής που παράγονται επίσης από εξασθενημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και από ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, προκαλούν δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μεταξύ των λιπιδικών φλεγμονωδών μεσολαβητών, ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια συμμετέχουν στην έναρξη και παράταση της αθηροσκλήρωσης (53), (54). Επιπλέον, οι επιδράσεις που προκαλούνται από την κυτοκίνη παίζουν κρίσιμο ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες και στην αθηροσκλήρωση. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF α) και οι σηματοδοτικές οδοί της ιντερλευκίνης 1 β (IL-1 β) επηρεάζουν σχεδόν όλα τα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηρογένεση προάγοντας την έκφραση των κυτοκινών και των μορίων προσκόλλησης, καθώς και τη μετανάστευση και τη μιτογένεση των αγγειακών λείων μυών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η IL-1 β είναι ένας ισχυρός αγωνιστής του μεταβολισμού

του PAF. Τα βιοσυνθετικά ένζυμα και τα ένζυμα αποικοδόμησης του PAF μπορούν να διαμορφωθούν από την IL-1β με έναν συγκεκριμένο χρόνο (52).

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα εκχυλίσματα κρασιού αναστέλλουν την *invitro* επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων και μειώνουν τη δραστηριότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων PAF στα μονοκύτταρα U937 (κύτταρα μονοβλαστικής λευχαιμίας) (55), (56), (57), (58), (59). Μεταξύ άλλων προφλεγμονωδών δράσεων, ο PAF θα μπορούσε να ενεργοποιήσει το φλεγμονώδες σώμα, με αποτέλεσμα την ωρίμανση της IL-1β και να συνεργαστεί με τον TNFα στη φλεγμονώδη απόκριση (52). Άλλοι ερευνητές ανέφεραν επίσης ότι τα εκχυλίσματα κρασιού ρυθμίζουν προς τα κάτω την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1, μόριο προσκόλλησης αγγείων κυττάρων-1/VCAM-1), E-σελεκτίνη, καθώς και χημειοελκυστική πρωτεΐνη μονοκυττάρου-1 (MCP- 1) (60) και αναστέλλουν την έκκριση και τη γονιδιακή έκφραση της IL-1β σε μακροφάγα (54).

Μια κλινική μελέτη (52) εξέτασε εάν η τακτική ελαφρύα έως μέτρια κατανάλωση κρασιού από ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) να εκκρίνουν IL-1β και TNFα υπό βασικές και φλεγμονώδεις συνθήκες καθώς και τα επίπεδα των διαλυτών φλεγμονωδών βιοδεικτών σε σύγκριση με αυτά που προκαλούνται από την πρόσληψη αλκοόλ χωρίς την παρουσία μικροσυστατικών του κρασιού. Εβδομήντα ένας άνδρες ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο επιστρατεύτηκαν αρχικά για να συμμετάσχουν στη μελέτη. Τελικά 64 πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης. Όλοι οι εθελοντές ακολούθησαν μια περίοδο 15 ημερών, απέχοντας από το αλκοόλ. Χωρίστηκαν τυχαία σε μία από τις τρεις ομάδες παρέμβασης. Τα άτομα έλαβαν οδηγίες να ακολουθήσουν τη συνήθη δίαιτά τους και να μην αλλάξουν το φάρμακό τους κατά τη διάρκεια της μελέτης. Στην ομάδα Α (ομάδα ελέγχου), οι συμμετέχοντες δεν κατανάλωναν αλκοόλ, στην ομάδα Β (ομάδα αιθανόλης) οι συμμετέχοντες κατανάλωναν 69 mL τσίπουρο με 38% αλκοόλ και οι συμμετέχοντες στην ομάδα Γ κατανάλωσαν 200 ml κόκκινο κρασί (Cabernet Sauvignon 13,5% αλκοόλ vol.). Η αιθανόλη που καταναλώθηκε στις δύο τελευταίες ομάδες ήταν ίση με 27 gr αιθανόλης την ημέρα και μαζί με το γεύμα καταναλώθηκε αλκοολούχο ποτό. Τα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος που απομονώθηκαν από ασθενείς επώαστηκαν υπό βασικές και φλεγμονώδεις συνθήκες για 4 και 24 ώρες και μετρήθηκε η έκκριση της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNFα). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων πριν από την έναρξη ή κατά τη διάρκεια της παρέμβασης στους πιο διαλυτούς βιοδείκτες. Υψηλότερη έκκριση TNFα από μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος παρατηρήθηκε σε βασικές συνθήκες στην ομάδα αιθανόλης τόσο στις 4 όσο και στις 24 ώρες της επώασης σε σχέση με την έκκριση της γραμμής αναφοράς. Επιπλέον, χαμηλότερη έκκριση του

TNFα παρατηρήθηκε μετά από 8 εβδομάδες λήψης ομάδα κρασιού έναντι της ομάδας αιθανόλης, τόσο στις 4 όσο και στις 24 ώρες της επώασης. Συμπερασματικά, η ελαφριά έως μέτρια καθημερινή κατανάλωση κρασιού για 8 εβδομάδες δεν έχει καμία αρνητική επίδραση στους βασικούς μεταβολικούς δείκτες σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα ή καμία ευεργετική επίδραση στους φλεγμονώδεις μεσολαβητές διαλυτών πρωτεϊνών. Ωστόσο, αποκαλύφθηκε ότι τα μικροσυστατικά του κρασιού μπορεί να μειώσουν την επίδραση της αιθανόλης στην έκκριση κυτοκίνης σε βασικές συνθήκες από τα PBMC των ασθενών.

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν επίσης *in vivo* σε μια μεταγευματική κλινική δοκιμή, όπου η κατανάλωση κρασιού μαζί με ένα τυποποιημένο γεύμα μείωσε το επίπεδο IL-6, βελτίωσε την επαγόμενη από το PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων και μείωσε τη δραστηριότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων PAF σε σύγκριση με την αιθανόλη ή νερό που υποδηλώνει ότι η καρδιοπροστατευτική δράση αποδίδεται στα μικροσυστατικά του κρασιού (61). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν σθεναρά ότι τα μικροσυστατικά του κρασιού θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων και τις φλεγμονώδεις διεργασίες μέσω του μεταβολισμού του PAF και των οδών σηματοδότησης (52).

Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κατανάλωση κρασιού δεν μπορεί να γίνει σε υπερβολικό βαθμό, δεδομένου ότι η παρουσία αιθανόλης είναι περιοριστικός παράγοντας. Επιπλέον, η διαδικασία απομόνωσης αυτών των ευεργετικών μικροσυστατικών του κρασιού χαρακτηρίζεται ως οικονομικά ασύμφορη. Έτσι οι μελέτες έχουν στραφεί στην μελέτη των υποπροϊόντων οινοποίησης με σκοπό να βρεθεί το πιο ισχυρό εκχύλισμα με αντιαιμοπεταλιακή δράση και να χαρακτηριστεί η χημική του σύσταση. Σε μια τέτοια μελέτη (34) εξετάστηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση των εκχυλισμάτων οινοποιητικών παραπροϊόντων. Για το σκοπό αυτό, εκχυλίστηκε πυρηνέλαιο από τέσσερις ερυθρές ποικιλίες με τέσσερις διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. Η περιεκτικότητα σε φαινολικά εκχυλίσματα, η αντιοξειδωτική ικανότητα και η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων έναντι των PAF, ADP, TRAP προσδιορίστηκαν με συσσωματομετρία μετάδοσης φωτός. Το αιθανολικό εκχύλισμα αναλύθηκε περαιτέρω σχετικά με την αντι-αιμοπεταλιακή του δράση και τη χημική του σύνθεση. Τα εκχυλίσματα αιθανολικής και υδατικής φάσης Bligh–Dyer έδειξαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις/ανθοκυανίνη και την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, η πιο ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αποκαλύφθηκε από τα εκχυλίσματα αιθανόλης, ακολουθούμενα από τα εκχυλίσματα λιποειδής φάσης Bligh–Dyer. Αιθανολικό εκχύλισμα, που βρέθηκε ότι περιέχει μικροσυστατικά όπως φωσφο-ενώσεις, φαινολικές ενώσεις και λιπαρά οξέα. Οι πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις ήταν η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η κερκετίνη και τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα ήταν το λινολεϊκό οξύ (C18:2n6), το λινολενικό οξύ (C18:3n3) και το παλμιτικό οξύ (C16:0). Το

αιθανολικό εκχύλισμα ήταν ικανό να αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων αγωνιστών και φαίνεται επίσης ότι η δράση του διατηρείται όταν χρησιμοποιήθηκαν αιμοπετάλια από ασθενή με στεφανιαία νόσο. Το αιθανολικό εκχύλισμα υποπροϊόντων οινοποιίας ασκεί ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση και η αξιοποίησή του θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (34).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών εκχυλισμάτων στεμφύλων λευκών (EtW, Ethanol Total White) και κόκκινων ποικυλίων (EtR, Ethanol Total Red), καθώς και πρότυπων φαινολικών ενώσεων (κερκετίνη, κατεχίνη, ρεσβερατρόλη, επικατεχίνη) στην έκφραση της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια με την χρήση συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP, TRAP και κολλαγόνου με κυτταρομετρίας ροής.

Τα αποτελέσματα των συσσωρευτικών παραγόντων ADP, PAF και κολλαγόνου έδειξαν μειωμένη έκφραση της P – σελεκτίνης και έτσι οι πειραματικές διαδικασίες συνεχίστηκαν μόνο με τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP, ο οποίος φάνηκε ότι επάγει πιο ισχυρά την έκφραση της P – σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η συγκέντρωση του TRAP με το μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων (αιμοπεταλίων) ήταν 0,01 mM με 61,8% ενεργοποιημένων κυττάρων.

Η επίδραση του TRAP στην έκφραση της P- σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων είχε βρεθεί και σε άλλη παρόμοια μελέτη που είχε στόχο να καθορίσει και να συγκρίνει την επίδραση εκχυλίσματος κουκουτσιών σταφυλιού (GSE) (σε τελική δόση 0,625–50 µg/ml) και της ρεσβερατρόλης σε διάφορα στάδια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Σε αυτή την μελέτη φάνηκε, εκτός των άλλων, ότι η επιφανειακή έκφραση της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια του αίματος διεγείρεται από το TRAP και τη θρομβίνη (49).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων (Ρεσβερατρόλη, Κατεχίνη, Επικατεχίνη και Κερκετίνη) στην επαγόμενη από TRAP έκφραση της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια με κυτταρομετρία ροής. Προέκυψε αυξημένο ποσοστό αναστολής της δράσης του TRAP από την κερκετίνη και την ρεσβερατρόλη με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Δηλαδή όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης (ρεσβερατρόλης και κερκετίνης) στο διάλυμα, τόσο αυξανόταν και η % αναστολή της επαγόμενης από τον TRAP έκφραση της P – Σελεκτίνης. Η κερκετίνη εμφάνισε την μεγαλύτερη αναστολή έναντι του TRAP σε συγκεντρώση 600µM (87% αναστολή) και ακολούθησε η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 1200 µM (82,9% αναστολή). Αντίθετα, όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις κατεχίνη και επικατεχίνη έδωσαν πολύ μικρό ποσοστό αναστολής.

Σε προηγούμενες μελέτες είχε βρεθεί ότι η κερκετίνη αναστέλλει την δράση του ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) και την *in vitro* επαγόμενη συσσώρευση πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων και ενισχύει τις αντισυσσωρευτικές ιδιότητες της προστακυκλίνης (62). Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να αναστέλλει την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων. (55). Επίσης από άλλη μελέτη φαίνεται ότι η ρεσβερατρόλη (1,25 – 50 mg/ml) αναστέλλει την έκφραση της P- σελεκτίνης και τον σχηματισμό μικροσωματιδίων που προκαλείται από τον TRAP (20 μ M) και την θρομβίνη (0,1 U/ml) (63).

Τέλος, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση των αιθανολικών εκχυλισμάτων, κόκκινων στελεχών (EtR) και λευκών στελεχών (EtW), στην επαγόμενη από τον συσσωρευτικό παράγοντα TRAP έκφραση της P-Σελεκτίνης. Μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων φάνηκε ότι το EtR προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση στην επαγόμενη από τον TRAP έκφραση της P-σελεκτίνης έναντι του EtW. Με ποσοστά αναστολής 32,14% (Αναστολή TRAP από EtR) έναντι 14,62% (αναστολή TRAP από EtW). Φάνηκε λοιπόν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα EtR εμφάνισε διπλάσια αναστολή του TRAP έναντι του εκχυλίσματος EtW. Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι η δράση του EtR είναι δοσο-εξαρτώμενη αφού διπλάσια ποσότητα οδήγησε σε σχεδόν διπλάσια αναστολή στην έκφραση της P-Σελεκτίνης αντίστοιχα ποσοστά αναστολής 55,7% έναντι 28,7%.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα εργασία εκπονήθηκε εντός του χρονικού διαστήματος της Πανδημίας του COVID -19 με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία στις αιμοληψίες αλλά και στην μεταφορά στο πανεπιστήμιο. Λόγω αυτών των δυσκολιών, έγινε μικρός αριθμός πειραμάτων αλλά και επαναλήψεων στις αναλύσεις.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα μελέτη φάνηκε ότι ο συσσωρευτικός παράγοντας TRAP επάγει την έκφραση της P – σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων πιο ισχυρά σε σχέση με τους συσσωρευτικούς παράγοντες ADP, PAF και κολλαγόνο. Αυτή η επαγόμενη από τον TRAP έκφραση της P-σελεκτίνης φάνηκε να αναστέλεται πιο ισχυρά από τις φαινολικές ενώσεις κερκετίνη και ρεσβερατρόλη σε σχέση με την κατεχίνη και την επικατεχίνη. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποίησης ανέστειλαν την επαγόμενη από TRAP έκφραση της P-σελεκτίνης και μάλιστα το αιθανολικό εκχύλισμα από τις κόκκινες ποικιλίες σταφυλιού φάνηκε να είναι πιο δραστικό.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα μικρο-συστατικά που υπάρχουν στο υδατοαιθανολικό εκχύλισμα υποπροϊόντων οινοποίησης μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία των αιμοπεταλίων εν μέρη μέσω μείωσης της έκφραση της P-σελεκτίνης.

Βιβλιογραφία

1. **Holinstat, Michael.** Normal platelet function. *HHS Public Access*. 1 Dec 2017 , σσ. 195–198.
2. **Juan C. Zapata, Dermot Cox , Maria S. Salvato.** The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. June 2014.
3. **Williams, Olivia Sergeant., Shane R.** *Histology, Platelets*. s.l. : StatPearls, 2020.
4. **Jose Rivera, María Luisa Lozano, Leyre Navarro-Núñez, Vicente Vicente.** Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. May 2009.
5. **Samantha J. Montague, 1 Yean J. Lim,1,2 Woei M. Lee,1,2 and Elizabeth E. Gardiner1.** Imaging Platelet Processes and Function—Current and Emerging Approaches for Imaging in vitro and in vivo. 31 Jan 2020.
6. **Garmo, Cyrus Bajwa, Tanvir Burns, Bracken.** *Physiology, Clotting Mechanism*. s.l. : StatPearls, 2020.
7. **Joachim Pircher, Bernd Engelmann, Steffen Massberg, Christian Schulz.** Platelet–Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thieme* . 2019, σσ. 1274-1282.
8. **Milka Koupenova, Beate E. Kehrel, Heather A. Corkrey, Jane E. Freedman.** Thrombosis and platelets: an update. *European Heart Journal*. 14 March 2017,, σσ. 785–791.
9. **Hoylaerts, Alexandre Kauskot and Marc F.** Platelet Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology* . August 2012, σσ. 23-57.
10. **Giovanni Davì, and Carlo Patrono.** Platelet Activation and Atherothrombosis. *new england journal of medicine*. 13 December 2007.
11. **Patrono, Giovanni Davì and Carlo.** Platelet Activation and Atherothrombosis. *The new england journal of medicine*. December 2007.
12. **Vasiliki D. Papakonstantinou, Nefeli Lagopati, Effie C. Tsilibary, Constantinos A. Demopoulos and Athanassios I. Philippopoulos.** A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New Class of Potent Metal-Based Anti-Inflammatory Drugs Induce Anticancer Properties? *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 28 Mar 2017.
13. **Constantinos A. Demopoulos, Haralabos C. Karantonis, Smaragdi Antonopoulou.** Platelet activating factor — a molecular link between atherosclerosis theories. 06 November 2003.
14. **Dane Rucker, Amit S. Dhamoon.** *Physiology, Thromboxane A2*. 14 Sep 2021.
15. **William Rasican Surin, Manoj Kumar Barthwal, Madhu Dikshit.** Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *THROMBOSIS RESEARCH*. Jan 2018.
16. **Peter Kraft, Simon F De Meyer and Christoph Kleinschnitz.** Next-generation antithrombotics in ischemic stroke: preclinical perspective on 'bleeding-free antithrombosis'. *J Cereb Blood Flow Metab*. Oct 2012.
17. **Offermanns, Nina Wettschureck and Stefan.** Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *American Physiological Society*. Oct 2005.

18. **Claudia Schoenichen, Christoph Bode, Daniel Duerschmied.** Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. *BRI*. January 2019.
19. **Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.** Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 1. *Hamostaseologie*. 2018, σσ. 203-210.
20. **Patricia Marchio, Sol Guerra-Ojeda, José M. Vila, Martín Aldasoro, Victor M. Victo and Maria D. Mauriciocorres.** Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. Jul 2019.
21. **Elizabeth Fragopoulou, Filio Petsini ,Maria Choleva ,Maria Detopoulou ,Olga S.Arvaniti ,Eftyhia Kallinikou,Eleni Sakantani ,Ageliki Tsolou,Tzortzis Nomikos and Yiannis Samaras.** Evaluation of Anti-Inflammatory, Anti-Platelet and Anti-Oxidant Activity of Wine Extracts Prepared from Ten Different Grape Varieties. *Molecules*. 29 September 2020.
22. **James D. McFadyen, Mathieu Schaff & Karlheinz Peter.** Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nature Reviews Cardiology volume* . 03 January 2018, σσ. 181–191 .
23. **Xiaohong Ruby Xu, Naadiya Carrim, Miguel Antonio Dias Neves, Thomas McKeown, Tyler W. Stratton, Rodrigo Matos Pinto Coelho, Xi Lei, Pingguo Chen, Jianhua Xu, Xiangrong Dai, Benjamin Xiaoyi Li & Heyu Ni.** Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thrombosis Journal*. 04 Ock 2016.
24. **Gaetano G, Castelnovo A, Rotondo S, Iacoviello L.** A meta-analysis of studies on wine and beer and cardiovascular disease. *Europe PMC*. 2002.
25. **Eric B Rimm, Paige Williams, Kerry Fosher, Michael Criqui and Meir J Stampfer.** Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *the bmj*. 1999.
26. **Susan E Brien, Paul E Ronksley, Barbara J Turner, Kenneth J Mukamal and William A Ghali.** Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *the bmj*. 22 Feb 2011.
27. **Fernández-Solà, Joaquim.** Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nature Reviews Cardiology* . JUNE 2015.
28. **Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou.** The French paradox three decades later: Role of inflammation and thrombosis. *Elsevier B.V*. November 2020, σσ. 160-169.
29. **Simona Costanzo, Augusto Di Castelnovo, Maria Benedetta Donati, Licia Iacoviello & Giovanni de Gaetano.** Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *Springer Link* . 2011, σσ. 833 - 850 .
30. **Ana Teixeira, Nieves Baenas ,Raul Dominguez Perles ,Ana Barros ,Eduardo Rosa, Diego A. and Cristina Garcia Viguera.** Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. Sep 2014, σσ. 15638–15678.

31. **Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou and Constantinos A. Demopoulos.** Biologically Active Lipids with Antiatherogenic Properties from White Wine and Must. *American Chemical Society*. 29 March 2002.
32. **Óscar A Muñoz Bernal, Alma J Coria Oliveros, Laura A de la Rosa , Joaquín Rodrigo García , Nina Del Rocío Martínez Ruiz, Sonia G Sayago Ayerdi, Emilio Alvarez Parrilla.** Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *ELSEVIER*. Feb 2021.
33. **Elizabeth. Fragopoulou, Filio Petsini, Maria Choleva, Maria Detopoulou.** Evaluation of Anti-Inflammatory, Anti-Platelet and. *molecules*. 30 October 2020.
34. **Maria Choleva, Vassiliki Boulougouri, Anthi Panara, Eirini Panagopoulou, Antonia Chiou, Nikolaos S. Thomaidis, Smaragdi Antonopoulou and Elizabeth Fragopoulou.** Evaluation of anti-platelet activity of grape pomace extracts. *ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*. 16 Nov 2019.
35. **Ana Teixeira, Nieves Baenas, Raul Dominguez Perles, Ana Barros, Eduardo Rosa, Diego A. and Cristina Garcia Viguera.** Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. Sep 2014, σσ. 15638–15678.
36. **Ana Teixeira, Nieves Baenas, Raul Dominguez Perles, Ana Barros, Eduardo Rosa, Diego A. Moreno and Cristina Garcia Viguera.** Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Molecular Sciences*. 4 Sep 2014, σσ. 15638–15678.
37. **P.Freitasb, Carolina Beresa ,Gislaine N.S.Costab, Ignacio Cabezudoc , Nina K.da Silva-James , Aline S.C.Telesa , Ana P.G.Cruza ,Caroline Mellinger-Silvad ,Renata V.Tonond Lourdes, M.C.Cabrald Suely.** Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Elsevier*. October 2017, σσ. 581-594.
38. **Ariel R. Fontana, Andrea Antonioli and Rubén Bottini.** Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *American Chemical Society*. 2013.
39. **Michal Bijak, Agnieszka Sut, Anna Kosiorek, Joanna Saluk-Bijak and Jacek Golanski.** Dual Anticoagulant/Antiplatelet Activity of Polyphenolic Grape Seeds Extract. *nutrients*. Jan 2019.
40. **Ó.A. Muñoz-Bernal, L.A. de la Rosa, J. Rodrigo-García, N.R. Martínez-Ruiz, S. Sáyago-Ayerdi, L. Rodriguez, E. Fuentes, I. Palomo, E. Alvarez-Parrilla.** Phytochemical Characterization and Antiplatelet Activity. *South African Journal of Enology and Viticulture*. March 2021.
41. **Rosalía Rodríguez-Rodríguez, María Luisa Justo, Carmen María Claro , Elisabet Vilab, Juan Parrado, María Dolores-Herrera, María Alvarez de Sotomayor.** Endothelium-dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. *ELSEVIER*. 2012.
42. **M. Ferri, S. Bin, V. Vallini, F. Fava, E. Michellini, A. Roda, A. Tassoni.** Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *ELSEVIER*. 2016.
43. **R. Rodríguez-Rodríguez, M.L. Justo, C.M. Claro, E. Vila, J. Parrado, M.D. Herrera, M. Alvarez De Sotomayor.** Endothelium-dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. *ELSEVIER*. 2012.

44. **W.P. de Oliveira, A.C.T. Biasoto, V.F. Marques, I.M. dos Santos, K. Magalhães, L.C. Correa, F. Shahidi.** Phenolics from Winemaking By-Products Better Decrease VLDL-Cholesterol and Triacylglycerol Levels than Those of Red Wine in Wistar Rats. *Food Science* . 2017.
45. **A. Caimari, J.M. Del Bas, A. Crescenti, L. Arola.** Low doses of grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma lipid profile in hamsters. *International Journal Of Obesity*. 2013.
46. **S.M. Razavi, S. Gholamin, A. Eskandari, N. Mohsenian, A. Ghorbanihaghjo, A. Delazar, H. Argani.** Red grape seed extract improves lipid profiles and decreases oxidized low-density lipoprotein in patients with mild hyperlipidemia. *Journal of Medicinal Food*. 2013.
47. **Noorafza Q.Khan, BintaPatel, Shahbaz S.Kang, Sukhjit K.Dhariwal, Fariyah Husain, Elizabeth G.Wood, Mark R.Pothecary, RogerCorder.** Regulation of vascular endothelial function by red wine procyanidins: Implications for cardiovascular health. *ELSEVIER*. 20 May 2015, σσ. 3059-3065.
48. **Borkwei Ed Nignpense, Kenneth A. Chinkwo, Christopher L. Blanchard and Abishek B. Santhakumar.** Polyphenols: Modulators of Platelet Function and Platelet Microparticle Generation? *Molecular Sciences*. 2020.
49. **Beata Olas, Barbara Wachowicz, Anna Stochmal, Wiesław Oleszek.** The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets*. 29 Sep 2011.
50. **Rouyanne T Ras, Peter L Zock, Yvonne E M P Zebregs, Neil R Johnston, David J Webb, Richard Draijer.** Effect of polyphenol-rich grape seed extract on ambulatory blood pressure in subjects with pre- and stage I hypertension. *British Journal of Nutrition*. 23 May 2013.
51. **Francesco Violi, Daniele Pastori , Pasquale Pignatelli , Roberto Carnevale.** Nutrition, Thrombosis, and Cardiovascular Disease. 7 May 2020.
52. **Elizabeth Fragopoulou, Chrysa Argyrou, Maria Detopoulou, SofiaTsitsou, Sotiria Seremeti, Mary Yannakoulia, Smaragdi Antonopoulou, Genovefa Kolovou , Petros Kalogeropoulos.** The effect of moderate wine consumption on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells: A randomized clinical study in coronary heart disease patients. *ELSEVIER*. Oct 2021.
53. **C.A. Demopoulos, H.C. Karantonis, S. Antonopoulou.** Platelet Activating Factor— a Molecular Link between Atherosclerosis Theories. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2003.
54. **Phospholipid Mediators in the Vessel Wall: Involvement in Atherosclerosis. [συγγρ. βιβλίου] E. Ninio.** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*:. 2005, σσ. 123-131.
55. **E. Fragopoulou, T. Nomikos, S. Antonopoulou, C.A. Mitsopoulou, C.A. Demopoulos.** Separation of Biologically Active Lipids from Red Wine. *American Chemical Society*. 2000.
56. **E. Fragopoulou, S. Antonopoulou, T. Nomikos, C.A. Demopoulos.** Structure Elucidation of Phenolic Compounds from Red/White Wine with Antiatherogenic Properties. *ELSEVIER*. 2003.
57. **Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, and Constantinos A. Demopoulos.** Biologically Active Lipids with Antiatherogenic Properties from White Wine and Must. *American Chemical Society*. 2002.

58. **Elizabeth Fragopoulou, Tzortzis Nomikos, Nektaria Tsantila, Alice Mitropoulou, Ioannis Zabetakis, and Constantinos A. Demopoulos.** Biological Activity of Total Lipids from Red and White Wine/Must. *American Chemical Society*. 2001.
59. **M.N. Xanthopoulou, D. Asimakopoulos, S. Antonopoulou, C.A. Demopoulos, E. Fragopoulou.** Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells. *ELSEVIER*. 2014.
60. **N. Calabriso, E. Scoditti, M. Massaro, M. Pellegrino, C. Storelli, I. Ingrosso, G. Giovino, M.A. Carluccio.** Multiple Anti-Inflammatory and Anti-Atherosclerotic Properties of Red Wine Polyphenolic Extracts: Differential Role of Hydroxycinnamic Acids, Flavonols and Stilbenes on Endothelial Inflammatory Gene Expression. *European Journal of Nutrition* . 2015.
61. **M.N. Xanthopoulou, K. Kalathara, S. Melachroinou, K. Arampatzi Menenakou, S. Antonopoulou, M. Yannakoulia, E. Fragopoulou.** Wine Consumption Reduced Postprandial Platelet Sensitivity against Platelet Activating Factor in Healthy Men. *European Journal of Nutrition*. 2017, σσ. 1485-1492.
62. **Alain Beretz, Anita Stierle, Robert Anton, Jean Pierre Cazenave.** Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin. *ELSEVIER*. 1982.
63. **Wachowicz, Beata Olas & Barbara.** Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets* . Oct 2004, σσ. 251-260.
64. Υποδοχείς των αιμοπεταλίων . *Haematologica* . 2009; , σσ. 700–711.
65. **Alexandre Kausko, Marc F Hoylaerts.** Platelet Receptors. August 2012.
66. **Nageswara R. Madamanchi, Aleksandr Vendrov, and Marschall S. Runge.** Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 11 Nov 2004.
67. **Gabriele Pizzino, 1 , * Natasha Irrera, 1 Mariapaola Cucinotta, 2 Giovanni Pallio, 1 Federica Mannino, 1 Vincenzo Arcoraci, 1 Francesco Squadrito, 1 Domenica Altavilla, 2 and Alessandra Bitto 1.** Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 27 July 2017.
68. **Holt, Roberta R. BS*, και συν.** Dietary Flavanols and Platelet Reactivity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. June 2006 , σσ. 187-196.
69. **HEALTH JADE TEAM.** HEALTH JADE. [Ηλεκτρονικό] 2019. <https://healthjade.net/hemostasis/>.
70. **G.Sayago-AyerdicEmilioAlvarez-Parrillaa, Óscar A.Muñoz-BernalAlma J.Coria-OliverosaLaura A.de la RosaaJoaquínRodrigo-GarcíaB.Ninadel Rocío Martínez-RuizaSonia.** Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *ELSEVIER*. Feb 2021.
71. **Anastasia V. Poznyak, Andrey V. Grechko, Varvara A. Orekhova, Yegor S. Chegodaev, Wei-Kai Wu and Alexander N. Orekhov.** Oxidative Stress and Antioxidants in Atherosclerosis Development and Treatment. *Biology*. Mar 2020.
72. **Divyashree Ravishankar, Dina A I Albadawi , Vishaant Chaggar , Pabitra H Patra, Harry F Williams, Maryam Salamah, Rajendran Vaiyapuri, Philip R Dash , Ketan Patel, Kimberly A Watson, Sakthivel**

- Vaiyapuri.** Isorhapontigenin, a resveratrol analogue selectively inhibits ADP-stimulated platelet activation. *ELSEVIER*. Nov 2019.
73. **Eduardo Fuentes, Iva'n Palomo.** Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions. *ELSEVIER*. 2014.
74. **Eleni Pavlidou, Maria Mantzorou, Aristeidis Fasoulas, Christina Tryfonos, Dimitris Petridis and Constantinos Giaginis.** Wine: An Aspiring Agent in Promoting Longevity and Preventing Chronic Diseases. *Diseases*. 08 Aug 2018.
75. **Francesco Violi, Pasquale Pignatelli and Stefania Basili.** Nutrition, Supplements, and Vitamins in Platelet Function and Bleeding. *American Heart Association*. 2 March 2010, σσ. 1033-1044.
76. **José Rivera, María Luisa Lozano, Leyre Navarro-Núñez, Vicente Vicente.** Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. May 2009.
77. **Luigi Castaldo, Alfonso Narváez, Luana Izzo, Giulia Graziani, Anna Gaspari, Giovanni Di Minno and Alberto Ritieni.** Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *molecules*. Oct 2019.
78. **Lukas Snopek, Jiri Mlcek, Lenka Sochorova, Mojmir Baron, Irena Hlavacova, Tunde Jurikova, Rene Kizek, Eva Sedlackova and Jiri Sochor.** Contribution of Red Wine Consumption to Human Health Protection. *Molecules*. Jul 2018.
79. **Maura Ferri, Sofia Bin, Veronica Vallini, Fabio Fava, Elisa Michelini, Aldo Roda, Giordano Minnucci, Giacomo Bucchi, Annalisa Tassoni.** Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *ELSEVIER*. 25 MAY 2016.
80. **Paolo Gresele, Chiara Cerletti, Giuseppe Guglielmini, Pasquale Pignatelli, Giovanni de Gaetano, Francesco Violi.** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. March 2011, σσ. 201 - 211.
81. **Sohaib Haseeb, Bryce Alexander and Adrian Baranchuk.** Wine and Cardiovascular Health. *Circulation*. 12 Oct 2017, σσ. 434–1448.
82. **Grieco, Giovanna Giovinazzo & Francesco.** Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Springer Link*. 07 November 2015, σσ. pages 454–462.
83. **Eleni Pavlidou, Maria Mantzorou, Aristeidis Fasoulas, Christina Tryfonos, Dimitris Petridis and Constantinos Giaginis.** Wine: An Aspiring Agent in Promoting Longevity and Preventing Chronic Diseases. *Diseases*.
84. **Anastasia V. Poznyak, Andrey V. Grechko, Varvara A. Orekhova, Yegor S. Chegodaev, Wei-Kai Wu and Alexander N. Orekhov.** Oxidative Stress and Antioxidants in Atherosclerosis Development and Treatment. *Biology*. 21 Mar 2020.
85. **Thomas F. Babor, John C. Higgins-Biddle.** Brief intervention for hazardous and harmful drinking: a manual for use in primary care. *WHO*. 2001.
86. **Elizabeth Fragopoulou, Antonopoulou Smaragdi.** The French paradox three decades later: Role of inflammation and thrombosis. *Elsevier B.V.* November 2020, σσ. 160-169.

87. **Xiaoping, Brian Estevez and.** New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *PHYSIOLOGY*. 22 FEB 2017.
88. **Jean-Claude.** Alcohol, Wine and Platelet Function. *SCIELO*. 2004.
89. **G.Sayago-AyerdicEmilioAlvarez-Parrillaa, Óscar A.Muñoz-BernalAlma J.Coria-OliverosaLaura A.de la RosaaJoaquínRodrigo-GarcíabNinadel Rocío Martínez-RuizaSonia.** Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *ELSEVIER* . FEB 2021.
90. **Óscar A Muñoz Bernal, Alma J Coria Oliveros, Laura A de la Rosa, Joaquín Rodrigo García, Nina Del Rocío Martínez Ruiz, Sonia G Sayago Ayerdi , Emilio Alvarez Parrilla.** Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *ELSEVIER*. FEB 2021.