ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΕΣΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟ ΤΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

ΓΕΩΡΓΙΑΔΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ
ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

Αθήνα 2005

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΕΣΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟ ΤΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

ΓΕΩΡΓΙΑΔΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ
ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

Αθήνα 2005

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε την περίοδο 2004-2005 στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του ***Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής*** *του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος για την απόκτηση Πτυχίου στην Επιστήμη της Διαιτολογίας και Διατροφής. Την επίβλεψη της παρούσας εργασίας είχε η Αντιπρύτανης του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σμαραγδή Αντωνοπούλου, την οποία ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες οδηγίες και το ενδιαφέρον που έδειξε στο πρόσωπο μου καθ΄όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.*

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Φραγκοπούλου Λίζα για την άμεση καθοδήγηση και συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Ομολογώ πώς η επίβλεψη και καθοδήγηση της, αλλά και ο τρόπος με τον οποίο η ίδια λειτουργεί ως ερευνήτρια αποτέλεσαν για΄μένα εκπαίδευση σε πολλαπλά επίπεδα. Την ευχαριστώ θερμά για όλη την υπομονή που έδειξε μαζί μου, αλλά και για την εμπιστοσύνη και το αμείωτο ενδιαφέρον απέναντι μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το τεχνικό, διδακτορικό και ερευνητικό προσωπικό του Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του ***Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής*** *του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, που ήταν πάντα πρόθυμο να με βοηθήσει σε οποιαδήποτε δυσκολία συναντούσα κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο Εργαστήριο.*

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ'όλη της διάρκεια των πανεπιστημιακών μου χρόνων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΣΕΛ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}: Η ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

1.1 Χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας. 2-5

1.2 Η ευεργετική δράση της παραδοσιακής Κρητικής δίαιτας έναντι των εκφυλιστικών νοσημάτων 5-6

1.2.1 Η Μελέτη των Εφτά Χωρών 7-8

1.2.2 Δράσεις των επιμέρους συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας, έναντι των εκφυλιστικών νοσημάτων . 7-9

1.3 Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες επίδρασης των φαινολικών ενώσεων της Μεσογειακής Δίαιτας στα εκφυλιστικά νοσήματα. 9-13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο} : ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

2.1 Εισαγωγή 14

2.2 Η χημική σύσταση των διαιτητικών φαινολικών ενώσεων 14-16

2.3 Περιεκτικότητα της Μεσογειακής δίαιτας σε φαινολικές ενώσεις 17-18

2.4 Απορρόφηση και Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών ενώσεων 18-21

2.5 Βιολογικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων 21-24

2.6 Εξέταση της Ρεσβερατρόλης

2.6.1 Εισαγωγή 24

2.6.2 Πηγές ρεσβερατρόλης 25

2.6.3 Μεταβολισμός – Βιοδιαθεσιμότητα 26-27

2.6.4 Βιολογικές δράσεις της ρεσβερατρόλη 28-39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο} : ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΜΕΣΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.1 Δομή του νεφρού - Μεσαγγειακά κύτταρα 40

3.1.1Νεφρώνας 41-43

3.2 Σπειραματονεφρίτιδα – Σπειραματοσκλήρυνση 43-44

3.2.1 Κύτταρα που εμπλέκονται στη φλεγμονή του σπειράματος 44-46

3.2.2 Προτεινόμενοι μηχανισμοί πρόκλησης της σπειραματοσκλήρυνσης - Συσχέτιση σπειραματοσκλήρυνσης και αθηροσκλήρυνσης 47-50

3.3 Ο Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων στο Νεφρό

3.3.1 Χαρακτηριστικά του Παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων 50-51

3.3.2 Η παραγωγή του PAF στο νεφρό 51

3.3.3 Δράση του PAF σε μεσαγγειακά κύτταρα. 51-52

3.3.4 Η εμπλοκή του PAF με το μηχανισμό της «αθηρωσκλήρωσης του σπειράματος» 52-54

3.3.5 Η επίδραση του PAF στην έκφραση των LDL και εκκαθαριστών υποδοχέων (ScrA) στα μεσαγγειακά κύτταρα. 54-55

3.4 Ρεσβερατρόλη και νεφρός 55-56

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΜΟ ΜΕΡΟΣ

4. Σκοπός 58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{Ο} : ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων 59-60

5.2 Συντήρηση και αναδιασπορά των κυττάρων 61-62

5.3 Διέγερση των κυττάρων με trans-Ρεσβερατρόλη 62-63

5.4 Απομόνωση ολικού RNA 63-65

5.5 Ηλεκτροφόρηση RNA 66

5.6 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Αλυσιδωτή αντίδραση (PCR) πολυμεράσης 66-68
5.7 Ηλεκτροφόρηση DNA 69
5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων RT-PCR. 69
5.9 Μορφολογική μελέτη 69-71
5.10 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) 71
5.11 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων 71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{ο} : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
6.1 Μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του n-LDL υποδοχέα σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMCL). 72
6.1.1 Επίδραση της συγκέντρωσης trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα. 72-75
6.1.2 Επίδραση του χρόνου επώασης μεσαγγειακών κυττάρων με την trans-ρεσβερατρόλη στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα. 76-77
6.2 Επίδραση της trans -ρεσβερατρόλης στην έκφραση του n-LDL υποδοχέα, μετά από διέγερση των μεσαγγειακών με προφλεγμονώδεις παράγοντες. 78
.
6.2.1 Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα, για χρονικό διάστημα 6h. 79-80
6.2.2 Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα, μετά από διέγερση των κυττάρων με PAF. 81-83
6.3 Μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του ScrA I υποδοχέα σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMCL)
6.3.1 Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του ScrA I υποδοχέα 84-86

6.4 Μορφολογικά πειράματα 88

6.4.1.2 Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, μέσω του n-LDLυποδοχέα. με ή χωρίς την εμπλοκή του PAF. 88-91

6.4.2 Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων μέσω της δράσης του ScrA I υποδοχέα, με ή χωρίς την εμπλοκή του PAF. 92-93

6.5 Πειράματα ελέγχου σταδίων πειραματικής πορείας

6.5.1 Έλεγχος ακεραιότητας ρεσβερατρόλης 94

6.3.2 Ηλεκτροφόρηση RNA 94-95

6.3.3 Έλεγχος πιθανής επιμόλυνσης προϊόντων PCR με DNA. 95-95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^{Ο} : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAPH	2,2'-azobis2-amidinopropane dihydrochloride
ADP	Αδενόσινο-διφωσφορικό οξύ
apo-A_1	Απολιποπρωτεΐνη A_1
bFGF	Βασικός παράγοντας ανάπτυξης των ινοβλαστών
BSA	Βόειος αλβουμίνη ορού
CBG	Κυτοσολική β-γλυκοζιδάση (cytosolic β-glucosidease)
c-DNA	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
CHD	Καρδιαγγειακή νόσος
COX	Κυκλοξυγενάση
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
DEPC	Diethyl-pyrocarbonate,διαίθυλο-πυροανθρακικό οξύ
DMSO	Διμεθυλοσουφοξείδιο
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξεικό οξύ
FCS	Ορός εμβρύου
GBM	βασική σπειραματική μεμβράνη
HETE	Υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HMG-CoA	β-υδρόξυ-β-μεθυλγλουτάρυλο-συνένζυμο Α
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
IL	Ιντερλευκίνη
ITS	Τρανσφεράση ινσουλίνης
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LPH	lactase phlorizin hydrolase
MC	Μεσαγγειακά κύτταρα
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας κ-Β
NO	Οξείδιο του αζώτου
ox-LDL	Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH	Ακετοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PDGF	Παραγόμενος από τα αιμοπετάλια παράγοντας ανάπτυξης
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PG	Προσταγλαδίνη
PKC	Extracellular signal –regulated kinases
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	πολυμορφοπύρηνα
PMSF	Πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλη
RNA	Ριβονουκλεϊνικό οξύ
ROS	Ενεργές ελεύθερες ρίζες
RT	Αντίδραση αντίστροφη μεταγραφής
SFM	Θρεπτικό μέσο χωρίς ορό
SMC	Λεία μυϊκά κύτταρα
SOD	Υπεροξειδάση της δισμουτάσης
SR	Εκκαθαριστής υποδοχέας
SR-A I	Εκκαθαριστής υποδοχέα Α τύπου Ι
TAE	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/οξικό οξύ/ EDTA
TBARS	Αντιδρώντες ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος
TBE	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/βορικό οξέος/ EDTA
TGF	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
TNF	Ογκονεκρωτικός παράγοντας
TRAP	Αντιοξειδωτική παράμετρος παγίδευσης ολικών ριζών
Tris-	Τρι-υδοξυλαμινομεθάνιο
TxB	Θρομβοξάνη
UV	Υπεριώδες
VLDL	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο}

Η ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

1.1 *Χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας.*[1]

Η διατροφή των Μεσογειακών λαών εμφανίζει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Κεντρικό σημείο όλων των μεσογειακών προτύπων διατροφής αποτελεί το ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο, το σιτάρι, το σταφύλι και τα παράγωγα τους καταναλώνονται στην μεσογειακή λεκάνη από την αρχαιότητα, ενώ σταδιακά ενσωματώθηκαν στη Μεσογειακή Δίαιτα ποικιλία φρούτων και λαχανικών, όπως η ντομάτα, η πατάτα, τα πορτοκάλια, το ρύζι, τα φασόλια και άλλα πολλά που έφθασαν στη μεσογειακή λεκάνη από περιοχές της Ανατολής, ως αποτέλεσμα διαρκών μετακινήσεων.

Με τον όρο «Μεσογειακή Δίαιτα» αναφερόμαστε, σήμερα, στα διατροφικά χαρακτηριστικά των περιοχών της Μεσογείου όπου ευδοκιμεί το ελαιόδεντρο και για την χρονική περίοδο τέλη 1950 και αρχές 1960. Κατά την χρονική αυτή περίοδο οι επιπτώσεις του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου είχαν παρέλθει στις Μεσογειακές χώρες, αλλά δεν είχε ακόμα επικρατήσει η κουλτούρα των "fast-food" στην περιοχή.

Το διατροφικό αυτό πρότυπο αν και συναντάται ευρύτερα στην περιοχή της Μεσογείου δεν αντιπροσωπεύει μια ενιαία δίαιτα για όλες τις Μεσογειακές χώρες[2] , αλλά αποτελεί μία μεγαλύτερη ενότητα με επιμέρους παραλλαγές ανά περιοχή, προσαρμοσμένες στα πολιτισμικά πρότυπα κάθε κοινωνίας. Η ελληνική παραλλαγή της Μεσογειακής δίαιτας ταυτίζεται συχνά με την παραδοσιακή διατροφή της ελληνικής νήσου Κρήτης (Κρητική Παραδοσιακή διατροφή) και περιλαμβάνει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: [3]

1) Υψηλός λόγος μονοακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών
2) Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ
3) Υψηλή κατανάλωση οσπρίων
4) Υψηλή κατανάλωση δημητριακών (συμπεριλαμβάνεται και το ψωμί)
5) Υψηλή κατανάλωση φρούτων
6) Υψηλή κατανάλωση λαχανικών
7) Χαμηλή κατανάλωση κρέατος και προϊόντων του
8) Μέτρια κατανάλωση γάλατος και γαλακτοκομικών προϊόντων

Πιο συγκεκριμένα το ελαιόλαδο αποτελεί την κύρια πηγή λίπους και καταναλώνεται ευρέως συνοδεύοντας την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων λαχανικών, τα οποία τρώγονται είτε ωμά σε σαλάτες, είτε βρασμένα και οσπρίων. Η συνολική κατανάλωση λίπους είναι αρκετά υψηλή γύρω στο 40% της συνολικής ενέργειας. Λόγω της προέλευσης του λίπους, το ποσοστό μονοακόρεστων (~15% επί του συνολικού λίπους) προς κορεσμένα λίπη (μόνο 7%-8% επί του συνολικού λίπους) είναι πολύ υψηλό

σε σχέση με άλλα μέρη του κόσμου, όπως τη Β. Ευρώπη και Β. Αμερική. Επιπλέον η μη βιομηχανική επεξεργασία των τροφίμων ελαχιστοποιεί το ποσοστό των υδρογονωμένων λιπαρών οξέων της διατροφής.

Στην παραδοσιακή ελληνική δίαιτα (Μεσογειακή Δίαιτα) οι υδατάνθρακες αποτελούν το 40%-50% των ημερησίων θερμίδων και προέρχονται από την κατανάλωση άρτου ολικής άλεσης, διαφόρων δημητριακών, ποικιλίας λαχανικών, που καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες και φρούτων, φρέσκων ή αποξηραμένων. Το κρασί καταναλώνεται σε μέτριες ποσότητες και πάντα κατά τη διάρκεια των γευμάτων. Η ποικιλία προϊόντων φυτικής προέλευσης συνεπάγεται την πρόσληψη πληθώρας μικροθρεπτικών συστατικών, όπως β-καροτενίου, προβιταμίνης Α, βιταμίνης C, τοκοφερόλης, διαιτητικών ινών, διαφόρων ιχνοστοιχείων και πολυφαινολών. Τα παραπάνω συστατικά αν και μη-θρεπτικά χαρακτηρίζονται από πολλές έρευνες σημαντικά για την προστασία έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου, καθώς και της καρδιαγγειακής νόσου.

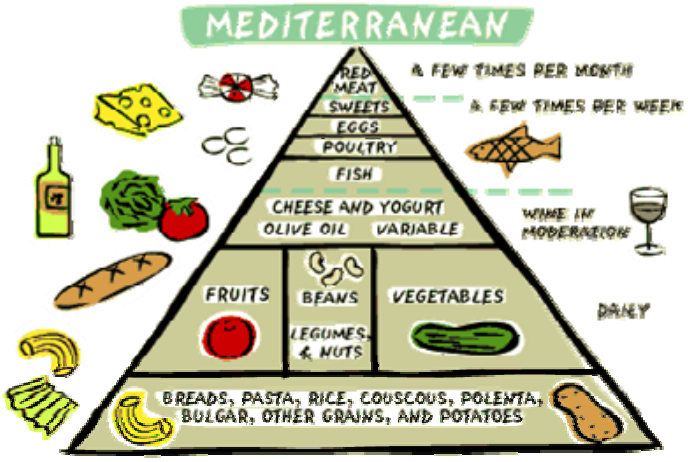
Οι πρωτεΐνες αποτελούν περίπου το 10% των συνολικά προσλαμβανόμενων θερμίδων και τα ¾ αυτών είναι φυτικής προέλευσης. Το γάλα καταναλώνεται σε μέτριες ποσότητες στην παραδοσιακή ελληνική δίαιτα, αλλά η κατανάλωση τυριού κυρίως και γιαουρτιού, σε μικρότερο βαθμό είναι υψηλή. Η φέτα προστίθεται συνήθως σε αρκετές σαλάτες και συνοδεύει αρκετά μαγειρευτά λαχανικά. Το κρέας ήταν αρκετά ακριβό στη δεκαετία 1950-1960, με αποτέλεσμα να καταναλώνεται σπάνια. Οι παραθαλάσσιες περιοχές συνήθως το αντικαθιστούσαν με άφθονη κατανάλωση ψαριού.

Ο προστατευτικός ρόλος της Μεσογειακής δίαιτας έναντι πολλών νοσημάτων φθοράς όπως τα καρδιαγγειακά, ο καρκίνος, η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου ΙΙ είναι διεθνώς αναγνωρίσιμος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή του μεσογειακού διατροφικού μοντέλου και ιδιαίτερα της ελληνικής παραδοσιακής δίαιτας μπορεί όχι μόνο να προλάβει αλλά και να θεραπεύσει πολλά νοσήματα, καθώς περιέχει μια πληθώρα φαρμακευτικών ουσιών, που δρουν συνεργιστικά.[2]

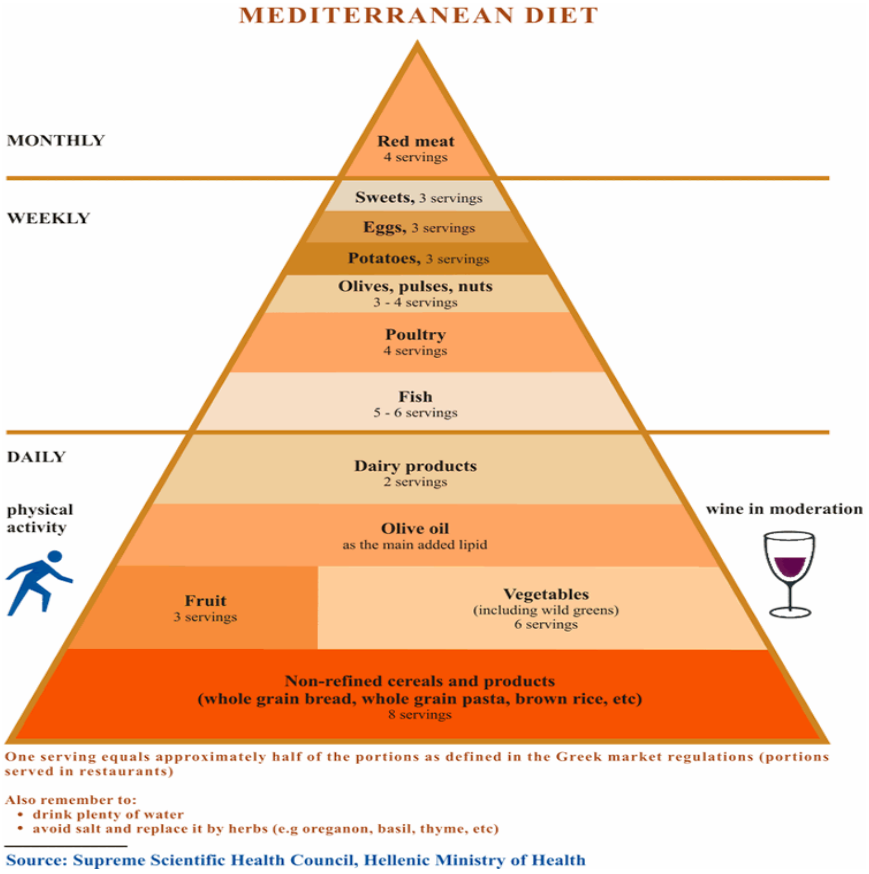
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, σε συνεργασία με το τμήμα δημόσιας υγείας του Harvard, και τον οργανισμό "Oldways Preservation and Exchange Trust", αναγνωρίζοντας τη συμβολή της Μεσογειακής Δίαιτας στην Παγκόσμια Υγεία πρότειναν το 1993 ένα διατροφικό πρότυπο, που βασίζεται στα 7 χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας και που κάθε κοινωνία θα μπορούσε να το εφαρμόσει προσαρμόζοντας το στις δικές της διατροφικές συνήθειες. Επίσης τονίστηκε ιδιαίτερα η σημασία της σωματικής δραστηριότητας στη προώθηση της υγείας, καθώς και η ελληνική κοινωνία του 1960, χαρακτηριζόταν από έντονη φυσική δραστηριότητα. Η πρόταση τους συνοψίζεται στη διατροφική πυραμίδα της Μεσογειακής Δίαιτα της Εικόνας 1.1

Οι διατροφικές συστάσεις που προτάθηκαν το 1996 από το Ανώτατο Επιστημονικό Συμβούλιο Υγείας, που εκλήθη από το Ελληνικό Υπουργείο Υγείας αντικατοπτρίζουν το ελληνικό παραδοσιακό μοντέλο διατροφής. Σε αντίθεση με την πυραμίδα της Εικόνας 1.1, η πυραμίδα που διαμορφώθηκε για τον ελληνικό πληθυσμό[4] τονίζει τη σημασία κατανάλωσης προϊόντων ολικής άλεσης, τα οποία είναι πλούσια σε διαιτητικές ίνες, μικροθρεπτικά συστατικά και έχουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη. Οι πατάτες μεταφέρονται

από τη βάση της πυραμίδας σε πιο υψηλό σημείο και προτείνεται η εβδομαδιαία κατανάλωση τους, λόγω του υψηλού γλυκαιμικού τους δείκτη. Επίσης προσδιορίζονται οι συνιστώμενες ποσότητες κατανάλωσης για κάθε τρόφιμο.



Εικόνα 1.1: *Αναπτύχθηκε από τον οργανισμό "Oldways Preservation and Exchange Trust" και τη σχολή δημόσιας υγείας του Παν/μιου Harvard, με βάση στην παραδοσιακή Μεσογειακή Δίαιτα. Παρουσιάστηκε στα πλαίσια του Διεθνούς συνεδρίου των Μεσογειακών Διαιτών (International Conference on the Diets of the Mediterranean), 1993.*[1]

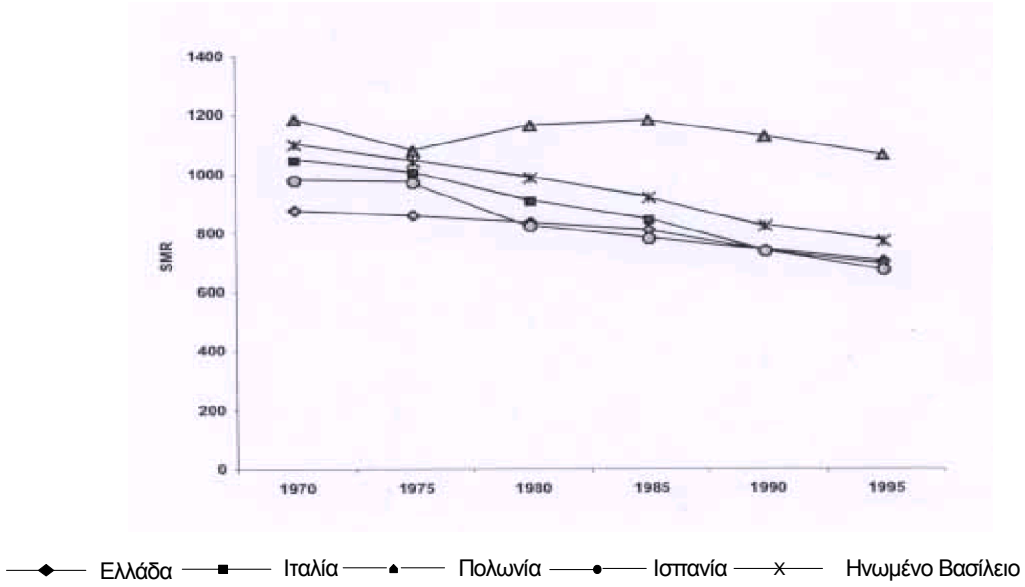


Εικόνα 1.2 *Η πυραμίδα της Μεσογειακής Δίαιτας. Πρόταση του Ανώτατου Επιστημονικού Συμβουλίου Υγείας του Ελληνικού Υπουργείου Υγείας, για τη διεξαγωγή διαιτητικών συστάσεων για τον Ελληνικό πληθυσμό.*[4]

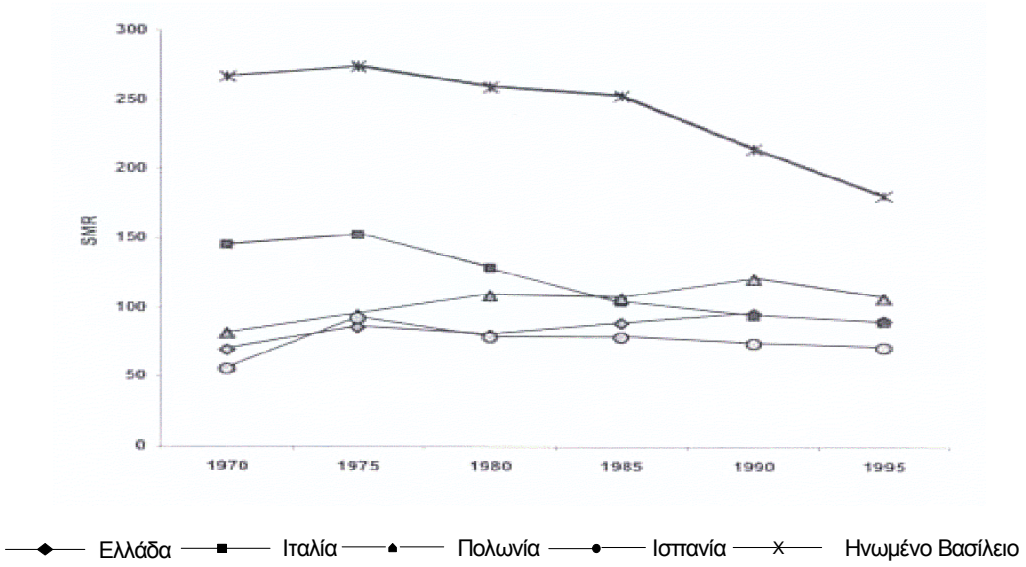
Σήμερα η ωφελιμότητα της παραδοσιακής Ελληνικής δίαιτας, είναι κάτι το καθιερωμένο. Επιπλέον μελέτες όπως η Australian study και η Danish study απέδειξαν την ωφελιμότητα της εφαρμογής της Μεσογειακής Δίαιτας ανεξάρτητα από το διατροφικό υπόβαθρο και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως γενετικό υπόβαθρο, γεωγραφικό πλάτος κ.α ενός πληθυσμού.[5] Σήμερα οι διατροφικές συστάσεις εξάγονται για διάφορους πληθυσμούς, όπως ο Αμερικάνικος, ο Καναδικός, Β. Ευρωπαϊκοί πληθυσμοί αλλά και Ασιατικοί λαμβάνουν σοβαρά υπ'όψιν τους την Κρητική παραδοσιακή δίαιτα.

1.2 *Η ευεργετική δράση της παραδοσιακής Κρητικής δίαιτας έναντι των εκφυλιστικών νοσημάτων.*[1]

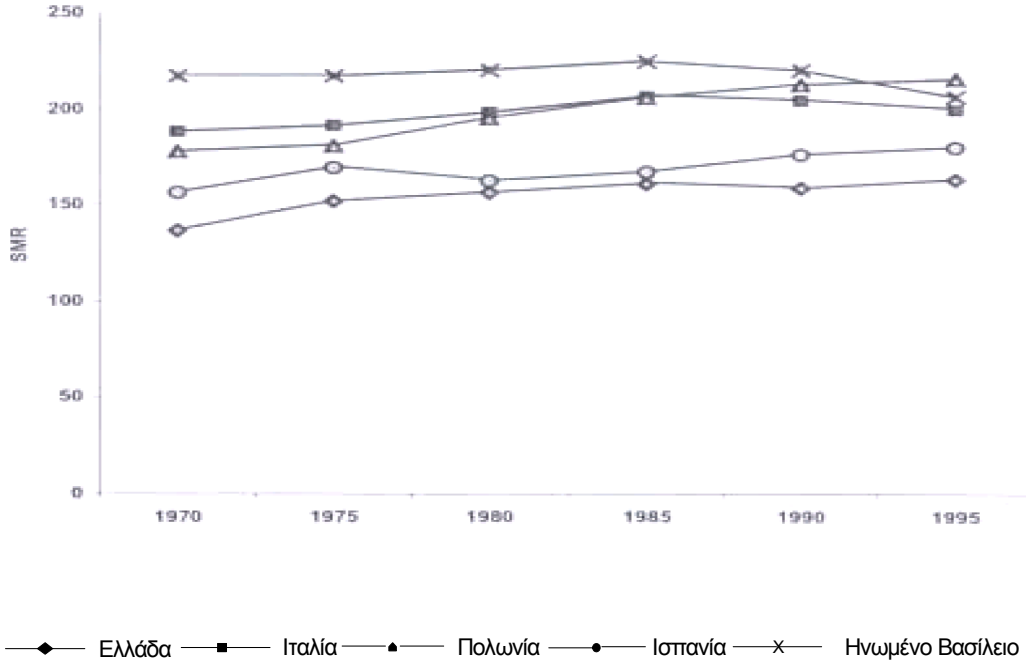
Οι Μεσογειακές χώρες, θεωρούνται περιοχές με μέτριο εως χαμηλό δείκτη θνησιμότητας από χρόνια νοσήματα, όπως τα καρδιαγγειακά και ο καρκίνος. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, που καλύπτουν τη χρονική περίοδο 1960-1990 οι Μεσογειακές χώρες απολάμβαναν μακροζωία και καλή υγεία, παρά το κατώτερο σύστημα υγείας και την ασυνήθιστα υψηλή επίπτωση του καπνίσματος σε σχέση με τις πιο αναπτυγμένες οικονομικά χώρες της Β.Ευρώπης και της Β.Αμερικής. Ιδιαίτερα εντυπωσιακή ήταν η επίπτωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων και διαφόρων τύπου καρκίνων, που έπληττταν τους Μεσογειακούς πληθυσμούς λιγότερο από κάθε άλλο πληθυσμό. (Εικόνα 1.3, 1.4, 1.5)



Εικόνα 1.3. *Διάγραμμα Δείκτη θνησιμότητας (standardized mortality rate-SMR) από όλες τις αιτίες ανά 100000 ανθρώπους του γενικού πληθυσμού για το χρονικό διάστημα 1970-1995, σε πέντε Ευρωπαϊκές Χώρες*[1]



Εικόνα 1.4. *Διάγραμμα Δείκτη θνησιμότητας (standardized mortality rate-SMR) από καρκίνο ανά 100000 ανθρώπους του γενικού πληθυσμού, για τη χρονικό διάστημα 1970-1995 σε πέντε Ευρωπαϊκές Χώρες.*[1]



Εικόνα 1.5 *Διάγραμμα δείκτη θνησιμότητας από ισχαιμική καρδιαγγειακή νόσο ανα 100000 ανθρώπους του γενικού πληθυσμού χρονικό διάστημα 1970-1995 σε πέντε Ευρωπαϊκές Χώρες.* [1]

1.2.1 Η Μελέτη των Εφτά Χωρών [6, 21]

Η πρώτη συστηματική επιδημιολογική μελέτη, που συσχέτισε τη δίαιτα των μεσογειακών λαών με τη χαμηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, και κυρίως με τη χαμηλή επίπτωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων ήταν η μελέτη υπό την καθοδήγηση του καθηγητή Ancel Keys του Πανεπιστημίου της Μινεσότα. Σήμερα είναι πιο γνωστή με το όνομα "Μελέτη των Εφτά Χωρών". Η "Μελέτη των Εφτά Χωρών" άρχισε το 1960 και συσχέτισε την επίπτωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων με τον τρόπο ζωής στις παρακάτω χώρες: Φιλανδία, Ιαπωνία, Η.Π.Α, Ολλανδία, Γιουγκοσλαβία, Ιταλία και Ελλάδα. Η κυριότερη διαπίστωση της μελέτης ήταν ότι ο ελληνικός πληθυσμός της νήσου Κρήτης είχε πολύ χαμηλό δείκτη θνησιμότητας και νοσηρότητας από την καρδιαγγειακή νόσο, σε σύγκριση με τους πληθυσμούς των άλλων χωρών, που συμμετείχαν στη μελέτη. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι οι Κρήτες είχαν υψηλότερα ποσοστά χοληστερόλης αίματος σε σχέση με όλους τους άλλους μελετούμενους πληθυσμούς, εκτός από τον Αμερικάνικο πληθυσμό. Επιπρόσθετα, ο δείκτης θνησιμότητας και νοσηρότητας παρέμεινε χαμηλός στο νησί και μετά από 25 χρόνια, που πραγματοποιήθηκε επανεξέταση.

Τα επίπεδα χοληστερόλης αίματος θεωρούνταν μέχρι τότε, δείκτης ανάπτυξης CHD, επειδή οι κρύσταλλοι χοληστερόλης αποτελούν το κύριο συστατικό των αθηρωματικών πλακών. Ένα από τα σημαντικότερα συμπεράσματα στα οποίο κατέληξε η Μελέτη των Εφτά Χωρών ήταν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης ήταν ανεξάρτητος των επιπέδων χοληστερόλης αίματος. Το συμπέρασμα αυτό επαληθεύτηκε και στη μελέτη επανεξέτασης της Μελέτη των Εφτά Χωρών 25 χρόνια αργότερα, όπου διαπιστώθηκε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης CHD διέφερε από χώρα σε χώρα, ακόμα και ανάμεσα σε ανθρώπους, που είχαν παρόμοια επίπεδα χοληστερόλης αίματος. Επίσης, ιδιαίτερη σημαντική ήταν και η διαπίστωση ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η δίαιτα και τα συστατικά της μπορούσαν να επηρεάσουν το κίνδυνο ανάπτυξης CHD, ανεξάρτητα από τα επίπεδα χοληστερόλης αίματος.

Η Μελέτη των Εφτά χωρών παρατήρησε ότι η δίαιτα των Κρητών ήταν πλούσια σε ολικό λίπος και σε μονοακόρεστα, ενώ η κατανάλωση κορεσμένων λιπών ήταν περιορισμένη. Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 1965 από τον Χρηστάκη et al παρατηρήθηκαν διαφορές στη σύσταση των λιπαρών οξέων του λιπώδους ιστού, ανάμεσα στους Αμερικάνους και τους Κρήτες. Συγκεκριμένα, ο λιπώδης ιστός των Κρητών είχε αυξημένο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με το λιπώδη ιστό των Αμερικανών. Καθώς η σύσταση του λιπώδους ιστού αποτελεί μία μακροπρόθεσμη ένδειξη του διατροφικού ιστορικού, ενός ατόμου, η μελέτη αυτή αποτέλεσε ακόμα μία επιβεβαίωση της διαπίστωσης, ότι οι Κρήτες κατανάλωναν μεγάλες ποσότητες μονοακόρεστου λίπους, προερχόμενου κυρίως από το ελαιόλαδο.

Τα αποτελέσματα της Μελέτης των Εφτά Χωρών ερμηνεύτηκαν από τον Keys ως αποτέλεσμα της χαμηλής πρόσληψης κορεσμένου λίπους και της αυξημένης πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων,

που χαρακτήριζαν τη δίαιτα των Κρητών. Παρά το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν ο καθηγητής Ancel Keys και οι συνεργάτες του υπήρχαν πολλοί επιστήμονες που υποστήριζαν ότι η Μεσογειακή διατροφή είναι κάτι παραπάνω από δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λίπη[7].

1.2.2 Δράσεις των επιμέρους συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας, έναντι των εκφυλιστικών νοσημάτων . [1, 2, 8]

Αμέσως μετά τη γνωστοποίηση των πρώτων ευρημάτων της Μελέτης των Εφτά Χωρών το 1970, ένας μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών και κλινικών ευρενών κατευθύνθηκε προς τη μελέτη των επιμέρους συστατικών της Μεσογειακής δίαιτας. Κυριότερος σκοπός των παραπάνω ερευνών ήταν η διερεύνηση της υπόθεσης ότι τα θετικά αποτελέσματα, που φαινόταν να έχει Μεσογειακή Δίαιτα στην υγεία οφείλονταν σε συγκεκριμένα συστατικά της, τα οποία ασκούσαν κάποια θετική δράση είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμό με άλλα.

Πέρα από τη διαπίστωση της Μελέτης των Εφτά χωρών ότι η Κρητική δίαιτα χαρακτηριζόταν από μεγάλη κατανάλωση ελαιολάδου αναφέρθηκαν και άλλες διαφορές ανάμεσα στην Κρητική δίαιτα και την δίαιτα των άλλων χωρών. Οι κυριότερες από αυτές τις διαφορές εντοπίσθηκαν κυρίως στην μεγάλη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων στην Β.Ευρώπη, κρέατος στις Η.Π.Α και λαχανικών, οσπρίων, ψαριού και κρασιού στη Ν.Ευρώπη και δημητριακών, προϊόντων σόγιας και ψαριού στην Ιαπωνία. Οι ομάδες τροφίμων ζωικής προέλευσης συσχετίσθηκαν άμεσα με θνησιμότητα από CHD, ενώ οι ομάδες των λαχανικών (εκτός από τις πατάτες), του ψαριού και του κρέατος συσχετίζονταν αντίστροφα με την θνησιμότητα από CHD. Επίσης θετική συσχέτιση με τον θάνατο από CHD φάνηκε να υπάρχει για την κατανάλωση βουτύρου (r=0,600), κρέατος (r= 0,645), αρτοσκευασμάτων ζαχαροπλαστικής (r=0,752) και γάλατος (r=0,600), ενώ υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση για την κατανάλωση λαχανικών (r= -0,822), ελαιολάδου (r= - 0,571), και αλκοόλ (r= - 0,609)[9]

Πέρα από την αυξημένη σύσταση σε μονοακόρεστα και τη χαμηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα η Μεσογειακή Δίαιτα περιλαμβάνει αυξημένες ποσότητες λαχανικών, φρούτων, δημητριακών, η πρόσληψη των οποίων συσχετίζεται αντίστροφα με την εμφάνιση καρκίνου[11] και συμβάλει στην αύξηση του ορίου ζωής[12]. Αυξημένες ποσότητες αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ουσιών περιέχονται στο ελαιόλαδο, στα φρούτα και τα λαχανικά. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η βιταμίνη Ε και, κυρίως η α-τοκοφερόλη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντίσταση της λιποπρωτεΐνης LDL στην οξείδωση. Επίσης πολλά ιχνοστοιχεία, όπως το σελήνιο, το λυκοπένιο καθώς και πολλές φαινολικές ενώσεις, όπως η ρεσβερατρόλη, φλαβονοειδή[10] κ.α. προστατεύουν από την εμφάνιση καρκίνου και CHD νοσημάτων.

Το γεγονός ότι οι Ιάπωνες εμφάνιζαν μαζί με τους Κρήτες το χαμηλότερο δείκτη θνησιμότητας από καρδιαγγειακά, παρ΄όλο που είχαν πολύ χαμηλότερη πρόσληψη συνολικού λίπους, 11% επί των συνολικών θερμίδων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων σε σχέση με τους Κρήτες (37% επί των συνολικών θερμίδων, αντίστοιχα) δεν σχολιάστηκε ιδιαίτερα από τον Keys et al[6].

Σε μία μελέτη των Sandker et al,[2] αναλύσεις σε δείγματα αίματος των πληθυσμών, που συμμετείχαν στη Μελέτη των Εφτά Χωρών έδειξαν ότι τα δείγματα εστέρων χοληστερόλης του πλάσματος από τον πληθυσμό της Κρήτης είχαν 3 φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε α-λινολενικό οξύ (18:3, ω-3) σε σχέση με τον πληθυσμό του Zutphen. Επίσης φάνηκε ότι και οι Ιάπωνες είχαν αυξημένα επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τον πληθυσμό του Zutphen. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής πρόσθεσαν ένα επιπλέον στοιχείο στην κατανόηση των θετικών δράσεων της Μεσογειακής δίαιτας, αφού θεωρήθηκε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις ω-3 λιπαρών οξέων στο αίμα των Κρητών και των Ιαπώνων συνέβαλαν σημαντικά στην προστασία έναντι των CHD νοσημάτων. Οι Κρήτες λάμβαναν α-λινολενικό οξύ από τα άγρια χόρτα, τα καρύδια και τα σύκα και οι Ιάπωνες από το λάδι της κάνολας, το σογιέλαιο και το ψάρι.

Η σημασία του απαραίτητου λιπαρού οξέος, α-λινολενικού οξέος, που συναντάται στα λαχανικά και τα φρούτα, π.χ ελιές, σύκα, για την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών, καθώς και των περισσότερων ω-3 λιπαρών οξέων, όπως το εικοσαπεντανοικό οξύ (20:5(ω-3)) και το δεκαεξανοικό οξύ (20:6(ω-3))[15], που συναντώνται στο ψάρι τονίζεται από πολλές πρόσφατες μελέτες[13].

Σε μία επιδημιολογική μελέτη των de Lorgenil και Renaud, η Lyon Heart Study[14] φάνηκε ξεκάθαρα ο προστατευτικός ρόλος του α-λινολενικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη αυτή συνέκρινε την επίπτωση που θα είχε μια τροποποιημένη μορφή της παραδοσιακής Κρητικής διατροφής, εμπλουτισμένης σε α-λινολενικό οξύ και της δίαιτας Step 1 του American Heart Association σε ασθενείς, που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μείωση κατά 70% των θανάτων στα άτομα, τα οποία διατρέφονταν σύμφωνα με την τροποποιημένη Μεσογειακή Δίαιτα και μετά από 4 χρόνια επανεξέτασης στο ίδιο δείγμα ασθενών αναφέρθηκε μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας καρδιαγγειακής νόσου κατά 56% (P= 0.03) επί των συνολικών θανάτων και 61%(P=0,05) μείωση της εμφάνισης καρκίνου, πάντα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ξεκάθαρα τον καρδιοπροστατευτικό και αντικαρκινικό ρόλο μιας δίαιτας χαμηλή σε ζωικό βούτυρο και κρέας, πλούσια σε ψάρι και προϊόντα φυτικής προέλευσης, τα οποία αποτελούν καλές πηγές α-λινολενικού οξέος.

Επιπρόσθετα η Κρητική διατροφή χαρακτηρίζεται και από χαμηλό λόγο ω-6:ω-3 λιπαρών οξέων κοντά στο 2:1 και 1:1. Τα θετικά αποτελέσματα αυτού του λόγου στην πρόληψη και αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου, στην υπέρταση , το διαβήτη, την αρθρίτιδα, και πιθανόν του καρκίνου είναι κάτι που έχει μελετηθεί ευρέως[15-22].

1.3 *Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες επίδρασης των φαινολικών ενώσεων της Μεσογειακής Δίαιτας στα εκφυλιστικά νοσήματα.*

Η Μεσογειακή Δίαιτα περιλαμβάνει μία πληθώρα πηγών φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις πρόσφατα τράβηξαν την προσοχή των επιστημόνων, εξ'αιτίας των αντιοξειδωτικών και αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων τους και της ενδεχομένης συμβολής τους στη θεραπεία και την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου.

Επιδημιολογικές μελέτες συνδέουν την υψηλή πρόσληψη φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών με το μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Στη μελέτη των ηλικιωμένων ατόμων του Zutphen, (805 άνδρες, ηλικίας 65 εως 84 ετών), η υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών (περίπου 30 mg/l) συσχετίσθηκε περίπου με 50% μείωση της θνησιμότητας από στεφανιαία καρδιαγγειακή νόσο, σε σχέση με τα άτομα που είχαν χαμηλή πρόσληψη φλαβονοειδών (<19mg/μέρα). Στη συγκεκριμένη μελέτη η πλειοψηφία των φλαβονοειδών της διατροφής προέρχονταν από το τσάι, τα κρεμμύδια και τα μήλα[23].

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν σε μία επιδημιολογική μελέτη, που διεξήχθη στη Φιλανδία, με 5133 άνδρες και γυναίκες, ηλικίας 30 εως 69 έτη.[24] Σε αυτή τη μελέτη οι συμμετέχοντες εξετάσθηκαν για 5 χρόνια και επανεξετάσθηκαν κατά τη διάρκεια των επόμενων 20 ετών. Οι συμμετέχοντες στο υψηλότερο τεταρτημόριο της πρόσληψης μήλων εμφάνισαν 50% μείωση της θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο. Μία παρόμοια μείωση παρατηρήθηκε και για τα άτομα που βρίσκονταν στο υψηλότερο τεταρτημόριο κατανάλωσης κρεμμυδιών.

Σε μία προοπτική μελέτη, όπου συμμετείχαν 34492 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στην Αιόβα η συνολική πρόσληψη φλαβονοειδών, κυρίως από μπρόκολο, συσχετίσθηκε με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης CHD (RR=0,63) στην ομάδα με την υψηλότερη πρόσληψη φλαβονοειδών[25]. Επιπλέον, η μελέτη του Rotterdam ανέφερε την υπόθεση ότι ο σχετικός κίνδυνος από αιφνίδιο έμφραγμα του μυοκαρδίου ήταν μικρότερος (RR=0,57) στα άτομα που κατανάλωναν καθημερινά τσάι σε ποσότητα μεγαλύτερη από 375ml[26]. Η πρόσληψη τσαγιού επί ένα χρόνο (1-2 φλυτζ./μέρα) έδειξε στην μελέτη Υγείας στην Περιοχή της Βοστώνης (Boston Area Health Study) μείωση του κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου, σε άνδρες και γυναίκες σε σχέση με τα άτομα που δεν έπιναν καθόλου τσάι τον προηγούμενο χρόνο.[27]

Αντιθέτως, στη μελέτη των καθηγητών υγείας (Health Professionals Study), όπου συμμετείχαν 34789 άνδρες, δεν υπήρχε καμία σχέση ανάμεσα στα νεοδιαγνωσθέντα εμφράγματα σε 496 ασθενείς και σε εκείνους που λάμβαναν φλαβονοειδή και φλαβόνες. Επίσης σε μία μελέτη του Hertog και συνεργατών, όπου μετά από 14 χρόνια επανεξετάστηκαν 334 άνδρες, ηλικίας 45 έως 59 ετών δεν διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση φλαβονοειδών ή τσαγιού και στην επίπτωση καρδιακού επεισοδίου. Αντιθέτως διαπιστώθηκε μία θετική συσχέτιση με την συνολική θνησιμότητα (RR: 1,4: 95% CI:1,0-2,0;p=0,014) Επίσης έχει αναφερθεί και μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονοειδών και την επακόλουθη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο σε 4814 άνδρες, με διαγνωσμένη καρδιοαγγειακή νόσο.[28]

Το 1979, ο St.Leger et al [29] περιέγραψε μία ισχυρή αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση κρασιού και τη θνησιμότητα από CHD σε 18 δυτικές χώρες. Επιπρόσθετες αναφορές βασισμένες στην ανάλυση παγκόσμιων στοιχείων επιβεβαίωσαν αυτή την αντίστροφη σχέση μεταξύ των δύο παραμέτρων.[30-33] Επίσης στοιχεία που υποστηρίζουν αυτή την άποψη προέκυψαν από την παρατήρηση ότι η θνησιμότητα από CHD στη Γαλλία είναι η χαμηλότερη μεταξύ των βιομηχανικών χωρών, παρά την ύπαρξη και στη χώρα αυτή υψηλού κινδύνου, από παράγοντες όπως το κάπνισμα, την δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε

λιπαρά και την έλλειψη σωματικής άσκησης, τα οποία χαρακτηρίζουν την αστική ζωή. Το φαινόμενο αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στην κατανάλωση κόκκινου κρασιού που μαζί με την μεσογειακού τύπου δίαιτα, πλούσια σε λαχανικά, αποτελούν το γνωστό «Γαλλικό παράδοξο»[34]. Το κόκκινο κρασί αποτελεί μία πλούσια και συμπυκνωμένη πηγή φαινολικών ουσιών.[35] Ανάμεσα σε αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται σε αυξημένη συγκέντρωση στο κόκκινο κρασί σε σχέση με το λευκό. Η ρεσβερατρόλη, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει απασχολήσει ένα σημαντικό αριθμό ερευνών εμφανίζει μία πληθώρα ευεργετικών για την υγεία δράσεων και πολλοί ερευνητές προτείνουν ότι είναι η κυρίως υπεύθυνη ουσία για την εμφάνιση του «Γαλλικού παράδοξου» και κατ'επέκταση των ευεργετικών δράσεων του κόκκινου κρασιού.[36]

Παρεμβατικές κλινικές μελέτες που διεξήχθησαν σε ανθρώπους διαπιστώνουν ότι πρόσληψη φαινολικών μπορεί να δράσει προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου μειώνοντας την αύξηση των παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι προδιαθέτουν για την εμφάνιση των παραπάνω νοσημάτων. Ιδιαίτερα το κόκκινο κρασί, αλλά και ο χυμός σταφυλιού φαίνεται να ασκεί ένα πολύ σημαντικό αριθμό θετικών δράσεων, οι οποίες αποδίδονται στην μεγάλη περιεκτικότητα τους σε φαινολικές ενώσεις.

Σε μία πρόσφατη κλινική μελέτη εξετάσθηκε η επίδραση μίας δίαιτας πλούσια σε φαινολικά σε αντίθεση με μία άλλη που δεν περιείχε καθόλου, στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 19 γυναίκες, ηλικίας 19-21 ετών, οι οποίες δεν κάπνιζαν και υποβλήθηκαν στις δύο δίαιτες σε δύο ξεχωριστές περιόδους, που απείχαν μεταξύ τους τρεις μέρες. Οι δίαιτες αποτελούνταν από κοινά φαγητά. Μετά από κάθε παρέμβαση λήφθηκε αίμα από τους εθελοντές στις 0, 3 και 6 ώρες και κάθε μέρα μέχρι και την $6^{η}$ μέρα της παρέμβασης. Με σκοπό να εξετασθεί, η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες πλάσματος, το αντιοξειδωτικό ένζυμο υπεροξειδάση της δισμουτάσης των ερυθροκυττάρων (SOD) και η ο βαθμός της προκαλούμενης βλάβης στο DNA των λευκοκυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι η κατανάλωση δίαιτας φτωχής σε φαινόλες ή που δεν περιείχε καθόλου οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών βιταμινών του πλάσματος (β-καροτένιο, α-τοκοφερόλη), ιδιαίτερα την $3^{η}$ και την $6^{η}$ μέρα της δίαιτας, της δράσης της SOD των ερυθροκυττάρων ενώ αλλαγές παρατηρήθηκαν και στο DNA των λευκοκυττάρων, ιδιαίτερα την $6^{η}$ μέρα της παρέμβασης,. Αντιθέτως, η δίαιτα πλούσια σε φαινολικά δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών βιταμινών, προκάλεσε αύξηση της δράσης τη SOD ιδιαίτερα την $6^{η}$ μέρα παρέμβασης. Επίσης σημειώθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη φαινολικών και τη δράση της SOD.

Σε μία παρεμβατική μελέτη, όπου δόθηκε κόκκινο ή λευκό κρασί ή αλκοόλη, για μία περίοδο 15 ημερών παρατηρήθηκε ότι το κόκκινο κρασί οδήγησε σε μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από ADP και αύξηση της HDL-χοληστερόλης.[37] Επίσης, ο Lavy et al[38] σε μία μελέτη όπου παρακολουθούσε 20υγιείς άντρες για δύο εβδομάδες, 10 εκ των οποίων κατανάλωναν 400ml λευκού κρασιού και οι άλλοι 10 κατανάλωναν 400ml κόκκινου κρασιού κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το κόκκινο κρασί αυξάνει θεαματικά

την HDL-χοληστερόλη πλάσματος και την apo-A_1 κατά 26% και 12% αντίστοιχα. Αυτές οι δράσεις δεν παρατηρήθηκαν στο λευκό κρασί. Παράλληλα ο Struck et al[39] συνέκριναν τη δράση του κόκκινου και λευκού κρασιού στα λιποειδή του ορού, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στα προϊόντα οξείδωσης σε 20 εφήβους υπερχοληστερολαιμικούς για μια περίοδο 3 μηνών. Και οι δύο τύποι κρασιού μείωσαν θεαματικά την προκαλούμενη από θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τα TBARS και την LDL-χοληστερόλη.

Σε πιο πρόσφατη κλινική έρευνα, ο Furham et al[40]ελέτησαν 17 υγιή άτομα που διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες: 8 κατανάλωσαν 400ml κόκκινου κρασιού ανά ημέρα για δύο εβδομάδες και 9 κατανάλωναν στην ίδια ποσότητα, λευκό κρασί. Η κατανάλωση κόκκινου κρασιού είχε σαν αποτέλεσμα 20% μείωση της ταχύτητας της οξείδωσης των λιποειδών του πλάσματος, παρουσία συστήματος αναγέννησης ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού μείωσε την υπεροξείδωση των λιποειδών του πλάσματος, παρουσία συστήματος αναγέννησης ελεύθερων ριζών. Παράλληλα η κατανάλωση κόκκινου κρασιού μείωσε την οξείδωση των λιποειδών στην LDL, η οποία προκαλείται από ιόντα χαλκού κατά 46%, 72% και 54% καθώς καθορίστηκε από τη μείωση του περιεχομένου, σε TBARS, σε οξειδωμένα λιποειδή και σε συζυγή διένια, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για το ξεκίνημα της οξείδωσης της LDL και η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στην LDL στα ατόμων που κατανάλωναν κόκκινο κρασί αυξήθηκε κατά 4,3 φορές από τα βασικά επίπεδα. Σε αντίθεση με τις δράσεις που είχε το κόκκινο κρασί η κατανάλωση λευκού κρασιού για δύο εβδομάδες είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας της οξείδωσης των λιποειδών της LDL πλάσματος.

Ο Goldberg et al [41,42] αν 24 υγιείς άντρες ηλικίας 26-45ετών. Καθένας κατανάλωνε 435ml κόκκινο ή λευκό κρασί για 4 εβδομάδες. Μετά από μία σειρά πειραμάτων μελέτης των λιποειδών, των λιποπρωτεϊνών, της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και της παραγωγής εικοσανοειδών δεν βρήκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, παρ΄όλο που και οι δύο ομάδες συσχετίζονταν με θεαματική ελάττωση των κύριων παραγόντων κινδύνου για ανάπτυξη CHD.

Συνακόλουθη μελέτη που έγινε σε 10 υγιή άτομα μετά από χορήγηση 113ml νερού (ομάδας αναφοράς) και ελεύθερου αλκοόλης κόκκινου και λευκού κρασιού, με κενά διαστήματα μίας εβδομάδας κατέληξε στο συμπέρασμα ότι και τα δύο παρουσίασαν in vitro δοσο–εξαρτώμενη δραστικότητα υπεροξυ-ριζών. Αξίζει όμως να τονισθεί ότι το κόκκινο κρασί ήταν 20 φορές πιο δραστικό σε σχέση με το λευκό και αυτό αποδόθηκε στο ότι η συγκέντρωση του κόκκινου κρασιού σε πολυφαινόλες είναι 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή του λευκού). Επιπρόσθετα, η χορήγηση κόκκινου κρασιού προκάλεσε θεαματική αύξηση της αντιοξειδωτικής παραμέτρου παγίδευσης ολικών ριζών (TRAP) στο πλάσμα καθώς και της συγκέντρωσης σ'αυτό 50 λεπτά μετά τη χορήγηση, ενώ το λευκό κρασί δεν έδειξε διαφορά. Η παράλληλη και άμεση αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο πλάσμα υποστηρίζει ότι οι πολυφαινόλες απορροφούνται από το άνω τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και ότι μπορούν να εμπλέκονται αμέσως στην αντιοξειδωτική άμυνα.[43]

Σε άλλη ερευνητική δουλειά ομάδες 6-9 ατόμων κατανάλωσαν κόκκινο ή λευκό κρασί από 375ml/μέρα, πολυφαινόλες κόκκινου κρασιού (RWPPs) που αντιστοιχούν σε 375ml καθώς και την ίδια ποσότητα RWPPs διαλυμένες σε λευκό κρασί. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι το κόκκινο κρασί αύξησε το χρόνο πρίν από την οξείδωση κατά 17,8 λεπτά, οι RWPPs κατά 14,2 λεπτά και οι RWPPs διαλυμένες σε λευκό κρασί κατά 11,7 λεπτά, καθώς και ότι όλες αυτές οι ομάδες μείωσαν τα TBARS, τα υπεροξείδια των λιποειδών, τα συζυγή διένια και αύξησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, Η μόνη διαφορά του λευκού κρασιού ήταν ότι αύξησε τα TBARS.[44]

Ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη, η οποία δεν αναφέρεται σε κρασί αλλά σε χυμούς από φρούτα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η προκαλούμενη από ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων του αίματος, μειώθηκε κατά 77% από το χυμό σταφυλιών ενώ οι άλλοι χυμοί δεν επηρέασαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.[45]

Τόσο οι επιδημιολογικές όσο και οι κλινικές μελέτες φαίνεται να καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η δίαιτα πλούσια σε πολυφαινόλες λειτουργεί προστατευτικά κατά των χρόνιων παθήσεων. Η μελέτη των δράσεων των φαινολικών ενώσεων έχει συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση μίας πολύ σημαντικής παραμέτρου της ευεργετικής δράσης της Μεσογειακής δίαιτας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο}

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ

2.1 Εισαγωγή[46]

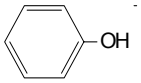
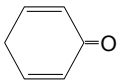
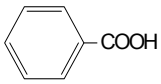
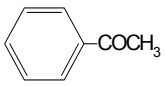
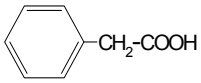
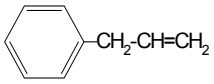
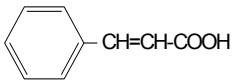
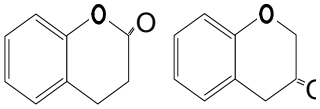
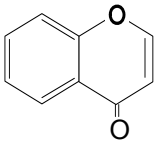
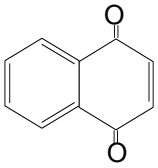
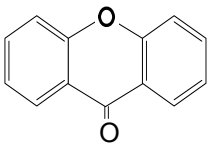
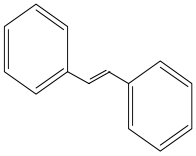
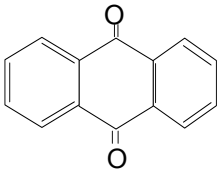
Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν άφθονο συστατικό των φυτών. Στη Μεσογειακή Δίαιτα μία ποικιλία φαινολικών ενώσεων προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής σαν συστατικά των φυτικών τροφίμων, όπως λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, φρούτα, ξηρούς καρπούς κ.α.. και στα διάφορα ποτά και αφεψήματα, που χαρακτηρίζουν τη Μεσογειακή Δίαιτα, π.χ κρασί. Τα φυτά παράγουν φαινολικά συστατικά σαν δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού τους. Οι φαινολικές ενώσεις είναι απαραίτητα συστατικά της φυσιολογίας των φυτών, καθώς εμπλέκονται στην ανάπτυξη, στην παραγωγή τους, στη μορφολογία τους, π.χ στο χρώμα και προσδίδουν στα φυτά αντίσταση έναντι των παθογόνων οργανισμών δρώντας ως φυτοαλεξίνες ή κάνουν τα φυτά στυφά και σκληρά, με αποτέλεσμα να είναι άγευστα, συμβάλλοντας στην προστασία τους από τα φυτοφάγα ζώα.

2.2 Η χημική σύσταση των διαιτητικών φαινολικών ενώσεων[46]

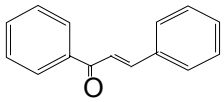
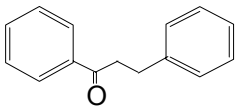
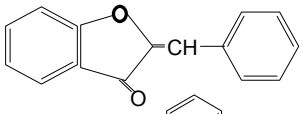
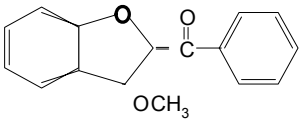
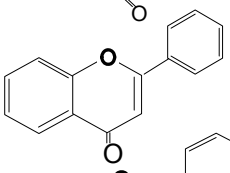
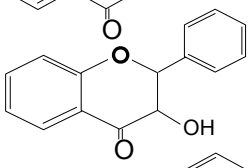
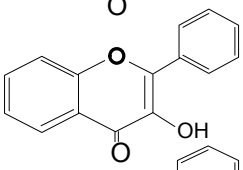
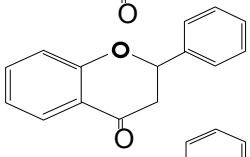
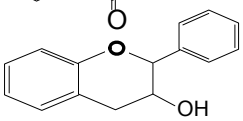
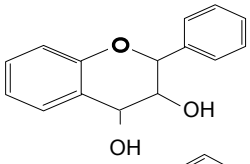
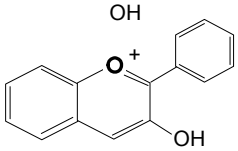
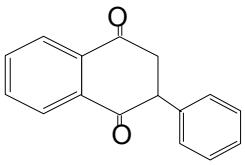
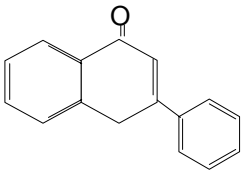
Υπάρχουν περισσότερες από 8000 φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν διαχωριστεί σε 10 τάξεις, ως προ τη χημική δομή τους. Οι κυριότερες τάξεις φαινολικών ενώσεων απεικονίζονται στον πίνακα 2.1. Οι απλές φαινόλες και τα φλαβονοειδή συνιστούν την πλειοψηφία των φαινολών στα φυτά. Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια υποκατηγορία των φαινολικών ενώσεων με σκελετό C6-C3-C6 και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 13 ομάδες, οι οποίες απεικονίζονται στον πίνακα 2.2. Το σύνολο των φλαβονοειδών φθάνει σε αριθμό τις 5000 φαινολικές ενώσεις.

Οι φαινολικές ενώσεις, που συναντώνται στα φυτά μπορεί να υπάρχουν σαν απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, αλλά και σα μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερισμένες ενώσεις (πολυφαινόλες), όπως είναι οι ταννίνες. Οι φαινολικές ενώσεις συνήθως υπάρχουν στα τρόφιμα με είτε με τη μορφή γλυκοζιτών, με ένα ή περισσότερα σάκχαρα σαν υποκαταστάτες της υδροξυλομάδας ή άμεσα συνδεδεμένα με κάποιο άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου ή ως αγλυκόνες. Τα σάκχαρα υποκαταστάτες μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή και ολιγοσακχαρίτες. Η γλυκόζη είναι το σάκχαρο που συναντάται πιο συχνά σαν υποκατάστατης.

Πίνακας 2.1 Τάξεις φαινολικών ενώσεων

Τάξη	Συντακτικός τύπος	Δομή
Απλές φαινόλες	C_6	
Βενζοκινόνες	C_6	
Φαινολικά οξέα	C_6- C_1	
Ακετοφαινόνες	C_6- C_2	
Φαινυλοξικά οξέα	C_6- C_2	
Φαινυλοπροπανοειδή	C_6- C_3	
(Υδρόξυ)κιναμμωμικά οξέα	C_6- C_3	
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες	C_6- C_3	
Χρωμόνες	C_6- C_3	
Ναφθοκινόνες	C_6-C_4	
Ξανθόνες	C_6-C_1-C_6	
Στιλβένια	C_6-C_2-C_6	
Ανθρακινόνες	C_6-C_2-C_6	
Φλαβονοειδή	C_6-C_3-C_6	
Λιγνάνες,Νεολιγνάνες	$(C_6$-$C_3)_2$	
Λιγνίνες	$(C_6$-$C_3)_n$	

Πίνακας 2.2 *Τάξεις φλαβονοειδών*

Τάξη	Δομή
Χαλκόνες	
Διϋδρόξυχαλκόνες	
Χρυσόνες	 
Φλαβόνες	
Φλαβονόλες	
Διϋδροφλαβονόλες	
Φλαβανόνες	
Φλαβανόλες	
Φλαβανοδιόλες	
Ανθοκυανιδίνες	
Ισοφαλαβονοειδή	 
Διφλαβονοειδή, Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες	

2.3 Πηγές της Μεσογειακής Δίαιτας σε φαινολικές ενώσεις[50,51,52]

Τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα αποτελούν πηγή φαινολικών ενώσεων, οι οποίες άλλωστε παράγονται από αυτά. Η Μεσογειακή Δίαιτα περιλαμβάνοντας μία ποικιλία τροφίμων φυτικής προέλευσης παρέχει τη δυνατότητα κατανάλωσης σημαντικής ποσότητας φαινολικών ενώσεων. Οι πιο σημαντικές πηγές φαινολικών ενώσεων της Μεσογειακής δίαιτας αναφέρονται παρακάτω.

Το ελαιόλαδο, κεντρικό τρόφιμο της Μεσογειακής Δίαιτας περιέχει τουλάχιστον 30 διαφορετικά είδη φαινολικών ενώσεων. Τα φαινολικά συστατικά που συναντώνται στο ελαιόλαδο σε μεγάλη συγκέντρωση είναι οι γλυκοζίτες της ολευρωπαίνης, της υδροξυτυροσόλης (3,4-διυδροξυφαινυλ αιθανόλη) και η τυροσόλη.[67] Η περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις διαφέρει ανάλογα με τον καρπό και τον τύπο του ελαιολάδου. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις κυμαίνεται από 800mg/kg εως 1mg/kg και στα περισσότερα είδη ελαιολάδου βρίσκεται πάνω από 500mg/kg. Για την περιεκτικότητα των διαφόρων τύπου ελαιολάδου έχει διαπιστωθεί ότι στο παρθένο ελαιόλαδο περιέχεται 232$\pm$15mg/kg και 62$\pm$12mg/kg στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Θέτοντας σαν μέσο όρο της συνολικής περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε πολυφαινόλες τα 500mg/kg εκτιμάται ότι η ατομική ετήσια κατανάλωση πολυφαινολών μόνο από το ελαιόλαδο είναι 9gr για την Ελλάδα, 7,5gr για την Ιταλία και 5,5gr για την Ισπανία. [48]

Στα όσπρια και τα λαχανικά η πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων ανήκουν στα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τις ταννίνες. Το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στα δημητριακά είναι λιγότερο από 1% επί ξηρής ύλης, εκτός από κάποια είδη σόργου, τα οποία μπορεί να έχουν μέχρι και 10% περιεκτικότητα. Όσπρια με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις είναι οι μαύρες ποικιλίες, όπως τα μαυρομάτικα φασόλια (red kidney beens), τα μαύρα φασόλια (*Phaseolus vulgaris*), και τα black gram (*Vigna mungo*). Τα όσπρια περιέχουν κυρίως ισοφλαβόνες, ενώ τα λαχανικά συνίστανται κυρίως από γλυκοζίτες φλαβονοειδών. Το περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στα φρούτα φθάνει τα 2-500mg/ml, αν και ορισμένες ποικιλίες πορτοκαλιών έχουν μεγαλύτερη ποσότητα, μέχρι 7000mg/ml, κυρίως λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε εσπεριδίνη (hesperidin). Το κόκκινο κρασί είναι πλούσια και συμπυκνωμένη πηγή πολυφαινολών, καθώς περιέχει πάνω από 200 είδη φαινολικών ενώσεων και σε μεγάλες ποσότητες 200-300mg/ml για το λευκό κρασί και 1000-4000mg/ml για το κόκκινο κρασί.[49]

Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή είναι άφθονα στα τρόφιμα. Τα φαινολικά οξέα συνιστούν το 1/3 των φαινολικών ενώσεων στα τρόφιμα και τα φλαβονοειδή τα 2/3.

Η κυριότερη κατηγορία των φαινολικών οξέων της δίαιτας είναι τα υδροξυκιναμικά οξέα, τα οποία συναντώνται σχεδόν σε κάθε φυτό. Ο κύριος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι το καφεϊκό οξύ, το οποίο υπάρχει στα τρόφιμα κυρίως σαν εστέρας με το κινικό οξύ και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ. Ο καφές είναι η κυριότερη πηγή χλωρογενικού οξέος στην ανθρώπινη δίαιτα. Η ημερήσια πρόσληψη χλωρογενικού οξέος στους καταναλωτές καφέ αντιστοιχεί σε 0,5-1gr, ενώ στους απέχοντες από τον καφέ συνήθως είναι λιγότερο από 100mg/μέρα.

Από την ομάδα των φλαβονοειδών, οι κύριοι εκπρόσωποι των φλαβονολών στην ανθρώπινη δίαιτα είναι η μυρισετίνη, κερκετίνη και η καπφερόλη. Η κερκετίνη βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαχανικά και

αφεψήματα και είναι η κυριότερη φλαβονόλη της διατροφής. Σε αφθονία βρίσκεται στα κρεμμύδια (0,3 mg/g στα φρέσκα κρεμμύδια) και στο τσάι (10-25mg/l).

Οι φλαβόνες είναι λιγότερο συχνές στη διατροφή και έχουν εντοπιστεί στο γλυκό κόκκινο πιπέρι (λουτεολίνη-luteolin) και στο σέλερι (απιγενίνη-apigenin).

Οι κυριότερες φλαβανόλες είναι οι κατεχίνες, οι οποίες υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στο τσάι. Πολλές ποικιλίες τσαγιού περιέχουν 200-340mg κατεχίνης, γαλλοκατεχίνης και των παραγώγων τους κυρίως στα φύλλα. Διήθημα πράσινου τσαγιού περιέχει 1g/l κατεχίνη. Άλλη σημαντική πηγή κατεχινών είναι το κόκκινο κρασί και η σοκολάτα. Κύριος εκπρόσωπος των ισοφλαβονών στα τρόφιμα είναι η γενιστεΐνη. Η σόγια είναι η κύρια πηγή ισοφλαβονών, καθώς περιέχει περίπου 1mg ανά γραμ. ξηρού σπόρου σόγιας γενιστεΐνης.

Οι φλαβανόνες εκπροσωπούνται στη διατροφή από την ταξοφιλίνη, τη ναριγενίνη και την εσπεριδίνη. Κύρια πηγή είναι τα ξινά φρούτα (Citrus) και ειδικά για την εσπεριδίνη τα πορτοκάλια (125-250mg/l χυμού).

Άλλες τάξεις φαινολικών ενώσεων, που συναντώνται στην διατροφή είναι οι ανθοκυανίνες, που αποτελούν τις χρωστικές των κόκκινων καρπών, με περιεκτικότητα που ποικίλει από 0,15mg/l στις φράουλες, 4,5 mg/l στα κεράσια εως 26mg/l στο κόκκινο κρασί. Τα στιλβένια συναντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες στη δίαιτα. Η κυριότερη διαιτητική πηγή στιλβενίων είναι τα σταφύλια, οι χυμοί σταφυλιών, το κρασί, τα φιστίκια και το φυστικοβούτυρο.[50] Παρ΄όλα αυτά έχουν λάβει τελευταία ιδιαίτερη προσοχή, λόγω της ρεσβερατρόλης, που συναντάται στο κρασί και των αντικαρκινικών ιδιοτήτων της. Τέλος τα λιγνάνια υπάρχουν σε μεγάλη ποσότητα σε όλα τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε φυτικές ίνες και ιδιαίτερα στα λινέλαια. [50]

2.4 Απορρόφηση και Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών ενώσεων[52,53]

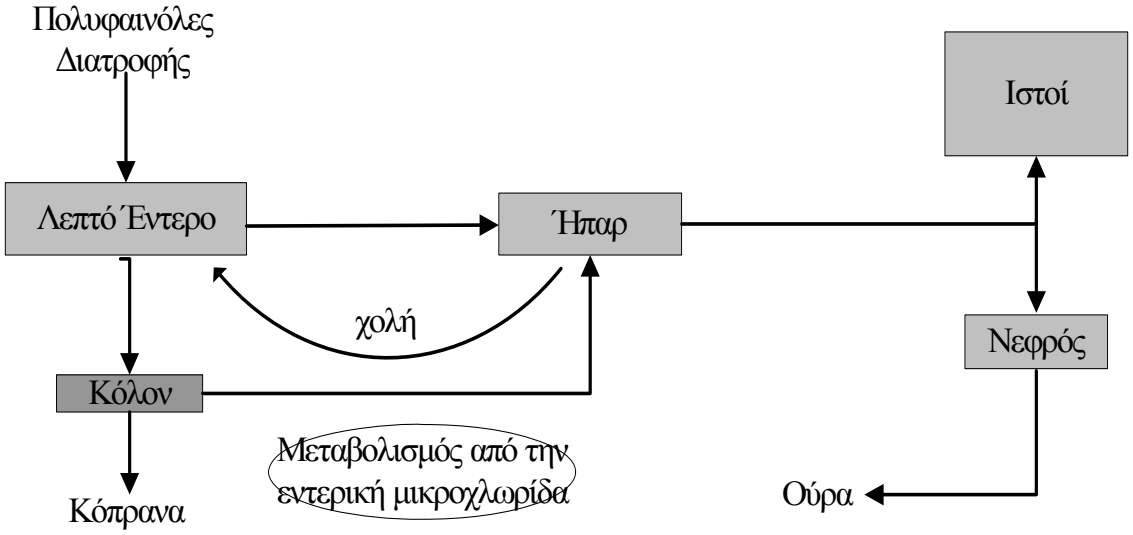
Η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων είναι σημαντικό να αναφερθούν πριν από τις βιολογικές δράσεις τους. Αν και οι φαινολικές ενώσεις είναι τα πιο κοινά συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας δεν είναι απαραίτητο ότι είναι δραστικές στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε γιατί εμφανίζουν φτωχή απορρόφηση μέσω του λεπτού εντέρου, είτε γιατί μεταβολίζονται εκτενώς σε προϊόντα τα οποία δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί, είτε γιατί αποβάλλονται σε μεγάλο βαθμό από τα ούρα. Επιπλέον, τα φαινολικά παράγωγα, τα οποία προκύπτουν από τη γαστρεντερική ή ηπατική δραστηριότητα και συναντώνται στο αίμα και στα όργανα στόχους είναι δυνατό να διαφέρουν όσον αφορά τη βιολογική τους δράση από τις μητρικές τους ενώσεις.

Η απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων διαφέρει ανάλογα με τη δομή της κάθε φαινολικής ένωσης. Οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο με παθητική διάχυση. Παρ'όλα αυτά οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις της διατροφής προσλαμβάνονται με τη μορφή εστέρων, γλυκοζιτών ή πολυμερών, τα οποία δεν μπορούν να απορροφηθούν υπό αυτή τη μορφή. Αυτές οι πιο σύνθετες ουσίες θα

πρέπει να υδρολυθούν από ένζυμα του λεπτού εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και να μετατραπούν σε αγλυκόνες. Η υδρόλυση των φαινολικών ενώσεων στο παχύ έντερο μειώνει σημαντικά την απορρόφηση τους, επειδή η εντερική μικροχλωρίδα αποικοδομεί επιπλέον τις αγλυκόνες σε απλούστερα αρωματικά οξέα. Η απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων στο στομάχι φαίνεται να είναι ελάχιστη καθώς οι πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων, που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής είναι γλυκοζιλιωμένα παράγωγα φαινολών, τα οποία αντιστέκονται στο όξινο περιβάλλον του στομάχου.

Μετά την απορρόφηση τους από το έντερο οι φαινολικές ενώσεις υποκαθίστανται αρχικά στο λεπτό έντερο και έπειτα στο ήπαρ. Οι ενδεχόμενοι υποκαταστάτες είναι τριών ειδών: μεθυλομάδα, θειοομάδα (SO_3^-, SO_4^-) και γλυκορουνικό οξύ. Η υποκατάσταση των φαινολικών ενώσεων περιορίζει τα ενδεχόμενα τοξικά αποτελέσματα των φαινολικών ενώσεων και αυξάνει τον υδρόφιλο χαρακτήρα τους διευκολύνοντας την απομάκρυνση τους από τη χολή και τα ούρα. Οι φαινολικές ενώσεις της αιματικής κυκλοφορίας είναι υποκατεστημένες ενώσεις, οι οποίες σε μεγάλο βαθμό είναι συνδεδεμένες με την αλβουμίνη. Η βαθμός σύνδεσης μίας φαινολικής ένωσης με την αλβουμίνη διαφέρει ανάλογα με τη χημική δομή της ένωσης και είναι αντιστρόφως ανάλογος με την πρόσληψη της φαινολικής ένωσης από τα κύτταρα του σώματος.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δυνατό να διεισδύουν στους ιστούς, κυρίως σε αυτούς στους οποίους μεταβολίζονται, αλλά η ικανότητα τους να συγκεντρώνονται σε ιστούς στόχους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Επίσης είναι δυνατό μέσω της χολής να περάσουν στο δωδεκαδάκτυλο, όπου υπόκεινται στη δράση βακτηριακών ενζύμων, κυρίως της β-γλυκορουνιδάσης και στη συνέχεια να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο και να επιστρέψουν πάλι στην αιματική κυκλοφορία. Έτσι πραγματοποιείται μία εντεροηπατική ανακύκλωση των φαινολικών ενώσεων, που επιμηκύνει το χρόνο παραμονής τους στο σώμα.



Εικόνα 2.1 *Μεταβολισμός τύχη των πολυφαινολών, που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής*

Όλες οι τάξεις των φλαβονοειδών εκτός από τις φλαβανόλες βρίσκονται γλυκοζυλιώμενες στα τρόφιμα. Το σάκχαρο υποκατάστασης είναι συνήθως γλυκόζη ή ραμνόζη, αλλά μπορεί επίσης να είναι γαλακτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γλυκορουνικό οξύ ή άλλα σάκχαρα, ενώ ο αριθμός περιορίζεται συνήθως στο ένα, αλλά είναι δυνατό να υπάρχουν και περισσότερα υποκατεστημένα σάκχαρα. Οι φαινολικές ενώσεις που είναι υποκατεστημένες με γλυκόζη συνήθως απορροφώνται στο λεπτό έντερο. Οι γλυκοζιλιωμένες με γλυκόζη φαινολικές ενώσεις αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για τις β-γλυκοζιδάσες, οι οποίες εκφράζονται από συγκεκριμένα ανθρώπινα κύτταρα, ανάμεσα στα οποία και τα εντερικά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Οι β-γλυκοζιδάσες για το λεπτό έντερο είναι οι LPH και για το ήπαρ και τους περισσότερους ιστούς οι CBG . Αντιθέτως, οι φαινολικές ενώσεις που είναι υποκατεστημένες με ραμνόζη αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για τις ραμνοζιδάσες, οι οποίες παράγονται από τη βακτηριακή μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Επειδή η απορρόφηση στο παχύ έντερο συμβαίνει, γενικώς, σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το λεπτό έντερο, λόγω της μικρότερης έκτασης ανταλλαγής ουσιών και της χαμηλής πυκνότητας συστημάτων μεταφοράς οι γλυκοζίτες ραμνόζης απορροφώνται πιο αργά και αποτελεσματικά σε σχέση με τους γλυκοζίτες γλυκόζης και τις αγλυκόνες, που απορροφώνται στο λεπτό έντερο. Η απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων, που είναι υποκατεστημένες με ξυλόζη ή αραβινόζη δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα.

Το παχύ έντερο αποτελεί, επίσης, το όργανο μεταβολισμού για τις εστεροποιημένες φαινολικές ενώσεις και τις φαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Οι εστεροποιημένες φαινολικές ενώσεις, όπως είναι τα υδροξυκιναμμωμικά οξέα υδρολύονται από τις εστεράσες που παράγονται από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και μεταβολίζονται μόνο εκεί καθώς δεν υπάρχουν εστεράσες στους ανθρώπινους ιστούς. Επιπλέον στο λεπτό έντερο δεν υδρολύονται ολιγομερείς πολυφαινόλες, μεγαλύτερες από τριμερείς, με αποτέλεσμα οι προανθοκυανιδίνες, οι οποίες αποτελούν πολυμερείς ενώσεις, μεγάλου μοριακού βάρους, να μην υδρολύονται στο λεπτό έντερο, αλλά από μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου.

Πέρα από τη φύση των προσλαμβανόμενων μέσω της τροφής φαινολικών ενώσεων, η απορρόφηση τους επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως: α) η αλληλεπίδραση τους με κάποια άλλα συστατικά της τροφής, όπως δεσμευμένες πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, β) διάφορες παραμέτρους της φυσιολογίας του γαστρεντερικού συστήματος, όπως το p.H, οι εντερικές ζυμώσεις, η ενεργοποίηση ή η απενεργοποίηση ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων, ή μεταφορέων των φαινολικών ενώσεων, υπό την παρουσία κάποιων μικροθρεπτικών συστατικών ή ξενοβιοτικών.

Μετά από όλα όσα περιγράφηκαν παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα επηρεάζεται από τη χημική δομή της ένωσης και από τη διαιτητική πηγή της. Μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις υποκατεστημένων φλαβονοειδών στο ανθρώπινο πλάσμα δε μπορούν να ξεπεράσουν το 1μM, όταν οι ποσότητες φαινολικών ενώσεων που λήφθησαν δεν ξεπερνούσαν την ποσότητα που λαμβάνεται μέσω της δίαιτας. Ιδιαίτερα υψηλή απορρόφηση εμφανίζουν οι ισοφλαβόνες, οι οποίες μπορεί να φθάσουν σε συγκεντρώσεις 1,4-4μM μέσα σε 6-8h, σε ενήλικες, που κατανάλωσαν σχετικά μικρή ποσότητα σόγιας, που αντιστοιχεί σε πρόσληψη περίπου 50mg ισοφλαβονών. Αυτές οι μέγιστες συγκεντρώσεις επέρχονται μέσα σε 1-2h από τη χορήγηση των φαινολικών ενώσεων,

εκτός από τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες υπόκεινται σε μερική αποικοδόμηση από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου.

Πολλές μελέτες που εξετάζουν την μεταβολική τύχη των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιούνται με χορήγηση μεγάλων δόσεων φαινολικών ενώσεων (εκατοντάδες mg ανά δόση), με αποτέλεσμα να προκαλείται κορεσμός της μεταβολικής τους πορείας και να συναντώνται στο αίμα μη υποκατεστημένες φαινολικές ενώσεις. Παρ΄όλα αυτά η ποσότητα, που λαμβάνεται μέσω της διατροφής (<100mg διαλυμένης ποσότητας) δεν είναι ικανή να προκαλέσει κορεσμό, με αποτέλεσμα την περαιτέρω επεξεργασία των φαινολικών ενώσεων μετά την απορρόφηση τους, μέσω της εντεροηπατικής ανακύκλωσης. Σε αυτή την περίπτωση σπάνια συναντώνται στο αίμα μη υποκατεστημένες φαινολικές ενώσεις ή βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες, κυρίως για σύντομο χρονικό διάστημα μετά την χορήγηση τους.

Ο ακριβής χρόνος ημίσειας ζωής-απομάκρυνσης των φαινολικών ενώσεων από το πλάσμα σπάνια υπολογίζεται με ακρίβεια. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή, τα οποία απορροφώνται μέσω του λεπτού εντέρου, υπολογίζεται ότι η απομάκρυνση τους από το αίμα γίνεται μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, 1-2h μετά την απορρόφηση τους. Η γρήγορη απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων από το πλάσμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί διευκολύνεται μέσω της υποκατάστασης των ενώσεων, ενώ ενώσεις που συνδέονται σε μεγάλο βαθμό από την αλβουμίνη του πλάσματος π.χ η κερκετίνη εμφανίζουν παρατεταμένο χρόνο παραμονής στο πλάσμα, που στη περίπτωση της κερκετίνης μπορεί να φθάσει τις 11-28h. Ο χρόνος ημίσειας ζωής για τις ανθοκυανιδίνες υπολογίζεται ότι είναι περίπου 2h, για τις φλαβανόλες 2-3h και για τις ισοφλαβόνες 4-8h, ενώ οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες μεταβολίζονται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου εμφανίζουν πολύ μεγάλο χρόνο απομάκρυνσης από το σώμα, λόγω της μεγάλης διάρκειας παραμονής τους στο παχύ έντερο. Ένα παράδειγμα των τελευταίων ενώσεων είναι το φυτοοιστρογόνο εκουόλη. Για την απομάκρυνση των μεταβολιτών της απαιτούνται 2 μέρες. Η διατήρηση μιας υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα απαιτεί επαναλαμβανόμενη πρόσληψη τους με το πέρας του χρόνου, όπως παρατηρήθηκε σε εθελοντές που κατανάλωναν τσάι κάθε 2h.

Συμπερασματικά, παρά την υψηλή απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων από το λεπτό έντερο η συγκέντρωση πλάσματος μίας φαινολικής ένωσης σπάνια ξεπερνά το 1μM, μετά την κατανάλωση 10-100mg πρόσληψη της ένωσης. Παρ΄όλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός φαινολικών μεταβολιτών, οι οποίοι παράγονται είτε από τους ιστούς, είτε από την εντερική μικροχλωρίδα και που δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί. Τέλος απαραίτητες είναι και οι μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε ανθρώπινους ιστούς, έτσι ώστε να γίνει σωστή εκτίμηση του εύρους των δράσεων, που θα μπορούσαν να έχουν οι φαινολικές ενώσεις σε συγκεκριμένους ιστούς-στόχους και στον ανθρώπινη υγεία κατ'επέκταση.

2.5 Βιολογικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων

- *Βιολογική οξείδωση* [46]

Η οξείδωση και η παραγωγή ελευθέρων ριζών, που προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο ($O^{2-\cdot}$, $HO^{\cdot}$,$NO^{\cdot}$, $NO^{2\cdot}$, $ONOO^{-}$, RO^{2-}, $RO^{\cdot}$) είναι μία διαδικασία που πραγματοποιείται φυσιολογικά στους ιστούς και στο αίμα. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν πολύ δραστικά οξειδωτικά μέσα και η δράση τερματίζεται από ενδογενή ή εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια, π.χ τα αντιοξειδωτικά ένζυμα υπεροξειδισμουτάση, καταλάση και η βιταμίνη α-τοκοφερόλη αντίστοιχα. Σε καταστάσεις αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών και μειωμένης δραστικότητας των ενδογενών αντιοξειδωτικών ή μειωμένης πρόσληψης εξωγενών αντιοξειδωτικών επέρχεται μία ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή και την εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες, το οποίο θεωρείται η αίτια πρόσκλησης και επιδείνωσης πολλών οξείων ή χρόνιων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρυνση, ο καρκίνος, διάφορες νεφροπάθειες. Μερικές από τις καταστάσεις που ευνοούν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες είναι η δίαιτα φτωχή σε φρούτα και λαχανικά, η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, η έκθεση σε UV.

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως αναγωγικά σώματα παρέχοντας ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες και σε αναγωγικά μέταλλα, με αποτέλεσμα να τα απενεργοποιούν και να μετατρέπονται οι ίδιες σε ρίζες. Παρ'όλα αυτά οι φαινολικές ρίζες έχουν μεγαλύτερη χημική σταθερότητα σε σχέση με τις ελεύθερες ρίζες και μπορούν να εμποδίσουν την διάδοση της αντίδρασης αλυσιδωτής οξείδωσης εκκαθαρίζοντας άλλες ελεύθερες ρίζες.

$$ROO\bullet + PPH \rightarrow ROOH + PP\bullet$$

$$RO\bullet + PPH \rightarrow ROH + PP\bullet$$

Με τον παραπάνω μηχανισμό δράσης οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να προστατέψουν τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως της LDL και τα λιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών από οξείδωση, γεγονότα τα οποία συμβάλλουν στην αθηρογένεση και τη δυσλειτουργία των κυττάρων, αντίστοιχα.

Η αντιοξειδωτική δραστικότητα των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται σημαντικά από τη χημική δομή τους. Η φαινόλη είναι ανενεργή από μόνη της σαν αντιοξειδωτικό, αλλά τα όρθο- και πάρα- διφαινολικά εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία αυξάνει μετά από υποκατάσταση των ομάδων υδρογόνου από αιθυλ- ή n- βουτυλ ομάδες.

- *Επίδραση φαινολικών ενώσεων στα επίπεδα χοληστερόλης*

Σε *in vitro* μελέτη μίγμα από τα φλαβονοειδή (-) επικατεχίνη, (-) επιγαλλοκατεχίνη και εστέρων τους με γαλλικό οξύ προκάλεσε μείωση της μικυλλιακής διαλυτότητας χοληστερόλης, καθώς και μείωση της εντερικής απορρόφησης της σε αρουραίους. Επίσης, σε μελέτη που έγινε με ισοραμνετίνη, ραμνετίνη, και κερκετίνη σε αρουραίους που τρέφονταν με δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη, η συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης στον ορό ήταν θεαματικά μικρότερη από εκείνη της ομάδας αναφοράς. [57]

- *Επίδραση των φαινολικών ενώσεων πάνω σε άλλα βιολογικά μόρια*

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν πρωτεΐνες. Η συγκεκριμένη δράση είναι πιο έντονη σε πολυφαινόλες μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες εμφανίζουν υψηλό βαθμό υδροξυλίωσης, ενώ οι φαινολικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους δεν είναι ικανές να δεσμεύουν πρωτεΐνες. Παρ'όλα αυτά επειδή η απορρόφηση πολυφαινολών μεγάλου μοριακού βάρους είναι περιορισμένη στον ανθρώπινο οργανισμό η απώλεια πρωτεΐνης λόγω δέσμευσης της με τις πολυφαινόλες είναι ελάχιστη στη δίαιτα.

Οι φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή μπορούν να μειώσουν την έκκριση ουρικού οξέος, που προκύπτει από το μεταβολισμό των πουρινών, μέσω της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι το ένζυμο που καταλύει την υδροξυλίωση πολλών πουρινών και μετατρέπει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και μετά σε ουρικό οξύ παρουσία μοριακού οξυγόνου ενώ συγχρόνως προκύπτει ανιόν υπεροξειδίου. Το παραγόμενο αυτό ανιόν έχει συνδεθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις. Σε μελέτη του Chang εννέα φλαβονοειδή εξετάστηκαν στην αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης συμπεριλαμβανομένου της κερκετίνης, της κατεχίνης και της επικατεχίνης και συγκρίθηκαν με αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κερκετίνη έχει την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση ακόμα και από τον αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης.[53]

- *Επίδραση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων*

Ex vivo μελέτες σε ανθρώπινα πλυμένα αιμοπετάλια έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις των κύριων φαινολικών τάξεων μπορούν να εμποδίσουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων δρώντας μέσω διαφόρων μηχανισμών.

Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι η δράση των φαινολικών ενώσεων στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαφέρει ανάλογα με την τάξη στην οποία ανήκουν. Συγκεκριμένα τα άγλυκα των φλαβονοειδών και τα παράγωγα φλαβονολών που δοκιμάστηκαν δεν επηρέασαν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, οι περισσότερες φλαβόνες αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αναστέλλοντας την πορεία σχηματισμού προθρομβωτικών μορίων, π.χ. το εικοσανοειδές 12-HETE. [60] Από τα φλαβονοειδή η κερκετίνη και η κατεχίνη βρέθηκε ότι είναι ισχυροί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μέσω ADP.[61] Επίσης, οι Corvanzier και Maclouf σε μία μελέτη όπου μελετήθηκαν 10 φλαβονοειδή διαπίστωσαν ότι όλα τα φλαβονοειδή συμπεριλαμβανομένου της κερκετίνης και της κατεχίνης μπορούσαν να αναστείλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.[58] Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι οι φλαβονόλες, άλλα όχι οι φλαβανόνες, δεσμεύονται στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων και εμποδίζουν τη συγκόλληση τους σε αγγειακό ενδοθήλιο κουνελιού προστατεύοντας το ενδοθήλιο από το σχηματισμό θρόμβου και επιπλέον δρουν θρομβολυτικά.[59] Επιπλέον μελέτες που έγιναν από την ερευνητική μας ομάδα έδειξαν ότι εκχυλισμένες φαινολικές ενώσεις, από το κρασί και το ελαιόλαδο μπορούν να αναστείλουν τη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. [62]

- *Μεταβολισμός των εικοσανοειδών*

Τα εικοσανοειδή αποτελούν πολύ δραστικά προφλεγμονώδη μόρια. Τα δύο κύρια ενζυμικά συστήματα, που εμπλέκονται στη σύνθεση εικοσανοειδών και στην εξέλιξη της τοπικής φλεγμονώδους απάντησης είναι η οδός της κυκλοξυγενάσης (COX) και της λιποξυγενάσης**.** Μέσω της οδού της κυκλοξυγενάσης παράγονται οι προσταγλαδίνες και οι θρομβοξάνες. Οι προσταγλαδίνες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρέχουν ερεθίσματα για την καρκινογένεση και εμποδίζουν τη ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και οι θρομβοξάνες εμπλέκονται σημαντικά στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα λευκοτριένια (π.χ.5-HETE(5-υδροξυ-6,8,11,14-εικοσανοικό οξύ), παράγονται μέσω της οδού της λιποξυγενάσης. Η παραγωγή των παραπάνω προφλεγμονωδών παραγόντων μπορεί να γίνονται από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και κύτταρα του αίματος, όπως τα ουδετερόφιλα, τα αιμοπετάλια κ.α [63]

Οι Corvazier και Maclouf έδειξαν ότι μερικά φλαβονοειδή αναστέλλουν το δρόμο της 5-λιποξυγενάσης σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα[64] Ο Moroney μελέτησε την ανασταλτική δράση διαφόρων γλυκοζιτών και άγλυκων φλαβονοειδών σε λευκοκύτταρα από περιτόναιο αρουραίου.[95] Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η προσθήκη του σακχάρου οδηγεί στη μείωση της ανασταλτικής ικανότητας, ενώ διατηρείται η εκλεκτικότητα στην 5-λιποξυγονάση. Στα άγλυκα φλαβονοειδή η δραστικότητα και η εκλεκτικότητα εξαρτάται από τα 3΄, 4΄ γειτονικά –OH στο B δακτύλιο. Οι φλαβόνες και τα φλαβονοειδή βρέθηκε ότι αναστέλλουν ευθέως τη σύνθεση θρομβοξανών από ραδιενεργό αραχιδονικό οξύ εξ'αιτίας της αναστολής του δρόμου της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης. [64]

Απαραίτητο ένζυμο για τη σύνθεση εικοσανοειδών από αραχιδονικό οξύ είναι η φωσφολιπάση A_2. Πέρα, όμως από το ρόλο της στην ενεργοποίηση του σχηματισμού των εικοσανοειδών η φωσφολιπάση A_2 συμμετέχει στην ενεργοποίηση ενός αριθμού άλλων μεσολαβητών φλεγμονής, όπως είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) και τα λυσοφωσφολιποειδή. Η κερκετίνη έχει βρεθεί σε in vivo πειράματα ότι αναστέλλει την παραγωγή φωσφολιπάσης A_2, σε συγκέντρωση <100μM.[66]

- *Πολυφαινόλες και καρκίνος* [67,68,69]

Σε ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα των φαρμακολογικών εφαρμογών τα φαινολικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κυττάρων προερχόμενα από ανθρώπινους και ζωικούς καρκίνους, όπως λευχαιμία, γαστρικό καρκίνο, καρκίνο του πεπτικού σωλήνα, κ.α Επιπλέον τα υδροξυλιωμένα φλαβονοειδή αλληλεπιδρούν και αναστέλλουν την μεταλλακτική ικανότητα των μεταβολιτών των πολυκυλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, που θεωρούνται ισχυρά μεταλλαξιογόνα και καρκινογόνα. Επίσης, όπως το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ παίζουνε ρόλο στην άμυνα του οργανισμού απέναντι στην καρκινογένεση αναστέλλοντας τον σχηματισμό των συστατικών με νιτρώδη ομάδα.

2.6 Εξέταση της Ρεσβερατρόλης

2.6.1 Εισαγωγή:[70]

Η ρεσβερατρόλη ανήκει, δομικά στα στιλβένια Συνθέτεται από μία ποικιλία φυτών, συμπεριλαμβανομένου και τρόφιμα, όπως είναι τα σταφύλια, τα φιστίκια (peanuts) και τα δαμάσκηνα (mulberries), σε καταστάσεις φυσιολογικού στρες στο φυτό, π.χ. τραυματισμού, ακτινοβόλησης με UV και μόλυνσης από μύκητες.

Η ρεσβερατρόλη ταυτοποιήθηκε το 1963, σαν το ενεργό συστατικό ξερών ριζών του φυτού *Polygonum cuspidatum,* που είναι επίσης γνωστό με την ονομασία Ko-jo-kon στα Γιαπωνέζικα. Το Ko-jo-kon χρησιμοποιούταν από αρχαιοτάτων χρόνων στην παραδοσιακή Κινέζικη και Γιαπωνέζικη ιατρική, ως θεραπεία για την πυώδη δερματίτιδα (suppurative dermatitis), τη γονόρροια, favus, την ασθένεια των ποδιών των αθλητών και την υπερλιπιδαιμία.

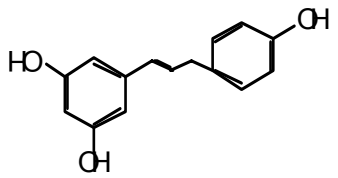
Η ρεσβερατρόλη για πρώτη φορά ανιχνεύτηκε σε χυμό σταφυλιού του είδους Vitis Vinifera το 1976 και έπειτα στο κρασί το 1992. Συντίθεται στην επιδερμίδα των αμπελόφυλλων και στην επιδερμίδα των σταφυλιών, αλλά όχι στο εσωτερικό τους. Οι φρέσκιες επιδερμίδες σταφυλιών, που δεν έχουν υποστεί ζύμωση περιέχουν 50-100mg ρεσβερατρόλης/g.

2.6.2 Πηγές ρεσβερατρόλης[71,72]

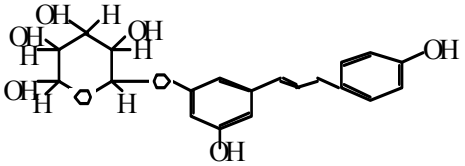
Στη φύση η ρεσβερατρόλη συναντάται με τη μορφή δύο στερεοϊσομερών της το (Ε-) ή trans- (3,5,4΄-τριυδρόξυστιλβένιο) και το (Ζ-) ή cis- ισομερές. Επίσης έχουν ανιχνευτεί στα τρόφιμα και ορισμένοι γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης. Η trans-ρεσβερατρόλη και ο γλυκοζίτης της piceid (trans- ρεσβερατρόλη-3-O-D-γυκοζίτης) συναντώνται σε σημαντική ποσότητα στο κόκκινο κρασί και στις επιδερμίδες των σταφυλιών. Αντιθέτως, η cis-ρεσβερατρόλη και οι γλυκοζίτες της δεν υπάρχουν σα φυσικό συστατικό των σταφυλιών, αλλά προκύπτει από το trans-ισομερές κατά τη διάρκεια παρασκευής του οίνου. Επίσης, η διαδικασία παρασκευής οίνου είναι καθοριστική για την περιεκτικότητα του στα παραπάνω ισομερή και γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης.

Το κόκκινο κρασί αποτελεί την κυριότερη πηγή trans-ρεσβερατρόλης Η περιεκτικότητα του κρασιού σε trans-ρεσβερατρόλη είναι ~5mg/L και η μέση συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο κρασί είναι 2,0-40,0μΜ. Η ρεσβερατρόλη έχει πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κόκκινο απ'ότι στο λευκό κρασί, επειδή η παρασκευή του κόκκινου κρασιού εμπεριέχει την επεξεργασία του σταφυλιού μαζί την επιδερμίδα του, που είναι πλούσια σε ρεσβερατρόλη. Η συγκέντρωση της trans-ρεσβερατρόλης στο λευκό κρασί κυμαίνεται από 0,02-0,11 mg/L. Επίσης η ρεσβερατρόλη υπάρχει σε μικρότερη ποσότητα στα φιστίκια και στα δαμάσκηνα, 0,02-1,79μg/gr.

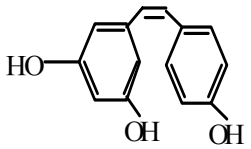
Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι επίσης και το γεγονός ότι η ρεσβερατρόλη κυκλοφορεί πλέον στην αγορά με μορφή συμπληρώματος διατροφής. Τέτοιου είδους συμπληρώματα μπορούν να παρέχουν 16mg ή και μεγαλύτερη ποσότητα ρεσβερατρόλης ανά δισκίο, ενώ δεν έχει προσδιοριστεί η συνιστώμενη ποσότητα δόσης[73,74]. Αν και η ρεσβερατρόλη φαίνεται να έχει πολλές ευεργετικές δράσεις *in vitro* και *in vivo*, η πρόσληψη τόσο μεγάλων ποσοτήτων μέσω συμπληρωμάτων διατροφής δεν είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι είναι ωφέλιμες, καθώς οι μελέτες που εξετάζουν την τύχη της προσλαμβανόμενης ρεσβερατρόλης στο ανθρώπινο σώμα είναι περιορισμένες.



3,4΄,5-τριυδοξυ-trans-στιλβένιο



trans-ρεσβερατρόλη-3-O-D-γλυκοζίτης (piceid)



3,4'.5-τριυδρόξυ-cis-στιλβένιο

Εικόνα 2.2 *Χημικές δομές ρεσβερατρόλης και παραγώγων της*

2.6.3 Μεταβολισμός – Βιοδιαθεσιμότητα[75]

Η εξέταση του μεταβολισμού της ρεσβερατρόλης έχει γίνει μέσω διαφόρων τύπων μελετών όπως *in vitro, ex vivo* και *in vivo* μελέτες, σε διάφορα πειραματικά μοντέλα και σε ανθρώπους.

Ex vivo μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματικό μοντέλο λεπτού εντέρου αρουραίου και in vitro μελέτες σε κυτταρική σειρά κυττάρων λεπτού εντέρου (Caco-2) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η

ρεσβερατρόλη απορροφάται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την χορήγηση της και σε αρκετά μεγάλο βαθμό από το λεπτό έντερο και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

In vitro μελέτες σε ηπατικά κύτταρα έδειξαν ότι το ήπαρ μπορεί να προσλάβει αρκετή ποσότητα ρεσβερατρόλης και μεταβολιτών της, είτε μέσω παθητικής διάχυσης, είτε μέσω συστήματος μεταφοράς. Παρ΄όλα αυτά σε φυσιολογικές συνθήκες μπορεί η πρόσληψη ρεσβερατρόλης από το ήπαρ να μην είναι τόσο μεγάλη λόγω της μεγάλης δέσμευσης της ρεσβερατρόλης από την αλβουμίνη και από άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος.

In vitro μελέτες, που εξέτασαν το σχηματισμό υποκατεστημέμων προϊόντων της ρεσβερατρόλης διαπίστωσαν ότι η ρεσβερατρόλη υποκαθίστανται σε μεγάλο βαθμό από τα εντερικά κύτταρα και τα ηπατικά μικροσώματα, αλλά και στο δωδεκαδάκτυλο, ενώ φάνηκε να υπερισχύει ο σχηματισμός γλυκοζυλιωμένων και υποκατεστημέμων με θειώδη ή θεϊκή ομάδα παραγώγων της,.

Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να εισέλθει γρήγορα και σε ικανοποιητική ποσότητα στην κυκλοφορία του αίματος. Παρ'όλα αυτά η εκτεταμένη υποκατάσταση της κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της μπορεί να περιορίσει σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητα της.

Οι πρώτες *in vivo* μελέτες με ρεσβερατρόλη του Bertelli et al, το 1996 που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα αρουραίου έδειξαν, επίσης, ότι η ρεσβερατρόλη εμφανίζει πολύ γρήγορη απορρόφηση από το λεπτό έντερο. Οι παραπάνω μελέτες καθώς και επόμενες σε πειραματικά μοντέλα αρουραίου και ποντικού ανίχνευσαν τη ρεσβερατρόλη στο πλάσμα 15min μετά την πρόσληψη της δία στόματος και εντόπισαν τη μέγιστη συγκέντρωση της μετά από χρονικό διάστημα 30min. Σε όλα τα πειραματικά μοντέλα η ρεσβερατρόλη ήταν εκτενώς υποκατεστημένη σε γλυκοζυλιωμένα και υποκατεστημένα με θειώδη ή θεϊκή ομάδα παράγωγα της. Αυτοί οι μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης ανιχνεύθηκαν στο αίμα μέχρι και 3h μετά την πρόσληψη ρεσβερατρόλης, ενώ σε αυτό το χρόνο η αγλυκόνη της ρεσβερατρόλης ανιχνευόταν στο πλάσμα σε ίχνη.

Η ρεσβερατρόλη μετά τη είσοδο τους στην κυκλοφορία του αίματος, είτε σε υποκατεστημένη είτε ως αγλυκόνη μπορεί να παραληφθεί από διάφορους ιστούς. Το ήπαρ φαίνεται να συγκεντρώνει ένα σημαντικό μέρος της ρεσβερατρόλης και των μεταβολιτών της. Παρ'όλα αυτά δεν είναι γνωστό αν η συσσώρευση μεταβολιτών της ρεσβερατρόλης στο ήπαρ εμφανίζεται λόγω σημαντικής υποκατάστασης της στο λεπτό έντερο και τη μετέπειτα απορρόφηση της από το ήπαρ ή λόγω του μεταβολισμού της στο ίδιο τον ιστό. Από μελέτες κινητικής του Bertelli και συνεργατών παρατηρήθηκε μία χρονοεξαρτώμενη μείωση ραδιοσημασμένης ρεσβερατρόλης με ^{14}C στο νεφρό. Αυτή η παρατήρηση επαληθεύτηκε και από την εμφάνιση υψηλών συγκεντρώσεων μεταβολιτών της ρεσβερατρόλης, 3-θειώδης-ρεσβερατρόλη και 3-γλυκοζυλο-ρεσβερατρόλη, στα ούρα δηλώνοντας είναι η κύρια οδός απομάκρυνσης της ρεσβερατρόλης από το σώμα των ζώων είναι τα ούρα.

Οι μελέτες σε ανθρώπους είναι περιορισμένες και συνήθως περιλαμβάνουν ένα μικρό αριθμό εθελοντών, από 3-12 άτομα. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα τους δεν είναι αξιόπιστα και στατιστικά σημαντικά. Παρ΄όλα αυτά είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να αναφερθούν. Όπως και στα πειραματικά μοντέλα με ζώα, έτσι και στον άνθρωπο η αγλυκόνη της trans-ρεσβερατρόλης και οι γλυκοζιλιωμένοι υποκαταστάτες της

απορροφώνται πολύ γρήγορα μετά την πρόσληψη τους δία στόματος. Η ρεσβερατρόλη και οι υποκαταστάτες της ανιχνεύονται πολύ γρήγορα στο αίμα μετά την πρόσληψη της, ενώ φθάνουν σε μέγιστη συγκέντρωση 30-60min μετά την κατανάλωση της. Επιπλέον εμφανίζεται μία δεύτερη άνοδο της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης στο αίμα περίπου 6h μετά την κατανάλωση της. Παράλληλα η απορρόφηση της δεν φάνηκε να επηρεάζεται από το μέσο χορήγησης, το οποίο ήταν είτε νερό στην περίπτωση των χυμών σταφυλιού, είτε αλκοόλ στο κρασί.

Σε όλες τις μελέτες σε ανθρώπους η trans- ρεσβερατρόλης δεν ανιχνεύθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο από 2% επί της συνολικής ρεσβερατρόλης και μερικές φορές ήταν ανύπαρκτη. Το μεγαλύτερο ποσοστό της ανιχνεύσιμης ρεσβερατρόλης ήταν γλυκοζιλιωμένη και υποκατεστημένη με θειώδη ή θειϊκή ομάδα. Παρ΄όλα αυτά η εμφάνιση της ρεσβερατρόλης σε μεγάλη συγκέντρωση στο πλάσμα 6h μετά την πρόσληψη, όπως παρατηρήθηκε και στις μελέτες με ζώα 3h μετά τη χορήγηση της δηλώνει ότι επαναρροφάται από το λεπτό έντερο μέσω της εντεροηπατικής ανακύκλωσης των φαινολικών ενώσεων και έτσι επανεμφανίζεται στην κυκλοφορία του αίματος. Επιπλέον, μελέτες σε ανθρώπους, που δέχθηκαν ενδοφλέβια χορήγηση trans-ρεσβερατρόλης διαπίστωσαν ότι η υποκατάσταση της ρεσβερατρόλης γίνεται το ίδιο έντονα και αποτελεσματικά στο αίμα όσο και στο λεπτό έντερο στην περίπτωση που λαμβάνεται δία στόματος. Τέλος η κύρια οδός απομάκρυνσης της ρεσβερατρόλης από τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως και στις *in vivo* μελέτες με ζώα διαπιστώθηκε ότι να είναι τα ούρα.

Παρά τις ενδείξεις καλής απορρόφησης και αξιοποίησης της ρεσβερατρόλης δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να εξετάζουν την απορρόφηση της όταν συνυπάρχει στα τρόφιμα μαζί με άλλα φαινολικά, που θα μπορούσαν να δράσουν ανταγωνιστικά ως προς την υδρόλυση και υποκατάσταση της, όπως συμβαίνει με την κερκετίνη, η οποία αποτελεί και συστατικό του κρασιού. Ενώ απαραίτητες κρίνονται και οι επιπλέον μελέτες σε ανθρώπους με μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών.

2.6.4 Βιολογικές δράσεις της ρεσβερατρόλη[76]

Η ρεσβερατρόλη αποτελεί μία από τις πιο φαινολικές ενώσεις του κόκκινου κρασιού, η οποία θεωρείται από πολλούς ερευνητές υπεύθυνη σε μεγάλο ποσοστό για τις ευεργετικές δράσεις του κόκκινου κρασιού στην υγεία και κατ'επέκταση για την εξήγηση του «Γαλλικού παράδοξου». Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν διαπιστώσει την ευεργετική δράση της ρεσβερατρόλης έναντι διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών, κυρίως των καρδιαγγειακών και του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένες λειτουργίες της, που συνιστούν αυτήν την προστατευτική και θεραπευτική δράση της περιγράφονται παρακάτω

- *Αντιοξειδωτική ικανότητα.*[76]

Η ρεσβερατρόλη έχει όπως και όλες οι φαινολικές ενώσεις την ιδιότητα να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες και τα αναγωγικά μέταλλα προστατεύοντας πληθώρα βιολογικών μορίων και κυττάρων από την οξείδωση.

Προστασία της LDL από οξείδωση.

Η οξείδωση της LDL λιποπρωτεΐνης φαίνεται να παίζει ένα πρωταρχικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρυνση. Η οξειδωμένη LDL αποτελεί προ-αθηρογόνο παράγοντα και το ερέθισμα για την έναρξη μίας φλεγμονώδους αντίδρασης στο ενδοθήλιο και στον υποενδοθηλιακό χώρο, που εν τέλει θα καταλήξει σε αθηρωμάτωση.

In vitro μελέτες δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη εμποδίζει την οξείδωση της LDL δεσμεύοντας αναγωγικά μέταλλα, που θα μπορούσαν να την οξειδώσουν, όπως ο χαλκός (Cu^{+2}). Η ιδιότητα της ρεσβερατρόλης να αντιδρά με το χαλκό είναι πολύ σημαντική, in vivo, καθώς είναι γνωστή η τάση της LDL να δεσμεύει ισχυρά το χαλκό και να οξειδώνεται.

Ο Frankel et al στο Πανεπιστήμιο Davis της Καλιφόρνιας ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι η προσθήκη trans-ρεσβερατρόλης σε ανθρώπινη LDL, μείωνε την καταλυόμενη από χαλκό οξείδωση της LDL. Σε συγκέντρωση 10μmol/L, η οξείδωση της LDL περιορίστηκε περισσότερο από τη ρεσβερατρόλη από οποιοδήποτε άλλο εκχύλισμα πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού. Επίσης έδειξαν ότι από τα υπόλοιπα συστατικά του κρασιού, τα στιλβένια πλην της ρεσβερατρόλης ήταν λιγότερο ισχυρά αντιοξειδωτικά από τα φλαβονοειδή, κατεχίνη και κερκετίνη.

Η trans-ρεσβερατρόλη έχει την ιδιότητα να επιμηκύνει το χρόνο έναρξης της οξείδωσης (lag time) της LDL από το χαλκό, πιο ισχυρά σε σχέση με διάφορα φλαβονοειδή, όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη ή η κερκετίνη, τα οποία υπάρχουν και στο κρασί. Μάλιστα σε συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης 1,5μmol/L, ο χρόνος έναρξης οξείδωσης της LDL από χαλκό ήταν δύο φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τα άλλα φλαβονοειδή. Αντιθέτως, η trans-ρεσβερατρόλη δεν ήταν τόσο αποτελεσματική όταν η οξείδωση της LDL προκλήθηκε από τον παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών AAPH (2,2'-azobis 2-amidinopropane dihydrochloride) και δεν δέσμευε τον σίδηρο, ο οποίος μαζί με το με το χαλκό αποτελούν στο αίμα δότες ηλεκτρονίων (αναγωγικά σώματα) κατά την οξείδωση της LDL. [77]

Τα παραπάνω αποτελέσματα επαληθεύτηκαν και από μία in vitro μελέτη σε κύτταρα μήτρας κινέζικου hamster ($CHO-K_1$). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η trans-ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 20μM μπορούσε να αποτρέψει πλήρως την οξείδωση της LDL από χαλκό, ενώ ακόμα και σε συγκέντρωση 40μM δεν μπορούσε να εμποδίσει το ίδιο ισχυρά την οξείδωση της LDL, από ελεύθερες ρίζες, που δημιουργήθηκαν, μέσω του παράγοντα AAPH. Επίσης, μετά από εκτίμηση της δράσης του LDL υποδοχέα μέσω κυτταρομετρία ροής διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με 40μM ρεσβερατρόλης επανέφερε πλήρως την πρόσληψη γηγενούς LDL από τα κύτταρα στην περίπτωση που η οξείδωση είχε επέλθει από τη δράση του χαλκού. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η trans-ρεσβερατρόλη μπορούσε να δράσει ισχυρά σαν αντιοξειδωτικό, σε συγκέντρωση 20μM έναντι της οξείδωσης της LDL από χαλκό, ενώ τα φλαβονοειδή σε συγκέντρωση 40μM δρούσαν πιο αποτελεσματικά ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών. Επιπλέον με την παρατήρηση μορφολογικών αλλαγών στο μόριο της LDL διαπιστώθηκε ότι η ρεσβερατρόλη (20μM) σε συγκέντρωση μικρότερη από τα φλαβονοειδή (40μM) προστατεύει την πρωτεΐνη

apoB της LDL από μορφολογικές αλλαγές, μέσω οξείδωσης. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι η οξείδωση της apo B πρωτεΐνης εμποδίζει την αναγνώριση της LDL, μέσω των LDL υποδοχέων της και προκαλεί την έκφραση εκκαθαριστών υποδοχέων, οι οποίοι εισάγουν ox-LDL στα κύτταρα μετατρέποντας τα σε αφρώδη. Ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων σηματοδοτεί την έναρξη της αθηρωματικής πλάκας.[78]

Η δραστικότητα της ρεσβερατρόλης ως δεσμευτής του χαλκού και ελευθέρων ριζών επηρεάζεται σημαντικά από τη θέση των υποκατεστημένων υδροξυλίων (cis- και trans- μορφή) στο μόριο της. Η L.Fremont και συνεργάτες έδειξαν ότι ικανότητα του cis-ισομερούς της ρεσβερατρόλης να δεσμεύει το χαλκό είναι η μισή από αυτή του trans-ισομερούς, ενώ δεν διαφοροποιήθηκε η δράση τους ως προς τη δέσμευση ελευθέρων ριζών. Επιπρόσθετα η δράση των ισομερών της ρεσβερατρόλης στη δέσμευση ελευθέρων ριζών, παραγόμενες από τον παράγοντα AAPH δεν ήταν τόσο σημαντική σε σύγκριση με τη δράση των φλαβονοειδών.

Από τα αποτελέσματα των *in vitro* ερευνών θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η προσλαμβανόμενη, κυρίως μέσω του κρασιού, ρεσβερατρόλη θα μπορούσε in vivo να καθυστερήσει την οξείδωση της LDL αποσύροντας το χαλκό είτε από τα μέρη της LDL είτε από τους ιστούς των αρτηριών. Η δράση της αυτή θα καθυστερούσε την κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών και των φλαβονοειδών της LDL από τις ιδιαίτερα δραστικές ελεύθερες ρίζες.[79]

Προστασία των κυτταρικών μεμβρανών

Η ρεσβερατρόλη προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες, εμποδίζοντας την οξείδωση των λιποειδών τους.[76] Ο Blond et al διαπίστωσαν ότι η ρεσβερατρόλη είχε τρεις φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την κερκετίνη, σε συγκέντρωση που ήταν απαραίτητη για τη αναστολή στο 50% της οξείδωσης προκαλούμενης από μη-ενζυμική δράση ή εξαρτώμενης από το NADPH.

Προστατεύοντας τα λιποειδή από οξείδωση, η ρεσβερατρόλη μειώνει την τοξική δράση των δραστικών ελευθέρων ριζών σε ζώντα κύτταρα. Ο Sun και συνεργάτες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να μειώσει την οξείδωση των λιποειδών των κυττάρων, επαγόμενη από σίδηρο και αιθανόλη σε PC12 κύτταρα (rat adrenal pheochromocytoma cells), που είναι ευαίσθητα στα ιόντα βαρέων μετάλλων και στη προσβολή ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, ο Chanvitayapongs et al έδειξαν ότι ένας συνδυασμός trans-ρεσβερατρόλης και βιταμίνης Ε ή βιταμίνης C προσέφεραν πιο ισχυρή προστασία στα κύτταρα, από οποιοδήποτε από τα τρία αντιοξειδωτικά μόνο τους. Από τα αποτελέσματα της μελέτης του Chanvitayapongs et al προέκυψε ότι η ρεσβερατρόλη όχι μόνο διέθετε αντιοξειδωτικές, αλλά επίσης, αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες, και επιπλέον προκαλούσε μείωση του κυτταρικού θανάτου.

Η ικανότητα της ρεσβερατρόλης να εμποδίζει την οξείδωση των λιποειδών, τόσο στις κυτταρικές μεμβράνες, όσο και στις λιποπρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα σημαντική in vivo, καθώς οι Draczynska-Lusiak et al, έδειξαν ότι ο ιστικός τραυματισμός και ο κυτταρικός θάνατος προκαλείται, μερικώς, από την ενδοκύττωση οξειδωμένης, κυτταροτοξικής VLDL και LDL.

- *Ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποειδών και λιποπρωτεϊνών*

Η επίδραση της ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό των λιποειδών έχει μελετηθεί, in vitro, κυρίως σε ηπατικά κύτταρα. Το ήπαρ αποτελεί κεντρικό όργανο ρύθμισης της πρόσληψης και έκκρισης της χοληστερόλης στο αίμα. Η χοληστερόλη μεταφέρεται σε αυτό μέσω των HDL λιποπρωτεϊνών και εκκρίνεται μέσω των VLDL λιποπρωτεϊνών, οι οποίες θα μετατραπούν στο αίμα σε LDL λιποπρωτεΐνες, που είναι ο κύριος μεταφορέας χοληστερόλης στα κύτταρα.[80] Επειδή οι αθηρωματικές πλάκες χαρακτηρίζονται από αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης, οποιοσδήποτε παράγοντας είναι ικανός να μειώσει τη συγκέντρωση του πλάσματος σε LDL αυξάνοντας ταυτόχρονα την HDL θεωρείται ιδιαίτερα ωφέλιμος.

Πρόσφατες *in vitro* μελέτες που διεξείχθηκαν στο πανεπιστήμιο του Τορόντο έδειξαν ότι μετά από επώαση ανθρώπινων κυττάρων ηπατοκαρκινώματος (HepG2-κυτταρική σειρά), τα οποία διατηρούν τις περισσότερες από τις ιδιότητες των κυττάρων φυσιολογικού ηπατικού παρεγχύματος, με αυξανόμενη συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης, μέχρι 50μmol/L μειώθηκε σημαντικά η ενδοκυτταρική συγκέντρωση απολιποπρωτεΐνης-Β της LDL. Επιπλέον, ο ρυθμός έκχυσης εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα μειώθηκε, πράγμα που μεταβολικά σημαίνει λιγότερη παραγωγή VLDL και επομένως LDL και μείωση του κινδύνου ανάπτυξης αθηρογένεσης.

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από τη μελέτη των Sebely Pal et al[81], στην ίδια κυτταρική σειρά. HepG2 κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με 5μmol/L ρεσβερατρόλης μείωσαν στο 45% την παραγωγή και έκκριση της απολιποπρωτεΐνηςΒ100 (ApoB100) στο εσωτερικό των κυττάρων σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου (μόνο θρεπτικό μέσο). Επιπλέον η επώαση των κυττάρων με πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού σε συγκέντρωση 0-10μmol/L οδήγησε, επίσης σε μείωση της ApoB100 κατά 50% στα κύτταρα και αύξηση του mRNA των LDL υποδοχέων πάνω από το 350% σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Η μείωση της ApoB100 και η αύξηση των LDL υποδοχέων αποδόθηκε από τους συγκεκριμένους ερευνητές στην ιδιότητα των πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού και της ρεσβερατρόλης να μειώνουν την ενδοκυττάρια παραγωγή χοληστερόλης αναστέλλοντας τη σύνθεση του ενζύμου σύνθεσης χοληστερόλης HMG-CoA ρεδουκτάση, όπως και η ατορβαστατίνη. Μείωση των ηπατικών επιπέδων χοληστερόλης έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ποσότητα πρώτων υλών για την παραγωγή ApoB100 και ταυτόχρονα αύξηση των LDL υποδοχέων για την πρόσληψη της από την κυκλοφορία του αίματος. Ο μειωμένος σχηματισμός ApoB100 οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό VLDL, η οποία περνώντας στο αίμα θα μετατραπεί σε LDL. Από την άλλη πλευρά η αύξηση των LDL υποδοχέων στα ηπατικά κύτταρα εκκαθαρίζει το αίμα από τη χοληστερόλη, μειώνοντας τον κίνδυνο αθηρωμάτωσης.

Οι πρώτες i*n vivo* μελέτες, που έγιναν για να αξιολογηθεί η δράση της ρεσβερατρόλης στο μεταβολισμό των λιποειδών και κατ΄επέκταση η καρδιοπροστατευτική της δράση πραγματοποιήθηκαν περίπου πριν από 20 χρόνια. Μελέτες σε αρουραίους, που είχαν γίνει υπερλιπιδαιμικοί, μέσω δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά, χορήγηση ρεσβερατρόλης και γλυκοζίτη εμπόδισε την εμφάνιση λιπώδους ήπατος, εμποδίζοντας τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης σ'αυτό. Επιπρόσθετα, αυτά τα στιλβένια

μπόρεσαν να προλάβουν τον τραυματισμό του ήπατος σε αρουραίους, που τρέφονταν με οξειδωμένα έλαια. Πιο πρόσφατες μελέτες επαληθεύουν τον προστατευτικό ρόλο της ρεσβερατρόλης κατά της αθηρογένεσης, μέσω της αλληλεπίδραση της με τα λιποειδή. Σε μία από αυτές τις μελέτες, ποντικοί με γενετική υπερχοληστερολαιμία (δεν διέθεταν υποδοχείς για την απολιποπρωτεΐνη-Ε και την LDL) και βλάβη του ενδοθηλίου, που είχε προκληθεί με laser τρέφονταν για 8 εβδομάδες με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και trans-ρεσβερατρόλη (9,6 και 96mg/kg της δίαιτας). Αν και οι συγκεντρώσεις πλάσματος των λιπιδίων (ολική χοληστερόλη και τριγλυκερίδια) παρέμειναν ίδιες και στις δύο ομάδες (κοντρόλ και δίαιτα με trans-ρεσβερατρόλη), όσοι ποντικοί τρέφονταν με ρεσβερατρόλη παρουσίασαν σημαντική μείωση (περίπου 30%) σχηματισμού αθηρώματος στην αορτή, καθώς και του θρόμβου, (περίπου 25%) που προκλήθηκε από τη δράση του laser, σε σχέση με τη ομάδα ελέγχου.[82]

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ρεσβερατρόλή, που έχει αποδειχθεί αν είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό *in vitro* μπορεί να αποτρέψει τις αρνητικές συνέπειες του αυξημένου λιπιδαιμικού προφίλ, ως αναφορά την εμφάνιση καρδιαγγειακών ασθενειών.

Παρ'όλα αυτά υπάρχουν μελέτες, που αντικρούουν την προστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης κατά της αθηρογένεσης. Σε μία μελέτη, όπου χορηγήθηκε trans-ρεσβερατρόλη (0,6mg/kg για 5 μέρες και έπειτα 1mg/kg για τις μέρες 6 εως 60) σε κουνέλια, που είχαν καταστεί υπερχοληστερολαιμικά μετά από ειδική δίαιτα δεν παρατηρήθηκε μείωση του πολύ υψηλού περιεχομένου χοληστερόλης στο πλάσμα (περίπου 30-φορές μεγαλύτερη του φυσιολογικού) και δεν άλλαξε την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της LDL, που απομονώθηκε από το πλάσμα, μετά από 12-h νηστείας. Η εικόνα της αορτής ήταν απροσδόκητη, καθώς παρατηρήθηκαν πολλοί αθηροσκληρωτικοί σχηματισμοί στα κουνέλια, που τους είχε χορηγηθεί ρεσβερατρόλη. Σε μία άλλη μελέτη η trans-ρεσβερατρόλη χορηγούνταν καθημερινά σε ενέσιμη μορφή σε θηλυκούς αρουραίους σε μεγάλες ποσότητες (20 και 40 mg/kg). Μετά από 21 μέρες θεραπείας, το λιποπρωτεινικό προφίλ έμεινε αμετάβλητο και δεν υπήρχε καμία αλλαγή στην επιδεκτικότητα των λιπιδίων τους στην οξείδωση, που προκλήθηκε μέσω της δράσης του χαλκού.

- Αντιφλεγμονώδη δράση[83]

Η φλεγμονή αποτελεί τη βάση των νοσημάτων φθοράς και των διαφόρων αλλεργιών. Διάφορα ερεθίσματα (αντιγόνα) μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών, οι οποίες δρουν τοπικά και επάγουν τη συσσώρευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα και άλλων παραγόντων, που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απάντηση, με αποτέλεσμα τη σύντομη εξάλειψη του ερεθίσματος. Παρ΄όλα αυτά η παρατεταμένη ύπαρξη ενός ερεθίσματος, όπως μπορεί να είναι οι ενεργές ελεύθερες ρίζες (ROS), η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL), η βλάβη του ενδοθηλίου κ.α έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση φθορών στους ιστούς και στο ενδοθήλιο, όπου λαμβάνει χώρα η φλεγμονώδης απάντηση, ενώ η παρατεταμένη ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απάντησης είναι δυνατό να προκαλέσει βλάβη στο ιδιαίτερα σημαντικό μηχανισμό αναστολής της φλεγμονής, ενισχύοντας τη φθορά.

Πολύ σημαντικοί προφλεγμονώδεις παράγοντες είναι η ομάδα των εικοσανοειδών, τα οποία παράγονται από αραχιδονικό οξύ. Μία σειρά in vitro μελετών δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να αναστείλει τη παραγωγή εικοσανοειδών:

Η ρεσβερατρόλη έχει φανεί ότι αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου μίας από τις δύο ισομορφές της κυκλοξυγενάσης (COX), την COX-2. Η COX-2 αποτελεί την ενεργοποιημένη μορφή της και ένα από τα πρωταρχικά γονίδια απάντησης στην φλεγμονή. Σε αντίθεση με την COX-1, η οποία εκφράζεται μερικώς στον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες, η COX-2 δεν είναι ανιχνεύσιμη σε φυσιολογικούς ιστούς, αλλά εκφράζεται άμεσα μετά από κάποιο μιτογόνο ή φλεγμονώδες ερέθισμα και σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως είναι τα νεφρά, ο εγκέφαλος, και οι καρκινικοί ιστοί. Σε μία μελέτη του Sabbaramaih K. και συνεργάτες έδειξαν ότι η trans-ρεσβερατρόλη (30μM) ανέστειλε τη δράση της COX-2 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού, (184B5/HER-κυτταρική σειρά) με αποτέλεσμα τη μείωση κατά 70% της παραγωγής προσταγλαδινών (PGE_2), ενώ η μείωση ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης.[84]

Σε μία από τις αρχικές μελέτες, που ερευνούσαν την παραπάνω ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης, ο Kimura και συνεργάτες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 10^{-6}-10^{-3} mol/L κατάφερε να εμποδίσει το σχηματισμό προιόντων λιποξυγενάσης και του TxB_2 (σταθερό μεταβολίτη του TxA_2) σε περιτοναιικά πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα αρουραίου.[85] Επίσης σε πιο πρόσφατη μελέτη του ίδιου ερευνητή φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη μπόρεσε να αναστείλει τη παραγωγή εικοσανοειδών μέσω της 5-λιποξυγενάσης, Η παραγωγή των εικοσανοειδών όπως η 5-υδροξυ-6,8,11,14-εικοσατετραενικόοξύ (5-HETE), 5,12-διυδρόξυ-6,8,10,14-εικοσατετραενικό οξύ(5,12-diHETE) και το λευκοτριένιο C4(LTC4) μειώθηκε στο 50% (IC50) μετά από επώαση ανθρώπινων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, με 8.90 x 10(-6) M, 6.70 x 10(-6) M και 1.37 x 10(-6) M, αντίστοιχα[86].

Σε ανθρώπινα κύτταρα ερυθρολευκαιμίας K562, η ρεσβερατρόλη απέτρεψε τον κυτταρικό θάνατο, που προκαλείται μέσω οξειδωτικού στρες, εξαφανίζοντας τις ελεύθερες ρίζες H_2O_2 και μειώνοντας σημαντικά τη δράση της 5-λιποξυγενάσης σε συγκέντρωση 30μM. [87]

Όλα τα στάδια, τόσο της οξείας, όσο και της χρόνιας φλεγμονής φαίνεται να δέχονται βελτίωση από τη δράση της ρεσβερατρόλης. Σε μία μελέτη επώαση μακροφάγων από το περιτόναιο ποντικών RAW 264,7 με ρεσβερατρόλη (30μM) μείωσε την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και την ενεργοποίηση της COX-2. Τα κύτταρα είχαν ενεργοποιηθεί με τον tumor promoter PMA, ελεύθερες ρίζες (ROI) και βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) με αποτέλεσμα την παραγωγή iNOS, και NO στην καλλιέργεια. Υψηλές συγκεντρώσεις iNOS στα κύτταρα, σε αντίθεση με τη μέτρια ποσότητα, που παράγεται φυσιολογικά οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή NO και των παραγώγων περοξυνιτρικών και διοξείδιο του αζώτου, τα οποία ενισχύουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Μετά από επώαση των μακροφάγων με ρεσβερατρόλη παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη μείωση του mRNA και της πρωτεΐνης του iNOS. [88]

Πολύ σημαντικό μέρος της ανοσολογικής απάντησης του ανθρώπινου σώματος, αποτελούν τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρηνα (PMN), τα οποία συμβάλλουν, επίσης στην ανάπτυξη παθογόνων καταστάσεων, όπως είναι η φλεγμονή και στην ανάπτυξη αλλεργίας.[89] Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα (PMN) μπορεί να οδηγήσει στην οξείδωση των μεμβρανικών λιποειδών, στην καταστροφή του ενδοθηλίου και στην αύξηση της αρτηριακής διαπερατότητας. Σε μία σειρά μελετών μετά από επίδραση διαφόρων παραγόντων ενεργοποίησης των PMN, έτσι ώστε να

παραχθούν ελεύθερες ρίζες από αυτά αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα των ελευθέρων ριζών, η απελευθέρωση λυσοσωμάτων από τα ουδετερόφιλα κύτταρα (neutrophil degranulation) και η έκφραση των υποδοχέων Mac-1 (μόριο προσκόλλησης) στην επιφάνεια των κυττάρων, μετά από επώαση με ρεσβερατρόλη.[90] Η απελευθέρωση λυσοσωμάτων από τα ουδετερόφιλα μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση ενζύμων, όπως η ελαστάση και η β-γλυκορουνιδάση, τα οποία έχουν συσχετισθεί με τη βλάβη του ενδοθηλίου, και τον υποενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. [91,92] Ένας ακόμα πολύ σημαντικός παράγοντας που συμβάλει στον τραυματισμό του ενδοθηλίου είναι η αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, όπως η οικογένεια των β-2 ιντεγκρινών (LFA1, Mac-1 και p150/95).[93] Η ρεσβερατρόλη, μετά από την διέγερση των PMN εμπόδισε σημαντικά την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS), την απελευθέρωση ελαστάσης και β-γλυκορουνιδάσης από τα λυσοσώματα των ουδετερόφιλων και ανέστειλε την έκφραση των β2-ιντεγκρινών και του MAC-1. Αυτά τα αποτελέσματα στηρίζουν την υπόθεση ότι η ρεσβερατρόλη έχει ανασταλτική δράση σε όλες τις φάσεις της φλεγμονώδους πορείας δηλ. από την αρχική συγκέντρωση των πολυμορφοπύρηνων, την ενεργοποίηση τους και την μετέπειτα απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων.

Επίσης, in vivo πειράματα επαληθεύουν τον αντιφλεγμονώδη ρόλο της ρεσβερατρόλης. Σε μία μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε μοντέλο αρουραίου με οίδημα στο πόδι, το οποίο προκλήθηκε από τη χορήγηση καραγενίνης.(carrageenan-induced paw edema) η ρεσβερατρόλη δεν έδιωξε το πρήξιμο, αλλά μπόρεσε μέσα σε 48 ώρες και σε συγκέντρωση 2mg/kg να αναστείλει (την υπεραλγεσία) τη βλάβη, που είχε προκαλέσει η καραγενίνη στους ιστούς.[94]

Μία σημαντική αιτία βλάβης στο ενδοθήλιο αποτελεί η επαναφορά της κυκλοφορίας του αίματος μετά την ισχαιμία, που προκαλείται από μειωμένη παροχή αίματος στους ιστούς, μετά από τραυματισμό ή από κάποιο φυσιολογικό σοκ.. Η μετισχαιμική παραγωγή ελευθέρων ριζών, που προκαλείται από την είσοδο του οξυγόνου αποτελεί την κύρια αιτία φλεγμονώδους αντίδρασης και πρόκλησης βλάβης στο ενδοθήλιο. Σε μία in vivo μελέτη, όπου αξιολογήθηκε η ικανότητα της ρεσβερατρόλης να μειώνει τη βλάβη του ενδοθηλίου μετά την ισχαιμία διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης (7 mg/Kg) μπόρεσε να περιορίσει σημαντικά την προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, η οποία ενισχύθηκε σημαντικά από τη δράση του PAF (100nM). Επιπλέον, η παραπάνω μελέτη αποτελεί ένδειξη ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να εξαλείψει μία από τις κύριες αιτίες πρόκλησης βλάβης στο ενδοθήλιο, μετά από την ισχαιμία, σε τελική συγκέντρωση όμοια με αυτή που προκαλεί 50% μείωση της οξείδωσης της LDL, in vitro.[95]

Η φλεγμονή αποτελεί σημαντική αιτία πρόκλησης και εξέλιξης της αθηροσκλήρυνσης. Η οξειδωμένη LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο παραλαμβάνεται από τα μακροφάγα και τα SMC μέσω της πρόσληψης της από τους εκκαθαριστές υποδοχείς στην επιφάνεια τους, με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε αφρώδη. In *vitro* μελέτη έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 100μM μπόρεσε να αναστείλει τη αύξηση του SR-A I υποδοχέα, μέσω αναστολής της δράσης της οδού της COX-2., μετά από επώαση λείων μυϊκών κυττάρων (SMC) ox-LDL[96]

Ρύθμιση έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενα με τη φλεγμονή

Η έκφραση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων, που εμπλέκονται στη φλεγμονή καθορίζεται από μία ομάδα πρωτεϊνών ,που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες.. Μερικοί από τους πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες είναι ο C/EBP, *fos/jun,*AP-1 και η οικογένεια των Rel μεταγραφικών παραγόντων με κυριότερο το NF-κB.[97,98]

Η παραγωγή πολλών προφλεγμονωδών, καρκινογενών παραγόντων και παραγόντων ανάπτυξης επάγεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Γι'αυτό το λόγο υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μελέτης της επίδρασης της ρεσβερατρόλης πάνω στο NF-κB. Η ανασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης πάνω στη δράση του NF-κB έχει μελετηθεί in vitro σε μία σειρά από κύτταρα, όπως οι κυτταρικές σειρές U937 (μυελοκύτταρα), Jurkat (λεμφοκύτταρα), Hela (επιθηλιακά κύτταρα). Μετά από έκθεση των παραπάνω κυττάρων στους φλεγμονώδεις παράγοντες, TNF, PMA, H_2O_2, LPS, και κεραμίδιο (ceramide) η ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν 10-20μmol/L απέτρεψε την ενεργοποίηση του NF-κB από τους παραπάνω παράγοντες.[99-100]

Αντιθέτως σε μία μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης, (ανθρώπινα αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs)) παρόμοιες με αυτές που συναντώνται in vivo στο πλάσμα μετά από μέτρια κατανάλωση κρασιού 100 nmol/L και 1 μmol/L, όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε μείωση του NF-κB, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση της δράσης του.[101] Επίσης σε μία άλλη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκαν SH-SY5Y κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με μικρές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης (<1μmol/L) φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη ευνοούσε την ενεργοποίηση της κινάσης 1 και 2, οι οποίες είναι πιθανό να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του NF-κB, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η ρεσβερατρόλη εμφάνιζε ανασταλτική δράση.[102]

- *Αντικαρκινική ιδιότητα*[103,104]

Το 1996 ο Jang και συνεργάτες δημοσίευσαν μία εργασία τους, όπου περιέγραφαν την ικανότητα της ρεσβερατρόλης να εμποδίζει την εμφάνιση καρκινογένεσης ασκώντας θεραπευτική δράση σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης, (έναρξη, πολλαπλασιασμός, μετάσταση).[105] Η εργασία αυτή αποτέλεσε έναυσμα περαιτέρω εξέτασης στα μετέπειτα χρόνια, με αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού in vitro και in vivo μελετών, που εξετάζουν την αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης.

In vivo μελέτες σε ποντίκι και αρουραίους έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη 200μg/kg εως 2mg/kg μείωσε την εμφάνιση καρκίνου, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εμφάνιση όγκων στα ζώα.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι μία πολύπλοκη και όχι τόσο καλά κατανοητή διαδικασία. Πολλοί μηχανισμοί φλεγμονής όπως η οδός της κυκλοξυγενάσης και της λυποξυγενάσης, αλλά και μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να εμπλένονται στην πρόκληση

μεταλλάξεων. Η αντιφλεγμονώδης δράση της ρεσβερατρόλης είναι λοιπόν ταυτόχρονα και αντικαρκινική.

Υπάρχει μία πληθώρα in vitro μελετών που υποστηρίζουν την αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης. Σε διάφορους τύπους κυττάρων η ρεσβερατρόλη σε 10-100μΜ φάνηκε να ασκεί να εμποδίζει πολλούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρκινογένεση.

Πίνακας2.3 In vivo μελέτες που παρουσιάζον τον αντικαρκινικό ρόλο της ρεσβερατρόλης[103]

Καρκινικό μοντέλο σε αρουραίο	***Ημερήσια δόση mg/Kg***	*Δραστικότητα*	***Max(μM) πλασματος***
Καρκίνος μαστού	100 και 10	+/-	~ 14/ ~1-2
Καρκίνος κόλον	200	+	~0,02
Καρκίνος μαστού	1	+	~0,1
Καρκίνος οισοφάγου	1ή 2	+	~0,1-1

Πίνακας2.4 In vitro μελέτες, που παρουσιάζουν την αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης σε συγκεντρώσεις 10-100μM[103]

Μηχανισμοί	*Πειραματικό μοντέλο*	*Αποτελεσματικές συγκ.ρεσβ. (μM)*
Αναστολή της ανάπτυξης	Πολ/πλες κυτταρικέ σειρές	~5-10
Πρόκληση απόπτωσης	Κύτταρα λευχαιμίας	32-100
Πρόκληση απόπτωσης	Καρκινικά κύτταρα κόλον	100
Αγωνιστής οιστρογόνου	Μαστικά κύτταρα	10-25
Αντιοιστρογόνος δράση	Μαστικά κύτταρα	0,1-1
Αναστολή παραγωγής NO, σχηματισμού ελευθέρων ριζών	Μακροφάγα	~30
Αναστολή κυτοχρώματος P450 ενζύμων: CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4	Ηπατικά κύτταρα, μικροσώματα, ανασυνδυασμένα ένζυμα	1-20
Ενεργοποίηση p53	Επιδερμικά κύτταρα ποντικού	20
Ενεργοποίηση c-jun κινάσης	Επιδερμικά κύτταρα ποντικού	10-40
Μείωση παραγωγής COX-2	Μαστικά επιθηλιακά κύτταρα	~5
Αναστολή NFκ-B	Μονοκύτταρα, μακροφάγα	30
Αναστολή NFκ-B και ενεργοποίηση AP-1	Μυελού, λεμφικά, επιθηλιακά κύτταρα	5

- *Αντιθρομβωτική ικανότητα*

Πέρα από το ρόλο τους στη αιμόσταση και στη θρόμβωση, τα αιμοπετάλια αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της πορείας της φλεγμονώδους απάντησης σε ένα ερέθισμα και της αθηρογένεσης. Η βλάβη του ενδοθηλίου προκαλεί την έκκριση παραγόντων που οδηγούν στην προσκόλληση κυττάρων του αίματος, μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του αρτηριακού ενδοθηλίου. Τα επικολλημένα στο ενδοθήλιο αιμοπετάλια μπορούν να ενεργοποιήσουν τη διαδικασία σχηματισμού θρόμβου και η συσσώρευση τους μπορεί να αποτελέσει έναρξη για την απόφραξη της αρτηρίας. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια συνδέονται με τη σύνθεση ένας σημαντικού αριθμού προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Μερικοί από αυτούς είναι τα εικοσανοειδή, που παράγονται από το αραχιδονικό οξύ, η θρομβοξάνη A_2, ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), η σεροτονίνη, TGF (transforming growth factor) και μεταβολίτες της λιποξυγενάσης, τα οποία είναι πιθανόν να διεγείρουν την επιπλέον συσσώρευση τους,[106]

Μία από της πρώτες in vitro μελέτες, που έγιναν για να διαπιστωθεί η επίδραση των φαινολικών ενώσεων στη θρόμβωση των αιμοπεταλίων έδειξε ότι σε συγκέντρωση 10^{-3} mol/L η ρεσβερατρόλη ανέστειλε τη συσσώρευση αιμοπεταλίων από το αραχιδονικό οξύ.

Πιο πρόσφατες μελέτες, οι οποίες εξέτασαν την αντιθρομβωτική ικανότητα της ρεσβερατρόλης, σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, από υγιείς εθελοντές. διαπίστωσαν ότι παρουσία trans-ρεσβερατρόλης σε συγκέντρωση 3,6 μg/L παρατηρήθηκε μείωση κατά 50,3% τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, που προκλήθηκε από το κολλαγόνο. [107] Δοκιμές με 1000 φορές αραιωμένο (Assays with a 1000-fold diluted red wine)κόκκινο κρασί, που περιείχε 3,6 μg/L πολυφαινόλες και 1,2 μg/L φυσική trans-ρεσβερατρόλη εμπόδισε την συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά 42%, ποσοστό το οποίο αυξήθηκε κατά 78% μετά από την προσθήκη στο ίδιο κρασί 1,2 μg/L trans-ρεσβερατρόλη. Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν μία συνεργιστική δράση ανάμεσα τη ρεσβερατρόλη και τα υπόλοιπα συστατικά του κόκκινου κρασιού. Οι ίδιοι ερευνητές μετά από δοκιμές με τα δύο ισομερή της ρεσβερατρόλης παρατήρησαν ότι σε παρόμοιες συγκεντρώσεις 10^{-5} M και 10^{-6} M, το cis-ισομερές μείωνε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, προκαλούμενη από κολλαγόνο κατά 43,5% και 26,8%. Αντιθέτως, το trans- ισομερές ήταν ελαφρώς λιγότερο ενεργό από το cis-ισομερές. Ως συμπέρασμα αυτής της παρατήρησης προκύπτει ότι για την αξιολόγηση της δράσης της ρεσβερατρόλης σε ζώα και ανθρώπους θα πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν το συνολικό ποσό των δύο ισομερών.[108]

Επίσης ο Pace-Asciak και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, και διαπίστωσαν ότι η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την προκαλούμενη από θρομβίνη και ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Παρ΄όλα αυτά χρειάστηκαν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης για την αναστολή στο 50% της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από ADP και θρομβίνη, 130μmol/L και 165 μmol/L, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη μπόρεσε να εμποδίσει τη σύνθεση TxB_2, HHT και σε μικρότερο βαθμό, 12-HETE, παράγοντες που εκκρίνονται από τα ίδια τα αιμοπετάλια και συμβάλλουν στην συσσώρευση τους.[109]

Η ίδια ερευνητική ομάδα διεξήγαγε ex vivo μελέτες σε 24 υγιείς άνδρες ηλικίας 26-45 ετών. Ο καθένας κατανάλωνε για 4 εβδομάδες: κόκκινο κρασί, λευκό κρασί, απλό χυμό σταφυλιού του εμπορίου και χυμό του εμπορίου εμπλουτισμένο σε ρεσβερατρόλη, με περιεκτικότητα σε trans-ρεσβερατρόλη 4mg/L. Η ημερήσια ποσότητα ήταν 375ml για το κρασί και 500ml για το χυμό σταφυλιού. Δοκιμασίες με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, που λήφθηκε από τους εθελοντές στη φάση νηστείας έδειξαν ότι τα δύο είδη κρασιού και ο εμπλουτισμένος σε ρεσβερατρόλη χυμός σταφυλιού αύξησαν την ανθεκτικότητα των αιμοπεταλίων στη συσσώρευση, προκαλούμενη από θρομβίνη και μείωσαν το περιεχόμενο των αιμοπεταλίων σε TxB_2. Ο λόγος στα αιμοπετάλια TxB_2/12-HETE αυξήθηκε μετά από την πρόσληψη χυμό του εμπορίου, ενώ μειώθηκε μετά την πρόσληψη χυμού εμπλουτισμένου σε ρεσβερατρόλη. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η trans-ρεσβερατρόλη μπορεί να απορροφηθεί από το χυμό σταφυλιού σε βιολογικά δραστικές ποσότητες, ικανές να προκαλέσουν μείωση του κινδύνου ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης. Η αδυναμία του κόκκινου κρασιού να παρουσιάσει κάποια δραματική διαφορά από το

λευκό κρασί, παρ'όλο που περιέχει 20 φορές μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών σε σχέση με το λευκό αποδόθηκε στο ότι in vivo, ο κυρίαρχος αντιθρομβωτικός παράγοντας του κρασιού ήταν η αιθανόλη. [110] Επιπλέον προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής ομάδας έδειξε ότι σε συγκέντρωση 10^{-4} M φάνηκε ότι μειώνει κατά 50% τη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, που προκλήθηκε από τη δράση του PAF, ο οποίος είχε τελική συγκέντρωση 10^{-10} M. [111]

Σε μελέτες που έγιναν από τον Olas και συνεργάτες, φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 100μg/ml εμπόδιζε ισχυρά την προσκόλληση (adhesion) των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο, μετά από προεπώαση πλυμένων αιμοπεταλίων με ρεσβερατρόλη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις πλάσματος (25-100 μg/ml, 30min, 37^0C)[112] Επίσης, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να εμπλέκεται στο μονοπάτι ενεργοποίησης της συσσώρευσης τους, λειτουργώντας σαν αντιοξειδωτικό έναντι των ελευθέρων ριζών που παράγονται από τα αιμοπετάλια, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς συσσώρευσης τους.[113]

Παρ΄όλα αυτά από τον ίδιο ερευνητή έχει διαπιστωθεί ότι επώαση αιμοπεταλίων με ρεσβερατρόλη (1-25μg/ml) μείωσε ελάχιστα τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, που προκλήθηκε από 5μM ADP ($P<0,005$) ή 10μM ADP ($P<0,005$). Μάλιστα στην περίπτωση που η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκλήθηκε από τη δράση της θρομβίνης η ρεσβερατρόλη παρουσίασε ασθενέστερη αντιθρομβωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά που δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 1-25 μg/ml.[114]

Πέρα από την ακέραιη μορφή της ρεσβερατρόλης, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και με ορισμένα παράγωγα της ρεσβερατρόλης, όπως είναι η 3-0-β-D-γλυκοπυρανόζη. Η υψηλότερη δράση της 3-0-β-D-γλυκοπυρανόζης διαπιστώθηκε με το κολλαγόνο σαν παράγοντας πρόκλησης συσσώρευσης και επίσης με τους παράγοντες στην παρακάτω σειρά: αδρεναλίνη>αραχιδονικό οξύ>ADP. Οι ίδιοι ερευνητές έχουν εξετάσει επίσης, τη δραστικότητα κι άλλων σχετικών υδροξυστιλβενίων και γλυκοζιτών, διαπιστώνοντας ότι η διαφορετική τοποθέτηση των υδροξυλομάδων και η διευθέτηση του διπλού δεσμού σχετίζεται με τη δραστικότητα τους. Αντιθέτως, η γλυκοζιλίωση των στιλβενίων φάνηκε να μειώνει τη δραστικότητα τους.[115].

- Αγγειοχαλαρωτική δράση

Ρεσβερατρόλη, προερχόμενη από τις ρίζες των φυτών Polygonum cuspidatum και multiflorum ανταγωνίστηκε μερικώς τη σύσπαση της τραχείας, που απομονώθηκε από ευαισθητοποιημένα με αντιγόνο guinea-pigs.[116] Οι Chen και Pace-Asciak[117] παρατήρησαν ότι τόσο η κερκετίνη, όσο και η trans-ρεσβερατρόλη προκάλεσαν χαλάρωση μέσω πρόκλησης απελευθέρωσης του οξειδίου του αζώτου (NO) σε ενδοθήλιο αορτής αρουραίου, στο οποίο προκλήθηκε σύσπαση. Αντιθέτως, οι Fitzpatrick και συνεργάτες[118] με σκοπό να εξετάσουν την επίδραση των προϊόντων του σταφυλιού στο καρδιαγγειακό σύστημα συνέκριναν την ικανότητα τους να προκαλούν χαλάρωση στην αορτή αρουραίου και διαπίστωσαν ότι η trans-ρεσβερατρόλη δεν είχε καμία αγγειοχαλαρωτική ιδιότητα.

- Δράση οιστρογόνου

Η δομή της ρεσβερατρόλης ομοιάζει πάρα πολύ με την δομή του συνθετικού οιστρογόνου διαιθυλστιλβεστρόλη (diethylstilbestrol).Η ρεσβερατρόλη φαίνεται ότι διαθέτει μία μικτή δράση αγωνιστή /ανταγωνιστή για τον υποδοχέα οιστρογόνου α- και β-.

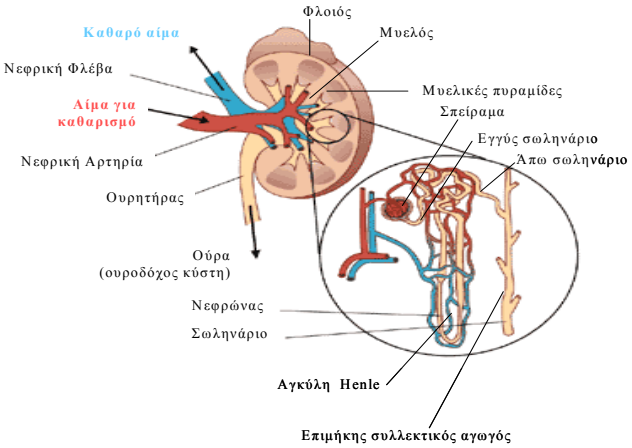
In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις 3-10μM, μετά από επώαση της με θετικά και αρνητικά ανθρώπινα κύτταρα, για εμφάνιση αδενοκαρκινώματος του μαστού, εξαρτώμενου από τη οιστρογονική δράση φάνηκε ότι μπορεί να ανταγωνίζεται την σύνδεση της οιστραδιόλης με τον υποδοχέα οιστρογόνου. Σε μία άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη κυτταρική σειρά κυττάρων καρκίνου του μαστού, η ρεσβερατρόλη φάνηκε να εμφανίζει δράση ανταγωγιστή της οιστραδιόλης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 20-160μM, αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολ/σμό.[119] Παρ΄όλα αυτά σε μία μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε η ίδια κυτταρική σειρά η ρεσβερατρόλη ενεργοποίησε τον κυτταρικό πολ/σμό των κυττάρων.[120]

3ο Κεφάλαιο

3.1 Δομή του νεφρού - Μεσαγγειακά κύτταρα[121]

Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει δυο νεφρούς σε σχήμα φασολιού. Από την εσωτερική κοίλη πλευρά βρίσκεται η νεφρική αρτηρία και φλέβα καθώς και η νεφρική πύελος που καταλήγει στον ουρητήρα. Ο κάθε νεφρός σκεπάζεται από τη νεφρική κάψα που αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό και έχει ένα εξωτερικό φλοιό και ένα εσωτερικό μυελό. Ο μυελός αποτελείται από 10-18 δομές που η κάθε μια έχει σχήμα κώνου και ονομάζονται μυελικές πυραμίδες. Ο φλοιός βρίσκεται στο χώρο ανάμεσα στις μυελικές πυραμίδες κάτω από τη νεφρική κάψα.

Ο νεφρός αποτελείται από τους νεφρώνες, τα αθροιστικά σωληνάρια και ένα μοναδικό δίκτυο μικροαγγείων. Ο ανθρώπινος νεφρός περιέχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Αυτός ο αριθμός έχει ήδη σχηματισθεί πριν από την γέννηση, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι μετά τη γέννηση του ατόμου δεν αναπτύσσονται νέοι νεφρώνες.



Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του νεφρού

3.1.1 Νεφρώνας

Ένας νεφρώνας αποτελείται από το νεφρικό σωμάτιο και ένα σύστημα σωληναρίων που τελικά καταλήγουν στο αθροιστικό σωληνάριο. Το σύστημα σωληναρίων του νεφρώνα αποτελείται από το εγγύς

σωληνάριο, το λεπτό και παχύ τμήμα της καμπύλης του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, τα οποία σκεπάζονται από μια βασική μεμβράνη που είναι συνέχεια του περιορισμένου συνδετικού ιστού που έχει το όργανο αυτό. Υπάρχουν δύο είδη νεφρώνων ανάλογα με το μήκος της αγκύλης του Henle.

Νεφρικό σωμάτιο

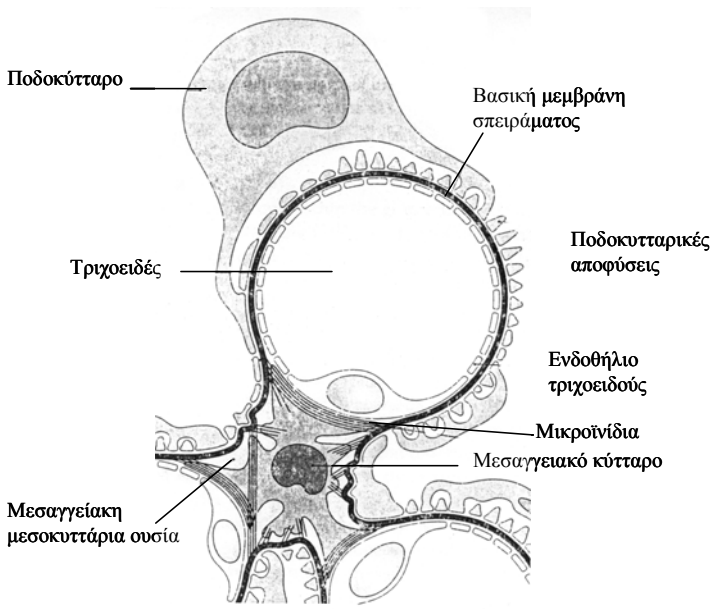
Το νεφρικό σωμάτιο αποτελείται από ένα άθροισμα από τριχοειδή, το σπείραμα, που περιβάλλονται από μια επιθηλιακή κάψα που έχει διπλά τοιχώματα και λέγεται κάψα του Bowman. Το εσωτερικό πέταλο της κάψας κολλάει στα τριχοειδή του σπειράματος και ονομάζεται περιαγγειακό πέταλο ενώ το εξωτερικό πέταλο σχηματίζει το εξωτερικό όριο του νεφρικού σωματίου και ονομάζεται τοιχωματικό πέταλο της κάψας Bowman. Ανάμεσα στα δύο πέταλα της κάψας υπάρχει ο καψικός χώρος που δέχεται το υγρό (πρόουρο) που διηθείται μέσα από τα τοιχώματα που έχουν τα τριχοειδή αγγεία και το περιαγγειακό πέταλο. Κάθε νεφρικό σωμάτιο έχει ένα αγγειακό πόλο όπου εισέρχεται το προσαγωγό αρτηρίδιο και εξέρχεται το απαγωγό αρτηρίδιο και ένα ουρικό πόλο όπου ξεκινάει το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο.

Η τοιχωματική στοιβάδα αποτελείται από επίπεδα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία στηρίζονται σε μια βασική μεμβράνη και μια λεπτή στοιβάδα από δικτυωτές ίνες ακτίνης.

Η περιαγγειακή μεμβράνη αντίθετα αποτελείται από διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα τα ποδοκύτταρα, τα οποία αποτελούνται από ένα κύριο κυτταρικό σώμα από όπου ξεκινούν πολλές πρωτογενής αποφυάδες. Από κάθε πρωτογενή αποφυάδα διακλαδίζονται πολλές δευτερογενής που αγκαλιάζουν τα τριχοειδή του σπειράματος και έρχονται σε επαφή με τη βασική μεμβράνη. Οι δευτερογενείς αποφύσεις από ένα ποδοκύτταρο αγκαλιάζουν περισσότερα από ένα τριχοειδή και οι δευτερογενείς αποφύσεις από γειτονικά κύτταρα αλληλοεισχωρούν, σχηματίζοντας στενόμακρους χώρους μεταξύ τους, τις διηθητικές σχισμές, που γεφυρώνονται από μία λεπτή μεμβράνη (διάφραγμα).

Μεσάγγειο

Η βασική μεμβράνη με 2 ή 3 τριχοειδή δημιουργεί σχηματισμούς στον κενό χώρο των οποίων βρίσκεται το μεσάγγειο που αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία . Τα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν πολλές προεκβολές που εκτείνονται στη βασική μεμβράνη και έχουν βρεθεί μικροϊνίδια ακτίνης, μυοσίνης και α-ακτινίνης. Ο χώρος που δεν καλύπτεται από τα μεσαγγειακά κύτταρα περιέχει τη μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία που περιέχει ένα πυκνό δίκτυο από ελαστικά μικροϊνίδια. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που έχουν πιστοποιηθεί στη μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία είναι διάφοροι τύποι κολλαγόνου (IV, V, VI), η φιμπριλίνη, αρκέτες γλυκοπρωτεΐνες όπως η ινωδονεκτίνη αλλά και πρωτεογλυκάνες.



Εικόνα 3.3. *Σχηματική αναπαράσταση του σπειραματικού λοβού. Φαίνεται ένα τριχοειδές και η τοποθεσία του μεσάγγειου (μεσαγγειακό κύτταρό και μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία).*

Οι βασικές δράσεις των μεσαγγειακών κυττάρων θα μπορούσαν να συνοψιστούν ως εξής:

- Δομική στήριξη του σπειράματος και ειδικά του λοβού που σχηματίζουν τα τριχοειδή αγγεία.
- Αναγέννηση και αλλαγή της σύστασης της μεσαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας .
- Αποτελούν στόχο αγγειοδραστικών παραγόντων τόσο αγγειοσυσταλτικών όπως η αγγειοτανσίνη ΙΙ, η ενδοθηλίνη, η βασοπρεσσίνη, η νορεπινεφρίνη) όσο και αγγειοδιασταλτικών όπως το NO, προσταγλαδίνες PGE2, PGI2 και της ντοπαμίνης.
- Αποτελούν στόχο φλεγμονωδών παραγόντων, παραγόντων ανάπτυξης και κυτταροκινών με τελικές δράσεις την τοπική αιμοδυναμική, τον πολλαπλασιαμό και την αλλαγή της σύστασης της μεσαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας.
- Αποτελούν πηγή αγγειοδραστικών παραγόντων, προσταγλαδινών, θρομβοξανίων, λευκοτριενίων, PAF, NO, χυμοκινών και παραγόντων ανάπτυξης
- Τόπο παραγωγής ενεργοποιητών και αναστολέων του πλασμαλογόνου
- Χειρίζονται μακρομόρια όπως λιποειδή, ανοσοσυπμλέγματα και τα προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης.

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι απαραίτητα στη δημιουργία, ανάπτυξη και διατήρηση των σπειραματικών λοβών των τριχοειδών αγγείων. Σε πειραματικό ανοσολογικό πρότυπο μεσαγγειόλυσης, η παρουσία του αντιγόνου Thy 1.1 στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων παρέχει τη δυνατότητα με έκχυση αντι-Thy 1.1 αντισώματος να επέλθει λύση των μεσαγγειακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Η λύση των μεσαγγειακών κυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια των ανεξάρτητων τριχοειδών και τη δημιουργία αγγειακών μικροανευρυσματικών σάκων, ενώ η

αναγέννηση των μεσαγγειακών κυττάρων είχε αποτέλεσμα την εκ νέου δημιουργία ανεξάρτητων τριχοειδών [122,123] Πειράματα σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με απώλεια είτε PDGF είτε του υποδοχέα για PDGF έδειξαν την αδυναμία των μεσαγγειακών κυττάρων να μεγαλώσουν κατά την ανάπτυξή του νεφρού, ενώ τα ποδοκύτταρα και η βασική σπειραματική μεμβράνη αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Η απώλεια των μεσαγγειακών κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αγγειακών σάκων αντί για ανεξάρτητα τριχοειδή. [124,125]

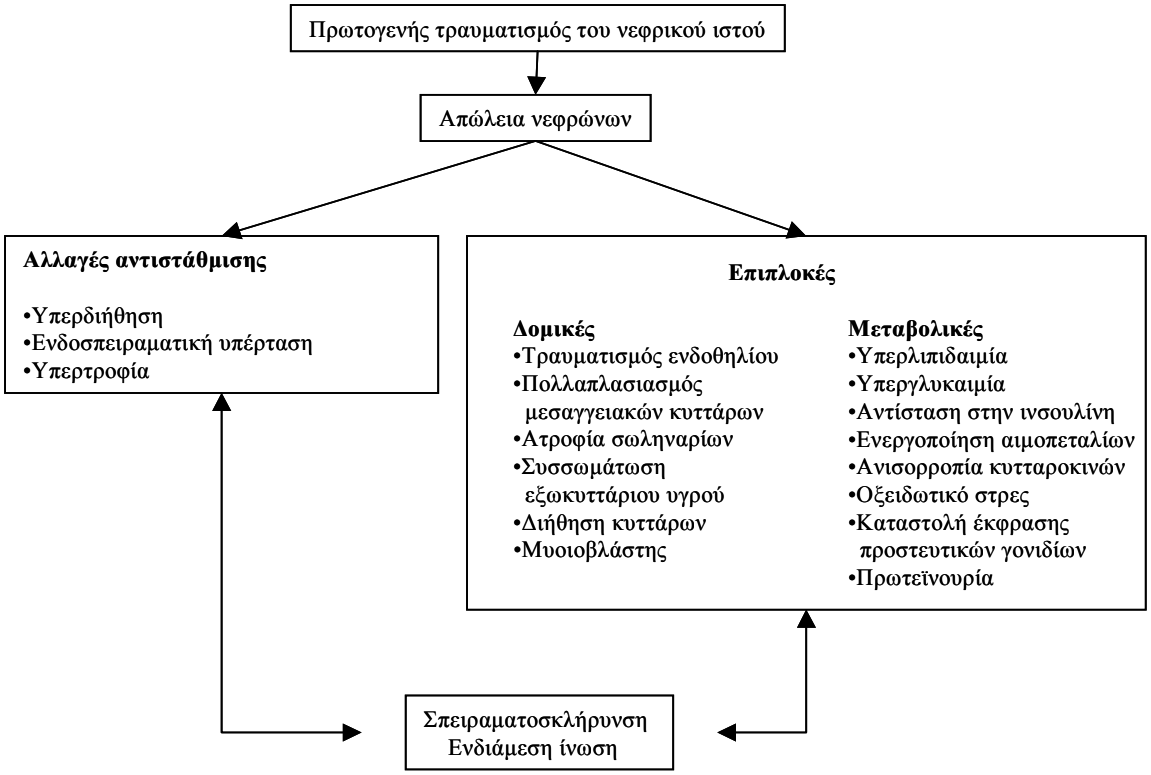
Το πειραματικό πρότυπο της μεσαγγειόλυσης έδειξε ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα εκτός από το να ρυθμίζουν τη ενδοσπειραματική πίεση στα τριχοειδή αγγεία μπορούν να ρυθμίζουν την ροή του αίματος ανεξάρτητα σε κάθε λοβό τριχοειδικών αγγείων μεταβάλλοντας με αυτό τον τρόπο ενεργή περιοχή φιλτραρίσματος[126]

3.2 Σπειραματονεφρίτιδα – Σπειραματοσκλήρυνση[121,127-131]

Οι πιο κοινές παθήσεις του νεφρού είναι αυτές που σχετίζονται με το σπείραμα, οι οποίες επίσης αποτελούν την πιο κοινή αιτία τελικού σταδίου νεφρικής ανεπάρκειας στον κόσμο. Μια πληθώρα φλεγμονωδών και μη ασθενειών επηρεάζουν το σπείραμα, και οδηγούν σε τροποποιήσεις της σπειραματικής διαπερατότητας, δομής και λειτουργίας. Κάτω από τον όρο σπειραματονεφρίτιδες συμπεριλαμβάνονται πολλές ασθένειες του σπειράματος που σχετίζονται με ανοσολογική απόκριση. Μπορούν να διακριθούν σε πρωτογενής εάν εμφανίζονται οι κλινικές ενδείξεις μόνο στο νεφρικό ιστό ή σαν δευτερογενής εάν αποτελούν μέρος μιας συστηματικής πάθησης όπως ο συστηματικός λύκος ή αγγειΐτιδες.

Από τη στιγμή που κάποιο αίτιο (αιμοδυναμικό, τοξικό, μεταβολικό, ανοσολογικό κ.α.) προκαλεί βλάβη στους νεφρούς οδηγεί στην απώλεια νεφρώνων και σε μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Το γεγονός ότι σε αρκετούς ασθενείς παρατηρήθηκε το φαινόμενο της περαιτέρω μείωσης της νεφρικής λειτουργίας παρόλο που απομακρύνθηκε το αρχικό αίτιο οδήγησε στην υπόθεση ότι εκτός από τους πρωτοπαθείς μηχανισμούς πρόκλησης νεφρικής βλάβης υπάρχουν και άλλοι δευτεροπαθείς που οδηγούν σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση του αριθμού των λειτουργικών νεφρώνων και επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Μελέτες που έγιναν τις τελευταίες δεκαετίες έχουν επισημάνει ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων κινδύνου οι οποίοι θεωρούνται ότι συμβάλουν στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής βλάβης. Αρκετές θεωρίες έχουν διατυπωθεί βασιζόμενες στις παραπάνω μελέτες που δίνουν έμφαση σε διαφορετικό παράγοντα. Ανεξάρτητα όμως του πρωτοπαθούς αιτίου που οδηγεί σε μείωσή των νεφρώνων ο οργανισμός προσπαθώντας να αντισταθμίσει την μειωμένη νεφρική λειτουργία αποκρίνεται με υπερλειτουργία και υπερτροφία των εναπομεινάντων νεφρώνων. Παρόλο που για μικρά χρονικά διαστήματα ο οργανισμός μέσω των αντισταθμιστικών ενεργειών τείνει να εξισορροπήσει τις βιοχημικές παραμέτρους και να εξασφαλίσει ικανοποιητική νεφρική λειτουργία, σε μεγάλα χρονικά διαστήματα συμβαίνουν περαιτέρω αλλαγές όπως τραυματισμός του ενδοθηλίου, βλάβη στα νεφρικά σωληνάρια, συστηματική και ενδοσπειραματική υπέρταση, διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οξειδωτικό στρες, ανισορροπία κυτταροκινών και λιποειδικών μεσολαβητών, πρωτεϊνουρία κ.τ.λ. που οδηγούν σε μακροχρόνια βλάβη. Μακροχρόνια οι

παράγοντες που συμμετέχουν στις αντισταθμιστικές αλλαγές έναντι της σπειραματικής και ενδιάμεσης-σωληναριακής βλάβης ενισχύουν ο ένας τον άλλον προκαλώντας περαιτέρω ενίσχυσή της βλάβης. Η συνεχόμενη ενίσχυση αυτών των φαινομένων οδηγεί σε δομική καταστροφή του νεφρού (σπειραματοσκλήρυνση) και σε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια Ο El Nahas υποστηρίζει ότι στην παθογένεια της σπειραματοσκλήρυνσής εμπλέκονται δυο δρόμοι. Ένας εσωτερικός που συμπεριλαμβάνει τα διηθούντα και μόνιμα σπειραματικά κύτταρα και ένας δεύτερος εξωτερικός που περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες. Αν και υπάρχουν διαφορετικές θεωρίες είναι κοινώς αποδεκτό ότι μετά από μια περίοδο προσαρμοστικών αλλαγών η σπειραματοσκλήρυνση και η ατροφία των σωληναρίων μειώνουν τον αριθμό των νεφρώνων και πυροδοτώντας την συνεχόμενη αυτο-καταστροφή των νεφρώνων με αποκορύφωμα την ίνωση, τον σχηματισμό ουλών, και την ουραιμία.



Εικόνα 3.4: Σχηματική παράσταση της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης.

3.2.1 Κύτταρα που εμπλέκονται στη φλεγμονή του σπειράματος

Οι περισσότεροι τύποι σπειραματονεφρίτιδας εμφανίζουν υπερπλασία των κυττάρων που οφείλεται είτε στη διείσδυση των κυκλοφορούντων φλεγμονωδών κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, και τα αιμοπετάλια είτε στην υπερπλασία των σπειραματικών κυττάρων και ιδίως των μεσαγγειακών. Πολλές μελέτες πιστοποιούν ότι τόσο τα κυκλοφορούντα φλεγμονώδη κύτταρα όσο και τα σπειραματικά μεσολαβούν στον τραυματισμό του σπειράματος ελευθερώνοντας οξειδωτικά, πρωτεάσες χημειοτακτικά μόρια, δραστικά λιποειδή και μόρια αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης. Σε καταστάσεις χρόνιας

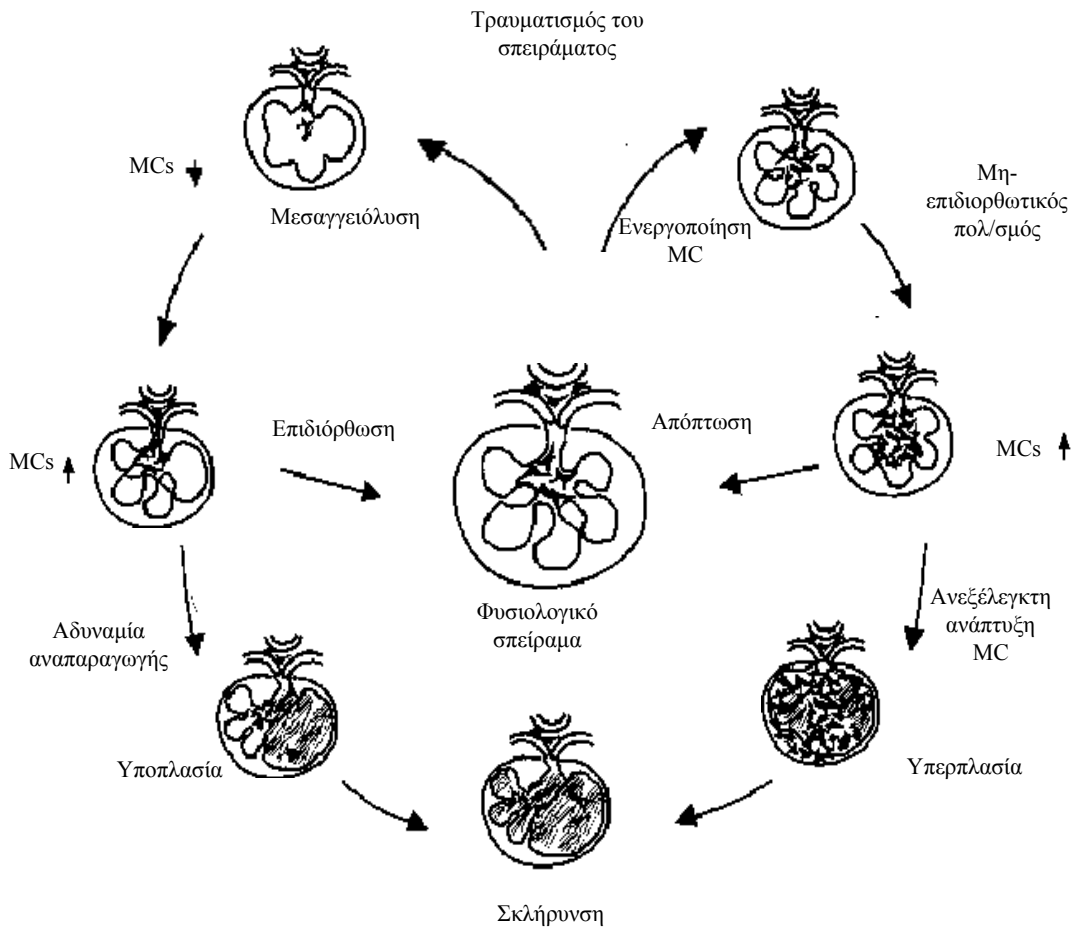
φλεγμονής η σταδιακή απώλεια κυττάρων του σπειράματος και η συσσώρευση εξωκυττάριου υγρού οδηγούν τελικά στην σκλήρυνση.

Μεσάγγειο [132]

Το μεσάγγειο εκτίθεται σε ποικιλία μακρομορίων εξαιτίας των μεγάλων ανοιγμάτων στο ενδοθήλιο των τριχοειδών και της έλλειψης βασικής μεμβράνης μεταξύ του αυλού των τριχοειδών και το ιδίου. Τα μακρομόρια που διεισδύουν στο μεσάγγειο περιλαμβάνουν παράγοντες όπως λιποπρωτεΐνες, ανοσοσυμπλέγματα και τα προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης. Τα μόρια αυτά έχουν τη δυνατότητα είτε να απομακρυνθούν από το μεσάγγειο και μέσω των καναλιών του μεσαγγείου να κατευθυνθούν προς τον σπειραματικό πόλο, είτε να παραληφθούν από τα μεσαγγειακά κύτταρα ή να μείνουν παγιδευμένα στη μεσοκυττάρια ουσία. Η μοίρα τους εξαρτάται από το μέγεθος τους, το φορτίο τους, τη συγκέντρωση τους και τη συγγένεια που έχουν είτε με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων είτε με συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας. Τα μεσσαγειακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι εκφράζουν υποδοχείς για ανοσοσυμπλέγματα όπως IgG-IgA, AGES και ότι έχουν υποδοχείς για λιποπρωτεΐνες όπως υποδοχείς LDL. Επιπλέον τα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την LDL και έχουν υποδοχείς για την τροποποιημένη LDL[133] Πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν επίσης την ύπαρξη υποδοχέων VLDL. Εάν η συγκέντρωση αυτών των μακρομορίων είναι μικρή γίνεται ενδοκύττωση τους μέσω υποδοχέα που έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση τους και διάσπαση τους από τα μεσαγγειακά κύτταρα χωρίς περαιτέρω συνέπειες. Υπάρχει όμως η πιθανότητα είτε να τροποποιηθούν, είτε να αυξηθεί τοπικά η συγκέντρωση τους, να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα και να οδηγήσουν σε φλεγμονώδη τραυματισμό του σπειράματος.

Μεσαγγειακά κύτταρα

Τα μεσαγγειακά κύτταρα αποτελούν το 1/3 των κυττάρων του σπειράματος και τα περισσότερο μελετημένα κύτταρα του σπειράματος. Ανεξάρτητα από το παθογόνο αίτιο πρόκλησης της σπειραματικής βλάβης ο ανεξέλεγκτος πολαπλασιαμός των μεσαγγειακών κυττάρων θεωρείται ότι παίζει πρωταρχικό ρόλο στην υπερπλασία του μεσαγγείου και στην πρόκληση σπειραματοσκλήρυνσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μεσαγγειακά κύτταρα ανανεώνονται με ρυθμό μικρότερο από 1%, σε ενήλικους οργανισμούς με αποτέλεσμα να μη διαθέτουν τα ίδια μηχανισμούς αναστολής της δράσης μιτογόνων παραγόντων, αλλά να προστατεύονται μέσω της δράσης ανασταλτικών παραγόντων ανάπτυξης. Ιστολογικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι ο πολ/σμός και η απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων αποτελούν επιδιορθωτικό μηχανισμό της φλεγμονής στο σπείραμα. Παρ΄όλα αυτά η παρατεταμένη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στο φαινότυπο των μεσαγγειακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την πιθανή εμφάνιση τόσο του ανεξέλεγκτου πολ/σμού (υπερπλασία) όσο και της υπερβολικής απόπτωσης τους (υποπλασία).[134]



Εικόνα 3.5. Ρόλος των μεσαγγειακών κυττάρων στη σπειραματοσκλήρυνση

Πολλοί παράγοντες με μιτογόνο δράση επάγουν τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων. Ο PDGF είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη των μεσαγγειακών κυττάρων αφού ποντίκια 'knock-out' σε PDGF στο σπείραμα παρουσίαζαν ολοκληρωτική έλλειψη μεσαγγειακών κυττάρων το σπείραμα[135,136] Επίσης, ο PDGF έχει βρεθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων, και υπερεκφράζεται σε πειραματικά μοντέλα αλλά και σε ανθρώπινη IgA νεφροπάθεια.[137,138] Ο bFGF, ο οποίος μπορεί να διεγείρει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων έχει βρεθεί όμως ότι επάγει την παραγωγή του PDGF από τα μεσαγγειακά οπότε δεν είναι γνωστό εάν πρόκειται για άμεση δράση [139,140] Άλλοι παράγοντες που *in vitro* επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MC είναι οι κυτταροκίνες (IL-1, IL-6), αγγειοδραστικές ουσίες όπως η AgII, ET, NO, προσταγλαδίνες, αδενοσίνη, και η σεροτονίνη[141] Επίσης έχουν βρεθεί εκφρασμένες σε ποικίλα μοντέλα σπειραματονεφρίτιδας με κύριο στοιχείο την υπερπλασία των μεσαγγειακών. Τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα είναι πηγές παραγόντων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των MC.

Οι αλλαγές στον φαινότυπο των μεσαγγειακών κυττάρων φαίνεται να συνδέονται με τον πολλαπλασιασμό τους. Οι αλλαγές εντοπίζονται στην έκφραση α-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων (αSMA), όπου είναι γνωστό ότι βρίσκεται σε αφθονία στα SMC, καθώς και σε άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού που σχετίζονται με τη συστολή συμπεριλαμβανομένων της βιμεκτίνης, δεσμίνης, και

μυοσίνης[142] Επίσης έχει βρεθεί σύνθεση και απόθεση κολλαγόνου I [143,144] Η παρατήρηση ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα εκφράζουν την αSMA και το κολλαγόνο I σημαίνει ότι τα ενεργοποιημένα μεσαγγειακά κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά μυοϊνοβλάστη.

3.4.2 Προτεινόμενοι μηχανισμοί πρόκλησης της σπειραματοσκλήρυνσης - Συσχέτιση σπειραματοσκλήρυνσης και αθηροσκλήρυνσης[145-146]

Οι καρδιαγγειακές ασθένειες είναι η κυριότερη αιτία θανάτου των ασθενών με εξελισσόμενη νεφρική βλάβη γεγονός που οδήγησε αρχικά στη συσχέτιση των παραγόντων κινδύνου των δυο ασθενειών.

Η αιμοδυναμική θεωρία υποστηρίζει ότι υπέρταση παίζει ρόλο στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης. Η συστηματική πίεση μπορεί να επηρεάσει την ενδοσπειραματική πίεση. Από πειράματα σε πειραματικό μοντέλο φάνηκε ότι μείωση της νεφρικής μάζας οδηγεί σε υπεραιμάτωση των εναπομενόντων λειτουργικών νεφρώνων με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης που οδηγεί σε σκλήρυνση με νέα απώλεια νεφρώνων και νέα αύξηση της ροής του αίματος οδηγώντας σε έναν φαύλο κύκλο. Έλλειψη όμως συσχέτισης μεταξύ του βαθμού σκλήρυνσης και αιμοδυναμικών χαρακτηριστικών ενισχύει την άποψη ότι και άλλοι μη αιμοδυναμικοί παράγοντες συμμετέχουν στη σκλήρυνση.

Διαταραχές στο μεταβολισμό των λιποειδών έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές νεφρικές παθήσεις[147] Η υπερλιπιδαιμία θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την στεφανιαία νόσο και έχει αναφερθεί η θεραπευτική αξία της ρύθμισης των λιποειδών του πλάσματος [148] Ήταν επομένως αναμενόμενο το ερευνητικό ενδιαφέρον να στραφεί στη συσχέτιση υπερλιπιδαιμίας και νεφρικής βλάβης.

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ νεφρικής βλάβης και υπερλιπιδαιμίας έγινε πριν από έναν αιώνα όταν ο Virchow συσχέτισε τον λιπιδαιμικό εκφυλισμό με την νεφρική βλάβη[149]. Αργότερα ο Munk περιέγραψε την παρατεταμένη απόθεση λιποειδών στο σπείραμα και το σωληνάριο σαν λιποειδική νέφρωση[150] . Ο Wilens μελετώντας διαβητικούς ασθενείς με υπέρταση παρατήρησε τη συσχέτιση μεταξύ σπειραματικής αθηροσκλήρυνσης των τριχοειδών και σπειραματικής λιπιδαιμίας και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η υπερλιπιδαιμία σε συνδυασμό με την υψηλή πίεση στα σπειράματα μπορεί να είναι υπεύθυνη για το λιποειδικό περιεχόμενο που έχει διεισδύσει στα αγγεία του σπειράματος [151].

Το 1982 ο Moorhead και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η αντισταθμιστική σύνθεση λιποπρωτεϊνών στο ήπαρ, ως απόκριση στην απώλεια λευκωματίνης μέσω των ούρων μπορεί να προκαλέσει σταδιακά νεφρική βλάβη[152]. Αυτή η υπόθεση εστιάζει στην πιθανότητα ότι η παρατεταμένη λευκωματουρία διεγείρει την εκτεταμένη σύνθεση λιποπρωτεϊνών στο ήπαρ ενισχύοντας τον τραυματισμό των νεφρώνων και μπορεί να οδηγήσει σταδιακά σε νεφρική βλάβη.

Μια σειρά μελετών σε πειραματόζωα έδειξε ότι η λήψη χοληστερόλης ως συμπλήρωμα στη δίαιτα οδηγεί σε εστιακή τμηματική σκληρυντική σπειραματονεφρίτιδα. Πειράματα σε ινδικά χοιρίδια που ακολούθησαν δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη έδειξαν να προκαλείται σπειραματική βλάβη, με κρυστάλλους χοληστερόλης στα τριχοειδή του σπειράματος και πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων στο σπείραμα., καθώς και σπειραματική υπερπλασία και επέκταση της εξωκυττάριας μεσαγγειακής ουσίας.

[153,154] Παρόμοιες μελέτες έγιναν και σε αρουραίους όπου έδειξαν ότι καθημερινή λήψη χοληστερόλης για μεγάλα χρονικά διαστήματα με την τροφή μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του σπειράματος και νεφρική βλάβη [155]. Επίσης φαίνεται να αυξάνεται η νεφρική αγγειακή αντίσταση όπως αποδείχθηκε από πειράματα έκχυσης σε απομονωμένους νεφρούς από ζώα που τρέφονταν με χοληστερόλη. Η αλλαγή στη υδραυλική πίεση των νεφρών μπορεί να προέρχεται από αγγειοδραστικά συστατικά που παράγονται από αυξημένα μακροφάγα και μεσαγγειακά κύτταρα. Η υπερλιπιδαιμία μειώνει την παραγωγή αγγειοδιασταλτικών παραγόντων όπως η προστακυκλίνη και το μονοξείδιο του αζώτου και αυξάνει τη σύνθεση αγγειοσυσταλτικών παραγόντων όπως η θρομβοξάνη Α2 και η ενδοθηλίνη[156-158]. Η βλάβη του σπειράματος είναι ακόμα μεγαλύτερη εάν προκληθεί αυξημένη συστηματική υπέρταση παρουσία της υπερλιπιδαιμίας [159]

Πιο πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν τον ρόλο των μακροφάγων σε συνδυασμό με την υπερλιπιδαιμία στην προκαλούμενη σπειραματοσκλήρυνση που ακολουθείται από την βλάβη του σπειράματος. Ο Diamond χρησιμοποιώντας πειραματικό πρότυπο σπρειραματοσκλήρυνσης σε αρουραίους PAN (προκύπτει μετά από χορήγηση αμινονουκλεοτιδίου της πουριμυκίνης) έδειξε ότι κατά την έντονη νεφρωτική φάση, όπου η πρωτεΐνοουρία και η υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αύξηση, η φαγοκύτωση των περιτοναϊκών μακροφάγων και η βασική παραγωγή εικοσανοειδών ήταν αυξημένες σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα [160].

Παρ'όλο όμως τον μεγάλο αριθμό μελετών που συνδέουν την υπερλιπιδαιμία με τη νεφρική βλάβη υπάρχουν κάποιες αξιοπρόσεκτες εξαιρέσεις. Μελέτη που έγινε σε κουνέλια Watanabe με κληρονομική υπερλιπιδαιμία τα οποία χαρακτηρίζονταν από έλλειψη των υποδοχέων της LDL και υπερχοληστερολαιμία, ανέπτυξαν αθηροσκλήρωση αλλά όχι νεφρική βλάβη [161]. Επίσης δεν υπήρχαν στοιχεία νεφρικής βλάβης σε πρότυπο υπερχοληστερολαιμικών αρουραίων[162]. Επιπλέον η οικογενειακή υπερχοληστερολαιμία δεν σχετίζεται συνήθως με νεφρική ανεπάρκεια και η νεφρική βλάβη σπάνια συναντάται σε ανθρώπους με πρωτογενή υπερλιπιδαιμία. Εξαίρεση αποτελούν οι περιπτώσεις παχυσαρκίας και κληρονομικής έλλειψης του ενζύμου λεκιθίνη:χοληστερόλη ακυλοτρανφεράση που προκαλούν νεφρική ανεπάρκεια σε ορισμένες περιπτώσεις.[163,164.]

Φαίνεται επομένως να απουσιάζουν κλινικά και πειραματικά στοιχεία που να επιβεβαιώνουν ότι η υπερλιπιδαιμία από μόνη της προκαλεί νεφρική βλάβη συνηγορώντας ότι εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες στην πρόκληση και εξέλιξη της νεφρικής βλάβης.

Η καλύτερη κατανόηση της παθογένεσης της αθηροσκλήρωσης βοήθησε και στην κατανόηση της σπειραματοσκλήρυνσης και υποστήριξε το ρόλο των λιποπρωτεϊνών σαν μεσολαβητές της νεφρικής βλάβης. Η θεωρία της απόκρισης στον τραυματισμό θεωρεί ότι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου είναι το αρχικό βήμα στην πρόκληση της βλάβης, ενώ η εξέλιξη της θεωρίας επισημαίνει ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, που επιτρέπει την αυξημένη διαπερατότητα λιποπρωτεϊνών είναι ικανή να ξεκινήσει τη βλάβη[165]. Τα τελευταία χρόνια μια σειρά μελετών επισημαίνουν ότι η αθηροσκλήρυνση και η σπειραματοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά και έχει προταθεί ο όρος «σπειραματική αθηροσκλήρωση» [166,167] Οι ομοιότητες μεταξύ των δυο παθήσεων περιλαμβάνουν τον μη φυσιολογικό μεταβολισμό λιποειδών, τον αρχικό τραυματισμό του ενδοθηλίου, τον συνεχόμενο

πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ή μεσαγγειακών κυττάρων, τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, την επέκταση της εξωκυττάριας ουσίας, την νέκρωση του ιστού και τελικά τη σκλήρυνση. Κύρια στοιχεία αυτής της ομοιότητας είναι το γεγονός ότι το σπείραμα έχει κύτταρα τα οποία είναι γνωστό ότι αποκρίνονται στον τραυματισμό της αρτηρίας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα, ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα που είναι τα κύρια κύτταρα του σπειράματος ομοιάζουν με τα VSMC στην προέλευση, ανατομία, ιστοχημεία και συσταλτικότητα και ότι η βασική σπειραματική μεμβράνη (GBM) είναι ικανή να δεσμεύσει λιποπρωτεΐνες από πλάσμα ανθρώπου[168-171]. Επομένως ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην αθηροσκλήρυνση βρίσκει εφαρμογή και στην σπειραματοσκλήρυνση. Ο Ross καθιέρωσε την αθηροσκλήρυνση ως φλεγμονώδη νόσο επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του Virchow και άρχισε επομένως να γίνεται πιο ξεκάθαρος ο ρόλος της φλεγμονής και στην περίπτωση της σπειραματοσκλήρυνσης [172,173]

Η διαδικασία της φλεγμονής είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διαδικασία, γι'αυτό είναι δύσκολο να περιγραφεί η ακριβής αλληλουχία των γεγονότων. Πιθανώς η LDL να αναγεννά προ-φλεγμονώδη μηνύματα που ξεκινάνε έναν καταρράκτη γεγονότων. Τα στοιχεία προτείνουν ότι τα οξειδωμένα παράγωγα της LDL, συμπεριλαμβανομένων οξυστερόλες, apo-B, λιπαρά οξέα αλλά κυρίως οξειδωμένα φωσφολιποειδή μπορούν να δράσουν ως προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές όταν παγιδευτούν στον υποενδοθηλιακό χώρο και οδηγούν σε αιμοδυναμική αλλαγή, αύξηση της οξείδωσης της LDL, στρατολόγηση μονοκυττάρων, πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και σχηματισμό ινώδους ιστού.

Η LDL και άλλες λιποπρωτεΐνες (VLDL, και IDL) σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, ενισχύουν την έκκριση κυτταροκινών όπως IL-6, TGF-β, PDGF από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMC) ενώ η ox-LDL ενισχύει την παραγωγή TNFα.[174] Ακόμα και η ελάχιστα τροποποιημένη LDL μπορεί να προκαλέσει έκκριση TNFα σε μεσαγγειακά αρουραίου [175], ενώ επίσης παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση του mRNA του PDGF παρατηρήθηκε σε HMC μετά από επώαση με LDL [176]. Παρ'όλο που το αρχικό συμβάν στην πρόκληση του μηχανισμού της αθηροσκλήρωσης δεν έχει διευκρινισθεί, η οξειδωτική τροποποίηση πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση. Η Ox-LDL είναι κυτταροτοξική συγκρινόμενη με την γηγενή LDL [177]. Όλοι οι κύριοι τύποι κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα (ενδοθηλιακά, SMC, μονοκύτταρα/μακροφάγα) είναι ικανοί να προκαλέσουν *in vitro* οξειδωτική τροποποίηση της LDL [178-180]. Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι πιθανό να συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία αφού μεσαγγειακά κύτταρα τόσο από αρουραίο όσο και από άνθρωπο μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση της LDL[181-182].

Μελέτες επίσης επισημαίνουν τον ρόλο των μακροφάγων σε συνδυασμό με την υπερλιπιδαιμία στην εξέλιξη της αρχικής φλεγμονής σε σπειραματοσκλήρυνση, ενώ ξεκάθαρες είναι οι δράσεις της τροποποιημένης LDL στην στρατολόγηση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων (άμεσα), ή επάγοντας την παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων και παραγόντων προσκόλλησης όπως MCP-1, m-CFF, IL-1β αλλά και άλλων μορίων προσκόλλησης (έμμεσα)[183-186]. Η επαγόμενη από την ox-LDL παραγωγή χημειοτακτικών μορίων από τα παρόντα μονοκύτταρα οδηγεί σε ενίσχυση του φαινομένου και ολοένα μεγαλύτερη

προσέλευση μονοκυττάρων ενώ επιπλέον συστατικά από την Ox-LDL προκαλούν παραγωγή IL-1 από τα προερχόμενα από μακροφάγα αφρώδη κύτταρα.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που επισημαίνουν τη σπουδαιότητα του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης. Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία μεταξύ των ROS και της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας χαρακτηρίζει την κατάστασή του οξειδωτικού στρες. Η Ox-LDL έχει βρεθεί σε FSGS [178], ενώ έχει δειχθεί σε απομονωμένα νεφρά αρουραίου ότι η Ox-LDL προκαλεί αγγειοσυστολή μέσω μείωσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO), πιθανότατα μέσω ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (καταλάση, η δισμουτάση του O_2^-, και η L-αργινίνη) παρέχουν προστασία έναντι στην προκαλούμενη από την Ox-LDL αγγειοσυστολή[179]. Αρτηρίες από υπερχοληστεριναιμικά ζώα παράγουν με μεγαλύτερο ρυθμό ελεύθερες ρίζες από ότι οι μάρτυρες. Η Ox-LDL προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα και πιστεύεται ότι είναι σημαντική στην εξέλιξη της βλάβης και ειδικά στην ανάπτυξη του λιποειδικού πυρήνα κατά τη νέκρωση των αφρωδών κυττάρων.

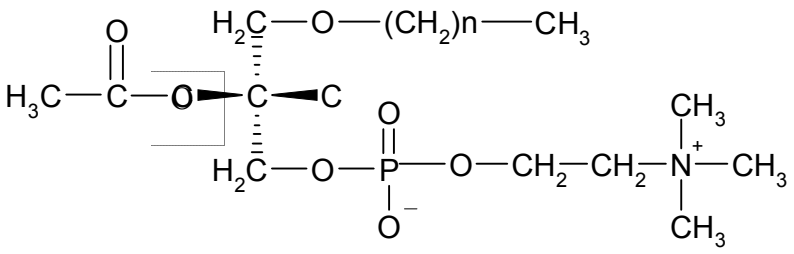
Επιπλέον αφού τα λεία μυϊκά κύτταρα παρουσία της LDL πολλαπλασιάζονται και γίνονται αφρώδη κύτταρα και τα μεσαγγειακά κύτταρα τα οποία έχουν χαρακτηριστικά λείων μυϊκών κυττάρων θα αντιδρούν ανάλογα, οδηγώντας σε «αθηροσκλήρωση του σπειράματος».

3.3 Ο Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων στο Νεφρό

3.3.2 *Χαρακτηριστικά του Παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων*

Η πρώτη αναφορά στον Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) τοποθετείται το 1966 όπου παρατηρήθηκε ότι κατά την ευαισθητοποίηση λευκοκυττάρων κουνελιού με αντιγόνο παράγεται ένας παράγοντας, ο οποίος είναι ανεξάρτητος συμπληρώματος και προκαλεί την απελευθέρωση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια. Αυτή η παρατήρηση επαληθεύτηκε και από άλλους ερευνητές, ανάμεσα στους οποίους ο Beneviste και οι συνεργάτες του πρότειναν τη λιποειδική φύση του PAF. Η δομή του PAF καθορίστηκε το 1979. Ο Δημόπουλος από την ερευνητική ομάδα του Hanahan δουλεύοντας με αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα ανάφεραν τη δομή του PAF σαν 1-*O*-αλκυλο-2-ακέτυλο-*sn*-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη (AGEPC). Η δομή του PAF πιστοποιήθηκε και από άλλες ερευνητικές ομάδες, σε νεφρικό ιστό κουνελιού και σε βασεόφιλα κουνελιού ενεργοποιημένα με ανοσογλοβουλίνη Ε (IgE). Αν και η κυρίαρχη δομή του PAF φαίνεται να είναι η 16:0 έχουν επίσης ανιχνευτεί και οι 17:0, 18:0 και 18:1 και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μοριακών ειδών PAF και είδους. Επίσης, ο PAF εντάσσεται σε μία οικογένεια λιποειδών τα οποία αν και εμφανίζουν διαφορετική δομή και προέλευση μοιράζονται παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες. Από την ομάδα αυτή ο PAF έχει τη μικρότερη συγκέντρωση στο αίμα σε σχέση με τα ανάλογα του PAF λιποειδή, τα οποία είναι 10^5-10^6 φορές από τον PAF. Τόσο ο PAF όσο και τα λιποειδή ανάλογα του PAF αναγνωρίζονται από ειδικό υποδοχέα (PAFr), διαμεμβρανικός υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες. [187-192] Εκτενής πειραματική δουλειά έδειξε ότι ο PAF αποτελεί ένα πολύ ισχυρό προφλεγμονώδη παράγοντα, ο

οποίος ενεργοποιείται και εκκρίνεται από μία πληθώρα μορίων και κυττάρων, αντίστοιχα. (Πίνακας 3.1) Πρόσφατα ο PAF προτάθηκε ως ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στις θεωρίες μηχανισμού πρόκλησης αθηρωμάτωσης. [193]



Εικόνα 3.6 Δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)

3.4.3 Η παραγωγή του PAF στο νεφρό

Ενδείξεις για την παραγωγή του PAF στο νεφρό υπήρχαν πριν την πιστοποίηση της δομής του. Ο Camussi πρώτος ανέφερε την παραγωγή ενός παράγοντα από απομονωμένους νεφρικούς ιστούς κουνελιού, κάτω από μη ανοσολογικές συνθήκες, με παρόμοια χαρακτηριστικά με τον PAF.[194] Αργότερα πιστοποιήθηκε η παραγωγή PAF από απομονωμένους νεφρικούς ιστούς αρουραίου ύστερα από ενεργοποίηση με ιονοφόρο A23187 ή μέσω ανοσολογικού μηχανισμού (IgE).[195] Από μελέτες που έγιναν με σκοπό να πιστοποιηθούν τα κύτταρα προέλευσης του PAF στο νεφρό, μετά από διέγερση κυττάρων του νεφρού φάνηκε ότι η κύρια κύτταρα παραγωγής PAF στο νεφρό γίνεται από τα μεσαγγειακά κύτταρα. [195-199]

Ο νεφρός φαίνεται ότι μπορεί να παράγει PAF, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, καθώς και οι δύο πορείες παραγωγής de novo και remodeling, αντίστοιχα, έχουν ανιχνευτεί σε νεφρό αρουραίου και ανθρώπινο νεφρικό ιστό. Τα νεφρικά κύτταρα διαθέτουν όλους τους ενζυμικούς μηχανισμούς, οι οποίοι συμμετέχουν στην σύνθεση του PAF. [200-201]

3.4.4 Δράση του PAF σε μεσαγγειακά κύτταρα.

Δεδομένου ότι τα μεσαγγειακά όπως έχει αναφερθεί αποτελούν τα κύρια κύτταρα του σπειράματος οι δράσεις του PAF στα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι δράσεις αυτές μπορούν να χαρακτηριστούν ως άμεσες όταν επιδρά ο PAF στα κύτταρα ή έμμεσες εάν διάφοροι παράγοντες έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή PAF.

Ο Schlondorff από το 1984 ανέφερε ότι ο PAF προκαλεί άμεσα τη συστολή των μεσαγγειακών κύτταρων αρουραίου και επάγει την παραγωγή της προσταγλαδίνης PGE2.[202] Η παραγωγή της προσταγλαδίνης αναστέλλεται από τους ειδικούς ανταγωνιστές του PAF BN52021, SRI 63-072 [203]. Λίγο αργότερα το 1987 ο Kester ανέφερε την αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου ως αποτέλεσμα της επώασης PAF με

μεσαγγειακά κύτταρα που πιθανότατα συνδέεται με την PKC [204]. Το ίδιο αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές που παρατήρησαν και αύξηση στο αραχιδονικό οξύ, διακυλογλυκερόλη και IP3 [205].

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει αναφερθεί σε καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων αρουραίου ύστερα από επώαση με PAF [206].

Διφορούμενη φαίνεται να είναι η δράση του PAF στον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων. Μελέτη έδειξε ότι PAF σε συγκέντρωση $<10^{-6}$M διεγείρει τον πολλαπλασιασμό μεσαγγειακών κυττάρων αρουραίου, μέσω φωσφορυλίωσης τυροσίνης ενώ σε PAF $>10^{-6}$M τον αναστέλλει, διότι δρα πιθανόν τοξικά [207].

Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο PAF προωθεί την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα μεσαγγειακά και του ότι επάγει την έκφραση του MCP1 [208, 209]. Η αναστολή της σύνθεσης του NO από τον PAF φαίνεται να ενισχύει την προσκόληση των πολυμορφοπύρηνων και των μονοκυττάρων στα μεσαγγειακά [210]. Επιπλέον διεγείρει την παραγωγή πρωτεϊνών του μεσοκυττάριου υγρού, φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο IV (μέσω TGF-b) [211].

Διάφοροι παράγοντες επιδρούν στα μεσαγγειακά κύτταρα με ενδιάμεση παραγωγή PAF. Ο TNFα και η IL-12 προκαλούν την παραγωγή PAF και τη συστολή των μεσαγγειακών κύτταρων. Επίσης οι IL-1, IL-6 έχουν βρεθεί να παράγουν μεγάλα ποσά PAF. Το H_2O_2 επίσης προκαλεί παραγωγή PAF που έχει ως συνέπεια την παραγωγή PGE2 και TXB2, η ενδοθηλίνη, και η αγγειοτανσίνη II, αγγειοδραστικές ενώσεις προκαλούν την παραγωγή PAF [212-215]. Η αγγειοτενσίνη II προκαλεί αύξηση του Ca^{2+}, ενεργοποίηση της PLA2, που αυξάνει το υπόστρωμα για την παραγωγή του PAF [216].

3.4.5 Η εμπλοκή του PAF με το μηχανισμό της «αθηρωσκλήρωσης του σπειράματος»[217]

Τα επίπεδα του PAF στο αίμα ρυθμίζονται από τις PAF-ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AHs), οι οποίες απενεργοποιούν τον PAF υδρολύοντας την sn-2 ομάδα του, μετατρέποντας τον σε λύσο-PAF.[216] Υπό φυσιολογικές συνθήκες αυξημένα επίπεδα PAF-AHs διατηρούν τον PAF στο αίμα σε τέτοια επίπεδα που δεν είναι δραστικός. Στην περιορισμένη δραστικότητα του PAF συμβάλλει και η περιορισμένη πρόσληψη του από τα κύτταρα, λόγω της ανταγωνιστικής πρόσληψης των λιποειδών ανάλογων του PAF (PAG-like lipids), τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον PAF στο αίμα. [217]

Μειωμένα επίπεδα ή μειωμένη δραστικότητα της PAF-AHs, καθώς και ανεπάρκεια ενδογενών ή προσλαμβανόμενων από την τροφή αντιοξειδωτικών μπορεί κάτω από παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως παρατεταμένη οξείδωση της LDL, φλεγμονώδεις καταστάσεις και υπεροξείδωση (peroxidation) των φωσφολιποειδών των κυτταρικών μεμβρανών να οδηγήσουν σε αύξηση της δραστικότητας του PAF. Το 1994 ο Δημόπουλος και συνεργάτες παρατήρησαν ότι η PAF-AH απενεργοποιείται κατά τη διάρκεια οξείδωσης της LDL, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η προστατευτική της δράση κατά των προφλεγμονωδών δράσεων του PAF και των ανάλογων του λιποειδών. Επίσης, ο Ambrosio και συνεργάτες έδειξαν ότι οι ρίζες οξυγόνου εμποδίζουν την δράση της PAF-AH στο ανθρώπινο πλάσμα. Αντιθέτως,

υπερέκφραση της PAF-AH έδειξε πειραματικά σε ποντίκια που δεν εξέφραζαν την apo-E πρωτεΐνη ότι προστατεύει από την αθηρογένεση.

Από τον Δημόπουλο και συνεργάτες έχει προταθεί μηχανισμός εμπλοκής του PAF στην πρόκληση της αθηροσκλήρυνσης.[217]Δεδομένης της ομοιότητας ανάμεσα στην σπειραματοσκλήρυνση και αθηροσκλήρυνση ο μηχανισμός αυτός φαίνεται ότι βρίσκει εφαρμογή και στην σπειραματοσκλήρυνση. Η οξειδωμένη LDL θεωρείται υπεύθυνη για την πρόκληση βλάβης στο ενδοθήλιο, που έχει σαν επακόλουθο την έναρξη της αθηρογένεσης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι αθηρογόνες δράσεις της LDL μπορούν να αποδοθούν στον PAF και στα ανάλογα του PAF λιποειδή. Τόσο ο PAF όσο και τα ανάλογα του PAF λιποειδή μπορούν να απελευθερώσουν ελεύθερες ρίζες προκαλώντας οξείδωση της LDL. Στη συνέχεια η οξείδωση της LDL συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση των επιπέδων του PAF, ενισχύοντας τη δράση του. Το 1994 ο Δημόπουλος και συνεργάτες έδειξαν ότι η μορφή C 16:0 του PAF σχηματίζεται κατά τη διάρκεια οξείδωσης της LDL. Επιπλέον ο Watson και συνεργάτες έδειξαν ότι η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) προστατεύει την παραγωγή και τη δράση της ox-LDL, διευκολύνοντας την υδρόλυση των ανάλογων του PAF λιποειδών.

Στη συνέχεια η ox-LDL μπορεί να ενεργοποιήσει το ενδοθήλιο. Ο PAF, μέσω του υποδοχέα του μπορεί να ενεργοποιήσει όλα τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονή του ενδοθηλίου όπως αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, σηματοδοτώντας την παραγωγή μίας σειράς χημειοτακτικών και φλεγμονωδών παραγόντων, καθώς και του ίδιου του PAF Η προσκόλληση των κυττάρων του αίματος στο ενδοθήλιο και η φλεγμονώδεις παράγοντες που εκκρίνουν προκαλούν ρήγμα στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, απ΄όπου η ox-LDL και κύτταρα αίματος μπορούν να εισέλθουν στον υποενδοθηλιακό χώρο. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν και μεταθέτουν στις επιφάνειες τους, PAF με πολύ γρήγορο ρυθμό. Ο PAF αποτελεί σήμα για την προσέλκυση λευκοκυττάρων, στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, μέσω του PAF, που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί αλλαγές στο σχήμα τους, αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου, ενεργοποίηση των πρωτεϊνών προσκόλλησης π.χ. β2-ιντεγκρίνες, οι οποίες προκαλούν την ενεργοποίηση και άλλων μορίων προσκόλλησης. Τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα μπορούν να διαπεράσουν το ενδοθήλιο και να εισέλθουν στον υποενδοθηλιακό χώρο. Αυτό οδηγεί σε μη φυσιολογική συγκέντρωση των μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο, τα οποία διαφοροποιούνται σε μακροφάγα**.** Τα μακροφάγα κύτταρα ενδοκυττώνουν την LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη. Επιπρόσθετα, ο PAF ενισχύει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, ο οποίος οδηγεί στη μετακίνηση τους στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου και αυτά ενδοκυττώνουν ox-LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα συνθέτουν PAF με ρυθμό μεγαλύτερο από οποιοδήποτε άλλα κύτταρα της φλεγμονής, λόγω της συνεχούς ενεργοποίησης τους από την ox-LDL. Οι αθηρωματικές πλάκες αποτελούνται από αφρώδη κύτταρα, τα οποία εναποτίθενται στο ενδοθήλιο και αποτελούν εστία ενίσχυσης της φλεγμονής σε αυτό. Σε πιο προχωρημένο στάδιο της αθηρωματικής πλάκας τα αφρώδη κύτταρα νεκρώνονται, διαρρηγνύονται και απελευθερώνουν κυτταροτοξικά προϊόντα, τα οποία δεν απομακρύνονται από τον υποενδοθηλιακό χώρο, λόγω της μη σωστής λειτουργίας των μακροφάγων, που βρίσκονται στην

περιοχή. Ο θάνατος των αφρωδών κυττάρων οδηγεί σε απόθεση χοληστερόλης στην πλάκα. Τέλος ο PAF συμμετέχει και στο τελικό στάδιο σκλήρυνσης των αρτηριών καθώς προκαλεί την απελευθέρωση ελαστάσης, η οποία αποικοδομεί τα συστατικά του εξωκυττάριου υγρού, φαινόμενο το οποίο αποτελεί και χαρακτηριστικό της αθηροσκλήρυνσης.

Κατ΄αντιστοιχία ο PAF μπορεί να προκαλέσει αύξηση της διαπερατότητας του σπειράματος λόγω συσσώρευσης αιμοπεταλίων και PMN στον αυλό των τριχοειδών και απόθεση των παραγόμενων από αυτά κατιονικών πρωτεϊνών οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια του αρνητικού φορτίου της σπειραματικής μεμβράνης [217] Τα διηθούντα αυτά μόρια και κύτταρα έχουν την δυνατότητα να απομακρυνθούν από το μεσάγγειο και μέσω των καναλιών του μεσαγγείου να κατευθυνθούν προς τον σπειραματικό πόλο, να παραληφθούν από τα μεσαγγειακά κύτταρα, ή να μείνουν παγιδευμένα στη μεσοκυττάρια ουσία. Η μοίρα τους εξαρτάται από το μέγεθος τους, το φορτίο τους, τη συγκέντρωση τους και τη συγγένεια που έχουν με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων ή με τα συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο PAF προάγει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα μεσαγγειακά κύτταρα και ότι επάγει την έκφραση του MCP1 [205-209]

Η αναστολή της σύνθεσης του NO από τον PAF φαίνεται να ενισχύει την προσκόλληση των πολυμορφοπύρηνων και των μονοκυττάρων στα μεσαγγειακά κύτταρα.[210] Επιπλέον, μέσω παραγωγής TGF-b, ο PAF φαίνεται να διεγείρει την παραγωγή πρωτεϊνών της μεσοκυττάριας ουσίας (ινωδονεκτίνη και κολλαγόνο IV) [211]. Η απώλεια των ενδογενών αντιοξειδωτικών και η παραγωγή ROS στην περιοχή του μεσαγγείου από τα μακροφάγα και μεσαγγειακά κύτταρα προκαλεί την παρατεταμένη οξείδωση της LDL., όπως και στην περίπτωση του ενδοθηλίου. Ο PAF έχει βρεθεί να επάγει την παραγωγή ROS τόσο από μεσαγγειακά κύτταρα [207]όσο και από τα κύτταρα του αίματος. Ο PAF έχει βρεθεί να προάγει την παραγωγή αρκετών παραγόντων από τα κύτταρα του αίματος ενώ, αρκετές κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες, ανοσοσυμπλέγματα, αγγειοδραστικά μόρια και το H_2O_2 προάγουν την παραγωγή PAF από τα μεσαγγειακά κύτταρα. Φαίνεται επομένως ότι δημιουργείται ένα δίκτυο δράσεων με τελικό αποτέλεσμα την επιδείνωση της βλάβης. Τόσο τα μεσαγγειακά όσο και τα μακροφάγα προσλαμβάνουν χοληστερόλη και εστέρες της χοληστερόλης και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Αν και αρχικά είχε αποδοθεί η δημιουργία των αφρωδών κυττάρων στην πρόσληψη λιποειδών, μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων, τελευταίες μελέτες δείχνουν τη συμμετοχή και άλλων υποδοχέων όπως των υποδοχέων LDL αλλά και των υποδοχέων VLDL[218-220]. Ο συνεχόμενος πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η επέκταση της μεσαγγειακής διάμεσης ουσίας οδηγούν σταδιακά σε απόθεση άμορφου υλικού, νέκρωση κυττάρων και τελικά σκλήρυνση.

3.3.5 Η επίδραση του PAF στην έκφραση των LDL και εκκαθαριστών υποδοχέων (ScrA) στα μεσαγγειακά κύτταρα.[221]

Η σπειραματοσκλήρυνση, όπως και η αθηροσκλήρυνση χαρακτηρίζονται από φλεγμονώδη απάντηση που οδηγεί στην προσέλκυση στο σπείραμα προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι ο PAF, οι κυτταροκίνες, κύτταρα ανοσολογικής απάντησης, όπως αιμοπετάλια, μακροφάγα, μορίων προσκόλλησης κ.α Βασικό στάδιο στην εμφάνιση σπειραματοσκλήρυνσης είναι η μετατροπή των μακροφάγων, που

καταφθάνουν στο σπείραμα, άλλα και των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη κύτταρα. Τα μεσαγγειακά κύτταρα εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά με λεία μυϊκά κύτταρα των αρτηριών (VSMC), ως προς την προέλευση, ανατομία, ιστοχημεία και συσταλτικότητα, ενώ πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τόσο τα λεία μυϊκά κύτταρα όσο και τα μεσαγγειακά κύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε αφρώδη.

Τόσο οι εκκαθαριστές υποδοχείς όσο και οι LDL υποδοχείς φαίνεται να συμμετέχουν στην μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη. Η μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη γίνεται λόγω πρόσληψης μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης ή ακετυλιωμένης LDL λιποπρωτεΐνης μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων (SR). Η έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων διεγείρεται μέσω της αυξημένης συγκέντρωσης ox-LDL στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ δεν υπάρχει κάποιος κυτταρικός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης τους. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στην πρόσληψη τροποποιημένης LDL λιποπρωτεΐνης συμμετέχουν και οι LDL υποδοχείς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα μπορούν να ελέγχουν την είσοδο χοληστερόλης στο κύτταρο, μέσω ενός μηχανισμού ελέγχου του υποδοχέα της LDL λιποπρωτεΐνης. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση χοληστερόλης είναι εκείνη η οποία ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα της LDL λιποπρωτεΐνης, με αποτέλεσμα σε συνθήκες κορεσμού του κυττάρου σε χοληστερόλη να μειώνεται η έκφραση των LDL υποδοχέων στη μεμβράνη του. Παρ'όλα αυτά πρόσφατες in vitro μελέτες δείχνουν κάτω από την επίδραση παραγόντων φλεγμονής όπως οι κυτταροκίνες, όπως η IL-1β και ο παράγοντας ανάπτυξης TNF-α απορυθμιζόταν η ελεγχόμενη έκφραση του LDL υποδοχέα, με αποτέλεσμα εισροής στο κύτταρο μεγαλύτερης ποσότητας γηγενούς LDL λιποπρωτεΐνης. Μία πρόσφατη διδακτορική διατριβή της Φραγκοπούλου Ε. δείχνει ότι ο PAF εμπλέκεται στην αύξηση των LDL και εκκαθαριστή υποδοχέα στην μεμβράνη των μεσαγγειακών κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα ο PAF σε συγκέντρωση 10^{-6}M φάνηκε ότι αυξάνει την έκφραση του mRNA LDL υποδοχέα σε μεσαγγειακά κύτταρα που είχαν επωαστεί με n-LDL. Αύξηση του LDL υποδοχέα εμφανίστηκε στις 6h επώασης των κυττάρων, ενώ στις 12h παρουσιάστηκε μέγιστη αύξηση. Για τον εκκαθαριστή υποδοχέα ο PAF προκάλεσε αύξηση του mRNA του σε συγκέντρωση (PAF) 10^{-9}M. Μέγιστη αύξηση του mRNA του εκκαθαριστή υποδοχέα (SR-A I) εμφανίστηκε στις 6 με 24ώρες επώασης των κυττάρων με ακετυλιωμένη LDL.

3.4 Ρεσβερατρόλη και νεφρός [223-225]

Παρότι η ρεσβερατρόλη αποτελεί μία πολύ βιολογικά δραστική φαινολική ένωση, με αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις δράσεις λίγες μελέτες έχουν γίνει σχετικά με ην επίδραση του μορίου αυτού σε νεφρικά κύτταρα. Υπάρχει όμως ένας μεγάλος αριθμός μελετών που καταλήγουν έμμεσα στην υπόθεση ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να ασκήσει προστατευτική δράση στα νεφρικά κύτταρα.

Επιπλέον οι αντιοξειδωτικές και αντιθρομβωτικές δράσεις της ρεσβερατρόλης βρίσουν εφαρμογή και στο νεφρό καθώς όλοι οι παράγοντες φλεγμονής, μπορούν να φθάσουν ή να παραχθούν στα μεσαγγειακά κύτταρα και η οξειδωμένη LDL αποτελεί και στο μεσάγγειο σημαντικό παράγοντα έναρξης φλεγμονής

In vivo μελέτη σε αρουραίους έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη σε χορηγούμενη δία στόματος ποσότητα 5mg/μερα/100kg σωμ. βάρους μπόρεσε να περιορίσει την πρωτεϊνουρία και την υποαλβουμιναιμία, η οποία αποτελεί σημαντική επιβάρυνση της λειτουργίας του σπειράματος.[222] Επίσης, η ρεσβερατρόλη φάνηκε ότι μειώνει τη νεφρική βλάβη που προκαλείται από την επαναφορά της κυκλοφορίας του αίματος μετά την ισχαιμία στο νεφρό, μετά από χορήγηση 0,23μg/kg ρεσβερατρόλης σε αρουραίους που είχαν υποστεί ισχαιμικό σόκ.

In vitro μελέτες σε επιθηλιακά κύτταρα νεφρού σκύλου (MDCK κυτταρική σειρά) έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 50μM και 10μM μπόρεσε να μειώσει τη βλαπτική επίδραση των σπορίων του βακτηρίου *Encephalitozoon cuniculi.* Τέλος, in vitro μελέτη σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων αρουραίου έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη μπορούσε να αναστείλει τη δράση νεφροτοξινών στα κύτταρα.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο}

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την *in vitro* μελέτη της επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στις λειτουργίες των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων. Επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν α) η μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του n-LDL και του SR-A I υποδοχέα σε HMCL κύτταρα και β) η μελέτη της επίδρασης μη δραστικών ποσοτήτων trans-ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από PAF αύξηση του mRNA του n-LDL και του SR-A I υποδοχέα, σε HMCL κύτταρα.

Κεφάλαιο 6^{ο} - Αποτελέσματα

6.1 Μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του n-LDL υποδοχέα σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMCL).

Εισαγωγή

Μία σειρά μελετών κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αθηροσκλήρυνση και η σπειραματοσκλήρυνση παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες ως προς τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τους, με αποτέλεσμα να προταθεί ο όρος «σπειραματική αθηροσκλήρωση». Μία από αυτές τις ομοιότητες, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3, εντοπίζεται στο μη φυσιολογικό μεταβολισμό των λιποειδών και στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Επιπλέον, τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMCL) του σπειράματος παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες στην προέλευση, ανατομία, ιστοχημεία και συσταλτικότητα με τα λεία μυϊκά κύτταρα των αρτηριών (VSMC). Τα μεσαγγειακά κύτταρα αποτελούν τα κύρια κύτταρα του σπειράματος και μελέτες δείχνουν ότι ο τρόπος εμπλοκής των μεσαγγειακών κυττάρων στη σπειραματοσκλήρυνση είναι ανάλογος αυτού των λείων μυϊκών κυττάρων στην αθηροσκλήρυνση.

Ένα βασικό στάδιο στο σχηματισμό σκλήρυνσης είτε στο σπείραμα, είτε στις αρτηρίες είναι ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, που αποτελούν τα κύρια συστατικά των σκληρυντικών πλακών. Η μετατροπή ενός κυττάρου σε αφρώδες γίνεται μέσω της ενδοκυττάρωσης μεγάλων ποσοτήτων χοληστερόλης. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις τα μεσαγγειακά κύτταρα, όπως και τα λεία μυϊκά κύτταρα αυξάνουν στην επιφάνεια τους την έκφραση υποδοχέων (n-LDL, SRs) μέσω των οποίων μπορούν να ενσωματώνουν μεγάλες ποσότητες χοληστερόλης και να μετατρέπονται σε αφρώδη.

Η ρεσβερατρόλη, όπως έχει ήδη περιγραφεί αναλυτικά στο Θεωρητικό μέρος είναι μία φαινολική ένωση με μία πληθώρα αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών δράσεων. Ελάχιστες μελέτες έχουν ερευνήσει τις *in vivo* δράσεις της ρεσβερατρόλης στο νεφρό, ενώ δεν υπάρχει καμία in vitro μελέτη που να εξετάζει τη δράση της ρεσβερατρόλης σε μεσαγγειακά κύτταρα.

Σκοπός της πρώτης ομάδας πειραμάτων, που περιγράφονται στις παραγράφους 6.1.1 έως 6.2.2 ήταν να μελετηθεί η εμπλοκή της ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, μέσω της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στη λειτουργία του n-LDLυποδοχέα.

6.1.1 Επίδραση της συγκέντρωσης trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα.

Εισαγωγή

Τα μεσαγγειακά κύτταρα, όπως και όλα τα κύτταρα καλύπτουν τις ανάγκες τους σε χοληστερόλη μέσω της πρόσληψης της από τους n-LDL υποδοχείς, που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση του n-LDL υποδοχέα υπόκεινται σε αυστηρό κυτταρικό έλεγχο. Αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης αποτελούν το σήμα για τη μείωση του ρυθμού έκφρασης του n-LDL υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ μειωμένα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης σηματοδοτούν την αύξηση του ρυθμού έκφρασης του n-LDL υποδοχέα. Επομένως, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης επηρεάζει ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης του n-LDL υποδοχέα.

Εξ'αιτίας αυτού του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης ο n-LDL υποδοχέας θεωρείτο ότι δε συμμετείχε στη μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη, αφού τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο εσωτερικό των αφρωδών κυττάρων θα προκαλούσαν αναστολή της έκφρασης του στην κυτταρική επιφάνεια. Παρ'όλα αυτά πρόσφατες *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι σε καταστάσεις φλεγμονής στο σπείραμα ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης του LDL υποδοχέα μπορεί να απορυθμιστεί, με αποτέλεσμα τον αυξανόμενο ρυθμό έκφρασης του, ως απόκριση στα αυξανόμενα εξωκυτταρικά επίπεδα γηγενούς LDL. Συνεπώς, οι LDL υποδοχείς συμμετέχουν στην μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη μέσω αυξημένης δέσμευσης γηγενούς LDL-χοληστερόλης.

Πειραματική πορεία

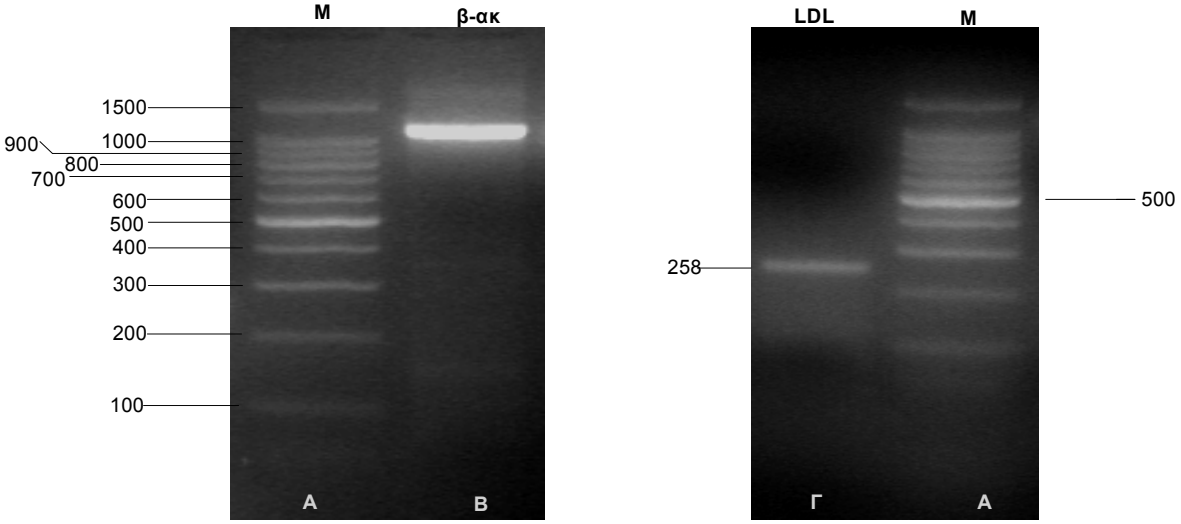
HMCL κύτταρα αποψύχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας 25cm^2. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM), το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM, για 24 ώρες τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM που περιέχει για κάθε δείγμα ξεχωριστά trans-ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις: 0μM, 1μM, 25μM, 50μM, 100μM και 1000μM, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση-διέγερση των κυττάρων με ρεσβερατρόλη για 24h. Η ρεσβερατρόλη όπως αναφέρεται και στις μεθόδους βρισκόταν διαλυμένη σε αιθανόλη και το κοντρόλ, που δεν περιείχε ρεσβερατρόλη περιείχε αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης. (μέχρι 1%).

Μετά από την ολοκλήρωση 24ωρών επώασης-διέγερσης των κυττάρων με ρεσβερατρόλη τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσεως. Κατά την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο η συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης 1000μM κρίθηκε ότι είναι τοξική για τα κύτταρα, αφού είχε προκαλέσει νέκρωση και αποκόλληση των κυττάρων, από την επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας.

Στη συνέχεια τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με συγκεντρώσεις trans-ρεσβερατρόλης 0μM, 1μM, 25μM, 50μM, 100μM ξεπλύθηκαν με PBS και απομονώθηκε το ολικού τους RNA.

Με RT-PCR δημιουργήθηκε και πολλαπλασιάστηκε το c-DNA του nLDLυποδοχέα και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το γονίδιο της β-ακτίνης. Η β-ακτίνη αποτελεί γονίδιο βασικής λειτουργίας του κυττάρου, του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή από δείγμα σε δείγμα. Συνεπώς, χρησιμοποιείται για να κανονικοποιηθούν οι τιμές της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάμε, εξαλείφοντας έτσι σφάλματα στους υπολογισμούς λόγω της διαφορετικής απόδοσης σε cDNA και DNA κατά την αντίδραση RT-PCR από δείγμα σε δείγμα. Η περιγραφή των μεθόδων αναφέρεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5.

Μετά την RT-PCR για τον υποδοχέα της nLDL και για την β-ακτίνη στις συνθήκες που αναφέρονται στις μεθόδους, γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων και χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο. Οι ταινίες που προκύπτουν έχουν το μέγεθος που προβλέπεται από τη θέση των αντίστοιχων εναρκτήριων μορίων στο cDNA. Για τον υποδοχέα της nLDL (LDLr) 258 bp.



Εικόνα 6.1: ***Μέγεθος των προϊόντων από την RT-PCR για τον υποδοχέα της nLDL και για β-ακτίνη:*** *Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον υποδοχέα της nLDL και για την β-ακτίνη. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων καθώς και του δείκτη μεγεθών cDNA σε πηκτή αγαρόζης 2% που περιείχε και βρωμιούχο αιθίδιο. Α) Δείκτης μεγεθών cDNA (1500-100 bp) Β) Ταινία για την β-ακτίνη Γ) Ταινία για τον υποδοχέα της nLDL.*

Αποτελέσματα

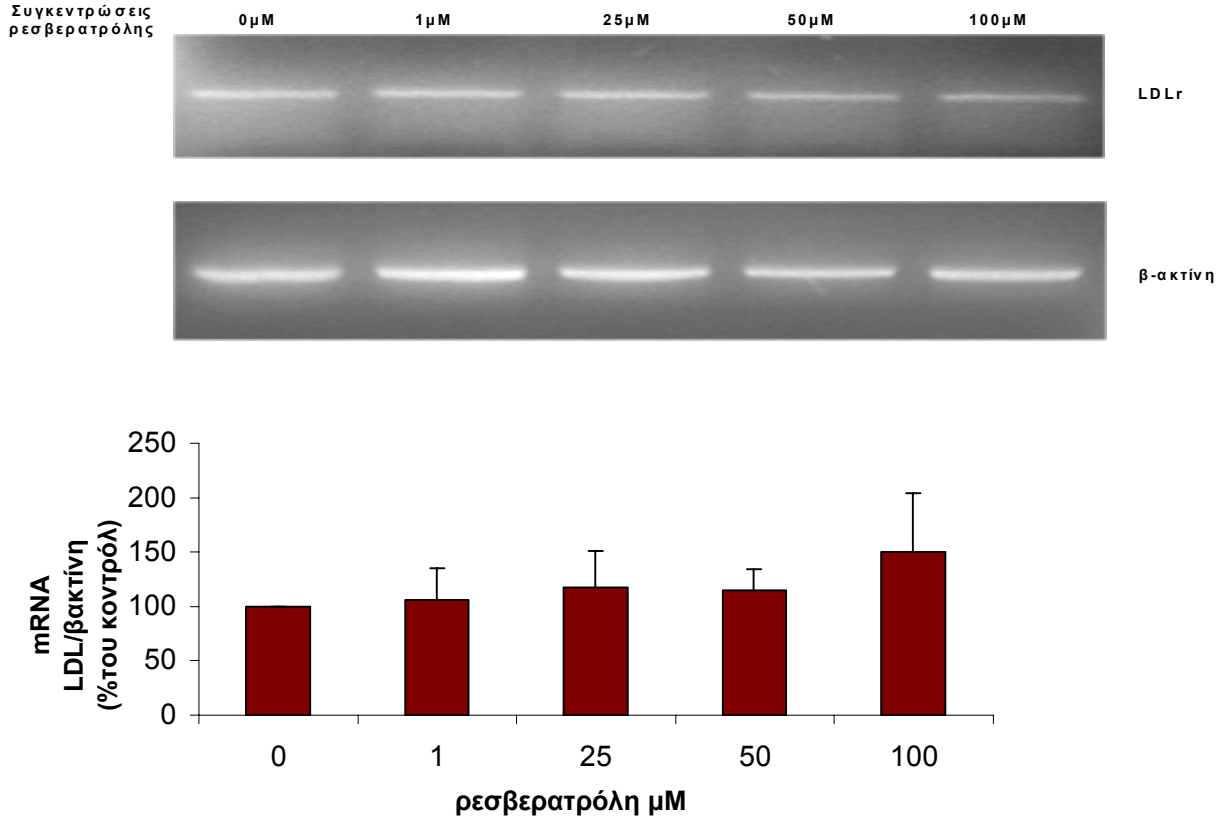
Η ένταση κάθε ταινίας που προέκυψε από την πηκτή ηλεκτροφόρησης ποσοτικοποιήθηκε, μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Gel-pro 3.1. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης και κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5. Για την εκτίμηση της μεταβολής της έκφρασης

του n-LDL υποδοχέα ως προς το δείγμα αναφοράς, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί % μεταβολή του λόγου LDLr/β-ακτίνης κάθε δείγματος σε σχέση με το λόγο LDLr/β-ακτίνης του δείγματος αναφοράς, που στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν το δείγμα κυττάρων που επωάστηκε με συγκέντρωση ρεσβερατρόλης: 0μM.

Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 6.1 και στο ιστόγραμμα της Εικόνας 6.1 προκύπτει ότι η διέγερση HMCL κυττάρων με ρεσβερατρόλη για 24h δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (0μM ρεσβερατρόλης), σε καμία συγκέντρωση. Παρ'όλα αυτά φαίνεται μία τάση αύξησης της έκφρασης του mRNA του LDLυποδοχέα όταν η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο μέσο επώασης ήταν 100μM.

Πίνακας 6.1 ***Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης στην έκφραση του n-LDL υποδοχέα***. *Υπολογίστηκε η επί % μεταβολή της έκφρασης του λόγου LDLr/β-ακτίνη του κάθε δείγματος ως προς το δείγμα αναφοράς (0μM ρεσβ). Για κάθε μεταβολή του λόγου LDLr /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο των λόγων LDLr /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) και η στατιστική σημαντικότητα του (p-value). Η στατιστική σημαντικότητα κάθε δείγματος υπολογίστηκε βάση της διαφοράς των απολύτων τιμών των λόγων LDLr/β-ακτίνη κάθε δείγματος από την απόλυτη τιμή του λόγου LDLr/β-ακτίνη του δείγματος αναφοράς (0μM ρεσβερατρόλης).*

Ρεσβερατρόλη(μM) επώασης	***LDLr/β-ακτίνη (% του κοντρόλ)***	**± SD**	***p-value***
0(κοντρόλ)	100	0	
1	105,59	29,68	E.V 0,014
25	117,91	33,14	E.V 0,015
50	115,02	18,91	E.V 0,084
100	150, 24	53,81	E.V0,057



Εικόνα 6.2: ***Η επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του υποδοχέα της nLDL***. *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, είτε σε FCS παρουσία πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων trans-ρεσβερατρόλης, 0μM, 1μM, 25μM, 50μM, 100μM για χρονικό διάστημα 24h. Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον υποδοχέα της nLDL. Χαρακτηριστική πηκτή και το ιστόγραμμα της μέτρησης πυκνότητας της κάθε ζώνης, κανονικοποιημένης ως προς β-ακτίνη και εκφρασμένης σαν % του δείγματος αναφοράς (0μM).*

6.1.2 Επίδραση του χρόνου επώασης με trans-ρεσβερατρόλη στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα.

Εισαγωγή

Επειδή οι 24h επώασης με ρεσβερατρόλη ενδέχεται να αποτελεί ένα μεγάλο χρονικό διάστημα επώασης των κυττάρων με το διεγερτικό παράγοντα κρίθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί η επώαση των κυττάρων με ρεσβερατρόλη για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, μικρότερα των 24h. Η συγκέντρωση ρεσβερατρόλης, με την οποία επωάστηκαν τα HMCL κύτταρα επιλέχθηκε να είναι τα 50μM. Τα χρονικά διαστήματα επώασης με ρεσβερατρόλη ήταν 0h, 2h, 4h, 6h και 24h.

Η επιλογή των 50μM ρεσβερατρόλης ως συγκέντρωση επώασης των κυττάρων επιλέχθηκε με βάση τα εξής κριτήρια: α) Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη σε

συγκέντρωση 100μM μπορούσε να αναστείλει τη δράση ενός πολύ ισχυρού προφλεγμονώδη παράγοντα (PAF), που προκαλούσε in vitro συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Μετά από περαιτέρω μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας ο παράγοντας συσσώρευσης αιμοπεταλίων (PAF) φάνηκε ότι εμπλέκεται στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων επηρεάζοντας την έκφραση των υποδοχέων πρόσληψης χοληστερόλης στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι δράσεις του PAF στην σπειραματοσκλήρυνση περιγράφονται στο κεφάλαιο 3. β) Από το πρώτο πείραμα μας, το οποίο παρουσιάζεται στην *παράγραφο 6.1.1* διαπιστώθηκε ότι διέγερση των κυττάρων με 100μM ρεσβερατρόλης προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα. Έτσι επιλέχθηκε η αμέσως μικρότερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης των 50μM, η οποία δεν φάνηκε να προκαλεί στατιστικώς σημαντική μεταβολή του του mRNA του n-LDL υποδοχέα η οποία είχε προκαλέσει τη μικρότερη αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα.

Πειραματικό μέρος

HMCL κύτταρα αναπτύχθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας 25cm^2. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά από 24h παραμονής των κυττάρων σε SFM τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με SFM στο οποίο είχε προστεθεί ρεσβερατρόλη με τελική συγκέντρωση 50μM. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ρεσβερατρόλη για διαφορετικά χρονικά διαστήματα: 0h, 2h, 4h, 6h και 24h. Στο τέλος κάθε χρονικού διαστήματος απομακρυνόταν το μέσο επώασης, τα κύτταρα εκπλένονταν με PBS και ακολουθούσε απομόνωση του ολικού RNA.

Με RT-PCR δημιουργήθηκε και πολλαπλασιάστηκε το cDNA του υποδοχέα του nLDL και β-ακτίνη και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR και χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο.

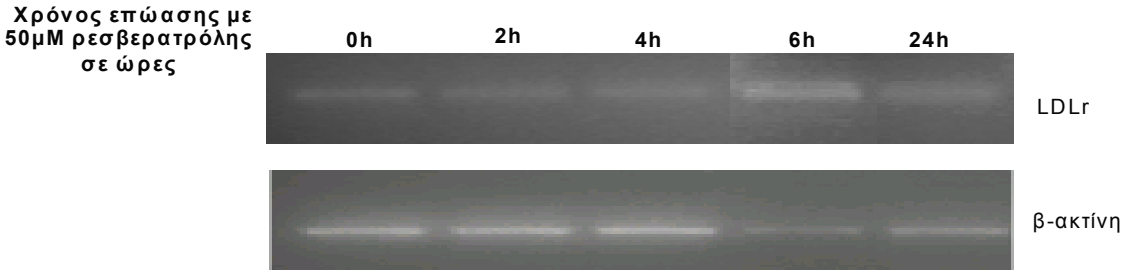
Οι ταινίες που προκύπτουν έχουν το μέγεθος που προβλέπεται από τη θέση των αντίστοιχων εναρκτήριων μορίων στο cDNA. Για τον υποδοχέα της nLDL (LDLr) 258 bp. (βλ. Εικόνα 6.1)

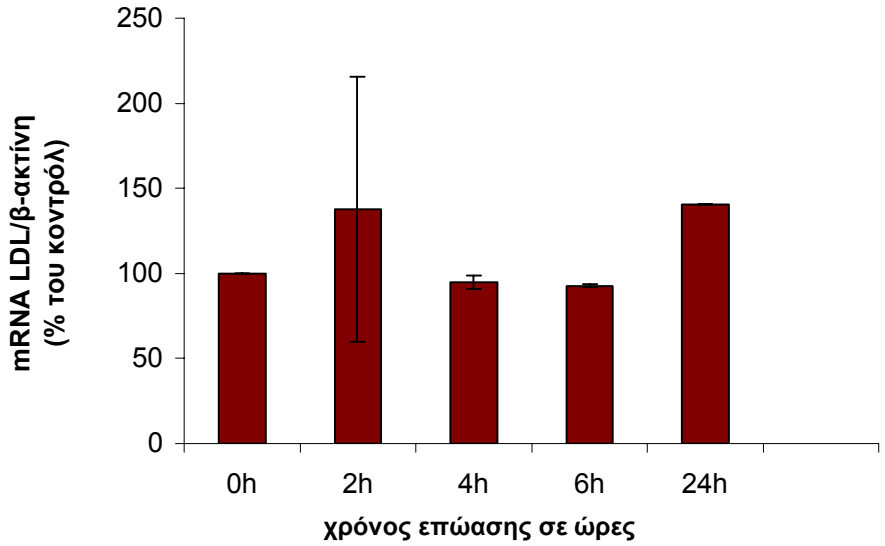
Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν φαίνονται στον πίνακα 6.2 και στο ιστόγραμμα της Εικόνας 6.3. Μετά από 4h και 6h διέγερση των κυττάρων με 50μM ρεσβερατρόλης δεν παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς το οποίο επωάστηκε με 50μM ρεσβερατρόλης για 0h. Αντιθέτως, στις 2h και στις 24h εμφανίστηκε αύξηση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων επειδή το πείραμα πραγματοποιήθηκε μόνο 2 φορές.

Πίνακας 6.2 ***Επίδραση του χρόνου επώασης με trans-ρεσβερατρόλη στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα***. *Υπολογίστηκε η επί % μεταβολή της έκφρασης του λόγου LDLr/β-ακτίνη του κάθε δείγματος ως προς το δείγμα αναφοράς (0μM ρεσβ). Για κάθε μεταβολή του λόγου*

LDLr /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο των λόγων LDLr /β-ακτίνη(% του κοντρόλ).

Χρόνος επώασης σε ώρες	***Ρεσβερατρόλη (μM)***	***LDLr/β-ακτίνη (% του κοντρόλ)***	***± SD***
0	50	100	0
2	50	137,62	78,017
4	50	94,80	3,68
6	50	92,73	0,88
24	50	140,48	0





Εικόνα 6.3 **Η επίδραση του χρόνου επώασης με trans-ρεσβερατρόλη στην έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα.** *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS και παρουσία συγκέντρωσης 50μM trans-ρεσβερατρόλης για χρονικό διάστημα 0h, 2h, 4h, 6h και 24h. Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον υποδοχέα της nLDL. Απεικόνιση χαρακτηριστικής πηκτής και του ιστογράμματος της μέτρησης πυκνότητας της κάθε ζώνης, κανονικοποιημένης ως προς β-ακτίνη και εκφρασμένης σαν % του δείγματος αναφοράς (0μM)..*

6.2 Επίδραση της trans -ρεσβερατρόλης στην έκφραση του n-LDL υποδοχέα, μετά από διέγερση των μεσαγγειακών με προφλεγμονώδεις παράγοντες.

Από την ερευνητική μας ομάδα έχει περιγραφεί η εμπλοκή ενός πολύ ισχυρού φλεγμονώδους παράγοντα, στο μηχανισμό της αθηροσκλήρυνσης. Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 3° φαίνεται να εμπλέκεται τόσο στο μηχανισμό της αθηροσκλήρυνσης όσο και της σπειραματοσκλήρυνσης.

Από μελέτες που έχουν γίνει από την ερευνητική μας ομάδα σε σχέση με το μηχανισμό δράσης του PAF στα μεσαγγειακά κύτταρα έχει διαπιστωθεί ότι ο PAF μπορεί να προκαλέσει απορύθμιση του n-LDL υποδοχέα συμβάλλοντας στη μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη. Πιο συγκεκριμένα φάνηκε ότι μετά από διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με PAF, που είχε τελική συγκέντρωση στο μέσο επώασης 10^{-6}M εμφανίστηκε αύξηση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα μετά τις 6h επώασης, ενώ μέγιστη αύξηση παρουσιάστηκε στις 12h επώασης. ΄

Η μελέτες διερεύνησης πιθανών αναστολέων του PAF, οι οποίοι περιέχονται στη Μεσογειακή Δίαιτα έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 100μM έχει την ικανότητα να αναστείλει την επαγόμενη από PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, μετά από τη δράση PAF σε συγκέντρωση 10^{-10}M.

6.2.1 Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα, για χρονικό διάστημα 6h.

Εισαγωγή

Η διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με PAF προκαλεί αύξηση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα μετά από τις 6h επώασης. Προκειμένου να διερευνηθεί η δράση της ρεσβερατρόλης στην αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα από τη δράση του PAF, θα πρέπει αρχικά να διερευνηθεί η επίδραση της ρεσβερατρόλης στον n-LDL υποδοχέα των μεσαγγειακών κυττάρων, στις 6h διέγερσης των κυττάρων με ρεσβερατρόλη.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τρεις συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης για διέγερση των κυττάρων στις 6h. Σ'αυτές συμπεριλήφθηκε η 100μM, η οποία είχε φανεί ότι προκαλεί αναστολή του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού και οι αμέσως μικρότερες της 50μM και 25μM, που είχαν χρησιμοποιηθεί στο πρώτο πείραμα διέγερσης των κυττάρων με ρεσβερατρόλη για 24h.

Πειραματικό μέρος

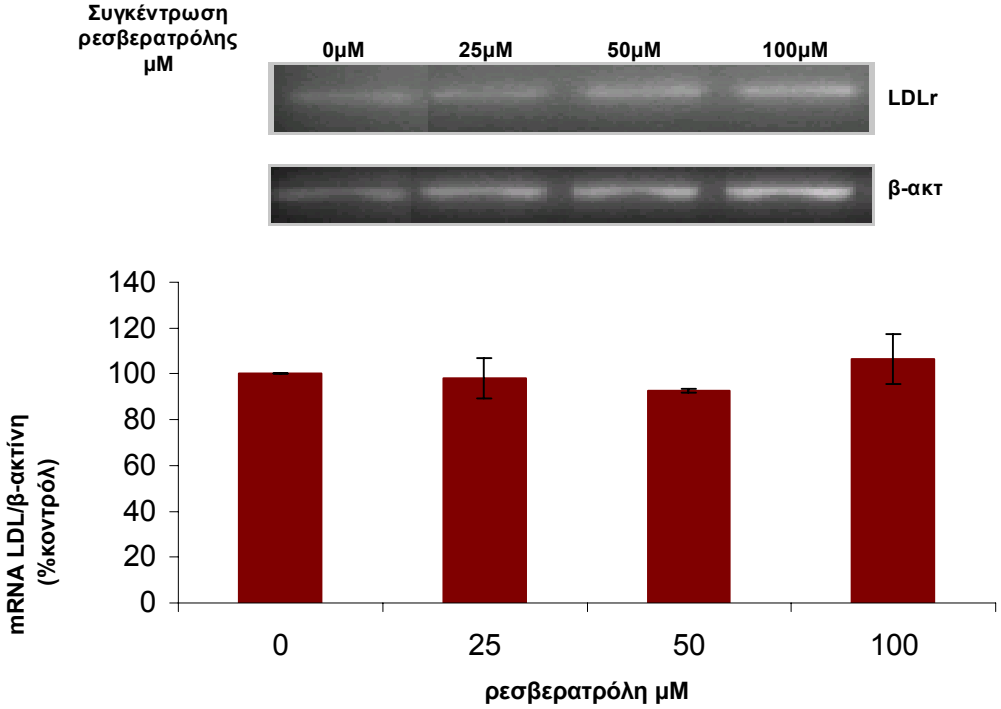
HMCL κύτταρα αναπτύχθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας 25cm^2. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά από 24h παραμονής των κυττάρων σε SFM τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με SFM στο οποίο είχε προστεθεί ρεσβερατρόλη με τελική συγκέντρωση 25μM, 50μM και 100μM. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ρεσβερατρόλη για χρονικό διάστημα 6h. Μετά το πέρας των 6h το μέσο επώασης απομακρύνθηκε, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA.

Με RT-PCR δημιουργήθηκε και πολλαπλασιάστηκε το cDNA του γονιδίου του υποδοχέα του n-LDL και της β-ακτίνης και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR και χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο.

Από τα αποτελέσματα, τα οποία απεικονίζονται στον πίνακα 6.3 και στο ιστόγραμμα της Εικόνας 6.3 φαίνεται ότι μετά από 6h διέγερση των HMCL με ρεσβερατρόλη δεν εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική μεταβολή της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα.

Πίνακας 6.3 ***Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα, για χρονικό διάστημα 6h.*** *Υπολογίστηκε η επί % μεταβολή της έκφρασης του λόγου LDLr/β-ακτίνη του κάθε δείγματος ως προς το δείγμα αναφοράς (0μM ρεσβ). Για κάθε μεταβολή του λόγου LDLr /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο των λόγων LDL /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) και η στατιστική σημαντικότητα του (p-value). Η στατιστική σημαντικότητα κάθε δείγματος υπολογίστηκε βάση της διαφοράς των απολύτων τιμών των λόγων LDLr/β-ακτίνη κάθε δείγματος από την απόλυτη τιμή του λόγου LDLr/β-ακτίνη του δείγματος αναφοράς (0μM ρεσβερατρόλης).*

Χρόνος επώασης σε ώρες	***Ρεσβερατρόλη (μM)***	***LDLr/β-ακτίνη (% του κοντρόλ)***	***± SD***	***p-value***
6	0 (κοντρόλ)	100	0	
6	25	98,025	8,69	-
6	50	92,729	0,87	0,015
6	100	106,631	10,93	0,142



Εικόνα 6.4 ***Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα, για χρονικό διάστημα 6h.*** *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS και παρουσία συγκέντρωσης 0μM, 25μM, 50μM και 100μM trans-ρεσβερατρόλης για χρονικό διάστημα 6h.. Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον υποδοχέα της nLDL. Απεικόνιση χαρακτηριστικής πηκτής και του ιστογράμματος της μέτρησης πυκνότητας της κάθε ζώνης, κανονικοποιημένης ως προς β-ακτίνη και εκφρασμένης σαν % του δείγματος αναφοράς (0μM ρεσβερατρόλης*

6.2.2 Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα, μετά από διέγερση των κυττάρων με PAF.

Εισαγωγή

Όπως διαπιστώθηκε στο προηγούμενο πείραμα, η διέγερση των HMCL κυττάρων με συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης 25μM, 50μM και 100μM για 6h δεν προκάλεσε ιδιαίτερα σημαντική μεταβολή στην έκφραση του mRNA του n-LDLυποδοχέα. Επομένως οι ίδιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την διέγερση των κυττάρων με PAF και ρεσβερατρόλη για 6h.

Πειραματικό μέρος

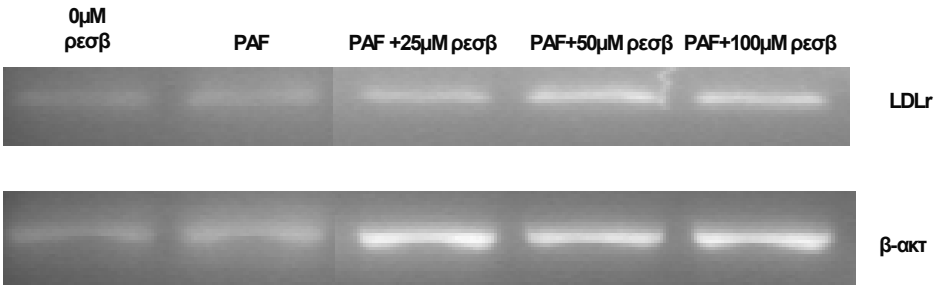
HMCL κύτταρα αναπτύχθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας 25cm^2. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά από 24h παραμονής των κυττάρων σε SFM τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με SFM στο οποίο είχε προστεθεί ρεσβερατρόλη και PAF με τελική συγκέντρωση 25μM, 50μM και 100μM και 10^{-6}M, αντίστοιχα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με ρεσβερατρόλη και PAF για χρονικό διάστημα 6h. Μετά το πέρας των 6h το μέσο επώασης απομακρύνθηκε, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA.

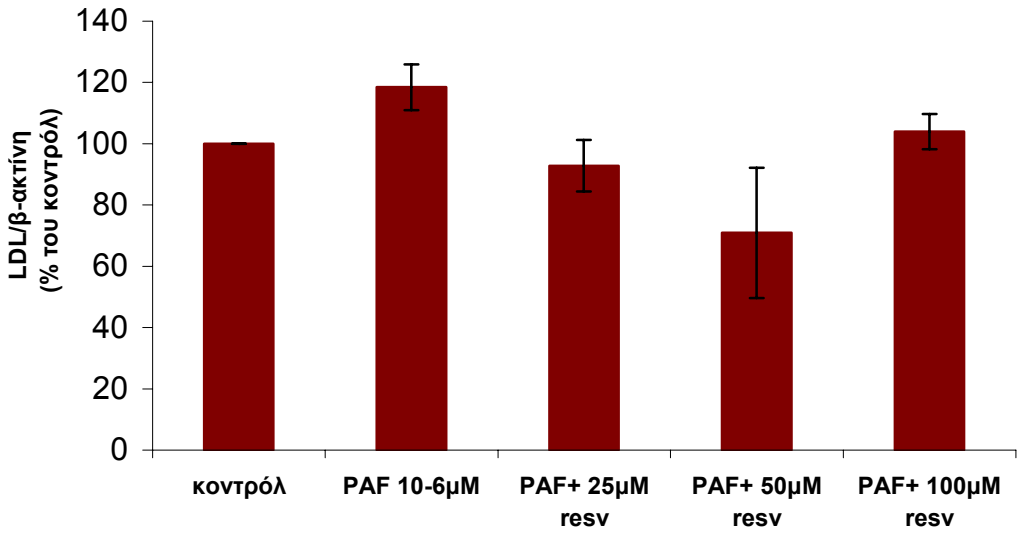
Με RT-PCR δημιουργήθηκε και πολλαπλασιάστηκε το cDNA του γονιδίου του υποδοχέα nLDL και της β-ακτίνης και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR και χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο.

Από τα αποτελέσματα, τα οποία απεικονίζονται στον πίνακα 6.4 και στο ιστόγραμμα της Εικόνας 6.4 φαίνεται ότι μετά από 6h διέγερση των HMCL κυττάρων με ρεσβερατρόλη και PAF φαίνεται ότι και η τρεις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν μείωσαν την αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα που προκλήθηκε μέσω της δράσης του PAF. Μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα εμφανίστηκε όταν η τελική συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στο μέσο επώασης ήταν 50μM.

Πίνακας 6.4 ***Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα, μετά από διέγερση των κυττάρων με PAF.*** *Υπολογίστηκε η επί % μεταβολή της έκφρασης του λόγου LDLr/β-ακτίνη του κάθε δείγματος ως προς το δείγμα αναφοράς (0μM ρεσβερ.). Για κάθε μεταβολή του λόγου LDLr /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο των λόγων LDL /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) και η στατιστική σημαντικότητα του (p-value).*

Χρόνος επώασης σε ώρες	***Ρεσβερατρόλη (μM)***	***PAF (M)***	***LDL/β-ακτίνη % του κοντρόλ)***	***± SD***	***p-value***
6	0(κοντρόλ)	0(κοντρόλ)	100	0	
6	-	10^{-6}	118,428	7,504	0,094
6	25	10^{-6}	92,815	8,406	0,159
6	50	10^{-6}	70,927	21,260	0,060
6	100	10^{-6}	103,951	5,777	0,195





Εικόνα 6.5 ***Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην αύξηση του mRNA του n-LDL υποδοχέα, μετά από διέγερση των κυττάρων με PAF.*** *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS και παρουσία συγκέντρωσης PAF 10^{-6}M, PAF+25μM ρεσβερατρόλης, , PAF+ 50μMρεσβερατρόλης και PAF+100μM -ρεσβερατρόλης για χρονικό διάστημα 6h. Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον υποδοχέα της nLDL. Χαρακτηριστική πηκτή και ιστόγραμμα επίδρασης της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα. Κάθε ζώνη είναι κανονικοποιημένη ως προς β-ακτίνη και εκφρασμένης σαν % του δείγματος που περιέχει μόνο PAF 10^{-6}M.*

6.3 Μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του ScrA I υποδοχέα σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMCL)

Εισαγωγή

Σε παθολογικές καταστάσεις του σπειράματος η παρουσία οξειδωμένων ή ακετυλιωμένων προϊόντων στο μεσοκυττάριο υγρό προκαλεί την αύξηση των εκκαθαριστών υποδοχέων (SR) στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων. Σε αντίθεση με τις καταστάσεις φλεγμονής υπό φυσιολογικές συνθήκες οι εκκαθαριστές υποδοχείς δεν εκφράζονται σε σημαντικό ποσοστό στην κυτταρική επιφάνεια.

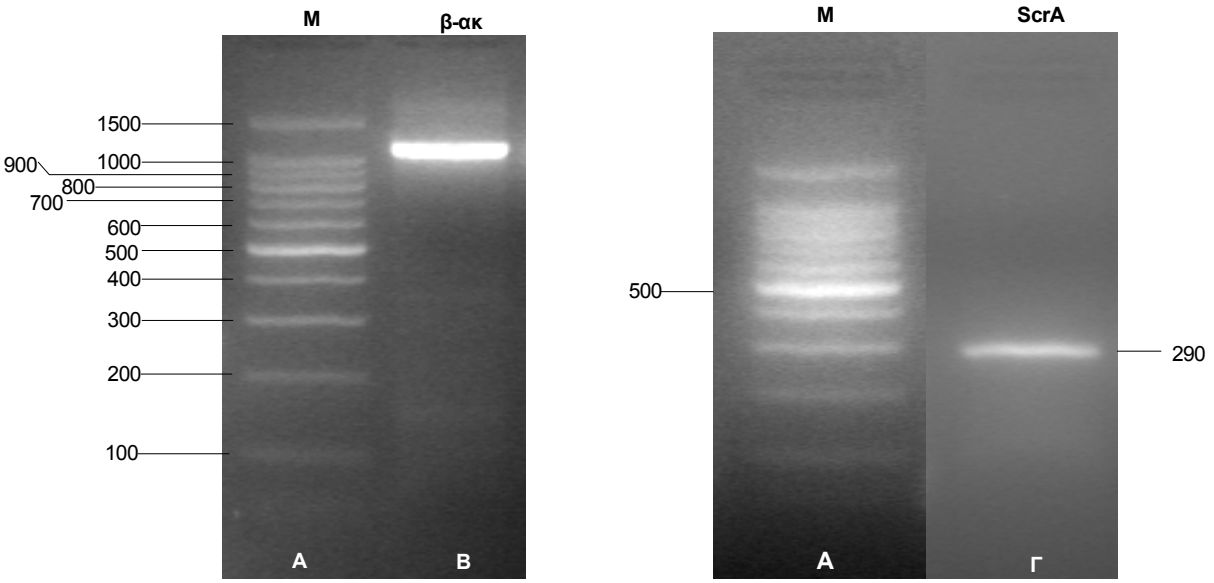
Οι εκκαθαριστές υποδοχείς δεν υπόκεινται σε κυτταρικό έλεγχο, με αποτέλεσμα ο αριθμός τους στην επιφάνεια του κυττάρου να αυξάνεται ανάλογα με την παρουσία οξειδωμένων ή ακετυλιωμένων προϊόντων στο εξωκυττάριο υγρό. Η ερευνητική μας ομάδα έχει δείξει ότι ο PAF σε συγκέντρωση 10^{-9}M μπορεί να αυξήσει *in vitro* την έκφραση του mRNA του εκκαθαριστή υποδοχέα Α τύπου I (SR-A I) από την ομάδα των εκκαθαριστών υποδοχέων.

6.*3.1 Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του SR-A I υποδοχέα*

Πειραματική πορεία

Για το σκοπό της διερεύνησης της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του ScrA I υποδοχέα, HMCL κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας 25cm^2 . Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε να συγχρονιστούν. Μετά από 24h παραμονής των κυττάρων σε SFM τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με φρέσκο SFM που περιείχε για κάθε δείγμα ξεχωριστά 0μM, 1μM, 25μM, 50μM και 100μM ρεσβερατρόλης. Η συγκέντρωση 1000μM ρεσβερατρόλης δεν δοκιμάσθηκε γιατί από τα πειράματα δράσης της ρεσβερατρόλης πάνω στον nLDL υποδοχέα είχε αποδειχθεί τοξική για τα κύτταρα(βλ. 6.1.1) Μετά από τη διέγερση των κυττάρων με trans-ρεσβερατρόλη για 24h τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσεως. Στη συνέχεια τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με συγκεντρώσεις trans-ρεσβερατρόλης 0μM, 1μM, 25μM, 50μM και 100μM ξεπλύθηκαν με PBS και απομονώθηκε το ολικό τους RNA.

Με RT-PCR για τον υποδοχέα της ScrA και για την β-ακτίνη γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων και χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο. Οι ταινίες που προκύπτουν έχουν το μέγεθος που προβλέπεται από τη θέση των αντίστοιχων εναρκτήριων μορίων στο cDNA. Για τον υποδοχέα SR-A I 290bp. (βλ.Εικόνα 6.7)



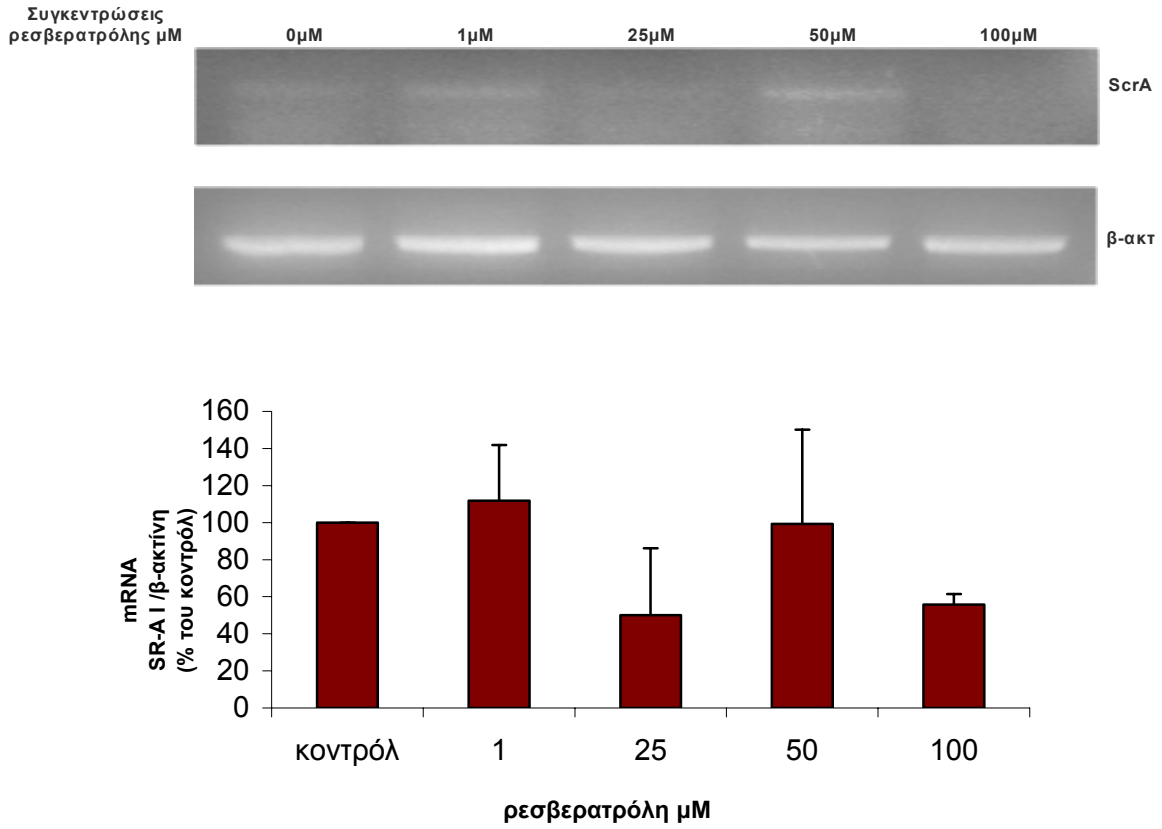
Εικόνα 6.6 ***Μέγεθος των προϊόντων από την RT-PCR για τον υποδοχέα της ScrA και για τη β-ακτίνη:*** *Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για γονίδιο του υποδοχέα ScrA I και για της β-ακτίνης. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων καθώς και του δείκτη μεγεθών cDNA σε πηκτή αγαρόζης 2% που περιείχε και βρωμιούχο αιθίδιο. Α) Δείκτης μεγεθών cDNA (1500-100 bp) Β) Ταινία για την β-ακτίνη Γ) Ταινία για τον υποδοχέα ScrA I.*

Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα του πειράματος που απεικονίζονται στον πίνακα 6.7 και στο ιστόγραμμα 6.8 παρατηρείται ότι η διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με ρεσβερατρόλη για 24h προκάλεσε μείωση της έκφρασης του mRNA του *SR*-A I υποδοχέα όταν η τελική συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο θρεπτικό μέσο ήταν 25μM, 50μM και 100μM. Ανάμεσα σε αυτές τις συγκεντρώσεις μεγαλύτερη μείωση εμφανίστηκε όταν η τελική συγκέντρωση ρεσβερατρόλης ήταν 25μM. Αντιθέτως, η μικρή συγκέντρωση ρεσβερατρόλης 1μM προκάλεσε αύξηση του mRNA του *SR*-A I υποδοχέα. Παρ'όλα αυτά λόγω του μικρού αριθμού πειραμάτων τα αποτελέσματα δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα.

Πίνακας 6.5 ***Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του SR-A I υποδοχέα.*** *Υπολογίστηκε η επί % μεταβολή της έκφρασης του λόγου SR-A I /β-ακτίνη του κάθε δείγματος ως προς το δείγμα αναφοράς (0μM ρεσβερατρόλης). Για κάθε μεταβολή του λόγου SR-A I /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από το μέσο όρο των λόγων ScrA I /β-ακτίνη(% του κοντρόλ) και η στατιστική σημαντικότητα του (p-value). Η στατιστική σημαντικότητα κάθε δείγματος υπολογίστηκε βάση της διαφοράς των απολύτων τιμών των λόγων SR-A I /β-ακτίνη κάθε δείγματος από την απόλυτη τιμή του λόγου SR-A I /β-ακτίνη του δείγματος αναφοράς (0μM ρεσβερατρόλης).*

Ρεσβερατρόλη(μM) επώασης	***SR-A I /β-ακτίνη (% του κοντρόλ)***	**± SD**
0(κοντρόλ)	100	0
1	111,85	30,05
25	50,13	35,92
50	99,28	50,83
100	55,68	5,82



Εικόνα 6.7 : ***Η επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του υποδοχέα της ScrA.*** *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS και παρουσία πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων trans-*

ρεσβερατρόλης, 0μM, 1μM, 25μM, 50μM, 100μM για χρονικό διάστημα 24h. Απομονώθηκε το ολικό RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με κατάλληλους εκκινητές για τον υποδοχέα της ScrA. Το ιστόγραμμα της μέτρησης πυκνότητας της κάθε ζώνης, κανονικοποιημένης ως προς β-ακτίνη και εκφρασμένης σαν % του control.

6.5 Μορφολογικά πειράματα

Εισαγωγή

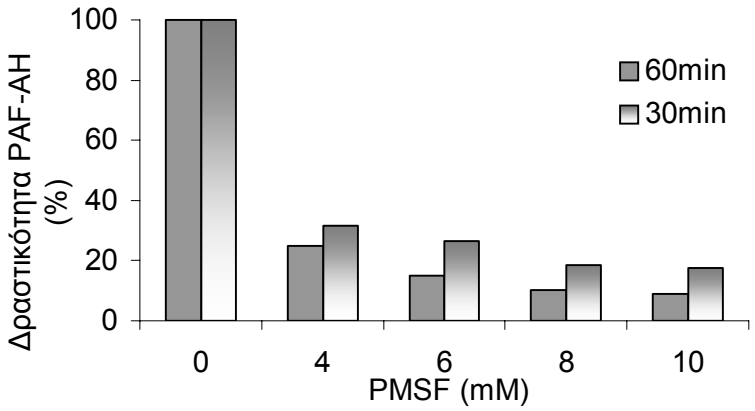
Τα μορφολογικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να επαληθευτούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα μελέτης της επίδρασης της ρεσβερατρόλης α)στην έκφραση του n-LDL και του ScrA I υποδοχέα, β) στην αυξημένη έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα που προκαλείται από τη δράση του PAF. Επίσης μορφολογικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για την μελέτη της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στην αυξημένη έκφραση του mRNA του ScrA I υποδοχέα, που προκαλείται μέσω του PAF.

Αυξημένη έκφραση είτε του n-LDL, είτε του ScrA I υποδοχέα στην επιφάνεια των HMCL κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Το στοιχείο, που χαρακτηρίζει τα αφρώδη κύτταρα είναι τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης. Μέσω των μορφολογικών πειραμάτων μπορεί να γίνει μια έμμεση εκτίμηση της λειτουργίας των υποδοχέων n-LDL και ScrA I, με βάση τα επίπεδα ενδοκυτταρικής χοληστερόλης.

6.4.1 Αναστολή της δραστικότητας PAF-AH

Η εκτίμηση της λειτουργίας του n-LDL υποδοχέα έγινε μετά από επώαση των HMCL κυττάρων σε θρεπτικό μέσο παρουσία περίσσειας n-LDL, παρουσία ή απουσία διεγερτικών παραγόντων (PAF, ρεσβερατρόλη). Είναι γνωστό ότι η n-LDL εμφανίζει δραστικότητα PAF-AH που είναι και το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του PAF. Πριν την επώαση των HMCL κυττάρων με PAF και ρεσβερατρόλη είναι απαραίτητη η απενεργοποίηση της PAF-AH έτσι ώστε να μην αποκοδομηθεί ο PAF.

Για την αναστολή της επιλέχθηκε να προ-επωάζεται η n-LDL (200μg/ml) με PMSF 10 mM για 60 λεπτά για την απενεργοποίηση της PAF-AH.



Εικόνα 6.8 ***Αναστολή της PAF-AH από PMSF.*** *Πραγματοποιήθηκε προεπώαση της n-LDL, για 30 και 60 λεπτά, με διάφορες συγκεντρώσεις PMSF στους 37°C και υπολογίστηκε το % αναστολή της PAF-AH.*

6.4.1.2 Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, μέσω του n-LDLυποδοχέα. με ή χωρίς την εμπλοκή του PAF.

Τα επίπεδα του n-LDL υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου ελέγχονται μέσω μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, ο οποίος εξαρτάται από τα επίπεδα ενδοκυτταρικής χοληστερόλης. Παρ΄όλα αυτά κάτω από παθολογικές καταστάσεις στο σπείραμα η παρουσία PAF μπορεί να προκαλέσει απορύθμιση του n-LDL υποδοχέα. Η αύξηση του n-LDL υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη και συσσώρευση χοληστερόλης, που προέρχεται από την n-LDL στο εσωτερικό των κυττάρων και τη μετατροπή τους σε αφρώδη.

Πειραματική πορεία

HMCL κύτταρα τοποθετούνται και αναπτύσσονται σε ειδικές θήκες καλλιέργειας κυττάρων πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά το συγχρονισμό των κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και στη συνέχεια επωάζονται παρουσία αυξημένων επιπέδων n-LDL (200μg/mL) με ή χωρίς την παρουσία PAF (10^{-6}M) και ρεσβερατρόλης σε συγκεντρώσεις: 1μM, 50μM και 100μM.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα μεσαγγειακά κύτταρα μπορούν να οξειδώσουν την n-LDL. Επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αποτραπεί η οξείδωση της n-LDL, που βρίσκεται στο μέσο επώασης των κυττάρων, η οποία θα μπορούσε να αυξήσει την έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων Α τύπου Ι (ScrA I), μετατρέποντας τα HMCL κύτταρα σε αφρώδη. Η n-LDL που χρησιμοποιήθηκε στα μορφολογικά πειράματα διαθέτει αντιοξειδωτικά EDTA και BHT, που εμποδίζουν την οξείδωση της. Έτσι είναι δυνατό να περιοριστεί η επίδραση παραγόντων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αυξημένη ενδοκυττάρωση χοληστερόλης μόνο στη δράση του PAF πάνω στον LDL υποδοχέα.

Μετά την επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με ή χωρίς τους παράγοντες διέγερσης των κυττάρων (PAF και ρεσβερατρόλη) ακολούθησε χρώση τους κυττάρων με Oil Red O. Η μέθοδος χρώσης των κυττάρων αναφέρεται αναλυτικά στις μεθόδους. Μετά το τέλος της χρώσης οι αντικειμενοφόρες πλάκες των κυττάρων παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσεως και οι εικόνες αποθηκεύτηκαν σε υπολογιστή, που βρίσκεται συνδεδεμένος με την κάμερα του μικροσκοπίου.

Μετά από σύγκριση της εικόνας που παρουσίαζαν τα κύτταρα που είχαν διεγερθεί είτε με PAF, είτε με ρεσβερατρόλη, με την εικόνα που παρουσίαζαν τα κύτταρα , που είχαν επωαστεί, μόνο με περίσσεια nLDL παρατηρήθηκαν τα εξής :

α) Η περίσσεια n-LDL στο εξωκυττάριο υγρό προκάλεσε την αρνητική ανατροφοδότηση της έκφρασης του n-LDL υποδοχέα, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται αφρώδη κύτταρα όταν απουσίαζαν διεγερτικοί παράγοντες στο μέσο επώασης. (HMCL αναφοράς)

β) Η επώαση των HMCL κυττάρων με PAF (10^{-6}M) προκάλεσε το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.

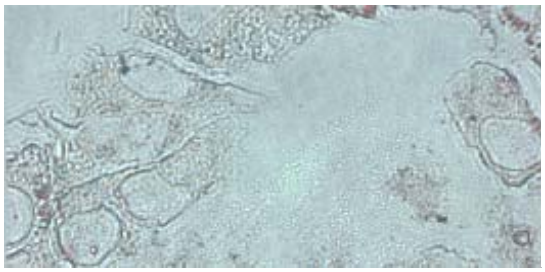
γ) Η επώαση των κυττάρων με ρεσβερατρόλη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 1μM, 50μM και 100μM οδήγησε στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, σε σχέση με την εικόνα των HMCL κυττάρων αναφοράς, όταν η τελική συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο μέσο επώασης ήταν 50μM και 100μM, ενώ η συγκέντρωση ρεσβερατρόλης 1μM δεν είχε καμία επίδραση πάνω στα κύτταρα. Το παραπάνω επαληθεύει τα αποτελέσματα του πειράματος διέγερσης των κυττάρων με ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις 1μM, 25μM, 50μM και 100μM για 24h και εκτίμηση της έκφρασης του mRNA του n-LDL υποδοχέα με RT-PCR και με ποσοτικοποίηση της ταινίας της πηκτής ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR. Το πείραμα περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.1.1.

δ) Η επώαση των κυττάρων με PAF (10^{-6}M) και ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις 1μM, 50μM και 100μM μείωσε το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων όταν η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης ήταν 1μM και 50μM, ενώ στην περίπτωση που η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης ήταν 100μM παρατηρήθηκε αύξηση του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων σε σχέση με τα HMCL κύτταρα αναφοράς.

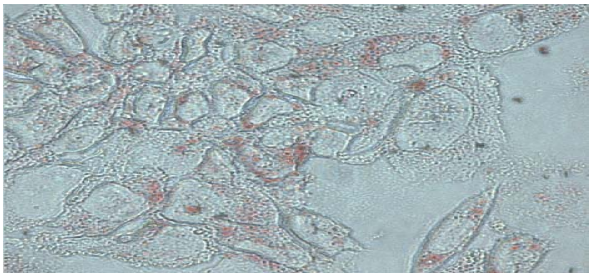
Πίνακας 6.6 ***Μορφολογικά πειράματα εκτίμησης της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, μέσω της δράσης του n-LDL υποδοχέα.*** *HMCL κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικές θήκες καλλιέργειας κυττάρων πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σε κάθε θήκη επικρατούσαν διαφορετικές συνθήκες. Οι παράγοντες που προστέθηκαν στο μέσο επώασης των κυττάρων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα*

.

Διαμερίσματα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
n-LDL (μg/ml)	250	250	250	250	250	250	250	250
PAF (CμM)	-	10^{-6}	-	10^{-6}	-	10^{-6}	-	10^{-6}
Ρεσβερατρόλη(CμM)	-	-	1	1	50	50	100	100

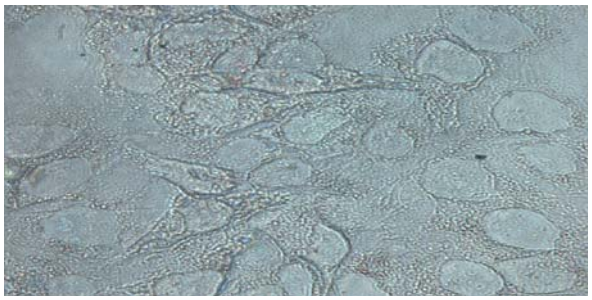


1. n-LDL

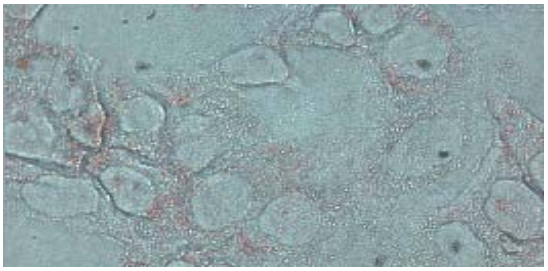


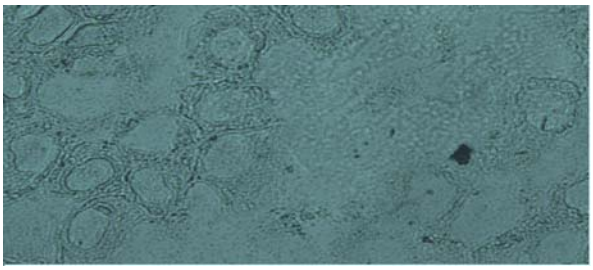
2.n-LDL+PAF

3. n-LDL +1μM ρεσβερ.



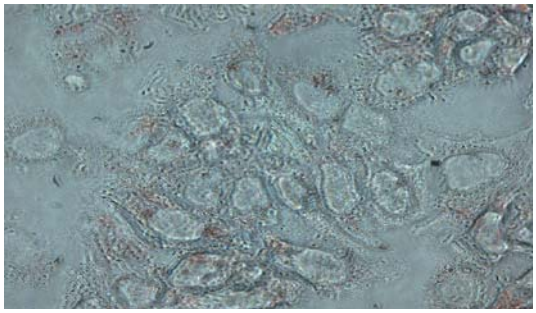
4.n-LDL+PAF+1μM ρεσβερ.

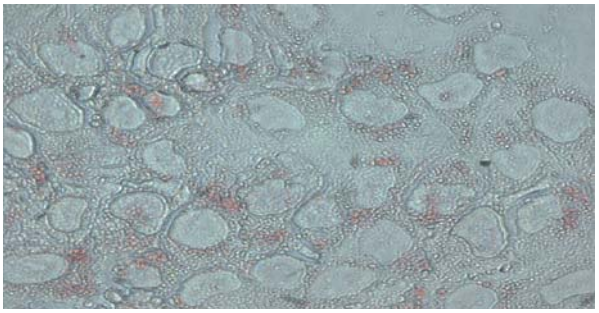




5.n-LDL + 50μM ρεσβ.

6. n-LDL + PAF+50μM ρεσβ.





7. n-LDl + 100μM

8.n-LDL +PAF+ 100μM

Εικόνα 6.9 ***Μορφολογική μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλη στην αύξηση του LDL υποδοχέα μετά από επώαση των κυττάρων με PAF.*** *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) παρουσία 200μg/ml n-LDL για 24 ώρες απουσία ή παρουσία PAF και ρεσβερατρόλης: 1) Απουσία παραγόντων διέγερσης των κυττάρων, 2) PAF: 10^{-6}M, 3)Ρεσβερατρόλη: 1μM, 4) PAF: 10^{-6}M και ρεσβερατρόλη:1μM, 5)Ρεσβερατρόλη: 50μM, 6)PAF: 10^{-6}M και ρεσβερατρόλης: 50μM, 7)Ρεσβερατρόλη:100μM, 8)PAF: 10^{-6}M και ρεσβερατρόλη:100μM.*

6.4.2 *Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων μέσω της δράσης του ScrA I υποδοχέα, με ή χωρίς την εμπλοκή του PAF.*

Η αύξηση του ScrA I ενεργοποιείται από την ύπαρξη οξειδωμένης ή ακετυλιωμένης LDL λιποπρωτεΐνης στο περιβάλλον του κυττάρου. Ο ScrA I υποδοχέας δεν ελέγχεται από κάποιο κυτταρικό μηχανισμό ρύθμισης με αποτέλεσμα η έκφραση του να αυξάνεται συνεχώς με την αύξηση οξειδωμένων και ακετυλιωμένων προϊόντων LDL λιποπρωτεϊνών στο μεσοκυττάριο υγρό, που περιβάλλει τα μεσαγγειακά κύτταρα. Η αυξημένη πρόσληψη οξειδωμένης ή ακετυλιωμένης LDL λιποπρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα

την αυξημένη πρόσληψη και συσσώρευση τροποποιημένης LDL στο εσωτερικό των μεσαγγειακών κυττάρων και τη μετατροπή τους σε αφρώδη.

Πειραματικό μέρος

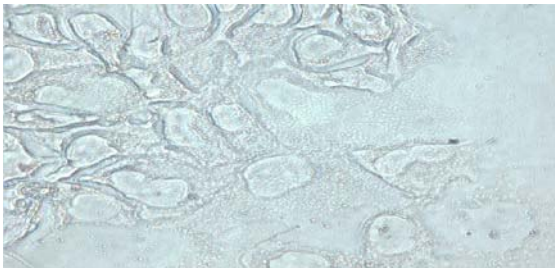
HMCL κύτταρα τοποθετούνται και αναπτύσσονται σε ειδικές θήκες καλλιέργειας κυττάρων πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά το συγχρονισμό των κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και στη συνέχεια επωάζονται απουσία ή παρουσία PAF (10^{-9}M) και ρεσβερατρόλης σε συγκεντρώσεις: 1μM, 50μM και 100μM. Μετά το πέρας των 24 ωρών γίνεται προσθήκη ακετυλιωμένης-LDL στο θρεπτικό μέσο. Η ακετυλιωμένη-LDL (200μg/ml) είναι απαραίτητο να τοποθετηθεί στο θρεπτικό μέσο μετά από 24h επώαση των μεσαγγειακών κυττάρων με διεγερτικούς παράγοντες, έτσι ώστε να μη εμπλέκεται στην αύξηση του ScrA.

Μετά την επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με ακετυλιωμένη-LDL πραγματοποιήθηκε χρώση των HMCL κυττάρων με Oil Red O. Η μέθοδος χρώσης των κυττάρων αναφέρεται αναλυτικά στις μεθόδους. Μετά το τέλος της χρώσης οι αντικειμενοφόρες πλάκες των κυττάρων παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσεως και οι εικόνες αποθηκεύτηκαν σε υπολογιστή, που βρίσκεται συνδεδεμένος με την κάμερα του μικροσκοπίου.

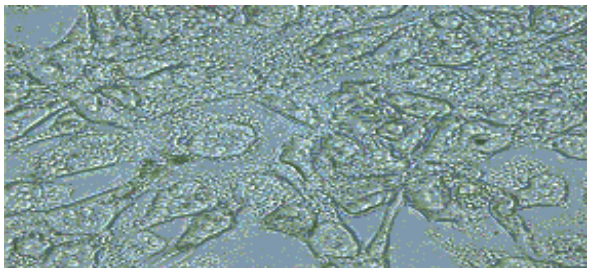
Μετά το τέλος της χρώσης η αντικειμενοφόρος πλάκα παρατηρήθηκε σε μιρκοσκόπιο αντιστρόφου φάσεως. Κατά την παρατήρηση των HMCL κυττάρων στο μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός των κυττάρων είχε αποκολληθεί από την αντικειμενοφόρο πλάκα, ενώ τα κύτταρα που είχαν απομείνει δεν είχαν χρωματιστεί καλά. Γι' αυτό το λόγο δεν ήταν δυνατό να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα, για τη δράση της ρεσβερατρόλης στη μετατροπή των HMCL κυττάρων σε αφρώδη μέσω των ScrA I υποδοχέων.

Πίνακας 6.7 ***Μορφολογικά πειράματα εκτίμησης της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, μέσω της δράσης του ScrA I υποδοχέα.*** *HMCL κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικές θήκες καλλιέργειας κυττάρων πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σε κάθε θήκη επικρατούσαν διαφορετικές συνθήκες. Οι παράγοντες που προστέθηκαν στο μέσο επώασης των κυττάρων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα*

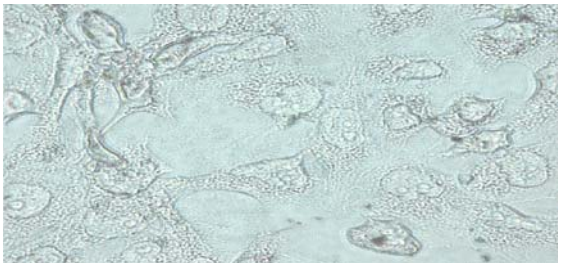
Διαμερίσματα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
ακετυλ.-LDL (μg/ml)	200	200	200	200	200	200	200	200
PAF (CμM)	-	10^{-9}	-	10^{-9}	-	10^{-9}	-	10^{-9}
Ρεσβερατρόλη(CμM)	-	-	1	1	50	50	100	100



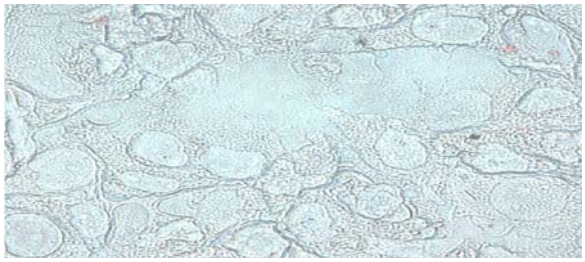
1. Ακετυλιωμένη- LDL



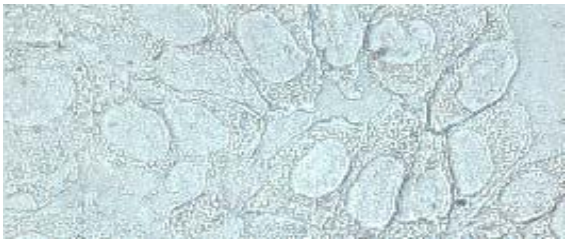
2.Ακετυλιωμένη-LDL + PAF



3. Ακετυλιωμένη- LDL + ρεσβερ.1μM



4. Ακετυλιωμένη-LDL + PAF+ρεσβερ.1μM



5. Ακετυλιωμένη-LDL + PAF+ρεσβερ.50μM

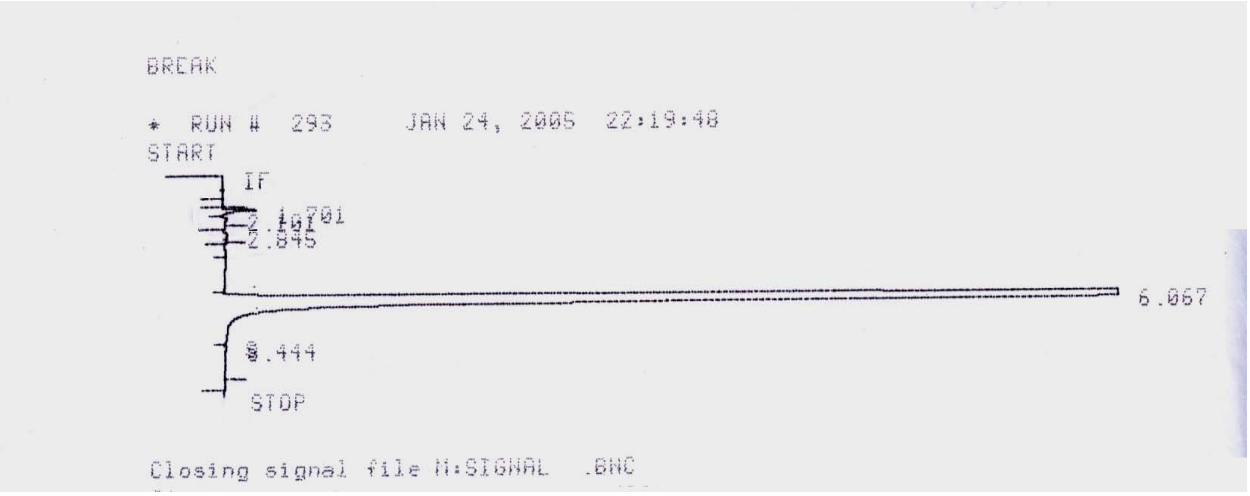
Εικόνα 6.10 ***Μορφολογική μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλη στην αύξηση του ScrA υποδοχέα μετά από επώαση των κυττάρων με PAF.*** *Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM) για 24 ώρες απουσία ή παρουσία PAF και ρεσβερατρόλης: 1) Απουσία παραγόντων διέγερσης των κυττάρων, 2) PAF: 10^{-6}M, 3)Ρεσβερατρόλη: 1μM, 4) PAF: 10^{-6}M και ρεσβερατρόλη:1μM, 5)Ρεσβερατρόλη: 50μM, 6)PAF: 10^{-6}M και ρεσβερατρόλης: 50μM, 7)Ρεσβερατρόλη:100μM, 8)PAF: 10^{-6}M και ρεσβερατρόλη:100μM. παρουσία 200μg/ml ακετυλιωμένης LDL*

6.5 Πειράματα ελέγχου σταδίων πειραματικής πορείας

6.5.1 *Έλεγχος ακεραιότητας ρεσβερατρόλης*

Το trans-ισομερές της ρεσβερατρόλης, που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διέγερσης των κυττάρων αποτελεί ένα στιλβένιο με μεγάλη ευαισθησία στο φως και στη θερμοκρασία. Με σκοπό να αποφευχθεί η διάσπαση της, η ποσότητα εργασίας τοποθετούνταν μέσα σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου eppendorf, οι οποίοι τυλίγονταν με αλουμινόχαρτο για την προστασία της ρεσβερατρόλης. Η ρεσβερατρόλη φυλασσόταν στους –20°C. Επιπλέον, η ακεραιότητα της ρεσβερατρόλης ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Η μέθοδος της χρωματογραφίας HPLC περιγράφεται αναλυτικά στον κεφάλαιο των μεθόδων.

Από τα αποτελέσματα του χρωματογραφίας HPLC προέκυψε καθαρή κορυφή για τη trans-ρεσβερατρόλη, το οποίο δηλώνει ότι η trans-ρεσβερατρόλη δεν έχει διασπαστεί. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα της trans-ρεσβερατρόλης φαίνεται στην εικόνα 6.11.



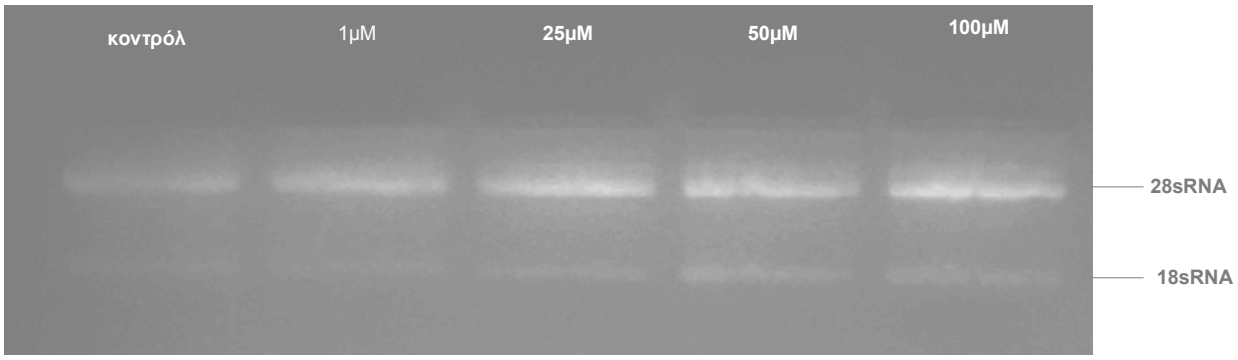
Εικόνα 6.11. ***Έλεγχος ακεραιότητας trans-ρεσβερατρόλης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).*** *Η ρεσβερατρόλη φυλασσόταν στους –20° C και η ποσότητα εργασίας τοποθετούνταν σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου eppendorf και προστατευόταν από το φως. Από το χρωματογράφημα προκύπτει καθαρή κορυφή της ρεσβερατρόλης στα 6,067 min το οποίο δηλώνει ότι η trans-ρεσβερατρόλη δεν έχει διασπαστεί.*

6.5.2 *Ηλεκτροφόρηση RNA*

Το RNA αποτελεί μονόκλωνο μόριο, το οποίο σε αντίθεση με το DNA (δίκλωνο) είναι ευάλωτο στη δράση αποδιατακτικών μορίων, όπως είναι οι RNAάσες. Οι RNAάσες είναι άφθονες και πολύ σταθερές πρωτεΐνες, που μπορούν να διασπάσουν το RNA και είναι δύσκολο να απενεργοποιηθούν. Η πιο κοινή

πηγή μόλυνσης είναι τα χέρια του ερευνητή καθώς και τα βακτήρια και οι μύκητες (μούχλα) που μπορεί να είναι παρόντα στα σωματίδια σκόνης του αέρα. Γι'αυτό πέρα από τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων των RNAασών είναι πολύ σημαντικό η απομόνωση του RNA να γίνεται σε καθαρό και κλειστό περιβάλλον και να γίνεται συχνή αλλαγή γαντιών. Επιπλέον, η ανάπτυξη υψηλής θερμοκρασίας στα δείγματα RNA, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης αποτελεί ένα επιπλέον παράγοντα που μπορεί να συμβάλλει στην αποδιάταξη του μορίου. Η αύξηση της θερμοκρασίας στα δείγματα RNA αυξάνει και την ενέργεια της εσωτερικής ενέργειας των δεσμών του μορίου, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση του. Γι΄αυτό και όλη η διαδικασία της απομόνωσης θα πρέπει να γίνεται στους $4^{o}C$, το οποίο επιτυγχάνεται με τη διατήρηση των δειγμάτων RNA σε πάγο. Η διαδικασία απομόνωσης αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο των μεθόδων.

Με σκοπό να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα του τρόπου εργασίας, όσον αναφορά την εξάλειψη της δράσης αποδιατακτικών παραγόντων στο RNA κατά την απομόνωση του πραγματοποιούνταν, κατά διαστήματα, ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας (2,5γρ) απομονωμένου RNA.. Παρακάτω φαίνεται χαρακτηριστική πηκτή ηλεκτροφόρησης RNA.



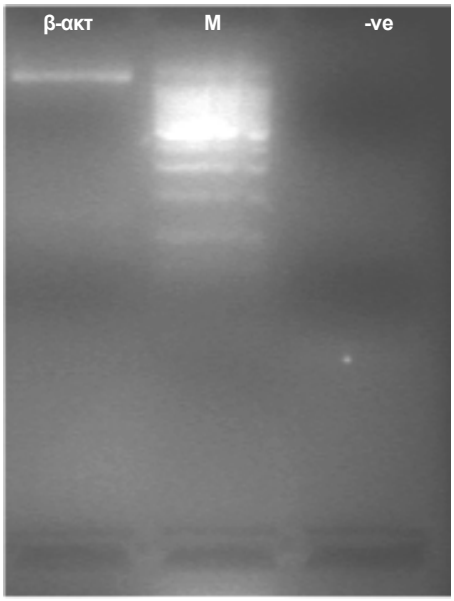
Εικόνα 6.11 ***Πηκτή ηλεκτροφόρησης RNA***. *Απομόνωση RNA από HMCL κύτταρα, τα οποία έχουν επωαστεί με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις trans-ρεσβερατρόλης: 0μM (κοντρόλ), 1μM, 25μM, 50μM και 100μM. Σε όλα τα δείγματα προέκυψε μόνο μία ταινία, η οποία αντιστοιχεί στο RNA. Η μέθοδος απομόνωσης εξαλείφει τη δράση των RNAασών και απομακρύνει πιθανές προσμίξεις του RNA με DNA ή με πρωτεΐνες. Η ηλεκτροφόρηση του RNA έδωσε παρόμοια εικόνα και για το RNA που είχε απομονωθεί και στα υπόλοιπα πειράματα.*

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν ότι από όλα τα δείγματα προέκυψε μόνο μία ταινία, το οποίο δηλώνει ότι το RNA δεν διασπάστηκε, έτσι ώστε να προκύψουν επιμέρους τμήματα με μικρότερο μέγεθος. Επομένως, η μέθοδος απομόνωσης εξαλείφει τη δράση των RNAασών και απομακρύνει πιθανές προσμίξεις του RNA με DNA ή με πρωτεΐνες.

6.3.3 Έλεγχος πιθανής επιμόλυνσης προϊόντων PCR με DNA.

Με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT) το μόριο του RNA μπορεί να αντιγραφεί σε DNA, το οποίο αποτελεί το c-DNA. Στη συνέχεια το c-DNA μπορεί με την προσθήκη ειδικών για κάθε γονίδιο εναρκτήριων μορίων να αποδώσει μέσω της κυκλικής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πολλά αντίγραφα ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Τα κρίσιμα στάδια στα οποία μπορεί να γίνει επιμόλυνση των προϊόντων PCR με μη επιθυμητό DNA είναι α) κατά την προετοιμασία του μίγματος αντιδρώντων PCR (master mix), όπου ο ερευνητής μπορεί λόγω λάθους χειρισμού να εισάγει ξένο DNA στα δείγματα ή β), λόγω επικοινωνίας του μίγματος των αντιδρώντων μορίων με το περιβάλλον, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης PCR. Το τελευταίο είναι αποτέλεσμα κυρίως της μη ικανοποιητικής εφαρμογής των καπακιών των σωλήνων, μέσα στα οποία βρίσκονται το μίγμα αντιδραστηρίων PCR.

Με σκοπό να ελεγχθεί η τυχόν πρόσμιξη των προϊόντων PCR με μη επιθυμητό DNA τοποθετούνταν κατά διαστήματα ένα επιπλέον μίγμα αντιδραστηρίων PCR, το οποίο αντί για προϊόν RT περιείχε DEPC νερό (-ve). Τα DEPC νερό είναι απαλλαγμένο DNA και RNA. Συνεπώς δεν περιέχει υπόστρωμα πάνω οποία θα δράσει η πολυμεράση, με αποτέλεσμα να μην αναμένονται προϊόντα PCR μετά το τέλος της αντίδρασης PCR. Παρακάτω φαίνεται χαρακτηριστικό δείγμα πηκτής που περιείχε και δείγμα ελέγχου για προσμίξεις DNA στα προϊόντα της PCR.



Εικόνα 6.12 ***Έλεγχος πιθανής επιμόλυνσης προϊόντων PCR με μη επιθυμητό DNA.*** *Μαζί με τα δείγματα που προορίζονται για PCR τοποθετείται και ένα μίγμα αντιδραστηρίων PCR που περιέχει DEPC νερού αντί δείγματος (-ve). Αυτό χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου προσμίξεων προϊόντων της PCR, με μη επιθυμητό DNA. Η ύπαρξη β-ακτίνης στα αριστερά του μάρτυρα δηλώνει ότι έχει πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR. Στα δεξιά του μάρτυρα βρίσκεται το –ve το οποίο δεν εμφάνισε καμία ταινία, γεγονός το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχουν προσμίξεις μη επιθυμητού DNA στα προϊόντα της PCR.*

Κεφάλαιο 7ο
Συζήτηση - Συμπεράσματα

Με τον όρο «Μεσογειακή Δίαιτα» αναφερόμαστε, σήμερα, στα διατροφικά χαρακτηριστικά των περιοχών της Μεσογείου, όπου ευδοκιμεί το ελαιόδεντρο και για την χρονική περίοδο τέλη 1950 και αρχές 1960. Κατά την χρονική αυτή περίοδο οι επιπτώσεις του 2ου Παγκοσμίου Πολέμου είχαν παρέλθει στις Μεσογειακές χώρες, αλλά δεν είχε ακόμα επικρατήσει η κουλτούρα των "fast-food" στην περιοχή. Η ελληνική παραλλαγή της Μεσογειακής Δίαιτας ταυτίζεται συχνά με την παραδοσιακή δίαιτα της ελληνικής νήσου Κρήτης (Κρητική Παραδοσιακή διατροφή). Η αυξημένη περιεκτικότητα της Μεσογειακής Δίαιτας σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης την καθιστούν πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων.

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν κύριο συστατικό των φυτών. Στη φύση υπάρχει μία τεράστια ποικιλία φαινολικών ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται στα τρόφιμα συνήθως με τη μορφή των γλυκοζιτών τους. Οι φαινολικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα κατατάσσονται σε 10 κύριες τάξεις, ενώ τα φλαβονοειδή (φαινολικές ενώσεις με σκελετό C6-C3-C6), τα οποία αποτελούν τα 2/3 των φαινολικών ενώσεων στα τρόφιμα, κατατάσσονται σε 13 διαφορετικές ομάδες. Πολλές επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να ασκήσουν προστατευτικό ρόλο, έναντι διαφόρων εκφυλιστικών νοσημάτων, όπως τα CHD και ο καρκίνος.

Το κόκκινο κρασί αποτελεί μία πλούσια και συμπυκνωμένη πηγή φαινολικών ουσιών και ένα από τα κεντρικά τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας, το οποίο καταναλώνεται σε μέτριες ποσότητες. Το 1979, ο St.Leger et al περιέγραψε μία ισχυρή αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση κόκκινου κρασιού και τη θνησιμότητα από CHD σε 18 δυτικές χώρες. Η ευεργετική δράση του κόκκινου κρασιού καθιερώθηκε μέσω του «Γαλλικού Παράδοξου» δηλαδή της στατιστιστικής παρατήρησης ότι ο πληθυσμός της Γαλλίας παρόλο που χαρακτηριζόταν από τους ίδιους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη CHD, όπως και οι πληθυσμοί των υπολοίπων χωρών (π.χ κάπνισμα, αυξημένη κατανάλωση κορεσμένου λίπους) παρουσίαζε χαμηλή θνησιμότητα από CHD. Η διατύπωση αυτή προσανατόλισε την έρευνα στη μελέτη των φαινολικών ενώσεων του κόκκινου κρασιού. Ανάμεσα σε αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται σε αυξημένη συγκέντρωση στο κόκκινο κρασί σε σχέση με το λευκό.

Η ρεσβερατρόλη ανήκει δομικά στα στιλβένια και παρουσιάζει μία πληθώρα ευεργετικών δράσεων, όπως: α) προστασία της LDL από οξείδωση, μέσω δέσμευσης αναγωγικών μετάλλων ή ελευθέρων ριζών, προστασία των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω παρεμπόδισης της οξείδωσης των λιποειδών τους, β) υποχοληστερολαιμική δράση, μέσω αυξημένης πρόσληψης χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα, γ) αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω αναστολής της σύνθεσης εικοσανοειδών, προφλεγμονωδών προϊόντων και την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, δ) αντικαρκινική δράση, μέσω παρεμπόδισης της

απόπτωσης και της αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και δράσης ως φυτοοιστρογόνου ε) αντιθρομβωτική δράση, μέσω αναστολής της δράσης προθρομβωτικών παραγόντων, στ) αγγειοχαλαρωτική δράση, μέσω πρόκλησης απελευθέρωσης NO.

Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας της ρεσβερατρόλης έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως *in vivo* σε ζώα και *in vitro* σε κύτταρα, ενώ οι μελέτες σε ανθρώπους περιλαμβάνουν ένα μικρό αριθμό εθελοντών και ο αριθμός τους είναι περιορισμένος. Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν ότι οι γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης απορροφώνται σε μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου και ότι μεγάλο ποσοστό της προσλαμβανόμενης ρεσβερατρόλης, κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών της φθάνει στο νεφρό και αποβάλλεται μέσω των ούρων.

Παρά τις ποικίλες βιολογικές δράσεις και την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρόλης στο νεφρό οι μελέτες που ερευνούν την επίδραση της σε νεφρικό ιστό είναι περιορισμένες, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν μελέτες επίδρασης της ρεσβερατρόλης σε νεφρικά κύτταρα του σπειράματος, που αποτελεί το πρώτο στόχο φλεγμονωδών παραγόντων και οξειδωμένων σωμάτων, που φθάνουν στο νεφρό μέσω του αίματος.

Οι καρδιαγγειακές ασθένειες είναι η κυριότερη αιτία θανάτου των ασθενών με εξελισσόμενη νεφρική βλάβη γεγονός που οδήγησε αρχικά στη συσχέτιση των παραγόντων κινδύνου των δυο ασθενειών. Ο Ross καθιέρωσε την αθηροσκλήρυνση ως φλεγμονώδη νόσο επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του Virchow και άρχισε επομένως να γίνεται πιο ξεκάθαρος ο ρόλος της φλεγμονής και στην περίπτωση της σπειραματοσκλήρυνσης. Ομοιότητες, οι οποίες παρατηρήθηκαν ανάμεσα στη σπειραματοσκλήρυνση και την αθηροσκλήρυνση είναι ο i) μη φυσιολογικός μεταβολισμός λιποειδών, ii) ο αρχικός τραυματισμός του ενδοθηλίου, iii) ο συνεχόμενος πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών ή μεσαγγειακών κυττάρων, iv) ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, v) η επέκταση της εξωκυττάριας ουσίας, vi) η νέκρωση του ιστού και vii) τελικά η σκλήρυνση.

Τα μεσαγγειακά κύτταρα (MC) αποτελούν το 1/3 των κυττάρων του σπειράματος και έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο. Τα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν πρωταρχικό ρόλο στη σπειραματοσκλήρυνση. Ιστολογικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι κατά τον τραυματισμό του σπειράματος, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων αποτελούν επιδιορθωτικό μηχανισμό της φλεγμονής στο σπείραμα. Παρ΄όλα αυτά η παρατεταμένη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στο φαινότυπο των μεσαγγειακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την πιθανή εμφάνιση τόσο του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού (υπερπλασία) όσο και της υπερβολικής απόπτωσης τους (υποπλασία). Τα μεσαγγειακά κύτταρα του σπειράματος εμφανίζουν μορφολογικές, ιστολογικές και λειτουργικές ομοιότητες με τα λεία μυϊκά κύτταρα (VSMC) και σε καταστάσεις φλεγμονής μπορούν να μετατραπούν σε αφρώδη κύτταρα, όπως και τα λεία μυϊκά κύτταρα.

Από την ερευνητική μας ομάδα έχει προταθεί ο μηχανισμός εμπλοκής του PAF στην αθηροσκλήρυνση. Δεδομένου του κύριου ρόλου του PAF στην πρόκληση της αθηρογέννεσης θεωρείται ότι η ύπαρξη αναστολέων του PAF στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας μπορεί να έχει προστατευτική δράση έναντι της νόσου. Η ύπαρξη τέτοιων ενώσεων (φώσφολιποειδή, γλύκολιποειδή και φαινολικές ενώσεις), έχει ήδη

πιστοποιηθεί στα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας, όπως το ελαιόλαδο και το κρασί. Δεδομένου της ομοιότητας της αθηροσκλήρυνσης και σπειραματοσκλήρυνσης υπήρχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η δράση του PAF στη σπειραματοσκλήρυνση. Επιπλέον, μέσω της μελέτης της δράσης αναστολέων του PAF στις λειτουργίες νεφρικών κυττάρων, όπως τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι δυνατό να διερευνηθεί μία επιπλέον παράμετρος της ευεργετικής για την υγεία δράσης της Μεσογειακής Δίαιτας.

Πρόσφατες *in vitro* μελέτες δείχνουν την εμπλοκή του PAF στην σπειραματοσκλήρυνση, η οποία έγκειται στην ικανότητα του να προκαλεί αύξηση των επιπέδων του mRNA τόσο του εκκαθαριστή (SR-A I) υποδοχέα, όσο και του n-LDL υποδοχέα σε HMCL κύτταρα, σε συγκεντρώσεις 10^{-9}M και 10^{-6}M, αντίστοιχα. Η αύξηση της μεταγραφής του mRNA και της έκφρασης της πρωτεΐνης των εκκαθαριστών υποδοχέων (SR-A I) στην κυτταρική επιφάνεια αποτελεί το πρώτο στάδιο της μετατροπής των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη. Οι n-LDL υποδοχείς δεν συσχετίζονταν μέχρι σήμερα με το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, διότι σε αντίθεση με τους SR-A I υπόκεινται σε αυστηρό κυτταρικό μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης, μέσω των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης στο εσωτερικό του κυττάρου. Παρ΄όλα αυτά πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι σε παθολογικές καταστάσεις και κάτω από την επίδραση κυτταροκινών και PAF μπορεί να απορυθμιστεί ο μηχανισμός ρύθμισης της παραγωγής n-LDL υποδοχέα, με αποτέλεσμα την συμμετοχή του στη συσσώρευση χοληστερόλης στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω αυξημένης πρόσληψης n-LDL.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η *in vitro* μελέτη της επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στις λειτουργίες των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων. Επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν α) η μελέτη της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του n-LDL και του SR-A I υποδοχέα σε HMCL κύτταρα και β) η μελέτη της επίδρασης μη δραστικών ποσοτήτων trans-ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από PAF αύξηση του mRNA του n-LDL και του SR-A I υποδοχέα, σε HMCL κύτταρα.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης στα επίπεδα mRNA του n-LDL και του SR-A I υποδοχέα, HMCL κύτταρα, που είχαν συγχρονιστεί καλλιεργήθηκαν με trans-ρεσβερατρόλης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις: 1μM, 25μM, 50μμ,100μM και 1000μM, για 24h. Η τελική συγκέντρωση 1000μM κρίθηκε τοξική για τα κύτταρα, αφού παρατηρήθηκε ότι είχε προκαλέσει αποκόλληση των κυττάρων, στα δοχεία καλλιέργειας και δεν ξαναχρησιμοποιήθηκε σε επόμενα πειράματα. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος έδειξαν ότι η trans-ρεσβερατρόλη δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων των mRNA LDL υποδοχέα σε σχέση με το δείγμα αναφοράς σε συγκέντρωση 1μM, 25μM και 50μM ενώ η επώαση με 100μM ρεσβερατρόλης εμφάνισε μία τάση αύξησης των επιπέδων του n-LDL υποδοχέα.

Εφ'όσον διαπιστώθηκαν οι μη δραστικές συγκεντρώσεις της trans-ρεσβερατρόλης στην έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα (1μM, 25μM και 50μM) τα πειράματα προσανατολίστηκαν προς στη διερεύνηση της δράσης της trans-ρεσβερατρόλης στα επίπεδα του mRNA του n-LDL υποδοχέα σε

διαφορετικές χρονικές στιγμές. Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν ήταν σε ώρες: 0h, 2h, 4h, 6h και 24h. Από προηγούμενα πειράματα της ερευνητικής μας ομάδας έχει φανεί ότι ο PAF προκαλεί μέγιστη αύξηση των επιπέδων του mRNA του n-LDL υποδοχέα, στις 6h. Επομένως οι χρόνοι που επιλέχθηκαν ήταν σκόπιμο να βρίσκονταν γύρω από τις 6h. Η συγκέντρωση της trans-ρεσβερατρόλης στα πειράματα κινητικής χρόνου ήταν 50μM, η οποία επιλέχθηκε με βάση τα εξής κριτήρια: α) προηγούμενα πειράματα της ερευνητικής μας ομάδας είχαν δείξει ότι η trans-ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 100μM μπόρεσε να αναστείλει την επαγώμενη από PAF (10^{-10}M) συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, β) η συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης 100μM είχε εμφανίσει μία τάση αύξησης των επιπέδων του mRNA του n-LDL υποδοχέα. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία επιλέχθηκε η αμέσως μικρότερη των 100μM συγκέντρωση, που δεν εμφάνιζε δραστικότητα στα επίπεδα του mRNA του n-LDL υποδοχέα., στις 24h. Τα αποτελέσματα της κινητικής της trans-ρεσβερατρόλης σε συγκέντρωση 50μM έδειξαν τάση μείωσης των επιπέδων του mRNA LDL υποδοχέα σε σχέση με το δείγμα αναφοράς στις 4h και στις 6h επώασης των κυττάρων, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του mRNA LDL υποδοχέα σε σχέση με το δείγμα αναφοράς στις 2h και στις 24h. Παρ΄όλα αυτά ο μικρός αριθμός (μόνο 2) των πειραμάτων της κινητικής της trans-ρεσβερατρόλης (50μM) που πραγματοποιήθηκαν δεν επέτρεψε τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η διαπίστωση της τάσης μείωσης των επιπέδων των επιπέδων mRNA του LDL υποδοχέα οδήγησε στην εξέταση της δράσης επιπλέον συγκεντρώσεων trans-ρεσβερατρόλης, στις 6h επώασης των κυττάρων. Επομένως τα κύτταρα επωάστηκαν με 25μM, 50μM και 100μM για 6h. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η ρεσβελατρόλη σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική μεταβολή του mRNA του LDL υποδοχέα σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Παρολαυτά μια τάση μείωσης του mRNA του LDL υποδοχέα εμφανίστηκε στη συγκέντρωση 50μM .

Με σκοπό να διαπιστωθεί η δράση της trans-ρεσβερατρόλης στην αύξηση που προκαλεί ο PAF στα επίπεδα του mRNA του n-LDL υποδοχέα στις 6h, τα κύτταρα επωάστηκαν με PAF (10^{-6}M) και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης 25μM, 50μM και 100μM. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη εμφανίζει μείωση του mRNA του LDL υποδοχέα σε συγκεντρώσεις 25μM και 50μM, με μέγιστη στατιστικώς σημαντική μείωση όταν η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης ήταν τα 50μM.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίδρασης της ρεσβερατρόλης στα επίπεδα mRNA του εκκαθαριστή υποδοχέα, SR-A I. Μετά από επώαση των κυττάρων για 24h μόνο με ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 1μM, 25μM, 50μM και 100μM παρατηρήθηκε αύξηση του mRNA του SR-A I υποδοχέα σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς που δεν περιείχε ρεσβερατρόλη, ενώ παρατηρήθηκε μείωση του mRNA του SR-A I τποδοχέα σε συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης 20μM και 100μM, ενώ τα 50μM ρεσβερατρόλης δεν επηρέασαν τα επίπεδα του mRNA του SR-A I. Αν και από τα αποτελέσματα μπορεί να υποτεθεί ότι μεγάλες συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης πιθανόν να έχουν κάποια ικανότητα μείωσης των επιπέδων των εκκαθαριστών υποδοχέων είναι απαραίτητος ο περαιτέρω αριθμός πειραμάτων.

Τέλος με σκοπό να επαληθευτούν τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν μορφολογικά πειράματα, από τα οποία προέκυψε ότι για η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 1μM και 50μM μπορούσε να μειώσει την επαγώμενη από PAF συσσώρευση λίπους στο εσωτερικό των μεσαγγειακών κυττάρων. Το γεγονός ότι η ρεσβερατρόλη φάνηκε σε συγκέντρωση 1μM να μειώνει τη συσσώρευση λιποειδών στο εσωτερικό των μεσαγγειακών κυττάρων δηλώνει ότι είναι απαραίτητη η διερεύνηση της δράσης μικρότερων συγκεντρώσεων ρεσβερατρόλης.

Συμπερασματικά προκύπτει από τα αποτελέσματα της μελέτης ότι η trans-ρεσβερατρόλη μπορεί να αναστείλει τον επαγώμενο από PAF σχηματισμό μεσαγγεακών αφρωδών κυττάρων όπως φάνηκε από τα πειράματα RT-PCR και από τα μορφολογικά πειράματα. Απαιτείται όμως περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της ρεσβερατρόλης για να προκύψει μια ολοκληρωμένη εικόνα της δράσης της.

Δεδομένου ότι η ρεσβερατρόλη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του κόκκινου κρασιού και κατ΄επέκταση της Μεσογειακής Δίαιτας τα παραπάνω δεδομένα μπορούν να αποτελέσουν μια εξήγηση για τις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Δίαιτας στα οποία καταλήγουν, οι επιδημιολογικές μελέτες. της .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Antonia-Leda Matalas, Antonis Zampelas, Vassilis Stavrinos, Ira Wolinski. (2001) by CRC Press LLC. The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion, Chapter 3.
2. Simopoulos P.Artemis. The Mediterranean Diets: What is so special about the Diet of Greece? The Scientific Evidence. J.Nutr. 131: 3065S-3075S, (2001).
3. Trichopolou, A. and Lagiou, P. Healthy traditional Mediterranean diet: An expression of culture, history and lifestyle, Nutr. Rev., 55, 383, (1997).
4. Willet, W. C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro- Luzzi, A., Helsing, E., and Trichopoulos, D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. Am. J. Clin. Nutr., 61(Suppl 6), 1402S, (1995).
5. A.Trichopoulou and E.Vasilopoulou. Mediterranean diet and longevity Br J Nutr 84, Suppl, 2, S205-S209, (2000)
6. Keys, A. Coronary heart disease in seven countries study, Circulation, 41 (Suppl 1), 1, (1970).
7. Trichopoulou A (1998) Rapporteur. The Mediterranean diet and Food Culture. What, Why, How? Report of a World Health Organization (Europe) Meeting, Delphi, Greece.
8. The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion, Chapter 9, Edited By: Antonia-Leda Matalas, Antonis Zampelas, Vassilis Stavrinos, Ira Wolinski. (2001) by CRC Press LLC.
9. Menotti, A., Cross-cultural relationship of dietary habits and coronary heart disease in the Seven Countries Study, Atherosclerosis, 144, (Suppl 1), 169A, 1999.
10. Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M, Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., and Katan, M.B., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. Arch. Intern.Med., 155, 381, 1995.
11. The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion, Chapter 12, Edited By: Antonia-Leda Matalas, Antonis Zampelas, Vassilis Stavrinos, Ira Wolinski. (2001) by CRC Press LLC.
12. The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion, Chapter 9, Edited By: Antonia-Leda Matalas, Antonis Zampelas, Vassilis Stavrinos, Ira Wolinski. (2001) by CRC Press LLC.
13. Singh, R. B., Niaz, M. A., Sharma, J. P., Kumar, R., Rastogi, V. & Moshiri, M. (1997) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival–4. Cardiovasc. Drugs Ther. 11:485-491
14. de Lorgeril, M. & Salen, P. (2000) Modified Cretan Mediterranean diet in the prevention of coronary heart disease and cancer. Simpoulos, A. P. Visioli, F eds. Mediterranean Diets 87:1-23 Karger Basel, Switzerland. .
15. Simopoulos, A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. J. Clin. Nutr. 54:438-463.

16. Simopoulos, A. P. Kifer, R. R. Martin, R. E. eds. Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods 1986 Academic Press Orlando, FL.
17. Galli, C. & Simopoulos, A. P. (1989) Dietary ω-3 and ω-6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality 1989 Plenum Publishing Corporation New York, NY. .
18. Simopoulos, A. P., Kife, R. R., Martin, R. E. & Barlow, S. M. (1991) Health effects of ω-3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. World Rev. Nutr. Diet. 66:1-592
19. Galli, C., Simopoulos, A. P. & Tremoli, E. (1994) Effects of fatty acids and lipids in health and disease. World Rev. Nutr. Diet. 76:1-152.
20. Salem, N., Jr., Simopoulos, A. P., Galli, C., Lagarde, M. & Knapp, H. (1996) Proceedings of the 2nd Congress of ISSFAL on Fatty Acids and Lipids from Cell Biology to Human Disease. Lipids 31(suppl.):S1-S326
21. Lagarde, M., Spector, A. A., Galli, C, Hamazaki, T. & Knapp, H. (1999) Proceedings of the 3rd Congress of ISSFAL on Fatty Acids and Lipids from Cell Biology to Human Disease. Lipids 34(suppl.):S1-S350
22. Hamazaki, T. Okuyama, H. eds. Fatty Acids and Lipids—New Findings 88 Karger Basel, Switzerland.
23. Hertog et al, 1993
24. Knekt et al, 1996
25. Yochum L & Kushi LH & Meyer K, & Folsom (1999) Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in post-menopausal women. American Journal of Epidimiology. 149, 943-949.
26. Geleijnse et al.1999
27. Sesso H, Gaziano J, Buring J, Hennekens C; Coffee and tea intake and the risk of myocardial infraction. Am. J. Epidemiol 149:162-167,1999.
28. Rimm EB & Katan MB& Ascherio A & Stampfer MJ &Willet WC (1996) Relation between intake of flavonoids and risk of coronary heart disease in male health professionals. Annual International Medicine, 125, 384-389.
29. St.Leger, A.S., Cochrane, A. L., Moore, F. Lancet 1979, 1, 1017-1020
30. Nanji, A., French, S. W. Atherosclerosis 1986, 60, 197-198.
31. Hengsted, D. M., Ausman, L. M. J.Nutr. 1998, 118, 1184-1189
32. Seigneur, M., Bonnet, J., Dorian, B. J Appl.Cardiol. 1990, 5,215-222
33. Renaud and De Lorgeril. Wine, alchohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet. 1992 Jun 20:339(8808):1523-6
34. German et al.2000
35. Peter Kopp, Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French Paradox'?Eur.J. Endocrin.(1998) 138 619-620
36. Kim HY, Kim OH, Sung MK Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quequetin and kaempferol in healthy volunteers. J. Am.Coll. Nutr, 2003 Jun;22(3): 217-23.

37. Seigner, M., Bonnet, J., Dorian, B. J Appl. Cardiol. 1990, 5, 215-222.
38. Lavy, A., Furham, B., Markel, A. Ann. Nutr. Metab. 1994, 38, 287-294.
39. Struck, M., Watkins, T., Tomeo, A., Halley, J., Bierenhaubaum, M. Nutr. Res. 1994, 14, 1811-1819.
40. Fuhrman, B., Lany, A., Aviran, M. Am. J. Ciln, Nutr. 1995, 61, 549-554.
41. .Pace-Asciak, C.R., Rounova, O., Hahn, S. Diamandis E.P. and D.M. Golberg, Clin. Chim. Acta 246 163-1821996).
42. Golberg, D.M., Garovic-Kovic, V., Daimandis, E.P., . Pace-Asciak, C.R., Clin. Chim. Acta 1996, 246,183-193.
43. . Serafini, M., Maiani, G., Ferro-Luzzi, A. J. Nutr. 1998, 128, 1003-1007.
44. .Nigdikar, S. V., Williams, N. R, Griffin, B. A., Howard, A. N., Am. J. Clin. Nutr. 1998, 68, 258-265.
45. Keevil, J. G., Osman, H. E., Reed, J. D., Folts, J. D. J. Nutr. 2000, 130, 53-56.
46. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56, 317-333.
47. 64. F. Visioli, C. Galli, Olive oil phenols and their potential effects on human health. J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4292-4296.
48. M.J. Amiot, A. Fleuriet, J.J. Macheix, Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, J. Agric. Food Chem. 34 (1996) 823-826.
49. German et al. 2000
50. Cassidy Aedin, Hanley Bryan and Lamuela-Raventos Rosa M., Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. Review. J. Sci. Food. Agric 80:1044-1062 (2000)
51. Skalbert A & Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of Polyphenols. Journal of Nutrition, 130, 2073-2085.
52. Manach Claudine, Scalbert Augustin, Morand Christine, Remesy Christian, and Jimenez Liliana. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004; 79:727-47.
53. Scalbert Augustin and Williamson Gary., Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. Am J Clin Nutr. 130: 2073S-2085S, (2000).
54. Halliwell, B. Lancet 1994, 344, 721-724.
55. Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 1992;32:67
56. Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., Biochem Biophys. Acta, 1129, 141-146, (1992)
57. Igarashi, k., Ohmuna, M, Biosci. Biotech. Biochem. 59, 595-601, (1995)
58. Corvanzier, E., Maclouf, J., Biochim. Biophys. Acta 1985, 835, 315-321.
59. Gryglewski, r., Korbut, r., Robak, J., Swies, J., Biochem. Phrmacol. 1987, 36, 317-322.
60. Mower R., Landolfi, R., Steiner, M. Biochem. Pharmacol. 1984, 33, 357-363.
61. Berentz, A., Stierle, A., Anton, R., Cazenave, J. P. Biochem Pharmacol. 1981, 31, 3597-3600.

62. Fragopoulou E., Antonopoulou SM, Nomikos TZ, Demopoulos C.A., Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties. Bioch et Bioph Acta 1632, 90-99, (2003)
63. Vander, Sherman, Luciano, Tsakopoulos., Φυσιολογία του Ανθρώπου, Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού. 8η ΄Εκδοση, Τόμος 1, Κεφάλαιο 7ο, σελ. 204-205.
64. Corvanzier, E., Maclouf, J., Biochim. Biophys. Acta, 835, 315-32, (1985)
65. Moroney, M. A., Alcaraz, M. J., Forden, R. A., Carey, F., Hoult, J. R. S. J. Pharh. Pharmacol., 40, 787-792. (1988)
66. Chang, J., Musser, J. H., McGregor, H. Biochem. Pharmacol. 1987, 36, 2429-2436.
67. Yoshiba, M., Sakai, T., Hosakawa, N. FEBS Lett. 1990, 260, 10-13.
68. Hosakawa, N, Hosakawa, Y., Sakai, T. Int. J. Cancer 1990, 45. 1119-1124.
69. Huang, M.T., Wood, A. W., Newmark, H. L. Carcinogenesis 1983, 4, 1631-1637.
70. Gusman J., Malonne H and Atassi Gh., A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotheurapeutic properties of resveratrol. Carcinogenesis vol.22, no8, pp.1111-1117, 2001.
71. Romero-Perez et al., Resveratrol and its glucosides in white and rose wines. J. Agric. Food. Chem., Vol. 44, No. 8, 2125-2128, (1996)
72. EctorB J. Et.al. Resveratrol concentartion in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. Small fruits research unit. United States Departement of Agriculture Agricultural Reasearch Service.
73. Product: Protykin Resveratrol (Natrol), Resveratrol Antioxidant Protection (Source Naturals) www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/res_0224.shtml
74. Product: LifeExtension, www.lef.org/magazine/mag2004/dec2004_supp_top10_01.htm
75. Wenzel E., Veronika S., Metabolism and bioavailability of trans-resvaratrol.Review., Mol.Nutr.Food Res. 2005, 49,000-000.
76. Lucie Fremont., Biological effects of resveratrol. (minireview). Life Sci., Vol.66, No.8, pp. 663-673, 2000.
77. 121. Ραλλίδης ΛΣ, Τσίτουρας ΓΚ. Οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης και αθηροσκλήρυνση. Ελλ. Καρδιολ. Επιθ. 1992, 33:369-378.
78. 122. Lucie Fremont, Leila Belguendouz and Serge Delpal, Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. Life Sc, Vol.64, No. 26, pp.2511-2521, 1999
79. Θ.Γιαπάππα, Α. Ζαμπέλας. Η επίδραση των αντιοξειδωτικών βιταμινών στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μια κριτική ανασκόπηση., Ιατρική 2000, 77(6): 519-532.
80. Vander, Sherman, Luciano, Tsakopoulos., Φυσιολογία του Ανθρώπου, Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού. 8η ΄Εκδοση, Τόμος 2.Κεφάλαιο 18ο .

81. Sebely Pal,. Nerisa Ho, Carlos Santos, Paul Dubois, John Mamo, Kevin Croft and Emma Allister., Red wine polyphenols increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB 100 from Human HepG2 cells. Am Soc Nutr Sc., 2003
82. Fukao H, Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Yamashita T, Fukunaga C, Oiwa K, Kawai Y, Suwa M, Yamamoto J. Effect of trans- resveratrol on thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-dificient and low-density lipoprotein receptor-dificient mice. Blood Coagul Fibrinolysis.2004 Sep;15(6):441-6.
83. Sabbaramaih K. Chung, Wen J. Michaluart P., Telang N., Tanabe T., Inoue H., Meishiang Jang, Pezzuto J.M., Dannenberg J.A., Resveratrol inhibits cyclooxyganase-2 transcription and actinity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. J. Biol. Chem. The Vol.273, No. 34, Issue of August 21, pp. 21875-21882, 1998,
84. Sabbaramaih K. Chung, Wen J. Michaluart P., Telang N., Tanabe T., Inoue H., Meishiang Jang, Pezzuto J.M., Dannenberg J.A., Resveratrol inhibits cyclooxyganase-2 transcription and actinity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. J. Biol. Chem. The Vol.273, No. 34, Issue of August 21, pp. 21875-21882, 1998,
85. Y. Kimura, H. Okuda and S. Arichi, Biochem. Biophys. Acta 834 275-278(1985)
86. Kimura, Y., Okuda, H., and Kubo. M., (1995) Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. J. Ethopharmacol. 45, 131-139.
87. MacCarrone, M., Lorenzon. T., Guerrieri, P., and Agro, A. F. (1999) Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxyganase and cycloxyganase activity. Eur. J. Biochem. 265, 27-34.
88. Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., and Lin. J. K. (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. Br. J. Pharmacol, 126, 673-680.
89. Harlan, J. M. (1987) Neutrophil-mediated vascular injury. Acta Med. Scand. Suppl. 715, 123-129.
90. Rotondo. S., Rajtar.G., Manarini S., Celardo. A., Rotillo. D., de Gactano, G., Evangelista, V., and Cerletti. C., (1998) Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. Br. J. Pharmacol. 123, 1691-1699.
91. Harlan, J. M. (1987) Neutrophil-mediated vascular injury. Acta Med. Scand. Suppl. 715, 123-129.
92. Totani, L., Piccoli. A., Pellegrini, G., Di Santo, A., and Lorenzet. R., (1994) Polymorphonuclear leukocytes enhance release of growth factors by cultured endothelial cells. Arterioscler. Thromb. 14. 125-132.
93. Arnaout. M. A. (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood 75, 1037-1050
94. Gentilli M, Mazoit JX, Bouaziz H, Fletcher D, Casper RF, Benhamou D, Savouret Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. Life Sci. 2001

95. Shigematsu S., Ishida S., Hara M., Takahashi N., Yoshimatsu H., Sakata T., Korthuis R., Resveratrol,
a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating facto, or oxidants. Free Rad. Biol.& Med. Vol.34, No.7,
pp.810-817, 2003.

96. Michele Mietuw-Snyder, Gowri Maya S., Pitas Robert. E., Class A- Scavenger Receptor up regulation in smooth muscle cells by low oxidized density lipoprotein. J.Bio.Chem The, Vol, 275, No
23, Issue 9, pp. 17661-17670,

97. Miyamoto,S. and Verma,I.M., Rel/NF-kappa B/I kappa B story, *Adv. Cancer Res.*, **66,** 255-292 (1995).

98. Makarov,S.S., NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances, *Mol. Med. Today*, **6,** 441-448 (2000).

99.Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B. B. (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. J. Immunol. 164, 6509-6519

100.Shazib Pervaiz., Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. The FASEB J. Vol.17 Nov.2003

101. Pellegatta F., Bertelli A., Staels B., Duhent Chr., Fulgenzi A., Ferrero M.E. Different short-and long-term effects of resveratrol on nuclear factor-κB phosphorylation and nuclear appearance in human endothelial cells. Am.J. Clin. Nutr. 2003 : 77 :1220-8.

102. Miloso M. Bertelli AA, Nicolini G, Tredici G. Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Neurosci Lett 1999;264:141-4

103. Gescher A.J., Steward W.P. Relationship between mechanisms, bioavailability and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. Canc.Epidem.Biom.& Prev.Vol.12.953-957.October 2003.

104.Gusman J., Malonne H and Atassi Gh., A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotheurapeutic properties of resveratrol. Carcinogenesis vol.22, no8, pp.1111-1117, 2001.

105. Jang, M.S., Cai, E.N., Udeani, G.O., Slowing., K.V., Thomas.C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzato, J.M. Cancer chemoprotective activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science (Wash. DC), 275: 218-220, 1997.

106.Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. Nature,362, 801-809.

107. A.A.E. Bertelli, L. Giovannini, D. Giannessi, M.Migliori, W.Bernini, M. Fregoni and A.Bertelli, Int.J.Tiss.Reac. 17 1-3 (1995)

108. A.A.E Bertelli, L.Giovannini, R. De Caterina, W. Bernini, M. Migliori, M. Fregoni, L.Bavaresco and A. Bertelli, Antiplatelet activity of cis-resveratrol. Drugs Exptl.Clin.Res. 22 61-63 (1996).
109. C.R. Pace-Asciak, S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas and D.M. Golberg. Clin. Chem. Acta 235 207-219 (1995)
110. C.R. Pace-Asciak, O. Rounova, S.Hahn, E.P. Diamandis and D.M. Golberg, Clin. Chim. Acta 235 207-219 (1996).
111. Antonopoulou Sm., Fragopoulou El., Nomikos Tz., Mitsopoulou Chr., Demopoulos Const., Separation of Biologically active lipids from red wine. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 1234-1238.
112. Olas B & Wachowicz B & Saluk-Juszsak J & Zielinski T (2002) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. Thrombosis research, 107, 141-145.
113. Olas B.& Zbikowska HM & Wachowicz B & Krajewski T Buszyncki A & Magnuszewska A. Inhibitory effect of resveratol on free radical generation in blood platelets. Acta Biochemica;1999, 46, 961-966.
114. Olas B. Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W, Anti-platelet effects of different phenolic compounds from Yucca schidigera Roezl.bark. Platelets 2002. May; 13(3):167-73.
115. F. Orsini, F. Pelizzoni, L. Verotta, T. Aburjai and C.B. Rogers, J. Nat. Prod.60 1082-1087 (1997).
116. E. Ragazzi, G. Froldi and G. Fassina, Pharmacol. Res. Commun 20 suppl 5 79-82 (1988)
117. C.K. Chen and C.R. Pace-Asciak, Gen. Pharmacol. 2 363-366 (1996).
118. D.F. Fitzpatrick, S.L. Hirschfield and R.G. Coffey, Heart Circ. Physiol. 34 H774-H778 (1993)
119. O.P.MGBonyebi, J.Russo and I.H. Russo, Int.J. Oncol.12 865-869 (1998)
120. M.S. Jang, E.N. Cai, G.O.Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H..S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C.Moon amd J.M. Pezzuto, Science 275 218-220 (1997).

Κεφάλαιο 3

121. Davison,A. and Cameron,G., Oxford text book of clinical nephrology, G-P-Grunfielled, 1998.
122. Iversen,B.M., Kvam,F.I., Matre,K., Morkrid,L., Horvei,G., Bagchus,W., Grond,J., and Ofstad,J., Effect of mesangiolysis on autoregulation of renal blood flow and glomerular filtration rate in rats, *Am. J Physiol*, **262,** F361-F366 (1992).
123. Yamamoto,T., Mundy,C.A., Wilson,C.B., and Blantz,R.C., Effect of mesangial cell lysis and proliferation on glomerular hemodynamics in the rat, *Kidney Int.*, **40,** 705-713 (1991).
124. Soriano,P., Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice, *Genes Dev.*, **8,** 1888-1896 (1994).
125. Leeven,P., Penky,M. , Gebre-Medhin,S., Swolin,B., Larsson,E., and Betsholtz,L., Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular and hematological abnormalities, *Genes Develop*, **8,** 1875-1887 (1994).

126. Mene,P., Simonson,M.S., and Dunn,M.J., Physiology of the mesangial cell, *Physiol Rev.*, **69,** 1347-1424 (1989)

127.Jonshon,R.j. and Fefeehally,j., Comprehensive clinical nephrology London, 2000.

128. Iatrou,C., Παθογεννετική μηχανισμοί του νεφρού, *Ελληνική νεφρολογία*, **8,** 229-236 (1996).

129. Couser,W.G., Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **13** Suppl 1, 10-15 (1998).

130. Vleming,L.J., Bruijn,J.A., and van Es,L.A., The pathogenesis of progressive renal failure, *Neth. J Med.*, **54,** 114-128 (1999).

131. Hostetter,T.H., Progression of renal disease and renal hypertrophy, *Annu. Rev. Physiol*, **57,** 263-278 (1995).

132. Schlondorff,D., Roles of the mesangium in glomerular function, *Kidney Int.*, **49,** 1583-1585 (1996).

133. Fernando,R.L., Varghese,Z., and Moorhead,J.F., Oxidation of low-density lipoproteins by rat mesangial cells and the interaction of oxidized low-density lipoproteins with rat mesangial cells in vitro, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **8,** 512-518 (1993).

134. Haas, Chr.S., Schφclmann. H.O., Lang St., Kralewski M., Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation. J. Nephrology Vol.12 No6: 405-415(1999)

135. Soriano,P., Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice, *Genes Dev.*, **8,** 1888-1896 (1994).

136. Leeven,P., Penky,M. , Gebre-Medhin,S., Swolin,B., Larsson,E., and Betsholtz,L., Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular and hematological abnormalities, *Genes Develop*, **8,** 1875-1887 (1994).

137. Iida,H., Seifert,R. , Alpers,C.E., Gronwald,R.G., Phillips,P.E., Pritzl,P., Gordon,K., Gown,A.M., Ross,R., Bowen-Pope,D.F., and ., Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **88,** 6560-6564 (1991).

138. Hewitson,T.D., Mathews,D.C., and Kincaid-Smith,P., Platelet-derived growth factor mesangial deposits in mesangial IgA glomerulonephritis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **6,** 11-16 (1991).

139. Floege,J., Eng,E., Young,B.A., Alpers,C.E., Barrett,T.B., Bowen-Pope,D.F., and Johnson,R.J., Infusion of platelet-derived growth factor or basic fibroblast growth factor induces selective glomerular mesangial cell proliferation and matrix accumulation in rats, *J Clin. Invest*, **92,** 2952-2962 (1993).

140. Abboud,H.E., Growth factors in glomerulonephritis, *Kidney Int.*, **43,** 252-267 (1993).

141. Buschhausen,L., Seibold,S., Gross,O., Matthaeus,T., Weber,M., and Schulze-Lohoff,E., Regulation of mesangial cell function by vasodilatory signaling molecules, *Cardiovasc. Res.*, **51,** 463-469 (2001).

142. Johnson,R.J., Floege,J., Yoshimura,A., Iida,H., Couser,W.G., and Alpers,C.E., The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"? , *J Am. Soc. Nephrol.*, **2,** S190-S197 (1992).

143. Floege,J., Johnson,R.J., Gordon,K., Iida,H., Pritzl,P., Yoshimura,A., Campbell,C., Alpers,C.E., and Couser,W.G., Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis, *Kidney Int.*, **40,** 477-488 (1991).

144. MacKay,K., Striker,L.J., Stauffer,J.W., Doi,T., Agodoa,L.Y., and Striker,G.E., Transforming growth factor-beta. Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells, *J Clin. Invest*, **83,** 1160-1167 (1989).

145. Jonshon,R.j. and Fefeehally,j., Comprehensive clinical nephrology London, 2000.

146. Fogo,A.B., Progression and potential regression of glomerulosclerosis, *Kidney Int.*, **59,** 804-819 (2001).

147. Chan,M.K., Varghese,Z., Persaud,J.W., Baillod,R.A., and Moorhead,J.F., Hyperlipidemia in patients on maintenance hemo- and peritoneal dialysis: the relative pathogenetic roles of triglyceride production and triglyceride removal., *Clin Nephrol*, **17,** 183-190 (1982).

148. Tyroler,H.A., Review of lipid-lowering clinical trials in relation to observational epidemiologic studies, *Circulation*, **76,** 515-522 (1987).

149. Virchow,R., A more precise account of fatty metamorphosis, Gryphonham, London, 1860, 366 pp.

150. Munk,F., Klinishe Diagnostik der degeneratinen nierenerkrankungen, *Z Clin Med*, **78,** 1-52 (1913).

151. Wilens,S.L., Elster,S.K., and Baker,J.P., Glomerular lipidosis in intercapillary glomerulosclerosis, *Ann. Intern. Med.*, **34,** 592-607 (1951).

152. Moorhead,J.F., Chan,M.K., El Nahas,M., and Varghese,Z., Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease, *Lancet*, **2,** 1309-1311 (1982).

153.French,S.W., Yamanaka,W., and Ostwald,R., Dietary induced glomerulosclerosis in the guinea pig, *Arch. Pathol.*, **83,** 204-210 (1967).

154.Brenner,B.M., Nephron adaptation to renal injury or ablation, *Am. J Physiol*, **249,** F324-F337 (1985).

155. Peric-Golia,L. and Peric-Golia,M., Aortic and renal lesions in hypercholesterolemic adult, male, virgin sprague-dawley rats, *Atherosclerosis*, **46,** 57-65 (1983).

156. Kaplan,R.M., Heller,M.B., McPherson,J., and Paris,P.M., An evaluation of nitrous oxide analgesia during transcutaneous pacing, *Prehospital. Disaster. Med.*, **5,** 145-149 (1990).

157.Triau,J.E., Meydani,S.N., and Schaefer,E.J., Oxidized low density lipoprotein stimulates prostacyclin production by adult human vascular endothelial cells, *Arteriosclerosis*, **8,** 810-818 (1988) .

158.Verbeuren,T.J., Jordaens,F.H., Zonnekeyn,L.L., Van Hove,C.E., Coene,M.C., and Herman,A.G., Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits, *Circ. Res.*, **58,** 552-564 (1986).

159. Grone,H.J., Walli,A., Grone,E., Niedmann,P., Thiery,J., Seidel,D., and Helmchen,U., Induction of glomerulosclerosis by dietary lipids. A functional and morphologic study in the rat, *Lab Invest*, **60,** 433-446 (1989).

160. Diamond,J.R., Pesek,I., Ruggieri,S., and Karnovsky,M.J., Essential fatty acid deficiency during acute puromycin nephrosis ameliorates late renal injury, *Am. J Physiol*, **257,** F798-F807 (1989).

161. Keane,W.F., Kasiske,B.L., O'Donnell,M.P., and Kim,Y., The role of altered lipid metabolism in the progression of renal disease: experimental evidence, *Am. J Kidney Dis.*, **17,** 38-42 (1991).

162. Zazt,R., Prado,E.B.A., Prado,M.J.B.A., Santos,M.M., and Fujihara,C.K., Aging analbuminemic rats fail to develop glomerosclerosis, *Kidney Int.*, **35,** 442A (1989).

163. Kasiske,B.L., Cleary,M.P., O'Donnell,M.P., and Keane,W.F., Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat, *J Lab Clin. Med.*, **106,** 598-604

164. Keane,W.F., Kasiske,B.L., and O'Donnell,M.P., Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis, *Am. J Nephrol.*, **8,** 261-271 (1988).

165. Ross,R., Glomset,J. , and Harker,L., Response to injury and atherogenesis, *Am J Pathol.*, **86,** 675-684 (1977).

166.Keane,W.F., Kasiske,B.L., and O'Donnell,M.P., Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis, *Am. J Nephrol.*, **8,** 261-271 (1988).

167.Diamond,J.R. and Karnovsky,M.J., Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis, *Kidney Int.*, **33,** 917-924 (1988).

168. Scheinman,J., Fish,A., Brown,DM., and Michael,A. , Human glomerular smooth muscle (mesangial) cells in culture, *Lab Invest*, **34,** 150-158 (1976).

169. Latta,H. and Maunsbach,A., Relations of the centrilobular region of the glomerulus to the juxtaglomerular apparatus, *J Ultrastruc Res*, **6,** 562-578 (1986).

170.Ausiello,D.A., Kreisberg,J.I., Roy,C., and Karnovsky,M.J., Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin, *J Clin. Invest*, 65, 754-760 (1980).

171. Iverius,P.H., The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans, *J Biol Chem*, **247,** 2607-2613 (1972).

172. Ross,R., Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N. Engl. J Med.*, **340,** 115-126 (1999).

173. Virchow,R., Cellular pathology: Lecture VIII. Blood and lymph, *CA Cancer J Clin.*, 25, 93-97 (1975).

174. Nishida,Y., Yorioka,N., Oda,H., and Yamakido,M., Effect of lipoproteins on cultured human mesangial cells , *Am. J Kidney Dis.*, **29,** 919-930 (1997).

175. Ruan,X.Z., Kang,Z.Q., Li,X.W., and Zheng,F.L., Minimally modified low density lipoprotein stimulates tumor necrosis factor alpha secretion from rat mesangial cells, *Kidney Int.*, 48(Supl)**,** 595 (1995).

176.Grone,E.F., Abboud,H.E., Hohne,M., Walli,A.K., Grone,H.J., Stuker,D., Robenek,H., Wieland,E., and Seidel,D., Actions of lipoproteins in cultured human mesangial cells: modulation by mitogenic vasoconstrictors, *Am. J Physiol*, **263,** F686-F696 (1992)

177.Hessler,J.R., Morel,D.W., Lewis,L.J., and Chisolm,G.M., Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity, *Arteriosclerosis***, 3,** 215-222 (1983).

178. Parthasarathy,S., Printz,D.J., Boyd,D., Joy,L., and Steinberg,D., Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor, *Arteriosclerosis*, **6,** 505-510 (1986).

179. Henriksen,T., Mahoney,E.M., and Steinberg,D., Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 78, 6499-6503 (1981).

180.Heinecke,J.W., Cellular mechanisms for the oxidative modification of lipoproteins: implications for atherogenesis, *Coron. Artery Dis.*, 5, 205-210 (1994).

181. Fernando,R.L., Varghese,Z., and Moorhead,J.F., Oxidation of low-density lipoproteins by rat mesangial cells and the interaction of oxidized low-density lipoproteins with rat mesangial cells in vitro, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 8, 512-518 (1993)

182. Wheeler,D.C., Chana,R.S., Topley,N., Petersen,M.M., Davies,M., and Williams,J.D., Oxidation of low density lipoprotein by mesangial cells may promote glomerular injury, *Kidney Int.***,** **45,** 1628-1636 (1994).

183. Quinn,M.T., Parthasarathy,S., Fong,L.G., and Steinberg,D., Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 84, 2995-2998 (1987).

184. Berliner,J.A., Territo,M.C., Sevanian,A., Ramin,S. , Kim,J.A., Bamshad,B., Esterson,M., and Fogelman,A.M., Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions, *J Clin. Invest***, 85,** 1260-1266 (1990).

185. Cushing,S.D., Berliner,J.A., Valente,A.J., Territo,M.C., Navab,M., Parhami,F., Gerrity,R., Schwartz,C.J., and Fogelman,A.M., Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 87, 5134-5138 (1990).

186. Rajavashisth,T.B., Andalibi,A., Territo,M.C., Berliner,J.A., Navab,M., Fogelman,A.M., and Lusis,A.J., Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins, *Nature*, 344, 254-257 (1990).

187. Ishii,S., Nagase,T. , and Shimizu,T., Platelet-activating factor receptor, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 599-609 (2002).

188. Shimizu,T. and Mutoh,H., Structure and regulation of platelet activating factor receptor gene, *Adv. Exp. Med Biol*, 407**,** 197-204 (1997) .

189. Honda,Z., Ishii,S., and Shimizu,T., Platelet-activating factor receptor, *J Biochem (Tokyo)*, 131, 773-779 (2002) .

190. T.M.Mclntyre, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott. Biologically active oxidized phospholipids. J. Biol. Chem. 274 (1999) 25189-25192.

191.C.A. Demopoulos, S. Antonopoulou : A discovery trip to compounds with PAF-like activity. Adv.Exp.Med.Biol. 416 (1996) 59-63.

192. J. Hanaban: Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. Annu. Rev. Biochem. 55 (1986) 483-509.

193. Benveniste,J., Egido,J., Gutierrez,M., V, and Camussi,G., Detection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation, *J Allergy Clin Immunol.*, 59, 271-279 (1977).

194. Pirotzky,E., Bidault,J., Burtin,C., Gubler,M.C., and Benveniste,J., Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, and vasoactive amines from isolated rat kidneys, *Kidney Int.*, 25**,** 404-410 (1984).

195. Schlondorff,D., The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte, *FASEB J*, **1,** 272-281 (1987).

196. Lovett,D.H., Haensch,G.M., Goppelt,M., Resch,K., and Gemsa,D., Activation of glomerular mesangial cells by the terminal membrane attack complex of complement, *J Immunol.*, 138, 2473-2480 (1987).

197. Neuwirth R, Satriano JA, Decantino S, Clay KL, and Schlondorff D, Angiotensin II causes formation of PAF in culture rat mesangial cells. 1989; 64(6): 1224, *CIRC. RES.*, 64(6), 1224 (1989).

198. Liapikos,T.A., Antonopoulou,S., Karabina,S.P., Tsoukatos,D.C., Demopoulos,C.A., and Tselepis,A.D., Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated, *Bba-Lipid Lipid Metab*, **1212,** 353-360 (1994).

199. Lianos,E.A. and Zanglis,A., Mesangial cell synthesis of PAF in response to defined inflammatory mediators, *KIDNEY INT.*, 33(1), 273 (1988).

200. Lianos,E.A. and Zanglis,A., Biosynthesis and metabolism of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in rat glomerular mesangial cells, *J Biol Chem*, **262,** 8990-8993 (1987).

201. Neuwirth,R., Singhal,P., Diamond,B., Hays,R.M., Clay,K., and Schlondorff D, Evidence for immunoglobulin Fc-receptor-mediated prostaglandin-2 and PAF formation by cultured rat mesangial cells, *J. CLIN. INVEST.*, **82,** 936-944 (1988).

202. Schlondorff,D., Satriano,J.A., Hagege,J., Perez,J., and Baud,L., Effect of platelet-activating factor and serum-treated zymosan on prostaglandin E2 synthesis, arachidonic acid release, and contraction of cultured rat mesangial cells, *J Clin Invest*, **73,** 1227-1231 (1984).

203. Η παραγωγή της προσταγλαδίνης αναστέλλεται από τους ειδικούς ανταγωνιστες του PAF BN52021, SRI 63-072 [398].

204. Kester,M., Mene,P., Dubyak,G.R., Dunn,M., and ., Elevation of cytosolic free calcium by platelet-activating factor in cultured rat mesangial cells, *FASEB J*, **1,** 215-219 (1987).

205. Bonventre,J.V., Weber,P.C., and Gronich,J.H., PAF and PDGF increase cytosolic [Ca2+] and phospholipase activity in mesangial cells, *Am J Physiol*, **254,** F87-F94 (1988).

206. Sedor JR,A.H., Platelet activating factor stimulates oxygen radical release by cultured rat messangial cells, *Kidney Int*, 222A (1985).

207. Komatsu,H., Ishiwari,K., Shikata,A., Nishida,M., Kawakatsu,H., and SAWADA,T., Platelet-activating factor induces cell growth through tyrosine phosphorylation pathway in cultured rat mesangial cells, *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, **37,** 622-631 (1995).

208. Brady,H.R., Denton,M.D., Jimenez,W., Takata,S., Palliser,D., and Brenner,B.M., Chemoattractants provoke monocyte adhesion to human mesangial cells and mesangial cell injury, *Kidney Int*, **42,** 480-487 (1992).

209. Bussolati,B., Mariano,F., Migliori,M., and Camussi,G., Nitric oxide/platelet activating factor cross-talk in mesangial cells modulates the interaction with leukocytes, *Kidney Int.*, **62,** 1322-1331 (2002).

210. Camussi,G., Tetta,C., Bussolino,F., Andres,G., Turello,E., and Baglioni,C., Involvement of cytokines and platelet-activating factor in renal pathology, *J Lipid Mediat*, **2 Suppl,** S203-S213 (1990) .

211. Lopez-Farre,A., Gomez-Garre,D., Bernabeu,F., and Lopez-Novoa,J.M., A role for endothelin in the maintenance of post-ischaemic renal failure in the rat, *J Physiol (Lond)*, **444,** 513-522 (1991).

212. Arribas,I., Rodriguez-Puyol,D., Garcia-Escribano,M.C., Diez-Marques,M.L., Perez,d.L., and Rodriguez-Puyol,M., Thromboxane A2 and platelet-activating factor decrease in the platelet-mesangial cell interactions, *Life Sci*, **57,** 957-965 (1995).

213. Montero,A., Rodriguez-Barbero,A., and Lopez-Novoa,J.M., A role for platelet-activating factor in endothelin-1-induced rat mesangial cell proliferation, *Eur J Pharmacol*, **243,** 235-240 (1993).

214. Neuwirth,R., Satriano,J.A.A., Decandido,S., Clay,K. , and Schlondorff,D., Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells, *Circ Res*, **64,** 1224-1229 (1989).

215. D.M Stafforini, T. M. Mclntyre, G. A. Zimmerman, S.M.Prescott. Platelet- activating factor acetylhydrolases. J. Biol. Chem. 272 (1997) 17895-17898.

216. A.Zanglis, E. A. Lianos, C. A. Demopoulos : The biological activity of acetylated sphingosylphosphorylcholine derivatives. Int.J.Biochem.Cell Biol.28 (1996) 63-7

217. Demopoulos,C.A., Karantonis,H.C., and Antonopoulou,S., Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories*, *Eur J Lipid Sci Thechnol*, **105,** 705-716 (2003).

218. Ruan,X.Z., Varghese,Z., Powis,S.H., and Moorhead,J.F., Human mesangial cells express inducible macrophage scavenger receptor, *Kidney Int.*, **56,** 440-451 (1999).

219. Ruan,X.Z., Varghese,Z., Powis,S.H., and Moorhead,J.F., Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation, *Kidney Int.*, **60,** 1716-1725 (2001).

220. Anami,Y., Kobori,S. , Sakai,M., Kasho,M., Nishikawa,T., Yano,T., Matsuda,H., Matsumura,T., Takemura,T., and Shichiri,M., Human beta-migrating very low density lipoprotein induces foam cell formation in human mesangial cells, *Atherosclerosis*, **135,** 225-234 (1997) .

221. Φραγκοπούλου Ελ. Μελέτη του μεταβολισμού και της δράσης του PAF σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό και νεφρικά κύτταρα. 2000.

222. Takeshi N., Yutaka M., Kazumi Y., Inhibitory effect of resveratrol on proteinuria,

hypoalbuminemia, and hyperlipidemia in nephritic rats. Lif. Sc. 68 (2001) 2845-2852.

223. Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi AA, Filippi C, Bertelli, A, Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. Life Dc. May 11; 68 (25) :: 2845-52 (2001).

224. Leiro J, Cano E, Ubeira FM, Orallo F, Sanmartin ML, In vivo effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* Antimicrob Agents Chemother Jul; 48(7) : 2497-501, (2004).

225. Cojocel C, Thomson MS., Arch Toxic.Sept; 78 (9): 525-32 (2004) Protective effect resveratrol against 6-hydroxydopamine-induced impairment of renal p-aminohippurate transport. Arch Toxic.Sept; 78 (9): 525-32 (2004)

Μεθοδολογία-Βιβλιογραφία

1. Sraer JD, Delarue F , Hagege J, Feunteun J, Pinet F, Nguyen G, and Rondeau E, Stable cell lines of T-SV40 immortalized human glomerular mesangial cells., *Kidney Int.*, **49,** 267-270 (1996).

2. Genelute™ Mammalian Total RNA Kit, Technical bulletin, Sigma.

3.Ong,A.C. and Moorhead,J.F., Tubular lipidosis: epiphenomenon or pathogenetic lesion in human renal disease?, *Kidney Int.*, **45,** 753-762 (1994).

4. Becker-Andre,M. and Hahlbrock,K., Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY), *Nucleic Acids Res.*, **17,** 9437-9446 (1989).