ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων και εκχυλισμάτων κόκκινου κρασιού στα ένζυμα μεταβολισμού του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Λέκτορας
Μέλη:
Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Καθηγήτρια
Τέντα Ρωξάνη, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2010

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση πρότυπων φαινολικών ενώσεων και εκχυλισμάτων κόκκινου κρασιού στα ένζυμα μεταβολισμού του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Λέκτορας
Μέλη:
Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Καθηγήτρια
Τέντα Ρωξάνη, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή έγινε την περίοδο 2009-2010 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 – Διατροφής. Την επίβλεψη της εργασίας είχε η κ. Ελισάβετ Φραγκοπούλου, την οποία ευχαριστώ θερμά, καθ' ότι η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, αλλά και οι πολύτιμες συμβουλές της ειδικά κατά τη διάρκεια της συγγραφής και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν πολύ σημαντικές για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Μαριάννα Ξανθοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια, την παροχή επιστημονικών γνώσεων και την ουσιαστική υποστήριξη και καθοδήγησή της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Τζώρτζη Νομικό και την κ. Σμαραγδή Αντωνοπούλου για τη συνολική υποστήριξη και τις επιστημονικές συμβουλές που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το τεχνικό, διδακτορικό και ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, καθώς και του εργαστηρίου Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών που ήταν πάντα πρόθυμοι να με συμβουλεύσουν και να με βοηθήσουν σε οποιαδήποτε δυσκολία συνάντησα κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο εργαστήριο.

Η παρούσα μελέτη αφιερώνεται στα μέλη της οικογένειάς μου που με στηρίζουν σε όλη την πορεία των σπουδών μου και χάρις σε αυτούς μπορώ να πραγματοποιώ τους στόχους μου, και στους φίλους μου που με βοηθούν ηθικά και ψυχολογικά όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAG	Αλκυλοακετυλογλυκερόλης
AAGPC	1-Ο-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη
AAPA	1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ
ACAT	Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase
AGEPC	1-*O*-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη
ALPA	Ακετυλολυσοφωσφατιδυκό οξύ
Apo-	Απολιποπρωτεΐνη-
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Βόειος αλβουμίνη ορού
C5a	Παράγοντας του συμπληρώματος 5a
CDP-χολίνη	Κιτυδιλο-διφωσφοχολίνη
CETP	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης
CoA	Συνένζυμο Α
COX	Κυκλοξυγονάση
CR1	Υποδοχέας συπληρώματος τύπου 1
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CSF	Παράγοντας πολλαπλασιασμού αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DHAP	Φωσφοδιυδρόξυ ακετόνη

DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH	Διφαινυλοπικρυλυδραζύλιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
ECM	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξεικό οξύ
EGTA	Αιθυλενογλυκολη-δι(β-αμινο-αιθυλειθέρας)-N,N,N',N'-τετραοξεικό οξύ
ER	Ενδοπλασματικό δίκτυο
FA	Λιπαρό οξύ
FCS	Ορός εμβρύου μοσχαριού
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
ICAM	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης
Ig-	Ανοσοσφαιρίνη-
IL-	Ιντερλευκίνη-
INF	Ιντερφερόνη
IP3	3-φωσφατιδυλο ινοσιτόλη
IP3K	κινάση της 3-φωσφατιδυλο ινοσιτόλης
LCAT	Λεκιθίνη:χολεστερόλη ακυλοτρανσφεράση
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LDLr	Υποδοχέας λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας

LOX	Λιποξυγονάση
LPL	Λιποπρωτεϊνική Λιπάση
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
LT	Λευκοτριένια
Λυσο-PAF AT	Ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση
MAC	Μεμβρανοεπιθετικό σύμπλεγμα
MMP	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
MTP	Microsomal Transfer Protein
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κάπα B
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAF-AH	PAF-ακετυλουδρολάση
PAFR	Υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAMPs	Χημικές δομές παθογόνων
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PECAM	Μόριο προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων –αιμοπεταλίων
PK	Πρωτεϊνική κινάση
PLA_2	Φωσφολιπάση A_2
PLC	Φωσφολιπάση C
PLD	Φωσφολιπάση D
PRR	Υποδοχέας αναγνώρισης δομών

PTK	Πρωτεϊνική τυροσινική κινάση
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
RNS	Ενεργές μορφές αζώτου
sn	Σύστημα στερεοειδικής αρίθμησης
TGF	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TNF	Ογκονεκρωτικός παράγοντας
Tris	Τρι-υδοξυλαμινομεθάνιο
TXA_2	Θρομβοξάνη A_2
VCAM	Αγγειακό μόριο προσκόλλησης
VEGF	Αγγειακός επιδερμικός παράγοντας ανάπτυξης
VLDL	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Πληθώρα επιστημονικών ερευνών οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση κρασιού, στο πλαίσιο της Μεσογειακής Δίαιτας, ασκεί ευεργετική δράση στην υγεία. Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) είναι το πρώτο βιολογικά δραστικό φωσφολιποειδές το οποίο έχει βρεθεί στη φύση και αποτελεί έναν από τους πιο δραστικούς, φυσικά παραγόμενους χυμικούς μεσολαβητές. Ο PAF θεωρείται ως ένα ισχυρότατο φλεγμονώδες μόριο που εμπλέκεται σε πληθώρα παθοφυσιολογικών καταστάσεων και παίζει σημαντικό ρόλο στη έναρξη και διάδοση της αθηροσκλήρωσης και το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών. Στο κόκκινο κρασί έχουν βρεθεί βιοδραστικά συστατικά τα οποία εμφανίζουν σημαντική αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση δρώντας με αυτόν το τρόπο προστατευτικά. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο έχουν δείξει την ύπαρξη βιολογικά δραστικών ενώσεων στο κόκκινο κρασί Cabernet Sauvignon οι οποίες αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν τη λιποξυγονάση. Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται κυρίως υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική προστασία του κρασιού. Περιορισμένες μελέτες υπάρχουν για την επίδραση των συστατικών του κρασιού στον μεταβολισμό του PAF. Η βιοσύνθεση του PAF πραγματοποιείται μέσω δυο πορειών, της remodeling πορείας που θεωρείται ότι ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής, και της de novo πορείας που θεωρείται υπεύθυνη για τα βασικά επίπεδα του PAF. Η κερκετίνη έχει βρεθεί ότι μπλοκάρει την παραγωγή του PAF μέσω αναστολής της λυσο-PAF AT, η οποία καταλύει το τελευταίο στάδιο της remodeling πορείας βιοσύνθεσης του PAF. Συνεπώς, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση των διαφορετικών εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού στη δραστικότητα του ενζύμου αυτού.

Σκοπός: Η παρούσα εργασία στοχεύει στη διερεύνηση της επίδρασης των διαφορετικών εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon και των πρότυπων ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη στη δραστικότητα του ενζύμου λυσο-PAF AT.

Μεθοδολογία: Εκχυλίστηκε δείγμα του κρασιού Cabernet Sauvignon με δύο μεθόδους εκχύλισης. Παραλήφθηκαν τα πολικά λιποειδή του από την πρώτη, ενώ από τη δεύτερη προέκυψαν τέσσερα κλάσματα κρασιού με διαφορετικό φαινολικό περιεχόμενο. Πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της λυσο-PAF AT απουσία (δείγμα αναφοράς) και παρουσία των εκχυλισμάτων ή των πρότυπων ενώσεων. Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ομογενοποίημα από την κυτταρική σειρά U-937. Ακολούθησε διαχωρισμός του παραγόμενου PAF με χρωματογραφία TLC και ποσοτικός προσδιορισμός του με βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Τέλος, υπολογίστηκε η επί τοις % επίδραση (αναστολή ή ενεργοποίηση του ενζύμου) των εκχυλισμάτων του κρασιού/προτύπων σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

Αποτελέσματα: Η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη παρουσιάζουν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα στη δράση της λυσο-PAF-AT ($IC_{50\text{-}\lambda\upsilon\sigma o\text{-}PAF\text{-}AT}$: 0.17 και 0.19 μg/μL αντίστοιχα). Τα πολικά λιποειδή εμφανίζουν μικρότερη ικανότητα αναστολής της λυσο-PAF AT, αφού το IC_{50} υπολογίζεται ίσο με 1,16μg/μL. Η υδατική φάση επίσης, προκαλεί αυξημένη αναστολή της δράσης του ενζύμου (95,2%) σε ποσότητα 1,00μg/μL. Όσον αφορά τα τέσσερα κλάσματα του κρασιού από τη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης, τα FI και FII εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT (99,8% και 99,2% αντίστοιχα). Τα άλλα δύο κλάσματα φαίνεται να προκαλούν μεν αναστολή (59,9% το FIII και 53,8% το FIV), η οποία όμως είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των προαναφερθέντων κλασμάτων.

Συμπεράσματα: Τα συστατικά του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon μπορούν να αναστείλουν τη δράση της λυσο-PAF AT, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη βιοσύνθεση του ισχυρού φλεγμονώδη μεσολαβητή PAF και δρώντας προστατευτικά. Οι ανθοκυανίνες, οι προκυανιδίνες, οι κατεχίνες, οι επικατεχίνες και οι γλυκοζίτες κερκετίνης φαίνεται να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες τάξεις φαινολικών ενώσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο
ΚΡΑΣΙ

1.1 Ιστορικά στοιχεία [1-3]

Ο οίνος (επίσης γνωστός και ως κρασί) είναι ένα αλκοολούχο ποτό, προϊόν ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού των σταφυλιών (μούστος). Ποτά παρεμφερή του κρασιού παράγονται επίσης από άλλα φρούτα, άνθη ή σπόρους, αλλά η λέξη κρασί σημαίνει πάντα το προϊόν από σταφύλια.

Το αμπέλι, από το οποίο προέρχεται το κρασί έχει, σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Πριν ακόμα από την εποχή των παγετώνων ευδοκιμούσε στην πολική ζώνη, κυρίως στην Ισλανδία, στη Βόρεια Ευρώπη αλλά και στη βορειοδυτική Ασία. Οι παγετώνες περιόρισαν σημαντικά την εξάπλωσή του και επέβαλαν κατά κάποιο τρόπο τη γεωγραφική απομόνωση πολλών ποικιλιών, μέρος των οποίων εξελίχθηκαν σε πολλά είδη. Στην πορεία των χρόνων, διάφοροι πληθυσμοί άγριων αμπέλων μετακινήθηκαν προς θερμότερες ζώνες, κυρίως προς την ευρύτερη περιοχή του Καυκάσου. Στην περιοχή αυτή, μεταξύ Εύξεινου πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος Άμπελος η οινοφόρος (στα λατινικά *Vitis vinifera)* και οι διαφορετικές ποικιλίες αυτού του είδους καλλιεργούνται έως και σήμερα.

Η διαδικασία της αμπελουργίας εικάζεται πως έχει τις ρίζες της στην αγροτική επανάσταση και τη μόνιμη εγκατάσταση πληθυσμών με σκοπό την καλλιέργεια, χρονολογείται δηλαδή γύρω στο 5000 π.Χ. Από τους πρώτους γνωστούς αμπελοκαλλιεργητές θεωρούνται οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Μεταγενέστερα, οι γνώσεις αμπελουργίας και οινοποιίας μεταφέρθηκαν στους Αιγύπτιους, τους λαούς της Φοινίκης και τους πληθυσμούς της Μικράς Ασίας και του Ελλαδικού χώρου. Όπως φαίνεται, ο άνθρωπος ασχολείται με την παραγωγή κρασιού εδώ και πολλά χρόνια, αλλά μόλις στα μέσα του 19ου αιώνα με τις έρευνες του Louis Pasteur, έμαθε ότι η παραγωγή όλων των κρασιών βασίζεται σε μια μικροβιολογική δράση, την αλκοολική ζύμωση.

Το κρασί είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για διάφορους λόγους. Είναι αφενός ένα δημοφιλές ποτό που συνοδεύει και ενισχύει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων, από τις πιο απλές και παραδοσιακές ως τις πιο σύνθετες, και αφετέρου αποτελεί σημαντικό γεωργικό προϊόν που αντικατοπτρίζει την ποικιλία του εδάφους και το κλίμα ενός τόπου. Το κρασί χρησιμοποιείται επίσης σε θρησκευτικές τελετές σε πολλούς πολιτισμούς, ενώ το εμπόριο κρασιού είναι ιστορικής σπουδαιότητας για πολλές περιοχές.

Οι Αρχαίοι Έλληνες έπιναν τον οίνο αναμειγνύοντας τον με νερό (έκραναν, ετυμολογία: κραίνω τον οίνο→ κράση→ κρασί), σε αναλογία 1/3 (ένα μέρος οίνου προς τρία μέρη νερού). Διέθεταν ειδικά σκεύη τόσο για την ανάμειξη (κρατήρες) όσο και για τη ψύξη του. Η πόση κρασιού που δεν είχε αναμιχθεί με νερό (άκρατος οίνος) θεωρείτο βαρβαρότητα και συνηθιζόταν μόνο από αρρώστους ή κατά τη διάρκεια ταξιδιών ως τονωτικό. Διαδεδομένη ήταν ακόμα η κατανάλωση κρασιού με μέλι καθώς και η χρήση μυρωδικών. Η προσθήκη αψίνθου (αψέντι) στο κρασί ήταν επίσης γνωστή μέθοδος (αποδίδεται στον Ιπποκράτη και αναφέρεται ως Ιπποκράτειος Οίνος) όπως και η προσθήκη ρητίνης (ρητινίτης οίνος, ρετσίνι).

Στις μέρες μας, το κρασί θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι της Ελληνικής παράδοσης και της Μεσογειακής διατροφής γενικότερα. Η κατανάλωσή του από την ελληνική οικογένεια είναι καθημερινή και σε αυτήν αποδίδονται πιθανές ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως η προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες έρευνες αποσκοπώντας τόσο στην κατανόηση των πιθανών προστατευτικών μηχανισμών όσο και στον εντοπισμό των πιθανών ωφέλιμων συστατικών του, μερικές από τις οποίες αναφέρονται στη συνέχεια του κεφαλαίου.

1.2 Η θέση του κρασιού στη μεσογειακή δίαιτα

Η μεσογειακή δίαιτα μπορεί να οριστεί ως το σύνολο των διατροφικών συνηθειών που επικράτησαν στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο στα τέλη της δεκαετίας του 1950 με αρχές της δεκαετίας του 1960. Στα κύρια χαρακτηριστικά της συμπεριλαμβάνονται η υψηλή κατανάλωση μονοακόρεστου λίπους, οσπρίων, δημητριακών, φρούτων και λαχανικών, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και γαλακτοκομικών προϊόντων και η χαμηλή κατανάλωση κρέατος [4].

Οι δείκτες θνησιμότητας για διάφορα νοσήματα στις Μεσογειακές χώρες είναι ιδιαίτερα μειωμένοι σε σχέση με τους αντίστοιχους άλλων οικονομικά πιο ανεπτυγμένων χωρών της Βόρειας Ευρώπης και Αμερικής. Φαίνεται λοιπόν, οι Μεσογειακοί λαοί να εμφανίζουν μικρότερη συχνότητα καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου, γεγονός που αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στη Μεσογειακή δίαιτα που ακολουθούν [5]. Επίσης, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι ο συγκεκριμένος τύπος διατροφής συμβάλλει στη μακροζωία [6].

Το κρασί αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής. Συνήθως καταναλώνεται σε μέτριες ποσότητες σε συνδυασμό με τα γεύματα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών που προσπαθούν να διαλευκάνουν τις επιμέρους ευεργετικές ιδιότητές του (αντικαρκινική δράση, προστασία από καρδιαγγειακά, κ.ά.) στα πλαίσια μιας ισορροπημένης και, πάνω απ' όλα, μεσογειακής διατροφής [4].

1.2.1 Το Γαλλικό παράδοξο

Το Γαλλικό παράδοξο (French Paradox) μπορεί να οριστεί ως ο μικρότερος – από τον αναμενόμενο – δείκτης θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα σε μία χώρα όπου οι συνήθεις παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών είναι το ίδιο συχνοί με τις άλλες βιομηχανοποιημένες χώρες και όπου η διατροφή ήταν ανέκαθεν πλούσια σε κορεσμένα ζωικά λίπη. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι Γάλλοι έχουν περισσότερες πιθανότητες για μια αίσια εξέλιξη μετά την εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου. Ορισμένες περιοχές στη Νότια Γαλλία παρουσιάζουν πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας καρδιακής νόσου παρά την υψηλή κατανάλωση λιπαρών τροφίμων και τα υψηλά ποσοστά καπνίσματος που παρατηρούνται [5]. Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί κατά καιρούς για την εξήγηση του φαινομένου, ενώ πολλοί το αποδίδουν στα ευεργετικά για την υγεία συστατικά του κόκκινου κρασιού.

Είναι γεγονός ότι η μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού μαζί με τα γεύματα αποτελεί καθημερινή συνήθεια των Γάλλων. Είναι αμφίβολο όμως κατά πόσο μπορεί να αποδοθεί στα πολυφαινολικά συστατικά του κρασιού, και μόνο σ' αυτά, ένας τόσο ισχυρά προστατευτικός ρόλος έναντι της στεφανιαίας νόσου.

Πρόσφατη έρευνα [7] προσπάθησε να εντοπίσει τον πιθανό ρόλο του αλκοόλ στο φαινόμενο αυτό. Η κατανάλωση κρασιού χωρίς αλκοόλ δεν επέφερε καμία μεταβολή στα λιπίδια, τις λιποπρωτεΐνες, την ινσουλίνη και τη γλυκόζη. Αντίθετα, όσοι κατανάλωσαν κρασί με αλκοόλ σημείωσαν σημαντικές αλλαγές, με κύριες τη μείωση της LDL και την αύξηση της HDL. Αυτή η διαπίστωση δε σημαίνει απαραίτητα ότι το αλκοόλ είναι υπεύθυνο για κάποια προστατευτική δράση. Είναι πιθανό το αλκοόλ να δρα συνεργιστικά με τις πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού, διευκολύνοντας, για παράδειγμα, την απορρόφησή τους.

1.3 Οινοποιία [8,9]

Οι ρώγες του σταφυλιού, που αποτελεί και την πρώτη ύλη του κρασιού, περιέχουν σάκχαρα, οργανικά οξέα και νερό (πάνω από 70 %). Η περιεκτικότητα σε αυτές τις ουσίες εξαρτάται κάθε φορά από τη ποικιλία, το υπέδαφος, τις κλιματικές συνθήκες αλλά και τη χρονική στιγμή της ωρίμανσης του σταφυλιού. Μετά τη διαδικασία του τρύγου (συγκομιδή), ακολουθεί η γλευκοποίηση, η διαδικασία δηλαδή κατά την οποία εξάγεται ο γλεύκος (μούστος) από το σταφύλι. Για την έκθλιψη του μούστου χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συνηθέστερα με χρήση ειδικών μηχανημάτων που λειτουργούν συνθλίβοντας το σταφύλι ανάμεσα σε περιστρεφόμενους κυλίνδρους ή με υδραυλική πίεση.

Το οινόπνευμα που περιέχει το κρασί παράγεται από τα σάκχαρα του μούστου με την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, που επιτελείται από ειδικά ένζυμα, τις ζυμάσες των ζυμομυκήτων. Οι ζυμομύκητες υπάρχουν αδρανοποιημένοι στο φλοιό των σταφυλιών και καθώς έρχονται σε επαφή με το μούστο, πολλαπλασιάζονται και επιτελούν τη ζύμωση. Εκτός από αιθυλική αλκοόλη παράγεται και διοξείδιο του άνθρακα. Η διαδικασία της ζύμωσης διαρκεί συνήθως 8 - 25 ημέρες. Είναι σύνηθες να παρατείνεται ή να διακόπτεται η ζύμωση με τεχνητά μέσα, κυρίως μέσω της διατήρησης της θερμοκρασίας σε χαμηλά ή υψηλά επίπεδα αντίστοιχα. Ο χρόνος της ζύμωσης είναι καθοριστικός για το κρασί που θα παραχθεί τελικά. Τέλος, γίνεται λόγος για *λευκή* και *ερυθρή* οινοποίηση, ανάλογα με το χρώμα του παραγόμενου κρασιού. Κατά τη λευκή οινοποίηση τα στέμφυλα παραμένουν καθ' όλη τη διάρκειά της, ενώ κατά την ερυθρή οινοποίηση τα στέμφυλα απομακρύνονται μετά το στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης.

1.3.1 Ερυθρή οινοποίηση [10]

1. Παραλαμβάνονται τα σταφύλια από ερυθρές ποικιλίες.
2. Απομακρύνονται τα κοτσάνια, ώστε να μη μεταδίδονται οι «χορτώδεις» γεύσεις τους στο μούστο.
3. Οι ρώγες σπάζουν ελαφρά (προαιρετικά).
4. Αλκοολική ζύμωση και εκχύλιση:
   Τα στέμφυλα ανεβαίνουν στην επιφάνεια του μούστου και σχηματίζουν το «καπέλο». Κατά την εκχύλιση, οι ανθοκυάνες, οι τανίνες και τα αρώματα, περνούν από τους φλοιούς στο μούστο. Η εκχύλιση ευνοείται από την υψηλή θερμοκρασία (26-30°C) και την περιοδική ανάμιξη και ομογενοποίηση στέμφυλων (δηλ. των φλοιών και των κουκουτσιών) και του μούστου.
5. Απομάκρυνση των ζυμωμένων στέμφυλων:
   Όταν το πέρασμα των συστατικών του φλοιού στο ζυμούμενο μούστο θεωρηθεί ικανοποιητικό, τα τσίπουρα (στέμφυλα) απομακρύνονται (οδηγούνται στο πιεστήριο όπου παραλαμβάνονται οι πιέσεις) και η ζύμωση συνεχίζεται απουσία στέμφυλων. Οι «πιέσεις» αποζυμώνουν ξεχωριστά. Το κρασί πίεσης μετά από αναλυτικό και οργανοληπτικό έλεγχο της ποιότητάς του ενδέχεται να αναμιχθεί με το υπόλοιπο ερυθρό κρασί (εκροής).
6. Μηλογαλακτική ζύμωση:
   Εφόσον κριθεί απαραίτητο, το κρασί υφίσταται τη μηλογαλακτική ζύμωση. Τα μηλογαλακτικά βακτήρια του κρασιού μετατρέπουν το ισχυρό μηλικό οξύ στο πιο ασθενές γαλακτικό οξύ και έτσι μειώνεται η οξύτητα του κρασιού.
7. Μετάγγιση, επεξεργασία, εμφιάλωση:
   Το ερυθρό κρασί μετά την επεξεργασία του (διαυγάσεις, σταθεροποιήσεις) εμφιαλώνεται. Εφόσον επιδέχεται παλαίωση παραμένει για κάποιο διάστημα σε δρύινα βαρέλια και κατόπιν σε φιάλες.

1.4 Σύσταση κρασιού [11, 12, 13]

Το κρασί αποτελείται από μια σειρά χημικών ενώσεων των οποίων η πρωταρχική μορφή βρίσκεται ήδη στους χυμούς της ρώγας του σταφυλιού. Πιο αναλυτικά, τα βασικά συστατικά του κρασιού παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1:

Το κρασί αποτελείται κατά κύριο λόγο από νερό (σ' αυτό οφείλεται ο υδάτινος χαρακτήρας του) και από εκατοντάδες έως και χιλιάδες άλλες χημικές ουσίες που συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της γεύσης και της υφής του (20-30 g/L περίπου από αυτές είναι στέρεες και βρίσκονται σε διάλυση). Οι σημαντικότερες από όλες αυτές τις ουσίες είναι:

- ✓ Τα οργανικά συστατικά
  Οργανικά οξέα, Αλκοόλες, Αρωματικές ενώσεις, Σάκχαρα, Πολυσακχαρίτες, Αζωτούχες ενώσεις, Ένζυμα, Βιταμίνες, Λιποειδή, Φαινολικές ενώσεις
- ✓ Τα ανόργανα συστατικά
  Ανιόντα: Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, F^-, Br^-, I^-
  Κατιόντα: K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^+

1.4.1 Οργανικά Συστατικά

1. *Οργανικά οξέα*

Τα οργανικά οξέα είναι υπεύθυνα για την ξινή γεύση των κρασιών, την προστασία των κρασιών από μικροβιολογικές ή χημικές προσβολές και τη διατήρηση του χρώματος. Τα κυριότερα οξέα είναι το τρυγικό οξύ (2-5g/L), το μηλικό οξύ (0-4g/L) και το κιτρικό οξύ (0,1g/L).

2. *Αλκοόλες*

Η αιθανόλη (CH_3CH_2OH), μετά το νερό, είναι το σημαντικότερο συστατικό του κρασιού και αποτελεί το 9-15% του όγκου του. Η γλυκερόλη είναι το τρίτο (σε συγκέντρωση) συστατικό του κρασιού σε περιεκτικότητα 5-20 g/L. Οι αλκοόλες, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη είναι τα «γλυκά» συστατικά του κρασιού και εξουδετερώνουν την ξινή γεύση των οξέων και την πικρή των φαινολικών ενώσεων.

3. *Αρωματικές Ενώσεις*

Το άρωμα του κρασιού οφείλεται κυρίως στις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες. Σημαντική συμμετοχή όμως έχουν και άλλες ενώσεις όπως αλδεΰδες, κετόνες, τερπένια, κ.ά.

4. *Σάκχαρα*

Μερικά σάκχαρα που περιέχονται στο κρασί είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη. Ανάλογα με την περιεκτικότητα τους, το κρασί διακρίνεται σε:

- Ξηρό: ≤2 g/L
- Ημίξηρο: 2-18 g/L
- Ημίγλυκο: 18-40 gL
- Γλυκό: >40g/L

5. *Πολυσακχαρίτες*

Οι πηκτίνες, τα κόμμεα και η δεξτράνη είναι προστατευτικά κολλοειδή, τα οποία προστίθενται στο κρασί για να προστατευτεί η διαύγειά του μετά την εμφιάλωση.

6. *Αζωτούχες Ενώσεις*

Οι αζωτούχες ενώσεις (πρωτεΐνες, πολυπεπτίδια, αμινοξέα) υπάρχουν στα στερεά μέρη του σταφυλιού, άρα οι ερυθροί οίνοι είναι πιο πλούσιοι σε αζωτούχες ενώσεις σε σχέση με τους λευκούς. Οι αζωτούχες ενώσεις προσδίδουν αρωματικές ιδιότητες στο κρασί και αποτελούν θρεπτικά συστατικά των ζυμών και των βακτηρίων.

7. *Βιταμίνες*

Είναι οργανικές ενώσεις που σε απειροελάχιστες δόσεις είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη, τη διατήρηση, και τη λειτουργία των οργανισμών, καθώς η απουσία τους προκαλεί χαρακτηριστικές διαταραχές και βλάβες. Το κρασί είναι πλούσιο σε βιταμίνες και οι κυριότερες που περιέχονται σ’ αυτό είναι οι ακόλουθες:

- Β1 ή θειαμίνη
- Β2 ή ριβοφλαβίνη
- Β3 ή νικοτιναμίδη
- Β4 ή αδενίνη
- Β5 ή παντοθενικό οξύ
- Β6 ή πυριδοξίνη
- Β12 ή κοβαλαμίνη
- C ή ασκορβικό οξύ

8. *Ένζυμα*

Στο κρασί περιέχονται πολυάριθμα ένζυμα όπως καταλάσες, οξειδάσες, ιμβερτάσες, πρωτεάσες κ.ά.

9. *Φαινολικές Ενώσεις*

Οι πολυφαινόλες συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και ευρύτατα διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και έτσι αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής, τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων. Ως πολυφαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται χημικά οι ενώσεις με έναν τουλάχιστον βενζολικό δακτύλιο που περιέχει ομάδες υδροξυλίου (-OH).

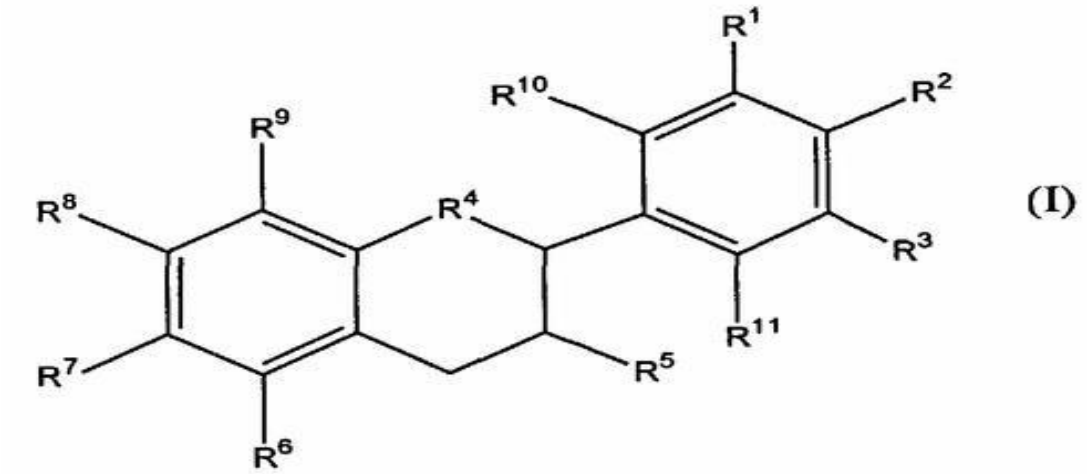
Οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για το χρώμα και τη γεύση (στυφάδα) του κρασιού, την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή προστασία και βοηθούν στην παλαίωση του.

Στο φυτικό βασίλειο έχουν ταυτοποιηθεί πολλές χιλιάδες μόρια με πολυφαινολική δομή και συγκεκριμένα πάνω από 8000 φαινολικές δομές είναι γνωστές μέχρι σήμερα [14].

Οι πολυφαινόλες, που αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια:

- το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και
- το μονοπάτι του οξικού οξέος.

Παρακάτω φαίνεται μία γενική χημική δομή των πολυφαινολών:



Εικόνα 1.1: Γενική χημική δομή των πολυφαινολών

Οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν, αλλά και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι μπορούν να ποικίλουν από απλά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, έως αρκετά πολυμερείς ενώσεις, όπως οι τανίνες.

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε συζευγμένη μορφή, με μία ή περισσότερες ομάδες σακχάρου να είναι δεσμευμένες στις υδροξυλομάδες, αν και μπορούν να υπάρξουν και άμεσες συνδέσεις των ομάδων σακχάρου σε κάποιο άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Τα δεσμευμένα σάκχαρα παρουσιάζονται με τη μορφή μονοσακχαριτών, δισακχαριτών ή ακόμα και ολιγοσακχαριτών. Η γλυκόζη αποτελεί τη συνηθέστερη ομάδα σακχάρου, αν και η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η αραβινόζη, το γλυκουρονικό οξύ και το γαλακτουρονικό οξύ, μπορούν επίσης να υπάρξουν. Επιπλέον, αρκετά συνήθεις είναι και οι συνδέσεις με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια, καθώς και με άλλες φαινόλες.

Οι πολυφαινόλες, σύμφωνα με τον Harborne (1980), μπορούν να διακριθούν σε 10 διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με τη βασική χημική δομή τους. Οι κατηγορίες αυτές φαίνονται στον πίνακα 1.2:

Πίνακας 1.2: Κύριες κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων στα φυτά (Harborne, 1980)

Αριθμός ατόμων C	*Βασικός σκελετός*	*Κατηγορία*
6	C6	Απλές φαινόλες Βενζοκινόνες
7	C6-C1	Φαινολικά οξέα
8	C6-C2	Ακετοφαινόνες Παράγωγα τυροσίνης Φαινυλοξικά οξέα
9	C6-C3	Υδροξυκιναμμωμικά οξέα Φαινυλοπροπάνια Κουμαρίνες Ισοκουμαρίνες Χρωμόνες
10	C6-C4	Ναφθοκινόνες
13	C6-C1-C6	Ξανθόνες
14	C6-C2-C6	Στιλβένια Ανθρακινόνες
15	C6-C3-C6	Φλαβονοειδή Ισοφλαβονοειδή
18	(C6-C3)2	Λιγνάνες Νεολιγνάνες
30	(C6-C3-C6)2	Διφλαβονοειδή
30	(C6-C3)n (C6)n (C6-C3-C6)n	Λιγνίνες Κατεχολ-μελανίνες Φλαβολάνες (τανίνες)

1.4.2 Ανόργανα Συστατικά

Το κρασί περιέχει 2-4 g/L ανόργανα συστατικά:

- Ανιόντα (Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{2-})
- Κατιόντα (K^+, Na^+, Ca^{2+})

1.5 Βιολογικές δράσεις του κρασιού

Πληθώρα επιστημονικών δεδομένων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση κρασιού, στο πλαίσιο της μεσογειακής δίαιτας, ασκεί ευεργετική δράση στην υγεία. Συγκεκριμένα, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν αποδείξει ότι το κρασί εμφανίζει:

1. Αγγειοδιασταλτική δράση
2. Αντιθρομβωτική δράση
3. Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση
4. Αντικαρκινική δράση
5. Αντιαλλεργική δράση
6. Δράση στα επίπεδα των λιποειδών
7. Αντιοξειδωτική δράση
8. Αντιφλεγμονώδη δράση

1.5.1 Αγγειοδιασταλτική δράση

Σε έρευνα των Rathel et al. μελετήθηκε η επίδραση του κόκκινου κρασιού στην ενδοθηλιακή συνθάση μονοξειδίου του αζώτου. Το νιτρικό οξείδιο (NO) που απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της ενδοθηλιακής συνθάσης είναι ένα προστατευτικό μόριο που εκτός από τις αγγειοδιασταλτικές ικανότητες μπορεί να προστατεύσει από την αρτηριοσκλήρυνση, αφού παρεμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την προσκόλληση λεμφοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση. Οι ερευνητές βρήκαν ότι το κόκκινο κρασί ενίσχυε σημαντικά την έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO και επομένως την απελευθέρωση του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [15].

Άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες συντελούν στην αύξηση της ελαστικότητας των στεφανιαίων αρτηριών, μέσω της παραγωγής του παράγοντα EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor), ο οποίος έχει ενεργό ρόλο στη διατήρηση του αγγειακού τόνου και της πίεσης του αίματος και στην αύξηση της απελευθέρωσης προστακυκλίνης. Οι πολυφαινόλες του κρασιού φαίνεται ότι ενεργοποιούν συγκεκριμένα μονοπάτια κινασών στα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα τη χαλάρωση των αρτηριών, μέσω της κινητοποίησης του EDHF. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης των κινασών.

Επίσης, οι πολυφαινόλες του κρασιού δημιουργούν τοπικά στην αρτηρία ελεγχόμενα μικρές ποσότητες υπεροξειδίων, ώστε να αυξηθούν τα αποθέματα ασβεστίου στο ενδοθήλιο, άρα και τα κανάλια που εξαρτώνται από το ασβέστιο και εμπλέκουν την παραγωγή EDHF, μέσω οξείδωσης της κυστεΐνης των κυτταρικών μεμβρανών [16]. Πειραματικές μελέτες στο αρτηριακό ενδοθήλιο έδειξαν ότι πολυφαινόλες, όπως οι προανθοκυανιδίνες και οι 3-φλαβανόλες αυξάνουν την απελευθέρωση της προστακυκλίνης, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με την κερκετίνη [17].

1.5.2 Αντιθρομβωτική δράση

Αθηρογένεση ή αγγειογένεση είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την πρόωρη αποδόμηση των εξωκυτταρικών μεταλλοπρωτεϊνασών (MMP), ακολουθούμενη από τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ωρίμανση των αγγείων. Οι πολυφαινόλες, έχοντας αντιαγγειογόνο δράση προλαμβάνουν την ενεργοποίηση των MMP, την έκφραση του αυξητικού παράγοντα VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Φυσιολογικοί ενεργοποιητές των MMP είναι η θρομβίνη και η πλασμίνη. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού προλαμβάνουν την ενεργοποίηση των MMP στα λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτή η δράση σχετίζεται με την ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της θρομβίνης. Η ανασταλτική δράση παρατηρείται σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον 3 mg πολυφαινολών/ L κρασιού [18,19].

Οι Russo et al. μελέτησαν in vitro τις αντιθρομβωτικές ιδιότητες του κόκκινου κρασιού βρίσκοντας δράση των προκυανιδίνων, αλλά όχι των φαινολικών οξέων και των φλαβονολών [20].

Οι Teede, Nestel et al. παρατήρησαν ότι οι ισοφλαβόνες δεν επιτρέπουν την ενεργοποίηση θρομβογόνων παραγόντων, όπως προθρομβίνη [21].

Άλλα πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι η χορήγηση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες οδηγεί στη σταδιακή μείωση του πάχους της αθηρωματικής πλάκας ή την αποτροπή δημιουργίας της, λόγω της αποτροπής πολλαπλασιασμού των μυϊκών κυττάρων των αρτηριών [34].

Από άλλες μελέτες συνοψίζεται ότι η αντιθρομβωτική δράση του κρασιού οφείλεται:

1. Στην αύξηση της συγκέντρωσης της HDL
2. Στη μείωση της οξείδωσης της LDL
3. Στην αύξηση του NO (προφυλάσσει το αγγείο και προκαλεί αγγειοδιαστολή)
4. Στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με διάφορους μηχανισμούς (εμποδίζεται η δημιουργία θρόμβων στις αρτηρίες)
5. Στην αύξηση της ινωδόλυσης (διευκολύνεται η διάλυση των θρόμβων)

Η επίδραση στα αιμοπετάλια διαπιστώθηκε και με πείραμα στον άνθρωπο σε εθελοντές που κατανάλωναν επί μία εβδομάδα ανά 24ωρο 300ml κόκκινο κρασί και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [22].

1.5.3 Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση

Είναι γνωστό ότι στην αρχαιότητα χρησιμοποιούσαν το κρασί για να αποστειρώσουν νωπά προϊόντα καθώς και για το πλύσιμο πληγών. Έριχναν ακόμη κρασί στο νερό για να προφυλαχθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονταν σε πηγές ή ποτάμια. Η αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή ιδιότητα του κρασιού αποδίδεται στην αλκοόλη, στα οξέα, αλλά κυρίως στις ταννίνες που περιέχει. Σε έρευνα διαπιστώθηκε ότι εκχυλίσματα λευκού και κόκκινου κρασιού χωρίς αλκοόλ επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη gram(+) και gram(-) βακτηρίων καθώς επίσης και μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα εντοπίσθηκε ισχυρή βακτηριοκτόνος και βακτηριοστατική δράση απέναντι σε στελέχη του S. Aureus και λιγότερο ισχυρή σε στελέχη των E. Coli και C. Albicans [23].

1.5.4 Αντικαρκινική δράση

Αρκετές μελέτες έχουν επισημάνει την αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων κρασιού και των συστατικών του. Τα ερευνητικά αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής του Δ. Κουρέτα [24] σχετικά με την διερεύνηση του χημειοπροστατευτικού-αντικαρκινικού ρόλου των οινοποιητικών προϊόντων της Ελλάδος στη πρόληψη μεταλλάξεων κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:

- Τα αμπελοκομικά εκχυλίσματα σε μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλουν τη μεταλλαξιογόνο δράση των οξειδωτικών παραγόντων στα βακτηριακά κύτταρα, καθώς και τις επαγόμενες από τις ελεύθερες ρίζες θραύσεις του πλασμιδιακού DNA. Έτσι, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων της αμπέλου -έναντι των βλαβών που προκαλούνται στο DNA από οξειδωτικούς παράγοντες- είναι ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιδεικνύουν χημειοπροστατευτική δράση κατά της καρκινογένεσης.
- Μελέτη της επίδρασής τους στη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση I, που παρουσιάζει αυξημένη δράση σε καρκινικά κύτταρα και η αναστολή του θεωρείται ένδειξη χημειοπροστατευτικής-αντικαρκινικής δράσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα της αμπέλου αναστέλλουν τη δράση της τοποϊσομεράσης I. Η αναστολή αυτού του ενζύμου πιθανά αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων κρασιού.
- Αρκετές από τις πολυφαινολικές ουσίες του οίνου είναι σε θέση να προστατεύσουν την SP-A πρωτεΐνη (επιφανειοδραστικός παράγοντας του πνεύμονα) από την οξείδωση που προκαλεί το όζον, με αποτέλεσμα να είναι σε θέση να προστατεύσουν τους πνεύμονες από τις δυσμενείς επιδράσεις (φλεγμονή, καρκινώματα) των ρυπαντών της ατμόσφαιρας.

Σε έρευνα των Soleas et al. έγινε σύγκριση των αντικαρκινικών ιδιοτήτων τεσσάρων πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού. Η κερκετίνη ήταν η πιο δραστική ενώ λιγότερο δραστικό ήταν το γαλλικό οξύ. Η trans ρεσβερατρόλη εμφάνισε μέτρια

αντικαρκινική δράση [12]. Σύμφωνα με άλλα πειράματα, παρατηρήθηκε ότι τα πολυφαινολικά συστατικά του κρασιού μειώνουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών οξείας φάσης στα καρκινικά κύτταρα και στους πληθυσμούς καρκινικών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Επομένως, η κατανάλωση κρασιού μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση [25].

1.5.5 Αντιαλλεργική δράση

Στα φλαβονοειδή του κρασιού έχει αποδοθεί και η αντιαλλεργική δράση του. Τα φλαβονοειδή προκαλούν αναστολή της δράσης των ενζύμων φωσφοδιεστεράση του cAMP και ATPάση που αυξάνουν την έκκριση της ισταμίνης τόσο από τα μαστοκύτταρα όσο και από τα βασεόφιλα [25]. Πολύ συχνά οι πάσχοντες από αλλεργία αναφέρουν σημαντική ανακούφιση με τη χρησιμοποίηση του εκχυλίσματος σταφυλιού. Επίσης, χρησιμοποιείται για το ρυθμιστικό του ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα αφού διεγείρει την έκκριση αντιφλεγμονωδών ορμονών.

1.5.6 Επίδραση στα επίπεδα των λιπιδίων

Η αυξημένη συγκέντρωση των λιπιδίων στην κυκλοφορία του αίματος είναι ένας βασικός παράγοντας κινδύνου αθηροσκλήρωσης. Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού μειώνουν την ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια, αυξάνουν την HDL και μειώνουν την LDL, αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών στις αρτηρίες [26].

Μελέτες σε ζώα προτείνουν ότι οι πολυφαινόλες αντιδρούν με τους πρωτεϊνικούς μεταφορείς της χοληστερόλης στην ψυκτροειδή παρυφή, εμποδίζοντας την απορρόφηση της στα εντεροκύτταρα και προωθώντας την απέκκριση της από τον οργανισμό.

Οι Pal et al. έδειξαν ότι όταν επωάστηκαν Caco-2 κύτταρα με κόκκινο κρασί παρατηρήθηκε 17% μείωση της απολιποπρωτεΐνης apoB48. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός με τον οποίο αλλαγές στην απορρόφηση χοληστερόλης (αλλαγές στο μεταβολισμό λιποπρωτεϊνών) επηρεάζουν τη φυσιολογική ρύθμιση της παραγωγής apoB48, διακόπτοντας τη σύνθεση χυλομικρών και μειώνοντας τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα. Τα φλαβονοειδή ναριγενίνη και εσπεριδίνη μειώνουν την έκκριση apoB στα ηπατοκύτταρα, γεγονός που συνδέεται με μείωση των εστέρων χοληστερόλης (CE, Cholesteryl Ester), του ενζύμου $ACAT_2$ (Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase) και της MTP (Microsomal Transfer Protein), πρωτεΐνης υπεύθυνης για τη δημιουργία χυλομικρών [27].

Πειράματα σε ζώα έδειξαν, επίσης, ότι οι πολυφαινόλες μείωσαν τη VLDL από 50% σε 39%, ενώ σε ανθρώπους μείωσαν τα τριγλυκερίδια, την apoB, την apoE και την LDL. Οι πολυφαινόλες των σταφυλιών μειώνουν τις συγκεντρώσεις των apoB, apoE στο πλάσμα, τροποποιώντας το μεταβολισμό της VLDL και μειώνοντας τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων, μέσω της αναστολής της λιπολυτικής δραστηριότητας του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL, Lipoprotein Lipase) [28].

Επίσης, οι πολυφαινόλες αυξάνουν την HDL στο αίμα. Πρόκειται για τη λιποπρωτεΐνη που κάνει αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, απομακρύνοντας τη χοληστερόλη από τα κύτταρα των αρτηριών [29].

Οι πολυφαινόλες δρουν ευεργετικά υπέρ της πρόληψης της αθηροσκλήρυνσης και μέσω μείωσης της LDL. Πολλές μελέτες που αφορούν την κατανάλωση πολυφαινολών του κρασιού εμφανίζουν τη δράση ενός ειδικού μηχανισμού, σύμφωνα με τον οποίο οι πολυφαινόλες επιδρούν στα ηπατοκύτταρα Hep G-2, απορρυθμίζοντας τη δραστηριότητα του υποδοχέα της LDL. Αυτή η απορρύθμιση σχετίζεται με την ικανότητα των πολυφαινολών να αυξάνουν τις συγκεντρώσεις της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης στο ήπαρ, αφού μειώνουν την απορρόφηση της χοληστερόλης της τροφής, οπότε ενεργοποιείται η διαδικασία μείωσης του υποδοχέα της LDL, άρα και της ίδιας της LDL χοληστερόλης.

Μετανάλυση μελετών δείχνει ότι οι πολυφαινόλες του τσαγιού, του ελαιολάδου, του κακάο, της σόγιας και του κόκκινου κρασιού μειώνουν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της apoB και της LDL, ενώ αυξάνουν την HDL και την apoA-I [29,30].

1.5.7 Αντιοξειδωτική δράση

Το κρασί και ιδιαίτερα το κόκκινο, έχει επαινεθεί αρκετά για τις ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία. Ως ποτό πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, είναι επόμενο να έχει μελετηθεί αρκετά όσον αφορά το βαθμό που συμβάλει στην εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών, δρώντας ενάντια στο οξειδωτικό stress [31].

1.5.7.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες [32-34]

Ως αντιοξειδωτική μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση κάποιου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών ως απενεργοποιητές ελεύθερων ριζών και υδροξυλιομένων ελεύθερων ριζών είναι να εμποδίσει την καταστροφή των συστατικών του κυττάρου που προκύπτει ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες. Όταν η διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών είναι μειωμένη, αυτή η καταστροφή μπορεί να συσσωρευτεί και να επιφέρει αποτελέσματα οξειδωτικού στρες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν τη δυνατότητα να σταθεροποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές επιτεθούν σε κύτταρα και βιολογικούς στόχους και γι’ αυτό το λόγο, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διατήρηση της υγείας του κυττάρου.

Η χημική έννοια του όρου «αντιοξειδωτικό» αναφέρεται στην τάση ενός μορίου για απόδοση ενός ηλεκτρόνιου (e^-) προς έναν οξειδωτικό παράγοντα, συνήθως ελεύθερη ρίζα, με αποτέλεσμα την προφύλαξη άλλων μορίων τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα.

Μετά την αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα μόριο μη ελεύθερη ρίζα, τουλάχιστον ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει οπωσδήποτε να είναι εκ νέου ελεύθερη ρίζα (λόγω της αφαίρεσης ενός ηλεκτρονίου από το ζεύγος ηλεκτρονίων). Η νέα ελεύθερη ρίζα αντιδρά περαιτέρω με τη σειρά της σχηματίζοντας νέες ελεύθερες ρίζες. Έτσι έχουμε αλυσιδωτές αντιδράσεις, οι οποίες εάν δεν αναστέλλονταν με κάποιο τρόπο θα είχαν σαν αποτέλεσμα την πλήρη καταστροφή του βιολογικού υλικού. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών μπορούν να σταματήσουν με δύο τρόπους:

- $A^* + B^* \rightarrow A - B$ (α)
- $A^* + Q \rightarrow A + Q^*$ (β)

Στην πρώτη περίπτωση (α), δύο μόρια ελεύθερων ριζών αντιδρούν μεταξύ τους συνεισφέροντας από ένα ηλεκτρόνιο η κάθε μια, σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό, ενώ στη δεύτερη (β), η ελεύθερη ρίζα A* αντιδρά με ένα άλλο μόριο Q σχηματίζοντας μια νέα ελεύθερη ρίζα Q*. Σ' αυτή την περίπτωση όμως η ελεύθερη ρίζα της ένωσης Q είναι μια από τις εξαιρέσεις οι οποίες δεν είναι δραστικές και έτσι διακόπτεται η ακολουθία των αντιδράσεων. Οι πιθανότητες για την περίπτωση (α) είναι εξαιρετικά μειωμένες λόγω του ότι τα A* και B* είναι πολύ δραστικά μόρια και κατά συνέπεια η συγκέντρωσή τους δεν είναι ποτέ τόσο υψηλή. Αντιδράσεις του τύπου (β) είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνες για την αντιμετώπιση ελεύθερων ριζών οι οποίες σχηματίζονται στο κύτταρο. Φυσιολογικές ενώσεις με ιδιότητες αντίστοιχες του μορίου Q είναι οι βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ) και E (α-τοκοφερόλη), όπως και οι φαινολικές ενώσεις.

Φαίνεται από τα παραπάνω ότι για να χαρακτηριστεί μια ένωση ως αντιοξειδωτική πρέπει να έχει δύο ιδιότητες:

1. Όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοξείδωση ή την προκληθείσα από ελεύθερες ρίζες οξείδωση.
2. Η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται μετά τη δράση της πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακού υδρογονικού δεσμού) σε περαιτέρω οξείδωση.

Ακόμη, ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με το υπόστρωμα και την ενεργή διάμεση ουσία, να επαναγεννάται γρήγορα από το βιολογικό σύστημα, να έχει πρόσβαση στην ενεργή διάμεση ουσία στο μικροπεριβάλλον, καθώς και να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα [34].

1.5.7.2 Ρόλος των αντιοξειδωτικών ουσιών του κρασιού

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο κρασί είναι φλαβονόλες όπως κερκετίνη, μυρισετίνη και απιγενίνη, φλαβανόλες όπως κατεχίνη, επικατεχίνη και επιγαλλοκετεχίνη, στιλβένια όπως ρεσβερατρόλη, παλλιδόλη, ταννίνες και πολυμερή ανθοκυανινών. Οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες που συναντώνται στο κρασί είναι η μαλβινιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη, κυανιδίνη και η δελφινιδίνη. Ακόμη, στα κρασιά περιέχονται φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό, το καφεϊκό, καφεϋλοτρυγικό, p-κουμαρικό και το p-κουμαροϋλοτρυγικό. Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των περισσότερων ενώσεων του οίνου υπόκεινται σε διάφορες μελέτες [35-37].

Αν και ο αντιοξειδωτικός ρόλος των φαινολικών συστατικών του κρασιού στην εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών είναι πολυδιάστατος, η προστασία της LDL από την οξείδωση αποτελεί τη σημαντικότερη, ίσως, δράση των πολυφαινολών στον τομέα της πρόληψης της στεφανιαίας νόσου, δεδομένης της μεγάλης συνεισφοράς της LDL στην αθηρογένεση.

Η οξειδωμένη LDL προκύπτει από την οξείδωση των λιποειδών και την τροποποίηση των απολιποπρωτεϊνών που βρίσκονται εντός αυτής. Η οξείδωση της LDL λαμβάνει χώρα στον υποενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος, όπου όλα τα βασικά κύτταρα, δηλαδή τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά και τα μακροφάγα, δύνανται να οξειδώσουν την LDL. Η αντίδραση της LDL με τα μακροφάγα, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, ενεργοποιεί κυτταρικές οξυγονάσες, οι οποίες παράγουν ROS και RNS, ρίζες υπεύθυνες για την οξείδωση της LDL. Στη διαδικασία εμπλέκονται αφενός μεν οι ρίζες ROS και RNS, αφετέρου δε ειδικά ένζυμα, όπως η λιποξυγονάση (LOX), η NADPH οξειδάση, το κυτόχρωμα P450 κ.ά. Κατά την οξείδωση παράγονται υδροϋπεροξείδια, αλδεΰδες, κετόνες και άλλες ρίζες, οι οποίες κινούνται προς νέα μόρια LDL. Επιπλέον, η οξείδωση της LDL οδηγεί στην παραγωγή PAF και οξειδωμένων φωσφολιποειδών τα οποία αποτελούν και ισχυρούς φλεγμονώδεις μεσολαβητές [38].

Η οξείδωση της LDL εξαρτάται από το οξειδωτικό επίπεδο των μακροφάγων και της LDL. Η έντονη οξείδωση των μακροφάγων διευκολύνει την οξείδωση της LDL. Το οξειδωτικό επίπεδο της LDL καθορίζεται από την ισορροπία ανάμεσα στην τάση οξείδωσης των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης εντός της LDL και στην αντιοξειδωτική άμυνα της LDL [34,39].

Η οξειδωμένη LDL και κυρίως τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή και ο PAF, θεωρούνται από τους σημαντικότερους παράγοντες αθηροσκλήρυνσης, διότι προκαλούν διέγερση διαδικασιών πολλαπλασιασμού των αρτηριακών κυττάρων, μετατρέπουν τα μακροφάγα σε αφρώδη κύτταρα και κινητοποιούν φλεγμονώδεις ουσίες [40]. Η οξειδωμένη LDL προκαλεί την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνης, που λειτουργούν ως διεγερτικοί παράγοντες και προκαλούν τη δέσμευση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, την είσοδο τους εντός της αρτηρίας και το μετασχηματισμό τους σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα αυξάνονται και, προσλαμβάνοντας την οξειδωμένη LDL μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, που

είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα και χοληστερόλη, υπεύθυνα για την πάχυνση της αθηρωματικής πλάκας [41].

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πληθώρα μελετών in vitro και in vivo σε ζωικά μοντέλα σχετικές με τη δράση των φαινολικών συστατικών στην οξείδωση της LDL. Στα in vitro πειράματα χρησιμοποιήθηκαν χαλκός ή σίδηρος για την οξείδωση της LDL και τα περισσότερα έδειξαν ότι διάφορα φαινολικά συστατικά, όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το p-κουμαρικό οξύ, ιδίως παρουσία α-τοκοφερόλης, προστατεύουν την LDL από την οξείδωση [39,40].

Σε μελέτη των Vinson et al., εξετάσθηκε η οξείδωση της LDL χοληστερόλης τόσο σε κύτταρα hamster όσο και σε ανθρώπινα με τη μέθοδο των TBARS και αποδείχτηκε ότι τα κλάσματα κόκκινου και λευκού κρασιού προστάτευαν την LDL από την οξείδωση περισσότερο από το ασκορβικό οξύ και την α-τοκοφερόλη [34].

Επίσης, το κρασί μπορεί να αναστείλει τη δράση οξειδωτικών ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των εικοσανοειδών, όπως η κυκλοξυγονάση (COX) και η λιποξυγονάση (LOX). Τα εικοσανοειδή είναι λιποειδή που δρουν και ως ορμόνες που παράγονται από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, ενώ περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό υποκατηγοριών, όπως: προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες, λευκοτριένια, υδροξυλιωμένα απαραίτητα λιπαρά οξέα, λιποξίνες που είναι σημαντικοί λιποειδικοί μεσολαβητές αλλά αποτελούν και προφλεγμονώδεις παράγοντες. Τα δύο κύρια ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στη σύνθεση των εικοσανοειδών είναι η οδός κυκλοξυγονάσης (COX) και λιποξυγονάσης (LOX). Μέσω της COX παράγονται οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξάνες. Οι προσταγλανδίνες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό κυττάρων, παρέχουν ερεθίσματα για την καρκινογένεση και εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και οι θρομβοξάνες εμπλέκονται σημαντικά στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα λευκοτριένια (πχ. 5-HETE (5-υδοξυ- 6,8,11,14 εικοσανοϊκό οξύ), παράγονται μέσω της οδού της λιποξυγονάσης [34].

Τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα που διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στην παθογένεση των καρδιαγγειακών παθήσεων, αφενός μεν διότι όταν ενεργοποιηθούν προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και προωθούν την αθηρογένεση, αφετέρου δε διότι η συσσωμάτωση τους οδηγεί σε θρόμβωση. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων λαμβάνει χώρα με διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης και της θρομβίνης. Η διέγερση με θρομβίνη ακολουθείται από την σύνθεση εικοσανοειδών, κυτταροκινών και προστανοειδών, γεγονός σημαντικό για την παθοφυσιολογική φλεγμονώδη διαδικασία, ενώ τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη φλεγμονή απελευθερώνοντας σεροτονίνη, ισταμίνη και PAF. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μέσω θρομβίνης, προάγει τη φλεγμονώδη διαδικασία, προωθώντας την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο και το ινωδογόνο του ενδοθηλίου, την παραγωγή μιτωτικών και αυξητικών παραγόντων εντός του ενδοθηλίου, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και τη δημιουργία αθηροσκλήρωσης.

Αναφορικά με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, πρόκειται για μία διαδικασία η οποία προωθείται από το LPS μικροοργανισμών, μέσω διέγερσης της παραγωγής της θρομβοξάνης A_2 (TXA_2). Στη διαδικασία εμπλέκεται το μονοπάτι του

αραχιδονικού οξέος, που ενεργοποιεί τη διαδικασία αναγέννησης των ελεύθερων ριζών [42-44].

Η ρεσβερατρόλη του κρασιού φάνηκε ότι μειώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που επάγεται από θρομβίνη, μέσω της τροποποίησης του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και της αποτροπής παραγωγής ελευθέρων ριζών και υπεροξειδίων. Στη διαδικασία εμπλέκεται και η αναστολή του μονοπατιού της κυκλοξυγονάσης. Η ρεσβερατρόλη έχει επίσης βρεθεί ότι αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων [36].

Οι Demrow et al. έδειξαν in vivo ότι ο χυμός σταφυλιών έχει αντιαιμοπεταλιακή δράση, ενώ οι ευεργετικές δράσεις του χυμού σταφυλιού φαίνεται ότι οφείλονται στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, στην αύξηση του NO και στη μείωση των υπεροξειδίων [45].

Σε άλλες ερευνητικές εργασίες πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες οξείδωσης με σίδηρο και ασκορβικό οξύ σε λιποειδή (λινελαϊκό οξύ) και αποδείχτηκε ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν αναστολή της υπεροξείδωσης των λιποειδών [46].

Επιπλέον, σε μελέτη των Brand-Williams et al. αναδεικνύεται η ικανότητα πολλών φαινολικών που υπάρχουν στο κρασί να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες του DPPH* εμφανίζοντας έτσι ισχυρή αντιοξειδωτική δράση αφού μειώνουν τις υπεύθυνες για την πρόκληση του οξειδωτικού stress ελεύθερες ρίζες [47]. Τέλος, πρόσφατη μελέτη της Ξανθοπούλου και συνεργατών έχει δείξει ότι εκχυλίσματα λευκού και κόκκινου κρασιού έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ρίζες του DPPH* και να αναστέλλουν τη λιποξυγονάση (LOX) [48].

Συμπερασματικά, σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, το κρασί φαίνεται να προστατεύει τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες αφού αναστέλλει την οξείδωση της LDL χοληστερόλης αλλά συμβάλει και στην εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται από διάφορες αιτίες και είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών. Τέλος, το κρασί μπορεί να αναστείλει τη δράση οξειδωτικών ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την έναρξη των διαδικασιών οξείδωσης και φλεγμονής στα ανθρώπινα κύτταρα.

1.5.8 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι μέρος της αντίδρασης του σώματος στη βλάβη. Πιστεύεται ότι η χρόνια χαμηλού επιπέδου φλεγμονή ως αντίδραση σε στρεσσογόνους παράγοντες όπως το κάπνισμα, η υψηλή χοληστερόλη και η παχυσαρκία, συντελεί στην οικοδόμηση των πλακών στο εσωτερικό τοίχωμα των αρτηριών. Η φλεγμονή μπορεί επίσης να κάνει τις πλάκες να διαρραγούν πιο εύκολα και να δημιουργηθεί θρόμβος που στη συνέχεια μπορεί να προκαλέσει έμφραγμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι, ενώ μέχρι πρόσφατα για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου «ενοχοποιούνταν» η αθηρωματική πλάκα και η αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, σήμερα έχει βρεθεί ότι υπάρχει πολύ μεγάλη σχέση της νόσου με την ύπαρξη φλεγμονής στα στεφανιαία αγγεία.

Μία από τις νεότερες επιστημονικές ανακαλύψεις είναι επίσης ότι η ισχαιμία, μία από τις συχνότερες εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου, όταν δεν είναι θανατηφόρος, μπορεί να έχει ευεργετικό ρόλο στην προστασία του μυοκαρδίου. Η συγκεκριμένη μελέτη από το Πανεπιστήμιο της Βαρκελώνης [18] έδειξε ότι οι γυναίκες που πίνουν μέτριες ποσότητες κρασιού μπορεί να έχουν λιγότερη φλεγμονή στα αιμοφόρα αγγεία. Στην μελέτη αυτή το βάρος δόθηκε στις πιθανές επιδράσεις του κρασιού στην φλεγμονή.

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) είναι ένα ισχυρότατο φλεγμονώδες μόριο που μεταξύ των άλλων σημαντικών δράσεων προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων, των κυττάρων που παίζουν βασικό ρόλο στο σημείο τραυματισμού ενός αγγείου σχηματίζοντας θρόμβο (πήγμα αίματος). Η χρόνια φλεγμονή εξαιτίας υψηλών επιπέδων PAF συμμετέχει δραστικά στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, στη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης και την πρόκληση καρδιαγγειακών νοσημάτων, εμφραγμάτων και εγκεφαλικών.

Το κόκκινο κρασί παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, σε μελέτες των Fragopoulou et al. βρέθηκε ότι τόσο τα ερυθρά κρασιά όσο και τα λευκά περιέχουν ουσίες που δρουν ως αναστολείς του PAF [49-52].

Τα φαινολικά του κρασιού αναστέλλουν την απελευθέρωση και την σύνθεση της ισταμίνης και της προσταγλανδίνης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη φλεγμονή. Επιστημονικά δεδομένα συγκλίνουν στην προστατευτική δράση των φαινολικών συστατικών έναντι της αθηροσκλήρυνσης, μέσω της καθυστέρησης ή της αποτροπής της φλεγμονώδους διαδικασίας.

Συγκεκριμένα, τα φαινολικά συστατικά αναστέλλουν την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της ρύθμισης της παραγωγής κυτταροκινών, της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και της απελευθέρωσης χημειοκινών. Οι πολυφαινόλες των σταφυλιών και του κρασιού έχει βρεθεί ότι μειώνουν τα μόρια προσκόλλησης στα μονοκύτταρα και στα Τ- λεμφοκύτταρα, μειώνουν τις συγκεντρώσεις των TNF-α, IL-6, ICAM-1, VCAM-1, μειώνουν τα μονοκύτταρα και τα Τ-λεμφοκύτταρα και εμποδίζουν το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Επιπρόσθετα, μειώνουν τις συγκεντρώσεις του παράγοντα Κ στα μονοκύτταρα. Ο παράγοντας Κ κινητοποιεί τη δράση των κυτταροκινών μέσω του μονοπατιού κινάση της τυροσίνης, το οποίο αναστέλλεται από τις πολυφαινόλες του κρασιού, όπως η ρεσβερατρόλη, και μέσω δέσμευσης ελευθέρων ριζών [19].

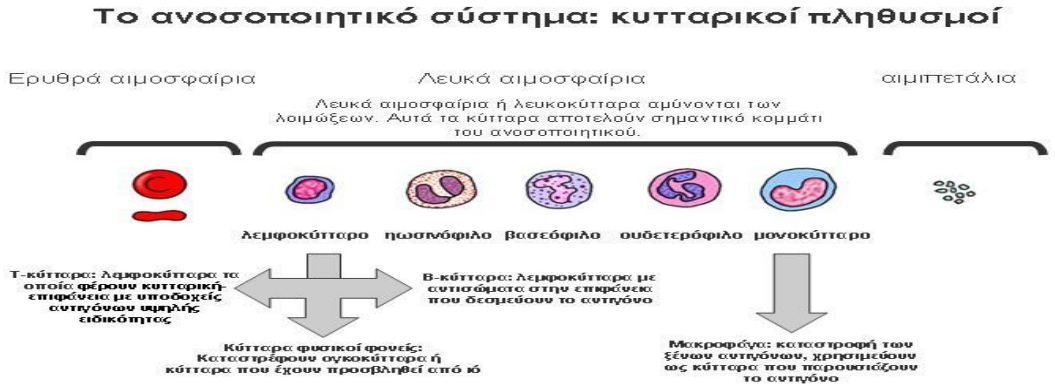
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο
ΦΛΕΓΜΟΝΗ

2.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα [53,54]

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα σύστημα για την αυτο-αναγνώριση και τη διατήρηση της ομοιόστασης. Είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο δίκτυο που εκτείνεται σε όλο το σώμα και είναι σε θέση να αναγνωρίσει και να υπερασπίσει τον οργανισμό ενάντια σε θεωρητικά άπειρες προκλήσεις. Πιο συγκεκριμένα, το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει ένα σύνολο κυττάρων και οργάνων τα οποία συνεργάζονται στενά μεταξύ τους με στόχο την προστασία του οργανισμού έναντι βλαπτικών παραγόντων του εξωτερικού ή του εσωτερικού περιβάλλοντος. Με τον όρο ανοσία εννοούμε κάθε απόκριση του οργανισμού («ξενιστή») έναντι ξένων σωμάτων που εισβάλλουν στο σώμα είτε πρόκειται για ζώσα είτε για μη ζώσα ύλη. Διακρίνοντας το «ίδιον» από το «μη ίδιον», οι λειτουργίες των αμυντικών μηχανισμών είναι οι εξής:

- Προστασία από μικροοργανισμούς (ιοί, βακτήρια, μύκητες και παράσιτα)
- Απομόνωση ή απομάκρυνση μη μικροβιακής φύσης ξένων σωμάτων
- Καταστροφή καρκινικών κυττάρων που γεννώνται στο σώμα (ανοσολογική επιτήρηση)

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από κύτταρα τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα και στη λέμφο, αλλά σχηματίζουν και καλά συγκροτημένους ιστούς οι οποίοι χρησιμεύουν τόσο στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και στην απαρτίωση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούνται από τους διάφορους τύπους των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα), τα πλασματοκύτταρα (διαφοροποίηση από Β λεμφοκύτταρα), τα μακροφάγα, τα μακροφαγομιμητικά κύτταρα και τα μαστοκύτταρα.



Σχήμα 2.1: Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

- *Αιμοπετάλια* [53]

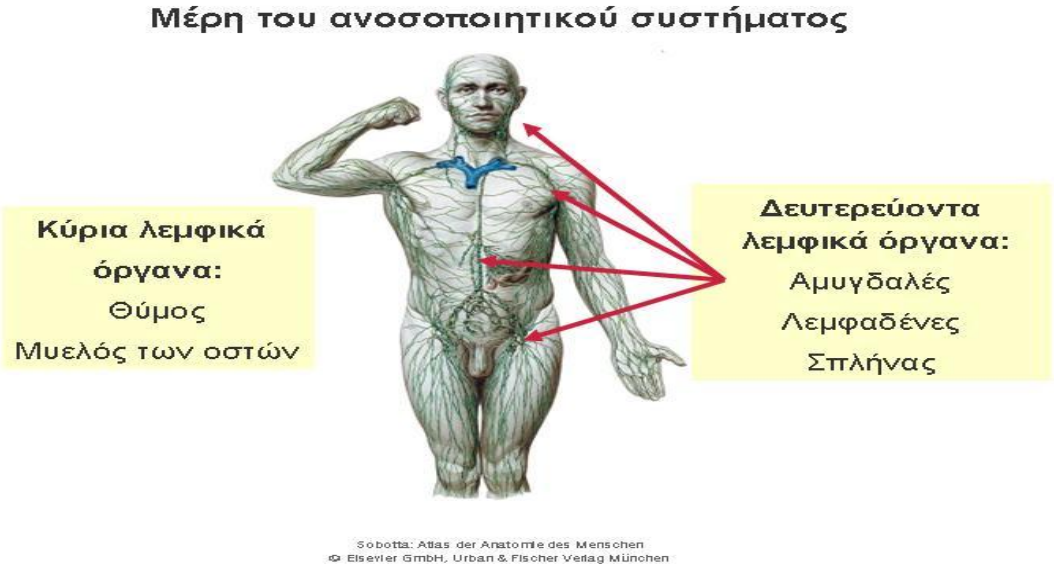
Τα αιμοπετάλια (ή θρομβοκύτταρα) είναι θραύσματα κυττάρων του αίματος που εμπλέκονται σε μηχανισμούς απαραίτητους για την πήξη του αίματος. Χωρίς το σχηματισμό θρόμβων αίματος κάθε διάρρηξη αιμοφόρου αγγείου θα οδηγούσε σε αιμορραγία. Τα αιμοπετάλια χρειάζονται για να αποφευχθεί διαρροή ερυθρών αιμοσφαιρίων ακόμη και από αγγεία που δεν έχουν υποστεί βλάβη.

Τα αιμοπετάλια παράγονται στο μυελό των οστών (περίπου 10^{11} ημερησίως), στα ονομαζόμενα μεγακαρυωτικά κύτταρα, τα οποία είναι πολυπύρηνα κύτταρα. Η θρομβοποιητίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται κυρίως στο ήπαρ και διεγείρει το μηχανισμό παραγωγής αιμοπεταλίων. Η ορμόνη αυτή συνδέεται με τον αριθμό των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων, δηλαδή εάν ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι ομαλός (150 έως 400 εκατομμύρια/ mL αίματος), τα επίπεδα της θρομβοποιητίνης στον ορό του αίματος παραμένουν χαμηλά, ενώ εάν μειωθεί ο αριθμός των αιμοπεταλίων, αυξάνονται τα επίπεδα της θρομβοποιητίνης στον ορό, έτσι ώστε να αυξηθεί η παραγωγή αιμοπεταλίων.

Η διάρκεια ζωής των κυκλοφορούντων στο αίμα αιμοπεταλίων είναι 7 έως 10 ημέρες. Τα αιμοπετάλια δεσμεύονται και αδρανοποιούνται στο σπλήνα. Κακή λειτουργία του σπλήνα (ή η απουσία του) μπορεί να αυξήσει τον αριθμό των αιμοπεταλίων. Αντίθετα, υπερλειτουργία του σπλήνα μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερη καταστροφή των αιμοπεταλίων και μείωση του αριθμού τους.

Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται όταν έρθουν σε επαφή με διάφορους παράγοντες, όπως το κολλαγόνο ή τη θρομβίνη. Μόλις ενεργοποιηθούν, το σχήμα τους αλλάζει (σχηματίζουν "ψευδόποδα") και απελευθερώνουν τα συστατικά των κοκκίων τους (π.χ. πηκτικοί παράγοντες κ.λπ.). Τα αιμοπετάλια συγκολλούνται μεταξύ τους (συσσωρεύονται) μέσω ειδικών υποδοχέων, και επίσης προσκολλώνται σε άλλα κύτταρα δημιουργώντας, σε συνδυασμό με το ινώδες, έναν "αιμοστατικό" θρόμβο. Αριθμός αιμοπεταλίων κάτω από τα φυσιολογικά όρια οδηγεί σε ακατάσχετες αιμορραγίες, ενώ αριθμός πάνω από τα φυσιολογικά όρια οδηγεί σε θρομβώσεις και αποφράξεις αγγείων.

Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος διακρίνονται σε κεντρικά ή πρωτογενή (ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας) και σε περιφερικά ή δευτερογενή (οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, οι αμυγδαλές και οι συσσωρεύσεις λεμφοκυττάρων στους βλεννογόνους του γαστρεντερικού, του αναπνευστικού, του γεννητικού και του ουροποιητικού σωλήνα). Τα κεντρικά λεμφικά όργανα είναι ο τόπος όπου πραγματοποιείται η γέννηση (μυελός των οστών) και η ωρίμανση (μυελός των οστών και θύμος αδένας) των λεμφοκυττάρων. Αφ' ότου τα λεμφοκύτταρα ωριμάσουν, αφήνουν τα κεντρικά λεμφικά όργανα και προωθούνται στα περιφερικά λεμφικά όργανα, όπου ενεργοποιούνται προκειμένου να λάβουν μέρος σε ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις.



Σχήμα 2.2: Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος

Επιπλέον συστατικό στοιχείο του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα προϊόντα των κυττάρων του, όπως οι υποδοχείς αντιγόνων, τα προσκολλητικά μόρια και οι κυτταροκίνες. Μέσω των υποδοχέων αντιγόνων τα κύτταρα του συστήματος διακρίνουν εκλεκτικά τα διάφορα αντιγόνα και αντιδρούν με εξαιρετικά ειδικό τρόπο εναντίον τους. Με τον όρο «αντιγόνο» εννοούμε μικρά πεπτίδια, ή τμήματα πολυσακχαριτών τα οποία αναγνωρίζονται ακριβώς από τους υποδοχείς αντιγόνων. Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεϊνικά μόρια, που απελευθερώνονται από ένα κύτταρο και δρουν μέσω υποδοχέων σε άλλα κύτταρα, θεωρούνται δε φορείς μηνυμάτων μεταξύ των κυττάρων. Οι κυτταροκίνες δεν παράγονται από εξειδικευμένους αδένες αλλά, από μια ποικιλία μεμονωμένων κυττάρων και δρουν ως αυτοκρινείς/παρακρινείς παράγοντες, δηλαδή η πλειοψηφία των δράσεών τους λαμβάνει χώρα στο σημείο της έκκρισής τους.

Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί άμυνας μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: τους μη ειδικούς και τους ειδικούς μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι μη ειδικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί (φυσική ανοσία) προστατεύουν απέναντι στις ξένες ουσίες ή κύτταρα που εισβάλλουν στον οργανισμό χωρίς να αναγνωρίζουν την ειδική τους ταυτότητα και δεν είναι μοναδικοί για μια συγκεκριμένη ξένη ουσία ή κύτταρο. Οι ειδικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί (επίκτητη ανοσία) εξαρτώνται από την ειδική αναγνώριση από τα λεμφοκύτταρα της ουσίας ή του κυττάρου εναντίον του οποίου θα οργανωθεί η επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος η οποία είναι μοναδική και απευθύνεται στη συγκεκριμένη ουσία ή κύτταρο. Οι μη ειδικοί και οι ειδικοί ανοσολογικοί αμυντικοί μηχανισμοί συνεργάζονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους: τα συστατικά της μη ειδικής ανοσίας παρέχουν κατευθύνσεις τις οποίες χρησιμοποιούν οι ειδικοί μηχανισμοί προκειμένου να επιλέξουν τους κατάλληλους στόχους προς επίθεση και τις στρατηγικές που θα χρησιμοποιηθούν για την εξολόθρευσή τους.

2.1.1 Μη ειδική ανοσολογική άμυνα [53]

Οι μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί παρέχουν προστασία στο σώμα από ξένα κύτταρα ή ουσίες χωρίς προηγουμένως να έχουν αναγνωρίσει την ταυτότητά τους. Η ιδιότητα που αναγνωρίζουν στον εισβολέα που τον κάνει να είναι «ξένος» είναι ορισμένες ειδικές τάξεις υδατανθράκων ή λιπιδίων που συχνά αποτελούν τα κυτταρικά τοιχώματα των μικροοργανισμών. Η φυσική ανοσία υπάρχει εκ γενετής, δεν εξελίσσεται με την πάροδο του χρόνου και αναπτύσσεται αμέσως μετά το αρχικό ερέθισμα. Οι μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τα εξής είδη:

- *Αμυντικοί μηχανισμοί επιφανειών σώματος*, οι οποίοι αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του σώματος απέναντι σε μικροοργανισμούς

(δέρμα, αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από το δέρμα και τους δακρυϊκούς αδένες, τρίχες, αντανακλαστικά βήχα και πταρμού, βλέννα που εκκρίνεται από τα επιθήλια του αναπνευστικού και πεπτικού συστήματος, όξινες εκκρίσεις στομάχου και μήτρας)

- *Φλεγμονή*, η οποία αποτελεί την εντοπισμένη απόκριση του σώματος στη μόλυνση ή τον τραυματισμό

  - *Μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης και φαγοκυττάρωσης*
  - *Συμπλήρωμα*

- *Ιντερφερόνες*, οι οποίες είναι μια οικογένεια κυτταροκινών που μη ειδικώς αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ιών μέσα στα κύτταρα του ξενιστή.

2.1.2 Ειδική ανοσολογική άμυνα [53,54]

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ειδική ανοσολογική άμυνα είναι αρκετά πολύπλοκοι. Η ειδική ανοσία «ωριμάζει» μετά την επαφή με το αντιγόνο και συνεπώς εξελίσσεται μετά τη γέννηση. Αναπτύσσεται βραδέως (διαφορά φάσης ημερών ή εβδομάδων) μετά το αρχικό ερέθισμα, με αποτέλεσμα μέχρι την εμφάνιση της, η φυσική ανοσία να κατέχει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό του αρχικού βλαπτικού ερεθίσματος. Συνήθως οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας προετοιμάζουν τις συνθήκες για την ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας όταν παραμένει το αίτιο που προκαλεί την ανοσολογική απόκριση.

Οι φορείς της ειδικής ανοσίας είναι τα Β- και τα Τ- λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν ειδικούς υποδοχείς για κάθε ξένο παράγοντα π.χ. βακτήριο, ιός, πρωτεΐνη, λιπίδιο και αντιδρούν ειδικά γι' αυτόν. Η ικανότητα των λεμφοκυττάρων να διακρίνουν το ένα αντιγόνο από το άλλο προσφέρει την ειδικότητα όσον αφορά στις ανοσολογικές αποκρίσεις στις οποίες συμμετέχουν. Επιπλέον, ο οργανισμός αναπτύσσει κύτταρα μνήμης τα οποία είναι σε θέση να ζουν πολλά χρόνια και να γνωρίζουν το ίδιο ερέθισμα οπότε εκπτύσσονται σε κλώνο (ομάδα πανομοιότυπων κυττάρων με τον πρόγονό τους) ενώ, κατά τη δεύτερη προσβολή δρουν πολύ γρήγορα.

Γενικά, μια τυπική ειδική ανοσολογική απόκριση μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια:

1. συνάντηση και αναγνώριση του αντιγόνου από τα λεμφοκύτταρα,
2. λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση, και
3. επίθεση η οποία εξαπολύεται από τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα.

Περιληπτικά, η φυσική ανοσία χαρακτηρίζεται από *μη ειδική αντιμετώπιση* και *αμεσότητα δράσης*, ενώ η ειδική ανοσία χαρακτηρίζεται από *ανοσολογική μνήμη* και από *βραδεία εμφάνιση ειδικής δράσης*.

Σχήμα 2.3: Γενική θεώρηση του ανοσοποιητικού συστήματος

2.2 Φλεγμονή

2.2.1 Γενικά [53-59]

Ο πρώτος, ο οποίος αναφέρθηκε στη φλεγμονή και περιέγραψε τα χαρακτηριστικά της ήταν ο Celsus (30π.χ.-38μ.Χ.). Αναφέρθηκε στα 4 βασικά χαρακτηριστικά της φλεγμονής που περιλαμβάνουν την τοπική ερυθρότητα, το οίδημα, την αύξηση της θερμοκρασίας και τον πόνο. Σε αυτά τα 4 χαρακτηριστικά, η απώλεια της λειτουργικότητας προστέθηκε στη συνέχεια από τον Galen (130-200μ.Χ.) και αργότερα από τον John Hunter (1728-1793μ.Χ.). Ο Hunter ήταν επίσης αυτός που πρότεινε ότι η φλεγμονή δεν αποτελεί από μόνη της ξεχωριστή ασθένεια, αλλά παρουσιάζεται ως απάντηση του οργανισμού σε κάποια βλάβη/ τραυματισμό. Παρατήρησε ότι η φλεγμονώδης αντίδραση είναι ίδια ανεξάρτητα από το είδος τραυματισμού και κύριος σκοπός της είναι η αποκατάσταση της κανονικής λειτουργίας των τραυματισμένων ιστών [55].

Φλεγμονή ορίζεται η εντοπισμένη απόκριση του σώματος σε μόλυνση ή τραυματισμό. Ειδικότερα, η φλεγμονή αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της απάντησης του οργανισμού στη λοίμωξη, τη χειρουργική επέμβαση και τον τραυματισμό και είναι μέρος της μη ειδικής ανοσίας του ανθρώπινου οργανισμού [56]. Πολλά είδη κυτταρικών βλαβών μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένων την υποξία, φυσικούς παράγοντες, όπως τραύμα και εγκαύματα, χημικές ουσίες, ναρκωτικά, λοιμώδεις παράγοντες, ανοσολογικές αντιδράσεις, γενετικές διαταραχές και διατροφικές ανισορροπίες (ελλείψεις και υπερβολές διαφόρων θρεπτικών συστατικών).

Ανεξαρτήτως της αιτίας, η φλεγμονή είναι σχετικώς στερεότυπη αφού ο μηχανισμός πυροδότησής της περιλαμβάνει κυρίως τον κυτταρικό ή τον ιστικό τραυματισμό [53]. Οι περισσότερες από τις φλεγμονώδεις απαντήσεις είναι κοινές και για τις περιπτώσεις που η φλεγμονή εκδηλώνεται ως απόκριση σε άλλους παράγοντες (π.χ. τραύμα, θερμοκρασία, κ.ά.). Επιπλέον, η φλεγμονή αποτελεί μια μορφή φυσικής ανοσίας που ονομάζεται και «απόκριση οξείας φάσης», ενώ αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο πολλών ειδικών ανοσολογικών μηχανισμών, όπου η φλεγμονή μεγεθύνεται και γίνεται περισσότερο αποτελεσματική [53,57].

Η ακούσια ενεργοποίηση της διαδικασίας της φλεγμονής ή η έλλειψη ενός κατάλληλου σήματος τερματισμού της μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καταστρέφοντας τους περιβάλλοντες ιστούς. Συνεπώς, η ιδανική φλεγμονώδης απόκριση είναι ταχεία και καταστροφική όταν χρειάζεται, αλλά επίσης ειδική και αυτοπεριοριζόμενη. Η σημασία αυτής της ισορροπίας αποδεικνύεται από τις παρατηρήσεις ότι σε ορισμένες χρόνιες λοιμώξεις ή φλεγμονώδεις διαταραχές, η φλεγμονώδης αντίδραση προκαλεί περισσότερη βλάβη στον ιστό του ξενιστή από ό, τι στο μικροοργανισμό. Μη φυσιολογική ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης θεωρείται ότι ευθύνεται για τον τραυματισμό ιστών ο οποίος συνδέεται με διάφορες παθολογικές διαταραχές, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της αθηροσκλήρωσης [53,57].

Οι λειτουργίες της φλεγμονής είναι η καταστροφή ή η απενεργοποίηση των ξένων εισβολέων-επιβλαβών παραγόντων (απόκριση του οργανισμού σε μόλυνση) και στη συνέχεια η εγκατάσταση επιδιόρθωσης της ιστικής βλάβης (απόκριση του οργανισμού σε τραυματισμό), μέσω μιας σειράς γεγονότων που θεραπεύουν και ανασυγκροτούν τον κατεστραμμένο ιστό [53,58]. Τα κύτταρα με ρόλο κλειδί στη διαδικασία της φλεγμονής είναι τα κύτταρα που λειτουργούν σαν φαγοκύτταρα, τα πιο σημαντικά των οποίων είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα μακροφαγομιμητικά κύτταρα [53,54].

Οι κοινές εκδηλώσεις του ιστικού τραύματος και της φλεγμονής είναι η τοπική ερυθρότητα, το οίδημα, η αύξηση της θερμοκρασίας και το άλγος [53,54,59]. Οι αγγειακές και κυτταρικές αποκρίσεις της φλεγμονής γίνονται μέσω χημικών παραγόντων του πλάσματος ή από κύτταρα που ενεργοποιούνται από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Αυτοί οι μεσολαβητές ενεργούν μεμονωμένα, σε συνδυασμό, ή σε σειρά, ενισχύοντας τη φλεγμονώδη απόκριση και την εξέλιξή της.

Οι χυμικοί παράγοντες (μεσολαβητές) του πλάσματος περιλαμβάνουν τα συστατικά τεσσάρων ενζυμικών καταρρακτών: το σύστημα του συμπληρώματος, το σύστημα της κινίνης, το σύστημα πήξης και το ινωδολυτικό σύστημα. Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί σημείο σύνδεσης μεταξύ των άλλων τριών συστημάτων και της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού στη λοίμωξη ή τον τραυματισμό. Οι κινίνες αποτελούν φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως είναι η βραδυκινίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόκληση πόνου, αυξάνοντας την αγγειακή διαπερατότητα και προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Ο ρόλος του συστήματος της πήξης είναι η πρόληψη της αιμορραγίας καθώς και της εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών στα κατεστραμμένα αγγεία. Ο ρόλος του ινωδολυτικού συστήματος είναι να προλαμβάνει τους θρόμβους του αίματος, δηλαδή ανταγωνίζεται τη δράση του συστήματος πήξης. Τα προϊόντα από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορούν να αυξήσουν την αγγειακή διαπερατότητα και να διεγείρουν κύτταρα ιστών ώστε να παράγουν ισταμίνη με αποτέλεσμα αγγειοδιαστολή και προώθηση χημειοταξίας λευκοκυττάρων προς τον τόπο της φλεγμονής. [59]

2.2.2 Οξεία και χρόνια φλεγμονή [53,60]

2.2.2.1 Οξεία φλεγμονή

Η άμεση και πρωταρχική απόκριση του οργανισμού σε έναν επιβλαβή παράγοντα χαρακτηρίζεται ως *οξεία φλεγμονή*. Είναι σχετικά σύντομης διάρκειας, που διαρκεί για μερικά λεπτά της ώρας, αρκετές ώρες, ή μερικές ημέρες, και τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι η αγγειοδιαστολή, η έκκριση υγρών και πρωτεϊνών του πλάσματος (οίδημα) και η μετανάστευση λευκοκυττάρων, κυρίως ουδετερόφιλων, από την κυκλοφορία προς συσσώρευσή τους στην περιοχή της βλάβης. Τα κύρια χαρακτηριστικά της εκδηλώνονται μέσω της μη ειδικής απόκρισης, ενώ ο βαθμός συμμετοχής της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης ποικίλει.

Η οξεία φλεγμονή έχει τρία σημαντικά συστατικά:

- την αγγειοδιαστολή που οδηγεί στην αυξημένη τοπική ροή του αίματος,
- τις δομικές αλλαγές των μικροαγγείων που επιτρέπουν στις πρωτεΐνες του πλάσματος και τα λευκοκύτταρα να φύγουν από την κυκλοφορία του αίματος, και
- τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων από τη μικροκυκλοφορία προς συσσώρευσή τους στην περιοχή του τραυματισμού. Τα λευκοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν τους επιβλαβείς παράγοντες (αντιγόνα), αποικοδομούν το νεκρωτικό ιστό και τα ξένα αντιγόνα. Τα λευκοκύτταρα μπορούν επίσης να παρατείνουν τη φλεγμονή και να προκαλέσουν καταστροφή σε κάποιο ιστό με την απελευθέρωση ενζύμων, χημικών μεσολαβητών, και ελεύθερων ριζών οξυγόνου.

2.2.2.2 Χρόνια φλεγμονή

Εάν ο φλεγμονώδης παράγοντας εμμένει, είναι πιθανό η κατάσταση να προχωρήσει σε *χρόνια φλεγμονή*, η οποία συνεχίζεται για μήνες ή ακόμα και για πολλά χρόνια και περιλαμβάνει καταστροφή ιστού, πολλαπλασιασμό κυττάρων και παραγωγή συνδετικού ιστού. Η χρόνια φλεγμονή προκαλεί μερικές από τις πιο κοινές ασθένειες, όπως είναι και η αθηροσκλήρωση.

Η χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζεται από:

- μετανάστευση μονοπύρηνων κυττάρων (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, και άλλα κύτταρα πλάσματος)
- καταστροφή ιστού, και
- προσπάθειες επιδιόρθωσης της βλάβης με αντικατάσταση του συνδετικού ιστού, αγγειογένεση και ίνωση.

2.2.3 Φορείς φλεγμονώδους απόκρισης [53-56]

Με τον όρο φορείς φλεγμονώδους απόκρισης αναφερόμαστε στα κύτταρα που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής καθώς και χυμικούς παράγοντες (ουσίες που βρίσκονται στους «χυμούς» του οργανισμού) οι οποίοι αποτελούν προϊόντα αυτών των κυττάρων [54].

Τα γεγονότα της φλεγμονής, όπως η αγγειοδιαστολή, επάγονται και ρυθμίζονται από ένα μεγάλο αριθμό χυμικών μεσολαβητών (μερικοί από αυτούς αναφέρονται περιληπτικά στον πίνακα 2.1) και κάθε μεσολαβητής μπορεί να επάγει περισσότερα του ενός γεγονότα. Με βάση την προέλευσή τους, οι μεσολαβητές είναι δυο γενικότερων κατηγοριών: 1) πεπτίδια (π.χ. κινίνες) που παράγονται στο σημείο της φλεγμονής μέσω ενζυμικών δράσεων σε πρωτεΐνες του πλάσματος και 2) ουσίες που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο υγρό από κύτταρα που είτε υπάρχουν ήδη στη μολυσμένη περιοχή (π.χ. μαστοκύτταρα) είτε έρχονται σ' αυτήν την περιοχή κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (π.χ. ουδετερόφιλα) [53].

Πίνακας 2.1: Μερικοί σημαντικοί τοπικοί μεσολαβητές της φλεγμονής

Μεσολαβητής	**Προέλευση**
Κινίνες	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος.
Συμπλήρωμα	Παράγεται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος.
Παράγοντες πήξης	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος.
Ισταμίνη	Εκκρίνεται από τα μαστοκύτταρα.
Εικοσανοειδή	Εκκρίνονται από πολλούς τύπους κυττάρων.
Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)	Εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων.
Κυτταροκίνες (TNF, IL-1, IFN-a, IL-6, IL-8) Χημειοκίνες	Εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και αρκετούς τύπους κυττάρων που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σ' αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες.
Λυσοσωμικά ένζυμα, οξείδιο του αζώτου και άλλες ουσίες που παράγονται από το οξυγόνο	Εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα.

Όταν τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούνται ή υπόκεινται σε βλάβες, παράγονται ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), τα εικοσανοειδή, η ισταμίνη, και κυτταροκίνες [61].

2.2.3.1 Μόρια προσκόλλησης

Η μετανάστευση των κυττάρων του αίματος από τα αγγεία προς τον ιστό κατά τη φλεγμονή αποτελεί ένα κεντρικό στάδιο. Η σύνδεση των κυττάρων του αίματος στο τοίχωμα των αγγείων ελέγχεται από έναν σύνθετο καταρράκτη μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του αίματος και του ενδοθηλίου, που γίνεται μέσω των μορίων προσκόλλησης των κυττάρων και παράγοντες που ενεργοποιούν τα κύτταρα [62]. Τουλάχιστον τρεις οικογένειες των μορίων προσκόλλησης συμμετέχουν στην προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων του αίματος. Αυτές οι οικογένειες είναι οι σελεκτίνες, οι ιντεγκρίνες και ορισμένα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών.

2.2.3.2 Καταρράκτης προσκόλλησης

Ο καταρράκτης της προσκόλλησης είναι μια συνέπεια της ελευθέρωσης διαλυτών μεσολαβητών που ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε πρώτη φάση, μερικά από τα λευκοκύτταρα απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος και προσκολλώνται με τρόπο χαλαρό και αντιστρεπτό στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από κυλιόμενη κίνηση. Η οικογένεια των σελεκτινών είναι αυτή που μεσολαβεί κατά κύριο λόγο για αυτήν την αρχική αλληλεπίδραση. Τα λευκοκύτταρα που εκτελούν την κυλιόμενη κίνηση έρχονται σε άμεση επαφή με το ενδοθήλιο, το οποίο τα εκθέτει σε ποικίλα σήματα ικανά να προκαλέσουν το επόμενο βήμα ενεργοποιώντας τις ιντεγκρίνες των λευκοκυττάρων [63]. Τα λευκοκύτταρα που προσδένονται μέσω των σελεκτινών ενεργοποιούνται από μεσολαβητές που παράγονται από το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο όπως ο PAF [64,65] και η IL-8 [66].

Μετά από την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών τους, τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται ισχυρά στην επιφάνεια του ενδοθηλίου και ξεκινούν να κινούνται αργά μέσω των διακυτταρικών συνδέσμων των ενδοθηλιακών κυττάρων προς τον υποενδοθηλιακό χώρο. Σε αυτήν την διαδικασία, τα λευκοκύτταρα δημιουργούν ψευδοπόδια μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και κινούνται με αμοιβαδοειδή κίνηση. Αυτό το στάδιο αναφέρεται ως διαενδοθηλιακή μετανάστευση και το PECAM (γνωστό και ως CD31), που εκφράζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, εμπλέκεται σε αυτό το στάδιο [67,68]. Αφού περάσουν από τους κυτταρικούς συνδέσμους των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα λευκοκύτταρα διαπερνούν τη βασική μεμβράνη και μεταναστεύουν στους ιστούς όπου εντοπίζεται η φλεγμονή.

Μερικοί παράγοντες, όπως ο PAF, η ισταμίνη, και η IL-8, μπορούν γρήγορα (μέσα σε 2-3 min) να αυξήσουν το επίπεδο της ενεργοποίησης ή/και της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης στα λευκοκύτταρα (όπως για παράδειγμα του CD11b/CD18) ή/και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (όπως για παράδειγμα της P-σελεκτίνης). Άλλοι παράγοντες όπως είναι οι κυτταροκίνες, η IL-1 και ο TNF-α δρουν με πιο αργό ρυθμό προωθώντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων σε

επίπεδο μεταγραφής, την έκφραση των μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που ενεργούν για να επεκτείνουν και να αυξήσουν περαιτέρω τις αποκρίσεις των λευκοκυττάρων στην κυλιόμενη κίνηση (όπως για παράδειγμα η Ε-σελεκτίνη) όπως και τις αποκρίσεις των λευκοκυττάρων στην προσκόλληση και τη μετανάστευση (όπως για παράδειγμα το ICAM-1) [69].

Συγχρόνως με την παροδική έκφραση των μορίων προσκόλλησης, των κυτταροκινών και των ενεργοποιητών των κυττάρων, ενεργοποιούνται μια σειρά αντιφλεγμονωδών συστημάτων που λειτουργούν στο μικροπεριβάλλον λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου. Μερικές ορμόνες και κυτταροκίνες, όπως γλυκοκορτικοειδή, IL-10 και IL-4, είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων με έναν ενδοκρινή τρόπο ενεργώντας δηλαδή σε ένα στόχο απομακρυσμένο από το κύτταρο παραγωγής τους [70]. Μεσολαβητές με παρακρινή ή αυτοκρινή δράση που ενεργούν στην μεσεπιφάνεια μεταξύ προσκολλημένων λευκοκυττάρων και ενδοθηλίου είναι η προστακυκλίνη (PGI2), η αδενοσίνη και το νιτρικό οξείδιο (NO) [69,71,72].

2.2.3.3 Κυτταροκίνες [53,59,73]

Οι κυτταροκίνες αποτελούν πρωτεϊνικά μηνύματα που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη του ξενιστή, δρώντας και στους ειδικούς και στους μη ειδικούς μηχανισμούς. Αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της απάντησης του οργανισμού στη μόλυνση ή τον τραυματισμό. Χαρακτηριστικά των κυτταροκινών είναι το ευρύ φάσμα δράσεων και η αποτελεσματικότητά τους σε πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Οι περισσότερες δρουν μόνο τοπικά σε γειτονικούς ιστούς (παρακρινής δράση). Μερικές κυτταροκίνες, ωστόσο, μπορούν να δράσουν σε απομακρυσμένους στόχους, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Στις κυτταροκίνες συμπεριλαμβάνονται οι ιντερλευκίνες (ILs), οι ιντερφερόνες (IFNs), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας (TGF) και οι παράγοντες πολλαπλασιασμού αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CSFs). Υπάρχει μια ομάδα τριών κυτταροκινών, η IL-1, η IL-6 και TNF-α, οι οποίες όχι μόνο μεσολαβούν και διαφοροποιούν τη δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά προκαλούν και εκτεταμένες μεταβολικές αλλαγές. Αυτά τα μόρια συχνά αναφέρονται ως προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μιας και αποτελούν μεσολαβητές-κλειδιά της φλεγμονής. Διάφορα κύτταρα παράγουν IL-1, IL-6 και TNF-α. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα φαγοκύτταρα, τα Β- και Τ- λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα ιστών, οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Κατά παράδοξο τρόπο, αν και οι κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της λοίμωξης και/ή του τραυματισμού μπορούν επίσης να έχουν και επιβλαβείς έως και θανατηφόρες συνέπειες για τον ξενιστή. Οι πιο δραστικοί φλεγμονώδεις παράγοντες ενισχύουν την παραγωγή κυτταροκινών, αυξάνοντας έτσι τα περιθώρια για πρόκληση καταστροφών στον ξενιστή. Κάποιο ρόλο παίζουν πιθανόν και γενετικά χαρακτηριστικά, προδιαθέτοντας έτσι άτομα για υψηλή παραγωγή κυτταροκινών. Τα οξειδωτικά μόρια διεγείρουν την παραγωγή κυτταροκινών, μέσω της ενεργοποίησης πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως NF-κB και NF-IL-6. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τη μεταγραφή του mRNA για την παραγωγή IL-1/TNF-α και IL-6 αντίστοιχα.

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς φλεγμονής παίζει ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, ο οποίος ενεργοποιείται από πλήθος εξωκυτταρικών ερεθισμάτων και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση όπως κυτταροκίνες, ένζυμα μεταβολισμού εικοσανοειδών και η επαγόμενη μορφή της συνθετάσης του NO (iNOS). Δυσλειτουργία αυτού του συστήματος μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής.

2.2.3.4 Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) [74-77]

Όταν τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούνται ή υπόκεινται σε βλάβες, παράγονται ο PAF, τα εικοσανοειδή, η ισταμίνη και κυτταροκίνες. Ο PAF είναι ένα συνδετικό στοιχείο που εμπλέκεται στις φυσιολογικές καθώς επίσης και παθολογικές φλεγμονώδεις διαδικασίες. Ενεργεί με έναν τρόπο μεμβρανοσύνδετο, παρακρινικό, ενδοκρινικό, αυτοκρινικό και διακρινικό. Η συμμετοχή του PAF στη φλεγμονή προέρχεται από την ικανότητά του να διεγείρει τα φλεγμονώδη κύτταρα και να μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος.

Η έκκριση του PAF από φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα και τα φαγοκύτταρα, αποτελεί ένα μηχανισμό για τη διακυττάρια σήμανση και την ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης. Ο PAF που παράγεται από αυτά τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να είναι μεμβρανοσύνδετος και μπορεί να ενεργοποιεί άλλα κύτταρα σε ένα ζωντανό οργανισμό, ενισχύοντας κατ' αυτό τον τρόπο την αρχική σήμανση που οδηγεί στην τοπική φλεγμονώδη απάντηση.

Ο PAF προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, απελευθέρωση ισταμίνης και αλλαγή της μορφής τους παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται με άλλους ενεργοποιητές αιμοπεταλίων. Ο PAF ασκεί επίσης παρόμοιες δράσεις σε φαγοκύτταρα και άλλα κυκλοφορούντα φλεγμονώδη κύτταρα μέσω του υποδοχέα του. Επιπλέον, αυτή η διέγερση αυξάνει τις CD11/CD18 (α β2- ιντεγκρίνες) και οδηγεί σε ισχυρή προσκόλληση των φαγοκυττάρων επάνω σε μια ευρεία ποικιλία επιφανειών, όπως τις επιφάνειες των ενδοθηλιακών κυττάρων και συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF (PAFR) εμποδίζουν τις ανωτέρω ενέργειες σχετικά με τα αιμοπετάλια και τα

φαγοκύτταρα. Παρόμοια αποτελέσματα του PAF παρατηρούνται σε άλλα φλεγμονώδη κύτταρα αν και οι συγκεκριμένες απαντήσεις ποικίλλουν μεταξύ κυτταρικών τύπων.

Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν PAF και τον εκθέτουν στην επιφάνειά τους. Το αποτέλεσμα αυτής της κίνησης είναι η σταθερή προσκόλληση των φαγοκυττάρων σε αυτά. Η σύνθεση του PAF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γρήγορη και οδηγεί σε έκθεσή τους σε συγκεκριμένους αγωνιστές όπως τη θρομβίνη, την ισταμίνη, το λευκοτριένιο D4, τη βραδυκινίνη, και την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP).

Η αυξανόμενη προσκόλληση των φαγοκυττάρων και των μονοκυττάρων επάνω στο ενδοθήλιο εμφανίζεται σαν απάντηση στη διακύμανση της έκφρασης της P-σελεκτίνης στην κυτταρική του μεμβράνη. Η P-σελεκτίνη βρίσκεται αποθηκευμένη σε εξειδικευμένους ενδοκυτταρικούς κόκκους των ενδοθηλιακών κυττάρων, γνωστά ως σωματίδια Weibel- Palade, και μετά την ενεργοποίησή του μεταφέρεται στην κυτταρική τους μεμβράνη. Επιπλέον, η μεμβρανοσύνδετη διέγερση του PAF αναγκάζει περισσότερα συγκροτήματα ιντεγκρινών CD11/CD18 να εμφανιστούν στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων με τη μη συγκολλητική μορφή τους έως ότου η διέγερσή τους να συμβεί από τη συνεργιστική δράση του PAF και της P-σελεκτίνη. Κατ' αυτό τον τρόπο η αρχική χαλαρή σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη γλυκοπρωτεΐνη στόχο στο φαγοκύτταρο μέσω των P-σελεκτινών ενισχύεται από τη σύνδεση CD11/CD18 των φαγοκυττάρων στο ligand της πάνω στο ενδοθηλιακό κύτταρο.

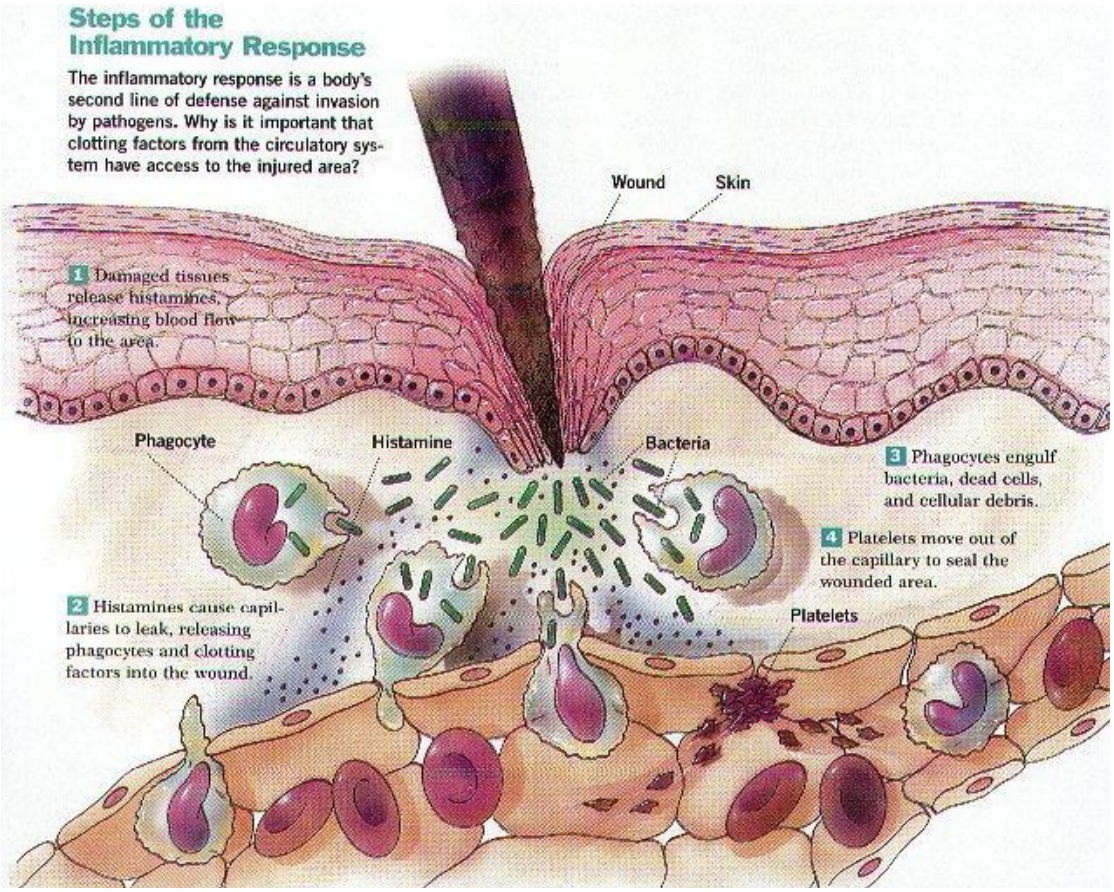
Η ανωτέρω ενεργοποίηση και η σταθερή προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εμποδίζονται από τους ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF ή από την έκθεση των διεγερμένων ενδοθηλιακών κυττάρων στην PAF AH πριν από την έκθεση τους στα φαγοκύτταρα. Αυτή η αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου είναι κρίσιμη στη διαδικασία φλεγμονής και ο ρόλος του PAF υπό αυτές τις καταστάσεις φαίνεται απαραίτητος.

2.2.4 Βασικοί μηχανισμοί φλεγμονής

Η φλεγμονή, όπως αναφέρθηκε, είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αλληλουχία των γεγονότων που εμφανίζονται σε απάντηση στη λοίμωξη ή στην αλλοίωση των ιστών. Η φλεγμονώδης αντίδραση στη λοίμωξη παραδοσιακά μπορεί να ταξινομηθεί σε 4 διακριτές φάσεις [57]:

1. την αναγνώριση της λοίμωξης,
2. την πρόσληψη των κυττάρων στο σημείο της λοίμωξης,
3. την εξάλειψη των μικροβίων, και τέλος
4. τη λύση της φλεγμονής και την επιστροφή στην ομοιόσταση.

Οι περισσότερες από τις φλεγμονώδεις απαντήσεις είναι κοινές, είτε η φλεγμονή εκδηλώνεται ως απόκριση στη μόλυνση από μικροοργανισμούς, είτε σε άλλους παράγοντες, π.χ. κρύο, θερμοκρασία και τραύμα. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η διαδικασία της φλεγμονής είναι επίσης ένα σημαντικό χαρακτηριστικό πολλών ειδικών ανοσολογικών μηχανισμών κατά τους οποίους η φλεγμονή μεγεθύνεται και γίνεται πιο αποτελεσματική [53].



Σχήμα 2.4: Η φλεγμονώδης απόκριση – Βασικά βήματα [78]

Η ακολουθία γεγονότων που συμβαίνουν τοπικά σε μια τυπική μη ειδική φλεγμονώδη απάντηση είναι η εξής:

1. *Αρχική είσοδος των βακτηρίων στους ιστούς ή τραυματισμός του ιστού και αναγνώριση από τον οργανισμό της ύπαρξης λοίμωξης*

Πολλοί τύποι κυττάρων οι οποίοι βρίσκονται φυσιολογικά στην περιοχή της μόλυνσης διαθέτουν στη μεμβράνη τους ειδικούς υποδοχείς αναγνώρισης δομών (PRRs), που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες χημικές δομές των παθογόνων (PAMPs) και να απαντούν σε αυτές με παραγωγή και έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών που προάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Τέτοιοι είναι οι υποδοχείς (CD14, CR13) που συνδέουν τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) Gram αρνητικών (-) βακτηρίων, οι υποδοχείς μανόζης και γλυκάνης των Gram θετικών (+) βακτηρίων κ.ά. [57]. Το τελικό αποτέλεσμα της αναγνώρισης του παθογόνου είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων και ιστικών κυττάρων και η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μεσολαβητών. Τα μόρια αυτά διεγείρουν την έναρξη μιας αλληλουχίας γεγονότων, τα οποία επιφέρουν αλλαγές στο περιβάλλον γύρω από τον ιστό καθώς επίσης και στα αγγεία της μικροκυκλοφορίας της φλεγμαίνουσας περιοχής [57,78].

Σε περίπτωση ιστικού ή κυτταρικού τραυματισμού, παρατηρείται απελευθέρωση του παράγοντα Hageman (XIIa-XII). Ο παράγοντας XII εκκινεί την όλη διαδικασία, προκαλώντας την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την παραγωγή βραδυκινίνης σε τοπικό επίπεδο. Μικροοργανισμοί και ενδοτοξίνες μπορεί να προκαλέσουν παρόμοια πορεία. Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει την παρουσία φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως τα μόρια του συμπληρώματος C3a και C5a, η βραδυκινίνη και η ισταμίνη. Επιπλέον, τα κατεστραμμένα/ τραυματισμένα κύτταρα απελευθερώνουν προϊόντα που προέρχονται από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, όπως οι προσταγλαδίνες και τα λευκοτριένια, όπου και τα δύο είναι εικοσανοειδή και έχουν σημαντικές διαμεσολαβητικές λειτουργίες στην οξεία φλεγμονή [79].

2. *Αγγειοδιαστολή στη μικροκυκλοφορία της φλεγμαίνουσας περιοχής και αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου*

Οι κυτταροκίνες και οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές προκαλούν τοπικά αλλαγές στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, οι οποίες με τη σειρά τους προωθούν τη μετατροπή των μολυσμένων ιστών σε μια φλεγμονώδη περιοχή. Ειδικότερα, ο TNF-α, η IL-6 και λιπιδικοί μεσολαβητές προκαλούν μια σειρά από μορφολογικές και μοριακές αλλαγές που συνολικά οδηγούν σε αυξημένη μετανάστευση των λευκοκυττάρων και της ροής πλάσματος στην περιοχή της μόλυνσης [57]. Το καθαρό αποτέλεσμα της δράσης αυτών των μεσολαβητών είναι η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, η οποία προκαλεί συσσώρευση των πρωτεϊνών οξείας φάσης και ανοσοσυμπλεγμάτων, καθώς και προώθηση της

κυτταρικής φάσης της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης μέσω διαπίδυσης και χημειοταξίας των λευκοκυττάρων [79].

Πιο συγκεκριμένα, μια ποικιλία προφλεγμονωδών μεσολαβητών προκαλεί αγγειοδιαστολή στα περισσότερα από τα αγγεία της μικροκυκλοφορίας σε μια μολυσμένη περιοχή και/ή σε μία περιοχή που έχει υποστεί βλάβη. Οι μεσολαβητές προκαλούν επίσης αύξηση της διαπερατότητας των πρωτεϊνών στα τοπικά τριχοειδή και φλεβίδια επιφέροντας τη συστολή-σμίκρυνση των ενδοθηλιακών τους κυττάρων, προκαλώντας κατά αυτόν τον τρόπο ανοίγματα μεταξύ αυτών, δια των οποίων μπορούν να μετακινηθούν οι πρωτεΐνες. Με την αυξημένη αιματική ροή (η οποία ευθύνεται για την ερυθρότητα και την αύξηση της θερμοκρασίας) επιτυγχάνεται αυξημένη μεταφορά πρωτεϊνών και λευκοκυττάρων και με την αυξημένη διαπερατότητα επιτυγχάνεται η μεταφορά τους από το πλάσμα στο μεσοκυττάριο υγρό, όπου έτσι συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής. Παράλληλα αυτό έχει ως αποτέλεσμα διήθηση του πλάσματος προς το μεσοκυττάριο υγρό και σχηματισμό οιδήματος [53].

3. *Χημειοταξία: έξοδος λευκοκυττάρων από τα φλεβίδια προς το μεσοκυττάριο υγρό της φλεγμαίνουσας περιοχής*

Με την έναρξη της φλεγμονής, τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα αρχίζουν να κινούνται έξω από το αίμα, διασχίζουν το ενδοθήλιο των φλεβιδίων και εισέρχονται στη φλεγμαίνουσα περιοχή. Αυτή η διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια είναι γνωστή ως χημειοταξία. Περιλαμβάνει μία ποικιλία πρωτεϊνών και υδατανθράκων, τα μόρια προσκόλλησης τόσο στο ενδοθηλιακό κύτταρο όσο και στο ουδετερόφιλο και ρυθμίζεται από μηνυματοφόρα μόρια που απελευθερώνονται από κύτταρα στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη, περιλαμβανομένων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτά τα μόρια καλούνται χημειοελκτικά ή χημειοταξίνες ή χημειοτακτικοί παράγοντες. Ορισμένες κυτταροκίνες έχουν δράση χημειοτακτικών παραγόντων και ονομάζονται χημειοκίνες [53].

Η μετακίνηση των κυττάρων στη φλεγμαίνουσα ή μολυσμένη περιοχή, όπως αναφέρθηκε, επάγεται από μόρια προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως είναι το ICAM-1, το VCAM-1 και οι E-, P-, L- σελεκτίνες. Τα μόρια αυτά βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και επιτρέπουν στα λευκοκύτταρα να δεσμεύονται και να μεταφέρονται στη συνέχεια στη φλεγμαίνουσα περιοχή [59]. Στο πρώτο στάδιο, το ουδετερόφιλο προσδένεται χαλαρά στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ειδικής τάξης μορίων προσκόλλησης, γεγονός που του επιτρέπει να «κυλίσει» κατά μήκος της επιφάνειας του αγγείου και να εκτεθεί σε χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνονται στην περιοχή της φλεγμονής. Αυτοί οι παράγοντες δρουν στο ουδετερόφιλο και επάγουν την ταχεία εμφάνιση μιας άλλης τάξης μορίων προσκόλλησης στη μεμβράνη του, μόρια που συνδέονται στενά με αντίστοιχα μόρια στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στο επόμενο στάδιο, μέσω άλλων μορίων προσκόλλησης, μια στενή προβολή του κυτταροπλάσματος του ουδετερόφιλου εισέρχεται στο διάστημα μεταξύ δύο ενδοθηλιακών κυττάρων και ολόκληρο το ουδετερόφιλο

συμπιέζεται μέσω του ενδοθηλιακού τοιχώματος προς το μεσοκυττάριο υγρό. Με αυτόν τον τρόπο, μεγάλοι πληθυσμοί ουδετερόφιλων μεταναστεύουν προς τη φλεγμαίνουσα περιοχή και κινούνται προς τα μικρόβια [53].

Τα πρώτα κύτταρα που εμφανίζονται στη φλεγμαίνουσα περιοχή είναι τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), η άφιξη των οποίων στην περιοχή της μόλυνσης πραγματοποιείται μέσα σε λίγες ώρες. Η κίνηση των λευκοκυττάρων δεν περιορίζεται μόνο σε αυτά τα μόρια, αλλά ακολουθείται από μια μεταγενέστερη εισροή μονοκυττάρων ή/και μακροφάγων και λεμφοκυττάρων. Τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν κατά μήκος του ενδοθηλίου και ωριμάζουν εντός του ιστού σε μακροφάγα (πρώιμη φάση φλεγμονής) [53,59,80].

4. *Καταστροφή – εξάλειψη μικροβίων στον ιστό, είτε μέσω φαγοκυττάρωσης, είτε μέσω μηχανισμών που δεν απαιτούν προηγούμενη φαγοκυττάρωση*

Τα κοκκιοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, που εισέρχονται στην περιοχή της φλεγμονής, συμμετέχουν στη θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών, στην εξάλειψη κυτταρικών και ιστικών υπολειμμάτων και στην ιστική επιδιόρθωση. Τα βοηθητικά Τ- λεμφοκύτταρα ενεργούν για τη ρύθμιση της δραστικότητας των μονοκυττάρων ή/και μακροφάγων, των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κύτταρα) και των Β- λεμφοκυττάρων. Άλλα λεμφοκύτταρα βοηθούν στην εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. μέσω δραστικότητας κυτταροτοξικών Τ- λεμφοκυττάρων και της παραγωγής αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα) [59].

α) Εξολόθρευση από φαγοκύτταρα

Τα κύτταρα τα οποία μπορούν να δράσουν ως φαγοκύτταρα είναι τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Όπως αναφέρθηκε, πρώτα φτάνουν και δρουν στη φλεγμαίνουσα περιοχή τα ουδετερόφιλα, τα οποία μέσω αποτελεσματικών μηχανισμών μπορούν να εξοντώσουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και τον ιστό του ξενιστή [57,80]. Κύρια λειτουργία των ουδετερόφιλων είναι η φαγοκυττάρωση και θανάτωση των μικροβίων. Αυτή η φαγοκυτταρική διαδικασία αρχίζει με δέσμευση του κυττάρου με το κύτταρο-στόχο, μέσω ενός μη ειδικού μηχανισμού, που περιλαμβάνει αλληλεπίδραση υποδοχέων φαγοκυττάρων με λιπίδια ή υδατάνθρακες στα κυτταρικά τοιχώματα των μικροοργανισμών. Η σύνθεση των κυττάρων με τους μικροοργανισμούς μπορεί να βελτιωθεί εάν τα κύτταρα είναι επικαλυμμένα με οψωνίνες, ουσίες που εκκρίνονται από το σώμα και μπορούν να ενισχύσουν τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα φέρουν υποδοχείς για το C3 μόριο πρωτεΐνης του συμπληρώματος και το Fc τμήμα της ανοσοσφαιρίνης – αντισώματος, τα οποία δρουν σαν οψωνίνες. [53,79] Αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων, που σχετίζονται με τους υποδοχείς αυτούς σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα, προκαλούν την απελευθέρωση προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, τα οποία με τη σειρά τους συμβάλλουν στην ενίσχυση και παράταση της φλεγμονώδους φάσης [79].

Τα ουδετερόφιλα διαθέτουν κοκκία (λυσοσώματα) που περιέχουν πρωτεάσες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν φαγοκυτταρικό υλικό. Επιπλέον έχουν τη δυνατότητα να παράγουν τοξικά προϊόντα οξυγόνου (H_2O_2) και αζώτου (NO), που μετουσιώνουν πρωτεΐνες, διαταράσσουν τα λιπίδια και καταστρέφουν το DNA του μικροοργανισμού [53,81]. Το φαγοκύτταρο εγκολπώνει το μικροοργανισμό και το εσωτερικό κυστίδιο που περικλείει το μικροοργανισμό λέγεται φαγόσωμα. Η μεμβράνη του φαγοσώματος συντήκεται με τα λυσοσώματα και το καινούριο κυστίδιο λέγεται φαγολυσόσωμα. Εκεί τα μόρια του μικροοργανισμού διασπώνται από τα λυσοσωμικά ένζυμα [53].

Τα προϊόντα που οδηγούν σε ενδοκυτταρική θανάτωση των μικροοργανισμών, οδηγούν επίσης στο θάνατο των ουδετερόφιλων και στην απελευθέρωση τοξικών αποβλήτων [79]. Η εκκαθάριση των ουδετερόφιλων που έχουν υποστεί απόπτωση γίνεται από τα μακροφάγα τα οποία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εισέρχονται στην περιοχή της φλεγμονής μετά τα ουδετερόφιλα. Τα μακροφάγα επίσης συμβάλλουν στη θανάτωση των μικροοργανισμών με φαγοκυττάρωση, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που περιγράφηκε για τα ουδετερόφιλα [57].

β) Εξολόθρευση με χρήση μηχανισμών που δεν απαιτούν προηγούμενη φαγοκυττάρωση [53,54]

Τα φαγοκύτταρα εκτός από ενδοκυττάρια καταστροφή των μικροοργανισμών, απελευθερώνουν αντιμικροβιακές ουσίες στο εξωκυττάριο υγρό που θανατώνουν τους μικροοργανισμούς χωρίς να απαιτείται φαγοκυττάρωση. Οι ουσίες αυτές που απελευθερώνονται από τα φαγοκύτταρα μπορούν να βλάψουν και τους φυσιολογικούς ιστούς.

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί μία οικογένεια πρωτεϊνών του πλάσματος, όπου παρέχει ένα ακόμα μέσο για την εξωκυττάρια εξολόθρευση των μικροοργανισμών, πρόκειται δηλαδή για εξολόθρευση χωρίς να προηγηθεί φαγοκυττάρωση. Το σύστημα αυτό αποτελείται από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους υπό μορφή καταρράκτη (η ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεϊνών ενεργοποιεί μια δεύτερη πρωτεΐνη, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί μια τρίτη κ.ο.κ.).

Στη μη ειδική ανοσολογική απάντηση, ο μηχανισμός ενεργοποίησης του συμπληρώματος λέγεται εναλλακτική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Η οδός αυτή δεν εξαρτάται από αντισώματα και παρακάμπτει την πρώτη πρωτεΐνη τη C1. Ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση υδατανθράκων του μικροοργανισμού και των ανενεργών μορίων του συμπληρώματος πέρα του C1. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν στο σχηματισμό του C3b, το οποίο είναι μία οψωνίνη (ενισχύει τη φαγοκυττάρωση), και στην ενεργοποίηση των εφεξής μορίων του συμπληρώματος σε αυτήν την οδό. Πέντε από τις ενεργές πρωτεΐνες που προκύπτουν σχηματίζουν το μεμβρανοεπιθετικό σύμπλεγμα (MAC), το οποίο τοποθετείται στη μεμβράνη του μικροοργανισμού και σχηματίζει πόρους μέσα από τους οποίους διαρρέουν νερό και

ηλεκτρολύτες, διαταράσσοντας το ενδοκυτταρικό ιοντικό περιβάλλον, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο το θάνατο του μικροοργανισμού. Μερικά από τα ενεργά μόρια του συμπληρώματος μπορούν και έμμεσα να εξολοθρεύσουν ένα μικροοργανισμό με το να προκαλούν αγγειοδιαστολή, αυξημένη διαπερατότητα και χημειοταξία. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι δεν μπορούν όλοι οι μικροοργανισμοί να ενεργοποιήσουν την εναλλακτική οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

5. *Λύση της φλεγμονής και ιστική επιδιόρθωση*

Αποτελεί την τελική φάση της φλεγμονής. Στη φάση αυτή γίνεται (όπου επιτρέπεται) πολλαπλασιασμός των ειδικών για κάθε ιστό κυττάρων ώστε να επουλωθεί η πληγή. Χαρακτηριστικό είναι ο πολλαπλασιασμός ινοβλαστών που εγκαθίστανται στην περιοχή, οι οποίοι διαιρούνται ταχέως και αρχίζουν να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου. Τα κύτταρα των αγγείων πολλαπλασιάζονται με τη διεργασία της αγγειογένεσης. Οι διεργασίες αυτές ενεργοποιούνται μέσω χυμικών μεσολαβητών και ειδικότερα μέσω μιας ομάδας αυξητικών παραγόντων που παράγονται τοπικά [53].

Η κλινική αυτή διαδικασία χαρακτηρίζεται από αλλαγές μιας σειράς εργαστηριακών παραμέτρων, όπως: η αύξηση της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η αύξηση της CRP, η αύξηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος, η αύξηση της α2-μακροσφαιρίνης και του ινωδογόνου, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η συγκέντρωση άλλων πρωτεϊνών όπως της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης, ή μετάλλων όπως του σιδήρου.

Έχει διαπιστωθεί ότι και χρόνιες παθήσεις όπως νεφροπάθειες, χρόνιες λοιμώξεις, αυτοάνοσα φλεγμονώδη νοσήματα και νεοπλασίες, συνοδεύονται από τις ίδιες ή παρόμοιες διαταραχές οι οποίες φαίνεται ότι χαρακτηρίζουν γενικώς τη φυσική ανοσία και όχι την απόκριση οξείας φάσης, όπως αρχικά είχε προσδιοριστεί [53,54].

Είναι σαφές ότι όλοι αυτοί οι μηχανισμοί της φλεγμονής που περιγράφηκαν παραπάνω, αν αφεθούν να συνεχιστούν, οδηγούν σε αύξηση της ιστικής καταστροφής, επιφέροντας επιζήμιες επιπτώσεις στον ίδιο τον ξενιστή [79]. Το φαινόμενο της φλεγμονής περιορίζεται τοπικά με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση αντιφλεγμονωδών μηχανισμών που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη λύση της αμέσως μετά την επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης ή την καταστροφή του βλαπτικού παράγοντα. Στους μηχανισμούς αυτούς συμμετέχουν ενδογενείς ανταγωνιστές της δράσης της IL-1 (IL-1Ra, sIL-1R), του TNFa (sTNF-R) και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-4, IL-10 και ο αυξητικός παράγοντας των όγκων TGFβ), οι οποίες καταστέλλουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β και TNFα [73].

2.3 Αντιφλεγμονώδης δράση κρασιού

Πληθώρα επιστημονικών δεδομένων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση κρασιού, στο πλαίσιο της μεσογειακής δίαιτας, ασκεί ευεργετική δράση στην υγεία μας.

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) είναι ένα ισχυρότατο φλεγμονώδες μόριο που μεταξύ των άλλων σημαντικών δράσεων προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων, των κυττάρων δηλαδή που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σημείο τραυματισμού ενός αγγείου σχηματίζοντας θρόμβο (πήγμα αίματος). Η χρόνια φλεγμονή εξαιτίας υψηλών επιπέδων PAF παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, στη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης και την πρόκληση καρδιαγγειακών νοσημάτων, εμφραγμάτων και εγκεφαλικών. Το κόκκινο κρασί παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα σε μελέτες των Φραγκοπούλου και συνεργατών βρέθηκε ότι τόσο τα ερυθρά κρασιά όσο και τα λευκά περιέχουν αναστολείς του PAF [49-52].

Τα φαινολικά του κρασιού αναστέλλουν την απελευθέρωση και τη σύνθεση της ισταμίνης και της προσταγλανδίνης οι οποίες είναι υπεύθυνες για την φλεγμονή.

2.3.1 Αντιφλεγμονώδης δράση των πολυφαινολών

Η συχνή κατανάλωση μέτριας ποσότητας κρασιού, και ιδιαίτερα κόκκινου, έχει φανεί ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά, όπως η μπύρα. Εξαιτίας της χημικής δομής τους εμφανίζουν κατά βάση αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αυτός ήταν ο λόγος που οι ερευνητές άρχισαν να ερευνούν αν αυτή η αντιοξειδωτική τους δράση συνοδευόταν και από αντιφλεγμονώδη δράση, όπως και τελικά φάνηκε. Επίσης, στην κατανάλωση κρασιού έχουν αποδοθεί και άλλες ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση.

Η αντιοξειδωτική τους δράση δεν είναι ο μόνος μηχανισμός μέσω του οποίου ασκούν την αντιφλεγμονώδη δράση τους οι φαινολικές ενώσεις [82]. Οι πολυφαινόλες ασκούν την αντιφλεγμονώδη δράση τους κυρίως μέσω δύο βασικών μηχανισμών:

- επίδραση σε οδούς που εξαρτώνται από το αραχιδονικό οξύ και
- επίδραση στην παραγωγή κυτταροκινών από τα βοηθητικά Τ- ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

Όσον αφορά τον πρώτο μηχανισμό, οι πολυφαινόλες δρουν εν μέρει σαν αντιοξειδωτικά αλλά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων. Στα πλαίσια αυτά αναφέρεται αναστολή της κυκλοοξυγονάσης, της λιποοξυγονάσης και της φωσφολιπάσης A_2. Οι δράσεις αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την εξασθένιση των μηχανισμών μεταγωγής σήματος που οδηγούν σε σύνθεση προφλεγμονωδών μορίων

και μορίων προσκόλλησης από τα μονοκύτταρα σε απόκριση διαφόρων φλεγμονωδών ερεθισμάτων [83].

Η ρεσβερατρόλη, μία από τις βασικές πολυφαινόλες που περιέχεται στα σταφύλια, άρα και στο κρασί σχετίζεται με μειωμένη ενεργοποίηση του NF-κB. Η ίδια έρευνα αναφέρει μείωση της παραγωγής NO με προσθήκη ρεσβερατρόλης στα κύτταρα [83].

2.3.2 Επίδραση στη συσσώρευση 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 συστατικά 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 [84]. Από τα φλαβονοειδή, η κερκετίνη και η κατεχίνη βρέθηκε ότι είναι ισχυροί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μέσω ADP [85]. 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 [86]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι φλαβονόλες, άλλα όχι οι φλαβανόνες, δεσμεύονται στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων και εμποδίζουν τη συγκόλληση τους στο αγγειακό ενδοθήλιο κουνελιού προστατεύοντας το ενδοθήλιο από το σχηματισμό θρόμβου και επιπλέον δρουν θρομβολυτικά [87]. Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι εκχυλισμένες φαινολικές ενώσεις από το κρασί μπορούν να αναστείλουν τη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού [52].

2.3.3 Επίδραση στο μεταβολισμό 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 κυκλοξυγονάσης (COX) και της λιποξυγονάσης (LOX). Μέσω της οδού της κυκλοξυγονάσης παράγονται οι προσταγλαδίνες και οι θρομβοξάνες. Οι προσταγλαδίνες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρέχουν ερεθίσματα για την καρκινογένεση και εμποδίζουν την 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 λιποξυγονάσης. Η παραγωγή των παραπάνω προφλεγμονωδών παραγόντων μπορεί να γίνεται από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και κυττάρων του αίματος, όπως τα ουδετερόφιλα, τα αιμοπετάλια κ.α. [53].

Οι Corvazier και Maclouf έδειξαν ότι μερικά φλαβονοειδή αναστέλλουν το δρόμο της 5-λιποξυγενάσης σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα [88]. Ο Moroney μελέτησε την ανασταλτική δράση διαφόρων γλυκοζιτών και άγλυκων φλαβονοειδών σε λευκοκύτταρα από περιτόναιο αρουραίου [89]. 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 [88].

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 [90].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

3.1 Εισαγωγή [91,92]

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) αποτελεί λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών. Η ονομασία της ένωσης κατά IUPAC ως 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-χολίνη προσδιορίζει δομικά την ένωση ως ένα γλυκεριναιθερικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης.

Ο PAF είναι το πρώτο βιολογικά δραστικό φωσφολιποειδές το οποίο βρέθηκε στην φύση και παραμένει μέχρι σήμερα ένας από τους πιο δραστικούς, φυσικά παραγόμενους, χημικούς μεσολαβητές. Συντίθεται και εκκρίνεται από πλήθος κυττάρων, τόσο σε βασικά επίπεδα, όσο και σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων και συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων του οργανισμού.

Ο PAF είναι ένας πανίσχυρος ενεργοποιητής και μεσολαβητής πολλών λειτουργιών των λευκών αιμοσφαιρίων. Προκαλεί συγκόλληση των αιμοπεταλίων, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, ερεθισμό και αναφυλαξία. Επιπλέον, συμμετέχει στους μηχανισμούς της αιμόστασης. Ακόμη και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξης των pM) ο PAF προκαλεί επικίνδυνο ερεθισμό των αεραγωγών και έντονα συμπτώματα άσθματος.

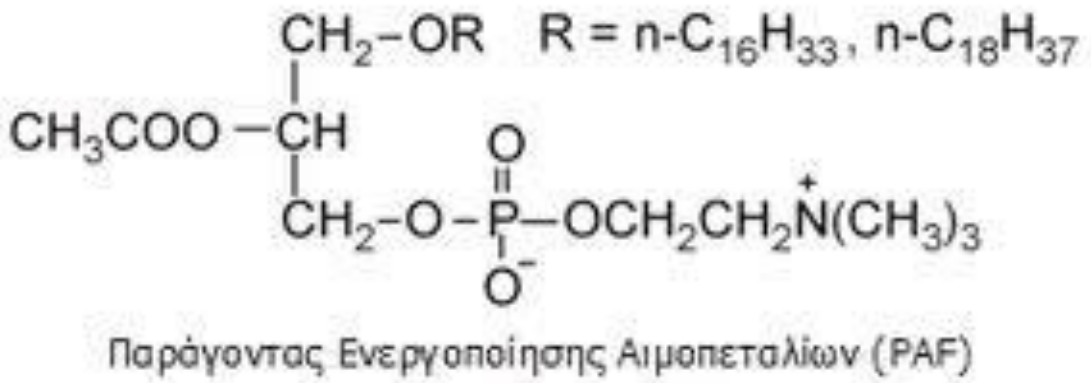
Η πρώτη αναφορά στον PAF τοποθετείται το 1966 [93] όπου παρατηρήθηκε ότι κατά την ευαισθητοποίηση λευκοκυττάρων κουνελιού με αντιγόνο παράγεται ένας παράγοντας, ο οποίος είναι ανεξάρτητος συμπληρώματος και προκαλεί την απελευθέρωση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια. Αυτή η παρατήρηση επαληθεύτηκε και από άλλους ερευνητές, ανάμεσα στους οποίους ο Beneviste και οι συνεργάτες του οι οποίοι πρότειναν τη λιποειδική φύση του PAF [94]. Η δομή του PAF καθορίστηκε το 1979.

Οι Demopoulos, Hanahan και Pinckard δουλεύοντας με αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα ανέφεραν τη δομή του PAF σαν 1-*O*-αλκυλο-2-ακέτυλο-*sn*-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη (AGEPC) [95]. Η δομή του PAF πιστοποιήθηκε και από άλλες ερευνητικές ομάδες, σε νεφρικό ιστό κουνελιού και σε βασεόφιλα κουνελιού ενεργοποιημένα με ανοσοσφαιρίνη Ε (IgE) [96-99]. Ο PAF έχει χαρακτηριστεί ως νέα, ισχυρή και μοναδική κατηγορία χημικών μεσολαβητών (λιπιδίων), ενώ άλλοι θεωρούν τον PAF ως ορμόνη ή αρχέγονο-καθολικό κυτταρικό βιολογικό ρυθμιστή. Ακόμα, η πλειοψηφία των αιθερικών λιποειδών έχει αντικατασταθεί με τα εστεροποιημένα ανάλογά τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, όμως ο PAF και μερικά δευτερεύοντα γλυκεριναιθερικά φωσφολιποειδή διατηρήθηκαν σε διάφορους οργανισμούς λόγω των σημαντικών βιολογικών ρόλων τους [100].

3.2 Δομή του PAF

Ο PAF είναι ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται, με αιθερικό δεσμό, μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς, στη δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης (Σχήμα 3.2).

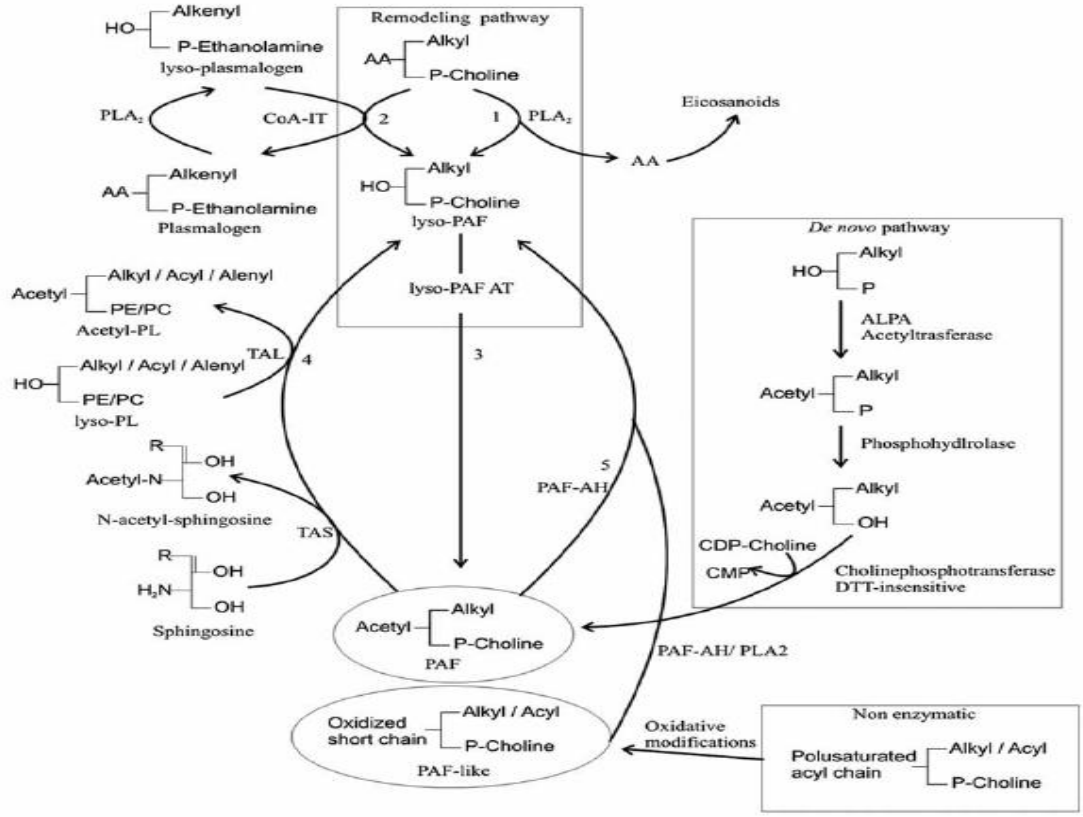
Η παρακάτω δομή αντιπροσωπεύει την πιο δραστική μορφή του PAF όχι όμως και τη μοναδική αφού στη φύση έχει βρεθεί μια μεγάλη ποικιλία μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF με παρόμοιες βιολογικές δράσεις [99]. Η ύπαρξη όλων αυτών των μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF οφείλεται κυρίως στη σχετικά ευρεία εξειδίκευση των ενζύμων βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του. Κάθε είδος κυττάρου δίνει ένα διαφορετικό μίγμα μοριακών ειδών PAF, το οποίο εξαρτάται από την σύσταση των φωσφολιποειδών στις μεμβράνες του κυττάρου, την κατανομή του αραχιδονικού οξέος στις διάφορες τάξεις των φωσφολιποειδών καθώς και από τη σχετική ταχύτητα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης αυτών των ενώσεων. Τα ανάλογα του PAF έχει βρεθεί ότι έχουν βιολογικές δράσεις ενδογενών ρυθμιστών της δραστικότητας του PAF [101].



<u>Σχήμα 3.1:</u> Χημική δομή του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη

3.3 Μεταβολισμός του PAF [102]

Η μελέτη του μεταβολισμού του PAF ξεκίνησε σχεδόν ταυτόχρονα με την εύρεση της δομής του. Οι πρώτες μελέτες επικεντρώθηκαν στην εύρεση των καταβολικών και βιοσυνθετικών πορειών του PAF στα κύτταρα, στη μελέτη των μεμονωμένων αντιδράσεων της κάθε πορείας και στο βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα εστιάζεται κυρίως στους μηχανισμούς ρύθμισης των μεταβολικών πορειών και στον καθορισμό και κλωνοποίηση των ενζύμων μεταβολισμού. Τα αποτελέσματα των ερευνών έχουν δείξει ότι ο PAF μπορεί να βιοσυντίθεται και να αποικοδομείται με περισσότερες από μία πορείες στα κύτταρα, ανάλογα το είδος και το περιβάλλον του κυττάρου. Οι πορείες αυτές βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο και ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα που οδηγούν, είτε στη σύνθεση είτε στην απενεργοποίηση του PAF ανάλογα με την παθοφυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Παράλληλα, έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση του μεταβολισμού του PAF με το μεταβολισμό και άλλων, βιολογικά δραστικών λιποειδών, κυρίως εικοσανοειδών, ενώ έχουν βρεθεί καινούριες αντιδράσεις και ένζυμα που καθορίζουν το είδος των δομικών αναλόγων του PAF σε κάθε κύτταρο.



Step	Inhibition	Activation
1	DHA diet, flavonoids, curcumin, vitamin E	
2	α-LA diet	
3	EPA-DHA diet, flavanoids, tea phenols, resveratrol, lycopene	Se-deficiency
4		Flavonoids, resveratrol, lycopene
5		Olive oil diet

Σχήμα 3.2: Μεταβολισμός του PAF

3.3.1 Βιοσύνθεση PAF [102-104]

Τα πρώτα βήματα στη βιοσύνθεση του PAF και άλλων αλκοξυαιθερο-λιποειδών λαμβάνουν χώρα στα υπεροξυσωμάτια. Στη συνέχεια το πρόδρομο μόριο για την παραγωγή PAF αποθηκεύεται στην κυτταρική μεμβράνη και ύστερα από κατάλληλη διέγερση μετατρέπεται σε PAF. Η σύνθεση του PAF μέσω ενεργοποίησης περιλαμβάνει είτε την πορεία ανασχηματισμού (remodeling) όπου γίνεται απαλκυλίωση του προδρόμου 1-O-αλκυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνης (αλκυλο-PC) και ακετυλίωση του παραγόμενου λυσο-PAF, είτε μέσω της εξ' υπαρχής πορείας (de novo) με μεταφορά φωσφατιδυλοχολίνης σε 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλη. Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει η μελέτη της μη ενζυμικής παραγωγής PAF αναλόγων μέσω οξειδωτικών καταστάσεων.

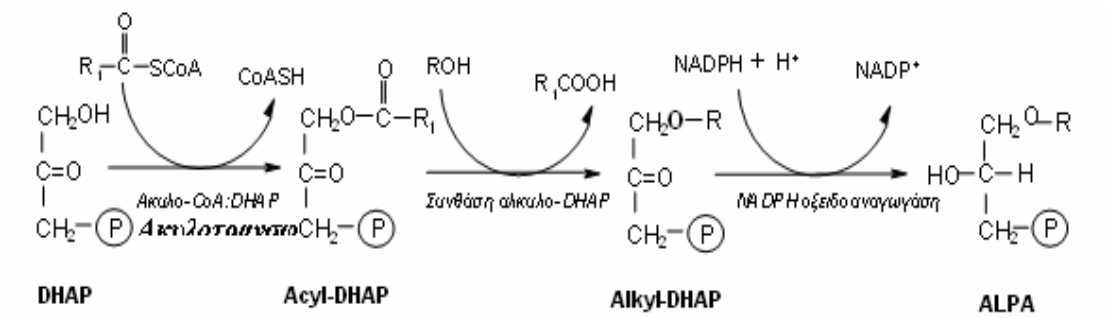
Όλα τα ένζυμα της de novo πορείας είναι μεμβρανικά και διαφέρουν στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους από τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την de novo σύνθεση των άλλων μεμβρανικών γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών. Η de novo πορεία βιοσύνθεσης του PAF δεν ενεργοποιείται από φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι υπεύθυνη για τη συνεχή, σταθερή παραγωγή PAF από τα κύτταρα με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων του στο αίμα και στους ιστούς.

Η πορεία ανασχηματισμού ενεργοποιείται σε απόκριση φλεγμονωδών και αλλεργικών ερεθισμάτων με σκοπό την άμεση παραγωγή του από τα κύτταρα. Η βιοσύνθεση του PAF μέσω της remodeling πορείας περιλαμβάνει τη μετατροπή γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών, που προϋπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, σε PAF.

<u>*Σχηματισμός αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή*</u> [102-104]

Ο σχηματισμός του αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή γίνεται σε τρία στάδια (Σχήμα 3.3):

1. Αρχικά μετατρέπεται η φωσφοδιϋδροξυακετόνη (DHAP), η οποία προέρχεται από την γλυκολυτική πορεία, σε 1-ακυλοφωσφοδιϋδροξυακετόνη (ακυλο-DHAP) με τη δράση του ενζύμου ακυλο-CoA:DHAP ακυλοτρανσφεράση.
2. Στη συνέχεια, η ακυλο-ομάδα της ακυλο-DHAP αντικαθίσταται από μία αλειφατική ανθρακική αλυσίδα μίας λιπαρής αλκοόλης, η οποία ενώνεται με αιθερικό δεσμό στη DHAP, προς σχηματισμό της 1-αλκυλο-φωσφοδιϋδροξυακετόνης (αλκυλο-DHAP). Η αντίδραση καταλύεται από τη συνθάση της αλκυλο-DHAP. [105,106]
3. Η αλκυλο-DHAP ανάγεται στη συνέχεια από μία NADPH εξαρτώμενη οξειδοαναγωγάση προς 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικό οξύ (ALPA). Το ALPA είναι το ενδιάμεσο προϊόν από το οποίο μπορούν να σχηματιστούν είτε τα κλασσικά γλυκεριναιθερικά φωσφολιποειδή των μεμβρανών, είτε ο PAF. [105-109]



<u>Σχήμα 3.3:</u> Πορεία σχηματισμού αιθερικού δεσμού στα γλυκεριναιθερικά λιποειδή

Η μετατροπή του ALPA στο αλκυλο-ανάλογο του φωσφατιδικού οξέος γίνεται μέσω μιας ακυλοτρανσφεράσης που φαίνεται να έχει εξειδίκευση για πολυακόρεστα ακυλο-CoA [106,110]. Στη συνέχεια με τη δράση μιας φωσφοϋδρολάσης προκύπτει 1-αλκυλο-2-ακυλο-γλυκερόλη όπου μετατρέπεται είτε σε αλκυλο-ακυλο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη είτε σε αλκυλο-ακλυλο-φωσφατιδυλοχολίνη ανάλογα με το αν θα μεταφερθεί η φωσφορική βάση από ένα μόριο CDP-χολίνης ή CDP-αιθανολαμίνης. Η αντίδραση καταλύεται από μια Mg^{2+} - εξαρτώμενη χολινο- ή αιθανολαμινο-τρανσφεράση αντίστοιχα [111].

Το ALPA φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των αιθερικών λιποειδών αφού κατέχει κεντρική θέση στην αλυσίδα των αντιδράσεων όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε στην de novo σύνθεση του PAF είτε στην de novo σύνθεση μεμβρανικών λιποειδών όπως αλκυλο – ακυλο - γλυκεροφωσφατιδυλοαιθανολαμίνες ή αλκυλο – ακυλο - γλυκεροφωσφατιδυλοχολίνες που αποτελούν μεμβρανικά λιποειδή και είναι πρόδρομα μόρια στη remodeling πορεία.

<u>3.3.1.1 Πορεία ανασχηματισμού (Remodeling πορεία)</u> [102-104]

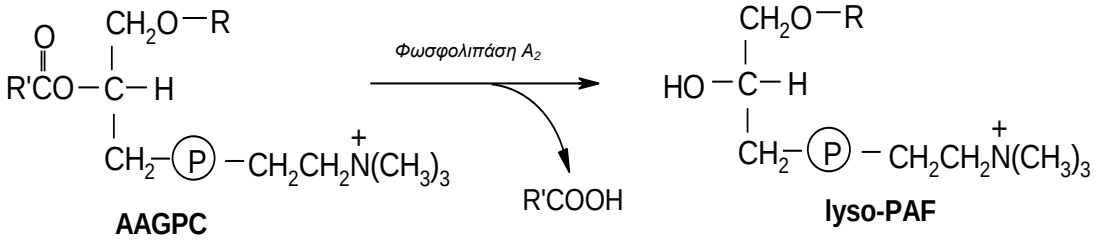
Όπως δηλώνει και το όνομά της, η remodeling πορεία περιλαμβάνει τη χημική τροποποίηση της δομής των προϋπάρχοντων λιποειδικών μορίων που βρίσκονται συνδεδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη.

Πρόδρομη ένωση του PAF στη remodeling πορεία είναι το μεμβρανικό γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (AAGPC). Στην sn-2 θέση του φωσφολιποειδούς βρίσκονται εστεροποιημένα κυρίως αραχιδονικό οξύ και λιγότερο άλλα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα οξέα.

Το πρώτο στάδιο της remodeling πορείας περιλαμβάνει την υδρόλυση της AAGPC προς 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (λυσο-PAF). Αρχικά, η αντίδραση αυτή αποδίδονταν αποκλειστικά στη δράση μιας υποθετικής φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2), με εξειδίκευση για αιθερικά υποστρώματα. Ωστόσο σήμερα έχει βρεθεί ότι η αντίδραση μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικές πορείες ανάλογα το είδος του κυττάρου:

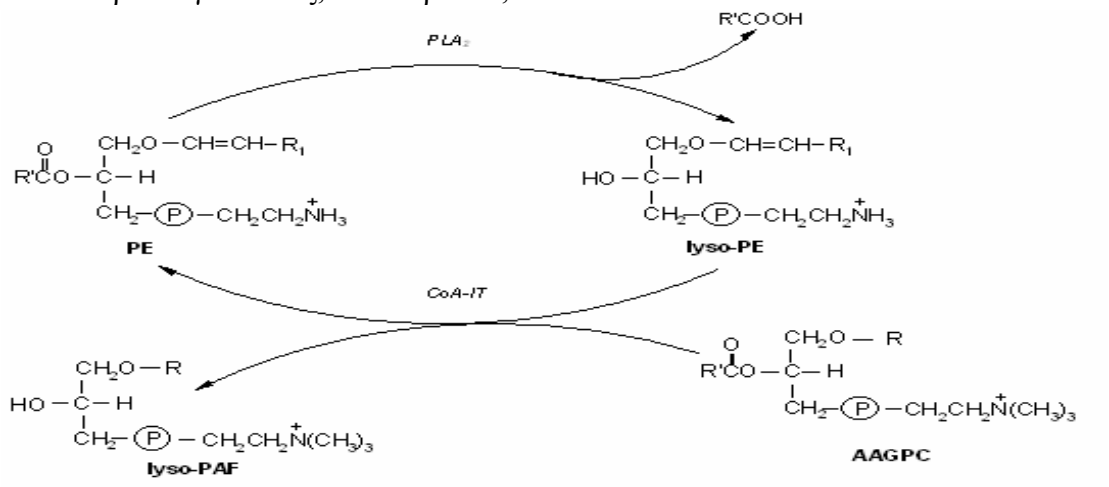
1. Η πρώτη πορεία περιλαμβάνει την δράση μιας PLA_2, η οποία έχει εξειδίκευση για πολυακόρεστες αλυσίδες στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού της AAGPC αλλά δεν φαίνεται να δείχνει ιδιαίτερη εξειδίκευση για το είδος του

δεσμού στην sn-1 θέση (Σχήμα 3.4). Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχτεί η ύπαρξη ειδικής PLA_2, η οποία υδρολύει εξειδικευμένα την AAGPC σε λυσο-PAF. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ο λυσο-PAF σε περιτοναϊκά κύτταρα ποντικού, σε μακροφάγα αρουραίου, σε ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα ανθρώπου κ.α.



Σχήμα 3.4: Σχηματισμός λυσο-PAF από AAGPC με την δράση PLA_2

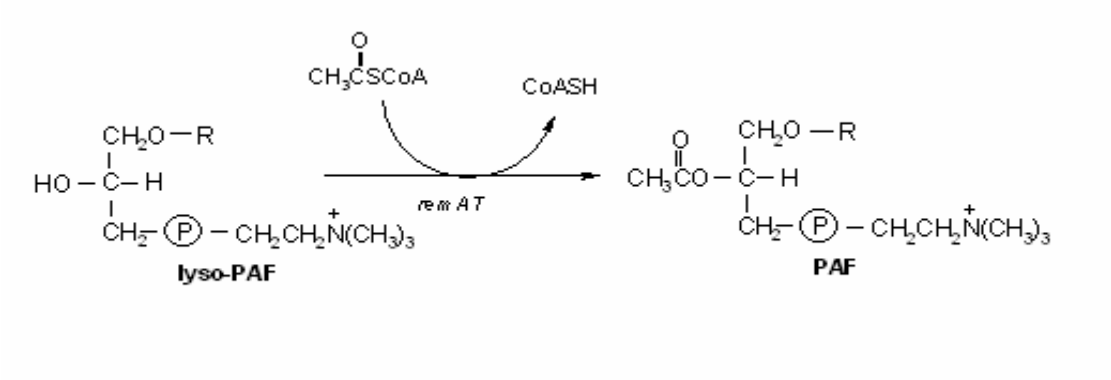
2. Στη δεύτερη πορεία σχηματισμού του λυσο-PAF, η οποία έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια, μια CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση (CoA-IT) μεταφέρει την ακυλο- ομάδα (κυρίως αραχιδονόϋλο-) από την sn-2 θέση της AAGPC σε λυσο πλασμαλογόνα αιθανολαμίνης (λυσο-PE). Η λυσο-PE σχηματίζεται από PE με την δράση μιας PLA_2 ειδικής για τα πλασμαλογόνα αιθανολαμίνης και για αραχιδονοϋλο-ομάδες στην sn-2 θέση των πλασμαλογόνων (Σχήμα 3.5). Χαρακτηριστικό της remodeling πορείας είναι ότι και στις δύο πορείες σχηματισμού του λυσο-PAF ελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε βιολογικά δραστικά εικοσανοειδή όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, κ.ά.



Σχήμα 3.5: Σχηματισμός λυσο-PAF με τη δράση τρανσακυλασών

Το δεύτερο στάδιο της remodeling πορείας είναι η ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF από το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο-PAF AT). Η λυσο-PAF AT δείχνει εξειδίκευση για αιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση και

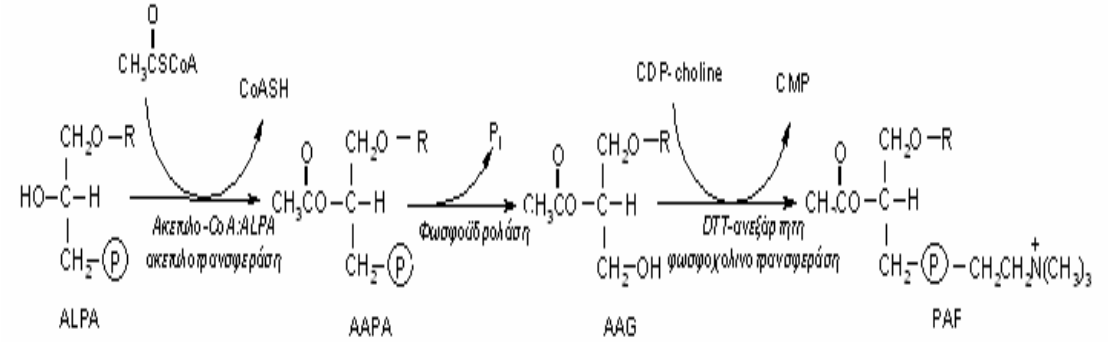
μεταφέρει μικρού μοριακού βάρους ακυλο-ομάδες (2 ή 3 ατόμων C) στην sn-2 θέση (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Ακετυλίωση λυσο-PAF προς PAF

3.3.1.2 De novo πορεία βιοσύνθεσης

Στην de novo πορεία λαμβάνουν χώρα οι εξής αντιδράσεις: α) μεταφορά μίας ακετυλομάδας από το ακετυλο-CoA στο ALPA προς σχηματισμό του 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος (AAPA). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ακετυλο-CoA:ALPA ακετυλοτρανσφεράση (de novo AT), β) απόσπαση της φωσφορικής ομάδας του AAPA με δράση μίας φωσφοϋδρολάσης, που υδρολύει τη φωσφορική ομάδα και μετατρέπει το AAPA σε AAG, γ) μεταφορά μιας ομάδας φωσφορυλοχολίνης με την μορφή κιτυδιλο-διφωσφορικής χολίνης (CDP-choline) στην sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού με τη δράση μίας DTT ανεξάρτητης φωσφοχολινοτρανσφεράσης προς σχηματισμό του PAF (Σχήμα 3.7)



Σχήμα 3.7: De novo πορεία βιοσύνθεσης του PAF

3.3.1.3 Οξειδωτική βιοσύνθεση αναλόγων του PAF [76]

Εκτός από την ενζυμικά ελεγχόμενη παραγωγή PAF, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να προσελκύει το ερευνητικό ενδιαφέρον η παραγωγή ανάλογων του PAF μορίων (PAF-like) κάτω από καταστάσεις οξειδωτικού στρες.

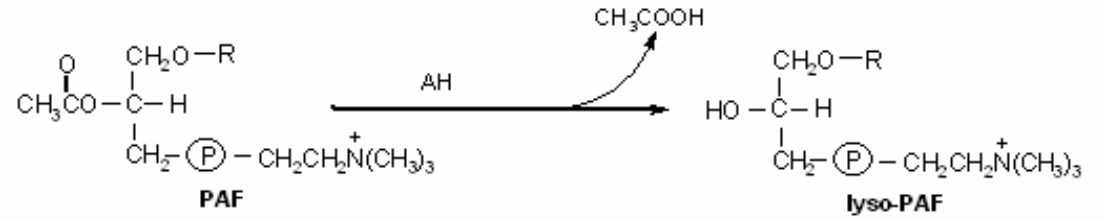
Η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) γίνεται με αποχώρηση ενός υδρογόνου από μια αλλυλική μεθυλενομάδα, που ακολουθείται από μεταφορά διπλού δεσμού και ενσωμάτωση μοριακού οξυγόνου ώστε να σχηματισθεί ρίζα υπεροξειδίου. Η ρίζα υπεροξειδίου μετατρέπεται σε υδροϋπεροξείδια ενσωματώνοντας ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο PUFA, ξεκινώντας με αυτόν τον τρόπο μια αλυσιδωτή αντίδραση.

Με ανάλογο τρόπο, τα PUFA που βρίσκονται στα φωσφολιποειδή μπορούν να σχηματίσουν υδροϋπεροξείδια. Παρουσία ιόντων, όπως για παράδειγμα Fe^{2+}, τα υδροϋπεροξείδια μπορούν να μετατραπούν σε φωσφολιποειδή με μικρότερη αλειφατική αλυσίδα ή αλειφατική αλυσίδα με αλδεϋδο-ομάδα ανάλογα τη θέση που θα σπάσει ο δεσμός.

3.3.2 Αποικοδόμηση του PAF

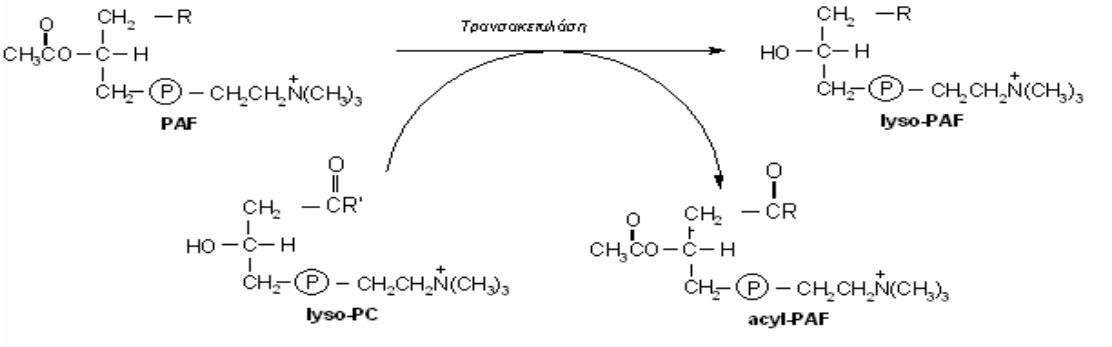
Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο αποικοδόμησης του PAF είναι η υδρόλυση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό του βιολογικά ανενεργού λυσο-PAF. Η αντίδραση υδρόλυσης της ακετυλομάδας μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους:

1) Με τη δράση της PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH), μίας Ca^{2+}-ανεξάρτητης PLA_2 που δείχνει εξειδίκευση για μικρού μοριακού βάρους (2 ή 3 ατόμων C) και οξειδωμένα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού (Σχήμα 3.8). Έχουν βρεθεί τόσο εξωκυτταρικές όσο και ενδοκυτταρικές ισομορφές του ενζύμου που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιολογικής δραστικότητας του PAF.



Σχήμα 3.8: Υδρόλυση του PAF από την AH

2) Με τη δράση τρανσακετυλασών που μεταφέρουν την ακετυλομάδα σε άλλα λιποειδικά υποστρώματα με ελεύθερο υδροξύλιο όπως λυσο-πλασμαλογόνα, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (Σχήμα 3.9), λιπαρές αλκοόλες, σφιγγοσίνη κ.α. Μέσω αυτής της αντίδρασης σχηματίζονται ακετυλιωμένα μόρια στα οποία έχουν αποδοθεί σημαντικές βιολογικές δράσεις τα τελευταία χρόνια. Ενζυμική δραστικότητα τρανσακετυλάσης έχει βρεθεί σε HL-60 κύτταρα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε κλάσματα LDL ανθρώπινου πλάσματος.

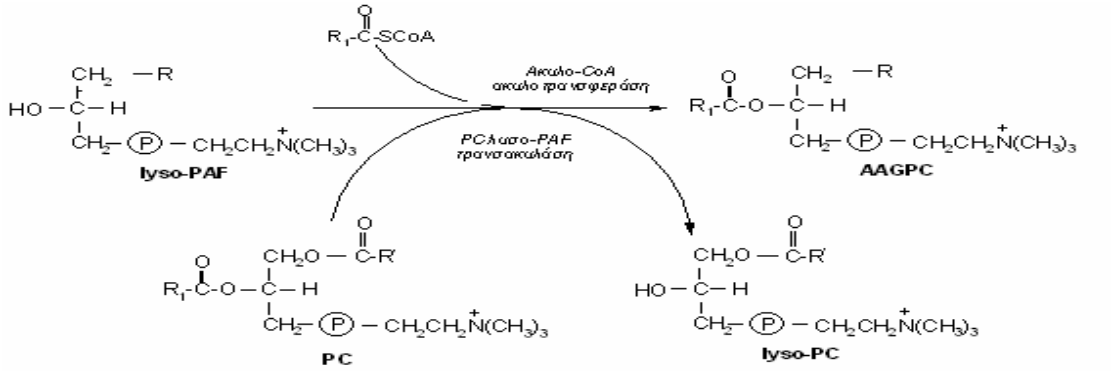


Σχήμα 3.9: Υδρόλυση PAF από τρανσακετυλάσες

3) Με τη δράση της λεκιθίνη:χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράσης (LCAT), η οποία μπορεί να μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-PC στο πλάσμα ανθρώπου. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τρανσακετυλάση και η LCAT αποτελούν διαφορετικά ένζυμα.

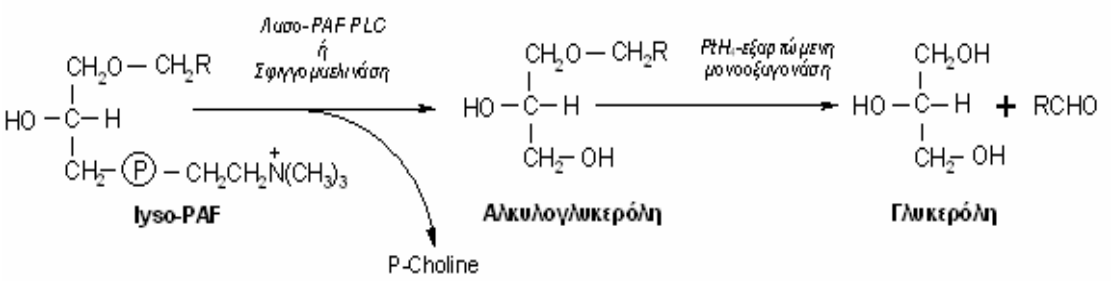
Ενδοκυτταρικά, ο λυσο-PAF είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικός λόγω των απορρυπαντικών ιδιοτήτων του, γι' αυτό είτε εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο, είτε μεταβολίζεται περαιτέρω στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταβολική τύχη του λυσο-PAF εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και μπορεί να είναι η εξής:

- Μπορεί να επανακυλιωθεί προς AAGPC, το οποίο στη συνέχεια ενσωματώνεται στις μεμβράνες των κυττάρων. Η ακυλίωση μπορεί να γίνει είτε από ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράσες, είτε από τρανσακυλάσες που μεταφέρουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως αραχιδονικό οξύ, από την PC στο λυσο-PAF (Σχήμα 3.10). Η μετατροπή του PAF σε AAGPC είναι ο συνηθέστερος τρόπος αποικοδόμησης του στα περισσότερα κύτταρα, κυρίως στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια.



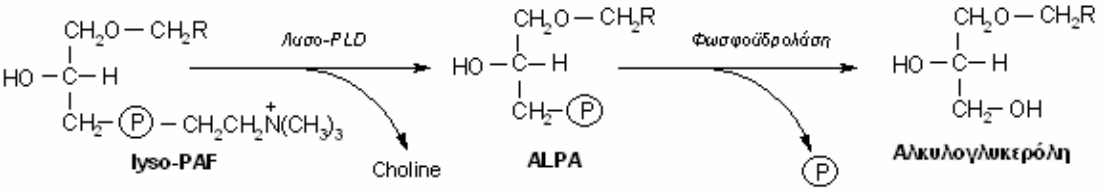
<u>Σχήμα 3.10:</u> Ακυλίωση του λυσο-PAF προς 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη

- Μπορεί να μεταβολιστεί από λυσο-φωσφολιπάση C σε αλκυλογλυκερόλη, η οποία είναι δυνατόν στη συνέχεια να διασπαστεί περαιτέρω σε γλυκερόλη και λιπαρή αλδεΰδη από την τετραϋδροπτερίδινη-εξαρτώμενη μονοοξυγονάση (Σχήμα 3.11). Η πορεία αυτή έχει αποδειχτεί σε ηπατοκύτταρα αρουραίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι κλωνοποιημένη ουδέτερη σφιγγομυελινάση μπορεί να λειτουργήσει και ως λυσο-PAF PLC στα κύτταρα.



<u>Σχήμα 3.11:</u> Υδρόλυση λυσο-PAF προς γλυκερόλη

- Μπορεί να υδρολυθεί από μία λυσο-PLD σε ALPA, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε AAG με τη δράση μίας φωσφοϋδρολάσης (Σχήμα 3.12). Η πορεία αυτή αποικοδόμησης του λυσο-PAF έχει βρεθεί σε μυοκύτταρα αρουραίου, σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου αρουραίου και σε πλάσμα κουνελιού.



<u>Σχήμα 3.12:</u> Υδρόλυση λυσο-PAF από PLD

- Ο αιθερικός δεσμός του λυσο-PAF μπορεί να διασπαστεί από την τετραϋδροπτερίδινη- εξαρτώμενη μονοοξυγονάση προς λιπαρές αλδεΰδες. Η μονοοξυγονάση διασπά τον αιθερικό δεσμό στα γλυκεριναιθερικά λιποειδή και για να δράσει απαιτεί τουλάχιστον ένα ελεύθερο υδροξύλιο.

3.3.3 Περιγραφή της Ακετυλο-CoA:1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερύλοφωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράσης, λυσο- PAF AT [103,112]

Η λυσο-PAF AT καταλύει το τελευταίο στάδιο της remodeling πορείας που είναι η ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF (Σχήμα 3.6). Εντοπίζεται στο μικροσωμιακό κλάσμα σχεδόν όλων των ιστών και των κυττάρων που παράγουν PAF, ενώ έχει βρεθεί και σε μικροσώματα σκουληκιών και μαλακίων. Πειράματα υποκυτταρικής κατανομής του ενζύμου έχουν δείξει ότι η λυσο-PAF AT κατανέμεται στις πλασματικές μεμβράνες, στο ER και στα τεταρτοταγή κοκκία ανθρώπινων ουδετερόφιλων και HL-60 κυττάρων, ενώ σε φλοιό εγκεφάλου αρουραίου και κουνελιού εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη και στον πυρηνικό φάκελο.

Το ένζυμο παρουσιάζει σχετικά ευρεία εξειδίκευση όσον αφορά τα λιποειδικά υποστρώματα αφού μπορεί να ακετυλιώσει αιθερικά και εστερικά ανάλογα PAF καθώς και ανάλογα με σκελετό αιθανολαμίνης. Επίσης, μικρού μοριακού βάρους ακυλο-CoA (C2-C6) αποτελούν υποστρώματα για τη λυσο-PAF AT. Μελέτες εξειδίκευσης του ενζύμου ως προς τα διάφορα λιποειδικά υποστρώματα έχουν δείξει ότι η σειρά προτίμησής της είναι: αλκυλο-λυσο-PAF > ακυλο-λυσο-PAF > αλκενυλο-λυσο-PAF > αλκυλο- λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη > ακυλο-λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Τα λιποειδή ακυλο-λυσο-φωσφατιδυλοσερίνη, αλκυλο-λυσο-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και ακυλο-λυσο-φωσφατιδικό οξύ δεν αποτελούν υποστρώματα για τη λυσο-PAF AT, ενώ μεγάλου μοριακού βάρους ακυλο-CoA, όπως παλμιτοϋλο-CoA, ελαϋλο-CoA, αραχιδονοϋλο-CoA είναι συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου. Το ένζυμο προτιμά ως υπόστρωμα τον C16:0-λυσο-PAF από τον C18:0-λυσο-PAF. Το ακετυλο-CoA δε συναγωνίζεται το ακυλο-CoA στον ενζυμικό προσδιορισμό της ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράσης, ενώ η ακετυλοτρανσφεράση είναι πιο ευαίσθητη σε απορρυπαντικά και στη θερμική απενεργοποίηση. Τα παραπάνω αποτελέσματα διαχωρίζουν τη δραστικότητα της ακυλοτρανσφεράσης από αυτή της ακετυλοτρανσφεράσης.

Το ένζυμο έχει ασβέστιο-εξαρτώμενη δραστηριότητα, με βέλτιστο pH περίπου 7,4 και αναστέλλεται από φυσικά παραγόμενες ενώσεις όπως ακυλο-CoA, αραχιδονικό οξύ, ελαϊκό οξύ, λυσο-PC, από μη ειδικούς αναστολείς όπως τα χηλικά αντιδραστήρια EDTA, EGTA, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, DIFP καθώς και από συνθετικές ενώσεις που αντιδρούν με –SH ομάδες πάνω στο ένζυμο. Το φλαβονοειδές κερκετίνη και το αντιφλεγμονώδες σουλφασαλαζίνη εμποδίζουν τη δράση της ακετυλοτρανσφεράσης in vitro.

Η ασπιρίνη και τριφλουοπεραζίνη εμποδίζουν επίσης τη δραστηριότητα ακετυλοτρανσφερασών αν και η ασπιρίνη μπορεί επίσης μη-ενζυματικά να ακετυλιώσει το λυσο-PAF in vitro.

Το ένζυμο υφίσταται ομοιοπολική ρύθμιση της δραστικότητάς του μέσω φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης όπως έχουν δείξει μελέτες σε σπλήνα αρουραίου, ανθρώπινα ουδετερόφιλα, παρωτιδικούς αδένες ινδικού χοιριδίου και μαστοκύτταρα ποντικού. Το ένζυμο είναι ενεργό φωσφορυλιωμένο και απενεργοποιείται με αποφωσφορυλίωση. Καταλυτικές υπομονάδες της cAMP-εξαρτώμενης PK και της Ca/καλμοδουλίνης-εξαρτώμενης PK ενεργοποιούν την rem AT in vitro. Αντιθέτως, η rem AT από νευρώνες κουνελιού είναι ευαίσθητη σε πυρηνικές και κυτοσολικές φωσφατάσες, ενώ αναστολείς φωσφατασών επιμηκύνουν την ενεργοποίηση της λυσο-PAF AT σε ανθρώπινα EC.

Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει προσπάθεια από ορισμένες ερευνητικές ομάδες να προσδιοριστεί και να χαρακτηριστεί το ένζυμο από διάφορες πηγές, όπως από το φλοιό και μυελό νεφρικών ιστών ανθρώπου [113], καθώς και από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα [114]. Οι συγκεκριμένες έρευνες υπέδειξαν ότι η δραστηριότητα της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης είναι παρούσα στα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα και καθιέρωσαν τις βιοχημικές ιδιότητες του ενζύμου για πρώτη φορά σε αυτά τα κύτταρα.

3.3.4 Φαινολικές ενώσεις και μεταβολισμός του PAF [104]

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένες μελέτες οι οποίες να συσχετίζουν τις φαινολικές ενώσεις με το μεταβολισμό του PAF, για παράδειγμα με τα ένζυμα PLA_2, λυσο-PAF AT.

Η αναστολή της δράσης της PLA_2 από τα φλαβονοειδή έχει φανεί από άλλες in vitro μελέτες [141,142]. Επιπλέον, η κερκετίνη και η εσπερεδίνη διαφοροποιούν το μεταβολισμό του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού stress. Τα παραπάνω φλαβονοειδή μπλοκάρουν την παραγωγή του PAF μέσω αναστολής της λυσο-PAF AT και της PLA_2 και ταυτόχρονα ενισχύουν το σχηματισμό λιγότερο βιολογικά ενεργών μεσολαβητών μέσω της εξαρτώμενης από τον PAF τρανσακετυλάσης. Αυτό το ένζυμο υδρολύει τον PAF ανάγοντας τον σε ακυλο-PAF, ο οποίος έχει ανασταλτικό ρόλο στην εκκίνηση και την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης [138].

3.4 Υποδοχείς του PAF [115,116]

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του αυτοκρινικά ή παρακρινικά μέσω της σύνδεσής του σε καλά χαρακτηρισμένο G-πρωτεϊνικό υποδοχέα συνδεμένο στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Οι ενδοκυτταρικές ενέργειες ασκούνται μέσω της σύνδεσής του στους πυρηνικούς υποδοχείς. Η αλληλεπίδραση του PAF με τον υποδοχέα του (PAFR) αρχίζει με ένα μονοπάτι διαφορετικών ενδοκυτταρικών πορειών μεταγωγής σήματος, οι οποίες μεταφράζουν το μήνυμα του μεσολαβητή στην τελική κυτταρική απάντηση. Οι πορείες μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τον PAF εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου και ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν την ομοιοπολική τροποποίηση και την εσωτερίκευση του PAFR, τη διαμόρφωση της έκφρασης των γονιδίων του PAFR και τη δεσμευτική δυνατότητα μαζί με τον ακριβή καθορισμό των πορειών μεταγωγής σημάτων από ένα μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών διαμορφωτών.

3.4.1 Πορείες μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τον PAF [104]

Η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του προκαλεί την ενεργοποίηση πορειών στο εσωτερικό του κυττάρου που οδηγούν στο σχηματισμό ή στην αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών μηνυματοφόρων μορίων όπως Ca^{2+}, cAMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), διακυλογλυκερόλη (DAG), αραχιδονικό οξύ, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου. Στην ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών μεσολαβούν G-πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με τον υποδοχέα του PAF. Το είδος του μηχανισμού μεταγωγής σήματος εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση ενώ πολλές φορές η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί παραπάνω από έναν μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους [74,75,117-121].
Οι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος που επάγονται από τον PAF είναι οι εξής:

1. Ενεργοποίηση G-πρωτεϊνών
2. Αναστολή της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης
3. Αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου
4. Ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) και του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI)
5. Ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2) και του σχηματισμού εικοσανοειδών
6. Ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K)
7. Ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης D (PLD)
8. Ενεργοποίηση των τυροσινικών κινασών (PTK)
9. Ενεργοποίηση MAP κινασών (MAPK)
10. Ενεργοποίηση γονιδιακής έκφρασης

3.5 Αναστολείς του PAF

Οι αναστολείς του PAF διακρίνονται σε μη ειδικούς και ειδικούς:

- *Μη ειδικοί αναστολείς PAF:*

Οι μη ειδικοί αναστολείς του PAF δρουν συνήθως αναστέλλοντας τις δευτερογενείς του δράσεις, μετά την σύνδεση του με τον υποδοχέα του. Στους μη ειδικούς αναστολείς ανήκουν, μεταξύ άλλων, ενώσεις που επιδρούν στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, είτε δρώντας ως ανταγωνιστές καναλιών Ca^{2+}, είτε αναστέλλοντας την καλμοδουλίνη, είτε συμπλοκοποιώντας το ασβέστιο.

- *Ειδικοί αναστολείς PAF:*

Οι ειδικοί αναστολείς του PAF δρουν ανταγωνιζόμενοι την σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα του. Διακρίνονται σε φυσικούς και συνθετικούς. Οι ευρύτερα μελετημένη ομάδα φυσικών αναστολέων του PAF είναι τα γκινγκολίδια (ginkgolides) και ειδικότερα τα γκινγκολίδια της σειράς Β με κύριο εκπρόσωπό τους το BN- 52021. Οι αναστολείς αυτοί, οι οποίοι είναι τριτερπένια, έχουν απομονωθεί το 1967 από τα φύλλα του φυτού Ginkgo biloba, ενός ιερού για τους Κινέζους δέντρου αφού είχε θεραπευτικές ιδιότητες. Τα τελευταία χρόνια, ενώσεις με σημαντική ανασταλτική δράση εναντίον του PAF έχουν βρεθεί και σε ζωικά και φυτικά τρόφιμα [49,122-124]. Η ύπαρξη τέτοιων αναστολέων σε τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας εξηγεί εν μέρει την σημαντική διατροφική τους αξία όσον αφορά την σημασία τους στην πρόληψη των καρδιοπαθειών.

Τα αποτελέσματα κλινικών μελετών όπου χορηγήθηκαν αναστολείς του PAF σε ανθρώπους [120, 125-127] ποικίλουν. Υπάρχουν μελέτες όπου δεν εμφανίζονται θετικά αποτελέσματα όπως στην αλλεργία και το άσθμα, άλλες έδωσαν αισιόδοξα αποτελέσματα αλλά απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση όπως σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής π.χ. ρευματοειδή αρθρίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας και φλεγμονές του στομάχου και τέλος άλλες έδωσαν θετικά αποτελέσματα όπου εμφανίστηκε μείωση της απόρριψης του μοσχεύματος σε μεταμοσχεύσεις νεφρού και μείωση της θνησιμότητας σε σηψαιμικές καταστάσεις ύστερα από χορήγηση BN-52021.

3.6 Δράσεις του PAF [74,74,115]

Ο PAF που παράγεται από τα κύτταρα μπορεί:

- Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινικά πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
- Να συντεθεί από τα κύτταρα και να ενσωματωθεί στην πλασματική τους μεμβράνη δρώντας από εκεί ως διακυτταρικός μεσολαβητής ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα.
- Να παραμείνει στα κύτταρα από τα οποία συντίθεται και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής.
- Να μεταβολιστεί άμεσα.

Το ποσό του PAF που παράγεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα εξαρτάται τόσο από το είδος του κυττάρου, όσο και από τις συνθήκες ενεργοποίησης του. Τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν 0 έως 60% του νεοσυντιθέμενου PAF ανάλογα το εξωτερικό ερέθισμα και τις συνθήκες ενεργοποίησης. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν από λίγο έως καθόλου PAF ανεξαρτήτως ερεθίσματος.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο PAF δεν εκκρίνεται αλλά μετά την σύνθεση του μπορεί να βρεθεί στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και από εκεί να δράσει ως διακυτταρικός μεσολαβητής. Με αυτόν τον τρόπο ο παραγόμενος από τα ενδοθηλιακά κύτταρα PAF μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα, ενώ με παρόμοιο μηχανισμό ο PAF των ουδετερόφιλων μπορεί να ενεργοποιήσει την προσκόλληση αιμοπεταλίων σε αυτά δρώντας από την επιφάνεια τους.

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του μέσω υποδοχέων που έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί και κλωνοποιηθεί. Η σύνδεση του PAF με τους υποδοχείς του ενεργοποιεί πολλές ενδοκυτταρικές πορείες μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην τελική απόκριση του κύτταρου. Οι δράσεις του PAF έχουν μελετηθεί, τόσο in vitro σε καλλιέργειες κυττάρων και απομονωμένους ιστούς (Πίνακας 3.2), όσο και in vivo μετά από χορήγηση του PAF σε πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο (Πίνακας 3.3) [115].

<u>Πίνακας 3.2:</u> Δράσεις του PAF σε κύτταρα και απομονωμένους ιστούς

Είδος κυττάρου/ ιστού	***Δράσεις***
Αιμοπετάλια	Αποκοκκίωση, αλλαγή σχήματος, συσσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, συσσώρευση, χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίων, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας, έκκριση εικοσανοειδών
Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα	Συσσώρευση, σύνθεση εικοσανοειδών, παραγωγή υπεροξειδίων, παραγωγή IL-1, έκκριση λυσοσωμικών ενζύμων
Ηωσινόφιλα	Χημειοταξία, έκκριση κατιοντικών πρωτεϊνών, αύξηση κυτταροτοξικότητας, σύνθεση LTC4, παραγωγή υπεροξειδίων, μετανάστευση διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, σύνθεση IL-8, πολυμερισμός ακτίνης
Λεμφοκύτταρα	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2
Ενδοθηλιακά	Ανακατανομή κυτταροσκελετού και αλλαγή σχήματος, σύνθεση εικοσανοειδών, μετανάστευση, αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητα με τα ουδετερόφιλα
Νευρώνες	Αύξηση ενδοκυτταρικού Ca2+, ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-jun, έκκριση προλακτίνης
Σπερματοζωάρια	Αύξηση κινητικότητας, αύξηση της διεισδυτικότητας τους στον τράχηλο της μήτρας
Πρωτόζωα	Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβολή στη σύσταση των λιποειδών
Φυτικά κύτταρα	Ρύθμιση δραστικότητας H+ ATPασών, επίδραση στο φωτοσύστημα II των θυλακοειδών
Ήπαρ	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας, αύξηση έκκρισης γαλακτικού και οξαλοξικού οξέος
Πνεύμονες	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών, σύσπαση απομονωμένου πνευμονικού ιστού και μείωση της διατασιμότητάς του, αγγειοσύσπαση, πνευμονικό οίδημα
Καρδιά	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας, σύσπαση των στεφανιαίων, μείωση της ροής αίματος, πρόκληση αρρυθμιών
Έντερο	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση

<u>Πίνακας 3.3:</u> Δράσεις του PAF in vivo

Βρογχόσπασμος
Θρομβοπενία, ουδετεροπενία, βασεοφιλοπενία
Σηπτικό σοκ Μεσολαβητής του σηπτικού σοκ που επάγεται από βακτηριακές λοιμώξεις και χορήγηση ενδοτοξίνης
Αναφυλακτικές αντιδράσεις α) *Στο αναπνευστικό*: Μείωση αναπνευστικής συχνότητας, βρογχόσπασμος, αύξηση πνευμονικών αντιστάσεων, αύξηση της ενδοτικότητας του πνεύμονα, αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα πρόκληση πνευμονικού οιδήματος. Μεσολαβητής του άσθματος β) *Στο κυκλοφοριακό*: Μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης, αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης
Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα Αρνητική ινότροπη δράση, μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης (υπόταση), μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος, μείωση των περιφερειακών αντιστάσεων Καρδιακή ισχαιμία και κοιλιακές αρρυθμίες Συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης
Επίδραση στο πεπτικό σύστημα Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου, μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία Συμμετοχή στην παθογένεια του πεπτικού έλκους και της παγκρεατίτιδας
Επίδραση στο σύστημα αναπαραγωγής Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος, στην ωορρηξία, στην εμφύτευση του ωαρίου στη μήτρα και στην υπέρταση της εγκυμοσύνης Συμμετοχή στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού
Επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία Μεσολαβητής της εγκεφαλικής ισχαιμίας και του τραυματισμού των νευρώνων σε ισχαιμικές καταστάσεις Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και έκκριση ορμονών, ρυθμίζει τα επίπεδα των νευροπεπτιδίων Συμμετέχει στο LTP και θεωρείται ανάδρομος (retrograde) μεσολαβητής
Επίδραση στο ανοσολογικό Συμμετέχει στην ανοσολογική κυτταρική απόκριση, είτε άμεσα ρυθμίζοντας τα επίπεδα και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας τα λευκοκύτταρα και την παραγωγή εικοσανοειδών από αυτά. Μεσολαβητής της οξείας απόρριψης των μοσχευμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο
ΣΚΟΠΟΣ

Η μέτρια κατανάλωση κρασιού αποτελεί σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής Δίαιτας, αλλά και της Ελληνικής παράδοσης. Αρκετές μελέτες έχουν επισημάνει τις ευεργετικές ιδιότητες της μέτριας κατανάλωσης του κρασιού στην υγεία, ενώ ιδιαίτερος λόγος έχει γίνει για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται στο κρασί.

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) είναι ένα ισχυρότατο φλεγμονώδες μόριο. Ο PAF εμπλέκεται σε πληθώρα παθο-φυσιολογικών καταστάσεων και παίζει σημαντικό ρόλο στη έναρξη και διάδοση της αθηροσκλήρωσης και το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών. Στο κόκκινο κρασί έχουν βρεθεί βιοδραστικά συστατικά τα οποία εμφανίζουν σημαντική αντι-φλεγμονώδη και αντι-οξειδωτική δράση δρώντας με αυτό το τρόπο προστατευτικά. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο έχουν δείξει την ύπαρξη βιολογικά δραστικών ενώσεων στο κόκκινο κρασί Cabernet Sauvignon οι οποίες αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν την λιποξυγονάση.

Η παρούσα εργασία έχει σκοπό να προσδιορίσει την επίδραση εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon, αλλά και ορισμένων πρότυπων ενώσεων (ρεσβερατρόλη, κερκετίνη) στη δραστικότητα του ενζύμου λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράση, η οποία καταλύει το τελευταίο στάδιο της remodeling πορείας βιοσύνθεσης του PAF και ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής, καθώς υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που εξετάζουν τη σχέση αυτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 1^{ος} τρόπος εκχύλισης (Bligh-Dyer)

5.1.1 Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL) [128,129]

- *Όργανα:*
  - ✓ 2 διαχωριστικές χοάνες του 1L.
  - ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 και 500 mL.
  - ✓ 2 σφαιρικές φιάλες των 500 mL.
  - ✓ Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
  - ✓ Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης σε ελαττωμένη πίεση (flash evaporator)
- *Αντιδραστήρια:*
  - ✓ Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας.

❖ *Αρχή μεθόδου:*

Με κατάλληλης ποιότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών, καθώς επίσης και εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών (π.χ. άλατα, αμινοξέα, σάκχαρα, κλπ.). Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στη χλωροφορμική φάση (πολική φάση) κατανέμονται όλα τα λιποειδή, ενώ στην υδατική φάση κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

❖ *Αναλυτική πορεία:*

Το δείγμα εκχυλίζεται στη διαχωριστική χοάνη με μίγμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: νερού (1:2:0,8 v/v/v), και στη συνέχεια προστίθενται υπολογισμένες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού προκειμένου η αναλογία να γίνει 1:1:0,9 v/v/v. Η χλωροφορμική στιβάδα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης απομακρύνεται με περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης με ελαττωμένη πίεση σε θερμοκρασία 30-35° C. Τα λιποειδή μεταφέρονται σε μικρή ποσότητα μίγματος χλωροφορμίου – μεθανόλης σε δοκιμαστικό σωλήνα για περαιτέρω ανάλυση.

5.1.2 Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) – Κατανομή κατά αντιρροή [128,130]

- *Όργανα / Αντιδραστήρια:*
  - ✓ Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
  - ✓ Υάλινες πιπέτες Pasteur.
  - ✓ Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, αιθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας.

- *Αρχή μεθόδου:*

Τα ολικά λιποειδή κατανέμονται σε διφασικό σύστημα πετρελαϊκού αιθέρα – αιθανόλης (87%). Τα πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της αιθανόλης, ενώ τα ουδέτερα λιποειδή κατανέμονται στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Για τον καλύτερο ποσοτικό διαχωρισμό των λιποειδών, η πορεία αυτή πραγματοποιείται 8 φορές συνολικά.

- *Αναλυτική πορεία:*

Τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται και αναδιαλύονται σε 9,0 ml πετρελαϊκού αιθέρα προεξισορροπημένου με 87% αιθανόλη. Προστίθενται 3,0 ml αιθανόλης προεξισορροπημένης με πετρελαϊκό αιθέρα. Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Παραλαμβάνεται η αιθανολική φάση (κάτω φάση - πολική) η οποία μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει 9,0 ml πετρελαϊκό αιθέρα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της αιθανολικής φάσης. Στη συνέχεια προστίθεται στον πρώτο σωλήνα 3,0 ml 87% αιθανόλης και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία. Στο τέλος της όλης διαδικασίας, η αιθανολική φάση (8*3,0 ml) περιέχει τα φωσφολιποειδή, ενώ στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα (2*9,0 ml) περιέχονται τα ουδέτερα λιποειδή.

5.2 2^{ος} τρόπος εκχύλισης (διαχωρισμός κλασμάτων κρασιού ανάλογα με το φαινολικό τους περιεχόμενο)

- *Όργανα:*
  - ✓ Κωνικές εσμυρισμένες φιάλες
  - ✓ Υάλινα σιφώνια
  - ✓ Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
  - ✓ Υάλινες πιπέτες Pasteur
  - ✓ Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης σε ελαττωμένη πίεση (flash evaporator)
  - ✓ Αέριο άζωτο
  - ✓ Φυγόκεντρος Solval

- *Αντιδραστήρια:*

  - ✓ Οργανικοί διαλύτες (οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας
  - ✓ Αέριο άζωτο

- *Αρχή μεθόδου:*

Πραγματοποιώντας εκχύλιση υγρού-υγρού παραλαμβάνονται 4 κλάσματα τα οποία περιέχουν διαφορετικές τάξεις φαινολικών ενώσεων.

- *Αναλυτική πορεία:*

Απομακρύνεται η αλκοόλη από το δείγμα του κρασιού σε συσκευή εξάτμισης με περιστροφή υπό κενό σε θερμοκρασία 25-30°C. Στο υπόλειμμα της εξάτμισης (μη αλκοολούχο κρασί) ρυθμίζεται το pH 2.0 και εκχυλίζεται 3 φορές με 150 ml οξικού αιθυλεστέρα. Για τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 500 g για 10 λεπτά. Η υδατική φάση (κλάσμα FI) περιέχει τις ανθοκυανίνες ενώ η οργανική φάση η οποία περιέχει τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά εξατμίζεται μέχρι ξηρού και αναδιαλύεται σε 100 ml νερού pH 7.0. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ξανά εκχύλιση 3 φορές με 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση που προκύπτει (κλάσμα FII) περιέχει τις προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες και γλυκοζίτες της κερκετίνης. Στην υδατική φάση ρυθμίζεται το pH 2.0 και πραγματοποιείται ξανά εκχύλιση με 3 φορές 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση που προκύπτει (κλάσμα FIII) περιέχει τα φαινολικά οξέα, και το παράγωγο της κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ. Η υδατική αποτελεί το κλάσμα FIV και περιέχει τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά. Όλα τα κλάσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο νερού (υδατικές) ή αιθανόλης (οργανικές).

5.3 Χημικοί προσδιορισμοί

5.3.1 Προσδιορισμός φωσφόρου [128,131]

- *Όργανα:*

  - ✓ Ατμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180 ^{o}C
  - ✓ Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/ Novaspec II
  - ✓ Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
  - ✓ Υάλινα σιφώνια
  - ✓ Φιάλη αζώτου

- *Αντιδραστήρια:*

  - ✓ Υπερχλωρικό οξύ 70%.
  - ✓ Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4%
    Ζυγίζονται 2,125g μολυβδαινικού αμμωνίου και διαλύονται σε αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 500ml.
  - ✓ Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ)
    Διαλύονται 30g $NaHSO_3$ και 6g Na_2SO_3 σε 250ml H_2O. Στο διάλυμα αυτό των θειωδών αλάτων διαλύεται 0,5g από 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ. Μετά από 3 ώρες αναμένεται να έχει σχηματιστεί ίζημα. Το αντιδραστήριο διηθείται και φυλάσσεται σε ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο για χρήση ένα μήνα μετά την παρασκευή του.
  - ✓ Αντιδραστήριο ANSA:
    Παρασκευάζεται πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού (αναμιγνύονται 2ml πρότυπο δ/μα ANSA και 3ml νερό).
  - ✓ Πρότυπο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου - 4μg φωσφόρου/ml

- ❖ *Αρχή μεθόδου:*

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή με καύση, παρουσία υπεχλωρικού οξέος, του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα. Στη συνέχεια με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο το οποίο παρουσία του ANSA σαν αναγωγικού μέσου και θέρμανση σε όξινο περιβάλλον, ανάγεται προς κυανούν του φωσφομολυβδαινίου.

- ❖ *Αναλυτική πορεία:*

Το δείγμα που περιέχει 0,5 -5 μg φωσφόρου φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα pyrex, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου, προστίθενται 0,5ml υπερχλωρικού οξέος και τοποθετείται σε αμμόλουτρο 170 – 180 ^oC για 1 ώρα. Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν τα δείγματα, προστίθενται 1ml νερό, 3 ml μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος, 0,5 ml αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 100^oC για 10 min. Αφήνονται να ψυχθούν για 20 min και φωτομετρούνται στα 820 nm. Παράλληλα, γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου.

5.3.2 Προσδιορισμός σακχάρων [128,132]

- *Όργανα:*
  - ✓ Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II
  - ✓ Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
  - ✓ Υάλινα σιφώνια
- *Αντιδραστήρια:*
  - ✓ Πυκνό θεϊκό οξύ 96%
  - ✓ Διάλυμα φαινόλης 5% w/v
  - ✓ Πρότυπο δ/μα γλυκόζης 15mg/ml

❖ *Αρχή μεθόδου:*

Οι εξόζες με την επίδραση πυκνού θειικού οξέος σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη η οποία με φαινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490 nm. Η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει επιπρόσθετο αποτέλεσμα και την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των εξοζών. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται και οι πεντόζες.

❖ *Αναλυτική πορεία:*

Το δείγμα, το οποίο περιέχει 20-150 μg σακχάρου, φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθεται 1ml νερού, 1ml διαλύματος φαινόλης και 2,5 ml διαλύματος πυκνού θειικού οξέος. Ύστερα από παραμονή 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 490 nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με δείγματα που περιέχουν 20-150 μg γλυκόζης.

5.3.3 Προσδιορισμός φαινολικών [128,133]

- *Όργανα:*
  - ✓ Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II
- *Αντιδραστήρια:*
  - ✓ Πρότυπο διάλυμα τυροσόλης συγκέντρωσης 1mg/ml αιθανόλης
  - ✓ Διάλυμα Na_2CO_3 35% w/v

- ✓ Διάλυμα Folin – Ciocalteu:
  Διαλύονται 10g βολφραμικού νατρίου και 2,5g μολυβαινικό νάτριο σε 70 ml νερό. Προστίθενται 5ml φωσφορικού οξέος 85% και 10ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το όλο μίγμα αφήνεται σε επαναρροή για 10 ώρες. Ύστερα προστίθενται 16g θειικού λιθίου, 5ml νερό και μια σταγόνα βρωμίου και ακολουθεί επαναρροή για 15 λεπτά. Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φέρεται σε όγκο 100ml συμπληρώνοντας με νερό (εξασθενημένα σύμπλοκα των φωσφομολυβδαινικού/ φωσφοβολφραμικού οξέων με τις ακόλουθες μορφές σχηματίζονται στο διάλυμα: $3H_2O \cdot P_2O_5 \cdot 13WO_3 \cdot 5MoO_3 \cdot 10H_2O$, $3H_2O \cdot P_2O_5 \cdot 14WO_3 \cdot 4MoO_3 \cdot 10H_2O$).

❖ *Αρχή μεθόδου:*

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

❖ *Αναλυτική πορεία:*

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται διαδοχικά 3,5ml νερό, 0,1ml Folin – Ciocalteu και αναδεύουμε ισχυρά. Μετά από παραμονή 3 λεπτών προστίθενται 0,4ml Na_2CO_3 35% και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως αφήνεται προς αντίδραση για μία ώρα και φωτομετρείται στα 725nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος από 1 – 60μg οπότε και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με βάση την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος.

5.3.4 Προσδιορισμός ορθο-φαινολικών [128,134]

➢ *Όργανα-Αναλώσιμα:*

- ✓ Φωτόμετρο
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10ml
- ✓ Κυψελίδες φωτομέτρου (micro)

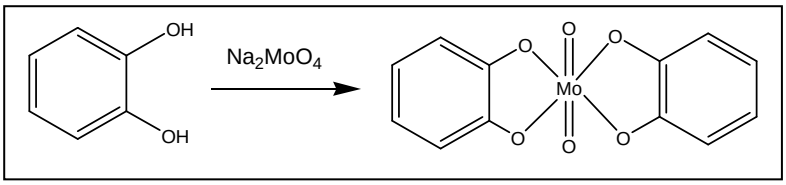
➢ *Στερεά Αντιδραστήρια:*

- ✓ Κερκετίνη
- ✓ Ένυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο (Na_2MoO_4 x $2H_2O$)

- *Διαλύματα:*
  - ✓ Διάλυμα Κερκετίνης 1mM σε EtOH:
    Ζυγίζονται 0,0017g Κερκετίνης και διαλύονται σε 5ml EtOH.
  - ✓ Διάλυμα $Na_2MoO_4x2H_2O$ 1,087% w/v σε H_2O:EtOH 1:1:
    Ζυγίζονται 0,5435g $Na_2MoO_4x2H_2O$ και διαλύονται σε 50ml H_2O:EtOH 1:1.

❖ *Αρχή Μεθόδου:*

Τα ιόντα του Mo, MoO_4^{2-}, σχηματίζουν σύμπλοκη ένωση με την ορθο-διφαινόλη μέσω και των δύο υδροξυλίων της:



Το σύμπλοκο αυτό έχει μέγιστη απορρόφηση στα 370nm.

❖ *Αναλυτική Πορεία:*

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 100μl αιθανόλης και 1150μl διαλύματος $Na_2MoO_4x2H_2O$ 1,087% w/v και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Μετά από παραμονή 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα φωτομετρείται στα 370nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός, καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα φαινολικών ενώσεων που περιέχουν ορθο-υδροξύλια, συγκέντρωσης από 5 έως 80 μM, οπότε κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, βάσει της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε ορθο-φαινολικές ενώσεις.

5.4 Καλλιέργεια μονοκυττάρων

Χρησιμοποιήθηκε μια σταθερή κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα μακροφάγα μέσω διαφόρων παραγόντων συμπεριλαμβανομένου και του 12-myristate 13-acetate (PMA). Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε από ένα διάχυτο ιστοκυτταρικό λέμφωμα ενός άνδρα ασθενή 37 ετών και διατηρεί τα χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων, τους Fc υποδοχείς (+) και άλλων καθιστώντας την ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη τους στο εργαστήριο. Η μορφολογία των κυττάρων της κυτταρικής σειράς είναι πανομοιότυπη με αυτή των καρκινικών κυττάρων της υπεζωκοτικής συλλογής από την οποία η σειρά δημιουργήθηκε. Η ιστοκυτταρική καταγωγή της σειράς φαίνεται από την ικανότητα της για παραγωγή λυσοζύμης και την έντονη δραστικότητα εστεράσης των κυττάρων. Τα U937 είναι μυελοειδούς καταγωγής και αποτελούν πρόδρομη μορφή μονοκυττάρων (προμονοκύτταρα). Μπορούν να μετατραπούν σε μονοκύτταρα με την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Παράγουν μεγάλο αριθμό κυτταροκινών και χημειοκινών, είτε σε βασικά επίπεδα (IL-1, GM-CSF), είτε σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων. Τα U937 χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο ως κυτταρικό μοντέλο μελέτης της διέγερσης και της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και για μελέτες αντικαρκινικής δράσης.

- *Όργανα:*
  - ✓ Δοχεία καλλιέργειας 75 cm^2 και 25 cm^2
  - ✓ Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL
  - ✓ Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL
  - ✓ Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 5% και σταθερής θερμοκρασίας 37° C
  - ✓ Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής, aura B4
  - ✓ Φυγόκεντρος HERMLE Z320
  - ✓ Μικροσκόπιο

- *Αντιδραστήρια:*
  - ✓ RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK)
  - ✓ Ορός εμβρύων μόσχου (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK):
    Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20° C.
  - ✓ L-Γλουταμίνη (Sigma):
    Το διάλυμα συγκέντρωσης 200mM χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20° C.

- ✓ Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma):
  Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20° C.
- ✓ Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v)
- ✓ Trypan Blue:
  Αναδιαλύονται 0,4g στερεού trypan blue σε 100ml dH2O με 0,81g NaCL (0,81%) και 0,06g μονόξινο φωσφορικό κάλιο (0,06%).

❖ *Αναλυτική πορεία:*

Τα κύτταρα, U937, καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε RPMI 1640, 10% FCS, 2 mmol/ L γλουταμίνη, 0,1 g/L στρεπτομυκίνη, 105 units/L πενικιλίνη σε δοχεία καλλιέργειας 25 cm^2 και 75 cm^2. Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα με 5% CO_2 και 95% υγρασία. και θερμοκρασία 37° C. Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Η διαδικασία απαιτούσε φυγοκέντριση στα 250g για 10 min, αναρρόφηση υπερκείμενου και αναδιασπορά σε νέο θρεπτικό υλικό με τελική συγκέντρωση 0,7x10^6 κύτταρα/mL. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιούνταν με χρώση με Trypan Blue και μέτρηση των κυττάρων με το αιματοκυττόμετρο στο μικροσκόπιο. Για τη μέτρηση πραγματοποιείται αραίωση 1:1 του διαλύματος των κυττάρων με το διάλυμα της χρωστικής.

5.5 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford [135]

➢ *Αντιδραστήρια:*

- ✓ Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) 1 mg/ml:
  Διαλύονται 5 mg BSA σε 5 ml νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα
- ✓ Stock διάλυμα Coomasie Blue G:
  100mg σε 50 ml MeOH και αυτό προστίθεται σε 100 ml H3PO4 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200 ml με H2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 40°C.
- ✓ Αντιδραστήριο Bradford (working διάλυμα):
  1 ml από το αντιδραστήριο Bradford (stock) αναμιγνύεται με 4 ml απιονισμένο νερό

➢ *Όργανα:*

- ✓ Φωτόμετρο 4040-LKB Biochrom, Novaspec

❖ *Αρχή μεθόδου:*

Η χρωστική που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford συμπλέκεται με τις πρωτεΐνες (βασικά και αρωματικά αμινοξέα) προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465 (καφέ χρώμα) σε 595 nm(μπλε χρώμα). Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης – χρωστικής σταθεροποιείται σε 5 λεπτά και παραμένει σταθερό για 45 λεπτά. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 μg σε 140 μg πρωτεΐνης, ως προς BSA.

❖ *Αναλυτική πορεία:*

Σε κυψελίδες φωτομέτρου του 1 ml προστίθεται νερό και κατάλληλες ποσότητες από το πρότυπο διάλυμα BSA ή το άγνωστο διάλυμα (1-10 μg). Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου Bradford. Προσδιορίζεται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων μετά από 5 min στα 595 nm. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 1 ml. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης χρωστικής είναι σταθερό για 60 min. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.6 Ανίχνευση της δραστικότητας της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης (λυσο-PAF AT) [113]

5.6.1 Προσδιορισμός της δραστικότητας της λυσο-PAF AT με TLC

➢ *Όργανα:*

- ✓ Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Ανακινούμενο υδρόλουτρο

➢ *Αναλώσιμα:*

- ✓ Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- ✓ Tips κίτρινα, μπλε

➢ *Στερεά αντιδραστήρια:*

- ✓ Tris
- ✓ Sucrose
- ✓ lyso-PAF ($C_{16:0}$) (Sigma)
- ✓ Ακετυλο-CoA (Sigma)
- ✓ BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)
- ✓ Silica gel G

- *Διαλύτες:*
  - ✓ MeOH
  - ✓ $CHCl_3$
  - ✓ AcOH

- *Διαλύματα:*
  - ✓ Διάλυμα φύλαξης (stock) λυσο-PAF 2,5 mg/ml:
    Διαλύονται 10 mg λυσο-PAF σε 4 ml MeOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20° C.
  - ✓ Διάλυμα ακετυλο-CoA 20 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7,4):
    Διαλύονται 25 mg σε 1540 ml ρυθμιστικού διαλύματος.
  - ✓ Διάλυμα BSA 10 mg/ml:
    Διαλύονται 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7,4).
  - ✓ Διάλυμα λυσο-PAF σε BSA (10mg/ml) συγκέντρωσης 800 μM (διάλυμα εργασίας):
    Φέρονται 40 μL διαλύματος λυσο-PAF 2,5 mg/ml σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε 259 μL BSA 10 mg/ml. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση λυσο-PAF 20 μM και τελική συγκέντρωση BSA 0,25 mg/ml.
  - ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4):
    Διαλύονται 0,605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 ml νερό.
  - ✓ Διάλυμα αναδιάλυσης Tris (50 mM-pH 7,4)-Suc 0,25 M-DTT 1 mM:
    Διαλύονται 0,605 g Tris, 8,55 g σακχαρόζης και 0,0154 g DTT σε 100 ml νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl 1 N.

- ❖ *Αρχή μεθόδου:*

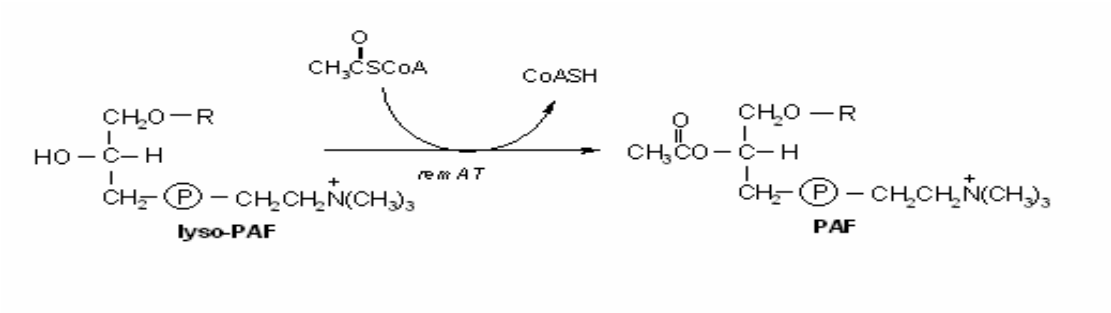
Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της re*m AT* βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF, μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με λυσο-PAF και ακετυλο-CoA, παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογικό πείραμα.

Η TLC των λιποειδών είναι μια τεχνική χρωματογραφικού διαχωρισμού τους, κατά την οποία ο διαχωρισμός των λιποειδικών ενώσεων επιτυγχάνεται λόγω διαφορετικής κατανομής τους σε μη μιγνυόμενους διαλύτες και λόγω διαφορετικής προσρόφησής τους στη στατική φάση της πηκτής του οξειδίου του πυριτίου (SiO_2), κατά τη διέλευση της κινητής φάσης από τη στατική φάση μέσω τριχοειδικών φαινομένων. Η ανίχνευση των λιποειδικών ουσιών πάνω στην χρωματογραφική πλάκα γίνεται οπτικά, με χρήση διάφορων ειδικών αντιδραστηρίων εμφάνισης. Ο λόγος της απόστασης της κίνησης της λιποειδικής ουσίας προς την απόσταση κίνησης του διαλύτη καλείται συντελεστής ανάσχεσης Rf (frontal ratio ή retardation factor) και αποτελεί στοιχείο ταυτοποίησης των ουσιών.

❖ *Αναλυτική πορεία:*

- *<u>Ενζυμική δοκιμασία:</u>*

1. Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), 5 μL διαλύματος εργασίας λυσο-PAF (τελική συγκέντρωση 20 μM), 2 μL διαλύματος ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200 μM) και το δείγμα (ρεσβερατρόλη, κερκετίνη ή PL). Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μL.
2. Προεπώαση για 5 min στους 37° C
3. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του δείγματος (ενζυμικό παρασκεύασμα).
4. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37° C για 10 min. Τα υποστρώματα της αντίδρασης είναι ο λυσο-PAF και το ακετυλο-CoA, και η ποσότητα της πρωτεΐνης περιέχεται στο κάθε δείγμα είναι 10μg.



<u>Σχήμα 5.1:</u> Ακετυλίωση λυσο-PAF προς PAF, με ένζυμο τη λυσο-PAF AT

- *<u>Προσδιορισμός παραγόμενου PAF:</u>*

1. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300 μL παγωμένου H_2O και 1111 μL μίγματος $CHCl_3$/MeOH (2 % AcOH).
2. Μετά από έντονη ανάδευση φυγοκεντρείται το μίγμα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση, η οποία εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο και φέρεται σε πλάκα TLC επιστρωμένη με Silica gel G.

3. Η πλάκα αναπτύσσεται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης C:M:AcOH:W (100:57:16:8).
4. Μετά το τέλος της ανάπτυξης, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I_2.
5. Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ PC και λυσο-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.
6. Το ξύσμα φέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ο PAF εκχυλίζεται με 2 ml μίγματος C:M:W (1:2:0,8) (x2). Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα C και W ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση που περιέχει τον PAF, η οποία φυλάσσεται στους –20°C.

5.6.2 Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και ποσοτικός προσδιορισμός PAF (βιολογική δοκιμασία **in vitro***)* [128,136]

- *Όργανα:*
  - ✓ Συσσωρευματόμετρο (Chrono – log)
  - ✓ pHμετρο (ORION 410A)
  - ✓ Φωτόμετρο Bausch-Lomb
  - ✓ Υδρόλουτρο 37° C
  - ✓ Φυγόκεντρος Sorval RC-5B Refrigerated, DuPont
- *Αντιδραστήρια:*
  - ✓ Διάλυμα 10 x Tyrodes stock:
    Σε 1lt περιέχονται 80g NaCl, 1,95g KCl, 2,13g $MgCl_26H_2O$, 10g γλυκόζη.
  - ✓ Διάλυμα 100 x $CaCl_2$ stock:
    Ποσότητα 1,911g σε 100 ml νερό.
  - ✓ Διάλυμα 0,2M EGTA stock:
    Ποσότητα 0,76g EGTA διαλύεται σε 10ml H_2O. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5M.
  - ✓ Διάλυμα ζελατίνης 10% w/v σε νερό
  - ✓ Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pHμέτρου
  - ✓ Διαλύματα Tyrodes-Zelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Zelatin-EGTA pH 6,5 (Tg-EGTA pH 6,5):
    Σε 80ml νερό προστίθενται 10ml Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5ml διαλύματος $NaHCO_3$ (0,203g $NaHCO_3$ σε 10ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δυο τμήματα των 50ml. Στο ένα από τα δυο προστίθενται

25μl EGTA 0,2 M. Ρυθμίζεται το pH και των δυο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 16ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ✓ Διάλυμα Tyrodes - Ca pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2):
  Σε 5ml Tyrodes 10x stock προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5ml $CaCl_2$ 100x. Κατόπιν, προστίθενται 2,5ml $NaHCO_3$ (παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1N. Διατηρείται στους 37° C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- ✓ Αντιπηκτικό διάλυμα ACD:
  Σε 1000ml νερό περιέχονται 13,65g κιτρικού οξέος, 25g κιτρικού νατρίου και 20g δεξτρόζης.
- ✓ Διάλυμα βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) stock:
  Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) διαλύεται σε 1ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους -20° C.
- ✓ Διάλυμα BSA 2,5mg/ml φυσιολογικού ορού:
  Από 10ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μl και προστίθενται 250μl BSA stock.
- ✓ Ficoll-Paque (Pharmacia)
- ✓ Υλικό επίστρωσης σιλικόνης (Serva)

❖ *Αναλυτική πορεία:*

1. *<u>Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού</u>:*

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού, ο σωλήνας γεμίζεται μέχρι τα 50ml και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στους 24° C στα 500g (~1850rpm). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης μεταφέρουμε 2ml Ficoll-paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14ml. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσια σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό πλάσματος τα 9ml για κάθε 2ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζουμε με parafilm και οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24° C στα 750g (2200rpm), οπότε τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

α) Αν υπάρχουν 2 σωλήνες: προστίθενται 7ml (Tg-EGTA pH 6,5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να διαχυθεί ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα.

β) Αν υπάρχουν 3 σωλήνες: προστίθενται 3ml (Tg-EGTA pH 6,5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να διαχυθεί ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14ml του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε 2 ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3ml (Tg-EGTA pH 6,5).

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2ml Ficoll (8ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στους 24° C στα 2400rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα των αιμοπεταλίων με πιπέτα Pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με πιπέτα Pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

Στη συνέχεια, προστίθενται όγκοι (~8ml) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να διαχυθεί στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14ml και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15min στους 24° C στα 2350 rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με πιπέτα Pasteur αφαιρώντας και την τελευταία σταγόνα από τα τοιχώματα του δοχείου.

Προστίθενται με αυτόματη πιπέτα 0,8ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε έναν πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25x10^{8}$ κύτταρα/ ml: Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10μL τα οποία αραιώνονται με 990μL Tg pH 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10μL δίνεται από τον τύπο: Αρ. Κυττάρων / 10μL = A x $1,25 \times 10^{8}$, όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων, υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων [137].

2. *Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού:*

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 50μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 200μL Tg-Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας, που περιστρέφεται με 1200rpm. Επωάζονται για 15min σε υδρόλουτρο 37° C. Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του συσσωρευματομέτρου με Tg-Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων. Κατόπιν, τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με τη συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100% συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματόμετρου (τελική συγκέντρωση). Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα ομοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF.

Τέλος, αφού είναι γνωστή η συγκέντρωση του PAF στο κάθε εξεταζόμενο δείγμα, προσδιορίζεται η δράση των εκχυλισμάτων του κρασιού και των πρότυπων ενώσεων στη δράση του ενζύμου που μελετάμε, δηλαδή στη δράση της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Δείγμα

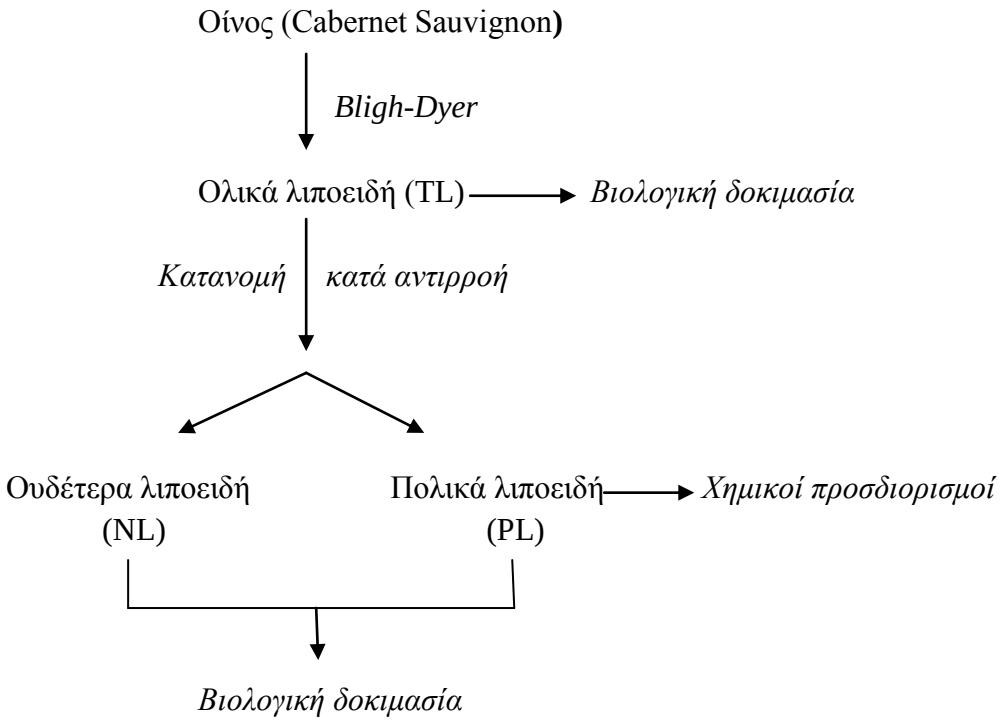
Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ερυθρός οίνος από το κτήμα Χατζημιχάλη. Συγκεκριμένα, είναι το:

- **Cabernet Sauvignon 2003**

Ερυθρός, ξηρός οίνος του 2003, 750 ml (13,5% vol), κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon

6.2 Απομόνωση και διαχωρισμός λιποειδών από τον οίνο

Η αναλυτική πορεία παρουσιάζεται σχηματικά ως εξής:



Σχήμα 6.1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας απομόνωσης και διαχωρισμού των λιποειδών από τον οίνο

6.2.1 1^{ος} τρόπος εκχύλισης (Bligh-Dyer)

6.2.1.1 Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL)

Έγινε εκχύλιση των ολικών λιποειδών από τον οίνο (750ml) με τη μέθοδο Bligh – Dyer (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5). Στους υπολογισμούς λήφθηκε υπόψη η περιεκτικότητα του κρασιού σε αλκοόλη. Τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε αέριο άζωτο, ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία -20° C έως την επόμενη χρήση τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

6.2.1.2 Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL)

Τα ολικά λιποειδή του κρασιού (TL), διαχωρίστηκαν σε πολικά (PL) και σε ουδέτερα (NL) λιποειδή με κατανομή κατά αντιρροή. Τόσο τα πολικά όσο και τα ουδέτερα λιποειδή, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη και αποθηκεύτηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία -20° C.

Πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

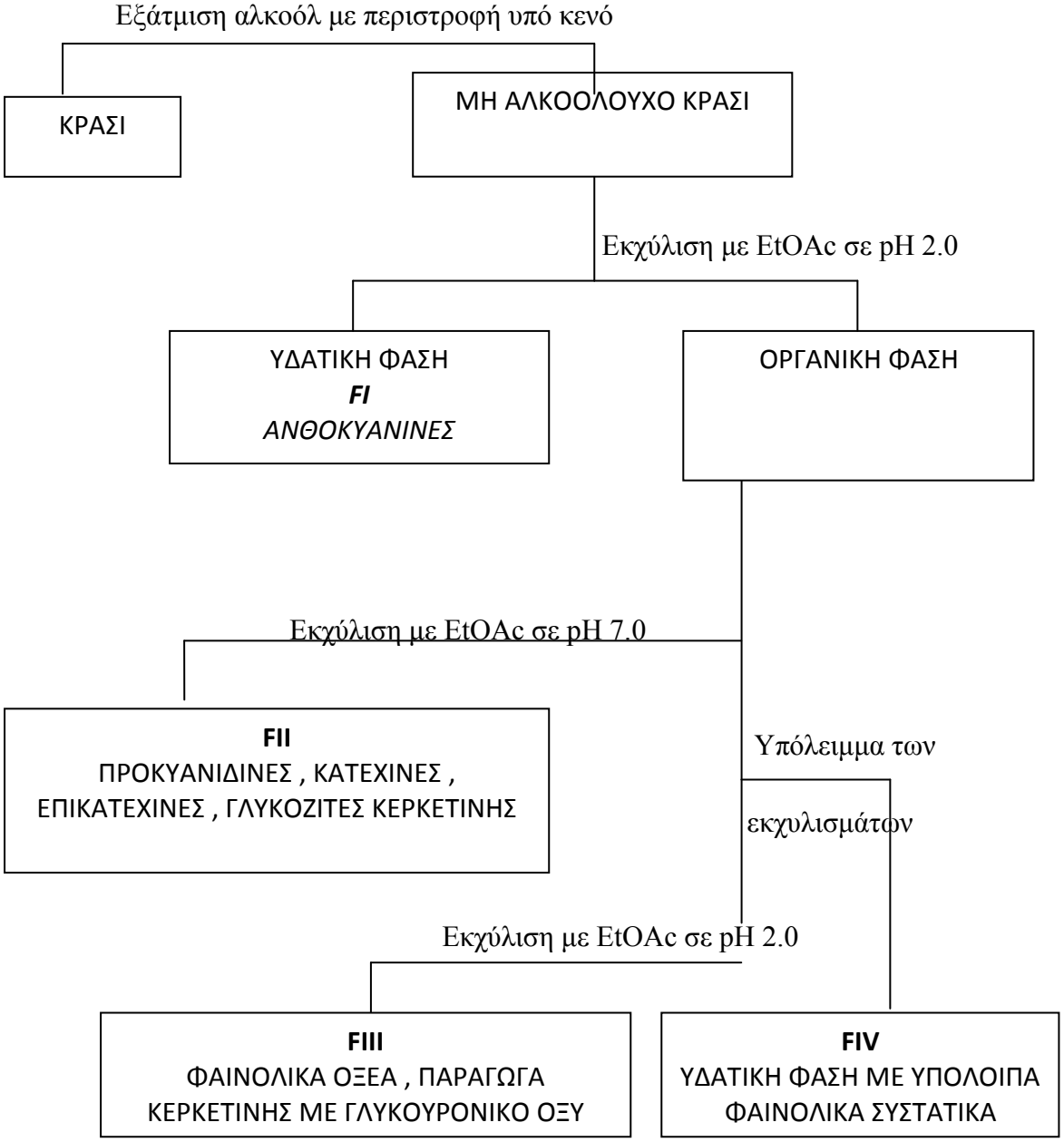
Πίνακας 6.1: Ποσοτικά αποτελέσματα των W, TL, PL, NL για το κρασί Cabernet Sauvignon

Κλάσματα κρασιού	*Δείγμα (g)*
W (νερό)	23,2 (97,5%)
TL (ολικά λιποειδή)	0,596 (2,5% w/w)
PL (πολικά λιποειδή)	0,558 (93,6% TL)
NL (ουδέτερα λιποειδή)	0,001 (0,2% TL)

Μια πρώτη παρατήρηση μετά την εκχύλιση Bligh-Dyer είναι ότι το 97,5% του εκχυλίσματος του κρασιού αποτέλεσε την υδατική φάση (W) και το υπόλοιπο 2,5% ήταν τα ολικά λιποειδή (TL). Από αυτά, το 93,6% ήταν το κλάσμα που περιείχε τα πολικά λιποειδή (PL) και το υπόλοιπο 0,2% ήταν το κλάσμα των ουδέτερων λιποειδών (NL).

6.2.2 2^{ος} τρόπος εκχύλισης (διαχωρισμός κλασμάτων κρασιού ανάλογα με το φαινολικό τους περιεχόμενο)

Ο δεύτερος τρόπος εκχύλισης είχε σκοπό να διαχωριστεί το φαινολικό περιεχόμενο του κρασιού στις επιμέρους τάξεις φαινολικών ενώσεεων. Το σχεδιάγραμμα της διαδικασίας παρουσιάζεται στο σχήμα 6.2. Μετά από διαδοχικές εκχυλίσεις, παραλαμβάνονται 4 διαφορετικά εκχυλίσματα οίνου που περιέχουν διαφορετικές τάξεις φαινολικών ενώσεων.



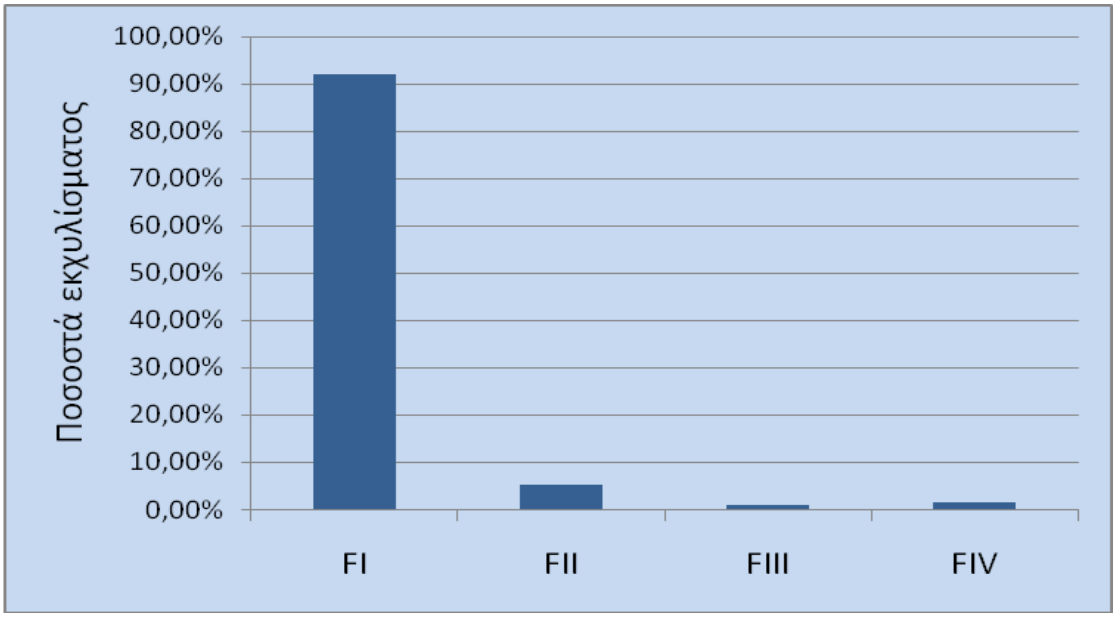
Σχήμα 6.2: Τα κλάσματα με τις διαφορετικές τάξεις φαινολικών ενώσεων που προκύπτουν μετά τον διαχωρισμό με τις διαδοχικές εκχυλίσεις

Το κάθε εκχύλισμα περιέχει και διαφορετικές ποσότητες φαινολικών ενώσεων όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2: Ποσότητα των κλασμάτων των διαφορετικών τάξεων φαινολικών ενώσεων στο κρασί Cabernet Sauvignon

Δείγμα	*Ποσότητα κλάσματος (g και ποσοστά)*
FI	23,5 (92,1%)
FII	1,35 (5,30%)
FIII	0,27 (1,07%)
FIV	0,38 (1,49%)

Το FI κλάσμα ήταν το 92,1% του οίνου προς εκχύλιση και περιέχει τις ανθοκυανίνες, το 5,3% ήταν το FII κλάσμα με τις προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες, γλυκοζίτες κερκετίνης, το 1,1% ήταν το FIII με τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγα κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ και τέλος το 1,5% αποτέλεσε την υδατική φάση με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις, και αποτέλεσε το FIV κλάσμα.



Σχήμα 6.3: Ποσοστά εκχυλίσματος σε κάθε κλάσμα του κρασιού Cabernet Sauvignon

Το FI κλάσμα, που αποτελείται από τις ανθοκυανίνες, περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλίσματος, όπως προέκυψε από τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων. Τα κλάσματα FIII και FIV περιέχουν σχεδόν αμελητέα ποσότητα του εκχυλίσματος, ενώ το FII περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα από αυτά, η οποία όμως είναι αρκετά μικρή σε σχέση με το κλάσμα FI.

6.3 Αποτελέσματα χημικών προσδιορισμών

Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, χημικοί προσδιορισμοί, με σκοπό να γίνει μια πρώτη διερεύνηση της σύστασης του εκχυλίσματος των ολικών και πολικών λιποειδών και του υδατικού κλάσματος. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αναφέρονται παρακάτω.

6.3.1 Προσδιορισμός φωσφόρου

Για τον προσδιορισμό του φωσφόρου στα κλάσματα του Cabernet Sauvignon μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε η ποσότητα του φωσφόρου στο εκάστοτε δείγμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους συνοπτικούς πίνακες 6.3 και 6.4.

6.3.2 Προσδιορισμός σακχάρων

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στα κλάσματα του Cabernet Sauvignon μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε η ποσότητα της γλυκόζης στο εκάστοτε δείγμα που φωτομετρήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους συνοπτικούς πίνακες 6.3 και 6.4.

6.3.3 Προσδιορισμός φαινολικών

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών στα κλάσματα του Cabernet Sauvignon μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε η ποσότητα φαινολικών που περιείχαν. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους συνοπτικούς πίνακες 6.3 και 6.4.

6.3.4 Προσδιορισμός ορθο-φαινολικών

Για τον προσδιορισμό των ορθο-φαινολικών στα κλάσματα του Cabernet Sauvignon μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε η ποσότητα ορθο-φαινολικών ενώσεων που περιείχαν. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους συνοπτικούς πίνακες 6.3 και 6.4.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα των χημικών προσδιορισμών στο υδατικό κλάσμα και στα κλάσματα TL και PL στο Cabernet Sauvignon, παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 6.3: Συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων των χημικών προσδιορισμών στο υδατικό κλάσμα και στα κλάσματα των TL και PL του κρασιού Cabernet Sauvignon

	W	*TL*	*PL*
Συγκέντρωση ολικών φαινολικών	2220 ±250 (7,19 ±0,81)	65,7 ±5,8 (8,88 ±0,79)	41,7 ±3,88 (6,34 ±0,59)
Συγκέντρωση ορθο – φαινολικών	485 ±64,9 (1,57 ±0,21)	14,4 ±1,7 (1,95 ±0,23)	11,7 ±1,25 (1,78 ±0,19)
Συγκέντρωση υδατανθράκων	6920 ±958 (22,41 ±3,1)	33,6 ±3,77 (4,54 ±0,51)	22,3 ±2,7 (3,47 ±0,41)
Συγκέντρωση οργανικού φωσφόρου	Δεν ανιχνεύθηκε	-	0,077 ±0,01 (0,012 ±0,002)
Συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου	111 ±13,9 (0,36 ±0,04)	-	-

*Τα αποτελέσματα για τα φαινολικά εκφράζονται ως mg γαλλικού οξέος / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση γαλλικού οξέος, για τα ορθο – φαινολικά ως mg κερκετίνης / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση κερκετίνης, για τους υδατάνθρακες ως mg γλυκόζης / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση γλυκόζης και για τον οργανικό φώσφορο ως mg φωσφόρου / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση φωσφόρου σε κάθε κλάσμα κρασιού.
- Όπου υπάρχουν κενά δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα των χημικών προσδιορισμών στα κλάσματα του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon που προήλθαν από το 2^{ο} τρόπο εκχύλισης:

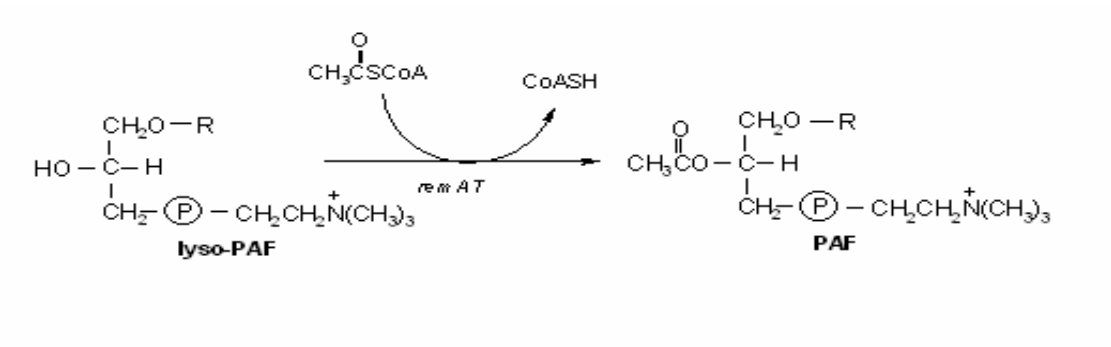
Πίνακας 6.4: Αποτελέσματα των χημικών προσδιορισμών στα δείγματα των κλασμάτων του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon που προέκυψαν από το 2^{ο} τρόπο εκχύλισης

	FI	*FII*	*FIII*	*FIV*
Συγκέντρωση ολικών φαινολικών	2950 ±273 (9,4 ±0,86)	457 ±62 (25,1 ±3,4)	35,6 ±3,6 (9,67 ±0,98)	33,2 ±3,89 (6,49 ±0,76)
Συγκέντρωση ορθο – φαινολικών	468 ±63,4 (1,49 ±0,2)	122 ±13,7 (6,7 ±0,75)	8,36 ±0,77 (2,27 ±0,21)	6,9 ±0,77 (1,35 ±0,15)
Συγκέντρωση υδατανθράκων	2260 ±270 (7,2 ±0,85)	115 ±14,2 (6,32 ±0,78)	21 ±2,54 (5,7 ±0,69)	66,2 ±11,8 (12,9 ±2,3)
Συγκέντρωση οργανικού φωσφόρου	Δεν ανιχνεύθηκε	0,268 ±0,036 (0,015 ±0,002)	0,063 ±0,008 (0,017 ±0,002)	0,12 ±0,02 (0,024 ±0,003)
Συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου	114 ±17,8 (0,43 ±0,06)	-	-	0,159 ±0,02 (0,031 ±0,004)

*Τα αποτελέσματα για τα φαινολικά εκφράζονται ως mg γαλλικού οξέος / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση γαλλικού οξέος, για τα ορθο – φαινολικά ως mg κερκετίνης / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση κερκετίνης, για τους υδατάνθρακες ως mg γλυκόζης / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση γλυκόζης και για τον οργανικό φώσφορο ως mg φωσφόρου / L κρασιού και ως % w/w συγκέντρωση φωσφόρου σε κάθε κλάσμα κρασιού.
- Όπου υπάρχουν κενά δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις.

6.4 Ανίχνευση της δραστικότητας της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης (λυσο-PAF AT)

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων στη δράση της λυσο-PAF AT πραγματοποιήθηκε η αντίδραση απουσία και παρουσία των εκχυλισμάτων. Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ομογενοποίημα από την κυτταρική σειρά U-937. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε όπως αναλυτικά αναφέρεται στη μεθοδολογία με 10 μg πρωτεΐνης ομογενοποιήματος και με χρόνο επώασης τα 10 min. Τα υποστρώματα της αντίδρασης είναι 20μM λυσο-PAF και 200μM ακετυλο-CoA. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι σχηματικά η ακόλουθη:

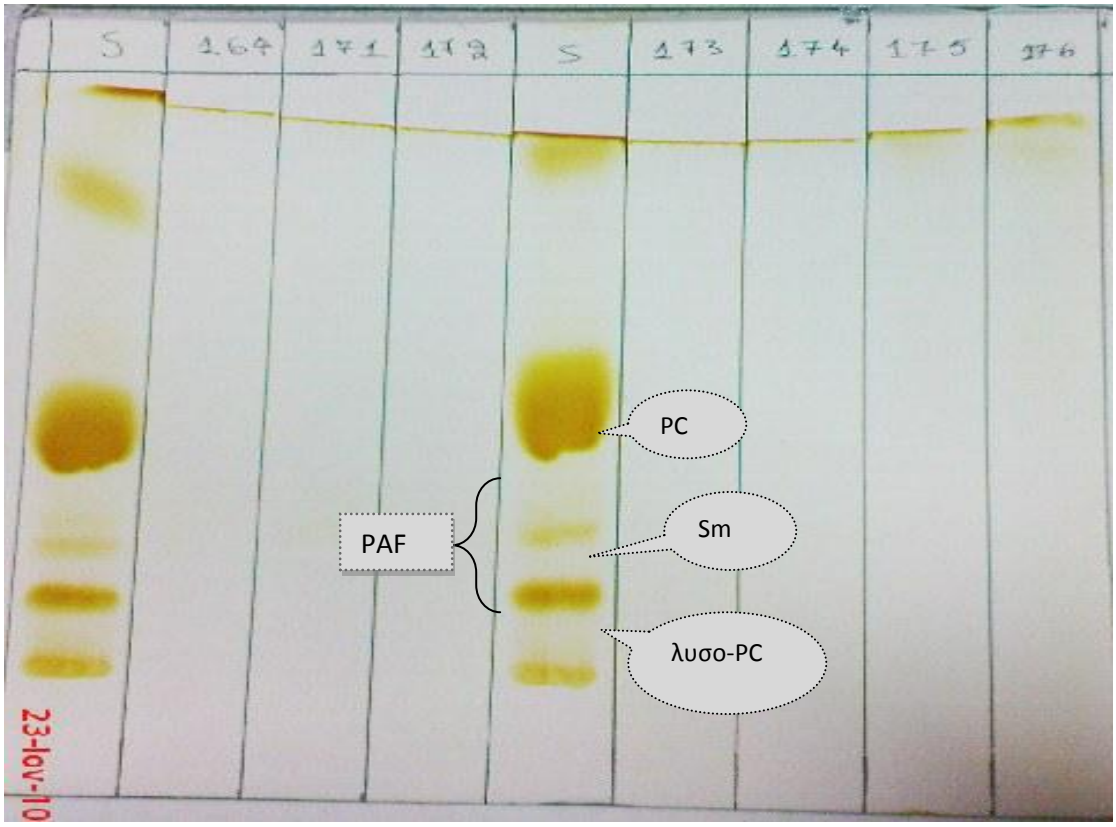


Σχήμα 6.4: Ακετυλίωση λυσο-PAF προς PAF, με ένζυμο τη λυσο-PAF AT

Μετά τα 10 min η αντίδραση σταματούσε με προσθήκη οργανικού διαλύτρη και παραλαβή του κλάσματος του παραγόμενου PAF με τη μέθοδο Bligh-Dyer.

6.4.1 Διαχωρισμός του παραγόμενου PAF με TLC

Με σκοπό να διαχωριστεί ο PAF από τα άλλα λιποειδή πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC. Μετά το τέλος της ανάπτυξης της πλάκας σε TLC, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I_2. Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ PC και λυσο-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Μία χαρακτηριστική εικόνα πλάκας TLC μετά από εμφάνιση σε ατμούς I_2 είναι η ακόλουθη:



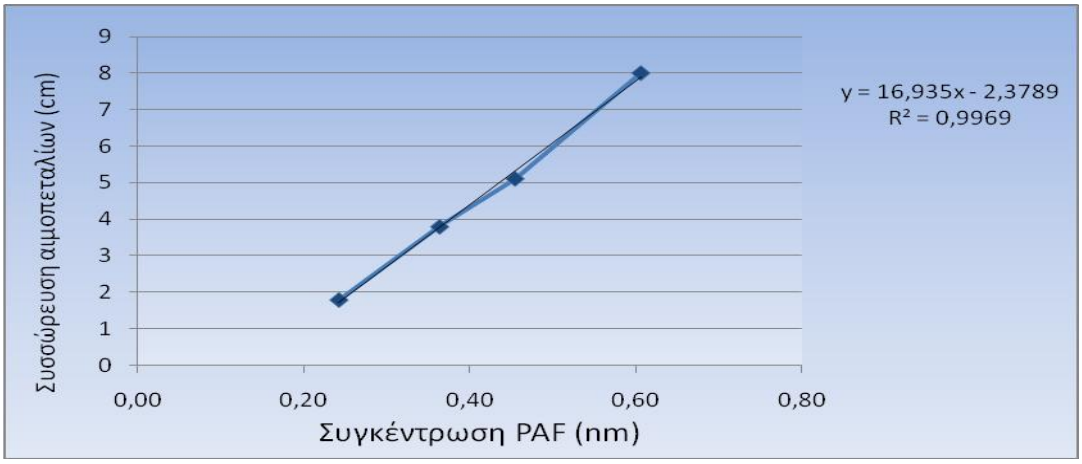
Εικόνα 6.1: Πλάκα TLC μετά από εμφάνιση σε ατμούς I_2
**PC= φωσφατιδυλο-χολίνη, Sm= σφιγγομυελίνη*

6.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του PAF (βιολογική δοκιμασία in vitro)

Κατά τη βιολογική δοκιμασία τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου, προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυμένο σε BSA 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με τη συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100% συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Μια από τις εξισώσεις πρότυπης καμπύλης αναφοράς του PAF που προέκυψε ήταν y=16,935x–2,3789 και η αντίστοιχη καμπύλη φαίνεται παρακάτω:



Σχήμα 6.5: Πρότυπη καμπύλη PAF

Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματόμετρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική δραστικότητα. Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα ομοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF (γρήγορη συσσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις).

Τέλος, αφού είναι γνωστή η συγκέντρωση του PAF στο κάθε εξεταζόμενο δείγμα, υπολογίζεται σε κάθε δείγμα η ειδική δραστικότητα της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης με βάση τον τύπο: *nmol PAF/mg πρωτεΐνης/min*, απουσία (δείγμα αναφοράς) ή παρουσία εκχυλίσματος. Τέλος, υπολογίζεται το % της επίδρασης (αναστολή ή ενεργοποίηση του ενζύμου) των εκχυλισμάτων του κρασιού σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

6.5 Επίδραση των εκχυλισμάτων στη δράση της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης (λυσο-PAF AT)

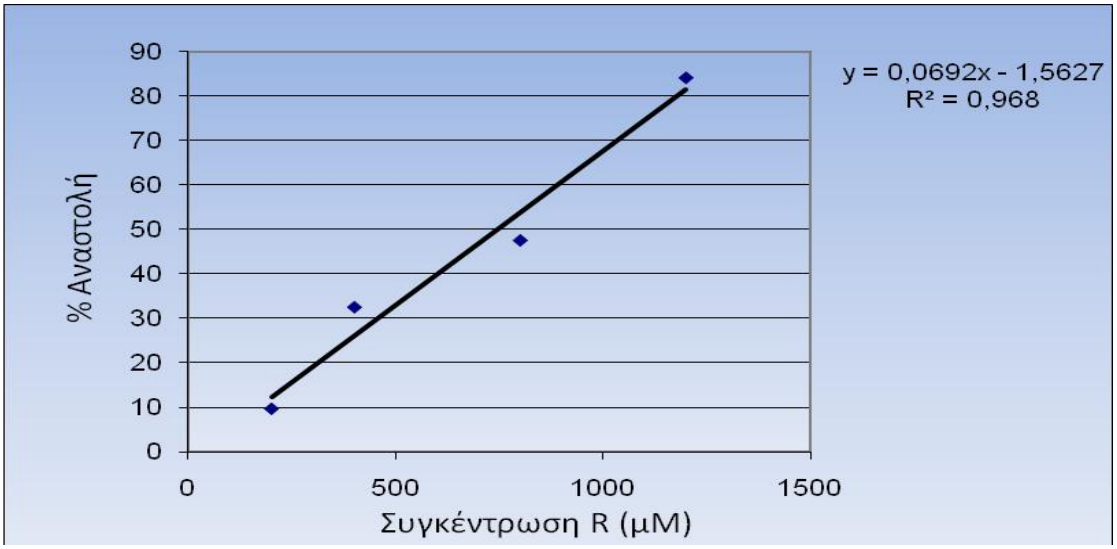
6.5.1 Πρότυπες ενώσεις: Ρεσβερατρόλη – Κερκετίνη

- Τα αποτελέσματα για τη ρεσβερατρόλη είναι τα εξής:

Πίνακας 6.5: Συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

$C_{τελ}$ *(μM)*	*% αναστολή της λυσο-PAF AT*
200	9,7
400	32,5
800	47,5
1200	84

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα προκύπτει η καμπύλη της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT που υπολογίστηκε από τη βιολογική δοκιμασία.



Σχήμα 6.6: Καμπύλη της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

Από την παραπάνω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί το IC_{50} της ένωσης αυτής, δηλαδή η τιμή της συγκέντρωσης της R που προκαλεί 50% αναστολή της λυσο-PAF AT. Το IC_{50} για τη ρεσβερατρόλη υπολογίζεται ίσο με 745,1μM.

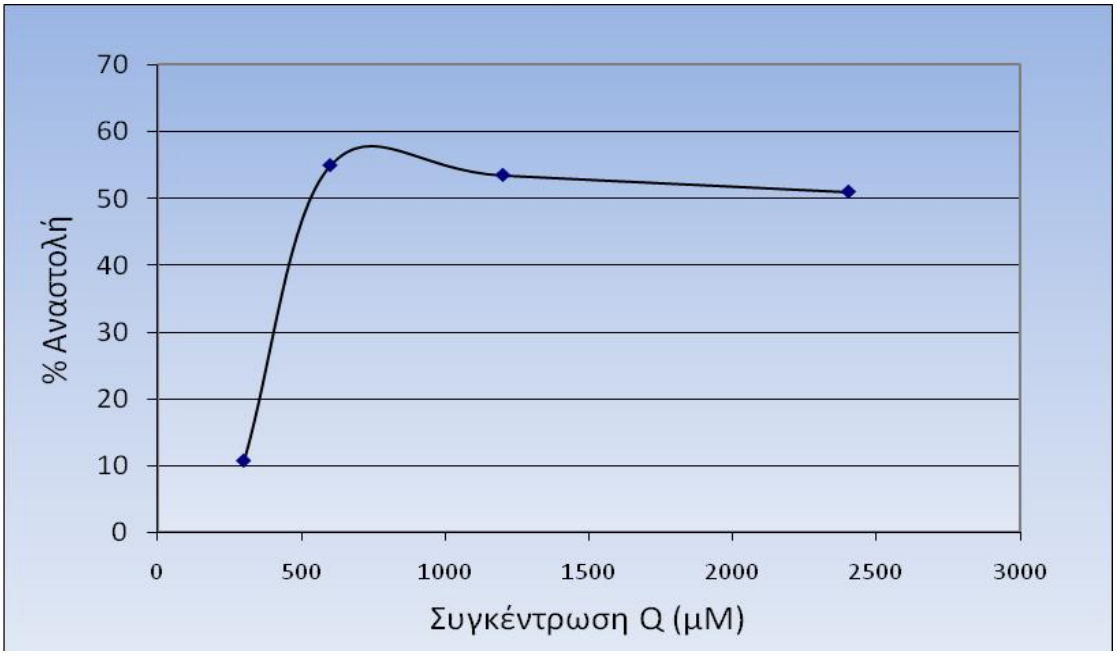
Είναι σημαντικό να μετατρέψουμε τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης σε μg/μL γιατί στα εκχυλίσματα του κρασιού δεν έχουμε συγκεκριμένη τιμή μάζας. Έτσι, για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων με τα αποτελέσματα των πρότυπων ενώσεων, χρησιμοποιούμε το μοριακό βάρος των τελευταίων για τον υπολογισμό, οπότε τελικά το IC_{50} της ρεσβερατρόλης είναι ίσο με: 0,170μg/μL.

- Τα αποτελέσματα για την κερκετίνη είναι τα εξής:

Πίνακας 6.6: Συγκέντρωση της κερκετίνης σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

$C_{τελ}$ *(μM)*	*% αναστολή της λυσο-PAF AT*
300	10,7
600	54,95
1200	53,5
2400	51

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα προκύπτει η καμπύλη της συγκέντρωσης της κερκετίνης σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT που υπολογίστηκε από τη βιολογική δοκιμασία.



Σχήμα 6.7: Καμπύλη της συγκέντρωσης της κερκετίνης σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

Στο παραπάνω σχήμα παρατηρούμε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της κερκετίνης πάνω από την τιμή των 600μM δεν προκαλεί αντίστοιχη αύξηση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η τιμή της συσσώρευσης είναι σχεδόν σταθερή για τις συγκεντρώσεις πάνω από τα 600μM. Έτσι, για να υπολογίσουμε το IC_{50} της κερκετίνης, λαμβάνουμε ως γραμμική περιοχή της καμπύλης την περιοχή που ορίζεται από τις δύο πρώτες συγκεντρώσεις, οπότε προκύπτει η εξίσωση:

- ✓ y= 0,1475x-33,55

Από την παραπάνω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί το IC_{50} της ένωσης αυτής είναι ίσο με 566,44μM, το οποίο μπορεί να εκφραστεί και ως 0,192μg/μL.

Συγκρίνοντας τις τιμές των IC_{50} για τις δύο ενώσεις παρατηρούμε ότι το IC_{50} της ρεσβερατρόλης είναι ίσο με 0,170μg/μL και της κερκετίνης 0,192μg/μL, δηλαδή η κερκετίνη φαίνεται να προκαλεί 50% αναστολή της λυσο-PAF AT σε λίγο

μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτή της ρεσβερατρόλης, δηλαδή η ρεσβερατρόλη φαίνεται να είναι ελάχιστα πιο δραστική.

6.5.2 Πολικά λιποειδή του ερυθρού οίνου Cabernet Sauvignon

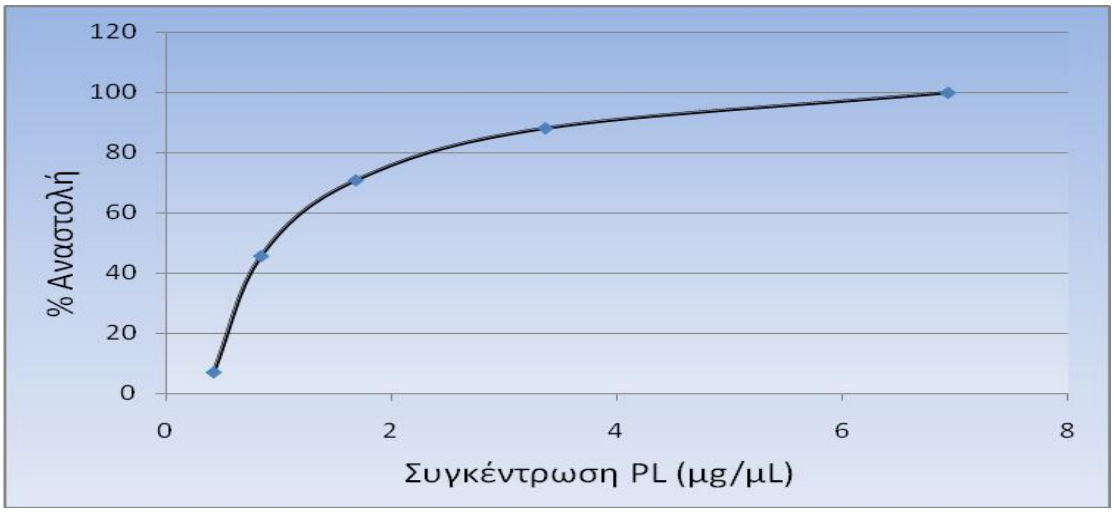
Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα πολικά λιποειδή (PL) του κρασιού Cabernet Sauvignon για δύο λόγους. Αρχικά, η ποσότητα των ουδέτερων λιποειδών (NL), όπως φαίνεται παραπάνω, είναι απειροελάχιστη σε σχέση με αυτή των πολικών λιποειδών (0,2% TL έναντι 93,6% TL αντίστοιχα). Επιπλέον, από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο έχει φανεί ότι η βιολογική δράση εντοπίζεται κυρίως στα πολικά λιποειδή.

Τα αποτελέσματα για τα πολικά λιποειδή του οίνου Cabernet Sauvignon παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.7: Συγκέντρωση των πολικών λιποειδών του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

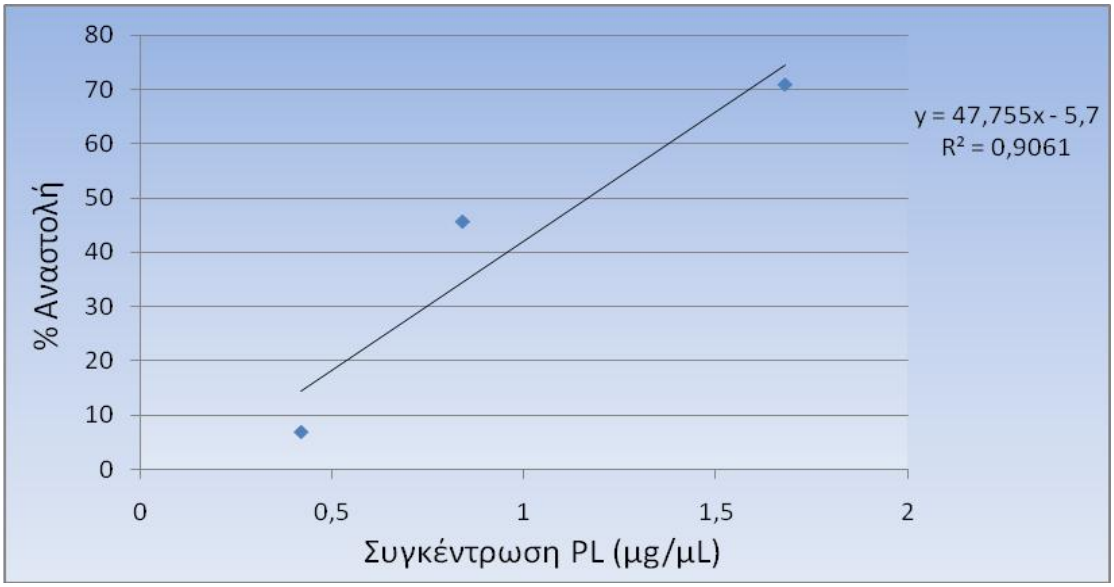
$C_{τελ}$ *(nM)*	*% αναστολή της λυσο-PAF AT*
0,42	6,9
0,84	45,6
1,68	70,8
3,36	88,1
6,93	99,9

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα προκύπτει η καμπύλη της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών του κρασιού σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT που υπολογίστηκε έπειτα από τη βιολογική δοκιμασία.



Σχήμα 6.8: Καμπύλη της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

Για να υπολογίσουμε το IC_{50} των πολικών λιποειδών του κόκκινου κρασιού, λαμβάνουμε ως γραμμική περιοχή της καμπύλης την περιοχή που ορίζεται από τις τρεις πρώτες συγκεντρώσεις, οπότε προκύπτει το παρακάτω γράφημα:



<u>Σχήμα 6.9:</u> Γραμμική περιοχή της καμπύλης της συγκέντρωσης των πολικών λιποειδών του κρασιού σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

Η εξίσωση που περιγράφει τη γραμμική αυτή περιοχή είναι η εξής:

- ✓ y= 47,755x-5,7

Από την παραπάνω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί το IC_{50} των πολικών λιποειδών του κρασιού που είναι ίσο με 1,16μg/μL.

Συγκρίνοντας τις τιμές των IC_{50} των πρότυπων ενώσεων με αυτή των πολικών λιποειδών βλέπουμε ότι η ρεσβερατρόλη έχει τιμή IC_{50} ίση με 0,170μg/μL, η κερκετίνη έχει τιμή IC_{50} 0,192μg/μL και τα πολικά λιποειδή του κόκκινου κρασιού έχουν τιμή IC_{50} 1,16μg/μL. Συνεπώς, παρατηρούμε ότι τα πολικά λιποειδή είναι λιγότερο δραστικά όσον αφορά την αναστολή της λυσο-PAF AT σε σχέση με τις συγκεκριμένες πρότυπες ενώσεις.

6.5.3 Υδατικό κλάσμα που προέκυψε από την εκχύλιση Bligh-Dyer

Τα αποτελέσματα για το υδατικό κλάσμα που προέκυψε από την εκχύλιση Bligh-Dyer δείχνουν πολύ υψηλή αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.8: Συγκέντρωση του υδατικού κλάσματος του κρασιού σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

Συγκέντρωση (μg/μL)	*% αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT*
0,1	95,2
0,2	97,8

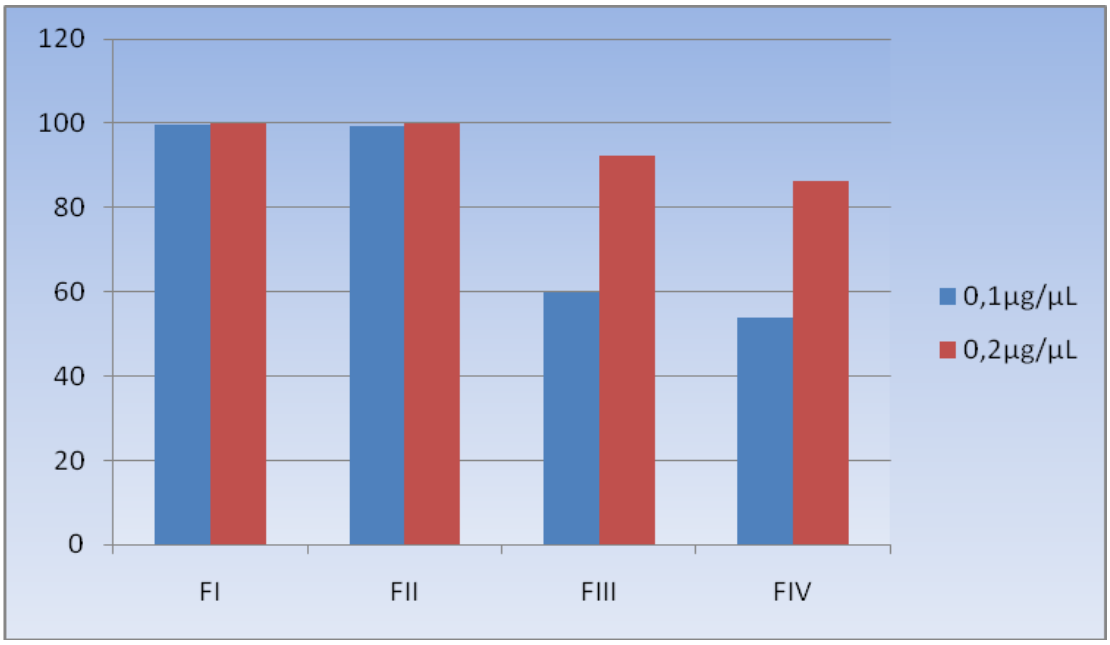
6.5.4 Κλάσματα κρασιού με διαφορετικό φαινολικό περιεχόμενο

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα διαφορετικά κλάσματα του κρασιού που διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων.

Πίνακας 6.9: Συγκέντρωση των διαφορετικών κλασμάτων του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon που προέκυψαν από τη μέθοδο διαδοχικών εκχυλίσεων σε συνάρτηση με την επί τοις % αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT

	Συγκέντρωση (μg/μL)	*% αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT*
FI	0,1	99,80
FII	0,1	99,23
FIII	0,1	59,91
FIV	0,1	53,80
FI	0,2	99,87
FII	0,2	99,92
FIII	0,2	92,47
FIV	0,2	86,17

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι δύο συγκεντρώσεις των κλασμάτων FI-FIV και οι αντίστοιχες τιμές αναστολής που εμφάνισαν.



Σχήμα 6.10: Σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών κλασμάτων του κρασιού όσον αφορά την επί τοις % αναστολή της λυσο-PAF AT

Παρατηρούμε ότι τα κλάσματα FI και FII εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αναστολή της δράσης της λυσο-PAF AT (>99%) σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα. Τα κλάσματα FIII και FIV φαίνεται να προκαλούν μεν αναστολή, αλλά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν είναι τόσο δραστικά όσο τα δύο πρώτα, γιατί στη συγκέντρωση του 0,1μg/μL η αναστολή που προκαλούν είναι σημαντικά μικρότερη από των FI και FII.

Στα κλάσματα FI-FIV δεν μπορέσαμε να υπολογίσουμε την τιμή του IC_{50}. Αρχικά, προσπαθήσαμε να υπολογίσουμε τη δράση των κλασμάτων με συγκέντρωση c=0,85μg/μL, αλλά η αναστολή ήταν πάρα πολύ υψηλή και γι' αυτό το λόγο στο επόμενο πείραμα δοκιμάσαμε τις συγκεντρώσεις που φαίνονται παραπάνω, δηλαδή τις c_1=0,1μg/μL και c_2=0,2μg/μL. Ακόμα και σε αυτές τις συγκεντρώσεις όμως παρατηρούμε ότι τα κλάσματα είναι πολύ δραστικά, οπότε με τις παρούσες τιμές δεν μπορούμε να υπολογίσουμε το IC_{50}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι πλέον δεδομένη η ευεργετική επίδραση της εφαρμογής του Μεσογειακού προτύπου δίαιτας στην υγεία και στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Πληθώρα ερευνητικών δεδομένων αποδεικνύουν πως μια τέτοια σύσταση δίαιτας δικαιολογεί όχι μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα της συνολικά προσλαμβανόμενης τροφής, αλλά, και τις διάφορες αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της καθώς και την επίδραση της στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και των λιποειδών του αίματος, την πρόληψη της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και της θρόμβωσης, καθώς και την προστασία ενάντια στην καρδιακή αρρυθμία και την καρδιακή ανεπάρκεια [5].

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. Οι ενώσεις αυτές έχουν αντιοξειδωτικές δράσεις, περιορίζουν την οξείδωση της LDL [34,39,40], δρουν ως εκκαθαριστές των ελεύθερων ριζών, συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής NO από το ενδοθήλιο, επιδρούν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μειώνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη σύνθεση προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών παραγόντων [36] και αναστέλλουν τη δράση διάφορων συσσωρευτικών παραγόντων όπως το ADP [85], ο PAF [22] και η θρομβίνη [21].

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας είναι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, και μάλιστα με τη μορφή οίνου. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως ο οίνος έχει καλύτερη βιολογική δράση σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά. Η ισχυρότερη αυτή δράση του οίνου έχει αποδοθεί στη δράση των μικροθρεπτικών συστατικών που περιέχονται σε αυτό. Στα βιολογικά δραστικά μικροσυστατικά του οίνου συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων τα λιποειδή και οι φαινολικές ενώσεις (π.χ. ρεσβερατρόλη, φλαβονόλες, κατεχίνες), ενώ παράλληλα υπάρχουν και άλλα μικροσυστατικά απαραίτητα για τον οργανισμό όπως βιταμίνες, αζωτούχες ενώσεις και ανόργανα συστατικά.

Η ευεργετική δράση του κόκκινου κρασιού καθιερώθηκε μέσω του «Γαλλικού Παράδοξου», δηλαδή της στατιστικής 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 [5].

Η διατύπωση αυτή προσανατόλισε την έρευνα στη μελέτη των φαινολικών ενώσεων του κόκκινου κρασιού. Ανάμεσα σε αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ρεσβερατρόλη, η οποία ανήκει δομικά στα στιλβένια. Η ρεσβερατρόλη 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 [39],

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) αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από διάφορους συσσωρευτικούς παράγοντες, όπως το ADP και ο PAF [22] και

η) αγγειοχαλαρωτική δράση, μέσω πρόκλησης απελευθέρωσης NO [15].

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 Διαίτας στα οποία καταλήγουν πολλές επιδημιολογικές μελέτες.

Μία άλλη ένωση από την ομάδα των φαινολικών που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η κερκετίνη. Η κερκετίνη έχει βρεθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα του ανθρωπίνου σώματος από τις καταστροφικές συνέπειες των ελεύθερων ριζών. Μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη καρδιακών παθήσεων και του εγκεφαλικού επεισοδίου, διότι προλαμβάνει τις καταστροφικές συνέπειες των ελεύθερων ριζών στα αιμοφόρα αγγεία, αφού εμποδίζει την οξείδωση της LDL και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Επίσης, η κερκετίνη έχει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση αλλεργιών και άλλων σχετικών παθολογικών καταστάσεων.

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (1-Ο-άλκυλο-2-ακέτυλο-sn-γλυκέρυλο- 3-φωσφοχολίνη, PAF) είναι ένας πιθανός τοπικός μεσολαβητής που εμπλέκεται στην φλεγμονή, στην αγγειογένεση, στην αναφυλαξία, στην κατάσταση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και στην αθηρογένεση. Συντίθεται από ποικίλα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων/μακροφάγων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων. Δρα μέσω του G-πρωτεϊνικού υποδοχέα, ο οποίος είναι συνδεδεμένος στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων ασκώντας αυτοκρινείς και παρακρινείς δράσεις που προάγουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την χημειοταξία των λευκοκυττάρων, την αγγειακή διαπερατότητα και τη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων.

Τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό καθορίζονται από την σχετική δράση των ενζύμων που τον συνθέτουν και αυτών που τον αποικοδομούν και υπό φυσιολογικές καταστάσεις βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που εστιάζουν στη δράση της PAF ακετυλοϋδρολάσης, το ένζυμο που αποικοδομεί τον PAF, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να γίνονται μελέτες για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της λυσο-PAF AT (το ένζυμο του καταλύει την ακετυλίωση του λυσο-PAF στη remodeling πορεία βιοσύνθεσης του PAF) στις αθηρογόνες διεργασίες [113,114]. Είναι γνωστό ότι η δραστικότητα του ενζύμου ενεργοποιείται κάτω από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκε σημαντικό να διερευνηθεί η επίδραση των πρότυπων ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη, αλλά και των πολικών λιποειδών του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon στη δραστικότητα του ενζύμου αυτού.

Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο δοκιμάστηκαν διάφορα είδη κόκκινου κρασιού όσον αφορά την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων και βρέθηκε ότι το κόκκινο κρασί Cabernet Sauvignon, με κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon, είχε την καλύτερη δράση. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε αυτό το δείγμα κρασιού για να μελετηθεί η αντιφλεγμονώδης του ικανότητα ως προς την επίδρασή του στη δράση της λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράσης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δυο τρόποι εκχύλισης. Στον πρώτο τρόπο έγινε διαχωρισμός σε υδατικό κλάσμα (W) και σε ολικά λιποειδή (TL) και στη συνέχεια διαχωρισμός των ολικών λιποειδών (TL) σε πολικά (PL) και ουδέτερα (NL) (διαδικασίες Bligh-Dyer και κατανομή κατά αντιρροή). Στο δεύτερο τρόπο πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις, με σκοπό την παραλαβή κλασμάτων με διαφορετικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις, και τα κλάσματα που προέκυψαν ήταν τα: FI, που περιέχει ανθοκυανίνες, FII, που περιέχει προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες και γλυκοζίτες κερκετίνης, FIII, που περιέχει φαινολικά οξέα και παράγωγα κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ και το FIV που ήταν η υδατική φάση με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις που δεν κατάφεραν να διαχωριστούν.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κλασμάτων στην πρώτη εκχύλιση έδειξε ότι το κόκκινο κρασί περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα υδατικού κλάσματος (ποσοστό 97,5%). Το 2,5% ήταν τα ολικά λιποειδή (TL) και από αυτά το 93,6% ήταν τα πολικά λιποειδή (PL) και το 0,2% ήταν το κλάσμα με τα ουδέτερα λιποειδή (NL). Στη δεύτερη εκχύλιση παρατηρήσαμε ότι το 92,1% ήταν το κλάσμα FI, το 5,3% ήταν το κλάσμα FII, το 1,1% ήταν το FIII και το υπόλοιπο 1,5% το FIV.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτική εκτίμηση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε κάθε κλάσμα με προσδιορισμό φαινολικών και διαπιστώθηκε πως το κλάσμα των ολικών λιποειδών που προκύπτει από την εκχύλιση Bligh-Dyer και το FII κλάσμα, που περιέχει τις προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες και γλυκοζίτες κερκετίνης, περιείχαν τις μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών, αλλά και ορθο-φαινολικών από κάθε άλλο κλάσμα.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των κλασμάτων του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon σε γλυκόζη και παρατηρήθηκε ότι και πάλι το υδατικό κλάσμα του πρώτου τρόπου εκχύλισης με το FIV κλάσμα, που είναι επίσης υδατικό περιείχαν τις μεγαλύτερες ποσότητες γλυκόζης από όλα τα υπόλοιπα κλάσματα κρασιού.

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των πρότυπων ενώσεων ρεσβερατρόλη και κερκετίνη, και των πολικών λιποειδών του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon στη δράση του ενζύμου λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράση πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αντίδραση απουσία ή παρουσία των ενώσεων και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του παραγόμενου PAF με βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη παρουσιάζουν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα στη δράση της λυσο-PAF-AT (IC_{50}=0.17 και 0.19 μg/μL αντίστοιχα). Τα πολικά λιποειδή εμφανίζουν μικρότερη ικανότητα αναστολής της λυσο-PAF AT από τις πρότυπες ενώσεις, αφού το IC_{50} υπολογίζεται ίσο με 1,16μg/μL. Η υδατική φάση προκαλεί αυξημένη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (95,2%) σε ποσότητα 1,00μg/μL.

Όσον αφορά τα τέσσερα κλάσματα του κρασιού από τη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης, τα FI και FII εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (99,8% και 99,2% αντίστοιχα). Τα άλλα δύο κλάσματα φαίνεται να προκαλούν μεν αναστολή (59,9% το FIII και 53,8% το FIV), η οποία όμως είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των προαναφερθέντων κλασμάτων.

Οι πρότυπες ενώσεις παρουσιάζουν συνολικά μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα από τα κλάσματα του κόκκινου κρασιού, πιθανώς γιατί τα εκχυλίσματα αποτελούν μίγματα πολλών ενώσεων που ενδέχεται να έχουν και αντίθετη δράση.

Η ρεσβερατρόλη σε ορισμένες μελέτες φάνηκε ότι μειώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από θρομβίνη, μέσω της τροποποίησης του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και της αποτροπής παραγωγής ελευθέρων ριζών και υπεροξειδίων, καθώς και ότι αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων [36]. Επίσης, στοιχεία από μία πρόσφατη έρευνα δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη, σε συγκέντρωση 25μM, αναστέλλει κατά 100% τη δράση της λυσο-PAF AT η οποία καταλύει τη βιοσύνθεση PAF από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) [138]. Στην παρούσα εργασία, συμπεραίνουμε ότι η ρεσβερατρόλη εμφανίζει, επίσης, ικανότητα αναστολής της λυσο-PAF AT από ομογενοποίημα μονοκυττάρων, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη βιοσύνθεση του ισχυρού φλεγμονώδη μεσολαβητή PAF και δρώντας προστατευτικά.

Όσον αφορά την κερκετίνη, έχει βρεθεί από ορισμένες μελέτες ότι είναι ισχυρός αναστολέας της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω ADP [85]. Επίσης, η κερκετίνη έχει βρεθεί σε in vivo πειράματα ότι αναστέλλει την παραγωγή φωσφολιπάσης A_2, σε συγκέντρωση <100μM [90]. Πέρα από τις προαναφερθείσες ιδιότητές της, στην παρούσα εργασία υπολογίζοντας τιμή IC_{50} ίση με 566μM επιβεβαιώνεται μία προηγούμενη μελέτη [139] η οποία υποστήριζε ότι η κερκετίνη, με IC_{50}=80μM, μπλοκάρει την παραγωγή του PAF μέσω αναστολής της λυσο-PAF AT (και της PLA_2), καθιστώντας την ισχυρό αντιφλεγμονώδες μόριο.

Τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν είναι πιθανώς μίγματα τόσο δραστικών όσο και μη δραστικών ενώσεων, αλλά παρ' όλα αυτά εμφάνισαν αναστολή της δράσης του ενζύμου. Το κόκκινο κρασί παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκε ότι το κόκκινο κρασί περιέχει αναστολείς του PAF [49-52]. Δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση των πολικών λιποειδών του κρασιού στη δράση της λυσο-PAF AT και γι' αυτό το λόγο κρίθηκε σκόπιμο να γίνει η μελέτη αυτή.

Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο που ασχολήθηκε με την αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε κλάσματος του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon κατέληξε στο συμπέρασμα ότι και τα κλάσματα των πολικών λιποειδών και το υδατικό κλάσμα από τον πρώτο τρόπο εκχύλισης παρουσιάζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση ως προς την ικανότητα τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την λιποξυγονάση [48].

Στην παρούσα μελέτη, το υδατικό κλάσμα που προκύπτει από την εκχύλιση Bligh-Dyer εμφανίζεται πολύ πιο δραστικό σε σχέση με τα πολικά λιποειδή του κρασιού. Σε συγκέντρωση 0,1μg/μL το υδατικό κλάσμα εμφανίζει αναστολή της τάξης του 95%, ενώ για τα πολικά λιποειδή χρειάζεται συγκέντρωση ίση με 1,16μg/μL (IC_{50}) για να προκληθεί 50% αναστολή.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι η ποσότητα των ολικών φαινολικών δεν είναι καθοριστικός παράγοντας για την εκδήλωση της βιολογικής δράσης στο κρασί αλλά αυτό που παίζει το μεγαλύτερο ρόλο είναι το είδος των φαινολικών που περιέχονται στα διάφορα εκχυλίσματα. Με την παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται αυτή η άποψη αφού συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τα κλάσματα του κόκκινου κρασιού Cabernet Sauvignon, παρατηρούμε πως το FI κλάσμα που περιέχει ανθοκυανίνες και το FII κλάσμα που περιέχει προκυανιδίνες, κατεχίνες, επικατεχίνες και γλυκοζίτες κερκετίνης είναι αυτά που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι τη μεγαλύτερη ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών παρουσιάζουν τα κλάσματα FI με τις ανθοκυανίνες, FIII με τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγα κερκετίνης με γλυκουρονικό οξύ και το FIV με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις που δε διαχωρίστηκαν. Ενώ το κλάσμα FII εμφάνισε την καλύτερη αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης [48].

Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι δε συμβαδίζουν πάντοτε τα αποτελέσματα όσον αφορά την αντιοξειδωτική και την αντιφλεγμονώδη δράση για τα κλάσματα του κρασιού. Η παρατήρηση αυτή δίνει το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τους μηχανισμούς που μεσολαβούν στις δράσεις των συστατικών του κρασιού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hugh Johnson**,** *Hugh Johnson's Modern Encyclopedia Of Wine*, Simon&Schuster, 1998

2. Σουφλερός Ε, *Οινολογία: Επιστήμη και τεχνογνωσία, 1ος τόμος,* Εκδοτική Θεσσαλονίκη, 2000

3. Massimo Montanari, *Πείνα και αφθονία στην Ευρώπη,* Εκδόσεις Ελληνικά Γράμματα, 1997

4. Matalas A/L, Zampelas ., Stavrinos V, Wolinsky I, *The Mediterranean diet: Constituents and health promotion,* CRC Press, 2001

5. Lorgeril M, Salen P, Paillard F, Laporte F, Boucher F, Leiris J, *Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary health disease,* Cardiovascular Research, 2002, 54: 503-515

6. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Vassilakou T, Gnardellis Ch, Polychronopoulos E, Venizelos M, Lagiou P, Wahlqvist M.L., Trichopoulos D, *The diet and survival of elderly Greeks; a link to the past,* Am. J. Clin. Nut., 61: 1346S, 1995.

7. Naissides M, Mamo J.C L., James A, Pal S, *The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women*, Atherosclerosis, 2006 Apr;185(2):438-45.

8. Σουφλερός Ε, *Οινολογία: Επιστήμη και τεχνογνωσία, 2ος τόμος,* Εκδοτική Θεσσαλονίκη, 2000

9. Τσακίρης Α, *Οινολογία: από το σταφύλι στο κρασί*, Εκδοτικός οίκος Ψύχαλος, 2008

10. Guyon F, Douet C, Colas S, Salagoïty MH, Medina B, *Effects of must concentration techniques on wine isotopic parameters*, J Agric Food Chem. 2006 Dec 27;54(26):9918-23.

11. Trichopoulou A, Vasilopoulou E, *Mediterranean diet and longevity*, British Journal Nutrition 2000.84: 205-209

12. George J. Soleas, Eleftherios P. Diamandis, and David M. Goldberg, *Wine as a Biological Fluid: History, Production and Role in Disease Prevention*, Journal of Clin Nutr 1997. 11: 287-313

13. Roulton B.R., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E., *Principles and practices of winemaking*, Springer Verlag, 1996

14. Bravo L, *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*, Nutr. Rev. (1998), 56, (11):317-33.

15. Räthel TR, Samtleben R, Vollmar AM, Dirsch VM, *Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process*, J Hypertens. 2007 Mar;25(3):541- 9.

16. Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schimi-Kerth VB, *Red wine polyphenols cause endothelium-depended EDHF-mediated relaxations in porcine*

coronary arteries via a redox-sensitive mechanism, Biochem. Biophys. Res.Comun. 2003;310:371-7.

17. Stoclet JC, Chataigneu T, Ndiaye M, *Vascular protection by dietary polyphenols*, Europ. J. of Pharmacology 2004;500:299-313.

18. Emilio Sacanella, Mònica Vázquez-Agell, Mari Pau Mena, Emilia Antúnez, Joaquim Fernández-Solá, José Maria Nicolás, Rosa M Lamuela-Raventós, Emilio Ros, and Ramón Estruc, *Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial*, Am. J. Clinical Nutrition, Nov 2007; 86: 1463 - 1469.

19. Dell'Agli M, Busciala A, Bosisio E, *Vascular effects of wine polyphenols*, Cardiovascular Research 2004;63:593-602.

20. Russo P, Tedesco I, Russo M, Russo GL, Venezia A, Cicala C, *Effects of dealcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation*, Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2001 Feb;11(1):25-9

21. Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ, *Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women*, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Jun 1;23(6):1066-71. Epub 2003 Apr 24.

22. de Lange DW, Verhoef S, Gorter G, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A, Akkerman JW, *Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox*, Alcohol Clin Exp Res. 2007 Aug;31(8):1308-14. Epub 2007 Jun 9.

23. Weisse ME, Eberly B, Person DA, *Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine*, BMJ. 1995 Dec 23-30;311(7021):1657-60.

24. Κουρέτας Δ, *Ερευνητικά αποτελέσματα σχετικά με τη διερεύνηση του χημειοπροστατευτικού-αντικαρκινικού ρόλου των οινοποιητικών προϊόντων της Ελλάδος στη πρόληψη μεταλλάξεων*, Διδακτορική Διατριβή, 2007

25. Armentia A, *Adverse reactions to wine: think outside the bottle*, Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2008 Jun;8(3):266-9. Review

26. Κουτελιδάκης Α, *Φαινολικά συστατικά και πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων,* Διδακτορική Διατριβή, 2008

27. Pal S, Ho SS, Takechi R, *Red wine polyphenolics suppress the secretion of ApoB48 from human intestinal CaCo-2 cells*, J Agric Food Chem. 2005 Apr 6;53(7):2767-72.

28. Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Khalil A, *Phenolic-extract from argan oil (Argania Spinosa L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages*, Atherosclerosis 2006;184:389-96.

29. Zern TL, Fernandez ML, *Cardioprotective effect of dietary polyphenols*, J. Nutr. 2005;135:2291-4.

30. Manach C, Mazur A, Scalbert A, *Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases*, Current Opinion in Lipidology 2005;16:77-84.

31. Rodrigo R, Rivera G, *Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine,* Free Radic Biol Med. 2002 Aug 1;33(3):409-22. Review.

32. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging,* Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep 1;90(17):7915-22. Review

33. Young IS, Woodside JV, *Antioxidants in health and disease,* J Clin Pathol. 2001 Mar;54(3):176-86

34. Vinson JA, Teufel K, Wu N, *Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model,* Atherosclerosis. 2001 May;156(1):67-72.

35. Κριμπά Β, *Ελληνική Αμπελογραφία, 1ος τόμος*, Αθήνα, 2006

36. Alonso Borbalán AM, Zorro L, Guillén DA, Barroso CG, *Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatographymass spectrometry and its relationship to antioxidant power,* J Chromatogr A. 2003 Sep 12;1012(1):31-8.

37. Waterhouse AL, *Wine phenolics,* Ann N Y Acad Sci. 2002 May;957:21-36. Review.

38. Arivam M, Fuhrman B, *Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-madiated oxidation of LDL and attenuate atherosclerosis,* Atherosclerosis 1998;137:45- 50.

39. Fuhrman B, Arivam M, *Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis,* Cur. Opin. Lipid. 2001;12:41-8.

40. Morton LW, Caccetta RA, Puddey IB, Croft KD, *Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds,* Clin. Exp. Pharmac. and Physiol. 2000;27:152.

41. Kaliora AC, Dedousis GVZ, Sehmid H, *Dietary antioxidants in preventing atherogenesis*. Atherosclerosis 2005.

42. Estruch R, Sacanella E, Badia E et al, *Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: A prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers*, Atherosclerosis. 2004;175:1

43. Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zieliski T, *Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin,* Thrombosis 2002;107:141-5

44. Rein D, Paglieroni TG, Wun T et al, *Cocoa inhibits platelet activation and function,* Ame. J. Clin. Nutr. 2000 ;72:30-5.

45. Demrow HS, Slane PR, Folts JD, *Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries,* 1995 Feb 15;91(4):1182-8

46. Chang W. Choi, Sei C Kim, Soon S. Hwang, Bong K. Choi, Hye J. Ahn, Min Y. Lee, Sang H. Park, Soo K. Kim, *Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison,* Plant Science 163, 2002: 1161-1168

47. Brand- Williams W., M. E. Cuvelier and Berset, *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,* Lebensm-Wiss. U-technol., 1995 28-30

48. Marianna N.Xanthopoulou, Elizabeth Fragopoulou, Konstantia Kalathara, Tzortzis Nomikos, Haralabos Karantonis, Smaragdi Antonopoulou, *Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts,* Food Chemistry 120(2010)665-672

49. E.Fragopoulou, T.Nomikos, S.Antonopoulou, C.A.Mitsopoulou and C.A.Demopoulos, *Separation of biologically active lipids from red wine,* J.Agricultural Food Chemistry(2000) 48, 1234-1238

50. Fragopoulou, T.Nomikos, N.Tsantila, A.Mitropoulou, I.Zabetakis and C.A.Demopoulos, *Biological activity of total lipids from red and white wine/must,* J. Agric. Food Chem., (2001) 49, 5186

51. E.Fragopoulou, S.Antonopoulou, and C.A.Demopoulos, *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must,* J.Agric.Food Chem. (2002) 50, 2684

52. E. Fragopoulou, S.Antonopoulou, T.Nomikos and C.A.Demopoulos, *Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties*, Biochim. Biophys. Acta (2003) 1632, 90.

53. Vander, Sherman, Luciano, M. Τσακόπουλος, Ν. Γελαδάς, *Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού,* Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2001

54. Stephen McPhee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, *Παθολογική Φυσιολογία*, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2006

55. Seaman DR, *The diet-induced pro-inflammatory state: a cause of chronic pain and other degenerative diseases,* J Manipulative Physiol Ther. 2002 Mar-Apr;25(3):168-79.

56. Grimble RF, *Inflammatory response in the elderly,* Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2003 Jan;6(1):21-9.

57. Gregory M. Barton, *A calculated response: control of inflammation by the innate immune system,* J Clin Invest. 2008 Feb;118(2):413-20.

58. Rubin E, *Βασική Παθολογική Ανατομική*, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2001.

59. Philip C. Calder, *Dietary modification of inflammation with lipids,* Proc Nutr Soc. 2002 Aug;61(3):345-58.

60. Cotran, R.S., Kumar V., and Robbins S.L., *Pathologic basis of disease*, WB Saunders Company, Philadelphia , 51-92. 1994.

61. Rang H.P. and Dale M.M. Pharmacology. Churchill Livingstone , 198-225. 1999.

62. Springer, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol 1995;57:827-72.

63. Travis J, *Biotech gets a grip on cell adhesion,* Science 1993;260:906-8.

64. Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Mehra M, Prescott S.M., *Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion,* J Cell Biol 1990;110:529-40.

65. Lorant D.E., Patel K.D., McIntyre T.M., McEver R.P., Prescott S.M., Zimmerman G.A., *Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or*

thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils, J Cell Biol 1991;115:223-34.

66. Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M., *Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules*. Immunol Today 1992;13:93-100.

67. Newman P.J., *The biology of PECAM-1*. J Clin Invest 1997;99:3-8.

68. Muller W.A., *Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in transendothelia migration. In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, pp 587-592. Eds JI Gallin and R Snyderman, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia . 1999.

69. Panes J, Perry M, Granger D.N., *Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention,* Br J Pharmacol 1999;126:537-50.

70. Perretti M., *Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction*. Trends Pharmacol Sci 1997;18:418-25.

71. Cronstein B.N., *Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent*. J Appl Physiol 1994;76:5-13.

72. Lefer A.M., Murohara T., Buerke M., *Effects of taprostene on neutrophil-endothelial interactions in isolated coronary arteries*. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1994;16:623-31.

73. Grimble RF, *Nutritional Modulation of Cytokine*, Biology Nutrition 1998 Jul-Aug;14(7-8):634-40.

74. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P, *PAF - A review of its effects antagonists and possible future clinical implications – Part I*, Drugs, 1991, 42, 9-29.

75. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P, *PAF, a review of its effects, antagonists and possible future clinical implications - Part II*, Drugs, 1991, 42, 174- 204

76. Prescott S.M., Zimmerman G.A., Stafforini D.M., and McIntyre T.M., *Platelet activating factor and related lipid mediators,* Annu. Rev. Biochem. 2000. 69, 419.

77. Ninio E, *Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis,* Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2005. 8:123-31.

78. Nathan C, *Points of control in inflammation,* Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):846-52.

79. Wan JM, Haw MP, Blackburn GL, *Nutrition, immune function, and inflammation: an overview,* Proc Nutr Soc. 1989 Sep;48(3):315-35.

80. Nathan C, *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities,* Nat. Rev. Immunol 2006 Mar;6(3):173-82.

81. Nathan C, Shiloh MU, *Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens,* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000 Aug 1;97(16):8841-8.

82. Augustin Scalbert, Ian T Johnson, and Mike Saltmarsh, *Polyphenols: antioxidants and beyond,* The American Journal of Clinical Nutrition, 2005, 81: 215S – 7S.

83. Biesalki H, *Polyphenols and inflammation: basic interactions*, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007 Nov; 10(6):724-8.

84. Mower R., Landolfi, R., Steiner, M. Biochem. Pharmacol. 1984, 33, 357-363.

85. Berentz, A., Stierle, A., Anton, R., Cazenave, J. P. Biochem Pharmacol. 1981, 31, 3597-3600.

86. Corvanzier, E., Maclouf, J., Biochim. Biophys. Acta 1985, 835, 315-321.

87. Gryglewski, r., Korbut, r., Robak, J., Swies, J., Biochem. Phrmacol. 1987, 36, 317-322.

88. Corvanzier, E., Maclouf, J., Biochim. Biophys. Acta, 1985, 835, 315-32.

89. 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.

90. Chang, J., Musser, J. H., McGregor, H. Biochem. Pharmacol. 1987, 36, 2429-2436.

91. Pinckard RN, McManus LM, Demopoulos CA, Halonen M, Clark PO, Shaw JO, Kniker WT, Hanahan DJ, *Molecular pathobiology of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine: evidence for the structural and functional identity with platelet-activating factor*, J Reticuloendothel Soc., 28(Suppl):95s-103s, 1980

92. Δημόπουλος ΚΑ, Αντωνοπούλου Σ, *Βασική Βιοχημεία*, 2η έκδοση, 2009

93. Barbaro,J.F. and Zvaifler,N.J., *Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody*, Proc. Soc. Exp. Biol Med, 122, 1245-1247 (1966).

94. Benveniste,J., Camussi,J., Mencia-Huerta,J.M., and Polonsky,J., *Isolation and partial characterization of (PAF) platelet-activating-factor*, Ann. Immunol. (Paris), 128, 259-260 (1977).

95. Demopoulos,C.A., Pinckard,R.N., and Hanahan,D.J., *Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)*, J Biol Chem, 254, 9355-9358 (1979).

96. Benveniste,J., Tence,M., Varenne,P., Bidault,J., Boullet,C., and Polonsky,J., *Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (PAF): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine*, C R Seances Acad Sci D, 289, 1037-1040 (1979).

97. Blank,M.L., Snyder,F., Byers,L.W., Brooks,B., and Muirhead,E.E., *Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine*, Biochem Biophys. Res Commun., 90, 1194-1200 (1979).

98. Hanahan,D.J., Demopoulos,C.A., Liehr,J., and Pinckard,R.N., *Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine*, J Biol Chem, 255, 5514-5516 (1980).

99. Hanahan DJ, *Platelet activating factor, a biologically active phosphoglyceride*, Ann.Rev.Biochem., 1986, 55, 483-509.

100. Demopoulos C.A.,.Karantonis H.C,.Antonopoulou S., *Platelet activating factor-a molecular link between atherosclerosis theories,* Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2003. 150, 705

101. Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ, *Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils,* J.Immunol., 1979, 123, 1847-1857.

102. Snyder F, *Platelet-activating factor and its analogs, metabolic pathways and related intracellular processes,* Biochim.Biophys.Acta, 1995, 1254, 231-249

103. Snyder F, *Platelet-activating factor, the biosynthetic and catabolic enzymes,* Biochem.J., 1995, 305, 689-705.

104. Tzortzis Nomikos, Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, *Food Ingredients and Lipid Mediators,* Current Nutrition & Food Science, 2007. 3, 255-276

105. Hajra,A.K., *Acyl dihydroxyacetone phosphate: precursor of alkyl ethers*, Biochem Biophys. Res Commun., 39, 1037-1044 (1970).

106. Wykle,R.L., Blank,M.L., Malone,B., and Snyder,F., *Evidence for a mixed function oxidase in the biosynthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine*, J Biol Chem, 247, 5442-5447 (1972).

107. LaBelle,E.F., Jr. and Hajra,A.K., *Biosynthesis of acyl dihydroxyacetone phosphate in subcellular fractions of rat liver*, J Biol Chem, 247, 5835-5841 (1972).

108. Chae,K., Piantadosi,C., and Snyder,F., *An alternate enzymic route for the synthesis of the alkyl analog of phosphatidic acid involving alkylglycerol*, Biochem Biophys. Res Commun., 51, 119-124 (1973).

109. Rock,C.O. and Snyder,F., *Biosynthesis of 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphate via adenosine triphosphate:1-alkyl-sn-glycerol phosphotransferase*, J Biol Chem, 249, 5382-5387 (1974).

110. Wykle,R.L. and Snyder,F., *Biosynthesis of an O-alkyl analogue of phosphatidic acid and O-alkylglycerols via O-alkyl ketone intermediates by microsomal enzymes of Ehrlich ascites tumor*, J Biol Chem, 245, 3047-3058 (1970).

111. Snyder,F., Blank,M.L., and Malone,B., *Requirement of cytidine derivatives in the biosynthesis of O-alkyl phospholipids*, J Biol Chem, 245, 4016-4018 (1970).

112. Baker RR, *Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor,* Neurochem Res. 2000. 25:677-83.

113. Nomikos TN, Iatrou C, Demopoulos CA, *Acetyl- CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue*, Eur J Biochem. 2003;270(14):2992–3000.

114. Elizabeth Fragopoulou, Christos Iatrou, Constantinos Alexandros Demopoulos, *Characterization of Acetyl-CoA: Lyso-PAF Acetyltransferase of Human Mesangial Cells,* Mediators of Inflammation • 2005:5 (2005) 263–272

115. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.1, *Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes,* Crit Rev Clin Lab Sci.2003. 40:643-72

116. Honda Z., Ishii S., Shimizu T., *Platelet-activating factor receptor*, J. Biochem. 2002. 131, 773-9.

117. Chao W, Olson MS, *Platelet-Activating Factor, receptors and signal transduction,* Biochem.J., 1993, 292 (Pt 3), 617-629.

118. Izumi T, Honda Z, Mutoh H, Kume K, Shimizu T, *Regulation and signal transduction of PAF receptor,* Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res., 1995, 23, 461-466.

119. Shukla SD, *Inositol phospholipid turnover in PAF transmembrane signaling,* Lipids, 1991, 26, 1028-1033.

120. Saunders RN, Handley DA, *Platelet-Activating Factor antagonists,* Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 1987, 27, 237-255.

121. Ishii S, Shimizu T, *Platelet-Activating Factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice,* Prog.Lipid.Res., 2000, 39, 41-82.

122. Koussissis S, Semidalas CE, Antonopoulou S, Kapoulas VM, Demopoulos CA, Kalyvas V, *PAF antagonists in food: isolation and identification of PAF antagonists in virgin olive oil,* Revue Francaise Des Corps Gras 1994, 9/10:323.

123. Koussissis S, Semidalas CE, Hadzistavrou EC, Kalyvas V, Antonopoulou S, Demopoulos CA, *PAF antagonists in food: isolation and identification of PAF antagonists in honey and wax,* Revue Francaise Des Corps Gras 1994, 5/6:127.

124. Rementzis J, Antonopoulou S, Demopoulos CA, *Identification and study of gangliosides from scomber-scombrus muscle,* J Agr Food Chem 1997, 45(3):611-615.

125. Koltai M, Guinot P, Hosford D, Braquet PG, *Platelet-activating factor antagonists: scientific background and possible clinical applications,* Adv Pharmacol 1994, 28:81-167.

126. Guinot P, *Clinical experience with platelet-activating factor antagonists. Past, present, and near future,* Clin Rev Allergy 1994, 12(4):397-417.

127. Summers JB, Albert DH, *Platelet activating factor antagonists,* Adv Pharmacol 1995, 32:67-168.

128. Φραγκοπούλου Ε., *Απομόνωση και in vitro μελέτη λιποειδών από οίνους και γλεύκη, Δομικές μελέτες των βιολογικά δραστικών κλασμάτων*, Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, 2000, σελ. 3-33.

129. Blight, E.G., Dyer W.J. Can., J.Biochem.Physiol.1959, 37, 911

130. Galanos D.S., Kapoulas V.M., Lipid Res.1962, 3,134

131. Barlett G.R., J Biol Chem 1959, 236, 466

132. Galanos D.S., Kapoulas V.M., *Προσδιορισμός φαινολικών*, Biochem. Biophys. Acta. 1965, 98, 275,

133. Singleton V.L., Joseph A., Rossi J.R., Am.J. Enol.Vitic., 144 – 158

134. Sara Arranz, Rosa Cert, Jara Pırez-Jimınez, Arturo Cert, Fulgencio Saura-Calixto, Food Chemistry 110 (2008) 985–99

135. Bradford MM, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding*, Anal.Biochem., 1976, 72, 248-254.

136. Stephen M., Prescot M.D., Thomas M., Mclntyre M.D., Guy A., Zimmerman M.D., Diana M., Stefforini M.D., Japanese Circulation Journal 1996, 60 – 3: 137 – 141

137. Demopoulos, C.A., et al, 1979

138. Ciro Balestrieri, Francesca Felice, Sonia Piacente, Cosimo Pizza, Paola Montoro, Wieslaw Oleszek, Vincenzo Visciano, Maria Luisa Balestrieri, *Relative effects of phenolic constituents from Yucca schidigera Roezl. bark on Kaposi's sarcoma cell proliferation, migration, and PAF synthesis*, biochemical pharmacology 71(2006)1479–1487

139. R. Yanoshita, H.W. Chang, K.H. Son, I. Kudo, Y. Samejima, *Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids*, Inflamm Res 45:546-549, 1996

140. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM, *Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids*, Thromb Res 1991; 64(1): 91-100

141. Lindahl M, Tagesson C, *Selective inhibition of group II phospholipase A_2 by Quercetin*, Inflammation 1993; 17(5): 573-582.

142. Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, et al., *Effects of flavonoids on Naja naja and human recombinant synovial phospholipases A_2 and inflammatory responses in mice*, Life Sci 1994; 54(20): L333-8