

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση μικροθρεπτικών συστατικών οίνου στους μηχανισμούς φλεγμονής σε καλλιέργειες κυττάρων.



Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Λέκτορας

Μέλη

Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Νομικός Τζώρτζης, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2007

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση μικροθρεπτικών συστατικών οίνου στους μηχανισμούς φλεγμονής σε καλλιέργειες κυττάρων.

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Λέκτορας

Μέλη

Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Νομικός Τζώρτζης, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2007

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα κα. Ελισάβετ Φραγκοπούλου, για το ενδιαφέρον που έδειξε στο πρόσωπό μου όλο αυτόν τον καιρό, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγησή της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια κα. Σμαραγδή Αντωνοπούλου και τον κ.κ. Τζώρτζη Νομικό για τη συνολική υποστήριξή τους και για όλες τις επιστημονικές και μη συμβουλές που μου παρείχαν σε όλο το διάστημα της συνεργασίας μας.

Επίσης, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου, για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στις πολύ καλές μου φίλες Ελπίδα, Ελισάβετ και Νάνσυ για την υποστήριξη που μου έδειξαν και για όσα περάσαμε μαζί που μας ενθάρρυναν να συνεχίζουμε, καθώς και σε όλους όσους εργάστηκαν στο εργαστήριο Βιοχημείας την ίδια περίοδο, και συνέβαλλαν στη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος.

Η παρούσα μελέτη, αφιερώνεται στην οικογένειά μου και σε εκείνους τους δασκάλους μου, που με ενέπνευσαν ώστε να ακολουθήσω το δρόμο αυτό της αναζήτησης της γνώσης.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ANSA	αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ
Apo A1	απολιποπρωτεΐνη A1
bFGF	αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
CAT	καταλάση αντιοξειδωτικών ενζύμων
CCR2	υποδοχέας CC χημειοκινών-2
CLC-	κυτταροκίνη με όμοια δράση με την καρδιοτροπίνη
COX-	Κυκλοξυγενάση-
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CT-1	καρδιοτροπίνη-1
DG	Διγλυκερίδιο
ELISA	ανοσοενζυμική μέθοδος
eNOS	συνθάση ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος
FCS	Ορός νεογνού μόσχου
FFA	ελεύθερα λιπαρά οξέα
FMD	flow-mediated dilatation
GSH	Γλουταθειόνη
GSSG	δισουλφίδιο γλουταθειόνης
HDL	υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HMCs	ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα
HMCL	κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων
ICAM	διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης
IFN	ρυθμιστικός παράγοντα ιντερφερόνης
IGF	αυξητικός παράγοντας-1 όμοιος της ινσουλίνης
IgA	ανοσοσφαιρίνη A
IgG	ανοσοσφαιρίνη G
IL-	ιντερλευκίνη -
IL-1ra	ανταγωνιστής υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1
IRF	ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης
LDL	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LIF	ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
MCP – 1	χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1

MDA	<i>Μαλονδιαλδεΐδη</i>
MG	<i>Μονογλυκερίδιο</i>
MIP-	<i>φλεγμονώδης πρωτεΐνη μακροφάγων</i>
NAC	<i>N-ακετυλοκυστεΐνη</i>
NF-κB	<i>πυρηνικός παράγοντας-κB</i>
NL	<i>ουδέτερα λιποειδή</i>
NTN	<i>neurturin neutrophilic factor</i>
OSM	<i>ογκοστατίνη</i>
oxLDL	<i>οξειδωμένη LDL</i>
PAF	<i>παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων</i>
PBS	<i>ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών</i>
PDGF	<i>αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων</i>
PGE ₂	<i>Προσταγλανδίνη E₂</i>
PGI ₂	<i>Προσταγλανδίνη I₂</i>
PL	<i>Πολικά λιποειδή</i>
PLA ₂	<i>φωσφολιπάση A₂</i>
RANTES	<i>χημειοκίνη εκφραζόμενη και παραγόμενη από T κύτταρα μετά από ενεργοποίηση</i>
ROS	<i>ενεργές ενώσεις οξυγόνου</i>
SFM	<i>θρεπτικό μέσο χωρίς ορό</i>
sIL-6R	<i>διαλυτός υποδοχέας της IL-6</i>
SOCS ₃	<i>αναστολέας της μεταγωγής σήματος κυτταροκινών</i>
sVCAM	<i>μόρια προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων</i>
TF	<i>ιστικός παράγοντας</i>
TG	<i>Τριγλυκερίδια</i>
TGF – β	<i>αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β</i>
TL	<i>ολικά λιποειδή</i>
TNF-α	<i>παράγοντας νέκρωσης όγκων-α</i>
tPA	<i>ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου</i>
TX-	<i>Θρομβοξάνιο</i>
VCAM	<i>μόρια προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων</i>
INF	<i>Ιντερφερόνη</i>

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1^ο: Η μεσογειακή Διατροφή

1.1	Η διατροφή γενικά.....	1
1.2	Η Μεσογειακή Διατροφή.....	2
1.2.1	Ορισμός Μεσογειακής Διατροφής.....	2
1.2.2	Τι περιλαμβάνει η Μεσογειακή Διατροφή (η Ελληνική εκδοχή).....	2
1.2.3	Επιδημιολογικά στοιχεία.....	7
1.3	Επιδράσεις τροφίμων που συμπεριλαμβάνονται στη Μεσογειακή διατροφή, στην υγεία....	10

Κεφάλαιο 2^ο: Ο οίνος

2.1	Ο οίνος στη Μεσογειακή διατροφή.....	12
2.2	Σύσταση οίνου.....	12
2.3	Επιδημιολογικά στοιχεία και ερευνητικά δεδομένα.....	25

Κεφάλαιο 3^ο: Φλεγμονή

3.1	Ορισμός Φλεγμονής.....	33
3.2	Η διαδικασία της φλεγμονής.....	33
3.2.1	Κυτταρικοί και χημικοί φορείς της φυσικής ανοσίας.....	35
3.2.2	Αιμόσταση.....	36
3.2.3	Αγγειακό τοίχωμα - αιμοπετάλια.....	36
3.2.4	Σημασία του παράγοντα πήξης αιμοπεταλίων.....	38
3.2.5	Πήξη του αίματος.....	39
3.2.6	Η φυσιολογική ινωδόλυση.....	39
3.2.7	Αναστολείς της πήξης του αίματος.....	40
3.2.8	Αρτηριοσκλήρυνση.....	40
3.3	Ιντερλευκίνη -1 & -6, και Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων.....	42
3.3.1	Ιντερλευκίνη – 1 (IL-1).....	42
3.3.2	Ιντερλευκίνη – 6 (IL-6).....	45
3.3.3	Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων – 1 (MCP-1).....	50

Κεφάλαιο 4^ο: Νεφροί & Νεφρικές Παθήσεις

4.1	Δομή και φυσιολογία νεφρών.....	55
4.2	Λειτουργίες νεφρών.....	58

4.3	Οι παθήσεις των νεφρών.....	59
4.3.1	Σπειραματικές παθήσεις.....	59
4.3.2	Φλεγμονή του σπειράματος.....	61
4.4	Επίδραση του οίνου στους νεφρούς.....	63

Κεφάλαιο 5^ο: Σκοπός	67
---	----

Κεφάλαιο 6^ο: Πειραματικές Μέθοδοι

6.1	Εκχύλιση λιποειδών κατά Blight-Dyer.....	68
6.2	Κατανομή κατά αντιρροή.....	69
6.3	Χημικοί προσδιορισμοί.....	69
6.3.1	Προσδιορισμός Φωσφόρου.....	69
6.3.2	Προσδιορισμός Σακχάρων.....	70
6.3.3	Προσδιορισμός Φαινολικών.....	71
6.4	Βιολογική Δοκιμασία in vitro.....	72
6.5	Καλλιέργειες Μεσαγγειακών κυττάρων.....	76
6.5.1	Συντήρηση και αναδιασπορά κυττάρων.....	78
6.5.2	Διέγερση κυττάρων με IL-1β.....	80
6.5.3	Επίδραση πολικών λιποειδών κρασιού στην έκκριση κυτταροκινών.....	81
6.5.4	Παραλαβή πρωτεϊνών από τα κύτταρα.....	83
6.5.5	Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	84
6.5.6	Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της κυτταροκίνης IL-6.....	85
6.5.7	Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της χημειοκίνης MCP-1.....	89

Κεφάλαιο 7^ο: Αποτελέσματα

7.1	Δείγματα.....	94
7.2	Απομόνωση και διαχωρισμός λιποειδών από τους οίνους.....	94
7.2.1	Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL).....	95
7.2.2	Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL).....	95
7.3	Αποτελέσματα χημικών προσδιορισμών.....	96
7.3.1	Προσδιορισμός φωσφόρου στα πολικά λιποειδή.....	96
7.3.2	Προσδιορισμός σακχάρων στα πολικά λιποειδή.....	98
7.3.3	Προσδιορισμός φαινολικών στα πολικά λιποειδή.....	99
7.4	Αποτελέσματα Βιολογικής δοκιμασίας in vitro σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.....	101
7.5	Αποτελέσματα της επίδρασης πολικών λιποειδών οίνων στην έκκριση κυτταροκινών σε	

καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων.....	104
7.5.1 Επίδραση πολικών λιποειδών οίνων στη έκκριση της κυτταροκίνης IL-6 σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων.....	104
7.5.2 Επίδραση πολικών λιποειδών οίνων στη έκκριση της χημειοκίνης MCP-1 σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων.....	111
Κεφάλαιο 8^ο: Συζήτηση.....	119
Περίληψη.....	126
Summary.....	128
Βιβλιογραφία.....	130

Κεφάλαιο Ι': Η Μεσογειακή Διατροφή

1. 1. Η διατροφή γενικά

Η διατροφή ορίζεται ως το σύνολο των διεργασιών εκείνων που εμπλέκονται στην πρόσληψη και χρήση των συστατικών της τροφής από τους ζώντες οργανισμούς. Οι διεργασίες αυτές, περιλαμβάνουν την πρόσληψη, πέψη, απορρόφηση και μεταβολισμό της τροφής. Ο κύριος ρόλος της τροφής είναι να μας εξασφαλίσει ποικίλα θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι χημικές ουσίες απαραίτητες σε επαρκείς ποσότητες για την επιβίωση - συντήρηση και ανάπτυξη του οργανισμού ^[1]. Τα θρεπτικά συστατικά παρέχουν ενέργεια και αποτελούν δομικά συστατικά των ιστών, και ρυθμιστικούς παράγοντες των διαφόρων αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στα κύτταρα ^[1,2].

Η επιστήμη της διατροφής διερευνά τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της πρόσληψης τροφής και των φυσιολογικών λειτουργιών των ζώντων οργανισμών από τη γέννηση, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, στην ενήλική ζωή αλλά και κατά τη γήρανση.

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις όσον αφορά το ρόλο της διατροφής στην υγεία ^[1,3] και το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη της σχέσης που υπάρχει ανάμεσα στη διαίτα και την ανάπτυξη και αιτιολογία των χρόνιων νοσημάτων. Η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα σε κάθε προσπάθεια πρόληψης χρόνιων νοσημάτων και βελτίωσης της ποιότητας ζωής. Για να προσδιοριστούν οι διατροφικοί παράγοντες που σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιων νοσημάτων, αναγκαία είναι και η κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης κάθε νόσου καθώς και το πώς αυτοί επηρεάζονται από τη διαίτα, πώς μεταβάλλονται οι διατροφικές απαιτήσεις αλλά και οι μεταβολικές λειτουργίες γενικότερα. Στο πλαίσιο αυτό, μελετώνται σε μοριακή βάση οι δράσεις των θρεπτικών συστατικών της διαίτας και η εμπλοκή τους στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόκληση των χρόνιων νοσημάτων ^[1,2].

1.2. Η Μεσογειακή διατροφή

1.2. 1. Ορισμός Μεσογειακής Διατροφής

Οι χώρες γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα χαρακτηρίζονται από ζεστό κλίμα και γόνιμο έδαφος, παράγοντες που ευνοούν την καλλιέργεια πολλών και ποικίλων καρπών. Επίσης, δεδομένης της γεωγραφικής τους θέσης οι περιοχές αυτές έχουν αναπτύξει και αλιευτικές δραστηριότητες. Συνεπώς, η κοινή προέλευση της τροφής, στις χώρες αυτές, η οποία βασίζεται στη γεωργία, την κτηνοτροφία και την αλιεία αποτελεί τη βάση της λεγόμενης Μεσογειακής διατροφής. Παρόλα αυτά, μεταξύ των χωρών της Μεσογείου υπάρχουν σημαντικές οικονομικές, κοινωνικές, πολιτισμικές, θρησκευτικές, γεωγραφικές, κ.α. διαφορές, οι οποίες εμποδίζουν την ομαδοποίηση τους σε ένα κοινό διατροφικό πρότυπο ^[4].

Είναι δύσκολο, λοιπόν, να δοθεί ένας και μόνος ορισμός για τη Μεσογειακή διατροφή καθώς τόσο τα τρόφιμα που καταναλώνονται όσο και η συχνότητα κατανάλωσής τους και ο τρόπος παρασκευής τους διαφέρουν ανάλογα με την ακριβή περιοχή της Μεσογείου στην οποία αναφερόμαστε. Ένας πιο γενικός ορισμός εξηγεί πως η Μεσογειακή διατροφή είναι μια όχι αυστηρά χορτοφαγική διατροφή, πλούσια σε ελαϊκό οξύ, ω-3 λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες, βιταμίνες του συμπλέγματος Β και αντιοξειδωτικά, ενώ ταυτόχρονα έχει χαμηλά επίπεδα κορεσμένων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ^[4].

Αυτή η δεύτερη, πιο γενική, περιγραφή της Μεσογειακής διατροφής μπορεί να εξηγήσει καλύτερα τα προσδοκώμενα οφέλη στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς μια τέτοια σύσταση διατροφής δικαιολογεί όχι μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα της συνολικά προσλαμβανόμενης τροφής, αλλά, και τις διάφορες αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της, την επίδραση στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και των λιπιδίων του αίματος, την πρόληψη της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και της θρόμβωσης, καθώς και την προστασία ενάντια στην καρδιακή αρρυθμία και την καρδιακή ανεπάρκεια.

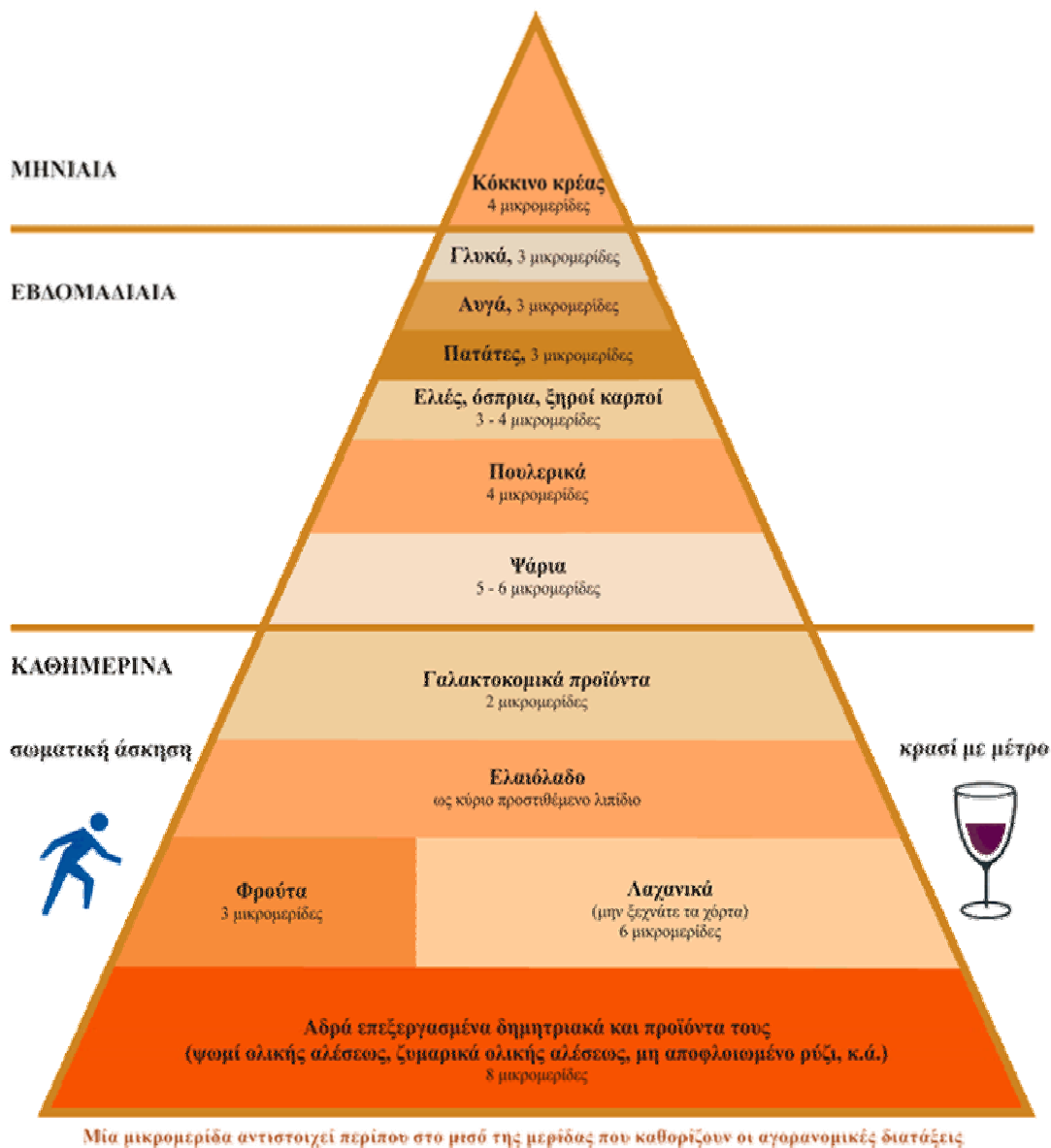
1.2. 2. Τι περιλαμβάνει η Μεσογειακή διατροφή (η Ελληνική εκδοχή)

Η παραδοσιακή Ελληνική εκδοχή της Μεσογειακής διατροφής (η οποία συνάδει και με το γενικότερο πρότυπο αυτού του τύπου διατροφής) παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά: (α)

υψηλό λόγο μονοακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα (ο λόγος αυτό είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 2), (β) μέτρια κατανάλωση αλκοόλ – και κυρίως με τη μορφή κρασιού, (γ) μεγάλη κατανάλωση οσπρίων, (δ) μεγάλη κατανάλωση δημητριακών και ψωμιού, (ε) αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, (στ) μικρή κατανάλωση κρέατος και κρεατοσκευασμάτων, (ζ) μέτρια κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, (η) ως κύρια πηγή λίπους χρησιμοποιείται το ελαιόλαδο –πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ^[3,5,6].

Συγκεκριμένα οι οδηγίες για τον ελληνικό πληθυσμό είναι (εικόνα 1)→Δημητριακά: Καθημερινά 8 μικρομερίδες δημητριακών ή προϊόντων τους, συμπεριλαμβανομένου του ψωμιού, κατά προτίμηση ολικής άλεσης (καλή πηγή διαιτητικών ινών), Πατάτες: Οι πατάτες έχουν υψηλό γλυκαιμικό δείκτη και οι σύγχρονες διατροφικές οδηγίες υπαγορεύουν την αποφυγή κατανάλωσης περισσότερων από 3 μικρομερίδες την εβδομάδα. Ζάχαρη και σχετικά προϊόντα: η μέση ημερήσια πρόσληψη δεν πρέπει να ξεπερνά τη μισή μικρομερίδα ανά ημέρα. Λαχανικά και φρούτα: Συνιστάται η κατανάλωση περίπου έξι μικρομερίδων λαχανικών και τριών μικρομερίδων φρούτων καθημερινά, κατά μέσο όρο. Όσπρια: Συνιστάται η κατανάλωση, κατά μέσο όρο, μιας μικρομερίδας ανά ημέρα (3 μικρομερίδες οσπρίων την εβδομάδα μαγειρευμένων σε ελαιόλαδο αντιστοιχούν σε κάτι περισσότερο από μία μερίδα οσπρίων εστιατορίου). Μυρωδικά: Η ρίγανη, ο βασιλικός, το θυμάρι και άλλα μυρωδικά που φύονται στην Ελλάδα αποτελούν εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών και συνιστούν ένα εύγευστο υποκατάστατο του αλατιού στην προετοιμασία των φαγητών. Κρέας και αυγά: Η κατανάλωση πουλερικών, αυγών και κόκκινου κρέατος δεν θα πρέπει να ξεπερνά, κατά μέσο όρο, τη μία μικρομερίδα την ημέρα. Ψάρια και θαλασσινά: ~3 μερίδες την εβδομάδα, Γαλακτοκομικά προϊόντα: Κατανάλωση ~2 μικρομερίδων γαλακτοκομικών την ημέρα (τυρί ή γιαούρτι ή γάλα) Προστιθέμενα λιπίδια: Το ελαιόλαδο θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε λογικές ποσότητες όποτε αυτό είναι δυνατό (σε σαλάτες, στο τηγάνι ή σε μαγειρευμένα τρόφιμα), η μείωσή του δεν συνιστάται όταν συνεπάγεται και μείωση πρόσληψης τροφών που συχνά μαγειρεύονται με ελαιόλαδο. Αιθανόλη: Η κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών, σε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 30 g αιθανόλης (τρία ποτήρια για τα περισσότερα οινοπνευματώδη) την ημέρα για τους άνδρες και 15 g αιθυλικής αλκοόλης (ένα και μισό ποτήρι για τα περισσότερα οινοπνευματώδη) την ημέρα για τις γυναίκες. Πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό, πως η δράση της αιθανόλης είναι δεδομένη, αλλά συγκριτικές μελέτες μεταξύ διαφόρων αλκοολούχων ποτών δείχνουν πως ο οίνος έχει ισχυρότερη βιολογική δράση, καθώς στις επιδράσεις του συμβάλλουν και τα διάφορα μικροσυστατικά του. Τέλος, ισχυρές επιδημιολογικές ενδείξεις μπορούν να υπάρξουν μόνο για τις προστιθέμενες ουσίες που υπόκεινται στον έλεγχο του ατόμου (π.χ. για το αλάτι και τα καρυκεύματα). ^[3,5,6]

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ



Θυμηθείτε επίσης:

- πίνετε άφθονο νερό
- αποφεύγετε το αλάτι· χρησιμοποιείτε μυρωδικά (ρίγανη, βασιλικό, θυμάρι, κ.λπ.) στη θέση του

Πηγή: Ανώτατο Ειδικό Επιστημονικό Συμβούλιο Υγείας, Υπουργείο Υγείας και Πρόνοιας

Εικόνα 1.1.: Οι διατροφικές οδηγίες απεικονίζονται ημιποσοτικοποιημένες με τη μορφή πυραμίδας.

Όπως φαίνεται, λοιπόν, η Μεσογειακή διατροφή, με την ποικιλία τροφίμων που περιλαμβάνει, καλύπτει πλήρως τις απαιτήσεις του οργανισμού τόσο σε μακροθρεπτικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη) όσο και σε μικροθρεπτικά (βιταμίνες, ανόργανα συστατικά) συστατικά (πίνακας 1.1.). Ταυτόχρονα προσλαμβάνονται από την τροφή διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως: βιταμίνη E (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες), βιταμίνη C, βιταμίνη A και καροτενοειδή (β- καροτίνη, λυκοπένη, λουτεΐνη), μέταλλα (όπως π.χ. σελήνιο) τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού, καθώς και

φυτοχημικές ουσίες με αντιοξειδωτικές ή άλλες βιολογικές ιδιότητες (φυτικές στερόλες, φλαβονοειδή, κ.α.). Κύριες πηγές των ουσιών αυτών αποτελούν τα φρούτα, τα λαχανικά και το ελαιόλαδο.

Πίνακας 1.1.: Διατροφικές πηγές ορισμένων θρεπτικών συστατικών της διαίτας.

Βιταμίνες	Πηγές	Ανόργανα στοιχεία	Πηγές
Ρετινόλη (βιτ.Α)	Κρέας, εμπλουτισμένα γαλακτοκομικά, συκώτι – εντόσθια, κρόκος αυγού, ιχθυέλαια	Σίδηρος	Κρέας, συκώτι, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, δημητριακά, όσπρια
β-καροτίνη (βιτ. Α)	πράσινα φυλλώδη λαχανικά, φρούτα και κίτρινα λαχανικά	Ιώδιο	Θαλασσινά, γάλα, τυρί, ιωδιωμένο αλάτι
Θειαμίνη (βιτ. Β1)	Δημητριακά ολικής άλεσης, χοιρινό, αρνί, ψάρια, πουλερικά, συκώτι	Ασβέστιο	Γάλα, τυρί, όσπρια, πράσινα φυλλώδη λαχανικά
Ριβοφλαβίνη (βιτ.Β2)	Ξηροί καρποί, γαλακτοκομικά, μαγιά μύρας, σόγια, δημητριακά ολικής άλεσης	Φώσφορος	Γάλα, τυρί, δημητριακά, κρέας
Νιασίνη (βιτ.Β3)	Εμπλουτισμένο ψωμί και δημητριακά, αραχίδες, άπαχο κρέας, πουλερικά, ψάρια, χταπόδι, πλιγούρι	Κάλιο	Ρίζες, μπανάνες, πράσινα φυλλώδη λαχανικά
Βιτ.Β6 (πυριδοξίνη)	πράσινα φυλλώδη λαχανικά, ξηρά φασόλια, πατάτες, μπανάνες	Ψευδάργυρος	Κόκκινο κρέας, τυρί, γάλα, όσπρια
Βιτ.Β12 (κυανοκοβαλαμίνη)	Άπαχο κρέας, εντόσθια, ψάρια, οστρακοειδή, γαλακτοκομικά, μαγιά μύρας	Μαγνήσιο	Δημητριακά, πράσινα φυλλώδη λαχανικά
Φυλλικό οξύ	πράσινα φυλλώδη λαχανικά, συκώτι, μαγιά μύρας, πορτοκάλι, ρεβύθια	Χαλκός	Συκώτι, πράσινα φυλλώδη λαχανικά
Βιτ. C	Εσπεριδοειδή, ντομάτα, πιπεριά, πατάτα, πράσινα φυλλώδη λαχανικά	Σελήνιο	Δημητριακά, ψάρια, κρέας, αυγά

Βιτ. D	Λιπαρά ψάρια, εμπλουτισμένα γαλακτοκομικά, συκώτι, κρόκος αυγού	Χρώμιο	Κόκκινο κρέας, δημητριακά ολικής άλεσης, όσπρια, μπαχαρικά
Βιτ. E	Ελαιόλαδο και άλλα φυτικά έλαια, ξηροί καρποί, δημητριακά ολικής άλεσης, πράσινα λαχανικά, σπόροι, ξηρά φασόλια	Μολυβδένιο	Όσπρια
Βιτ. K	Μπρόκολο, λάχανο, φυτικά έλαια, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, γιαούρτι, κρόκος αυγού, συκώτι, πατάτα, σόγια, γαλακτοκομικά	Φθόριο	Τσάι
Άλλα συστατικά			
Απαραίτητα λιπαρά οξέα (ω-3, ω6)	ψάρια	Φυτικές ίνες	Φακές, όσπρια, δημητριακά ολικής αλέσεως, φρούτα και λαχανικά, , κριθάρι, μαγιά
πολυφαινόλες	κόκκινο κρασί, χυμοί μήλου και πορτοκαλιού, τσάι, όσπρια, ορισμένα φαρμακευτικά φυτά	λυκοπένιο	τομάτες και τα προϊόντα της. Σε μικρές ποσότητες στα βερίκοκα, το γκρέιπφρουτ και το πεπόνι
κορεσμένα λιπαρά οξέα	Κόκκινο κρέας, πλήρη γαλακτοκομικά (γάλα, τυρί) και επεξεργασμένα έλαια		

Πηγή, προσαρμογή από: World Health Organization,

1.2. 3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Τα τελευταία πενήντα χρόνια έχει εμφανιστεί στο παγκόσμιο προσκήνιο μια διεθνής επιστημονική άποψη ότι η παραδοσιακή διατροφή των χωρών της Μεσογείου προάγει την υγεία σε αντίθεση με τις δυτικές ή τις άφθονες δίαιτες.

Στην πραγματικότητα ήταν η μελέτη των επτά χωρών ^[4] αυτή που έστρεψε το επιστημονικό ενδιαφέρον στη Μεσογειακή διατροφή. Το 1958 ο Ancel Keys αποφάσισε να διεξάγει συγκριτική προοπτική μελέτη (η οποία τελικά διήρκησε ως και τη δεκαετία του '70) με σκοπό να εξετάσει τους διάφορους παράγοντες κινδύνου που οδηγούν στην εκδήλωση καρδιαγγειακών νοσημάτων, σε πληθυσμούς από 7 διαφορετικές χώρες (Ελλάδα, Ιταλία, Γιουγκοσλαβία, Ολλανδία, Φινλανδία, ΗΠΑ και Ιαπωνία). Τα αποτελέσματα της έρευνας (στην οποία συμμετείχε από κάθε χώρα τουλάχιστον μια ομάδα χιλίων ατόμων ηλικίας 40 – 50 ετών) ήταν εντυπωσιακά ειδικά για την ομάδα της Κρήτης (Πίνακας 1.2.). Μετά από παρακολούθηση 5-10 και 15 χρόνων η ομάδα της Κρήτης παρουσίαζε τη χαμηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο και καρκίνο, αλλά και γενικά χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από κάθε αιτία θανάτου. Επιπλέον, οι κάτοικοι των άλλων μεσογειακών χωρών εμφάνισαν μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας και είχαν το μεγαλύτερο μέσο όρο ζωής, σε σχέση με τους κατοίκους των άλλων χωρών ^[7].

Πίνακας 1.1.: Ποσοστά θνησιμότητας μετά από δεκαπενταετή παρακολούθηση σύμφωνα με τη Μελέτη των επτά χωρών.

Ανά 1000	Στεφανιαία	Καρκίνος	Γενική Θνησιμότητα
Ηνωμένες Πολιτείες	773	384	1575
Zutphen (Ολλανδία)	636	781	1825
Ιταλία	462	622	1874
Γιουγκοσλαβία	242	394	1712
Κέρκυρα (Ελλάδα)	202	338	1317
Ιαπωνία	136	623	1766
Κρήτη (Ελλάδα)	38	317	855

Προσαρμογή: A. Keys και συν., 1986

Το φαινόμενο αυτό, οι επιστήμονες, το απέδωσαν στον ιδιαίτερο και φυσικό τρόπο ζωής των Κρητικών (εργασία στην ύπαιθρο, αυξημένη φυσική δραστηριότητα), καθώς επίσης και στην απλή και λιτή διατροφή τους, η οποία έγινε παγκοσμίως γνωστή ως Μεσογειακή Διατροφή.

Η επαλήθευση των ευρημάτων της Μελέτης των επτά χωρών ήλθε αργότερα, όταν ο S. Renaud και οι συνεργάτες του ^[8], στην προοπτική, τυχαιοποιημένη, μονά τυφλή μελέτη ασθενών – μαρτύρων Lyon Heart Study, μελέτησαν την υπόθεση ότι μια Μεσογειακή διαίτα εμπλουτισμένη με α-λινολενικό οξύ (18:3 ω-3,) θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματική έναντι της στεφανιαίας νόσου από τη συνηθισμένη διαίτα που συστήνεται σε αυτούς τους ασθενείς. Στη μελέτη συμμετείχαν 605 ασθενείς (ομάδα παρέμβασης n=302, ομάδα ελέγχου n=303) που είχαν ήδη υποστεί ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στην έρευνα αυτή, συγκρίθηκε η επίδραση της Κρητικής Μεσογειακής διαίτας στην ολική θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, με τη συνηθισμένη διαίτα των ασθενών αυτών. Και τα δυο διατροφικά σχήματα περιείχαν μέτριες ποσότητες ολικού λίπους (31-34% της ενεργειακής πρόσληψης) και κορεσμένου λίπους (8% της ενεργειακής πρόσληψης στην ομάδα παρέμβασης και 12% στην ομάδα ελέγχου), ενώ παρόμοια ήταν η πρόσληψη μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Επίσης, η πρόσληψη χοληστερόλης στην ομάδα παρέμβασης ήταν 203 mg/ημ. ενώ η ομάδα ελέγχου προσλάμβανε 312 mg χοληστερόλης/ημ. Η μεγαλύτερη διαφορά τους όμως ήταν στην πρόσληψη α-λινολενικού οξέος (1,8 g/ημ στην ομάδα παρέμβασης και 0,79 g/ημ στην ομάδα ελέγχου) και στην πρόσληψη βιταμίνης C (η ομάδα παρέμβασης κατανάλωνε περισσότερα φρούτα και λαχανικά). Αυτές οι διαφορές συσχετίστηκαν με 50-70% μικρότερη κίνδυνο ολικής θνησιμότητας και καρδιοπάθειών ^[8]. Κάτι που υποδεικνύει ότι η Μεσογειακή Δίαιτα αυξημένη σε α-λινολενικό είναι πιο αποτελεσματική στην πρόληψη καρδιοπαθειών από άλλες συνηθισμένες δίαιτες.

Ο Vialettes, το 1992 ^[9], αναφέρει πως η Μεσογειακή, διατροφή εξαιτίας της σύστασής της, δρά ευεργετικά στον οργανισμό μέσω της βελτίωσης του λιπιδαιμικού προφίλ (μειώνει την LDL χοληστερόλη, αυξάνει την HDL χοληστερόλη), της βελτίωσης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της μειωμένης οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών. Με βάση τα παραπάνω, τελικά, προτείνει την υιοθέτηση αυτού του προτύπου διατροφής.

Σε άρθρο ανασκόπησης, (Tsarouchi A., 1997) ^[10], επισημαίνονται τα μικροσυστατικά που έχουν ευεργετικές επιδράσεις και που περιλαμβάνονται σε τρόφιμα που καταναλώνονται συχνά στη Μεσογειακή διαίτα. Στο ίδιο άρθρο προτείνεται ότι η σωστή διατροφική αγωγή σε συνδυασμό με την ορθή επιλογή τροφίμων, μπορεί να περιορίσει τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών όπως είναι η παχυσαρκία, ο διαβήτης, τα καρδιαγγειακά και ορισμένοι τύποι καρκίνου.

Πιο πρόσφατα, μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα έδειξαν ότι η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή έχει προστατευτική δράση (σχετίζεται ισχυρά αρνητικά) με αρκετές μορφές καρκίνου, στεφανιαία νόσο και άλλα χρόνια νοσήματα.

Στη μελέτη CARDIO2000 ^[11] χρησιμοποιήθηκαν 661 μεσήλικες ασθενείς με ένα πρώτο έμφραγμα μυοκαρδίου ή ασταθή στηθάγχη και 661 άτομα (παρόμοιας ηλικίας και φύλου) ως ομάδα ελέγχου, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι ερευνητές, βρήκαν πως η υιοθέτηση της Μεσογειακής δίαιτας (η οποία αξιολογήθηκε με βάση Μεσογειακό διατροφικό σκορ ^[5]) σχετίστηκε με μείωση του κινδύνου εμφάνισης πρώτου επεισοδίου οξέος στεφανιαίου συνδρόμου κατά 16% ^[11], με μείωση κατά 12% του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίου επεισοδίου – ανεξαρτήτως επιπέδων χοληστερόλης και άλλων καρδιαγγειακών παραγόντων – στην υποκατηγορία των υπερχοληστερολαιμικών ατόμων και με μείωση κατά 35% στην υποκατηγορία των ατόμων με μεταβολικό σύνδρομο (μετά από προσαρμογή για ηλικία, φύλο, εκπαιδευτικό και οικονομικό επίπεδο, καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου).

Επίσης, ένα από τα συμπεράσματα της μελέτης ATTICA ^[12], είναι πως παραδοσιακή Μεσογειακή διαίτα σχετίζεται με μειωμένους δείκτες φλεγμονής και πήξης του αίματος. Στη συγκεκριμένη μελέτη συσχετίστηκε η εφαρμογή της Μεσογειακής διατροφής από τους συμμετέχοντες με τις συγκεντρώσεις της CRP, της IL-6, του TNF-a, του αμυλοειδούς A, του ινωδογόνου και της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα, καθώς και με τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων. Υψηλό σκορ Μεσογειακής διατροφής σχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερες τιμές των παραπάνω δεικτών (οριακές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ των TNF-a / αμυλοειδούς A και διατροφικού σκορ) ^[12].

Επιπρόσθετα, σε παρόμοια έρευνα ^[13] συσχέτισαν τα διάφορα διατροφικά πρότυπα (υπολογίζοντας τα αντίστοιχα διατροφικά σκορ) με τη λειτουργία του ενδοθηλίου (μετρώντας τη συγκέντρωση της CRP, της IL-6, της E – σελεκτίνης καθώς και των sICAM και sVCAM). Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν πως υψηλό σκορ για AHEI (Alternate Healthy Eating Index) και aMED (alternate Mediterranean Eating Index) σχετίζεται με μειωμένες συγκεντρώσεις των δεικτών φλεγμονής και δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου ^[13].

Οι παραπάνω έρευνες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η Μεσογειακή διαίτα, μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό μέτρο για τη μείωση του κινδύνου από καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο αλλά και άλλες χρόνιες παθήσεις.

1. 3. *Επιδράσεις τροφίμων που συμπεριλαμβάνονται στη Μεσογειακή διατροφή, στην υγεία*³¹

Η **γλυκαιμική επίδραση** των αμυλούχων τροφών, η οποία συχνά μετριέται με το γλυκαιμικό δείκτη (δηλ. τη σχετική αύξηση της γλυκόζης αίματος που προκαλείται μετά την κατανάλωση ενός τροφίμου, σε σύγκριση με αυτή που προκαλείται από την αντίστοιχη πρόσληψη γλυκόζης^[1]). Σε υπερτριγλυκεριδαιμικά άτομα, η μακροχρόνια κατανάλωση τροφίμων με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη ενδέχεται να ελαττώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων βελτιώνοντας την ανοχή γλυκόζης, μειώνοντας την έκκριση ινσουλίνης και ελαττώνοντας τα επίπεδα λιπιδίων του ορού. Τα **λαχανικά** και τα **φρούτα** θεωρείται ότι προστατεύουν κατά της στεφανιαίας νόσου και των περισσότερων νεοπλασιών, πιθανόν λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς τους σε διαιτητικές ίνες, φυλλικό οξύ, βιταμίνη C, β-καροτένιο, άλλα καροτενοειδή, πολυφαινόλες και φυτοοιστρογόνα. Τα **όσπρια** δεν έχουν σταθερά συσχετισθεί με οποιαδήποτε νόσο, παρά την ύπαρξη ορισμένων αναφορών για θετική συχέτισή τους με τον καρκίνο του στομάχου. Οι γλυκαιμικές τους επιδράσεις είναι ηπιότερες αυτών των κονδύλων (όπως της πατάτας) και η υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και χαμηλή περιεκτικότητά τους σε λιπίδια αυξάνουν τη διατροφική τους αξία. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι **διαιτητικές ίνες** (μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες) από τα δημητριακά, τα όσπρια, τα λαχανικά και τα φρούτα έχουν ευνοϊκή επίδραση στο λιπιδαιμικό φάσμα, την αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας, την πρόληψη της εκκολπωμάτωσης και τη ρύθμιση του σακχαρώδη διαβήτη. Οι **ξηροί καρποί** έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη E και φυτικές ίνες, κατά κανόνα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και πολλοί από αυτούς φαίνεται να έχουν και υποχοληστερολαιμική δράση. Το **κρέας** και τα **αυγά** παρέχουν πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Το κρέας περιέχει επίσης βιταμίνες του συμπλέγματος B και σελήνιο. Επιπλέον, αποτελεί καλή πηγή σιδήρου και ψευδαργύρου. Επιπλέον, η πρόσληψη κρέατος, και ιδιαίτερα κόκκινου κρέατος, σχετίζεται σταθερά με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και ενδεχομένως με άλλες μορφές καρκίνου και τη στεφανιαία νόσο. Τόσο το κρέας όσο και τα αυγά περιέχουν σχετικά υψηλές ποσότητες χοληστερόλης. Τα **ψάρια** (κυρίως τα λιπαρά ψάρια) και τα θαλασσινά θεωρείται ότι μειώνουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, πιθανόν γιατί περιέχουν μεγάλες ποσότητες ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου. Τα **γαλακτοκομικά** είναι πλούσια σε ασβέστιο, όμως περιέχουν πολλά κορεσμένα λιποειδή. Τα **κορεσμένα λιπαρά** οξέα έχουν συσχετισθεί με τη στεφανιαία νόσο, τον καρκίνο του προστάτη, πιθανόν τον καρκίνο του παχέος εντέρου και ίσως και άλλες νεοπλασίες. Τα **trans λιπαρά οξέα**, που περιέχονται σε πολλές μαργαρίνες και βιομηχανοποιημένα προϊόντα (π.χ. μπισκότα), έχουν ιδιότητες ανάλογες, αν όχι περισσότερο επιβλαβείς από αυτές των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Τα **πολυακόρεστα**

λιπαρά οξέα θεωρείται ότι προστατεύουν από τη στεφανιαία νόσο γιατί ελαττώνουν τη συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών LDL στον ορό, αν και τείνουν επίσης να ελαττώνουν και τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών HDL, αποτέλεσμα που δεν είναι επιθυμητό. Τα ***ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου*** έχει αναφερθεί ότι ελαττώνουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, πιθανόν μέσω δράσης τους στη θρομβογένεση και στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του αίματος. Τα ***μονοακόρεστα λιπαρά οξέα***, και ιδιαίτερα το ελαιόλαδο, ελαττώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, χωρίς να ελαττώνουν την HDL χοληστερόλη, έτσι ώστε να παρέχουν προστασία κατά της στεφανιαίας νόσου και της αθηρωμάτωσης γενικότερα. Η κατανάλωση **αλκοόλ** αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ανώτερου πεπτικού συστήματος, ιδιαίτερα μεταξύ των καπνιστών, είναι βασική αιτία κίρρωσης του ήπατος και χρόνιας υποτροπιάζουσας παγκρεατίτιδας, και ενδέχεται επίσης να συμβάλλει στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού και ίσως του εντέρου. Παρόλα αυτά, η ισχυρή προστατευτική επίδραση της αιθανόλης, αλλά και άλλων συστατικών ορισμένων οινοπνευματωδών ποτών, κατά των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι πλέον αποδεκτή. Έτσι, συστήνεται η μετρημένη κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών, ειδικά με τη μορφή του κρασιού και κυρίως κατά τα γεύματα. Οι σχετικές οδηγίες, όμως, θα πρέπει να εξατομικεύονται ανάλογα με την ενδεχόμενη ύπαρξη ηπατοπάθειας, τις καπνιστικές συνήθειες, ή ακόμη και το φύλο, (τα οφέλη από την κατανάλωση οινοπνεύματος φαίνεται να είναι μεγαλύτερα για τους άνδρες παρά για τις γυναίκες). Η κατανάλωση **ζάχαρης** έχει συσχετισθεί με αυξημένη επίπτωση τερηδόνας, ιδιαίτερα όταν απουσιάζει η φθορίωση του νερού και τα απαραίτητα μέτρα στοματικής υγιεινής ^[1]. Οι γλυκαιμικές επιδράσεις των απλών σακχάρων είναι συγκρίσιμες, αν όχι μικρότερες, αυτών του αμύλου των μαγειρευμένων τροφών. Τέλος, αναφορικά με τις **προστιθέμενες ουσίες**, ισχυρές επιδημιολογικές ενδείξεις μπορούν να υπάρξουν μόνο για τις προστιθέμενες ουσίες που υπόκεινται στον έλεγχο του ατόμου, ιδιαίτερα για το αλάτι και τα καρυκεύματα. Το **αλάτι** συμβάλλει στην ανάπτυξη υπέρτασης σε προδιατεθειμένα άτομα.

Κεφάλαιο 2^ο: Ο οίνος

2.1. Ο οίνος στη Μεσογειακή διατροφή

Όπως αναφέρθηκε ήδη στο προηγούμενο κεφάλαιο, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής είναι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ. Η προστατευτική επίδραση της αιθανόλης, αλλά και άλλων συστατικών ορισμένων οινοπνευματωδών ποτών, κατά των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι πλέον αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα. Συγκεκριμένα συστήνεται η κατανάλωση 3 ποτηριών για τα περισσότερα οινοπνευματώδη ποτά την ημέρα για τους άνδρες και 1 ½ ποτήρι την ημέρα για τις γυναίκες (ποσότητες που αντιστοιχούν στα επιθυμητά επίπεδα πρόσληψης αλκοόλ ανά ημέρα δηλ. σε 30g/ημέρα για τους άνδρες και 15g/ημέρα αντίστοιχα για τις γυναίκες) και κυρίως κατά τα γεύματα. Βέβαια οι παραπάνω συστάσεις θα πρέπει να εξατομικεύονται ανάλογα με το ιατρικό και οικογενειακό ιστορικό του κάθε ατόμου.

Ένα από τα οινοπνευματώδη ποτά που συστήνονται συχνότερα είναι ο οίνος. Έρευνες ^[14-18] έδειξαν πως ο οίνος έχει καλύτερη βιολογική δράση σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά (εξαιτίας των μικροσυστατικών του). Ταυτόχρονα υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφίας που εξηγεί την προστατευτική επίδραση του οίνου ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα αλλά και σε άλλες χρόνιες παθήσεις ^[19, 34, 60]

2.2. Σύσταση οίνου ^[19, 20]

Ο οίνος έχει περιγραφεί ως το δεύτερο πιο περίπλοκο γνωστό υγρό (όντας το αίμα πρώτο). Περιέχει μίγμα οξέων, σακχάρων, αλκοολών, κ.α. συστατικών ^[19]. Ο αριθμός αρωματικών και εύγευστων ουσιών που προέρχονται από τα σταφύλια, είναι μικρότερος από την πλειάδα ουσιών που παράγονται κατά τη ζύμωση, κατά την οποία από τα σταφύλια παράγεται ο οίνος. Στους οίνους γενικά, περιέχονται 0,8 – 1,2g αρωματικά συστατικά ανά λίτρο (εκ των οποίων τα περισσότερα είναι πτητικές αλκοόλες, πτητικά οξέα και εστέρες λιπαρών οξέων). Οι φαινόλες, η αιθανόλη, τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα, κ.α. είναι συστατικά τα οποία συνεισφέρουν στη γεύση και την οσμή του οίνου. Οι ταννίνες απαντώνται κυρίως στους ερυθρούς οίνους, ενώ πιο σπάνια υπάρχουν σε αξιόλογες ποσότητες στους λευκούς οίνους ^[19,20].

Το νερό και οι αλκοόλες είναι τα συστατικά τα οποία απαντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες στον οίνο (πίνακας 2.1., εικόνα 2.1.), αλλά σε αυτόν περιέχονται και διάφορα μικροσυστατικά (πίνακας 2.2., εικόνα 2.2.).

Πίνακας 2.1. : Συστατικά στη μεγαλύτερη ποσότητα

Συστατικό	Ποσοστό
Νερό	Έως και 85%
Αλκοόλες - Αιθανόλη	9 – 15% (συνήθως κυμαίνονται ~12%)
Λοιπά συστατικά	~3%

Σύσταση του οίνου (1)



Εικόνα 2.1.: Διαγραμματική απεικόνιση σύστασης οίνου

Νερό ^[19]:

Αποτελεί το πρώτο σε ποσότητα συστατικό του οίνου και ανέρχεται σε περιεκτικότητα 80-85%. Το νερό είναι σημαντικό για την ανάπτυξη των διαφόρων χαρακτηριστικών του οίνου, συμμετέχοντας στις διάφορες χημικές αντιδράσεις τόσο κατά την παραγωγή του οίνου από σταφύλια όσο και κατά τη διαδικασία ωρίμανσής του. Επίσης, το νερό είναι υπεύθυνο για την πυκνότητα του οίνου. Τέλος, υδατοδιαλυτά συστατικά ή μερικώς υδατοδιαλυτά, φαίνεται πως σπάνια έχουν σημαντικό ρόλο.

Αλκοόλες ^[19]:

Η σημαντικότερη, ίσως, αλκοόλη στον οίνο είναι η *αιθανόλη*. Η συγκέντρωση αιθανόλης μπορεί να κυμαίνεται από ~10% έως και 15% (μ.ο. ~12%). Παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων (είναι προϊόν του μεταβολισμού των σακχάρων από τις ζύμες). Είναι σημαντικό συστατικό για τη σταθερότητα, την ωρίμανση και τα οργανοληπτικά συστατικά του οίνου.

Η *μεθανόλη* βρίσκεται στον οίνο σε συγκέντρωση 0,1 – 0,2g/L. Προέρχεται από την απομεθυλίωση των πηκτινών. Οι πηκτίνες προέρχονται από τα στερεά συστατικά των σταφυλιών, συνεπώς, η περιεκτικότητα του οίνου σε μεθανόλη είναι ανάλογη με το χρόνο παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα. Για το λόγο αυτό οι ερυθροί οίνοι είναι πλουσιότεροι σε μεθανόλη από τους λευκούς. Η οξείδωση της μεθανόλης στο σώμα παράγει φορμαλδεΐδη και μυρμιγκικό οξύ τα οποία είναι τοξικά για το κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο οίνος έχει τη μικρότερη συγκέντρωση μεθανόλης από όλα τα αλκοολούχα ποτά που προέρχονται από ζύμωση.

Στις αλκοόλες συγκαταλέγονται οι *ανώτερες αλκοόλες* ^[23]. Οι ανώτερες αλκοόλες είναι δευτερεύοντα προϊόντα αλκοολικής ζύμωσης που προέρχονται κετονοξέα (με εξαίρεση την εξανόλη-1), έχουν περισσότερα από 2 άτομα άνθρακα άρα και μεγαλύτερο μοριακό βάρος και υψηλότερο σημείο βρασμού. Ο σχηματισμός του εξαρτάται από τις ζύμες, τις συνθήκες κατά τη ζύμωση π.χ. τη θερμοκρασία, κ.λ.π. Σε μικρές ποσότητες οι ενώσεις αυτές επιδρούν θετικά στο άρωμα του οίνου.

Οι 4 κυριότερες ανώτερες αλκοόλες που εντοπίζονται στον οίνο, σε φθίνουσα σειρά συγκέντρωσης, είναι:

3-μεθυλοβουτανόλη : $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

2- μεθυλοβουτανόλη : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-OH}$

2-μεθυλοπροπανόλη : $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH}$

1-προπανόλη : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

άλλες ανώτερες αλκοόλες που συναντώνται είναι:

ισοπροπανόλη: $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-OH}$

n-βουτανόλη: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

n-αμυλική αλκοόλη: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
n-εξανόλη: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
2-φαινυλοαιθανόλη: $(\text{C}_6\text{H}_5)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

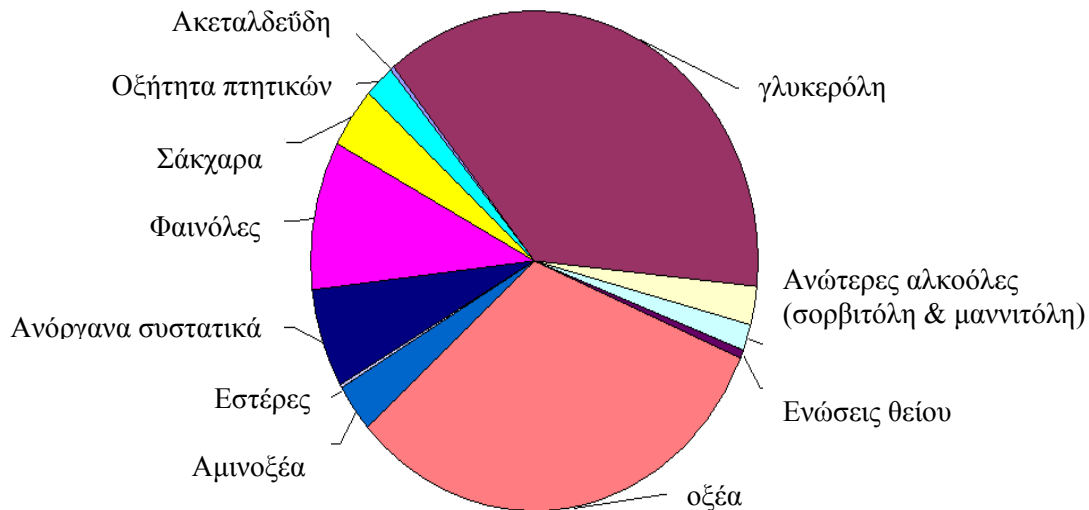
Σημαντικές είναι και **πολυαλκοόλες** του οίνου. Η **γλυκερόλη**, βρίσκεται σε συγκέντρωση 5 – 20g/L και παράγεται κυρίως στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης. Η **μαννιτόλη**, παράγεται με αναγωγή της μανόζης (κατά την αλκοολική ζύμωση) ή της φρουκτόζης (από τα γαλακτικά βακτήρια) και βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,2 – 1g/L αλλά μπορεί να φθάσει και ως 10g/L. Ο σχηματισμός της μαννιτόλης συνοδεύεται σχεδόν πάντα από το σχηματισμό **αραβιτόλης** η οποία παράγεται από την αποικοδόμηση των σακχάρων κατά τον κύκλο των πεντοζών και της **ερυθριτόλης** που υπάρχει στο σταφύλι. Η **σορβιτόλη** είναι παράγωγο της γλυκόζης και η συγκέντρωσή της μπορεί να φθάσει και τα 0,3g/L. Τέλος η **ινοσιτόλη** προέρχεται απευθείας από το σταφύλι. Είναι μια αλκοόλη η οποία δε ζυμώνεται και έτσι βρίσκεται αναλλοίωτη σε περιεκτικότητα 0,5g/L (όπως είναι και στο μούστο).

Τα άλλα μικροσυστατικά του οίνου, τα οποία συναντώνται σε μικρότερες ποσότητες αναφέρονται εν συντομία στον παρακάτω πίνακα και την εικόνα (πίνακας 2.2., εικόνα 2.2.).

Πίνακας 2.2.: Άλλα συστατικά

Συστατικό	Συγκέντρωση mg/L
Ακεταλεύδη	70
Γλυκερόλη	5000 – 20000
Ανώτερες αλκοόλες	500
Σορβιτόλη & Μαννιτόλη	300
Ενώσεις Θείου	80
Οξέα	6000
Αμινοξέα	550
Εστέρες	60
Μέταλλα	1200
Φαινόλες	1800
Σάκχαρα	750
Οξύτητα πτητικών συστατικών	400

Σύσταση του οίνου (2): μικροσυστατικά



Εικόνα 2.2. : Διαγραμματική απεικόνιση των μικροσυστατικών του ερυθρού οίνου

Στα υπόλοιπα μικροσυστατικά συμπεριλαμβάνονται:

Σάκχαρα ^[19, 20]:

Στα σταφύλια, κύρια σάκχαρα είναι η **γλυκόζη** και η **φρουκτόζη**. Τα σάκχαρα αυτά χρησιμοποιεί ως βασικό υπόστρωμα και ο *Saccharomyces cerevisiae* κατά τη ζύμωση των σταφυλιών προς οίνο. Θεωρείται ότι η ζύμωση έχει ολοκληρωθεί όταν η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι 2g/L στους ερυθρούς οίνους και 1,5g/L στους λευκούς. Τα εναπομείναντα σάκχαρα σε ξηρούς οίνους, είναι γενικά λιγότερα από 1,5g/L και αποτελούνται κυρίως από **πεντόζες** (όπως π.χ. είναι η αραβινόζη, η ραμνόζη και η ξυλόζη). Τα επίπεδα των σακχάρων είναι δυνατόν να αυξηθούν κατά την ωρίμανση του οίνου στο βαρέλι μέσω της αποικοδόμησης γλυκοσιδών του ξύλου. Υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων μπορούν να αυξήσουν την πτητικότητα των αρωματικών ενώσεων στους οίνους ^[19, 21]. Γενικότερα το επίπεδο των σακχάρων στον οίνο επηρεάζεται και από άλλα συστατικά όπως είναι η αιθανόλη, τα οξέα και οι ταννίνες. Επιπρόσθετα, τα σάκχαρα μεταβολίζονται σε ανώτερες αλκοόλες, εστέρες λιπαρών οξέων και αλδεΐδες, συστατικά τα οποία προσδίδουν στον κάθε οίνο το δικό του ξεχωριστό αρωματικό χαρακτήρα.

Τα σάκχαρα διαχωρίζονται σε αναγωγικά και μη αναγωγικά. Στα **αναγωγικά ζυμώσιμα σάκχαρα** ανήκουν οι εξόζες [D(+)-γλυκόζη, D(-)-γαλακτόζη, D(-)-φρουκτόζη], ενώ τα **αναγωγικά μη ζυμώσιμα σάκχαρα** αποτελούνται από πεντόζες και περιέχονται σε μικρές ποσότητες (από 0,3 – 2g/L). Η αραβινόζη και η ξυλόζη, δεν μπορούν να ζυμωθούν αλλά αποικοδομούνται από τα γαλακτικά βακτήρια. Στα **μη αναγωγικά σάκχαρα** ανήκει η σακχαρόζη η οποία υδρολύεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη.

Γενικά οι ερυθροί οίνοι έχουν περισσότερες πεντόζες από τους λευκούς.

Επίσης, στους οίνους, υπάρχουν και πολυμερή των σακχάρων, οι **πολυσακχαρίτες**. Οι πολυσακχαρίτες έχουν σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος και κολλοειδείς ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από το σταφύλι, από autólυση των ζυμών, από βακτήρια και μύκητες. Σε μικρές ποσότητες στον οίνο εντοπίζονται πηκτίνες 0,1 – 1g/L (πολυμερή του γαλακτουρονικού οξέος εστεροποιημένου με μεθανόλη σε ορισμένα σημεία της αλυσίδας) και κόμμεα 0,1 – 3g/L (πολυμερή που στο μόριό τους συμμετέχουν ανυδρίτες σακχάρων).

Οξέα^[19]:

Τα οξέα είναι μια σημαντική ομάδα ενώσεων στον οίνο, συνεισφέρουν στην όξινη γεύση των οίνων και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του χρώματος, αλλά και για την προστασία αυτών από τις μικροβιολογικές και της χημικές προσβολές. Προέρχονται από τόσο από το σταφύλι όσο και από τις ζυμώσεις και τις τυχόν μικροβιολογικές προσβολές. Ορισμένα καρβοξυλικά οξέα (π.χ. οξαλικό, φουμαρικό, κιτρικό οξύ) καθορίζουν το pH του οίνου. Τα οξέα διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες: τα πτητικά και τα σταθερά οξέα. Τα σημαντικότερα οξέα παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3.: Τα σημαντικότερα οξέα του οίνου

Πτητικά οξέα	Σταθερά οξέα	
Οξέα ζυμώσεων και προσβολών	Οξέα σταφυλιού	
Οξικό	Ηλεκτρικό	Τρυγικό
Μυρμικικό	Γαλακτικό	Μηλικό
Προπιονικό	Κιτρομηλικό	Κιτρικό
Ισοβουτυρικό	Διμεθυλογλυκερικό	Ουρονικό
Βουτυρικό	Πυροσταφυλικό	Γλυκονικό
	α - κετογλουταρικό	Οξαλικό
		Ασκορβικό

Το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ είναι τα τρία κυριότερα οξέα των οίνων

Τρυγικό οξύ: Αποτελεί το χαρακτηριστικό οξύ του σταφυλιού. Κατά την αλκοολική ζύμωση, η παραγωγή αλκοόλης μειώνει τη διαλυτότητα του όξινου τρυγικού καλίου με αποτέλεσμα την καθίζησή του και την τελική περιεκτικότητα περίπου σε 2,5 – 4g/L. Υπό την επίδραση του ψύχους γίνεται περεταίρω καθίζηση με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της περιεκτικότητας του οίνου σε τρυγικό σε ~ 1,5 – 2,5g/L. το τρυγικό οξύ είναι το πιο σταθερό σε βακτηριακές προσβολές μεταξύ των τριών κύριων οξέων.

Μηλικό οξύ: Η περιεκτικότητά του στα ώριμα σταφύλια είναι 2 – 4g/L ενώ στα πράσινα η περιεκτικότητα μηλικού είναι περίπου μεταξύ 15 – 25g/L. Είναι ευπαθές και προσβάλλεται από ζύμες και βακτήρια. Κατά την αλκοολική ζύμωση ή ποσότητα του μηλικού οξέος παραμένει σχεδόν αμετάβλητη. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις η ποσότητα μηλικού οξέος μπορεί να μειωθεί σημαντικά ανάλογα με το είδος των ζυμών (μπορεί και μείωση ως 40%) και των βακτηρίων (μηλογαλακτική ζύμωση).

Κιτρικό οξύ: Το κιτρικό οξύ που υπάρχει στους οίνους προέρχεται από τα σταφύλια (κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζεται ελάχιστη ποσότητα ή δε σχηματίζεται καθόλου κιτρικό οξύ από τα σάκχαρα). Σε οίνους όπου έχει γίνει μηλογαλακτική ζύμωση δε βρίσκεται κιτρικό οξύ εφόσον έχει διασπαστεί από τα βακτήρια προς οξικό οξύ.

Καρβονυλικές ενώσεις^[19]:

Η **ακεταλδεϋδη** είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά που επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων. Είναι δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και παράγεται από βακτήρια τα οποία οξειδώνουν αιθανόλη προς σχηματισμό ακεταλδεϋδης.

Η περιεκτικότητα της στους ξηρούς οίνους μπορεί να φτάσει τα 50 -100mg/l, στους γλυκούς να ξεπεράσει τα 200mg/l (πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4.: Επίπεδα ακεταλδεϋδης σε αλκοολούχα ποτά*

Τύπος	Ακεταλδεϋδη (mg/L)
Ερυθρός οίνος	4 – 212
Λευκός οίνος	11 – 493
Γλυκός οίνος	188 – 248
Τσέρυ	90 – 500
Μπράντυ	63 – 308
Κονιάκ	105

**Προσαρμογή δεδομένων από: Liu et. al. (2000).*

Η παρουσία οξυγόνου και SO₂ μπορεί να επηρεάσει την ποσότητα της παραγόμενης ακεταλδεϋδης (παρουσία SO₂ ο οίνος έχει σημαντικά υψηλότερη ποσότητα ακεταλδεϋδης). Η ακεταλδεϋδη μπορεί να σχηματιστεί και ως αποτέλεσμα της οξείδωσης φαινολικών ενώσεων. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, που αποτελεί προϊόν της οξείδωσης των φαινολικών, θα οξειδώσει την αιθανόλη προς ακεταλδεϋδη (βλ. και 2.δ. ενώσεις του θειώδους ανυδρύτε) ^[24].

Άλλες καρβονυλικές ενώσεις που περιέχονται στον οίνο είναι: Η **ακετάλη** (σχηματίζεται από την αντίδραση της ελεύθερης ακεταλδεϋδης με αιθανόλη, μικρή περιεκτικότητα σε οίνους <5mg/L). Η **υδρο-μεθυλο-φουρφουράλη** (σχηματίζεται από την αφυδάτωση σε όξινο περιβάλλον της φρουκτόζης, σημαίνει επεξεργασία των οίνων στους οποίους εντοπίζεται). Η **ακετοΐνη** (περιέχεται σε οίνους σε ποσότητα ~100mg/L, προέρχεται από τη συμπύκνωση δυο μορίων ακεταλδεϋδης και σχηματίζεται κατά το μέσο περίπου της αλκοολικής ζύμωσης ενώ σε επόμενα στάδια η παραγωγή της μειώνεται). Το **διακετύλιο** (βουτανεδιόνη-2,3) (προέρχεται από τη οξείδωση της ακετοΐνης, σε οίνους η περιεκτικότητα κυμαίνεται μεταξύ 0,1 – 2mg/L).

Ενώσεις του θειώδους ανυδρύτη^[19]:

Θειούχες ενώσεις η/και το διοξείδιο αποτελούν συντηρητικά των φρούτων και του οίνου, επίσης, τέτοιες ενώσεις παράγονται και από τον ανθρώπινο οργανισμό. Σε ένα ποτήρι οίνου περιέχονται ~10 mg , μεγαλύτερες ποσότητες σημειώνονται σε λευκούς οίνους ενώ σε σχέση με τους ερυθρούς.

Ο θειώδης ανυδρύτης δύναται να ενώνεται με ουσίες που διαθέτουν καρβονυλομάδες προς σχηματισμό άλλων ενώσεων σταθερών ή ασταθών. Σε οίνο με pH 3 -4, υπάρχει κυρίως από HSO_3^- και μικρές ποσότητες μοριακού SO_2 και ιόντων SO_3^{2-} . Τα HSO_3^- σχηματίζουν ενώσεις με καρβονυλικά συστατικά και κυρίως με την ακεταλδεΐδη. Η δέσμευση αυτή της ακεταλδεΐδης, περιορίζει τη συνεισφορά της ένωσης αυτής στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Τέλος, η προσθήκη SO_2 αναστέλλει τον αρωματικό χαρακτήρα της ακεταλδεΐδης (περιορίζεται το άρωμα του οίνου) και όχι την παραγωγή της⁽⁴⁾. Στους οίνους υπάρχουν και άλλες ποικίλες καρβονυλικές ενώσεις που δεσμεύουν το θειώδη ανυδρίτη, αλλά είτε δεν έχουν ακόμα επαρκώς μελετηθεί είτε απαντώνται μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες.

Λιποειδή του οίνου^[19, 236]:

Τα λιποειδή του οίνου προέρχονται κυρίως από τα λιποειδή της ζύμης. Η περιεκτικότητα και η σύστασή τους μεταβάλλεται από τη χρήση των θειωδών αλάτων με αντιστρόφως ανάλογο τρόπο. Ανάλογα με το κάθε είδος οίνου τα ουδέτερα λιποειδή (NL) αποτελούν το 50 – 70% των ολικών λιποειδών (TL), τα γλυκολιποειδή το 25 – 40% των TL, και τα φωσφολιποειδή το 2 – 4% του συνόλου των λιποειδών (TL). Τα κυριότερα γλυκολιποειδή είναι: τα μονο-γαλακτοζύλο διγλυκερίδια και οι κερεβοζίτες. Σε μεγαλύτερη αναλογία έχουν βρεθεί τα εξής φωσφολιποειδή: φωσφατιδυλο-χολίνη, φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη, φωσφατιδυλο-γλυκερόλη. Τα κορεσμένα και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα συναντώνται σε περίπου ίδια ποσά, με ελαφρά υπεροχή των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Επιπλέον έχουν βρεθεί και φωσφο-γλυκο λιποειδή με σκελετό γλυκερόλης.

Σε μελέτη όπου εξετάστηκε η επίδραση των εξωγενών λιποειδών στη συμπεριφορά του αφρού σε αφρώδεις οίνους^[22], αρχικά προσδιορίστηκαν τα ενδογενή λιποειδή τριών οίνων (πίνακας 2.5.).

Πίνακας 2.5.: Προσδιορισμός των λιποειδών σε οίνους, βάσει των λιπαρών οξέων αυτών: $C_{16} - C_{20}$

Λιποειδή	Οίνο			Μέσος όρος %
	Chardonnay $\mu\text{g/L}$	Pinot noir $\mu\text{g/L}$	Pinot meunier $\mu\text{g/L}$	κάθε τάξης
TG	37	40	32	12
DG	145	163	159	51
MG	44	55	47	16
FFA	45	40	46	14
PL	19	27	26	7
TL	290	325	310	100

* Όπου: TG = τριγλυκερίδια, DG = διγλυκερίδια, MG = μονογλυκερίδια, FFA = ελεύθερα λιπαρά οξέα, PL = πολικά λιποειδή

Φαινολικές ενώσεις^[19, 237]:

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μία μεγάλη και σύνθετη ομάδα ιδιαίτερης σημασίας για την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά των οίνων (κυρίως των ερυθρών, στους λευκούς οίνους η συγκέντρωση φαινολικών είναι αρκετά μικρότερη) (Πίνακας 2.6). οι ενώσεις αυτές επιδρούν στην εμφάνιση, τη γεύση, το άρωμα και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οίνων. Προέρχονται από το σταφύλι (από τη σάρκα και το κουκούτσι), από το κλίμα και από το ξύλο των βαρελιών στα οποία ο οίνος αποθηκεύτηκε και παλαιώσε.

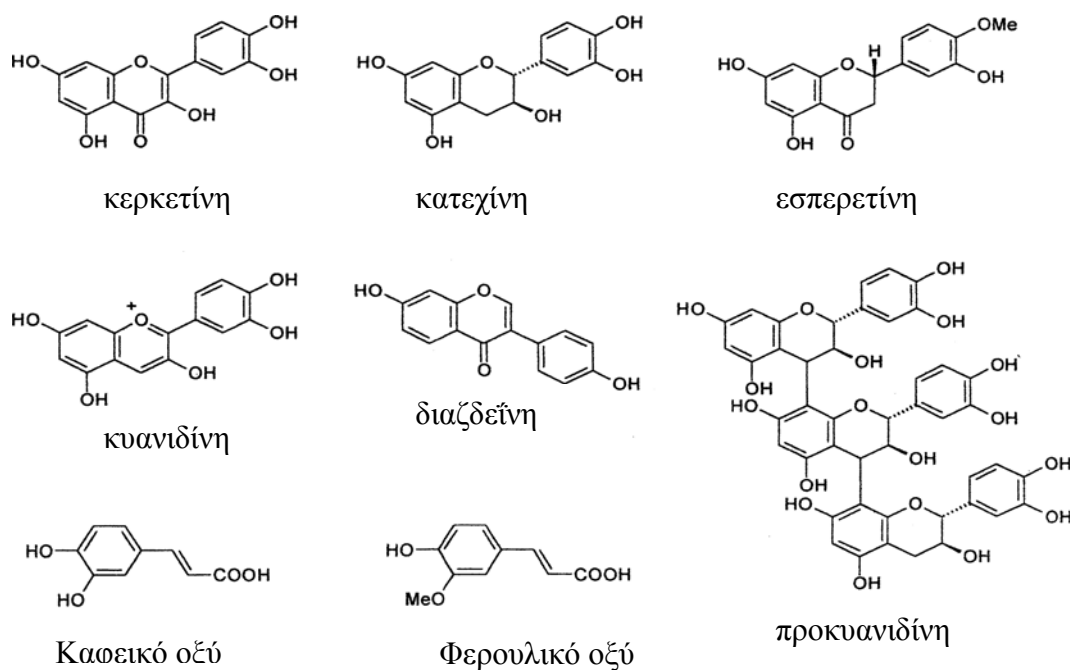
Πίνακας 2.6.: Τυπική σύσταση οίνων (% βάρους)¹.

Συστατικό	Επιτραπέζιοι οίνοι		Επιδόρπιοι οίνοι	
	Λευκός	Ερυθρός	Λευκός	Ερυθρός
Νερό	87	87	76	74
Αιθανόλη	10	10	14	14
Άλλα πτητικά	0.04	0.04	0.05	0.05
Σάκχαρα	0.05	0.05	8	10
Πηκτίνες	0.3	0.3	0.25	0.25
Γλυκερόλη	1.1	1.1	0.9	0.9
Οξέα	0.7	0.6	0.5	0.05
Φαινόλες²	0.01	0.2	0.01	0.1
Αμινοξέα	0.25	0.25	0.2	0.2
Λίπη, Τερπένια	0.01	0.02	0.01	0.02
Βιταμίνες, κ.α.	0.01	0.01	0.01	0.01
Σύνολο:	100	100	100	100

1. Προσαρμογή από Soleas και συν.

2. Εκτός από το περιεχόμενο σε σάκχαρα, αυτή είναι η κύρια διαφορά μεταξύ των δυο κατηγοριών οίνων (Table and Dessert).

Οι φαινόλες είναι ενώσεις που φέρουν μια ομάδα $-OH$ απευθείας συνδεδεμένη σε έναν αρωματικό δακτύλιο, $ArOH$, (εικόνα 2.3.).



Εικόνα 2.3.: Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που συναντώνται σε οίνους.

Δυο κύριες υποομάδες φαινολών απαντώνται στους οίνους α) οι φλαβονοειδείς και β) οι μη φλαβονοειδείς.

Α) Φλαβονοειδείς φαινόλες: ονομάζονται οι πολυμοριακές φαινόλες που έχουν τύπο: $C_6-C_3-C_6$ ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβόνη. Κύριες φλαβονοειδείς ενώσεις στον οίνο είναι οι φλαβονόλες, οι κατεχίνες (4 ισομερή: (+) και (-) κατεχίνη, (+) και (-) επικατεχίνη καθώς και δυο ρακεμικά), οι ταννίνες και οι ανθοκυανίνες (ιδίως σε ερυθρούς οίνους). Τα φλαβονοειδή ευρίσκονται είτε ελεύθερα είτε ως πολυμερή ενωμένα με άλλες ενώσεις όπως φλαβονοειδή, σάκχαρα (γλυκοσίδες), μη φλαβονοειδή. Εκτός από τις μονομοριακές κατεχίνες υπάρχουν και συμπυκνωμένα φαινολικά παράγωγα (προανθοκυανιδίνες). Παρόλο που οι προανθοκυανιδίνες συναντώνται ως διμερή στα σταφύλια ^[19], τείνουν να πολυμερίζονται και να κυριαρχούν στον οίνο ως ταννίνες. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες προέρχονται κυρίως από τη σάρκα, τα κουκούτσια και το κλίμα του σταφυλιού, ενώ οι κατεχίνες από τα κουκούτσια και το κλίμα του σταφυλιού. Οι φλαβονοειδείς ενώσεις στους ερυθρούς οίνους συνήθως αποτελούν >85% των συνολικών φαινολών ($\geq 1,000$ mg/L) ενώ σε λευκούς οίνους είναι <20% των φαινολών (≤ 50 mg/L). Η ποσότητα φλαβονοειδών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, η συνολική διάρκεια παραμονής με τα στέμφυλα, το pH, η συγκέντρωση αιθανόλης, το SO_2 που υπάρχει, οι κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, κ.α.

Β) Μη φλαβονοειδείς φαινόλες: είναι οι μονομοριακές φαινόλες όπως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. Σε οίνους οι οποίοι δεν ωρίμασαν στο βαρέλι, οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις είναι παράγωγα του υδροξυκιναμικού και υδροξυβενζοϊκού οξέος. Οι παράγωγες ενώσεις του υδροξυκιναμικού οξέος συναντώνται εστεροποιημένες με σάκχαρα, οργανικά οξέα, ή διάφορες αλκοόλες. Εκείνοι οι οίνοι που ωρίμασαν στο βαρέλι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ενώσεων παραγώγων του υδροξυβενζοϊκού οξέος, ιδίως ελαγικού οξέος, το οποίο προέρχεται από την υδρόλυση των ταννινών. Επίσης, αποικοδόμηση των λιγνίνων που υπάρχουν στο ξύλο των βαρελιών, απελευθερώνει φαινολικά οξέα, και πιο ειδικά παράγωγα κινναμωμικού και βενζοϊκού οξέος, καθώς και φαινολικές αλδεύδες, παράγωγα βενζαλδεΐδης και κινναμωμικής αλδεΐδης. Συνεπώς, κατά την παλαίωση οι οίνοι εμπλουτίζονται με φαινολικά οξέα, σε ποσότητες που επηρεάζονται από το ξύλο του βαρελιού και τις συνθήκες αποξήρανσής του. Μια άλλη κατηγορία μη φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων είναι τα στιλβενια τα οποία προέρχονται από τα αμπέλια (ξύλινα μέρη, φύλλα, καρποί) σε ερυθρούς οίνους η *trans*-ρεσβερατρόλη απαντάνται σε ποσότητες 0,1 – 15mg/L. Βρέθηκε ότι ο 3 – Ο –β γλυκοζίτης της ρεσβερατρόλης, κυρίως το *cis*-ισομερές είναι κύριο συστατικό των στιλβενίων στον οίνο στην αρχή της ζύμωσης, ενώ ο τελικός οίνος περιέχει μεγαλύτερα ποσά από το *trans*-ισομερές (σε ερυθρό οίνο της ποικιλίας Cabernet Sauvignon έχει βρεθεί πως περιέχονται περίπου 2,75mg/L).

Η συγκέντρωση φαινολικών στους οίνους αυξάνεται κατά τη ζύμωση με τα στέμφυλα, ενώ αντίθετα, κατά την ωρίμανση οι φαινολικές ενώσεις μειώνονται και η παλαίωση έχει ακόμα πιο δραματικό αποτέλεσμα στη μείωση αυτή.

Αζωτούχες ενώσεις^[19]:

Αζωτούχες ενώσεις περιέχονται στους οίνους σε συγκέντρωση 0,5 – 4g/L. Προέρχονται από τα στερεά μέρη των σταφυλιών (για το λόγω αυτό οι ερυθροί οίνοι είναι πλουσιότεροι στις ενώσεις αυτές). Διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες στις οργανικές και στις ανόργανες. Η πρώτη κατηγορία αζωτούχων ενώσεων αποτελεί περίπου το 95% του συνολικού αζώτου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι **πρωτεΐνες**, τα **πολυπεπτίδια**, τα **αμινοξέα** (κυρίως η αλανίνη, το ασπαραγινικό, το γλουταμινικό και η προλίνη, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγή αζώτου για τους ζυμομύκητες), τα **αμίδια** (κυρίως ασπαραγίνη και γλουταμίνη), οι **βιογενείς αμίνες**, οι **νουκλεινικές ενώσεις**, και οι **εξοζαμίνες** (γλυκοζαμίνες, γαλακτοζαμίνες). Στη δεύτερη κατηγορία, στις ανόργανες αζωτούχες ενώσεις, συγκαταλέγονται τα **αμμωνιακά άλατα** τα οποία αποτελούν περίπου το 5% του συνολικού αζώτου.

Εστέρες^[19]:

Τα ελεύθερα οργανικά οξέα που βρίσκονται στους οίνους, αντιδρούν με την αιθανόλη προς σχηματισμό εστέρων. Με την πάροδο του χρόνου η περιεκτικότητα των οίνων σε εστέρες αυξάνει 2 – 3 φορές στους παλαιότερους οίνους. Περίπου το 80% των συνολικών πτητικών εστέρων αποτελεί ο οξικός αιθυλεστέρας (παράγεται από ζύμες και οξικά βακτήρια, η παραγωγή του επηρεάζεται από το είδος των ζυμών, τη θερμοκρασία – το pH – τον αερισμό κατά τη ζύμωση και την τεχνική οινοποίησης).

Τερπένια^[19]:

Το μεγαλύτερο μέρος των τερπενίων αποτελούν τα μονοτερπένια. Βρίσκονται συνδεδεμένα με κατάλοιπα σακχάρων στο χυμό σταφυλιών και στους οίνους. Οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συνθέτουν μονοτερπένια. Οι ενώσεις αυτές δε μεταβάλλονται κατά τη ζύμωση. Τα συστατικά αυτά είναι σημαντικά για το άρωμα των οίνων.

Βιταμίνες^[19]:

Υπάρχουν διάφορες βιταμίνες οι οποίες οι οποίες περνούν στον οίνο αφού επεξεργαστούν από τις ζύμες. Στις βιταμίνες που υπάρχουν στον οίνο συγκαταλέγονται αυτές του συμπλέγματος Β (σε περιεκτικότητα από 0,002mg/L έως και 0,8mg/L ή ακόμα και 10-100mg/L όπως η ριβοφλαβίνη σε λευκούς οίνους), η βιταμίνη C – ασκορβικό οξύ (30mg/L σε ερυθρούς και λευκούς οίνους), κ.α.

Ανόργανα συστατικά^[19]:

Προέρχονται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού. Για το λόγο αυτό στους ερυθρούς οίνους τα ανόργανα συστατικά βρίσκονται αυξημένη ποσότητα, φθάνονται 2 – 4g/L.

Ανιόντα: SO_4^{--} , Cl^- , PO_4^{--} , Si, B, F^- , Br^- , I^-

Κατιόντα: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+}

2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία και ερευνητικά δεδομένα

Η αρχή για τη στροφή του επιστημονικού ενδιαφέροντος προς ο οίνος και τη μελέτη των επιδράσεων του στην υγεία του ανθρώπου, ουσιαστικά έγινε μετά την παρατήρηση, αρκετών ερευνών. Στη Γαλλία σημειώθηκε χαμηλότερη θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακών αιτιών σε όλο τον βιομηχανικό κόσμο (εκτός της Κρήτης στην Ελλάδα), αλλά αριθμός καρκίνων και βίαιων θανάτων από τους υψηλότερους, παρόλο που το συνολικό επίπεδο παραγόντων κινδύνου είναι παρόμοιο με τις άλλες βιομηχανικές χώρες και ταυτόχρονα η διατροφή είναι πλούσια σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη ^[3]. Η παραπάνω παρατήρηση έγινε αρχικά από τον Ancel Keys το 1958 (μελέτη των 7 χωρών) ^[7] και τον Ducimetiere και συν., 1980 (για το ίδιο επίπεδο παραγόντων κινδύνου, ο αριθμός καρδιαγγειακών κρίσεων είναι κατά 35 – 55% χαμηλότερος στη Γαλλία από ότι στις Η.Π.Α.), ενώ και άλλες έρευνες και στατιστικά στοιχεία επιβεβαίωσαν το φαινόμενο αυτό στη Γαλλία (στατιστικά του Π.Ο.Υ. 1990 – 1991, MONICA 1989) ^[26]. Το φαινόμενο αυτό που παρατηρήθηκε στη Γαλλία ονομάστηκε “Γαλλικό παράδοξο” και εξηγήθηκε εν τέλει με την μέτρια κατανάλωση οίνου ^[11, 25]

Άρθρα ανασκόπησης ερευνών, που περιλάμβαναν μεγάλο δείγμα και των δύο φύλων, υποστηρίζουν το γεγονός ότι μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται όχι μόνο με μείωση στη συνολική θνησιμότητα εξαιτίας της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων ^[19] αλλά και με την αύξηση της επιβίωσης ^[27, 28, 29]. Η υψηλότερη όμως πρόσληψη οίνου έχει συσχετιστεί με αυξημένη θνησιμότητα ^[27, 28]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις κατέληξαν στη διαγραμματική περιγραφή της συσχέτισης της κατανάλωσης αλκοόλ και της θνησιμότητας, με καμπύλες σχήματος U ή J (σύμφωνα με τις καμπύλες, όσοι δεν καταναλώνουν και όσοι υπερκαταναλώνουν ερυθρό οίνο έχουν αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας σε αντίθεση με αυτούς που καταναλώνουν μέτριες ποσότητες αλκοολούχων ποτών) ^[27, 30, 31], έρευνες ασθενών – μαρτύρων επιβεβαιώνουν την παραπάνω συσχέτιση ^[32]. Ο Pitsavos και συν. (CARDIO 2000) ^[33] επιβεβαίωσαν και στον Ελλαδικό χώρο, την παραπάνω συσχέτιση αλκοόλ – θνησιμότητας με τη μορφή καμπύλης σχήματος J.

Πλήθος ερευνών, έχουν αποδείξει την ευεργετική επίδραση του οίνου στο λιπιδαιμικό προφίλ, στη λειτουργία του ενδοθηλίου, στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, στους αιμοστατικούς παράγοντες: στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στη δημιουργία θρόμβων, όλα σημεία που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση χρόνιων φλεγμονωδών

νοσημάτων όπως είναι τα καρδιαγγειακά, ορισμένες νεφρικές παθήσεις, κ.α. Επίσης έχει ερευνηθεί και η επίδραση των συστατικών του οίνου στον καρκίνο.

Επίδραση στα επίπεδα των λιπιδίων: Πιο συγκεκριμένα, άρθρα ανασκόπησης [32, 34] εξηγούν πως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τα επίπεδα της HDL (ιδίως της HDL₂ και της απολιποπρωτεΐνης – Apo A1) ενώ ταυτόχρονα παρεμβατικές μελέτες σε ανθρώπους επαληθεύουν τα ευρήματα [35]. In vitro πειράματα έδειξαν πως η αιθανόλη που περιέχεται σε αλκοολούχα ποτά, μειώνει την οξείδωση της LDL (αν και από μόνη της είναι προ-οξειδωτικό μόριο). Τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη έχουν παρόμοια λειτουργία.

Οι επιδράσεις του οίνου στα λιπίδια του αίματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Παράμετρος που μετράται	Επίδραση ερυθρού οίνου
HDL	↑
Ρυθμός οξείδωσης της LDL	↓
LDL/HDL	↓
Apo-A1 HDL	↑
Χοληστερόλη / HDL	↓
Λιποπρωτεΐνη (α)	↓

* Ο πίνακας είναι προσαρμογή από: Giovanni de Gaetano και συν., “*The Mediterranean Lecture: Wine and Thrombosis -From Epidemiology to Physiology and Back*”.

Οι μεταβολές που περιγράφηκαν παραπάνω, στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, θεωρούνται ότι αποτελούν τον κύριο μηχανισμό μέσω του οποίου η κατανάλωση οίνου επιδρά θετικά στην καρδιαγγειακή νόσο [36, 37].

In vitro, αρκετές έρευνες έχουν δείξει τις ευεργετικές επιδράσεις του οίνου. Πληθώρα μελετών έχει αποδείξει την in vitro ικανότητα του οίνου αλλά και συγκεκριμένων συστατικών του (όπως π.χ. τα φαινολικά) να αναστέλλει την οξείδωση της LDL, είτε αυτή προκαλείται από τα μακροφάγα, είτε από διάφορα ιόντα, είτε από έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E, είτε από τις ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες [38 – 46]. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί πως η κατανάλωση οίνου επιδρά και στη μείωση των κυτταρικών επιπέδων χοληστερόλης. [47].

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες και οξειδωτικό στρες: Λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των οίνων (κυρίως των πολυφαινολών των οίνων) μπορεί να καθυστερήσει η έναρξη της αθηρογένεσης δια του περιορισμού των προοξειδωτικών δράσεων [36].

Σε *in vivo* μελέτες έχει πιστοποιηθεί η ικανότητα που έχουν τα συστατικά του οίνου να μεταβάλουν την αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος καθώς και να μειώνουν την οξείδωση. Επίσης, έχει αποδειχτεί *in vitro* πως τα διάφορα συστατικά του οίνου (π.χ. φαινολικά παράγωγα.) συμβάλλουν στον εκκαθαρισμό των ελευθέρων ριζών, δρώντας ενάντια στο οξειδωτικό στρες^[48 – 53].

Σε παρεμβατικές μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε οίνος (ιδίως ερυθροί οίνοι), φάνηκε πως κυρίως οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν σε αυτό ή τα φαινολικά παράγωγα, απορροφώνται από τον οργανισμό και παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές δράσεις (π.χ. γνωρίζουμε *in vitro* πως οι ενώσεις αυτές προστατεύουν την LDL από την οξείδωση)^[43, 45, 51].

Παρεμβατική μελέτη του Montilla και συν. σε αρουραίους^[54] έδειξε πως όταν τα πειραματόζωα λάμβαναν δίαιτα υψηλή σε χοληστερόλη και παράλληλα κατανάλωναν ερυθρό οίνο (400 ml/70 kg) μειώθηκαν τα προϊόντα οξείδωσης των λιποειδών (στον εγκέφαλο και στους νεφρούς) καθώς και ο αριθμός των ερυθροκυττάρων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου όπου λάμβαναν μόνο τη δίαιτα υψηλή σε χοληστερόλη. Επίσης, η συγκέντρωση της ουρίας, της κρεατινίνης και της αλβουμίνης στα ούρα, μειώθηκε σημαντικά. Η ερευνητική ομάδα, λοιπόν, προτείνει πως η κατανάλωση ερυθρού οίνου πιθανόν έχει νευρο- και νεφρο- προστατευτικά αποτελέσματα ενάντια στο οξειδωτικό στρες και την υπερχοληστερολαιμία. Η ρεσβερατρόλη – ένωση της ομάδας των πολυφαινολών που περιέχονται στον οίνο – δρά με αντιοξειδωτικό τρόπο^[51] και μειώνει σημαντικά το βαθμό φλεγμονής του εντέρου, την διήθηση των ουδετερόφιλων, τα επίπεδα των κυτταροκινών και την έκφραση κυκλοξυγονάσης-2 (COX-2) σε ζωικά μοντέλα που τους προκλήθηκε ελκώδης κολίτιδα^[55].

Παρεμβάσεις σε εθελοντές, έδειξαν αύξηση των αντιοξειδωτικών συστατικών του πλάσματος και προστασία από την οξείδωση της LDL, μετά από κατανάλωση ερυθρού οίνου^[56, 57]. Σημαντικός περιορισμός της μεταγευματικής οξειδωτικής δραστηριότητας^[50] παρατηρήθηκε σε εθελοντές, όταν καταναλώθηκε γεύμα πλούσιο σε λίπος μαζί με οίνο^[58]. Σε άλλες παρεμβάσεις παρόμοιου σχεδιασμού^[36] βρέθηκε πως η κατανάλωση οίνου οδηγεί σε μετρήσιμες ποσότητες φαινολικών ή μεταβολιτών τους στο πλάσμα (Tsang και συν.^[59]), σε προστασία του DNA από την οξείδωση (Leighton F.^[60]) αλλά και σε αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης (η ομοκυστεΐνη αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο παράγοντα που σχετίζεται με το θάνατο από καρδιαγγειακά, υπάρχει και εδώ συσχέτιση τύπου U) (van der Gaag και συν.)^[61].

Αιμόσταση: Φαίνεται πως το αλκοόλ επηρεάζει διάφορους παράγοντες που εμπλέκονται στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ σχηματισμού θρόμβου για διακοπή της αιμορραγίας και διάλυσης του θρόμβου ώστε να μην αποφράξει η αρτηρία (αιτία δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας και εμφάνισης εμφράγματος).

Οι θετικές επιδράσεις του οίνου φαίνονται σε διάφορα στάδια της αιμοστατικής διαδικασίας (αρχική αιμόσταση, ινωδογονόλυση και θρόμβωση). Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα tPA, μειωμένες τιμές ινωδογόνου, αντιθρομβίνης III και του παράγοντα πήξης^[34, 62, 63, 64], καθώς και μειωμένη ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων^[34, 65, 66]. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες επιδρούν στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, καταλήγοντας να αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και περιορίζοντας τη σύνθεση προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών παραγόντων^[34, 67 - 69]. Επιπλέον έρευνες^[34, 70] αποκάλυψαν πως κατανάλωση ερυθρού οίνου είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων ινωδογόνου και του παράγοντα πήξης VIIc του πλάσματος, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε στο αντιγόνο ενεργοποίησης του πλασμινογόνου των ιστών.

Στο σημείο αυτό, καλό θα ήταν να αναφερθούμε λίγο παραπάνω στην επιρροή του οίνου στα αιμοπετάλια. Είναι γνωστό πως η συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ήδη κατεστραμμένο ενδοθήλιο είναι το βασικότερο βήμα για τη δημιουργία θρόμβωσης και αθηρογένεσης. Αρκετές έρευνες έχουν αξιολογήσει την πιθανότητα η κατανάλωση αλκοόλ με τη μορφή οίνου να έχει επιπρόσθετο θετικό αποτέλεσμα στη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε σχέση με την απλή κατανάλωση αλκοόλης. Αν και η αντ αιμοπεταλιακή δράση των πολυφαινολών του οίνου όπως αυτή παρατηρείται *in vitro*^[71] και σε μοντέλα πειραματόζων^[73], έχει πιστοποιηθεί, δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί σε ανθρώπους.

Οι Demrow και συν.,^[74] συγκρίνανε την επίδραση ερυθρού και λευκού οίνου (ml/kg), με τη δράση που παρουσιάζει ο χυμός από σταφύλια (ml/kg), στα αιμοπετάλια και στο σχηματισμό θρόμβων, σε *in vivo* μοντέλο πειραματόζων. Ο ερυθρός οίνος και ο χυμός των σταφυλιών, έδειξαν αντ αιμοπεταλιακή και αντιθρομβωτική δράση. Οι ερευνητές, γνωρίζοντας ότι η ποσότητα αιθανόλης που απαιτείται ώστε να εκδηλωθεί αντ αιμοπεταλιακή και αντιθρομβωτική δράση, είναι αρκετά μεγαλύτερη από την ποσότητα αιθανόλης που υπάρχει στον ερυθρό οίνο, κατέληξαν πως ο ερυθρός οίνος περιέχει και άλλα συστατικά που δρουν ως αναστολείς της συσσώρευσης αιμοπεταλίων εκτός από την αιθανόλη. Οι Rein και συν.^[75] μελέτησαν *in vitro* αλλά και *in vivo* σε υγιείς ανθρώπους, την επίδραση μη αλκοολούχου οίνου στη λειτουργία των

αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως σε μη διεγερμένα αιμοπετάλια, ο μη αλκοολούχος οίνος συνέβαλε στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενώ παράλληλα περιόρισε την προκαλούμενη από επινεφρίνη απόκριση των αιμοπεταλίων. Σημαντικές πληροφορίες παρείχε η μελέτη του Russo και συν. ^[76]. Στη μελέτη αυτή, φάνηκε σημαντική *in vitro* αντιαιμοπεταλιακή δράση του οίνου. Η δράση αυτή, συσχετίστηκε με τα μη αλκοολικά συστατικά του οίνου και κυρίως με τις προκυανιδίνες, και τις κατεχίνες. Στη συγκεκριμένη έρευνα δε φάνηκε δραστηριότητα άλλων συστατικών όπως είναι οι τα φαινολικά οξέα και οι φλαβονόλες. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα αλλά και απομονωμένες ενώσεις από ερυθρούς και λευκούς οίνους αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων^[72, 78].

Παρόλα τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, κάποιες έρευνες σε ανθρώπους δεν έχουν δείξει διαφορές στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από κατανάλωση ερυθρού ή λευκού οίνου ^[67, 77]. Συνεπώς χρειάζονται επιπλέον έρευνες ώστε να καθοριστούν ακριβώς οι δράσεις του οίνου στα αιμοπετάλια.

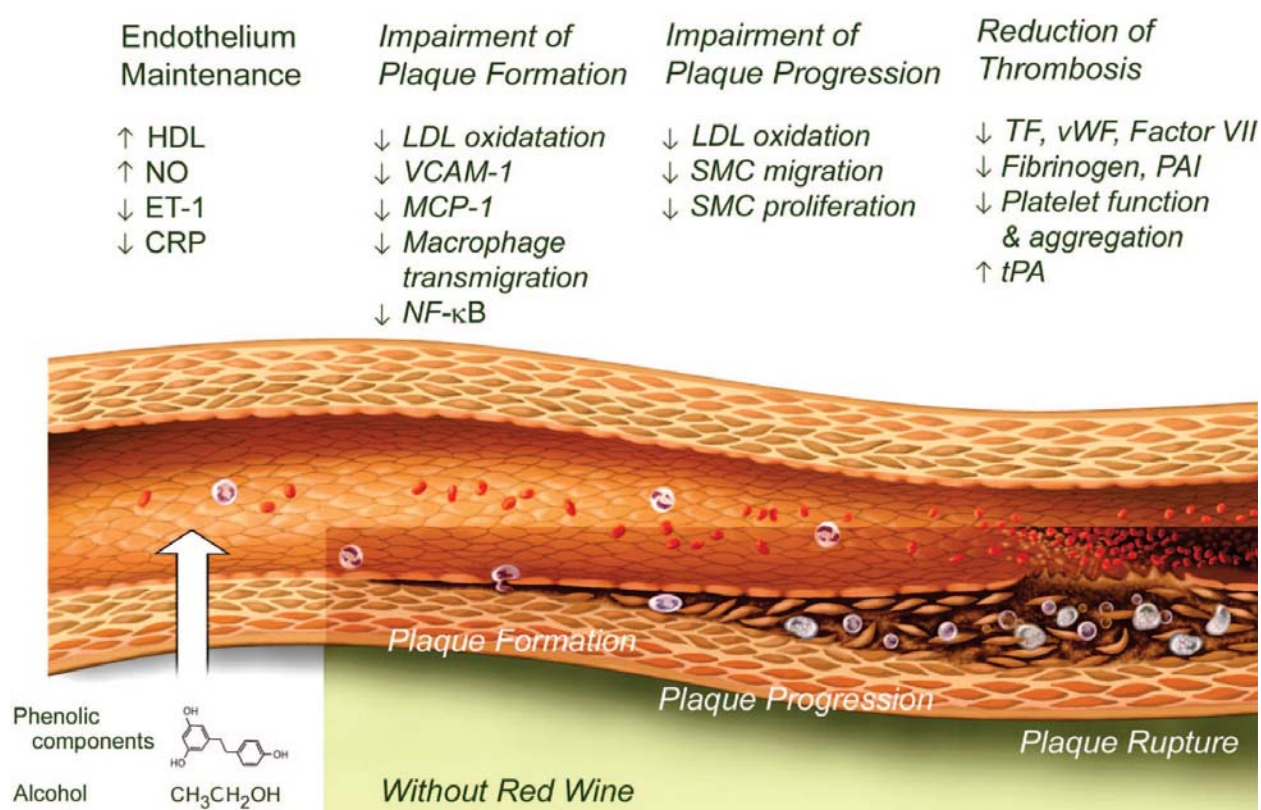
Λειτουργία του ενδοθηλίου: Μελέτες σε πειραματόζωα υποδεικνύουν ότι μαζί με την αντιθρομβωτική επίδραση των αλκοολούχων ποτών, οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον οίνο διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ενδοθηλίου (προάγουν τη σύνθεση του ενζύμου eNOS συνθετάση). Πιο συγκεκριμένα, ο Andriambeloson και συν. ^[34, 79] έδειξε πως σε αρουραίους αυξήθηκε το παραγόμενο από το ενδοθύλιο NO υπό την επίδραση οίνου. Ο Martin και συν. ^[34, 80] έδειξε πως η ανθοκυανιδίνη και η δελφινιδίνη ανέστειλαν την απόπτωση κυττάρων του ενδοθηλίου μέσω της ομοιόστασης Ca και του βιοχημικού μονοπατιού της παραγωγής NO. Επιπλέον, οι πολυφαινόλες μειώνουν την έκφραση μορίων συγκόλλησης (π.χ. ICAM, VCAM) και τη δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα, επηρεάζοντας έτσι τη λειτουργία του ενδοθηλίου ^[34, 79 – 80].

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως η κατανάλωση οίνου βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου.

Έρευνες σε ανθρώπους εθελοντές οι οποίοι κάπνιζαν συστηματικά έδειξαν μείωση στο FMD (flow-mediated dilatation) όμως όταν παράλληλα κατανάλωσαν ερυθρό οίνο τέτοια μεταβολή δεν παρατηρήθηκε ^[81]. Σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο η κατανάλωση οίνου βελτίωσε τη λειτουργία του ενδοθηλίου αν και δε φάνηκε αύξηση των επιπέδων πολυφαινολών στο πλάσμα.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι επώαση των, ενδοθηλιακών κυττάρων με ερυθρό οίνο, αύξησε την *in vitro* έκφραση του mRNA της eNOS, τα επίπεδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης καθώς και τη δραστηριότητα του ενζύμου eNOS^[82]. Οι ερευνητές της παραπάνω μελέτης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτή η αύξηση της παραγωγής και της δραστηριότητας της eNOS πιθανώς συμβάλλει στην ευεργετική επίδραση του οίνου στο καρδιαγγειακό σύστημα. Αξισημείωτο είναι ότι στη μελέτη αυτή, δοκιμάστηκαν ερυθροί οίνοι από διαφορετικές χώρες προέλευσης και μόνο ο Γαλλικός οίνος έδειξε τα παραπάνω αποτελέσματα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ποικιλία είναι σημαντική για τη βιολογική δραστηριότητα του οίνου.

Εν τέλει, συνοπτικά οι προστατευτικές δράσεις του οίνου έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 2.4.)



Εικόνα 2.4.: Οι προστατευτικές δράσεις του οίνου στην αγγειακή νόσο.

*Προσαρμογή από: Szmítko P.E., και συν., 2005

Καρκίνος: Τα φαινολικά συστατικά, και ιδίως η κερκετίνη, έχει αποδειχτεί πως παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κυττάρων τα οποία προέρχονται από ανθρώπινους και ζωικούς καρκίνους όπως λευχαιμία^[83], καρκίνωμα στήθους^[84], καρκίνωμα λαιμού και κεφαλής^[85], καρκίνο του πεπτικού σωλήνα^[86, 87], αλλά και καρκίνο του προστάτη. Οι παραπάνω δράσεις

έχουν φανεί τόσο σε πειράματα *in vitro* όσο και σε πειραματόζωα ^[19, 88 – 93]. Ενώ και μελέτες σε ανθρώπους έχουν αρχίσει να φαίνονται ανάλογα αποτελέσματα (π.χ. Ferry DR ^[94], και συν., σε κλινική δοκιμή φάσης 1).

Τα φλαβονοειδή και οι γλυκοζίτες τους (όπως myricetin, quercetin, morin, kaempferol and rutin) αλληλεπιδρούν και αναστέλλουν την προκαλούμενη από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονανθράκες μετάλλαξη^[93]. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονανθράκες, θεωρούνται ισχυρά καρκινογόνα αλλά και μεταλλαξιογόνα.

Σε μελέτες *in vitro* ^[95] σε καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων αρουραίου, η κατεχίνη αναστείλει την επαγόμενη από NNK (4-μεθυλνιτροζαμινο-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη, είναι ειδικό καρκινογόνο του καπνού) αποικοδόμηση του DNA. Ο Fan και συν., ^[96] μελέτησε την επίδραση της κατεχίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa, KB, και 3T3, και παρατήρησε πως η καμπύλη ανάπτυξης των δύο πρώτα ειδών κυττάρων μειώθηκε από την κατεχίνη.

Επιπλέον, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, αναστέλλουν το σχηματισμό των συστατικών που περιέχουν νιτρώδη ομάδα, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην άμυνα του οργανισμού έναντι της καρκινογένεσης ^[97]. Επίσης φάνηκε πως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ ανέστειλαν τη μετάλλαξη που προκαλεί η αφλατοξίνη B1.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως υπάρχουν και ενδείξεις για ευεργετικά αποτελέσματα του οίνου (κυρίως του ερυθρού οίνου) έναντι του καρκίνου του πνεύμονα και του καρκίνου του προστάτη σε ανθρώπους^[98]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η κατανάλωση ερυθρού οίνου, μειώνει το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα κατά 57% σε αντίθεση με όσους δεν έπιναν καθόλου. Όμοια αποτελέσματα με τα παραπάνω, βρέθηκαν για τον καρκίνο του προστάτη^[99]. Βέβαια, υπάρχουν και έρευνες όπως αυτή των Sutcliffe, Giovannucci και συν. ^[100] οι οποίοι σε follow-up στη μελέτη Healthy Professionals βρήκαν πως η κατανάλωση οίνου δεν είχε επίδραση στην αιτιολογία και εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. Γίνεται λοιπόν, αντιληπτό πως χρειάζονται περισσότερες έρευνες σε ανθρώπους ώστε να καθοριστεί η επίδραση της κατανάλωσης οίνου στην εμφάνιση καρκίνου.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί στην παρούσα εργασία μια από τις νεότερες υποθέσεις (που ερευνάται και με πειράματα) γύρω από τις ευεργετικές επιδράσεις του οίνου σε παθήσεις

των νεφρών. Το 2002 οι Rodrigo και Rivera ^[101] δημοσίευσαν την υπόθεση πως ο ερυθρός οίνος μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά ενάντια στην καταστροφή των νεφρών από το οξειδωτικό στρες. Οι ευεργετικές επιδράσεις της μέτριας κατανάλωσης ερυθρού οίνου μπορούν εν μέρει να αποδοθούν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο οίνος και κυρίως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε αυτόν, σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τροποποιούν τη συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι οξειδωτικές, αυτές, ρίζες εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό των συνθηκών όπως είναι η σπειραματοσκλήρυνση (πάθηση η οποία είναι κύρια αιτία νεφρικής ανεπάρκειας). Σε πρόσφατη ανασκόπηση ^[102], συγκεντρώνονται διάφορες επιδράσεις που έχει ο οίνος και τα διάφορα συστατικά του, στις νεφρικές παθήσεις. Συνοπτικά τα συμπεράσματα της ανασκόπησης είναι τα εξής: (1) δόσοεξαρτώμενη βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νεφρών αρουραίων μετά από κατανάλωση οίνου, (2) αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νεφρών και υπό την μακροχρόνια επίδραση πολυφαινολών, (3) η ρεσβερατρόλη α) μέσω ελέγχου των γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη λιπιδίων, συμβάλλει στον περιορισμό της συγκέντρωσης χοληστερόλης στα μακροφάγα, β) προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την oxLDL, την απόπτωση και περιορίζει την ασβεστιοποίηση, γ) συμβάλλει στον περιορισμό της πρωτεϊνουρίας και της λιπιδαιμίας σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων με σπειραματονεφρίτιδα, (4) η κερκετίνη μπορεί να αναστείλει τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* την απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων και (5) σε διαβητικούς ασθενείς, δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες και εμπλουτισμένη σε πολυφαινόλες, μαζί με μέτρια πρόσληψη οίνου, φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου σε διαβητική νεφροπάθεια.

Εκτενέστερη αναφορά στις υπάρχουσες έρευνες που εξετάζουν την επίδραση του οίνου στις νεφρικές παθήσεις, πραγματοποιείται στο κεφάλαιο 4 (Νεφροί & Νεφρικές Παθήσεις) της παρούσας εργασίας.

Κεφάλαιο 3^ο: Φλεγμονή

3.1. Ορισμός ^[102]

Φλεγμονή ορίζεται ως η τοπική αντίδραση σε τραυματισμό ή μόλυνση που χαρακτηρίζεται από οίδημα, άλγος, θερμότητα και ερυθρότητα. Ανεξάρτητα από την αιτία που την προκαλεί, η φλεγμονή είναι σχετικά στερεότυπη αφού ο μηχανισμός πυροδότησής της περιλαμβάνει κυρίως τον κυτταρικό ή τον ιστικό τραυματισμό. Στις λειτουργίες της φλεγμονής εντάσσονται η καταστροφή ή απενεργοποίηση των ξένων εισβολέων (απόκριση του οργανισμού στη μόλυνση) και η επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης (απόκριση του οργανισμού σε τραυματισμό). Σημαντικό ρόλο κατά τη φλεγμονή έχουν τα κύτταρα που λειτουργούν ως φαγοκύτταρα. Σημαντικότερα φαγοκύτταρα είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα μακροφαγομιμητικά κύτταρα.

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.α.). 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.

3.2. Η διαδικασία της φλεγμονής ^[102, 103]

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.

Η ακολουθία των γεγονότων που συμβαίνουν τοπικά σε μια μη ειδική φλεγμονώδη απάντηση, είναι περιληπτικά οι εξής:

- α. Τραυματισμός ενός ιστού ή είσοδος των βακτηρίων στους ιστούς.

- β. Αγγειοδιαστολή στη μικροκυκλοφορία στη φλεγμαίνουσα περιοχή που οδηγεί στην αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος στην περιοχή.
- γ. Σημαντική αύξηση στη διαπερατότητα των πρωτεϊνών στα τριχοειδή και τα φλεβίδια της φλεγμαίνουσας περιοχής, με αποτέλεσμα διάχυση των πρωτεϊνών και διήθηση υγρού στο μεσοκυττάριο χώρο. Ενεργοποίηση ενδογενών φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως είναι οι παράγοντες του συμπληρώματος, τα προφλεγμονώδη λιποειδή και συγκεκριμένες χημειοτακτικές κυτταροκίνες που προσελκύουν ουδετερόφιλα.
- δ. Χημειοταξία: έξοδος των λευκοκυττάρων από τα φλεβίδια προς το μεσοκυττάριο υγρό της φλεγμαίνουσας περιοχής.
- ε. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα μετανάστευση μονοκυττάρων κατά μήκος του ενδοθηλίου και η ωρίμανση τους εντός του ιστού σε μακροφάγα (πρώιμη φάση φλεγμονής).
- στ. Ανάλογα με το μικροπεριβάλλον, τα μακροφάγα ενεργοποιούν μεταξύ άλλων κυτταροτοξικούς παράγοντες, απελευθερώνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, κυτταροκίνες και χημειοκίνες ή/ και προχωρούν σε φαγοκυττάρωση. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη φλεγμονώδη διεργασία.
- ζ. Ιστική επιδιόρθωση

Τα λευκοκύτταρα που προσδένονται μέσω σελεκτινών και του PAF, ενεργοποιούνται από μεσολαβητές που παράγονται από το ενεργοποιημένο επιθήλιο, όπως ο PAF και η IL-8 ^[104]. Λαμβάνει χώρα αύξηση παραγωγής ιντεγκρινών, που βοηθούν στη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων, πριν αυτά μεταναστεύσουν εντός του ιστού ^[105]. Οι μεταναστευτικές ιδιότητες των λευκοκυττάρων επιτρέπουν τη ραγδαία συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στις εστίες της φλεγμονής. Οι χημειοκίνες και τα μόρια προσκόλλησης – μαζί με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους – ευθύνονται για τον περιορισμό της φλεγμονής σε συγκεκριμένο χώρο-ιστό.

Τα γεγονότα της φλεγμονής που βρίσκονται κάτω από αυτές τις εκδηλώσεις επάγονται και ρυθμίζονται από ένα μεγάλο αριθμό χημικών μεσολαβητών (μερικοί από αυτούς αναφέρονται παρακάτω στον πίνακα 3.1.)

Πίνακας 3.1.: Ορισμένοι 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 των αιμοπεταλίων (PAF)	Εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων
Κυτταροκίνες (TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-1ra, IL-6, κ.α.)	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
Χημειοκίνες (MCP-1, MIP, RANTES, κ.α.)	Εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα
Λυσοσωμικά ένζυμα, οξείδιο του αζώτου και άλλες ουσίες που παράγονται από το οξυγόνο	Εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα

*Προσαρμογή από Vander, MD. Sherman, PhD. Luciano, PhD. Μ.Τσακόπουλος, Ν. Γελαδάς: Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού.

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.

3.2.1. Κυτταρικοί και χυμικοί φορείς της φυσικής ανοσίας^[102]

Οι φορείς της φυσικής ανοσίας διακρίνονται σε κύτταρα και χυμικούς παράγοντες (ουσίες που εντοπίζονται στους «χυμούς» του οργανισμού). Τέτοια κύτταρα είναι τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα κοκκιοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα. Χυμικοί παράγοντες είναι οι κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, IL-8, IFN-α, TNF, κ.α.) που είναι προϊόντα των ανωτέρω κυττάρων, οι πρωτεΐνες οξείας φάσης που είναι προϊόντα του ήπατος, και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος.

3.2.2. Αιμόσταση^[103]

Είναι γνωστό πως αν σε ένα σημείο του σώματος γίνει τραυματισμός ενός αγγείου η αιμορραγία που ακολουθεί κατά συνήθως λίγα λεπτά γιατί ο οργανισμός κινητοποιεί έναν πολύπλοκο μηχανισμό αιμόστασης, ο οποίος σταματά την αιμορραγία. Το μηχανισμό αυτό της αιμόστασης μπορούμε να το διαιρέσουμε σε δυο φάσεις: στην πρώτη (άμεση ή ταχεία) γίνεται προσωρινή αναστολή της αιμορραγίας με σύσπαση των αγγείων και με σχηματισμό προσωρινού θρόμβου που αποτελείται από αιμοπετάλια (λευκός ή αιμοπεταλιακός θρόμβος). Στη δεύτερη (βραδεία) γίνεται μόνιμη ανάσχεση της αιμορραγίας με το σχηματισμό ινώδους και ερυθρού θρόμβου που αποσκοπεί στη μονιμοποίηση της αγγειακής απόφραξης. Ο θρόμβος που θα σχηματιστεί θα διαλυθεί στη συνέχεια με φυσιολογική ινωδόλυση.

Απαραίτητοι παράγοντες για την ομαλή λειτουργία της αιμόστασης (πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς) είναι:

1. η ακεραιότητα του αγγειακού τοιχώματος.
2. ο φυσιολογικός αριθμός και η λειτουργία των αιμοπεταλίων.
3. ο φυσιολογικός μηχανισμός πήξης του αίματος (φυσιολογικοί παράγοντες πήξης και οι αναστολείς).
4. ο φυσιολογικός ινωδολυτικός μηχανισμός.

Οι παραπάνω παράγοντες εξετάζονται στη συνέχεια χωριστά μαζί με τις πιο γνωστές παθολογικές καταστάσεις.

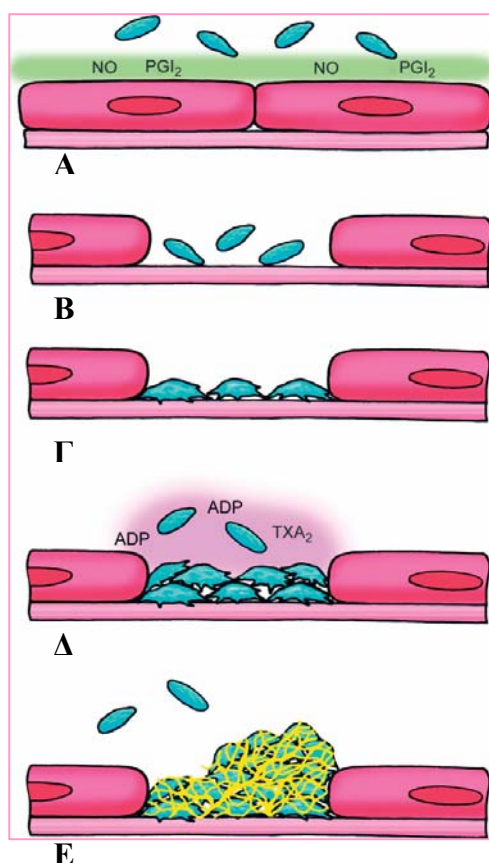
3.2.3. Αγγειακό τοίχωμα – αιμοπετάλια^[103]

Το αγγειακό τοίχωμα πρέπει να είναι ακέραιο, το κολλαγόνο δηλαδή η ουσία που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ενδοθήλια πρέπει να μην έχει υποστεί τροποποιήσεις. Σε μερικές αβιταμινώσεις (π.χ. βιτ. C) ή σε μερικές κληρονομικές παθήσεις παραβλάπτεται το κολλαγόνο με συνέπεια τριχοειδικές αιμορραγίες.

Επίσης, μετά τον τραυματισμό του το αγγείο συσπάται κι αυτό επιβραδύνει τη ροή του αίματος. Η σύσπαση προκαλείται από ορισμένες ουσίες που εκκρίνουν τα αιμοπετάλια που συσσωρεύονται στο σημείο της βλάβης.

Τα αιμοπετάλια είναι μικρού μεγέθους και ακανόνιστου δισκοειδούς σχήματος απύρρηνα κύτταρα προερχόμενα από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 150-400 χιλ./μl και ο χρόνος ζωής τους είναι 7-10 ημέρες.

Ο σχηματισμός του αιμοπεταλιακού θρόμβου γίνεται ως εξής (εικόνα 3.1.): Όταν γίνει ένας τραυματισμός αγγείου τα αιμοπετάλια έλκονται προς το σημείο της βλάβης και μετατρέπονται σε σφαιρικά κύτταρα με ακανθοειδείς προσεκβολές ενώ ταυτόχρονα αποκαλύπτονται υποδοχείς της επιφάνειάς τους (Ia – IIa, IIb – IIIa, Ib/IX) που βοηθούν στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους (κυρίως με τη βοήθεια του ινωδογόνου) και με τις κολλαγόνες ίνες του ενδοθηλίου (με τη βοήθεια μιας συνδετικής γλυκοπρωτεΐνης, του παράγοντα von Willebrand). Η συγγόληση αυτή των αιμοπεταλίων έχει αποδοθεί στη γλώσσα μας σαν συσσώρευση (Aggregation), πρόκειται όμως για μια μορφή συγκόλλησης. Ταυτόχρονα, κινητοποιείται ο μηχανισμός της πήξης, αρχικά με την εξωγενή οδό και στη συνέχεια και με την ενδογενή. Μετά τη συγκόλληση τους τα αιμοπετάλια εμφανίζουν το φαινόμενο της έκκρισης ή απελευθέρωσης κατά το οποίο τα περιεχόμενο των κοκκίων τους, των λυσοσωμάτων κ.λπ. απελευθερώνεται στο περιβάλλον (κυρίως ADP) καθώς και διάφορα προϊόντα που προέρχονται από σύνθεση προσταγλανδινών (κυρίως θρομβοξάνη A_2). Όλες αυτές οι ουσίες δρουν στα γειτονικά αιμοπετάλια που τα ενεργοποιούν ώστε να διευρυνθεί το φαινόμενο της συσσώρευσης και να αυξηθεί το μέγεθος του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Ο στερεός πλέον θρόμβος συστέλλεται και αργότερα λύεται με τη βοήθεια του ινωδολυτικού συστήματος.



Εικόνα 3.1.: Σχηματισμός αιμοπεταλιακού θρόμβου.

A) Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν πλησίον του ενδοθηλίου και η συγκόλλησή τους εμποδίζεται –σε υγιές επιθήλιο– από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και την προστακυκλίνη (PGI_2). **B)** Ύστερα από τη βλάβη του ενδοθηλίου τα αιμοπετάλια μεταφέρονται και προσκολλώνται στον υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. **Γ)** Διάχυση των αιμοπεταλίων στο χώρο του υποενδοθηλίου κατά την αρχική φάση σχηματισμού αιμοπεταλιακού θρόμβου. **Δ)** Επιμήκυνση του αιμοπεταλιακού θρόμβου μέσω “επιστράτευσης” επιπλέον αιμοπεταλίων μέσω απελευθέρωσης μεσολαβητών όπως π.χ. ADP, TXA_2 κ.α. **Ε)** Ο αιμοπεταλιακός θρόμβος σταθεροποιείται μέσω του ινωδογόνου και του δικτύου ινικής.

Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συμβαίνει και όταν αυτά εκτεθούν στον λιποειδικό μεσολαβητή PAF (τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet aggregation factor – PAF).

3.2.4. Σημασία του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων στη φλεγμονή^[106, 107]

Σημαντικός μεσολαβητής στη φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων – PAF (1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη). Ο PAF συντίθεται από διάφορα κύτταρα όπως είναι τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αφρώδη κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από ενεργοποίησή τους. Νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν πως ο PAF είναι ο σημαντικότερος λιποειδικής φύσης μεσολαβητής στη φλεγμονή συμβάλλοντας στην αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου. Φαίνεται πως έχει σημαντικό ρόλο σε θρομβωτικές επιπλοκές, προκαλεί την απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου, συμβάλλει στην οξείδωση της LDL και παράγεται κατά την οξείδωση αυτής. Σε διάφορες έρευνες αναφέρεται πως οι αθηρογόνες ιδιότητες των ox-LDL μπορούν να αποδοθούν στον PAF. Επιπλέον, ο PAF, μαζί με την P-σελεκτίνη, είναι απαραίτητος για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο.

Επίσης, τα αιμοπετάλια (συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου) ενεργοποιούνται και συσσωρεύονται από τον PAF. Η συσσώρευσή τους ρυθμίζεται από ιντεγκρίνες και τη συνεπακόλουθη πρόσθεση του ινωδογόνου. Τα προσκολλημένα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με τη σειρά τους συνθέτουν PAF. Έτσι ενεργοποιείται μια αλυσίδα σημάτων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων που μεσολαβεί για την περιστροφή και σφιχτή προσκόλληση των ουδετερόφιλων.

Ακόμη, η αυξημένη δράση του PAF στο αίμα μπορεί να αποτελέσει την έναρξη μιας γρήγορης φλεγμονώδους απάντησης των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου της αναγνώρισης του υποδοχέα του μορίου αυτού. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου (σημαντικό στάδια για την αρχή της αθηροσκλήρωσης, σύμφωνα με τη θεωρία της «απόκρισης στον τραύματισμό» για την εξήγηση της αθηροσκλήρωσης). Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα γρήγορα παράγουν και εκθέτουν PAF στην επιφάνειά τους, προκαλώντας με τον τρόπο αυτό την ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων.

Τέλος, ο PAF δρά μέσω ειδικού υποδοχέα και ενεργοποιεί διάφορα κύτταρα όπως είναι: τα ουδετερόφιλα, τα ανθρώπινα μονοκύτταρα, τα λευκοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του σχήματός τους, αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{+2} και αύξηση της κυκλοφορίας πρωτεϊνών προσκόλλησης.

3.2.5. Πήξη του αίματος^[102, 103]

Εκτός από τη σύσπαση των αγγείων και το σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου ο τρίτος μηχανισμός που κινητοποιείται για το σχηματισμό του θρόμβου είναι η πήξη του αίματος, που βασικά αποσκοπεί στο σχηματισμό της ινικής η οποία θα καταστήσει το θρόμβο πιο συμπαγή και στερεό. Η πήξη του αίματος είναι μια πολύπλοκη βιολογική διεργασία στην οποία συμμετέχουν 30 περίπου διαφορετικές ουσίες, από τις οποίες άλλες μεν προάγουν την πήξη του αίματος που είναι γνωστές σαν παράγοντες πήξης, άλλες την αναστέλλουν (αναστολείς της πήξης), άλλες δρουν σαν συνένζυμα ή ως υποβοηθητικές ουσίες κ.λπ. Φυσιολογικά υπάρχει ισορροπία μεταξύ των παραγόντων της πήξης του αίματος και των αναστολέων. Όταν όμως γίνει λ.χ. τραυματισμός ενός αγγείου, αυτός ο μηχανισμός της πήξης του αίματος πυροδοτείται.

3.2.6. Η φυσιολογική ινωδόλυση^[103]

Το ινώδες που σχηματίζεται κατά την πήξη του αίματος, πρέπει, αφού πρώτα επιτελέσει το σκοπό του, να διαλυθεί, ώστε ο αυλός των αγγείων να ξαναβρεί τη διαβατότητά του. Αυτό γίνεται με ένα μηχανισμό αντίθετο της πήξης ο οποίος λέγεται ινωδολυτικός μηχανισμός ή ινωδόλυση.

Το ινωδογόνο από πλευράς χημικής δομής αποτελείται από τρεις διπλές πεπτιδικές αλυσίδες, τις Αα, Ββ και γ. η θρομβίνη αποσπά από αυτές τα ινωδοπεπτίδια Α και Β, οπότε μένουν τα τμήματα α, β και γ που συνιστούν το μονομερές του ινώδους. Το μονομερές αυτό στην αρχή πολυμερίζεται αλλά παραμένει ασταθές και ευδιάλυτο. Όμως, με τη βοήθεια του παράγοντα XII αποκτά σταυρωτή διάταξη του μορίου του και γίνεται σταθερό και αδιάλυτο, ώστε να επιτελέσει τη φυσιολογική του αποστολή.

Για να κινητοποιηθεί ο ινωδολυτικός μηχανισμός πρέπει να ενεργοποιηθεί ένα αδρανές πρωτεολυτικό ένζυμο, το πλασμινογόνο, σε μια δραστική μορφή την πλασμίνη. Για να

ενεργοποιηθεί απαιτείται η απελευθέρωση διαφόρων ενεργοποιητών που ελευθερώνονται από τα λυσοσωμάτια διαφόρων κυττάρων και κυρίως τα ενδοθήλια των τριχοειδών. Οι κυριότεροι ενεργοποιητές είναι ο ιστικός ενεργοποιητής και η ουροκινάση. Μπορεί να λεχθεί πως με τον τραυματισμό του αγγείου – άρα και του ενδοθηλίου του – κινητοποιούνται ταυτόχρονα σχεδόν ο μηχανισμός της πήξης και της ινωδόλυσης.

Η πλασμίνη διασπά το ινωδογόνο ή την ινική σε προϊόντα λύσης, δηλαδή σε πεπτίδια που αναφέρονται με διάφορα σύμβολα (X, Y, D και E). Τα προϊόντα αυτά απομακρύνονται από την κυκλοφορία με το ΔΕΣ.

3.2.7. Αναστολείς της πήξης του αίματος^[103]

Σε φυσιολογικές καταστάσεις για να αποφευχθεί η ανεξέλεγκτη ενδοαγγειακή πήξη του αίματος, το αίμα περιέχει μερικές πρωτεΐνες που εξουδετερώνουν τους ενεργοποιημένους παράγοντες της πήξης και ονομάζονται αναστολείς της πήξης. Οι σπουδαιότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι: η αντιθρομβίνη III, η α_2 – μακροσφαιρίνη, η α_2 – αντιπλασμίνη, η α_1 – αντιθρυψίνη και οι πρωτεΐνες C και S.

3.2.8. Αρτηριοσκλήρυνση^[103]

Η αρτηριοσκλήρυνση, είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου σε άτομα άνω των 45 ετών. Είναι μια κατάσταση που προσβάλλει τις μεγάλου και μέσου μεγέθους αρτηρίες σχεδόν κάθε ανθρώπου (τουλάχιστον στις κοινωνίες όπου τα πλούσια σε χοληστερόλη τρόφιμα είναι άφθονα). Η διαταραχή αυτή, αρχίζει από την παιδική ηλικία και σε απουσία επιβαρυντικών παραγόντων, εξελίσσεται αργά μέχρι τη γεροντική ηλικία κατά την οποία είναι πλέον πολύ εκτεταμένη. Χαρακτηρίζεται από περιοχές ινώδους πάχυνσης του τοιχώματος των αρτηριών που συνοδεύονται από πλάκες λιπιδίων οι οποίες μπορεί τελικά να ασβεστοποιηθούν. Η αρτηριοσκλήρυνση, προκαλεί αρτηριακή ανεπάρκεια των άκρων, διαταραχή της νεφρικής κυκλοφορίας και τελικά ρήξη της αορτής ή και άλλων μεγάλων αρτηριών.

Αιτιολογία: Η αρτηριοσκλήρυνση αρχίζει νωρίς με κάποια εντοπισμένη βλάβη στο ενδοθήλιο. Το ενδοθήλιο είναι εκτεθειμένο σε διατμητικές τάσεις, δηλαδή, σε τάση να παρασυρθεί από τη ροή του αίματος ή να παραμορφωθεί. Η βλάβη του ενδοθηλίου παρατηρείται

κυρίως στα σημεία όπου υπάρχουν υψηλές διατμητικές τάσεις όπως είναι τα σημεία διχασμού των αρτηριών. Η βλάβη του ενδοθηλίου οδηγεί στην έκφραση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των μορίων πρόσφυσης των αγγειακών κυττάρων. Δια των μορίων αυτών, τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και, στη συνέχεια, εισέρχονται στην υπενδοθηλιακή περιοχή. Εκεί μετατρέπονται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν τις LDL και τις oxLDL, διογκώνονται από τις oxLDL και έτσι μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα, κατά μήκος της αρχικής θέσης της ενδοθηλιακής βλάβης, σχηματίζουν μια λιπώδη γράμμωση. Αυτές οι γραμμώσεις είναι χαρακτηριστικές της εξελισσόμενης αρτηριοσκλήρυνσης.

Τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών που βρίσκονται στην περιοχή της αρχικής βλάβης, διεγείρονται και μετακινούνται από το μέσο στον έσω χιτώνα. Εκεί πολλαπλασιάζονται και εναποθέτουν κολλαγόνο και άλλα μόρια της θεμέλιας ουσίας, συμβάλλοντας στην αύξηση του όγκου της βλάβης. Τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών προσλαμβάνουν επίσης την ox LDL, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται και αυτά σε αφρώδη κύτταρα. Στα σημεία στένωσης και παραμόρφωσης των αγγείων λόγω παρουσίας αθηρωματικής πλάκας, υπάρχει η τάση σχηματισμού θρόμβων. Τέλος, στο παραμορφωμένο, πεπαχυσμένο τοίχωμα της αρτηρίας εναποτίθεται ασβέστιο, σχηματίζοντας μια εύθραυστη πλάκα. Επιπλέον, οι ασβεστοποιημένες πλάκες μπορεί να εξελκωθούν ή να ραγούν, αυτή η πρόσθετη αλλοίωση της αρτηρίας αυξάνει τις πιθανότητες σχηματισμού θρόμβων.

Τα T κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκκρίνουν τουλάχιστον ένα από τους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τη μετατροπή των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Επιπλέον, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, που συμμετέχουν στη διαδικασία μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι στο DNA που γειτονεύει με τα σχετικά γονίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων, υπάρχουν ειδικές θέσεις που ανταποκρίνονται σε διατμητικές τάσεις. Κατά τη μετατροπή ενός μονοκυττάρου σε μακροφάγο, αυξάνεται η έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων της oxLDL. Η έκφραση αυτών των υποδοχέων γίνεται κατόπιν διέγερσης των μονοκυττάρων από τον παράγοντα που διεγείρει τις αποικίες των μακροφάγων και που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Η συσσώρευση oxLDL στο εσωτερικό του κυττάρου οδηγεί στη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων. Είναι προφανές ότι ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων είναι καθοριστικό γεγονός για την εξέλιξη της αρτηριοσκληρυντικής βλάβης.

Η αρτηριοσκλήρυνση όντας διαταραχή των αρτηριών, μπορεί να προσβάλλει σχεδόν κάθε όργανο του σώματος (όπως και τους νεφρούς, προκαλώντας σκλήρυνση στα αρτηρίδια του νεφρού).

3.3. *Ιντερλευκίνη -1 & -6, και Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP – 1)*

Από το σύνολο των φλεγμονωδών παραγόντων, στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν οι: ιντερλευκίνη 1 και 6 (IL-1, IL-6) και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1), συνεπώς στα μέρη αυτά γίνεται εκτενέστερη αναφορά.

Ιντερλευκίνες

Οι ιντερλευκίνες, είναι κυτταροκίνες με πλειοτρόπο δράση σε πολλά κυτταρικά συστήματα. Οι περισσότερες ιντερλευκίνες παράγονται/επιδρούν από/σε κύτταρα της λεμφικής σειράς (πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, κυτταρική συνεργασία, κ.λπ.)^[103]. Τέλος, η παραγωγή, η ωρίμανση κ.λπ. των κοκκιοκυττάρων διεγείρεται από τις ιντερλευκίνες αλλά και από άλλες κυτταροκίνες που παράγονται λ.χ. κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονής και σκοπό έχουν να αυξήσουν την παραγωγή τους και να τα κινητοποιήσουν προς την περιοχή της φλεγμονής (IL – 1, IL – 6, TNF, ιντερφερόνες, κ.α.)^[103].

3.3.1. *Ιντερλευκίνη 1 (IL – 1)*

Η IL – 1 είναι στην πραγματικότητα μια οικογένεια τριών κυτταροκινών, της IL-1α, της IL-1β (εικόνα 3.2.) και του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra).

Η IL-1α και η IL-1β συντίθενται ως πρόδρομα μέρη – pro-IL-1α και pro-IL-1β (31 kDa), από τα οποία στη συνέχεια προκύπτουν οι ώριμες πρωτεΐνες (17 kDa). Η οικογένεια των τριών IL – 1, αντιπροσωπεύει 3 διαφορετικά πεπτίδια (IL-1α, IL-1β, και IL-1ra ή IL-1γ)^[108]. Οι IL – 1α και IL – 1β έχουν παρόμοιες βιολογικές δράσεις, παρόλο που μόνο το ~25% των αμινοξέων τους είναι ίδια. Επίσης, οι τρεις αυτές κυτταροκίνες, αλληλεπιδρούν με παρόμοια χημική συγγένεια με τους δύο υποδοχείς τύπου I και II που έχουν βρεθεί για την IL – 1^[108].



Εικόνα 3.2.: Σχηματική απεικόνιση της δομής της IL-β.

Οι υποδοχείς τύπου I απαντώνται στα T κύτταρα, στους ινοβλάστες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα ηπατοκύτταρα, και σε άλλα κύτταρα. Εντοπίζονται σε μεγάλη έκταση στην κυτοπλασμική μεμβράνη και είναι υπεύθυνοι για τη μεταγωγή σήματος^[109]. Η ικανότητα του IL-1ra να δεσμεύεται στους υποδοχείς τύπου I, χωρίς όμως περαιτέρω μεταγωγή σήματος, είναι η βάση της ιδιότητας του να δρα ως ανταγωνιστής κυτταροκινών ^[109]. Η δέσμευση και απομάκρυνση της IL-1 από τους ανενεργούς υποδοχείς τύπου II, μπορεί να εξυπηρετεί μια αντιφλεγμονώδη λειτουργία, οπότε αναφέρονται ως υποδοχείς – παγίδες (decoy receptors), αφού δεν οδηγούν σε μεταγωγή σήματος ^[109].

Η IL-1 παράγεται κυρίως από φαγοκύτταρα, αλλά και από ενδοθηλιακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα, αρθρικά κύτταρα, αστροκύτταρα, οστεοβλάστες, ουδετερόφιλα, νευρογλοία και διάφορα άλλα κύτταρα. Η παραγωγή της IL-1 μπορεί να διεγερθεί από ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ενδοτοξινών, άλλων κυτταροκινών, μικροοργανισμών άλλα και αντιγόνων ^[109]. Η IL-1 παράγεται στην εστία της μόλυνσης/ φλεγμονής και διεγείρει τα παρακείμενα κύτταρα να συνθέσουν και να απελευθερώσουν χημειοκίνες (που προσελκύουν πολυμορφοπύρρηνα, μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα), κυτταροκίνες (IL-2, IL-4, IL-6) και ενεργοποιεί διάφορους ιστούς. Η παραγωγή και η δραστηριότητα της IL-1, λόγω της αποτελεσματικότητάς της, θα πρέπει να τίθεται υπό αυστηρό έλεγχο (σε περίπτωση κακής ρύθμισης της παραγωγής ή της δραστηριότητάς της, μπορεί να προκληθεί παρατεταμένη φλεγμονή και μη φυσιολογικές ανοσολογικές αποκρίσεις) ^[110, 111]. Στον πίνακα 3.2. συνοψίζονται οι κυριότερες βιολογικές δράσεις της IL – 1.

Η IL-1 διεγείρει τη σύνθεση επιπρόσθετων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των TNF, IL-6, GM-CSF και ως μηχανισμό θετικής παλίνδρομης ρύθμισης, την έκκριση επιπλέον IL-1 ^[109].

Πίνακας 3.2.: Βιολογικές επιδράσεις της IL-1*.

Βιολογικές δράσεις της ιντερλευκίνης –1
Συστηματικές επιδράσεις Πυρετός, υπόταση, ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφριδίων, ουδετεροφιλία, υποσιδηραιμία, υπερλιπιδαιμία, υποαλβουμινουρία
Τοπικές επιδράσεις Αγγειογένεση, ίνωση, εισροή ουδετερόφιλων, παραγωγή χημειοκινών
Ανοσολογικές επιδράσεις Ενεργοποίηση T και B λεμφοκυττάρων, παραγωγή λεμφοκινών και αντισωμάτων
Φλεγμονώδεις επιδράσεις Συμμετέχει στην εμφάνιση σοκ, αρθρίτιδας, υπερινσουλινισμού, θυρεοειδίτιδας κατά τη φλεγμονώδη νόσο, αυξάνει τα μόρια προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, ενισχύει την απελευθέρωση των προϊόντων του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος

* Προσαρμογή από Rosenwasser LJ. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:344-50

Ιντερλευκίνη -1 και νεφρός:

Όσον αφορά το νεφρικό σπείραμα, υποστηρίζεται ότι η IL-1 εκδηλώνει τις πλειοτροπικές της δράσεις στα μεσαγγειακά κύτταρα μέσω της σύνδεσης με τους υποδοχείς τύπου I (οι οποίοι εκφράζονται βασικά σε αυτά) ^[112, 113]. Ο ανασυνδυασμένος ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (recombinant IL-1ra) μπλόκαρε την παραγωγή mRNA της IL-1 σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων ^[113].

Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, η IL-1β αναστέλλει τη ροή [³H]-χοληστερόλης ^[114, 115], αυξάνει την παραγωγή της μεταλοπρωτεΐνης-9 της θεμέλιας ουσίας ^[116, 117] και αυξάνει τη δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα ^[118] που θεωρείται ότι προάγει την φλεγμονή ^[119]. Σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, η IL-1 αυξάνει την παραγωγή των ROS ^[120], την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 ^[121, 122] διεγείρει τη φωσφολιπάση PLA₂ ^[123], προκαλεί την έκφραση συνθάσης του NO ^[124] και αυξάνει τη σύνθεση TxB₂ και PGE₂ μέσω αύξησης της δραστηριότητας της κυκλοοξυγενάσης –1 (COX-1) ^[125].

Η IL-1 φαίνεται ότι προκαλεί την παραγωγή IL-6 ^[113, 126 – 129] και MCP-1 ^[121, 126, 130, 131] από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα από κυτταροκίνες ανθρώπινα

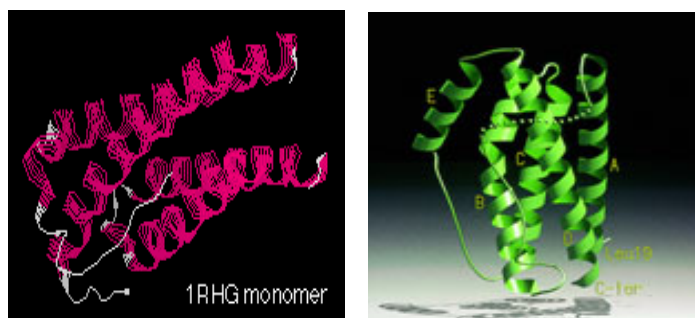
μεσαγγειακά κύτταρα εμφανίζουν τις ακόλουθες αλλαγές: (α) αυξάνουν σε μέγεθος, διαστέλλονται το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, αυξάνονται τα ελεύθερα ριβοσώματα και πολυσώματα, (β) αυξάνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, (γ) αυξάνεται η έκφραση του mRNA της IL-6 μετά από διέγερση με IL-6 ή IL-1 μαζί με IL-6, αλλά και (δ) απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες PAF, TxB₂ και υπεροξειδίου^[132]. Οι φαινοτυπικές αυτές αλλαγές προσομοιάζουν το ρόλο των μεσαγγειακών σε συνθήκες σπειραματοσκλήρυνσης.

Η έκκριση της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα διεγερμένα με IL-1 (ή LPS), αποδόθηκε σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) εξαρτώμενης από το cAMP. Στη διαδικασία διέγερσης της έκκρισης της IL-6 φαίνεται να εμπλέκονται και ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB^[133], ο πυρηνικός παράγοντας για την έκφραση της IL-6 (nuclear factor for IL-6 expression, NF-IL6)^[129, 130], η πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1 (activator protein-1, AP-1)^[134] και ο ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης-1 (interferon regulatory factor-1, IRF-1)^[135].

Η διέγερση έκκρισης του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα ενεργοποιημένα με IL-1 θεωρείται ότι οφείλεται στην οικογένεια των NF-κB πρωτεϊνικών μεταγραφικών παραγόντων^[136 - 142]. Η IL-1 μπορεί να προκαλέσει μεγάλη και απότομη αύξηση του NF-κB μέσω των υποδοχέων IL-1 τύπου I σε λεμφοκύτταρα^[143]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το NO^[144], η κερκετίνη^[145] σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα και τα στεροειδή φάρμακα σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού^[146], φαίνεται πως αναστέλλουν την παραγωγή NF-κB, οπότε εμποδίζουν την έκφραση του MCP-1.

3.3.2. Ιντερλευκίνη 6 (IL – 6)

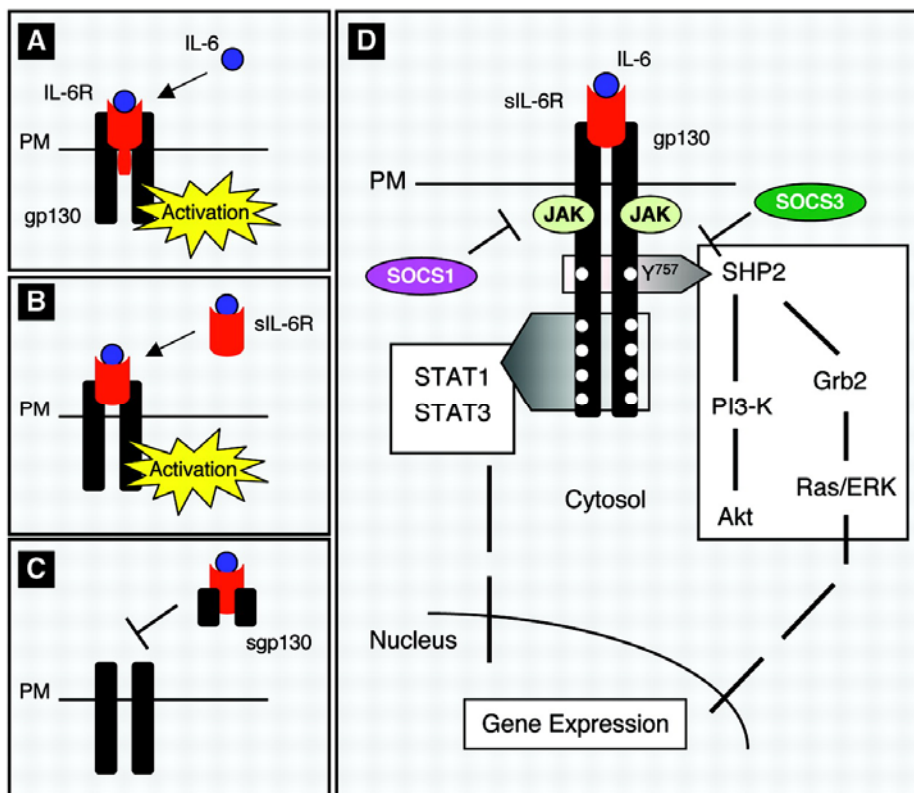
Η ιντερλευκίνη 6 (εικόνα 3.3.) ανήκει σε μια οικογένεια κυτταροκινών με ευρύ φάσμα δράσεων, επηρεάζοντας το ανοσοποιητικό, το νευροενδοκρινικό σύστημα αλλά και τις ομοιοστατικές λειτουργίες. Η IL-6 αποτελείται από 184 αμινοξέα και έχει μέγεθος 26 kDa^[147]. Κατατάσσεται στην κατηγορία των γλυκοπρωτεϊνών, με δυο πιθανές εστίες N-γλυκοζυλίωσης. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη IL-6, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7^[147].



Εικόνα 3.3.: Σχηματικές απεικονίσεις δομής της IL-6.

Ο υποδοχέας της IL-6 αποτελείται από δυο πεπτιδικές αλυσίδες, που ονομάζονται α και β υπομονάδες. Η α- υπομονάδα είναι η αλυσίδα στην οποία δεσμεύεται ο υποκατάστατης και ονομάζεται IL – 6Ra (δε μεταδίδει κάποιο σήμα), ενώ η β- υπομονάδα είναι μια πεπτιδική αλυσίδα μεγαλύτερου μεγέθους που ονομάζεται gp130 (για την IL -6). Η β- αλυσίδα είναι αυτή που μεταφέρει το σήμα του συμπλόκου υποδοχέα^[147]. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη gp130 απαντάται στα περισσότερα όργανα, συμπεριλαμβανόμενων της καρδιάς, των νεφρών, της σπλήνας, του ήπατος, των πνευμόνων και του εγκεφάλου^[148]. Ο υποδοχέας της IL-6 εντοπίζεται σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, κ.α.^[147, 149].

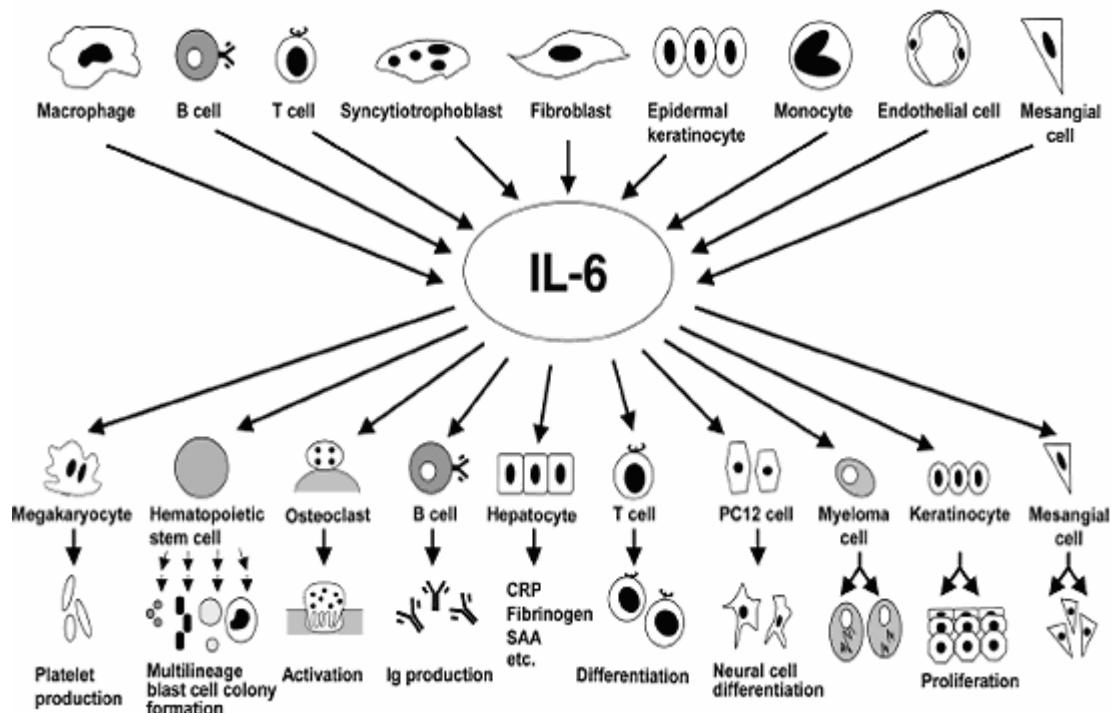
Εκτός από τη δέσμευσή της στον υποδοχέα IL-6R, η IL-6 ενεργοποιεί και ένα διαλυτό IL-6R, τον sIL-6R. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο IL-6/sIL-6R λειτουργεί ως προαγωγός, που δεσμεύει το gp130 με υψηλή χημική συγγένεια. Με τον τρόπο αυτό, η IL-6 θεωρείται ότι μπορεί να εκδηλώσει τις βιολογικές της δράσεις και σε κύτταρα που στερούνται του υποδοχέα της IL-6^[150]. Το σύμπλοκο IL-6/sIL-6R έχει βρεθεί ότι προσελκύει λευκοκύτταρα και ότι προάγει φλεγμονώδεις απαντήσεις από ενδοθηλιακά κύτταρα^[151]. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο sIL-6R συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στη ρύθμιση προφλεγμονωδών μεσολαβητών^[150].



Εικόνα 3.4.: Μετάδοση του σήματος της IL – 6 από τον υποδοχέα της.

Η περαιτέρω προώθηση του σήματος της IL-6, γίνεται με επιπλέον κυτταροπλασματικές κινάσες των κυττάρων που φέρουν τον IL-6R. Η οικογένεια των μορίων IL-6R χρησιμοποιεί συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των Jak-Tyk κινασών. Από πρόσφατα δεδομένα φαίνεται ότι ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής STAT3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος της IL-6 ^[147].

Η IL-6, συνιστά μια πλειοτρόπο κυτταροκίνη με μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων και παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων όπως είναι π.χ. τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα, τα B- λεμφοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μεσαγγειακά κύτταρα, κ.α (εικόνα 3.5.) ^[152]. Όπως και τα άλλα μέλη αυτής της οικογένειας κυτταροκινών, έτσι και η IL – 6 παρουσιάζει τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις δράσεις.



Εικόνα 3.5.: Κύτταρα που παράγουν IL-6 και βιολογικές δράσεις αυτής. Από Naka T. και συν. *Arthritis Res* 2002;4(suppl 3):S233-42

Στο σημείο αυτό θα αναφερθούν συνοπτικά οι κυριότερες προ- και αντι- φλεγμονώδεις δράσεις της IL – 6.

Προφλεγμονώδεις δράσεις:

Η IL-6:

- ο αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους φλεγμονώδεις παράγοντες,
- ο εμπλέκεται στην παθογένεση και την κλινική πορεία της αθηροσκλήρυνσης^[153], της σπειραματοσκλήρυνσης, της καχεξίας και του πολλαπλού μυελώματος^[147],
- ο είναι ο κύριος εισηγητής της απόκρισης οξείας φάσης (διεγείρει την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης όπως η CRP, το ινωδογόνο, η α₁-αντιθρυψίνη και αμυλοειδές Α ορού, ενώ παράλληλα αναστέλλει την παραγωγή αλβουμίνης,
- ο προκαλεί ανάπτυξη των Τ κυττάρων και τη διαφοροποίηση των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων με αύξηση έκφρασης του υποδοχέα της IL-2 και παραγωγής αυτής,
- ο προάγει τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων,
- ο προκαλεί διαφοροποίηση μεγακαρυοκυττάρων προς παραγωγή αιμοπεταλίων,
- ο δρα ως αυξητικός παράγοντας για τα νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα, τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα, διαφόρων τύπων καρκινικά κύτταρα.

Αντιφλεγμονώδεις δράσεις:

Η IL-6:

- ο έχει ανασταλτικές επιδράσεις σε μακροφάγα και αρθρικούς ινοβλάστες,
- ο προάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως ο IL-1ra, IL-10),
- ο προκαλεί την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών,
- ο αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL-1, TNF, MIP-2, κ.α.),
- ο αναστέλλει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης,
- ο αναστέλλει την έκφραση πρωτεασών και προάγει την παραγωγή των αναστολέων τους, όπως είναι π.χ. ο ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνάσης-1,
- ο βελτιώνει τις εκδηλώσεις της φλεγμονής σε διάφορα πειραματικά μοντέλα με ζώα, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους πνευμονικής νόσου και της αρθρίτιδας προκαλούμενης από zymosan,
- ο πιθανώς αναστέλλει τον NF-κΒ (μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της IL-6).

Ιντερλευκίνη – 6 και νεφρός:

Μεταξύ των κυτταροκινών, όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της επίδρασης της IL – 6 στη φλεγμονή του σπειράματος.

Στο επίπεδο του νεφρού, η πρώτη αναφορά έγινε από τον Hoggii και τους συνεργάτες του ^[176], οι οποίοι έδειξαν ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι ικανά να εκφράσουν την IL-6 και ανίχνευσαν IL-6 στις βιοψίες και τα ούρα ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα.

Η IL-6 θεωρείται ένας αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας για τα σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα ^[154 - 157] και η ενδοσπειραματική παραγωγή της θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεση της μεσαγγειακής σπειραματονεφρίτιδας στον άνθρωπο ^[157 - 159]. Για το λόγο αυτό, υποστηρίζεται πως τα επίπεδα της IL-6 στα ούρα αποτελούν ένα καλό δείκτη πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων ^[156]. Ενώ, γενικότερα η ποσότητα IL – 6 των ούρων έχει συσχετιστεί με τη δραστηριότητα υπάρχουσας νεφρικής νόσου.

Παρόλα αυτά, ο Eitner και οι συνεργάτες του ^[160], μετά από ποικίλα πειράματα, κατέληξαν πως η IL-6 δεν αποτελεί τον πιο σημαντικό *in vivo* μεσολαβητή του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων και της υπερπαραγωγής θεμέλιας ουσίας. Σε πειραματικό μοντέλο ανοσολογικά προκαλούμενης σπειραματικής βλάβης σε NTN ποντίκια φάνηκε η

αντιφλεγμονώδης δράση της IL-6^[161] (η IL-6 μείωσε τη διήθηση από ουδετερόφιλα, τη σπειραματική έκκριση IL-1 και την πρωτεϊνουρία).

Οι IL-6 και IL-11 ανταγωνίζονται την έκφραση των διεγειρομένων μορίων από IL-1, TNF-α ή LPS μορίων προσκόλλησης, TIMP-3, IL-8 μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει αναστολή του NF-κΒ^[162, 163]. Η IL-1, πέρα από το να διεγείρει την έκκριση της IL-6, αναστέλλει και τα γονίδια που κωδικοποιούν τον αναστολέα της μεταγωγής σήματος κυτταροκινών (*suppressor of cytokine signaling 3, SOCS₃*) και τον ρυθμιστικό παράγοντα ιντερφερόνης (*IFN regulatory factor, IRF-1*), εμποδίζοντας την περαιτέρω έκκριση IL-6^[162, 163]. Το πρότυπο ελέγχου έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τους IRF-1 και SOCS₃ συνιστά ένα μοντέλο αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Επειδή οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν τις κυτταρικές αποκρίσεις στις κυτταροκίνες και τις ιντερφερόνες, ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης είναι πολύ σημαντικός για την πορεία της φλεγμονής.

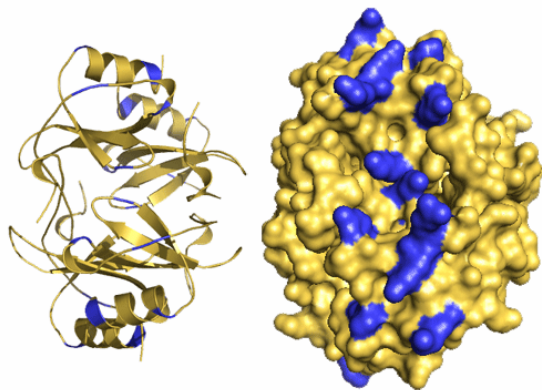
Αύξηση παραγωγής της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει και ο PDGF, ο οποίος εμπλέκεται και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών^[164,165]. Επιπλέον, μια πληθώρα παραγόντων όπως οι κυτταροκίνες (TNF-α^[166, 167], IL-4 μαζί με IL-1^[129], INF-γ^[168]), οι λιποπρωτεΐνες (VLDL, IDL, LDL, HDL)^[164 - 168], τα ανοσοσυμπλέγματα (IgA, IgG)^[169 - 172] και η φιμπρονεκτίνη^[173] διεγείρουν την παραγωγή IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η IL-6 προκαλεί τον πολλαπλασιασμό τους και ότι φαινορικά εκχυλίσματα από κινέζικα βότανα είναι ικανά να αναστείλουν τη δράση της^[174]. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η IL-6 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων ποντικού^[155]. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-6 διεγείρει την παραγωγή ROS, H₂O₂^[175] και της χημειοκίνης MCP-1. Η μελέτη έκφρασης των δυο υπομονάδων του υποδοχέα της IL-6 έδειξε ότι τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα εκφράζουν μόνο την υπομονάδα gp130.

3.3.3. Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 (MCP-1)

Οι χημειοκίνες αποτελούν μια ομάδα χημειοτακτικών κυτταροκινών (είναι συνήθως πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους ~8-10 kDa), που προκαλούν κυτταρική μετακίνηση και

ενεργοποίηση^[177]. Οι διαφορετικές χημειοκίνες που έχουν περιγραφεί, κατατάσσονται σε 2 κύριες ομάδες: **(α)** τις CXC χημειοκίνες (χαρακτηρίζονται από το ότι οι δυο πρώτες ομάδες κυστεΐνης χωρίζονται από ένα αμινοξύ) π.χ. ιντερλευκίνη 8 (*IL-8*) και **(β)** τις CC χημειοκίνες που αποτελούν την μεγαλύτερη τάξη. Στην τάξη αυτή μεταξύ άλλων ανήκουν η MIP-1 και ο MCP-1^[177] (εικόνα 3.6.).



Εικόνα 3.6.: Απεικόνιση της δομής του MCP – 1.

Η βιολογική δράση των χημειοκινών, ρυθμίζεται από ειδικές διαμεμβρανικές G πρωτεΐνες-υποδοχείς που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων. Έως σήμερα, για τις CC χημειοκίνες έχουν αναγνωριστεί και μελετηθεί 9 τέτοιοι υποδοχείς (CCR1-9/10). Οι υποδοχείς των χημειοκινών, συχνά αναγνωρίζουν περισσότερες από μια χημειοκίνες, ενώ και οι χημειοκίνες μπορούν να δράσουν σε διάφορους υποδοχείς^[177, 178].

Υποδοχέας του MCP-1 είναι ο CCR2 (αλλά φαίνεται πως μπορεί να δράσει και στον υποδοχέα CCR9/10) ο οποίος έχει ανιχνευθεί μεταξύ άλλων σε μονοκύτταρα, βασεόφιλα, ιοσινόφιλα, T- και B- λεμφοκύτταρα^[179]. Πρόσφατα, ανιχνεύθηκε ο υποδοχέας CCR2 και σε σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα^[180]. Οι δράσεις του MCP-1 εξαρτώνται από την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα CCR2 στα αντίστοιχα κύτταρα-στόχους^[181]. Τα μονοκύτταρα εκφράζουν μονίμως τον υποδοχέα CCR2, ενώ τα T λεμφοκύτταρα μόνο όταν έχουν ενεργοποιηθεί^[179].

Οι χημειοκίνες παράγονται από διάφορα κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των νεφρών (όπως είναι π.χ. τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μεσαγγειακά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και του σπειράματος κ.α.^[182]).

Η κυριότερη βιολογική λειτουργία του MCP-1 φαίνεται να είναι η προσέλκυση των μονοκυττάρων και άλλων μονοπύρηνων κυττάρων στην εστία της φλεγμονής. Μαζί με την IL-8, πυροδοτεί τη σταθερή προσκόλληση των μονοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Αφού εισέλθουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η συνεχιζόμενη εισροή λίπους οδηγεί σε σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, ενώ τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα συνεχίζουν να παράγουν αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες, προσελκύοντας και ενεργοποιώντας επιπλέον μονοκύτταρα^[183]. Παρόμοιος μηχανισμός παρατηρείται και στα τριχοειδή αγγεία του σπείράματος (τα ενδογενή σπειραματικά κύτταρα ενεργοποιούνται από κάποια παθολογική εισβολή και παράγουν προφλεγμονώδεις μεσολαβητές. Η παραγωγή χημειοκινών και η έκφραση των υποδοχέων τους, μαζί με την τοπική έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών – IL-1, TNF-α, IFN-γ, PAF, ROS κ.α. – προωθεί την ενεργοποίηση σελεκτινών και ιντεγκρινών στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι ώστε να λαμβάνει χώρα η προσκόλληση και κατόπιν η μετανάστευση στον υποενδοθηλιακό χώρο^[184]). Επιπλέον, ο MCP-1 λειτουργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας και για τα T λεμφοκύτταρα και τα βασεόφιλα^[179, 185].

Επίσης, ο MCP-1 μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορες κατηγορίες κυττάρων (πχ. Αυξάνει την έκφραση των CD1 Ib, CD1 Ic, αλλά και να προκαλέσει την παραγωγή IL-1 και IL-6)^[186]. Τέλος, ο MCP-1 μπορεί να προκαλέσει αύξηση ιντεγκρινών, IL – 6 (μέσω ενεργοποίησης του NF –κΒ) αλλά και του ιστικού παράγοντα στα λεία μυϊκά κύτταρα. Παράλληλα, πιο πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν πως ο MCP-1 πυροδοτεί την αύξηση του αριθμού των λείων μυϊκών κυττάρων, διεγείροντας τη δραστικότητα της πρωτεΐνης-ενεργοποιητή 1.

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τον MCP-1 με τη διαδικασία της αθηρογένεσης^[179, 187 - 189]. Η ενζυμική, μη οξειδωτική τροποποίηση της LDL, μετατρέπει τη λιποπρωτεΐνη σε πιθανό αθηρογενετικό παράγοντα, ο οποίος προκαλεί μαζική απελευθέρωση MCP-1 από τα μακροφάγα^[179, 187]. Υποστηρίζεται δε πως η ενεργοποίηση του υποδοχέα CCR2, κυρίως από τον MCP-1, συνεισφέρει στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, που συνιστά πρώιμες αθηροσκληρυντικές βλάβες^[183].

MCP-1 και νεφρός:

Η έκφραση των χημειοκινών αλλά και των υποδοχέων τους από τα νεφρικά κύτταρα, είναι σημαντική τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη των διαφόρων φλεγμονωδών πειραματικών παθήσεων.

Θεωρείται ότι ο MCP-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ανθρώπινων νεφρικών παθήσεων. Τα επίπεδα του MCP-1 στα ούρα είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με προχωρημένη πάθηση των νεφρών και συσχετίζονται με δείκτες προόδου της νόσου, όπως ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων^[190]. Ο MCP-1 πιθανότατα συμμετέχει στην παθογένεση των φλεγμονωδών νεφρικών νόσων, μέσω προσέλκυσης και ενεργοποίησης των μονοκυττάρων. Επιπρόσθετα, φαίνεται πως μεσολαβεί στην εναπόθεση κολλαγόνου στην πειραματική σπειραματονεφρίτιδα προκαλούμενη από TGF-β, οπότε η έκκρισή του σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής μπορεί να οδηγήσει σε σκλήρυνση ^[191]

Βιοψίες σε ανθρώπινους νεφρούς, έδειξαν πως η έκφραση MCP-1 σχετιζόταν με τοπική διήθηση μακροφάγων σε νεφροπάθειες και σε σπειραματοσκλήρυνση ^[192-194]. Σε άλλες μελέτες, κατά τη διάρκεια βιοψιών σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα και νεφρίτιδα προκαλούμενη από συστηματικό ερυθματώδη λύκο, αναγνωρίστηκαν μελανώματα στο σπείραμα που οφειλόταν στον MCP-1 ^[192, 195, 196]. Επίσης, σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο του MCP-1 με τον υποδοχέα του CCR2 αλλά και η εφαρμογή μηχανικής πίεσης αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, που συμμετέχουν και στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης ^[180].

Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν το ρόλο του MCP-1 στις διάφορες νεφρικές παθήσεις.

Στον πίνακα 3.4 που ακολουθεί αναφέρονται οι διεγέρτες και οι αναστολείς έκκρισης MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα όπως έδειξαν *in vitro* μελέτες. Η σχετική αναλογία μεταξύ αναστολέων και διεγερτών καθορίζει το βαθμό έκκρισης του MCP-1 κατά συνέπεια την έκταση των επιδράσεων στους ιστούς.

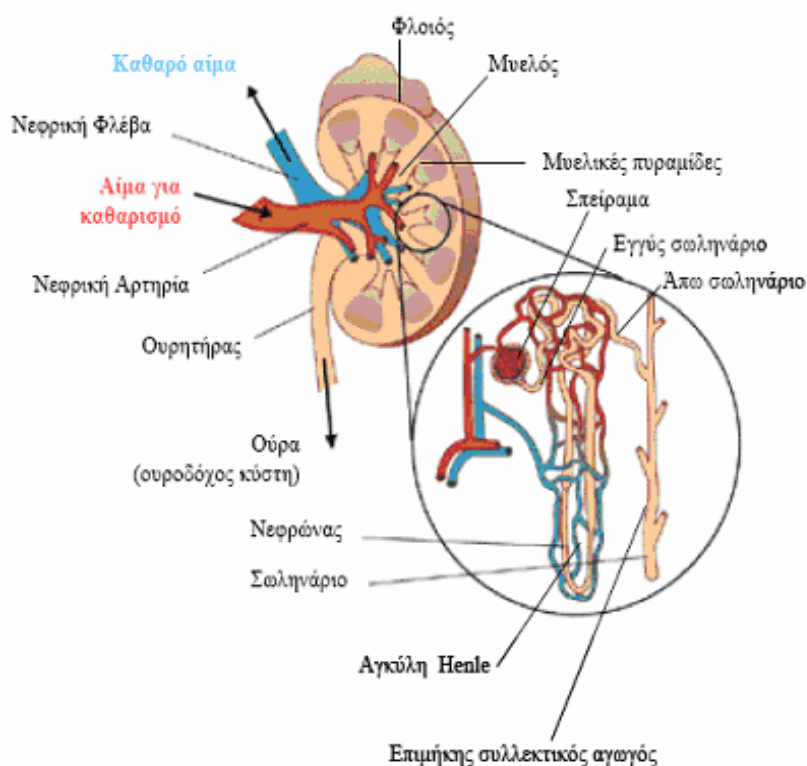
Πίνακας 3.4 Διεγέρτες και αναστολείς έκκρισης του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα (in vitro μελέτες) (προσαρμογή από Schlondorff και συν., *Ghemokines and renal disease*)

Διεγέρτες	Αναστολείς
IL-1 ^α	IL-1ra
IL-1β	TGF-β ₁
TNF-α	PGE ₂
LPS	Εξωγενές NO
IL-6	Εικοσαπεντανοϊκό οξύ
CRP	trans ρετινοϊκό οξύ
PDGF	PDTC
PMA	NAC
Ιντεργκρίνη	cAMP
Αγγειοτενσίνη II	PGE ₂
Ιντερφερόνη-γ	γενιστεΐνη
IgG	
O ₂ ⁻	

Κεφάλαιο 4^ο: Νεφροί & Νεφρικές Παθήσεις

4.1. Δομή και φυσιολογία νεφρών^[102].

Οι νεφροί (εικόνα 4.1.) είναι όργανα που περιβάλλονται από κάψα και βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο. Κάθε νεφρός εμφανίζει περίπου 11 εκατοστά μήκος, 6 εκατοστά πλάτος και 4 εκατοστά πάχος. Από την πύλη κάθε νεφρού εισέρχεται η νεφρική αρτηρία και εξέρχεται η νεφρική φλέβα. Οι νεφροί δέχονται περίπου το 25% της καρδιακής παροχής. Η διήθηση του αίματος από τους νεφρούς επιτρέπει την απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού – κυρίως της ουρίας και των άλλων αζωτούχων ενώσεων – τη ρύθμιση του ενδοαγγειακού όγκου και τη διατήρηση του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών του εξωκυττάριου χώρου. Η ροή του αίματος φέρεται από τη φλοιώδη στη μυελώδη μοίρα.



Εικόνα 4.1.: Σχηματική απεικόνιση της δομής του νεφρού.

Νεφρώνας^[102]

Η ανατομική μονάδα της νεφρικής λειτουργίας είναι ο νεφρώνας. Σε κάθε νεφρό υπάρχουν περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Η δομή αυτή αποτελείται από (α) ένα αρχικό διηθητικό οργανίδιο το οποίο ονομάζεται νεφρικό σωμάτιο και (β) ένα νεφρικό σωληνάριο το οποίο αποτελεί φυσική προέκταση του νεφρικού σωματίου.

Το νεφρικό σωμάτιο σχηματίζει, από το αίμα, ένα διήθημα το οποίο δεν περιέχει ούτε κύτταρα ούτε πρωτεΐνες. Το διήθημα αυτό εγκαταλείπει το νεφρικό σωμάτιο και εισέρχεται στο σωληνάριο. Το νεφρικό σωληνάριο αποτελείται από τα εξής δομικά στοιχεία: το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, όπου γίνεται η επαναρρόφηση του 80% του ύδατος και των ηλεκτρολυτών, το λεπτό και παχύ τμήμα της αγκύλης του Henle και τέλος το άπω εσπειραμένο και το αθροιστικό σωληνάριο, τα οποία σκεπάζονται από μια βασική μεμβράνη που είναι συνέχεια του περιορισμένου συνδετικού ιστού όπου γίνεται η συμπίκνωση των ούρων καθώς και οι περεταίρω ανταλλαγές ύδατος και ηλεκτρολυτών.

Νεφρικό σωμάτιο^[102]

Κάθε νεφρικό σωμάτιο περιέχει ένα θύσανο αλληλοσυνδεδεμένων τριχοειδών βρόχων ο οποίος ονομάζεται νεφρικό σπείραμα ή σπειραματικά τριχοειδή. Κάθε σπείραμα τροφοδοτείται με αίμα από ένα προσαγωγό αρτηρίδιο. Το νεφρικό σπείραμα θηλυκώνει μέσα σε μια κάψουλα γεμάτη υγρό, γνωστή ως κάψα του Bowman. Ο συνδυασμός ενός σπειράματος και μίας κάψας αποτελεί το νεφρικό σωμάτιο. Καθώς το αίμα ρέει μέσα στο σπείραμα, ένα μέρος του πλάσματος διηθείται μέσα στην κάψα του Bowman. Το υπόλοιπο του αίματος εξέρχεται από το σπείραμα με ένα άλλο αρτηρίδιο, το απαγωγό αρτηρίδιο.

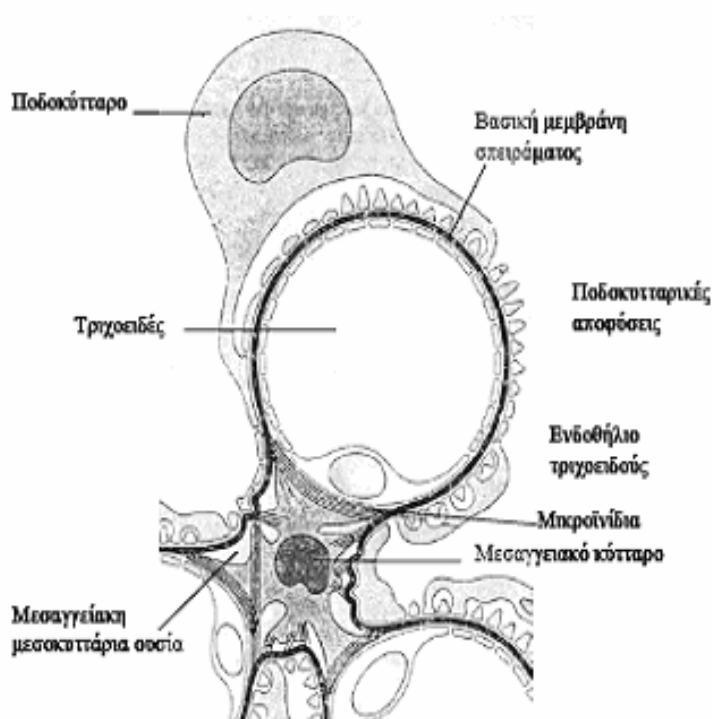
Το σπείραμα αποτελείται από ένα προσαγωγό και ένα απαγωγό αρτηρίδιο μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται πολυάριθμα τριχοειδή. Τα τριχοειδή αυτά εσωτερικά επενδύονται από ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ εξωτερικά καλύπτονται επιθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν μια συνεχόμενη στιβάδα με τα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν την κάψα του Bowman και το νεφρικό σωληνάριο.

Ο χώρος που παρεμβάλλεται μεταξύ των τριχοειδών και του σπειράματος, λέγεται μεσάγγειο. Μεταξύ των τριχοειδών του σπειράματος και των επιθηλιακών κυττάρων που καλύπτουν την εξωτερική τους επιφάνεια, υπάρχει η βασική μεμβράνη. Από την άλλη μεριά της βασικής μεμβράνης βρίσκονται τα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι γνωστά ως ποδοκύτταρα, (παρουσιάζουν χταποδοειδή δομή) λόγω των πολυάριθμων προεκβολών τους, συνδέονται δε μεταξύ τους μέσω τροποποιημένων δεσμοσωμάτων.

Μεσάγγειο^[102, 197]

Η βασική μεμβράνη με δυο ή τρία τριχοειδή δημιουργεί σχηματισμούς (σπειραματικός λοβός – εικόνα 3.2.) στον κενό χώρο των οποίων βρίσκεται το μεσάγγειο. Το μεσάγγειο αποτελεί επέκταση της βασικής μεμβράνης του σπειράματος, είναι όμως λιγότερο πυκνός ιστός.

Εικόνα 3.2.: Απεικόνιση του σπειραματικού λοβού (διακρίνεται ένα τριχοειδές και η τοποθεσία του μεσάγγειου – μεσαγγειακό κύτταρο και μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία).



Το μεσάγγειο αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεσαγγειακή εξώκυττάρια ουσία (εικόνα 3.2.). Τα μεσαγγειακά κύτταρα, αποτελούν κύτταρα τροποποιημένου λείου μυός τα οποία περιβάλλουν τους βρόχους των τριχοειδικών αγγείων του σπειράματος, χωρίς όμως να ανήκουν στη διηθητική οδό. Τα κύτταρα αυτά έχουν πολλές προεκβολές που εκτείνονται στη βασική μεμβράνη του σπειράματος, ενώ ο χώρος που δεν καλύπτεται από τα μεσαγγειακά

κύτταρα, περιέχει τη μεσαγγειακή εξώκυττάρια ουσία που περιέχει πυκνό δίκτυο από ελαστικά μικροϊνίδια.

Μεταξύ των βασικών δράσεων των μεσαγγειακών κυττάρων συμπεριλαμβάνεται οι εξής^[198]:

- ο Στηρίζουν δομικά το σπείραμα και το σπειραματικό λοβό.
- ο Αναγεννούν και αλλάζουν τη σύσταση της μεσαγγειακής εξώκυττάριας ουσίας.
- ο Αποτελούν στόχο αγγειοσυσταλτικών παραγόντων (π.χ. αγγειοτενσίνη II, ενδοθηλίνη, βασοπρεσσίνη, νορεπινεφρίνη) και αγγειοδιασταλτικών (π.χ. NO, προσταγλαδίνες PGE₂, PGI₂, ντοπαμίνη).
- ο Αποτελούν στόχο φλεγμονωδών παραγόντων, παραγόντων ανάπτυξης και κυτταροκινών με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την αλλαγή της σύστασης της μεσαγγειακής εξώκυττάριας ουσίας.
- ο Αποτελούν πηγή αγγειοδραστικών παραγόντων, προσταγλαδινών, θρομβοξανών, λευκοτριενών, PAF, NO, χυμοκινών και παραγόντων ανάπτυξης.
- ο Αποτελούν τόπο παραγωγής ενεργοποιητών και αναστολέων πλασμινογόνου.
- ο Χειρίζονται μακρομόρια όπως λιποειδή, ανοσοσυμπλέγματα και τα προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης.

4.2. Λειτουργίες των νεφρών ^[102].

Οι νεφροί επεξεργάζονται το πλάσμα του αίματος από το οποίο κατακρατούν διάφορες ουσίες και σε ελάχιστες περιπτώσεις προσθέτουν σε αυτό κάποιες άλλες. Τρεις είναι οι βασικές νεφρικές διεργασίες: η σπειραματική διήθηση, η σωληναριακή επαναρρόφηση και η σωληναριακή έκκριση. Επιπρόσθετα, οι νεφροί επιτελούν και άλλες λειτουργίες οι οποίες συνοπτικά είναι οι εξής:

1. Ρύθμιση του ισοζυγίου του ύδατος, της οξεοβασικής ισορροπίας και του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών και των ανόργανων ιόντων.
2. Απομάκρυνση των μεταβολικών παραπροϊόντων και ξένων χημικών ουσιών από το αίμα και απέκκριση τους στα ούρα.
3. Γλυκονεογένεση
4. Έκκριση ορμονών (ερυθροποιητίνη, ρενίνη, 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D₃)

4.3. Οι παθήσεις των νεφρών^[102, 103]

Οι παθήσεις των νεφρών μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την εστία της βλάβης: (α) σπειραματικές, (β) σωληναριακές, (γ) διάμεσες και (δ) αγγειακές. Οι σπειραματικές παθήσεις είναι οι πιο κοινές παγκοσμίως και αποτελούν κύριο αίτιο πρόκλησης νεφρικής ανεπάρκειας στους ανθρώπους. Έτσι στην παρούσα εργασία θα γίνει περαιτέρω αναφορά σε αυτές.

4.3.1. Σπειραματικές παθήσεις

Οι σπειραματοπάθειες διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: (1) πρωτογενείς (με εκδηλώσεις μόνο στο νεφρό) και (2) δευτερογενείς (εάν αποτελούν κομμάτι συστηματικής νόσου, π.χ. συστηματικός ερυθρελαιώδης λύκος), ^[199, 200].

Τα κύρια χαρακτηριστικά των σπειραματοπαθειών είναι: (α) οι ιστολογικές διαταραχές που προκύπτουν ποικίλουν (ο τύπος και η ένταση της διαταραχής, οι μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία και τη διαπερατότητα των κυττάρων του σπειράματος και του μεσαγγείου διαφέρουν μεταξύ των ασθενών) και (β) η εξέλιξη της νόσου (ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου διαφέρει, καθώς και οι δομικές και λειτουργικές μεταβολές που συντελούνται). Μακροπρόθεσμα, λαμβάνουν χώρα περαιτέρω αλλαγές, δομικές (π.χ. τραυματισμός του ενδοθηλίου, ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων, η ατροφία των νεφρικών σωληναρίων, η συσσωμάτωση του εξωκυττάρου υγρού, η διήθηση κυττάρων και ο σχηματισμός μυοινοβλαστών) ή μεταβολικές (π.χ. συστηματική και ενδοσπειραματική υπέρταση, την ινσουλινοαντίσταση, την υπερλιπιδαιμία, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, το οξειδωτικό στρες, την ανισορροπία κυτταροκινών και λιποειδικών μεσολαβητών, την πρωτεϊνουρία και την καταστολή έκφρασης προστατευτικών γονιδίων) που καταλήγουν σε μακροχρόνια βλάβη ^[204, 199 – 203, 205].

Βασικό χαρακτηριστικό στους περισσότερους τύπους νεφρικής βλάβης είναι η υπερβολική απόθεση εξωκυττάριας ουσίας και η μεταβολή της σύστασής της. Στην ρύθμιση των διαδικασιών αυτών φαίνεται να έχει βασικό ρόλο ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TGF-β (διεγείροντας τη σύνθεση κολλαγόνου, ινωδονεκτίνης και πρωτεογλυκανών σε

καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων). Επίσης, εμπλέκονται και ο PDGF, ο PAF, οι ιντερλευκίνες IL-1 και IL-6.

Η σπειραματική βλάβη, που μπορεί να εξελιχθεί σε σκλήρυνση, μπορεί να προέλθει από συστηματική υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, διήθηση μακρομορίων και κυττάρων στο χώρο του σπειράματος που μεσολαβείται από χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, από συγκόλληση αιμοπεταλίων και θρόμβωση ^[203, 104, 206]. Τρεις είναι οι κυριότεροι προτεινόμενοι μηχανισμοί πρόκλησης σπειραματικής βλάβης: (1) *εξαιτίας Αιμοδυναμικά μεσολαβούμενης βλάβης* (η υπερλειτουργία των κυττάρων του σπειράματος ως απάντηση στην αυξημένη ενδονεφρική πίεση και ροή, μπορεί να προκαλέσει μορφολογικές/ ιστολογικές βλάβες που καταλήγουν σε νεφρική ανεπάρκεια), (2) *λόγω Διαταραχών στο μεταβολισμό λιπιδίων* (η αύξηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών στο αίμα μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή του φορτίου της βασικής μεμβράνης του σπειράματος και αύξηση της διαπερατότητάς της, έτσι ακόμα και τα μεγάλου μεγέθους μόρια - όπως είναι η LDL - μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό των μεσαγγειακών κυττάρων, τα οποία θα απαντήσουν σε αυτή την ενδοκυτταρική αύξηση της συγκέντρωσης LDL με πυροδοτώντας τον πολλαπλασιασμό τους και εκκρίνοντας εξωκυττάρια ουσία. Οι αλλαγές αυτές αποτελούν προοίμιο σκλήρυνσης) και (3) *ως Απάντηση στη φλεγμονή*, κατά την οποία διάφοροι φλεγμονώδεις μεσολαβητές πρωτεϊνικής και λιποειδικής φύσης εμπλέκονται στην έναρξη της βλάβης (η έναρξη σπειραματοσκλήρυνσης ομοιάζει με αυτή της αθηροσκλήρωσης, έτσι ο μηχανισμός πρόκλησης της νέκρωσης του ιστού και τελικά η σκλήρυνση λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο και στις δύο περιπτώσεις).

Η σπειραματοσκλήρυνση θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα σε μεγάλο εύρος νεφροπαθειών, άσχετα με την αιτιολογία της αρχικής βλάβης, και η εξέλιξή της συνδέεται με μεταβολή των χαρακτηριστικών των ενδοθηλιακών κυττάρων ^[206]. Είναι το αποτέλεσμα της προοδευτικής απώλειας της αρχιτεκτονικής του σπειράματος, ως επακόλουθο της συνεχούς ή κατά ώσεις δράσης ερεθισμάτων ή παραγόντων που ευθύνονται για την πρόκληση σπειραματικής βλάβης ^[206]. Χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση συστατικών θεμέλιας ουσίας και προοδευτική απώλεια εγγενών κυττάρων του σπειράματος, με συνέπεια την αντικατάσταση των σπειραμάτων από ινώδη ιστό. Η ανάπτυξη σκλήρυνσης στα σπειράματα συνοδεύεται από παρουσία σημαντικών αλλοιώσεων στο διάμεσο ιστό, στα ουροφόρα σωληνάρια και στα αγγεία. Επομένως, συνυπάρχει φλεγμονώδης διήθηση και ίνωση του διάμεσου χώρου, ατροφία των σωληναρίων και υαλίνωση του τοιχώματος των αρτηριδίων ^[203].

4.3.2. Φλεγμονή του σπειράματος

Κοινό χαρακτηριστικό των σπειραματοπαθειών, αποτελεί η φλεγμονή (διαδικασία που περιγράφηκε εκτενώς στο κεφάλαιο 3) του σπειράματος. Στη χρόνια φλεγμονή του σπειράματος, το φαινόμενο ενισχύεται με την έκκριση^[201 – 203]: προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-13, INF- α), χημειοκινών (π.χ. MCP-1, MIP, RANTES, IL-8), παραγόντων ανάπτυξης (π.χ. TGF- β , PDGF, IGF-1, bFGF) και προφλεγμονωδών λιποειδών (π.χ. PAF, εικοσανοειδή) με αποτέλεσμα την αυξημένη απόθεση εξωκυττάριου υγρού που οδηγεί τελικά σε σκλήρυνση.

Οι περισσότεροι τύποι σπειραματονεφρίτιδας χαρακτηρίζονται από κυτταρική υπερπλασία, που είτε προκαλείται από διείσδυση των φλεγμονωδών κυττάρων της αιματικής κυκλοφορίας (π.χ. ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, αιμοπετάλια), είτε από υπερπλασία των σπειραματικών κυττάρων, ιδιαίτερα των μεσαγγειακών κυττάρων^[207]. Τα φλεγμονώδη κύτταρα της κυκλοφορίας και τα σπειραματικά κύτταρα συμμετέχουν στον τραυματισμό του σπειράματος ελευθερώνοντας πρωτεάσες, χημειοτακτικές ουσίες, δραστικά λιποειδή, οξειδωτικές ουσίες και μόρια αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης^[208]. Ως απάντηση στον τραυματισμό αυτό τα μεσαγγειακά κύτταρα (1) πολλαπλασιάζονται, (2) εκκρίνουν αντιγόνα με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται ένας «ενεργοποιημένος» φαινότυπος και (3) συμβάλλουν στην εναπόθεση μεσοκυττάριας ουσίας στον εξωκυτταρικό χώρο^[209].

Οι φαινοτυπικές αλλαγές του τραυματισμένου ενδοθηλίου περιλαμβάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης, τα οποία διευκολύνουν την προσκόλληση λευκοκυττάρων στα σπειραματικά τριχοειδή και την επακόλουθη είσοδό τους στον υποενδοθηλιακό χώρο. Η απελευθέρωση κυτταροκινών (IL-1, TNF- α), χημειοκινών (IL-8, MCP-1, MIP-2, οστεοποντίνη) αλλά και αυξητικών παραγόντων (PDGF, TGF- β) από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια, έχει σαν αποτέλεσμα την περαιτέρω προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων στο σπείραμα και την ενεργοποίηση των μεσαγγειακών κυττάρων^[209].

Ορισμένοι από τους προαναφερθέντες μεσολαβητές, συγκεκριμένα η IL-1 και ο TNF- α , έχουν επιπλέον προθρομβωτικές ιδιότητες συνεισφέροντας με τον τρόπο αυτό στο σχηματισμό σπειραματικών θρόμβων. Συνεπώς, οι αλληλεπιδράσεις των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων με τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα, είναι σημαντικές στην εξέλιξη της νόσου σε σπειραματοσκλήρυνση^[203, 209].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα του σπειράματος, συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεση της σπειραματοσκλήρυνσης. Έχουν την ικανότητα σύνθεσης και απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων ενώ απαντούν και στον τραυματισμό του σπειράματος. Ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων συχνά προβλέπει την έναρξη μεσαγγειοσκλήρυνσης και σπειραματοσκλήρυνσης ^[206]. Τα μεσαγγειακά κύτταρα διεγείρονται προς πολλαπλασιασμό (in vitro τουλάχιστον) υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως είναι: ο bFGF (ταυτόχρονα φαίνεται να επάγει την παραγωγή του PDGF από τα κύτταρα αυτά), κυτταροκίνες (IL-1, IL-6) και αγγειοδραστικές ουσίες (αγγειοτενσίνη II, ενδοθηλίνη, μονοξείδιο του αζώτου, προσταγλαδίνες, κ.α.) ^[210, 211].

Νεότερες έρευνες έχουν δείξει πως ιστολογικά χαρακτηριστικά της σπειραματοσκλήρωσης είναι όμοια με τις αλλαγές που παρατηρούνται κατά την αθηροσκλήρωση, με τη διαδικασία της φλεγμονής να κυριαρχεί. Έχει προταθεί λοιπόν ο όρος σπειραματοσκλήρυνση. OPAF είναι ισχυρός μεσολαβητής της φλεγμονής και φαίνεται ότι εμπλέκεται στους μηχανισμούς πρόκλησης σπειραματοσκλήρυνσης.

Στους νεφρούς, ο PAF, πιστεύεται πως παράγεται είτε από διηθημένα φλεγμονώδη κύτταρα, είτε από εσωτερικά κύτταρα του σπειράματος, όπως είναι τα μεσαγγειακά. Αρκετές έρευνες (περιλαμβανομένων in-vitro δοκιμών, πειραμάτων σε ζώα αλλά και κλινικές μελέτες) υποστηρίζουν την εμπλοκή του PAF στην παθογένεση της νεφρικής βλάβης. Έρευνες σε ζώα έδειξαν πως έγχυση PAF σε αρτηρία του νεφρού προκάλεσε μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και της νεφρικής αιματικής ροής, ενώ αυξήθηκε η πρωτεϊνουρία και η διαπερατότητα του σπειράματος. Επιπλέον, σε πειραματικά μοντέλα με σπειραματονεφρίτιδα έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής PAF, ενώ παράλληλη προσθήκη μορίων που ανταγωνίζονται τη δράση του PAF μπορεί να προλάβει ή και να μειώσει τη νεφρική βλάβη. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και από ορισμένες κλινικές μελέτες.

Ο PAF φαίνεται^[107] ότι διεγείρει διάφορα «μονοπάτια» σημάτων σε καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων, επάγοντας τη συστολή των μεσαγγειακών κυττάρων, την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και τη διαφοροποίησή τους σε αφρώδη κύτταρα.

4.4. Επίδραση του οίνου στους νεφρούς

Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φανερώνει τον μικρό αριθμό εργασιών που μελετούν την επίδραση του οίνου και των συστατικών αυτού στα νεφρά ή/και σε νεφρικά κύτταρα, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* & *ex vivo*. Πολύ περισσότερο δε, έχει πραγματοποιηθεί περιορισμένος αριθμός παρεμβατικών μελετών σε νεφροπαθείς. Ωστόσο, οι υπάρχουσες έρευνες αποδεικνύουν την ευεργετική δράση του οίνου στους νεφρούς και σε νεφρικές παθήσεις.

Η ανάλυση στοιχείων από 45.289 άνδρες οι οποίοι συμμετείχαν στη μελέτη Health Professionals Follow-up Study ^[212, 213] έδειξε πως η αυξημένη κατανάλωση υγρών μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης λίθων στα νεφρά. Μεταξύ διαφόρων ποτών-ροφημάτων (για κάθε μερίδα 240mL/ημέρα), η κατανάλωση κρασιού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης νεφρολιθίασης κατά 39% σε αντίθεση με τον καφέ (μείωση του κινδύνου κατά 10%), το τσάι (μείωση του κινδύνου κατά 14%) και την μύρα (μείωση του κινδύνου κατά 21%). Επιπλέον, η επεξεργασία των στοιχείων 81.093 γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη Nurses Health Study, έδειξε όμοια αποτελέσματα με αυτά των ανδρών από την προαναφερθείσα μελέτη ^[213].

Την υπόθεση ότι ο ερυθρός οίνος μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό ενάντια στη νεφρική βλάβη που προκαλείται από οξειδωτικό στρες υποστήριξαν οι Gaimi G., Carollo C και συν. σε άρθρο τους ^[214] προτείνοντας πως μέτρια κατανάλωση κρασιού από ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να είναι ωφέλιμη και αξίζει να εξεταστεί με κλινικές μελέτες.

Σε μελέτη που έγινε σε πειραματόζωα (αρουραίους), τα ζώα διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες και για 10 εβδομάδες ακολούθησαν μια ισορροπημένη δίαιτα ενώ παράλληλα κάθε ομάδα κατανάλωνε είτε νερό (ομάδα ελέγχου), είτε κόκκινο κρασί, είτε απλώς αιθανόλη, είτε κόκκινο κρασί χωρίς αλκοολούχα συστατικά. Στο τέλος των 10 εβδομάδων πραγματοποιήθηκαν διάφορες μετρήσεις από τις οποίες προέκυψε: (1) Μετά από κατανάλωση κόκκινου κρασιού ^[215, 216 – 218] διατηρήθηκαν τα επίπεδα αραχιδονικού και εικοσαπεντανοϊκού οξέος, αυξήθηκαν τα επίπεδα HDL και TG, μειώθηκε το MDA (μαλονδιαλδεΰδη), αυξήθηκε ο λόγος GSH/GSSG, αυξήθηκε η δραστηριότητα των CAT και GSH-Px ενώ ταυτόχρονα προστατεύει το νεφρικό ιστό από τη βιοχημική – λειτουργική – μορφολογική καταστροφή που προκαλείται από ραβδομύλυση (ίσως να δρουν συνεργιστικά η αιθανόλη και τα μη αλκοολούχα συστατικά του οίνου). (2) Η κατανάλωση αιθανόλης περιόρισε την οξείδωση των λιποειδών, μείωσε τα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσού και την ποσότητα αραχιδονικού οξέος, ενώ

αύξησε τη HDL και τα TG. Επίσης, οι ερευνητές θεωρούν πως η αιθανόλη επιδρά θετικά στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νεφρών^[215, 216 - 218]. (3) Τα μη αλκοολούχα συστατικά του οίνου φάνηκε πως, στους αρουραίους, περιόρισαν την οξείδωση των λιποειδών, ενώ αύξησαν την ποσότητα του αραχιδονικού οξέος^[215, 218]. Συμπερασματικά, λοιπόν, η ερευνητική ομάδα καταλήγει πως η μέτρια κατανάλωση κρασιού επιδρά στην παραγωγή λιπαρών οξέων από τα νεφρά, διατηρώντας τα επίπεδα των ω-6 (αραχιδονικό) και ω-3 (εικοσαπεντανοϊκό) λιπαρών οξέων. Ταυτόχρονα, το κόκκινο κρασί αυξάνει την HDL, προστατεύει τα νεφρά από την καταστροφή προκαλούμενη από ραβδομύλωση, και τέλος, ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των νεφρών (επίδραση αλκοόλης και μη αλκοολούχων συστατικών). Φαίνεται επομένως, ότι ο οίνος μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από τη νεφρική βλάβη που προκαλείται από οξειδωτικό στρες^[101].

Επίσης, υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν την προστατευτική δράση των επιμέρους συστατικών του οίνου.

Οι Alberto A.E., Bertelli και συν., μελέτησαν την επίδραση της ρεσβερατρόλης στην προστασία από νεφρικές νόσους^[219]. Χρησιμοποίησαν 40 αρουραίους Wistar τους οποίους χώρησαν σε δύο ομάδες, εκ των οποίων στη μία χορηγήθηκε ρεσβερατρόλη 1 μM στους αρουραίους. Κατόπιν, και στις δυο ομάδες, οι δύο νεφρικές αρτηρίες συσφίχθηκαν - προκλήθηκε ισχαιμία - για 40 λεπτά. Μετά από 24 ώρες οι αρουραίοι θανατώθηκαν και πραγματοποιήθηκε ιστολογική εξέταση. Στην ομάδα χωρίς ρεσβερατρόλη, βρέθηκε σωληναριακή υπέρταση, ενώ στην ομάδα που είχε χορηγηθεί ρεσβερατρόλη η πίεση είχε μειωθεί. Σε αυτή την ομάδα (σε αντίθεση με την άλλη όπου δεν είχε χορηγηθεί ρεσβερατρόλη), μειωμένος ήταν και ο αριθμός των σχηματισμένων θρόμβων από αιμοπετάλια, ο βαθμός νέκρωσης του ιστού αλλά και τα επίπεδα cGMP στα ούρα. Καταληκτικά, η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει την προστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης ενάντια στις νεφρικές παθήσεις.

Πιο πρόσφατα, ερευνήθηκε η επίδραση της ρεσβερατρόλης στον τραυματισμό του νεφρικού ιστού που προκαλείται από τη γλυκερόλη^[220]. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί αρουραίοι Wistar, οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με το αν εμβολιαστήκαν με: 8mg/kg ή 50% γλυκερόλη, γλυκερόλη + ρεσβερατρόλη, φυσιολογικό ορό, φυσιολογικό ορό + καρβοξυ-μεθυλοκυτταρίνη, ή φυσιολογικό ορό + ρεσβερατρόλη. Οι αρουραίοι θανατώθηκαν μετά από 3 ημέρες. Οι ιστολογικές, ανοσο-ιστο-χημικές εξετάσεις και οι εξετάσεις ούρων που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν πως με τη χορήγηση γλυκερόλης, αυξήθηκε σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η έκφραση του NF-kB, ο αριθμός των μακροφάγων/ λεμφοκυττάρων, και η κρεατινίνη του πλάσματος. Η

ρεσβερατρόλη μετριάζει όλες τις παραπάνω δράσεις· συνεπώς, μπορεί να περιορίσει τον τραυματισμό του νεφρικού ιστού που προκαλείται από τη γλυκερόλη^[220].

Κάποιες μελέτες έδειξαν και την αντικαρκινική δράση του οίνου στους νεφρούς. Σε μια προοπτική μελέτη στη Σουηδία^[221], εξετάστηκε η πρόσληψη οίνου (μέσω ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων) και η εμφάνιση καρκίνου σε νεφρικά κύτταρα. Οι ερευνητές, υπολόγισαν πως όσες από τις γυναίκες της μελέτης κατανάλωναν αιθανόλη >4,3 gr/ημ., είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκινώματος στα νεφρά, σε σχέση με αυτές που κατανάλωναν <2,5 gr/ ημ. (η διαφορά αυτή παρέμενε για όλες τις γυναίκες ανεξαρτήτως της ηλικίας τους και του Δείκτη Μάζας Σώματός τους)^[221]. Επίσης, τα αποτελέσματα μιας συνδυαστικής ανάλυσης 12 προοπτικών ερευνών^[222], υπολογίστηκε η επίπτωση της εμφάνισης καρκίνου σε νεφρικά κύτταρα. Η ανάλυση αυτή έδειξε σημαντική διαφορά της παραπάνω επίπτωσης μεταξύ αυτών που κατανάλωναν αλκοόλ – ομάδα Α – (>15 gr/ημ.) και αυτών που δεν έπιναν – ομάδα Β –, υπέρ της ομάδας που κατανάλωνε αλκοόλ. Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, λοιπόν, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε νεφρικά κύτταρα και στα δυο φύλα.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί^[223], ότι ο οίνος δρά στην ex vivo ενίσχυση της ενδοθηλιακής σύνθεσης NO των νεφρών, στη μείωση της πίεσης του αίματος και στον περιορισμό της υπέρτασης και στους νεφροπαθείς, καθώς και στη μείωση του οξειδωτικού στρες στους νεφρούς.

Συγκεντρώνοντας επομένως όλα τα δεδομένα^[102], οι επιδράσεις που έχει ο οίνος και τα διάφορα συστατικά του, στις νεφρικές παθήσεις, είναι οι εξής: (1) δοσοεξαρτώμενη βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νεφρών αρουραίων μετά από κατανάλωση οίνου, (2) αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νεφρών και υπό την μακροχρόνια επίδραση πολυφαινόλων, (3) η ρεσβερατρόλη α) μέσω ελέγχου των γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη λιποειδών, συμβάλλει στον περιορισμό της συγκέντρωσης χοληστερόλης στα μακροφάγα, β) προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των αρτηριών από την oxLDL, την απόπτωση και τη συγκέντρωση Ca^{+2} , γ) συμβάλλει στον περιορισμό της πρωτεϊνουρίας και της λιπιδαιμίας σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων με σπειραματονεφρίτιδα, (4) η κερκετίνη μπορεί να αναστείλει τόσο in vivo όσο και in vitro την απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων και (5) σε διαβητικούς ασθενείς, δίαιτα χαμηλή σε υδατάνθρακες και

εμπλουτισμένη σε πολυφαινόλες, μαζί με μέτρια πρόσληψη οίνου, φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου σε διαβητική νεφροπάθεια.

Σκοπός

Η σπειραματοσκλήρυνση είναι το κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό στις περισσότερες νεφρικές παθήσεις και σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη αυτών σε νεφρική ανεπάρκεια. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κοινώς αποδεκτό ότι η σπειραματοσκλήρυνση αποτελεί μια φλεγμονώδη νόσο. Τα μεσαγγειακά κύτταρα αποτελούν τα κύρια κύτταρα του σπειράματος και εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη της βλάβης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορούν να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων που οδηγεί στην έναρξη και εξέλιξη της βλάβης.

Τα τελευταία χρόνια πολλά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η διατροφή μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη χρόνιων παθήσεων. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τον ευεργετικό ρόλο της Μεσογειακής Δίαιτας σε μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων και έχει πιστοποιήσει την ύπαρξη βιολογικά δραστικών λιποειδών σε τρόφιμα αυτής. Βασικό χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διατροφής με αποδεδειγμένες ευεργετικές δράσεις, είναι η κατανάλωση οίνου.

Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φανερώνει το μικρό αριθμό εργασιών που μελετούν την επίδραση του οίνου και των συστατικών αυτού στα νεφρά ή/και σε νεφρικές παθήσεις, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των ολικών πολικών λιποειδών οίνου στις λειτουργίες κυτταρικής σειράς ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων και συγκεκριμένα στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Κεφάλαιο 6^ο: Πειραματικές Μέθοδοι

6.1. Εκχύλιση λιποειδών κατά *Blight-Dyer*^[20, 224]

➤ 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.

6.2. Κατανομή κατά αντιρροή^[20, 225]

➤ 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 πετρελαϊκού 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.

6.3. Χημικοί προσδιορισμοί

6.3.1. Προσδιορισμός φωσφόρου^[20, 226]

➤ Όργανα:

- Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180 °C.
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/ Novaspec II.
- Υάλινοι δοκιμαστικού σωλήνες.
- Υάλινα σιφώνια.
- Φιάλη αζώτου.

➤ Αντιδραστήρια:

- Υπερχλωρικό οξύ 70%.
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4% (Ζυγίζονται 2,125g μολυβδαινικού αμμωνίου και διαλύονται σε απεσταγμένο 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 υπερχλωρικού 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 °C 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°C 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 διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου.

6.3.2 Προσδιορισμός σακχάρων ^[20, 227]

➤ Όργανα:

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υάλινα σιφώνια.

➤ Αντιδραστήρια:

- Πυκνό θειικό οξύ 96%.
- Διάλυμα φαινόλης 5% w/v.
- Πρότυπο δ/μα γλυκόζης 15mg/ml.

➤ Αρχή μεθόδου:

Οι εξόξες 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.

6.3.3 Προσδιορισμός φαινολικών^[20, 228]

➤ Όργανα:

- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.

➤ Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα Folin – Ciocalteu: Διαλύονται 10g βολφραμικού νατρίου και 2,5g μολυβδαινικού 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:
 $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 14\text{WO}_3\cdot 4\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

- Πρότυπο διάλυμα τυροσόλης συγκέντρωσης 1mg/ml εθανόλης.
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% w/v.

➤ 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.

6.4. Βιολογική δοκιμασία *in vitro* ^[20, 229]

➤ Όργανα:

- Aggreometer (CHRONO – LOG).
- pHμετρο (CHEMTRIX Type 60A).
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.
- Υδρόλουτρο 37 °C.
- Φυγόκεντρος Sorval.

➤ Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα 10 x Tyrodes stock: Σε 1lt περιέχονται 80g NaCl, 1,95g KCl, 2,13g $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10g γλυκόζη.
- Διάλυμα 100x CaCl_2 stock: Ποσότητα 1,911g σε 100 ml νερό.

- Διάλυμα 0,2M EGTA stock: Ποσότητα 0,76g EGTA / 10ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7,5 με 5M NaOH.
- 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 10 x Stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5ml διαλύματος NaHCO₃ (0,203g NaHCO₃ σε 10ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του νερού στο NaHCO₃. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δυο τμήματα των 50ml. Στο ένα από τα δυο προστίθενται 25μl 0,2 M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των δυο κλασμάτων στο 6,46 με 1N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tyrodes και Ca pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2): Σε 5ml Tyrodes 10 x stock προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5ml 100 x CaCl₂ stock. Κατόπιν, προστίθενται 2,5ml NaHCO₃ (παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1N HCl. Διατηρείται στους 37° C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- Αντιδραστήριο ACD: Σε 100ml νερό περιέχονται 13,65g κιτρικού οξέος, 25g κιτρικού νατρίου και 20g δεξτρόζης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock: Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) /ml 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 σιλικοναρίσματος (Serva).

➤ Αναλυτική πορεία:

1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού: Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται μέχρι τα 50ml. 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 σιφόνιο των 20ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσό πλάσματος τα 9ml για κάθε 2ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφόνια και μεταφέροντας ίσους όγκους πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζουμε με parafilm. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24° C στα 750g (2200rpm), οπότε τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του πλάσματος και της στιβάδας 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 2500rpm.

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

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, ενώ καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 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 αναδιασπείρωντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε έναν πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ ml: Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων παίρνουμε 10μL και 990μL Tg pH6,5 και φωτομετρείται στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10μL είναι: $\text{Αρ.Κυττάρων} / 10\lambda = A \times 1,25 \times 10^8$, όπου A η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων (Demopoulos, C.A., et al 1979).

2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού: Σε ειδικές πλαστικές κυψελίδες προστίθενται 50μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 200μL Tg-Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας. Επωάζονται για 15min σε υδρόλουτρο 37° C. Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του aggregometer με Tg-Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg-Ca pH 7,2. Κατόπιν, τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του aggregometer και προστίθενται διάφορες συγκεντρώσεις PAF διαλυτοποιημένου σε BSA 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης. Σαν 100% συσσώρευση ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση PAF που προκαλεί τη μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων ενώ η τιμή IC₅₀ αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση PAF που προκαλεί 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια.
3. Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού: Στη σειρά αυτών των πειραμάτων πριν την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προστίθενται διαφορετικές ποσότητες του εξεταζόμενου (για αναστολή) δείγματος. Ακολουθεί επώαση για 1min και στη συνέχεια προστίθεται PAF που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων. Υπολογίζεται το ποσοστό

αναστολής στον PAF για κάθε συγκέντρωση δείγματος, σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης και σαν τιμή IC₅₀ ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης.

6.5. Καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων^[204, 230, 231]

Χρησιμοποιήθηκε μια εξακριβωμένη σταθερή κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (Human mesangial cell line, HMCL). Τα κύτταρα έγιναν αθάνατα με προσθήκη (transfection) των ογκογονιδίων SV40 και H-ras. Τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων διατηρήθηκαν και στη κυτταρική σειρά (Κλώνος C2M12)^[231] (πίνακας 6.1.).

Πίνακας 6.2.: Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων και της κυτταρικής σειράς αυτών.

	Ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα	Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων.
Μορφολογία		
Αστεροειδής σχήμα	+	+
Κυτοπλασμικές προεκτάσεις	+	+
Μικρολαχνές	+	+
Αντιγονικοί δείκτες		
α-ακτίνη	+	+
T-SV 40	-	+
Συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας		
Κολλαγόνο I	+	+
Κολλαγόνο IV	+	+
Λαμίνη	+	+
Φιμπρονεκτίνη	+	+
Βιοσύνθεση		
IL-6	+	+
Ρενίνη	+	+
t-PA	+	+
u-PA	+	+
PAI1	+	+

Από Sraer JD et al. *Kidney Int* 1996;49: 267-70

➤ Όργανα:

- Δοχεία καλλιέργειας (flask) 75 cm² και 25 cm²
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Αποστειρωμένα δοχεία
- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασία 37°C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R.

➤ Αντιδραστήρια:

- Ορός νεογνού μόσχου (Foetal calf serum, FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C.
- L-Γλουταμίνη (Sigma): 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 200 mM. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C.
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 20 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, και προκύπτει διάλυμα 10000 units / mL πενικιλίνη-και 25 mg / mL στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C.
- Αμφοτερικίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 5 ml αποστειρωμένο DMSO, και προκύπτει διάλυμα 50 mg/ mL. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C.
- Ανθρώπινη μεταφοράση, ινσουλίνη (ITS). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 4.1 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 5 mg / mL ινσουλίνη και 7.66 mg / mL τρανσφερίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr Na₂HPO₄·2H₂O, 0.2408 gr NaH₂PO₄·2H₂O, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.

- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v.v).
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).

➤ Αναλυτική πορεία:

Τα κύτταρα, HMCL, καλλιεργούνται σε μέσο που περιέχει RPMI 1640, 5% FCS, 2 mmol / L γλουταμίνη, 10^5 unit / L πενικιλίνη, 0,1g / L στρεπτομυκίνη, 2.5×10^{-3} g / L αμφοτερικίνη, 5×10^{-3} g/L ινσουλίνη, 5×10^{-3} g/ L ανθρώπινη τρανσφερρίνη και 5×10^{-3} g/ L σεληνιώδες νάτριο (*sodium selenite*) σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm².

Κάθε 2-3 μέρες απαιτείται αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας και ανακαλλιέργεια στα κύτταρα σε διαστήματα 6-7 μέρων. Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί πλήρως στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνεται το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονται με PBS. Στη συνέχεια προστίθεται θρυψίνη και τα κύτταρα επωάζονται για 2 λεπτά στους 37°C. Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσης και ενισχύεται με απότομη ανακίνηση του δοχείου καλλιέργειας.

Η ενζυματική δράση της θρυψίνης τερματίζεται με προσθήκη μέσου ανάπτυξης που περιέχει 5% FCS και η παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων γίνεται με φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το ίζημα αναδιασπείρεται σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετείται σε δοχεία καλλιέργειας σε αναλογία 1:3.

6.5.1. Συντήρηση και αναδιασπορά κυττάρων

➤ Όργανα:

- Δοχεία καλλιέργειας (*flask*) 75 cm² και 25 cm²
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένα δοχεία
- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασία 37°C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.

- Φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R.

➤ *Αντιδραστήρια:*

- Ορός νεογνού μόσχου (Foetal calf serum, FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- L-Γλουταμίνη (Sigma): 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 200 mM. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 20 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, και προκύπτει διάλυμα 10000 units / mL πενικιλίνη-και 25 mg / mL στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Αμφοτερικίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 5 ml αποστειρωμένο DMSO, και προκύπτει διάλυμα 50 mg/ mL. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Ανθρώπινη μεταφοράση, ινσουλίνη (ITS). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 4,1 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 5 mg / mL ινσουλίνη και 7,66 mg / mL τρανσφερρίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Θρυψίνη (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0,9076 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2408 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C .
- Αμπούλες DMSO
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v.v).
- Διάλυμα συντήρησης : διάλυμα FCS 20% σε DMSO.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK)

➤ *Αναλυτική πορεία:*

Όταν έχει πραγματοποιηθεί η πλήρης ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνεται το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονται με PBS. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη θρυψίνης και τα κύτταρα επωάζονται για 2 λεπτά στους 37°C . Η

αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσης και ενισχύεται με απότομη ανακίνηση του δοχείου καλλιέργειας.

Η ενζυματική δράση της θρυψίνης τερματίζεται με προσθήκη μέσου ανάπτυξης που περιέχει 5% FCS και η παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων γίνεται με φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε 0,9 mL FCS, ακολουθεί προσθήκη 0,9 mL διαλύματος συντήρησης και τοποθέτηση σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες για αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Το DMSO προστίθεται για την αποφυγή κρυστάλλων και επομένως την προστασία των κυττάρων κατά τη ψύξη. Η σταδιακή μείωσή της θερμοκρασίας είναι σημαντική για την ομαλή ψύξη των κυττάρων και την βιωσιμότητά τους για αυτό το λόγο οι σωλήνες αρχικά τοποθετούνταν στο δοχείο ισοπροπανόλης στους -20°C για σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας και μετά από διάστημα 1 μέρας σε δοχείο υγρού αζώτου.

Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται με τοποθέτησή τους κατευθείαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C . Αμέσως μετά την υγροποίηση του διαλύματος διασποράς των κυττάρων ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε σωλήνα των 50 mL που περιέχει 20 mL RPMI1640. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση στα 500 x g για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε 20 mL RPMI1640 και γίνεται φυγοκέντρηση στα 500 x g για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν ποσότητα του DMSO. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιασπείρεται σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετείται σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm^2 μέσα στον επωαστικό θάλαμο.

6.5.2. Διέγερση των κυττάρων με *IL-1 β*

➤ Όργανα:

- Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 12 πηγαδιών (12 well plates)
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37°C .
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντροι Eppendorf centrifuge 5810R και Eppendorf centrifuge 5417C.

➤ Αντιδραστήρια:

- Φρέσκο μέσο ανάπτυξης RPMI1640.
- Διάλυμα BSA 10% w.v. ελεύθερης λιπαρών οξέων και χαμηλής ενδοτοξίνης (Sigma): 1g BSA αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm .
- Φρέσκο μέσο χωρίς ορό (SFM: περιέχει 0,2 % BSA, 2 mmol / L γλουταμίνη, 10^5 unit / L πενικιλίνη, 0,1g / L στρεπτομυκίνη, 2.5×10^{-3} g / L αμφοτερικίνη).
- Διάλυμα IL-1 β : 5 μg IL-1 β αναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA-FFA ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/mL}$ IL-1 β .
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0,9076 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2408 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).

➤ Αναλυτική πορεία:

Τα κύτταρα HMCL καλλιεργήθηκαν σε μέσο ανάπτυξης RPMI1640 σε δοχεία καλλιέργειας 12 πηγαδιών με βάση τη μεθοδολογία που αναλύθηκε στις προηγούμενες παραγράφους.

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα φθάνουν περίπου στο 80% της συμβολής στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνεται το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονται με PBS. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη φρέσκου μέσου χωρίς ορό που περιέχει 0,2 % BSA (SFM) και ακολουθεί παραμονή σε αυτό το μέσο για 24 ώρες ώστε να επέλθει συγχρονισμός των κυττάρων. Μετά τις 24 ώρες απομακρύνεται το μέσο και τα κύτταρα πλένονται με PBS. Ακολουθεί προσθήκη φρέσκου μέσου SFM που περιέχει είτε το διαλύτη του κάθε προστιθέμενου παράγοντα (δείγμα αναφοράς) είτε διαλύματα IL-1 β κατάλληλης συγκέντρωσής (σε PBS 0,1% BSA), είτε κάποιον άλλο παράγοντα ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος.

6.5.3. Επίδραση πολικών λιποειδών κρασιού στην έκκριση κυτταροκινών

➤ Όργανα:

- Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 12 πηγαδιών (12 well plates)

- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Ειδικά σωληνάκια (*cluster tubes*) για τη φύλαξη των υπερκείμενων των κυττάρων.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασία 37°C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής.
- Φυγόκεντρος.

➤ Αντιδραστήρια:

- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Φρέσκο μέσο καλλιέργειας RPMI1640.
- Διάλυμα BSA 10% w.v. ελεύθερης λιπαρών οξέων και χαμηλής ενδοτοξίνης (Sigma): 1g BSA αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Φρέσκο μέσο χωρίς ορό (SFM: περιέχει 0,2 % w.v BSA, 2 mmol / L γλουταμίνη, 10⁵ unit / L πενικιλίνη, 0,1g / L στρεπτομυκίνη, 2,5 x 10⁻³ g / L αμφοτερικίνη).
- Διάλυμα IL-1β: 5μg IL-1β αναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA-FFA ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1 μg/mL IL-1β.
- Πολικά λιποειδή κρασιού: εξατμίζονται σε αέριο άζωτο και στη συνέχεια αναδιαλύονται σε 50 μL DMSO, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 22,4 μg/mL.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS).
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).

➤ Αναλυτική πορεία

Τα HMCL κύτταρα καλλιεργούνται σε δοχεία 12 πηγαδιών όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Αφού τα κύτταρα συγχρονιστούν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 24 ώρες, στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα εκπλένονται με PBS.

Δοκιμάστηκε (α) η διαδικασία της συνεπώσεως: Προστίθενται σε διάλυμα SFM, κατάλληλες ποσότητες είτε των διαλυτών *PBS 0,1% BSA-FFA* και *DMSO* (δείγματα αναφοράς), είτε IL-1β, είτε πολικά λιποειδή κρασιού (*διαφορετικές ποσότητες*), είτε IL-1β και πολικά λιποειδή κρασιού (*διαφορετικές ποσότητες*). Μετά από 6 ώρες επώσεως των κυττάρων πραγματοποιείται (βλ. και παρακάτω) η μέτρηση των κυτταροκινών (ELISA).

Επιπλέον, δοκιμάστηκε και (β) η διαδικασία της προεπώσεως: Προστίθενται σε διάλυμα SFM, κατάλληλες ποσότητες του διαλύτη *DMSO* χωρίς (δείγματα αναφοράς) ή με (δείγματα ελέγχου) τις αντίστοιχες για την κάθε συνθήκη ποσότητες πολικών λιποειδών κρασιού. Τα κύτταρα προεπωάζονται για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται *PBS 0,1% BSA-FFA* χωρίς (δείγματα αναφοράς) ή με (δείγματα ελέγχου) IL-1β. Μετά από 6 ώρες επώσεως των κυττάρων πραγματοποιείται (βλ. και παρακάτω) η μέτρηση των κυτταροκινών (ELISA).

Ο όγκος του θεραπευτικού υλικού ανά πηγάδι καλλιέργειας ήταν 1 mL. Μετά από 6 ώρες (από τη στιγμή που προστέθηκε η IL-1β) επώσεως στον επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασίας 37°C, συλλέγονται τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 500 x g για να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα, χωρίζονται σε 3 μέρη σε ειδικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -80°C μέχρι τη χρήση τους, όποτε και μετρήθηκε η συγκέντρωση IL-6 και MCP-1 με άνοσοενζυμικό προσδιορισμό (ELISA).

6.5.4. Παραλαβή πρωτεϊνών από τα κύτταρα

➤ Όργανα:

- Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 12 πηγαδιών (12 well plates)
- Πιπέτες 200, 1000 ml
- Αποστειρωμένα tips μπλε και κίτρινα
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασία 37 °C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντροι Eppendorf Centrifuge 5417C και Eppendorf Centrifuge 5810R

➤ *Αντιδραστήρια*

- Διάλυμα NaOH 0,5N σε νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS).

➤ *Αναλυτική πορεία:*

Αφού γίνει συλλογή των υπερκειμένων των κυττάρων μετά το πέρας του χρόνου επώασης στις εκάστοτε συνθήκες του πειράματος, ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS. Προστίθεται 1 ml διαλύματος NaOH 0,5N/ πηγάδι για λύση των κυττάρων και την παραλαβή των πρωτεϊνών. Τα κύτταρα τίθενται στον επωαστικό θάλαμο για τουλάχιστον 1 ώρα. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, παραλαμβάνεται το περιεχόμενο των πηγαδιών, το οποίο και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να προσδιοριστεί η περιεχόμενη πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford.

6.5.5 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford ^[230, 204]

➤ *Όργανα:*

- Κυκλοαναδευτήρας (vortex).
- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών για φωτομέτρηση των δειγμάτων.
- Φωτόμετρο Elisa Reader Tecan Sunrise Remote F039300.
- Αυτόματες πιπέτες.

➤ *Αντιδραστήρια:*

- Διάλυμα αποθήκευσης: αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) 100 μg/ml : αραιώνεται σε νερό με αναλογία 1:3 (BSA:Νερό) => 25μg/ml
- Προκατασκευασμένο αντιδραστήριο Bradford το οποίο είναι διάλυμα Brilliant Blue G και φωσφορικού οξέος σε μεθανόλη.
- Απεσταγμένο νερό

➤ *Αρχή μεθόδου:*

Η μέθοδος Bradford περιλαμβάνει την τοποθέτηση της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G στο διάλυμα των πρωτεϊνών. Η χρωστική συμπλέκεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών 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 είναι σταθερό για 45 λεπτά. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 µg σε 10 µg πρωτεΐνης, ως προς BSA.

➤ Αναλυτική πορεία:

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 2,5-25 µg / mL. Παρασκευάζεται διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό, με προσθήκη 3µl δείγματος (*προηγείται έντονη ανάδευση στον κυκλοαναδευτήρα*) σε 197µl απεσταγμένου νερού ανά πηγάδι. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 0,2 mL. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την πρότυπη καμπύλη αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

α/α	µg/ml	BSA µl (25 µg/ml)	H ₂ O µL
1	0	-	200
2	2,5	20	180
3	5	40	160
4	7,5	60	140
5	10	80	120
6	15	120	80
7	20	160	40
8	25	200	-

Προστίθενται 50 µl ανά πηγάδι αντιδραστηρίου Bradford και μετά από παραμονή 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, μετράται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων στα 595nm. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

6.5.6. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της κυτταροκίνης IL-6

➤ Όργανα:

- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών ειδική για ELISA
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml.
- Σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml.
- Φωτόμετρο Elisa reader Tecan Sunrise Remote F039300.
- 8-κάναλη πιπέτα.

➤ Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,05% v.v. σε Tween 20 Σε τελικό όγκο 500mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 250 μL Tween 20.
- Διάλυμα αντιδραστηρίου αραίωσης (reagent diluent): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 1% w.v. σε BSA Σε τελικό όγκο 100 mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 1g BSA ειδικής καθαρότητας για ELISA και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm . Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα πυκνού θεικού οξέος: 37, 5N
- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): Διάλυμα 2N H_2SO_4 . Προστίθενται 26,6 mL διαλύματος πυκνού θεικού οξέος σε 474 mL νερού.

Duaset Elisa kit (R-D systems) για ανθρώπινη IL-6, που περιλαμβάνει:

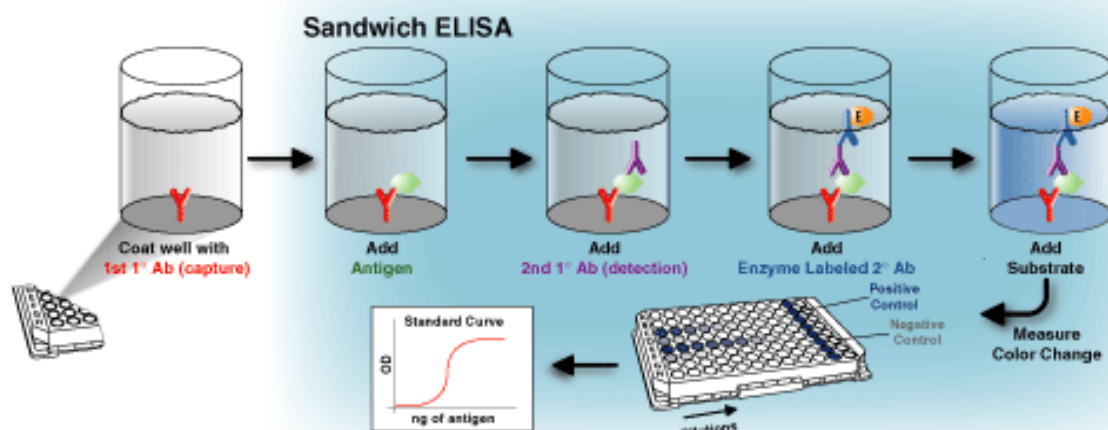
- ⇒ Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος δέσμευσης (capture antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 360 μg μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα IL-6 ποντικού. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Συγκέντρωση 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- ⇒ Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 36 μg μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα IL-6 αίγας. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Συγκέντρωση 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- ⇒ Διάλυμα αποθήκευσης πρότυπης IL-6: 1 φιαλίδιο περιέχει 15 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL-6. Αναδιαλύεται σε 0,5 ml απεσταγμένο νερό. Συγκέντρωση 30 ng/ml.
- ⇒ Διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): 1 φιαλίδιο περιέχει 1 ml στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (*HRP, horseradish peroxidase*).
- ⇒ Διάλυμα αντιδραστηρίου A: περιέχει διάλυμα H_2O_2
- ⇒ Διάλυμα αντιδραστηρίου B: περιέχει διάλυμα τετραμεθυλοβενζινιδίνης
- ⇒ Διάλυμα εργασίας (working) αντισώματος δέσμευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml PBS προστίθενται 100 μL από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος δέσμευσης.

- ⇒ Διάλυμα εργασίας (working) αντισώματος ανίχνευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραιώσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραιώσης προστίθενται 100 μL από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος ανίχνευσης.
- ⇒ Διάλυμα εργασίας (working) στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): Παρασκευάζεται διάλυμα αραιώσης 1/200 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,95 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραιώσης προστίθενται 50 μL από το διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP).
- ⇒ Πρότυπα διαλύματα IL-6: Προστίθενται 10 μL διαλύματος αποθήκευσης πρότυπης IL-6 σε 490 μL διαλύματος αντιδραστηρίου αραιώσης, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 600 pg/mL. Από το διάλυμα αυτό προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις 1:1 με τα εξής διαλύματα 300 – 150- 75 – 37,5 – 18,75 pg/mL.
- ⇒ Διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution): Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι διαλύματος αντιδραστηρίου A και B λίγο πριν την χρήση

➤ Αρχή της μεθόδου:

Πραγματοποιείται δέσμευση του αντισώματος δέσμευσης για IL-6 στα πηγάδια της πλάκας (96 well plate). Στις ειδικές για IL-6 θέσεις του αντισώματος δέσμευσης προσδένεται η περιεχόμενη IL-6 του δείγματος (υπερκεείμενα κυττάρων), αλλά και η ανασυνδυασμένη IL-6 των πρότυπων διαλυμάτων. Στη συνέχεια το αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται στη δεσμευμένη με το αντίσωμα δέσμευσης IL-6. Στο αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται η υπεροξειδάση HRP για να καταλύσει την αντίδραση του H_2O_2 με την τετραμεθυλοβενζινιδίνη, που μας δίνει έγχρωμο προϊόν. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την 2N H_2SO_4 στα πηγάδια οπότε αποδίδει ένα τελικό κίτρινο χρωματισμό, η ένταση του οποίου φωτομετράται στα 450 nm. Παράλληλα πραγματοποιείται φωτομέτρηση και στα 620 nm όπου αφαιρείται από τη φωτομέτρηση στα 450 nm ώστε να διορθωθούν οι παρεμποδίσεις που προκύπτουν στην οπτική απορρόφηση από το υλικό της πλάκας. Η συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που προκύπτει από τη φωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων IL-6 (εικόνα 6.1.).

Εικόνα 6. 1.: Σχηματική απεικόνιση της ELISA



➤ Αναλυτική πορεία:

1. Προετοιμάζεται η πλάκα των 96 πηγαδιών για την υποδοχή των δειγμάτων, με προσθήκη 100 μ l / πηγάδι διαλύματος capture antibody σε PBS (100 μ L IL-6 C.A. +9,9ml PBS) και αφήνεται σκεπασμένο σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας.
2. Μετά από 12 ώρες πρωί ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Και εναποθέτουμε 300 μ l reagent diluent / πηγάδι για 1 ώρα.
3. Μετά από 1 ώρα, ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Από stock διάλυμα IL-6 30ng/ml, φτιάχνουμε 7 πρότυπα διαλύματα (S1 –S7→όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα) συγκέντρωσης 9,375 - 600pg/ml IL-6 από τα οποία θέτουμε στα κατάλληλα πηγάδια 100 μ L/well και συνιστούν την πρότυπη καμπύλη:

S7 => 10 μ L από το stock δ/μα IL-6+ 490 μ L RD	C = 600pg/ml
S6 => 250 μ L από το S7 + 250 μ L RD	C = 300 pg/ml
S5 => 250 μ L από το S6 + 250 μ L RD	C = 150pg/ml
S4 => 250 μ L από το S5 + 250 μ L RD	C = 75pg/ml
S3 => 250 μ L από το S4 + 250 μ L RD	C = 37,5pg/ml
S2 => 250 μ L από το S3 + 250 μ L RD	C = 18,75pg/ml
S1 => 250 μ L από το S2 + 250 μ L RD	C = 9,375pg/ml

Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης από τους -80°C, θέτουμε 100 μ L/well στα αντίστοιχα πηγάδια. Η τοποθέτηση των προτύπων και των δειγμάτων

γίνεται εις διπλούν. Αφήνουμε τα δείγματα να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου

4. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Προστίθενται 100 μ l/well διαλύματος detection antibody σε reagent diluent (100 μ L IL-6 D.A. + 9,9ml RD). Αφήνονται να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
6. Προστίθενται 100 μ l/well διαλύματος HRP-Streptavidin σε reagent diluent (50 μ L HRP +9,95ml RD) και τα αφήνουμε να επωαστούν για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
7. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Αναμιγνύουμε με αναλογία 1:1 τα color reagent A και B (5ml CRA+5ml CRB) θέτουμε 100 μ L/well δείγματος και επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος.
8. Προστίθενται 50 μ l/well stop solution. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση (ώστε να εξασφαλίσουμε καλή μίξη).
9. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 450nm.

6.5.7. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της χημειοκίνης MCP-1

➤ Όργανα:

- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών ειδική για ELISA
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml
- Σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml
- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5417C
- Φωτόμετρο Elisa reader Tecan Sunrise Remote F039300

➤ Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο

7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,05% v.v. σε Tween 20 Σε τελικό όγκο 500mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 250 μ L Tween 20.
- Διάλυμα αντιδραστηρίου αραίωσης (reagent diluent): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 1% w.v. σε BSA Σε τελικό όγκο 100 mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 1g BSA ειδικής καθαρότητας για ELISA και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μ m. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα πυκνού θειικού οξέος: 37, 5N
- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): Διάλυμα 2N H₂SO₄. Προστίθενται 26,6 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος σε 474 mL νερού.

Duaset Elisa kit (R-D systems) για ανθρώπινη MCP-1, που περιλαμβάνει:

- ⇒ Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος δέσμησης (capture antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 180 μ g μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα MCP-1 ποντικού. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Συγκέντρωση 100 μ g/ml.
- ⇒ Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 18 μ g μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα MCP-1 αίγας. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Συγκέντρωση 10 μ g/ml.
- ⇒ Διάλυμα αποθήκευσης πρότυπου MCP-1: 1 φιαλίδιο περιέχει 35 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL-6. Αναδιαλύεται σε 0,5 ml απεσταγμένο νερό. Συγκέντρωση 70 ng/ml.
- ⇒ Διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): 1 φιαλίδιο περιέχει 1 ml στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP, horseradish peroxidase).
- ⇒ Διάλυμα αντιδραστηρίου A: περιέχει διάλυμα H₂O₂
- ⇒ Διάλυμα αντιδραστηρίου B: περιέχει διάλυμα τετραμεθυλοβενζινιδίνης
- ⇒ Διάλυμα εργασίας αντισώματος δέσμησης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml PBS προστίθενται 100 μ L από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος δέσμησης.
- ⇒ Διάλυμα εργασίας αντισώματος ανίχνευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης προστίθενται 100 μ L από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος ανίχνευσης.

- ⇒ Διάλυμα εργασίας στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/200 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,95 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης προστίθενται 50 μ L από το διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP).
- ⇒ Πρότυπα διαλύματα IL-6: Προστίθενται 50 μ L διαλύματος αποθήκευσης πρότυπου MCP-1 σε 450 μ L διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 1000 pg/mL. Από το διάλυμα αυτό προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις 1:1 με τα εξής διαλύματα 500 – 250 – 125 – 72,5 – 36,25 pg/mL.
- ⇒ Διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution): Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι διαλύματος αντιδραστηρίου A και B λίγο πριν την χρήση.

➤ Αρχή της μεθόδου (όμοια με πριν όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 5.1.):

Πραγματοποιείται δέσμευση του αντισώματος δέσμευσης για MCP-1 στα πηγάδια της πλάκας (96 well plate). Στις ειδικές για MCP-1 θέσεις του αντισώματος δέσμευσης προσδένεται ο περιεχόμενος MCP-1 του δείγματος (υπερκείμενα κυττάρων), αλλά και ο ανασυνδυασμένος MCP-1 των πρότυπων διαλυμάτων. Στη συνέχεια το αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται στη δεσμευμένη με το αντίσωμα δέσμευσης MCP-1. Στο αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται η υπεροξειδάση HRP για να καταλύσει την αντίδραση του H_2O_2 με την τετραμεθυλοβενζινιδίνη, που μας δίνει έγχρωμο προϊόν. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την 2N H_2SO_4 στα πηγάδια οπότε αποδίδει ένα τελικό κίτρινο χρωματισμό, η ένταση του οποίου φωτομετράται στα 450 nm. Παράλληλα πραγματοποιείται φωτομέτρηση και στα 620 nm όπου αφαιρείται από τη φωτομέτρηση στα 450 nm ώστε να διορθωθούν οι παρεμποδίσσεις που προκύπτουν στην οπτική απορρόφηση από το υλικό της πλάκας. Η συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που προκύπτει από τη φωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων MCP-1.

➤ Αναλυτική πορεία:

1. Προετοιμάζεται η πλάκα των 96 πηγαδιών για την υποδοχή των δειγμάτων, με προσθήκη 100 μ l / πηγάδι διαλύματος capture antibody σε PBS (100 μ L MCP-1 C.A. +9,9ml PBS) και αφήνεται σκεπασμένο σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας.
2. Το επόμενο πρωί ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Και εναποθέτουμε 300 ml reagent diluent / πηγάδι για 1 ώρα.

3. Μετά από 1 ώρα, ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Από stock διάλυμα MCP-1 30ng/ml, φτιάχνουμε 7 πρότυπα διαλύματα (S1 –S7 $\rightarrow$ όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα) συγκέντρωσης 15,625 – 1000pg/ml MCP-1 από τα οποία θέτουμε στα κατάλληλα πηγάδια 100 μ L/well και συνιστούν την πρότυπη καμπύλη:

S7 => 50 μ L από το stock δ/μα + 450 μ L RD	C = 1000pg/ml
S6 => 50 μ L από το S7 δ/μα + 250 μ L RD	C = 500 pg/ml
S5 => 50 μ L από το S6 + 250 μ L RD	C = 250pg/ml
S4 => 50 μ L από το S5 + 250 μ L RD	C = 125pg/ml
S3 => 50 μ L από το S4 + 250 μ L RD	C = 62,5pg/ml
S2 => 50 μ L από το S3 + 250 μ L RD	C = 31,25pg/ml
S1 => 50 μ L από το S2 + 250 μ L RD	C = 15,625pg/ml

Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης από τους -80°C, θέτουμε 100 μ L/well στα αντίστοιχα πηγάδια. Η τοποθέτηση των προτύπων και των δειγμάτων γίνεται εις διπλούν. Αφήνουμε τα δείγματα να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου

4. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Προστίθενται 100 μ l/well διαλύματος detection antibody σε reagent diluent (100 μ L MCP-1 D.A. + 9,9ml RD). Αφήνονται να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
6. Προστίθενται 100 μ l/well διαλύματος HRP-Streptavidin σε reagent diluent (50 μ L HRP +9,95ml RD) και τα αφήνουμε να επωαστούν για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
7. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης*4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί. Αναμιγνύουμε με αναλογία 1:1 τα color reagent A και B (5ml CRA+5ml CRB) θέτουμε 100 μ L/well δείγματος και επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος.
8. Προστίθενται 50 μ l/well stop solution. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση (ώστε να εξασφαλίσουμε καλή μίξη).

9. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 450nm.

Κεφάλαιο 7^ο: Αποτελέσματα.

7.1. Δείγματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν λευκός και ερυθρός οίνος από το κτήμα Χατζημιχάλη.

1. Ambelon Veriki

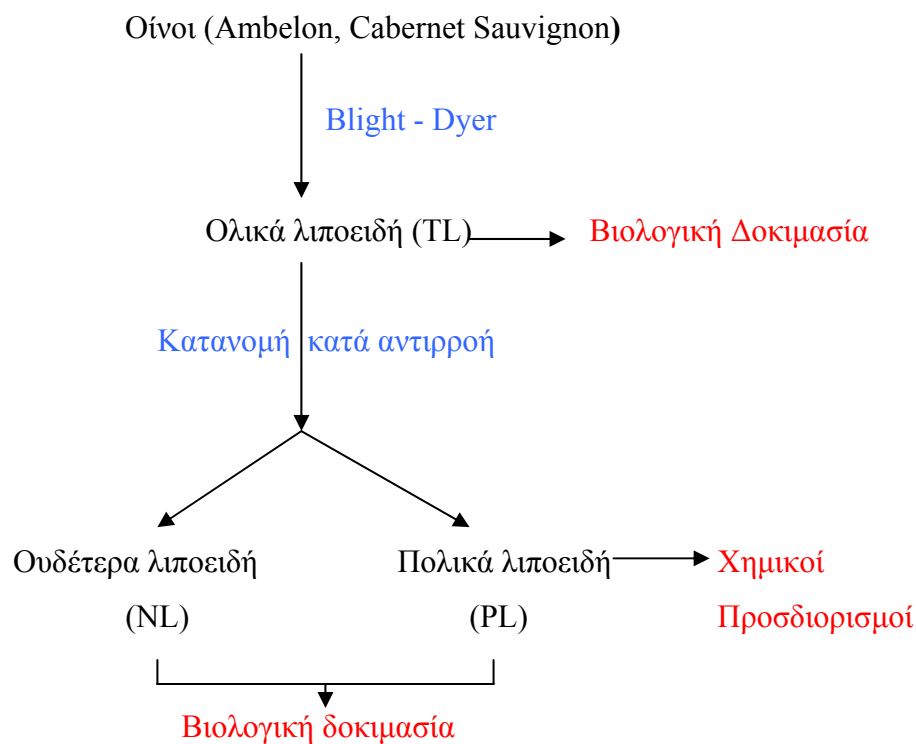
Λευκός, ξηρός οίνος του 2005, 750ml (13% vol), κύρια ποικιλία Ρόμπολα.

2. Cabernet Sauvignon 2003

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

7.2. Απομόνωση και διαχωρισμός λιποειδών από τους οίνους.

Η αναλυτική πορεία παρουσιάζεται σχηματικά ως εξής:



7.2.1. Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL)

Έγινε εκχύλιση των ολικών λιποειδών από τους οίνους (750ml) με τη μέθοδο Blight – Dyer (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 6). Στους υπολογισμούς λήφθηκε υπόψη η περιεκτικότητα του κάθε κρασιού σε αλκοόλη. Μετά την εκχύλιση και την παραμονή για κατάλληλο χρονικό διάστημα (~24 ώρες σε ψυκτικό θάλαμο) ώστε να δημιουργηθεί το διφασικό σύστημα, απορρίπτεται η υδατοαλκοολική φάση. Η χλωροφορμική φάση, η οποία περιέχει τα ολικά λιποειδή, εξατμίζεται σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτήρα υπό ελαττωμένη πίεση. Στη συνέχεια, τα ολικά λιποειδή μεταφέρονται σε προζυγισμένο σωλήνα, εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε αέριο άζωτο και ζυγίζονται. Τα αποτελέσματα της ζύγισης έδειξαν πως το Ambelon περιείχε 0,3467gr TL, ενώ το Cabernet Sauvignon βρέθηκε να περιέχει 0,5958gr TL. Τα ολικά λιποειδή του κάθε κρασιού, αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη (5ml χλωροφόρμιο : μεθανόλη – 1:1) και αποθηκεύτηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία -20° C έως την επόμενη χρήση τους.

Πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1. για το κρασί Ambelon και στον πίνακα 7.2. για το Cabernet Sauvignon.

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

Από τα ολικά λιποειδή κάθε κρασιού (TL =50 ml), διατηρούμε τα 0,5 ml το 1/10 (που αντιστοιχούν σε 37,5ml οίνου) για να πραγματοποιηθεί η βιολογική δοκιμασία (υπολογιστεί η βιολογική δραστηριότητα). Τα υπόλοιπα 9/10 (4,5 ml TL, που αντιστοιχούν σε 712,5 ml οίνου) των 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 (για τα NL: 2ml χλωροφόρμιο : μεθανόλη – 1:1, για τα PL: 5ml χλωροφόρμιο : μεθανόλη – 1:1) και αποθηκεύτηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία -20° C.

Πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1. για το κρασί Ambelon και στον πίνακα 7.2. για το Cabernet Sauvignon.

Πίνακας 7.1.: Ποσοτικά αποτελέσματα των TL, PL, NL για το κρασί Ambelon.

	δείγμα (gr)	V* (ml)	C (mg/ml)
TL	0,3467	5	0,06934
PL	0,3048	5	0,06096
NL	0,0006	2	0,00030

*όπου V = τελικός όγκος δείγματος (δείγμα + διαλύτης)

Πίνακας 7.2.: Ποσοτικά αποτελέσματα των TL, PL, NL για το κρασί Cabernet Sauvignon.

	δείγμα (gr)	V* (ml)	C (gr/ml)
TL	0,5958	5,5	0,10833
PL	0,5577	5	0,11154
NL	0,001	2	0,00050

*όπου V = τελικός όγκος δείγματος (δείγμα + διαλύτης)

7.3. Αποτελέσματα χημικών προσδιορισμών.

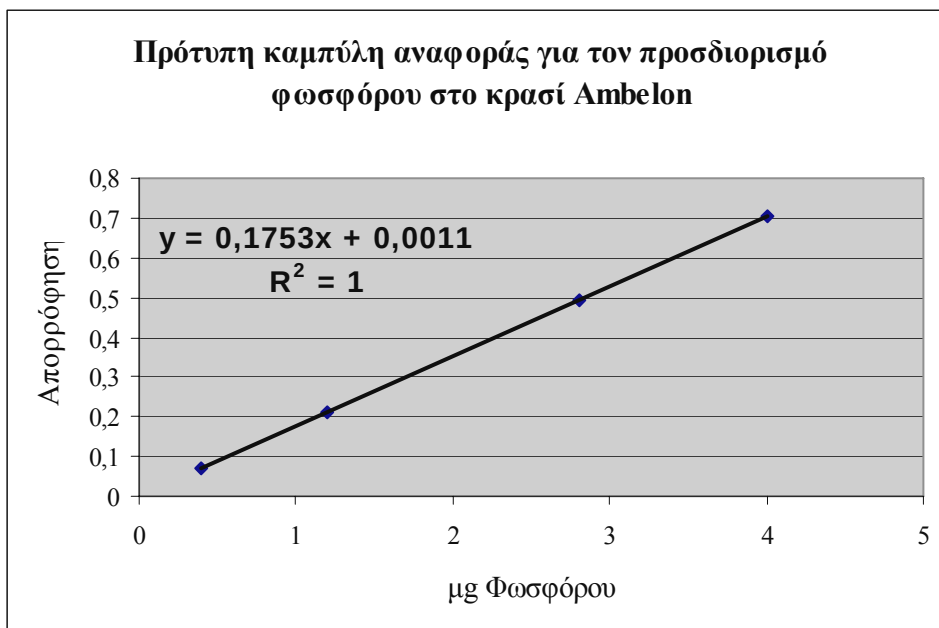
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί, με σκοπό να γίνει μια πρώτη διερεύνηση της σύστασης του εκχυλίσματος των πολικών λιποειδών. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αναφέρονται παρακάτω.

7.3.1. Προσδιορισμός φωσφόρου στα πολικά λιποειδή (PL)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα P 4μg/ml, και αναλυτικά οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Απορρόφηση (A)	Συγκέντρωση Φωσφόρου (μg)
0	0
0,072	0,4
0,210	1,2
0,493	2,8
0,702	4

Συνεπώς, η πρότυπη καμπύλη για τους δυο οίνους είναι:



Για τον προσδιορισμό του φωσφόρου στα πολικά λιποειδή του Ambelon, χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας 0,6096 mg PL. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε ίση με 0,094 και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε ότι υπάρχουν 0,052995 μg φωσφόρου στο δείγμα αυτό των πολικών λιποειδών. Δηλαδή, είναι 52,99487 ng φωσφόρου / ml, ενώ ανά ml κρασιού (για τα 750 ml οίνου τύπου Ambelon) υπάρχουν 0,353299 ng φωσφόρου.

Για τον προσδιορισμό του φωσφόρου στα πολικά λιποειδή του Cabernet Sauvignon, χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας 1,1154 mg PL. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε ίση με 0,021 και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε ότι υπάρχουν 0,116239 μg φωσφόρου στο δείγμα αυτό των πολικών λιποειδών. Δηλαδή, είναι 11,62393 ng φωσφόρου / ml, ενώ ανά ml κρασιού (για τα 750 ml οίνου τύπου Cabernet Sauvignon) υπάρχουν 0,077493 ng φωσφόρου.

- Πιο συγκεκριμένα, τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7.3.: Αποτελέσματα του προσδιορισμού φωσφόρου στα δείγματα PL στους δυο οίνους.

	μg P	ng P / ml PL	ng P / ml κρασιού
Ambelon	0,529949	52,99487	0,353299
Cabernet Sauvignon	0,116239	11,62393	0,077493

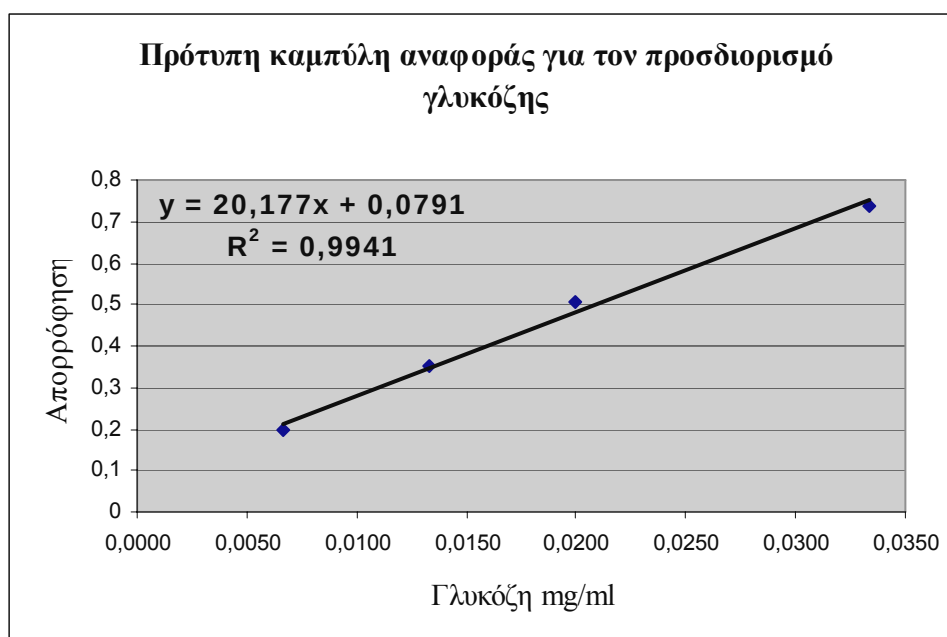
7.3.2. Προσδιορισμός σακχάρων στα πολικά λιποειδή (PL)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης 15mg/ml, και αναλυτικά οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Απορρόφηση (A)	Συγκέντρωση (mg/ml)	μg γλυκόζης
0,199	0,0067	30
0,352	0,0133	60
0,506	0,0200	90
0,739	0,0333	150

Τα σάκχαρα που μετρήθηκαν στα δείγματα, εκφράστηκαν ων μg γλυκόζης.

Συνεπώς, η πρότυπη καμπύλη για τους δυο οίνους είναι:



Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στα πολικά λιποειδή του Ambelon, χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας 0,6096 mg PL. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε ίση με 0,216 και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίσθηκε ότι υπάρχουν 0,0068 mg γλυκόζης /ml στο διάλυμα πολικών λιποειδών που φωτομετρήθηκε. Δηλαδή, είναι 3,0532 mg γλυκόζης/ml στο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό, άρα υπολογίζεται ότι είναι 15,2661 mg γλυκόζης / ml συνολικού δείγματος PL (στα 5 ml δείγματος συνυπολογιζομένου του διαλύτη), ενώ ανά ml κρασιού (για τα 750 ml οίνου τύπου Ambelon) υπάρχουν τελικά 0,0204 mg γλυκόζης.

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στα πολικά λιποειδή του Cabernet Sauvignon, χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας 1,1154 mg PL. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε ίση με 0,406 και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκε ότι υπάρχουν 0,0162 mg γλυκόζης /ml στο διάλυμα πολικών λιποειδών που φωτομετρήθηκε. Δηλαδή, είναι 7,2907mg/ml στα 10 μl που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό, άρα είναι 36,4536 mg γλυκόζης / ml συνολικού δείγματος PL (στα 5 ml δείγματος συνυπολογιζομένου του διαλύτη), ενώ ανά ml κρασιού (για τα 750 ml οίνου τύπου Cabernet Sauvignon) υπάρχουν τελικά 0,0486 mg γλυκόζης.

- Πιο συγκεκριμένα, τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7.4.: Αποτελέσματα του προσδιορισμού σακχάρων στα δείγματα PL στους δυο οίνους.

	mg γλυκόζης/ml δ/τος	mg γλυκόζης/ml (στο δείγμα των 5 ml δ/τη + PL)	mg γλυκόζης/ml κρασιού
Ambelon	0,0068	15,2661	0,0204
Cabernet Sauvignon	0,0162	36,4536	0,0486

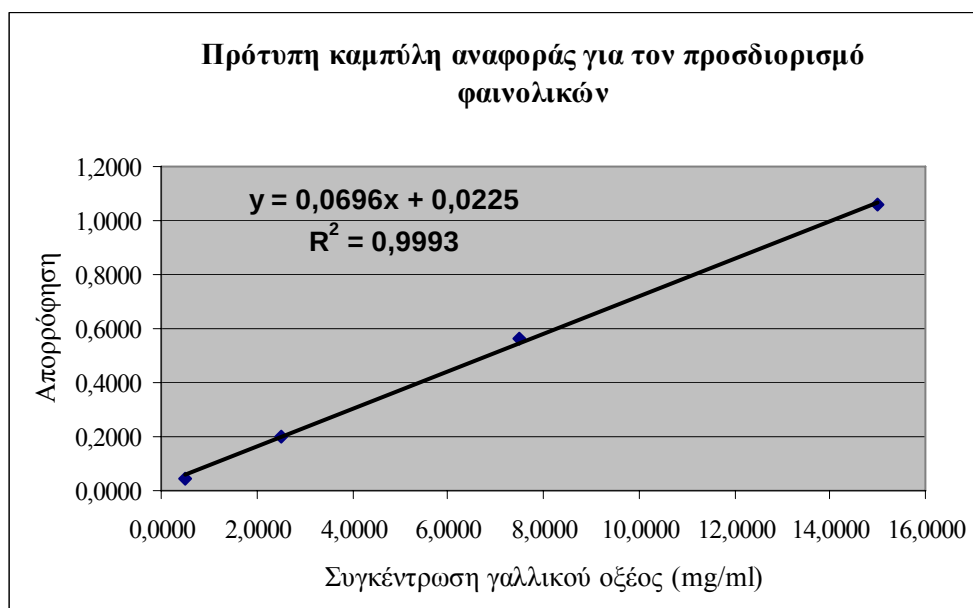
7.3.3. Προσδιορισμός φαινολικών στα πολικά λιποειδή (PL)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τυροσόλης 1mg/ml, και αναλυτικά οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Απορρόφηση (A)	Συγκέντρωση (mg/ml)
0,046	0,50
0,2	2,50
0,56	7,50
1,058	15,00

Τα ολικά φαινολικά που μετρήθηκαν στο δείγμα, έχουν εκφραστεί ως mg/ml τυροσόλης.

Συνεπώς, η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τους δυο οίνους είναι:



Για τον προσδιορισμό των φαινολικών στα πολικά λιποειδή του Ambelon, χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας 0,9144 mg PL. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε ίση με 0,334 και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκε ότι υπάρχουν 4,4756 mg τυροσόλης/ml του διαλύματος που φωτομετρήθηκε. Δηλαδή, είναι 1193,4866mg τυροσόλης/ ml στο δείγμα PL που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό, άρα είναι 5,9674g τυροσόλης στο συνολικό δείγμα PL (στα 5 ml δείγματος συνυπολογιζομένου του διαλύτη), ενώ ανά ml κρασιού (για τα 750 ml οίνου τύπου Ambelon) υπάρχουν τελικά 0,0080mg τυροσόλης.

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών στα πολικά λιποειδή του Cabernet Sauvignon, χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας 1,1154mg PL. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε ίση με 0,518 και μέσω της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκε ότι υπάρχουν 7,1193 mg τυροσόλης/ml του διαλύματος που φωτομετρήθηκε. Δηλαδή, είναι 2847,7011mg τυροσόλης/ ml στο δείγμα PL που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό, άρα είναι 14,2385g τυροσόλης στο συνολικό δείγμα PL (στα 5 ml δείγματος συνυπολογιζομένου του διαλύτη), ενώ ανά ml κρασιού (για τα 750 ml οίνου τύπου Cabernet Sauvignon) υπάρχουν τελικά 0,0190mg τυροσόλης.

- Πιο συγκεκριμένα, τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7.5.: Αποτελέσματα του προσδιορισμού φαινολικών στα δείγματα PL στους δύο οίνους.

	g τυροσόλης /ml	mg τυροσόλης φαινολικών/ml κρασιού
Ambelon	5,9674	0,0080
Cabernet Sauvignon	14,2385	0,0190

⇒ Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα των χημικών προσδιορισμών στους δύο οίνους, παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 7.6.: Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων των χημικών προσδιορισμών στα δείγματα των PL των δύο οίνων.

Χημικοί Προσδιορισμοί	Ambelon	Cabernet Sauvignon
	/ml κρασιού	/ml κρασιού
Φώσφορος (ng)	0,353299	0,077493
Σάκχαρα (mg γλυκόζης)	0,0204	0,0486
Φαινολικές ενώσεις (mg τυροσόλης)	0,0080	0,0190

7.4. Αποτελέσματα Βιολογικής δοκιμασίας *in vitro* σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Με σκοπό να εξετασθεί η βιολογική δραστηριότητα των κλασμάτων των λιποειδών των οίνων Ambelon και Cabernet Sauvignon, μελετήθηκε η βιολογική τους δράση σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Ειδικότερα, εξετάστηκε η ικανότητά τους είτε να προκαλούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, είτε να αναστέλλουν την επαγόμενη από PAF συσσώρευση τους.

Στις ποσότητες που δοκιμάστηκαν, κανένα κλάσμα λιποειδών δεν προκάλεσε τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Για τα πειράματα αυτά, της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, πριν από την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα – PAF –, προστίθενται διαφορετικές ποσότητες του εξεταζόμενου (για αναστολή) δείγματος, δηλ. των TL, NL, PL. Μετά από επώαση για 1min με το κάθε δείγμα, προστίθεται PAF $0,4 \times 10^{-10}$ μl που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων (8 – 8,7 cm). Υπολογίζεται το ποσοστό της επαγόμενης από τον PAF

συσσώρευσης αιμοπεταλίων για κάθε συγκέντρωση δείγματος, σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης και σαν τιμή IC₅₀ ορίζεται εκείνη η ποσότητα του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης.

Για τα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες από το κάθε δείγμα* :

- Ambelon: 0,006934mg TL, Cabernet Sauvignon: 0,010833mg TL (οι ποσότητες αυτές των λιποειδών αντιστοιχούν σε 7,5ml οίνου - για τον κάθε οίνο),
- Ambelon: 0,006096mg PL, Cabernet Sauvignon: 0,011154mg PL (οι ποσότητες αυτές των λιποειδών αντιστοιχούν σε 14,25ml οίνου - για τον κάθε οίνο),
- Ambelon: 0,00021mg NL, Cabernet Sauvignon: 0,00035mg NL (οι ποσότητες αυτές των λιποειδών αντιστοιχούν σε 249,37ml οίνου - για τον κάθε οίνο),

Οι ποσότητες αυτές στη συνέχεια, αναδιαλύθηκαν σε 200μl δ/τος BSA.

* Οι παραπάνω ποσότητες ισχύουν και για τους δυο τύπους οίνου που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Επίσης, πρέπει να σημειώσουμε πως κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καταστράφηκε το δείγμα που περιείχε τα ουδέτερα λιποειδή του ερυθρού οίνου Cabernet Sauvignon (NL_{Cab. Sauv.})

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

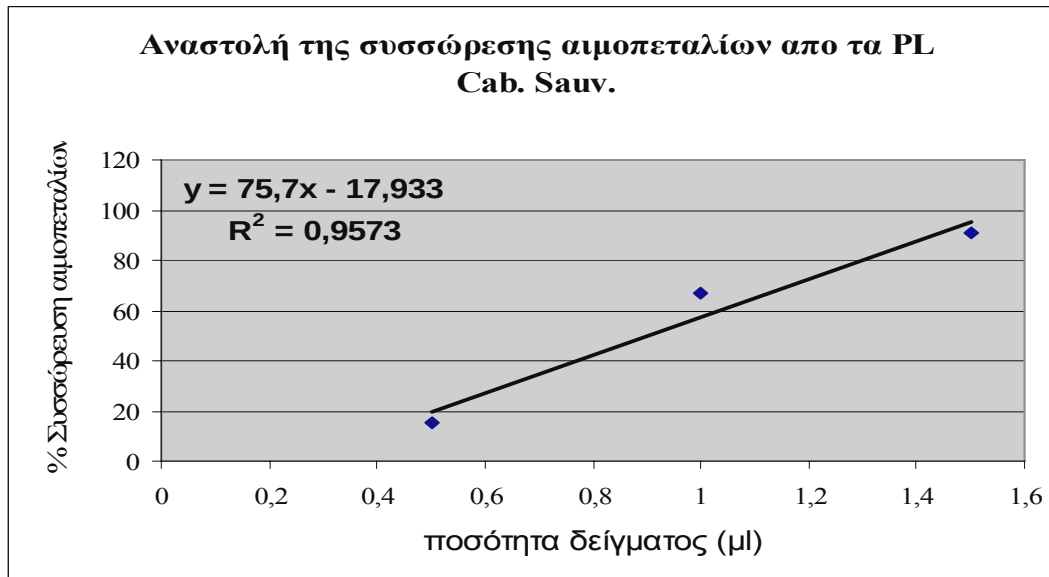
Πίνακας 7.7.: Αναλυτικά αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας.

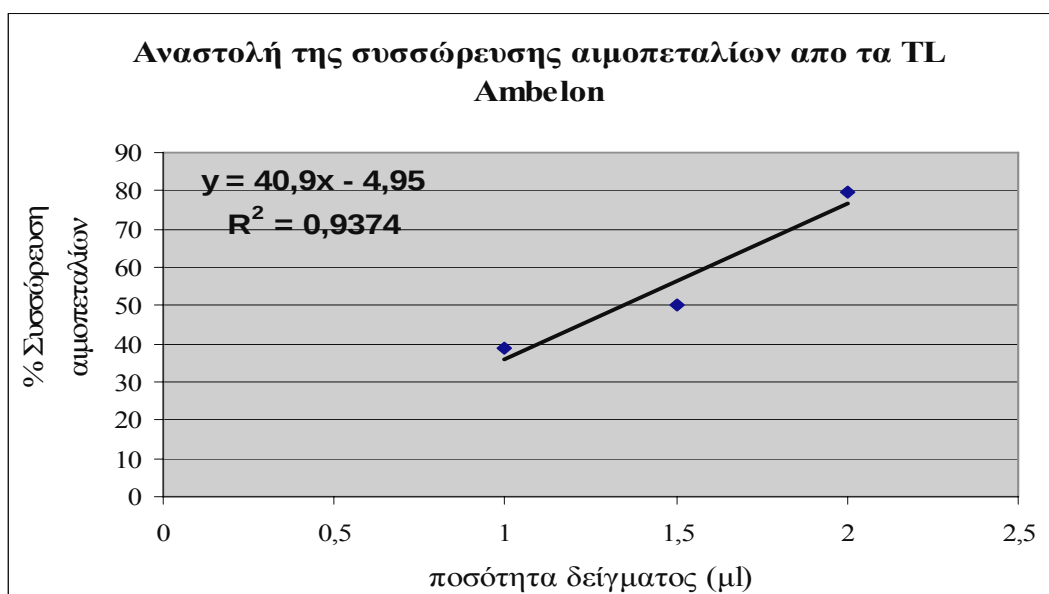
Δείγμα	Ποσότητα (μl BSA)	% Αναστολή	IC ₅₀ (μl BSA)	ml οίνου που προκαλεί αναστολή στο IC ₅₀
TL Cab. Sauv.	1	51,4	0,9813	0,0368
	0,5	14		
PL Cab. Sauv.	0,5	15,3	0,8974	0,0639
	1	67		
	1,5	91		
TL Ambelon	1	39	1,3435	0,0504
	1,5	50,3		
	2	79,9		
PL Ambelon	1	49	1,0204	0,0727
	1,5	73,5		
NL Ambelon	40	26,4	50,0756	62,4367
	66	87,3		

Παρατηρούμε, λοιπόν, εύκολα πως τόσο στον ερυθρό οίνο όσο και στον λευκό, τα ολικά λιποειδή είναι ισχυρότεροι αναστολείς της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα PL δρουν σε παρόμοια τάξη μεγέθους σε αντίθεση με τα ουδέτερα λιποειδή. Άρα, το δραστικό κλάσμα είναι αυτό των πολικών λιποειδών.

Επίσης, μεταξύ των δύο οίνων φαίνεται πως ο ερυθρός είναι ισχυρότερος αναστολέας, ενάντια στην επαγόμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αφού απαιτούνται μικρότερες ποσότητες (από τα TL αλλά και τα PL) από τον οίνο αυτό ώστε να ανασταλεί η συσσώρευση στο IC₅₀, σε αντίθεση με τις πιο μεγάλες ποσότητες των αντίστοιχων λιποειδών του λευκού οίνου που απαιτούνται για την ίδια λειτουργία.

Στη συνέχεια, παρατίθενται ενδεικτικά κάποια από τα διαγράμματα με βάση τα οποία υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κάθε δείγματος που προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο 50% (IC₅₀).





7.5. Αποτελέσματα της επίδρασης πολικών λιποειδών (PL) οίνων στην έκκριση κυτταροκινών σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων

Τα δείγματα των πολικών λιποειδών διαλύθηκαν σε DMSO για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες δειγμάτων: (α) Από το λευκό οίνο Ambelon χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες PL: 0,200μg/ml και 0,0200μg/ml, (β) Από το κρασί Cabernet Sauvignon χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες PL: 0,20μg/ml, 0,020μg/ml και 0,0020μg/ml.

7.5.1. Επίδραση των πολικών λιποειδών (PL) οίνων στην έκκριση της κυτταροκίνης IL – 6 σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία η οποία περιγράφεται συνοπτικά ως εξής: Στη φάση όπου τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί τόσο ώστε να καλύπτουν περίπου μεταξύ του 80 – 90% της επιφάνειας του δοχείου που τα περιέχει, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία 5 ng/ml IL-1β, διαλυμένης σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA. Στο τέλος του χρόνου επώασης συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, στα 500 x g

και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6, ενώ στα κύτταρα έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

Η εξέταση της επίδρασης των πολικών λιποειδών των δύο οίνων στην έκκριση της IL – 6, από τα μεσαγγειακά κύτταρα, έγινε ως εξής:

A) Συνεπώαση

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες: **(α)** μόνο με την παρουσία του διαλύτη των εκχυλισμάτων (DMSO), **(β)** μόνο με την παρουσία των εκχυλισμάτων στις προαναφερθείσες ποσότητες, **(γ)** μόνο με την παρουσία IL-1β (5ng/ml), **(δ)** με την παρουσία των εκχυλισμάτων των PL και της IL-1β.

B) Προεπώαση

Τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 24 ώρες **(α)** μόνο με την παρουσία του διαλύτη (DMSO), **(β)** μόνο με την παρουσία των διαφορετικών ποσοτήτων των εκχυλισμάτων, και στη συνέχεια επώαστηκαν για 6 ώρες είτε σε σκέτο SFM (δείγματα αναφοράς), είτε με IL-1β 5ng/ml.

Συγκεντρώσεις: Για την κάθε συνθήκη στην οποία χρησιμοποιήθηκε δείγμα λιποειδών, οι τελικές συγκεντρώσεις των πολικών λιποειδών στο θρεπτικό υλικό είναι:

Ambelon → $WW_1 = 0,2\mu\text{g/ml}$, $WW_2 = 0,02\mu\text{g/ml}$

Cabernet Sauvignon → $RW_1 = 0,2\mu\text{g/ml}$, $RW_2 = 0,02\mu\text{g/ml}$, $RW_3 = 0,002\mu\text{g/ml}$

Επαναλήψεις: Για την κάθε συνθήκη, πραγματοποιήθηκαν διπλά δείγματα κυττάρων και διπλές μετρήσεις στην ELISA (δηλ. x2 x2 ELISA). Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σαν μέση τιμή των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν για την κάθε μια συνθήκη.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των PL του κάθε οίνου στην έκκριση IL – 6 (κανονικοποιημένα ως προς τον αριθμό των κυττάρων, έτσι όπως αυτός υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford) παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7.8.) ενώ παρουσιάζονται και διαγραμματικά (διαγράμματα 7.1. – 7.4.).

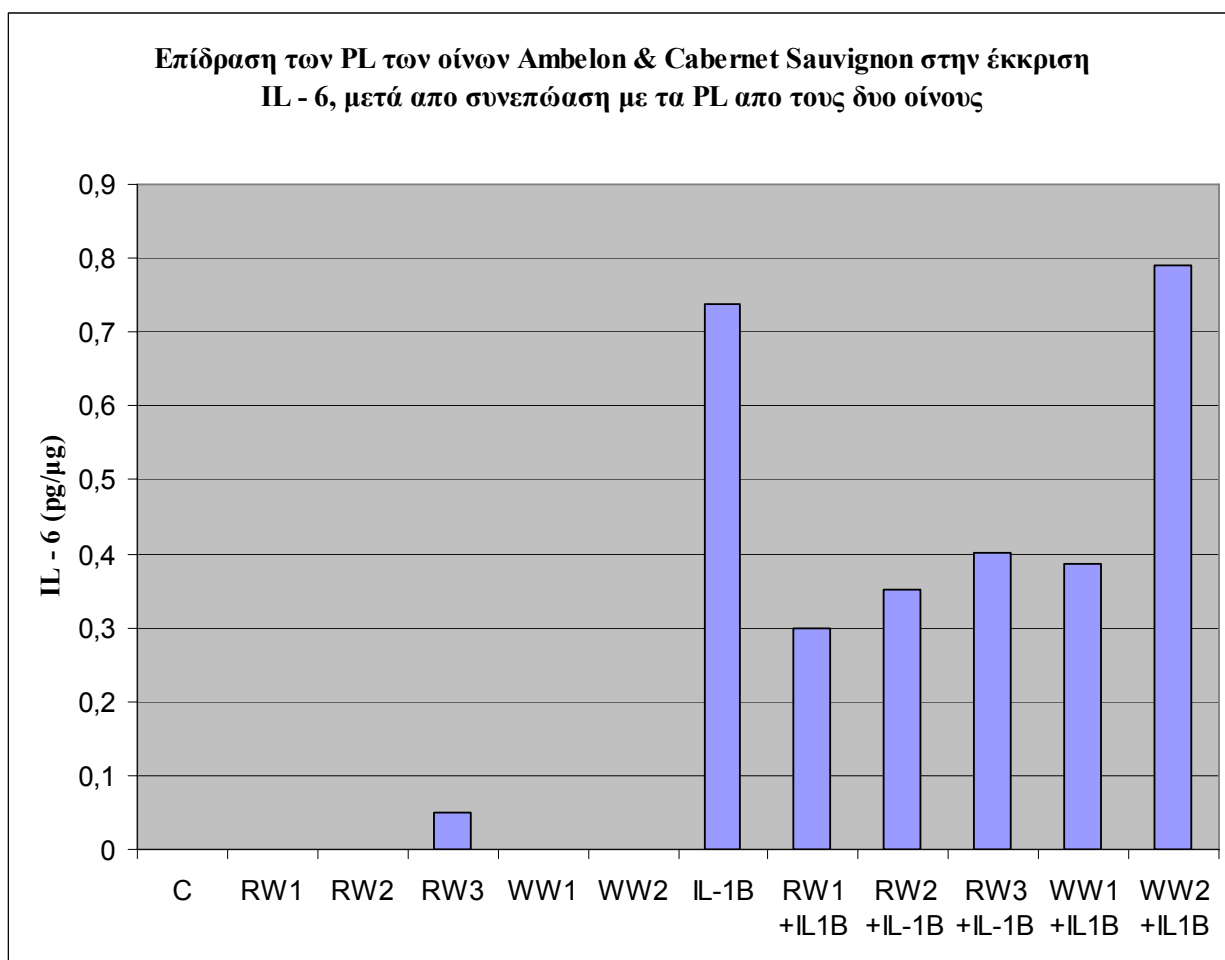
Πίνακας 7.8.: Επίδραση των πολικών λιποειδών (PL) οίνων στην έκκριση IL – 6 σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων

Δείγμα	Παραγωγή IL – 6 (pg/mg)		%μεταβολή IL – 6	
	Συνεπώαση	Προεπώαση	Συνεπώαση	Προεπώαση
C	0	0	-	-
IL – 1β	0,7369	0,3700	100	100
RW 1	0	0	0	0
RW 2	0	0	0	0
RW 3	0,0505	0	5,05	0
WW 1	0	0	0	0
WW 2	0	0	0	0
*RW 1 + IL – 1β	0,2982	0,3924	40,5 (↓59,53%)	106,05 (↑6,05%)
*RW 2 + IL – 1β	0,3517	0,3163	47,74 (↓52,26%)	85,51 (↓14,51%)
*RW 3 + IL – 1β	0,4002	0,5975	55,3 (↓45,7%)	161,48 (↑61,48%)
*WW 1 + IL – 1β	0,3863	0,2822	52,42 (↓47,58%)	76,28 (↓23,71%)
*WW 2 + IL – 1β	0,7915	0,4640	107,4 (↑7,4%)	125,4 (↑25,4%)

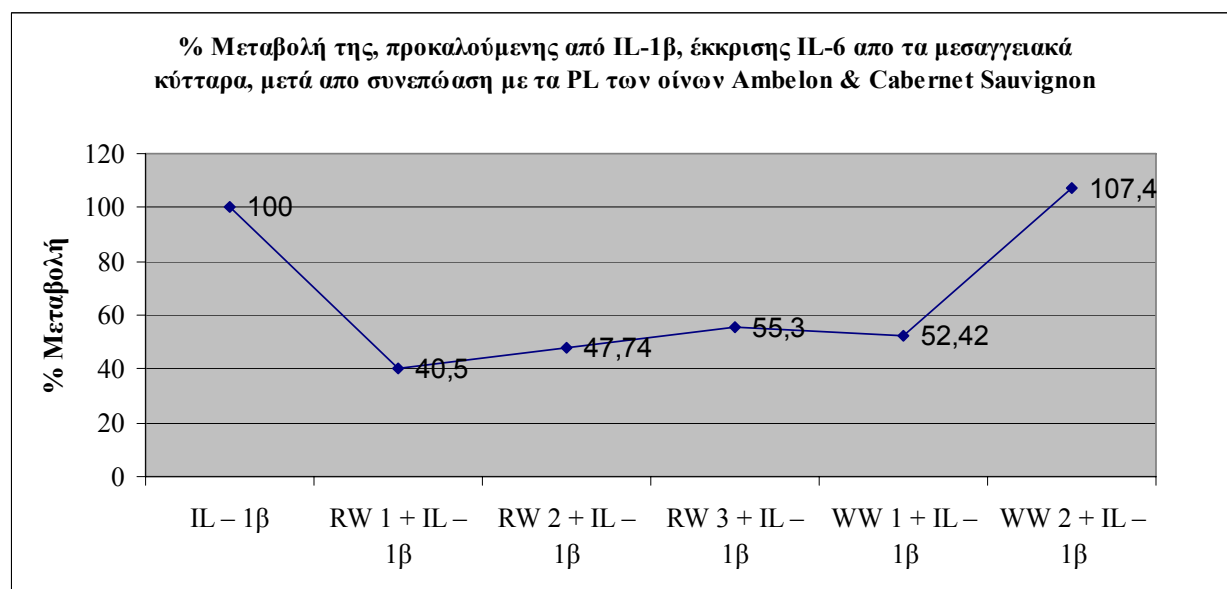
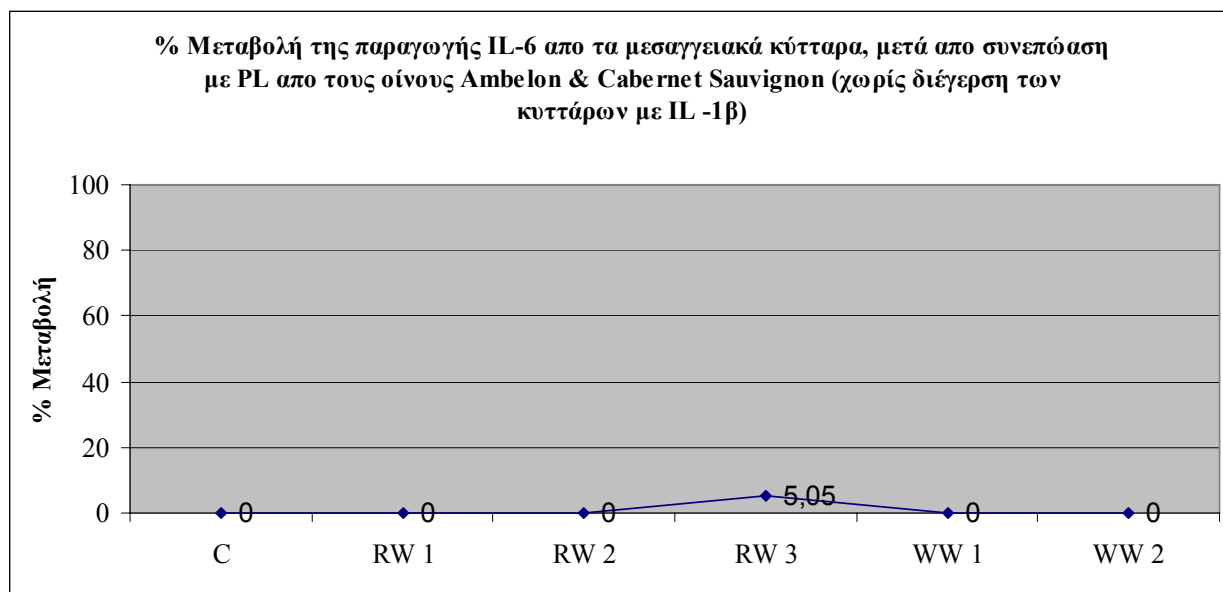
* Το % της μεταβολής είναι σε σχέση με τη δράση της IL-1β

Α) Συνεπώαση

Διάγραμμα 7.1.



Διάγραμμα 7.2.



Από τα παραπάνω διαγράμματα (διάγραμμα 7.1. – 7.2.) όπου απεικονίζεται η έκκριση IL-6 από τα μεσαγγειικά κύτταρα μετά από τη συνεπώαση τους για 6 ώρες με διαφορετικές ποσότητες πολικών λιποειδών ερυθρού και λευκού οίνου και με την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-1β, φαίνεται πως :

- (α) Τα μεσαγγειικά κύτταρα από μόνα τους (δείγμα ελέγχου), χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα δεν εκκρίνουν IL-6.
- (β) Τα κύτταρα που επώαστηκαν με τις διαφορετικές ποσότητες των πολικών λιποειδών (χωρίς διέγερση τους με IL-1β) δε φάνηκε να εκκρίνουν IL-6 όπως και συνέβη και στο δείγμα ελέγχου. Μοναδική εξαίρεση στην περίπτωση αυτή, ήταν η αραιότερη ποσότητα πολικών λιποειδών

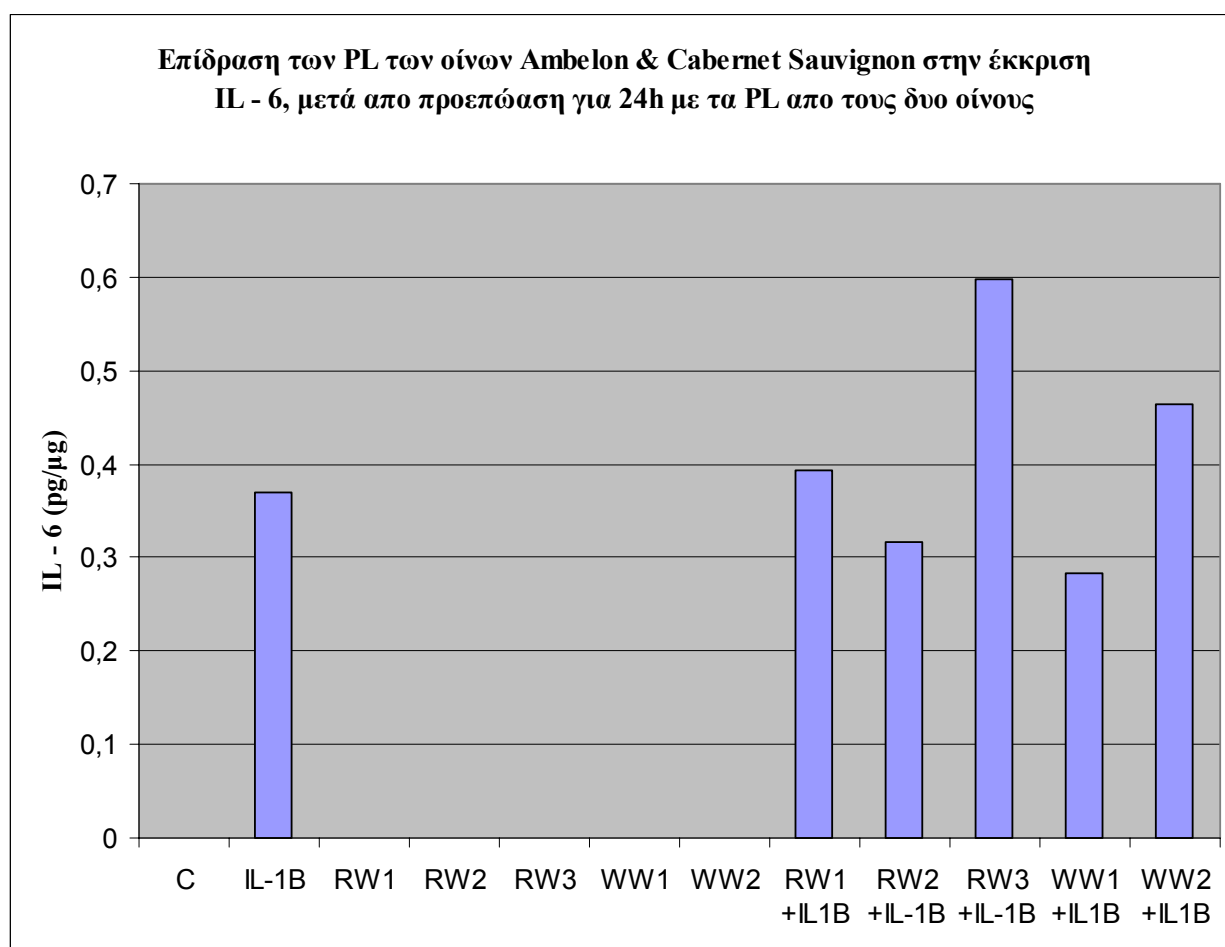
ερυθρού οίνου (0,002μg PL /ml), η οποία φάνηκε ικανή να προκαλέσει μια πολύ μικρή αύξηση από της έκκρισης IL-6 από τα κύτταρα κατά 5,05% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

(γ) Όταν τα μεσαγγειακά κύτταρα διεγέρθηκαν με IL-1β αυξήθηκε κατά 73,69% η έκκριση IL-6 σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

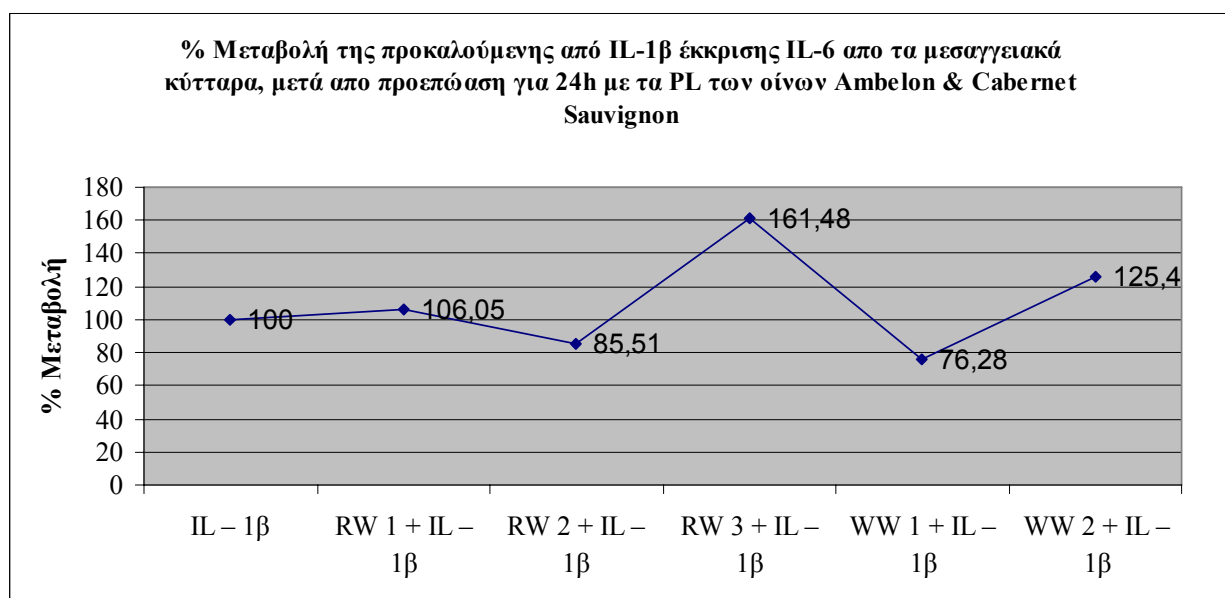
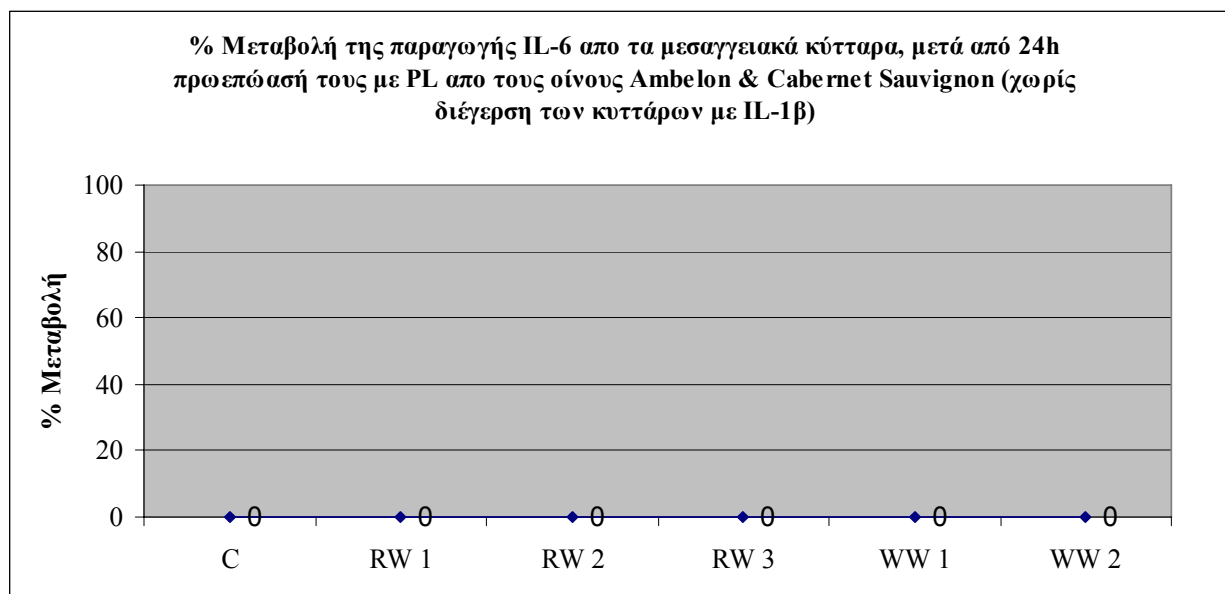
Σημαντικό εύρημα ήταν πως κατά τη συνεπώαση των μεσαγγειακών κυττάρων με πολικά λιποειδή οίνου, η προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6 μειώνεται. Μάλιστα φάνηκε πως όσο πιο πυκνά ήταν τα δείγματα των πολικών λιποειδών και των δύο οίνων, τόσο πιο μεγάλη ήταν και η αναστολή της έκκρισης IL-6 από τα κύτταρα. Εξάιρεση στα παραπάνω ευρήματα αποτέλεσε μόνο η αραιότερη ποσότητα (0,02μg PL/ml) πολικών λιποειδών του λευκού οίνου Ambelon, η οποία δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την έκκριση IL-6, σε σχέση με τη βασική έκκριση της συγκεκριμένης κυτταροκίνης από τα κύτταρα μετά από διέγερσή τους με IL-1β.

B) Προεπώαση

Διάγραμμα 7.3.



Διάγραμμα 7.4.



Από τα τελευταία διαγράμματα (διάγραμμα 7.3. – 7.4.), που απεικονίζουν την έκκριση IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα μετά από προεπώασή τους για 24 ώρες με διαφορετικές ποσότητες πολικών λιποειδών ερυθρού και λευκού οίνου και με 5ng/ml της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β, φαίνεται ότι:

- (α) Τα μεσαγγειακά κύτταρα από μόνα τους, χωρίς να διεγερθούν από κάποιον παράγοντα, δεν εκκρίνουν IL-6 (όπως είχε φανεί εξάλλου και στο προηγούμενο πείραμα της συνεπώασης).
- (β) Όταν τα μεσαγγειακά κύτταρα επωαστούν για 24 ώρες με πολικά λιποειδή οίνου, δεν παρατηρείται αύξηση της έκκρισης IL-6 από αυτά.
- (γ) Όταν τα μεσαγγειακά κύτταρα διεγέρθηκαν με IL-1β παράγαγαν IL-6.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σε ποσότητα 0,02μg/ml PL από τον ερυθρό και 0,2μg/ml PL από το λευκό οίνο, τα εκχυλίσματα αυτά, προκαλούν μια μικρή μείωση της επαγόμενης από IL-1β έκκρισης IL-6, ενώ σε μικρότερες ποσότητες προκαλούν ενίσχυση της δράσης της IL-1β.

7.5.2. Επίδραση των πολικών λιποειδών (PL) οίνων στην έκκριση της χημειοκίνης MCP – 1 σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία η οποία περιγράφεται συνοπτικά ως εξής: Στη φάση όπου τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί τόσο ώστε να καλύπτουν περίπου μεταξύ του 80 – 90% της επιφάνειας του δοχείου που τα περιέχει, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία 5 ng/ml IL-1β, διαλυμένης σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA. Στο τέλος του χρόνου επώασης συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της MCP – 1, ενώ στα κύτταρα έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg MCP – 1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

Η εξέταση της επίδρασης των πολικών λιποειδών των δύο οίνων στην έκκριση MCP-1, από τα μεσαγγειακά κύτταρα, έγινε ως εξής:

A) Συνεπώαση

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες: **(α)** μόνο με την παρουσία του διαλύτη των εκχυλισμάτων (DMSO), **(β)** μόνο με την παρουσία των εκχυλισμάτων στις προαναφερθείσες ποσότητες, **(γ)** μόνο με την παρουσία IL-1β (5ng/ml), **(δ)** με την παρουσία των εκχυλισμάτων των PL και της IL-1β.

B) Προεπώαση

Τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 24 ώρες **(α)** μόνο με την παρουσία του διαλύτη (DMSO), **(β)** μόνο με την παρουσία των διαφορετικών ποσοτήτων των εκχυλισμάτων, και στη συνέχεια επώαστηκαν για 6 ώρες είτε σε σκέτο SFM (δείγματα αναφοράς), είτε με IL-1β 5ng/ml.

Συγκεντρώσεις: Για την κάθε συνθήκη στην οποία χρησιμοποιήθηκε δείγμα λιποειδών, οι τελικές συγκεντρώσεις των πολικών λιποειδών στο θρεπτικό υλικό είναι:

Ambelon → $WW_1 = 0,2\mu\text{g/ml}$, $WW_2 = 0,02\mu\text{g/ml}$

Cabernet Sauvignon → $RW_1 = 0,2\mu\text{g/ml}$, $RW_2 = 0,02\mu\text{g/ml}$, $RW_3 = 0,002\mu\text{g/ml}$

Επαναλήψεις: Για την κάθε συνθήκη, πραγματοποιήθηκαν διπλά δείγματα κυττάρων και διπλές μετρήσεις στην ELISA (δηλ. x2 x2 ELISA). Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σαν μέση τιμή των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν για την κάθε μια συνθήκη.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των PL του κάθε οίνου στην έκκριση MCP – 1 (κανονικοποιημένα ως προς τον αριθμό των κυττάρων, έτσι όπως αυτός υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford) παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7.9.) ενώ παρουσιάζονται και διαγραμματικά (διαγράμματα 7.5. – 7.8.).

Πίνακας 7.9.: Επίδραση των πολικών λιποειδών (PL) οίνων στην έκκριση MCP – 1 σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων

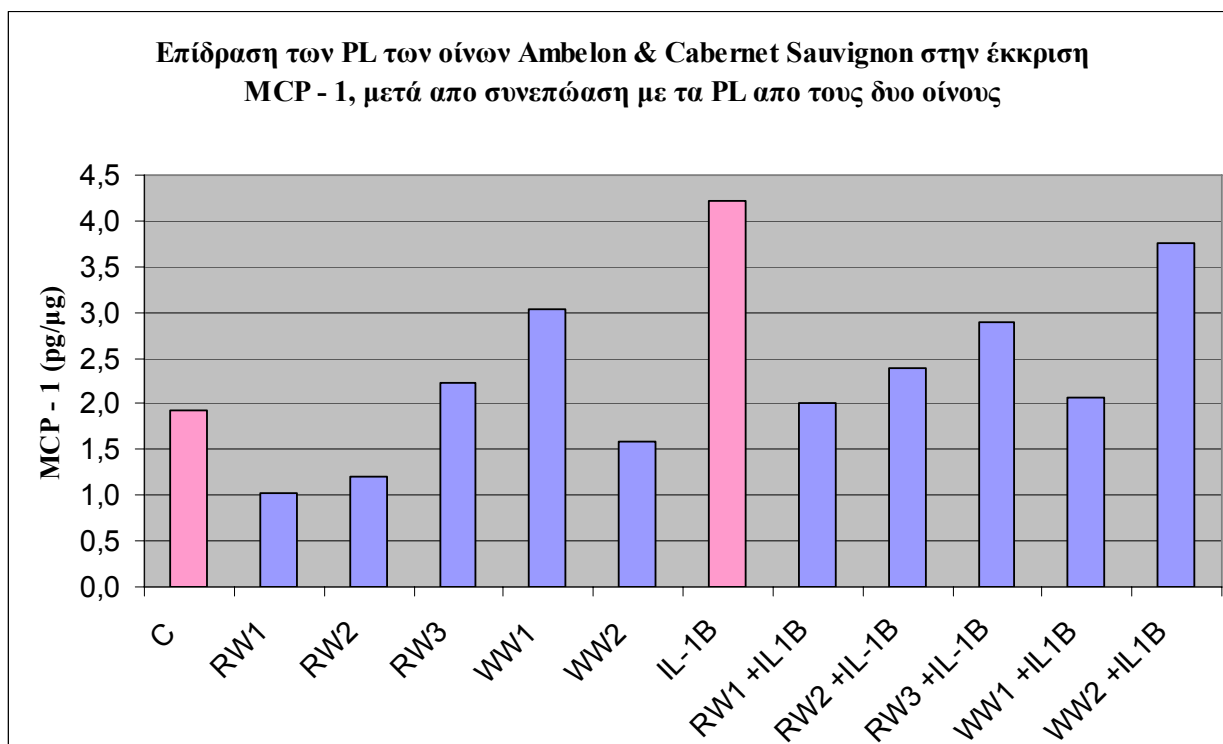
Δείγμα	Παραγωγή MCP – 1 (pg/mg)		%μεταβολή MCP – 1	
	Συνεπώαση	Προεπώαση	Συνεπώαση	Προεπώαση
C	1,9210	1,3889	-	-
IL – 1β	4,2224	2,4487	100	100
*RW 1	1,0219	1,9617	53,2 (↓46,80%)	141,24 (↑41,24%)
*RW 2	1,2056	0,9481	62,76 (↓37,24%)	68,27 (↓31,73%)
*RW 3	2,2342	1,0793	116,3 (↑16,30%)	77,7 (↓22,3%)
*WW 1	3,0265	0,9824	157,55 (↑57,55%)	70,73 (↓29,27%)
*WW 2	1,5789	1,5034	82,2 (↓17,80%)	108,24 (↑8,24%)
**RW 1 + IL – 1β	2,0125	2,8095	47,7 (↓52,33%)	114,73 (↑14,73%)
**RW 2 + IL – 1β	2,3938	1,9370	56,7 (↓43,30%)	79,10 (↓20,9%)
**RW 3 + IL – 1β	2,8980	2,9465	68,64 (↓31,36%)	120,33 (↑20,33%)
**WW 1 + IL – 1β	2,0612	1,4697	48,82 (↓51,18%)	60,02 (↓39,98%)
**WW 2 + IL – 1β	3,7591	2,5925	89,1 (↓10,97%)	105,87 (↑5,87%)

* Το % της μεταβολής είναι σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (c)

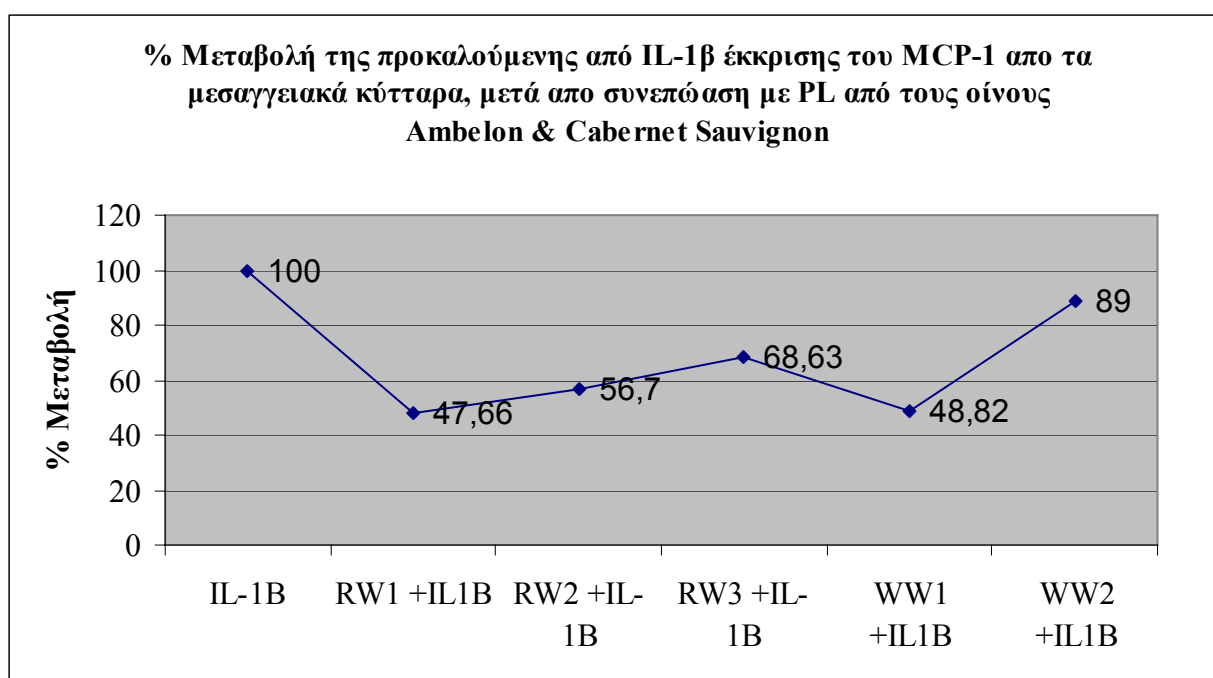
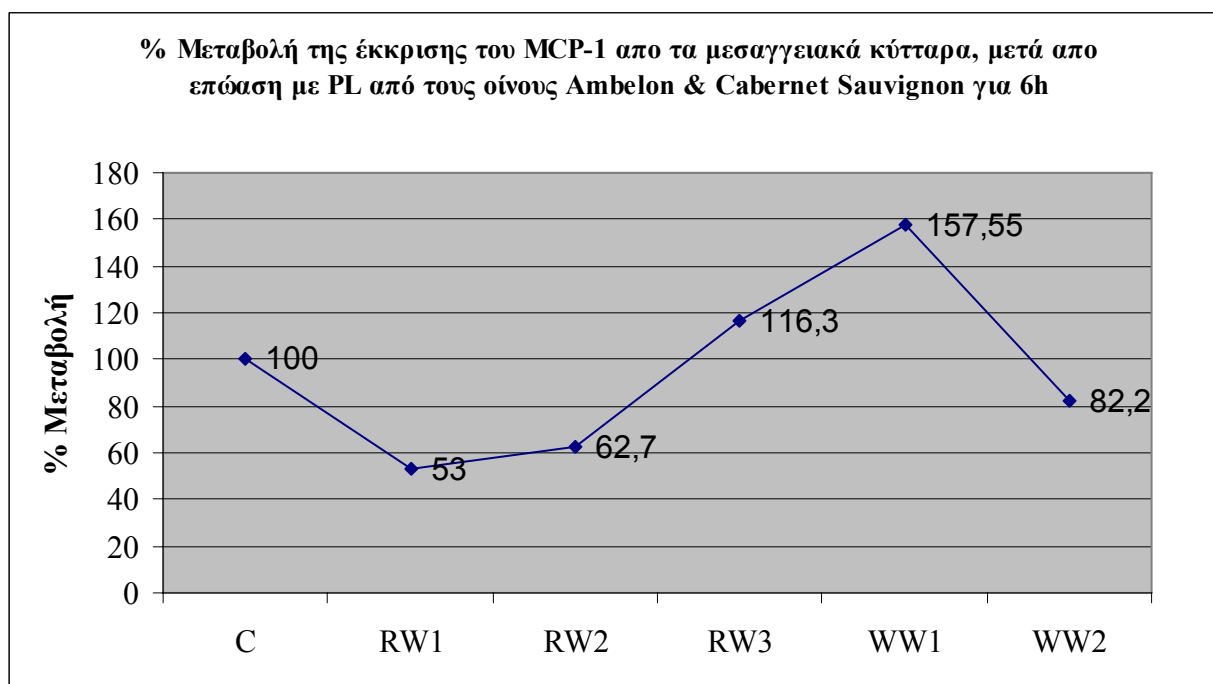
** Το % της μεταβολής είναι σε σχέση με τη δράση της IL-1β

A) Συνεπώαση

Διάγραμμα 7.5.



Διάγραμμα 7.6.



Από τα παραπάνω διαγράμματα (διάγραμμα 7.5. – 7.6.) όπου απεικονίζεται η έκκριση MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα μετά από τη συνεπώαση τους για 6 ώρες με διαφορετικές ποσότητες πολικών λιποειδών ερυθρού και λευκού οίνου και με 1μg/ml της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β, φαίνεται πως :

(α) Τα μεσαγγειακά κύτταρα από μόνα τους (δείγμα ελέγχου), χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα (IL-1β ή PL οίνου) παράγουν MCP-1.

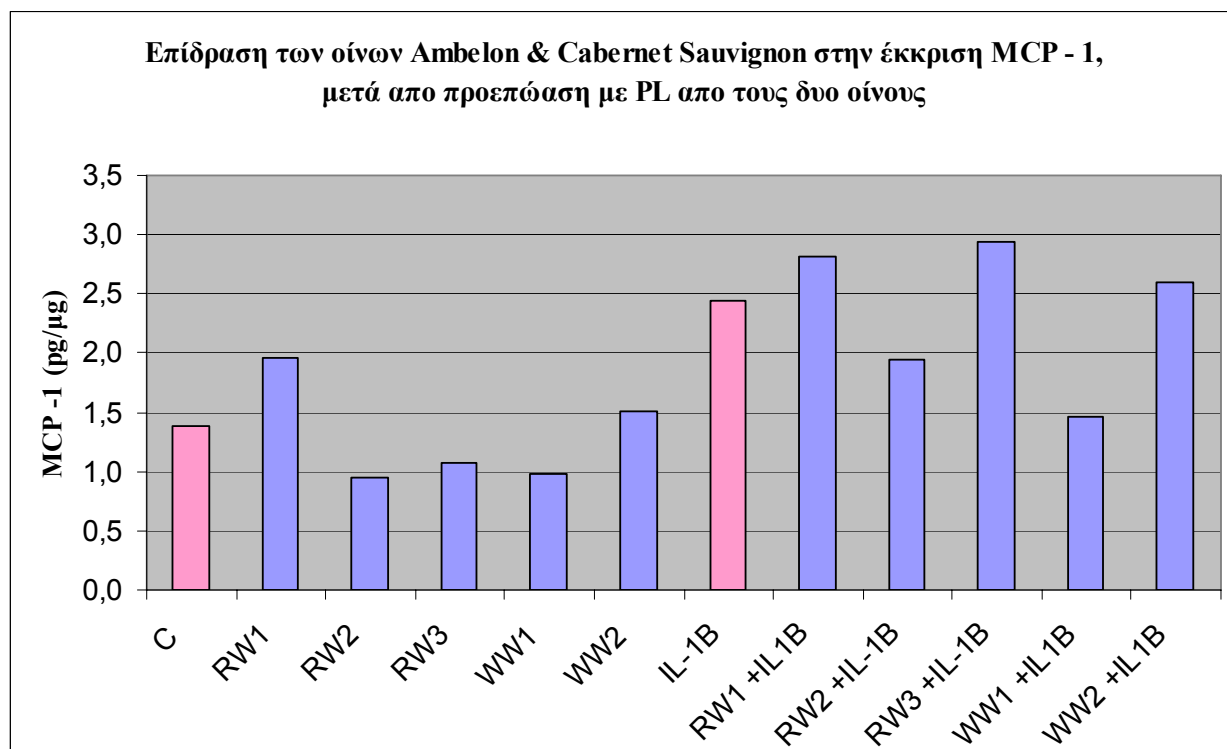
(β) Υπό την επίδραση μόνο των πολικών λιποειδών των οίνων στα κύτταρα, προκαλείται μερική αναστολή της έκκρισης MCP-1. Η αναστολή αυτή, φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη όσο αφορά τον ερυθρό οίνο, ενώ στο λευκό φαίνεται να είναι αντίστροφη η σχέση αυτή, δηλ. όσο μικρότερη είναι η ποσότητα των PL τόσο μεγαλύτερη είναι η αναστολή. Αυτό, πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το κλάσμα των PL αποτελεί μίγμα πολλών ενώσεων με αποτέλεσμα κατά την αραίωσή του να υπερισχύει η δράση των πιο δραστικών ενώσεων και να τροποποιείται η δράση του εκχυλίσματος. Μόνο σε δυο περιπτώσεις δεν παρατηρείται αναστολή: στην περίπτωση οπού τα κύτταρα συνεπώσθησαν με την αραιότερη συγκέντρωση πολικών λιποειδών ερυθρού οίνου (μικρή αύξηση της έκκρισης MCP-1), και στην περίπτωση που η συνεπώαση έγινε με την πυκνότερη συγκέντρωση πολικών λιποειδών λευκού οίνου (αύξηση της παραγόμενης από τα κύτταρα ποσότητας MCP-1 κατά 57,55% σε σχέση με τη βασική έκκριση MCP-1 όπως μετρήθηκε στο πείραμα αυτό).

(γ) Μετά από διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με IL-1β, αυτά εκκρίνουν MCP-1 και μάλιστα κατά 219,8% περισσότερη ποσότητα της χημειοκίνης αυτής σε σχέση με τα μη διεγερμένα μεσαγγειακά κύτταρα (δείγμα ελέγχου).

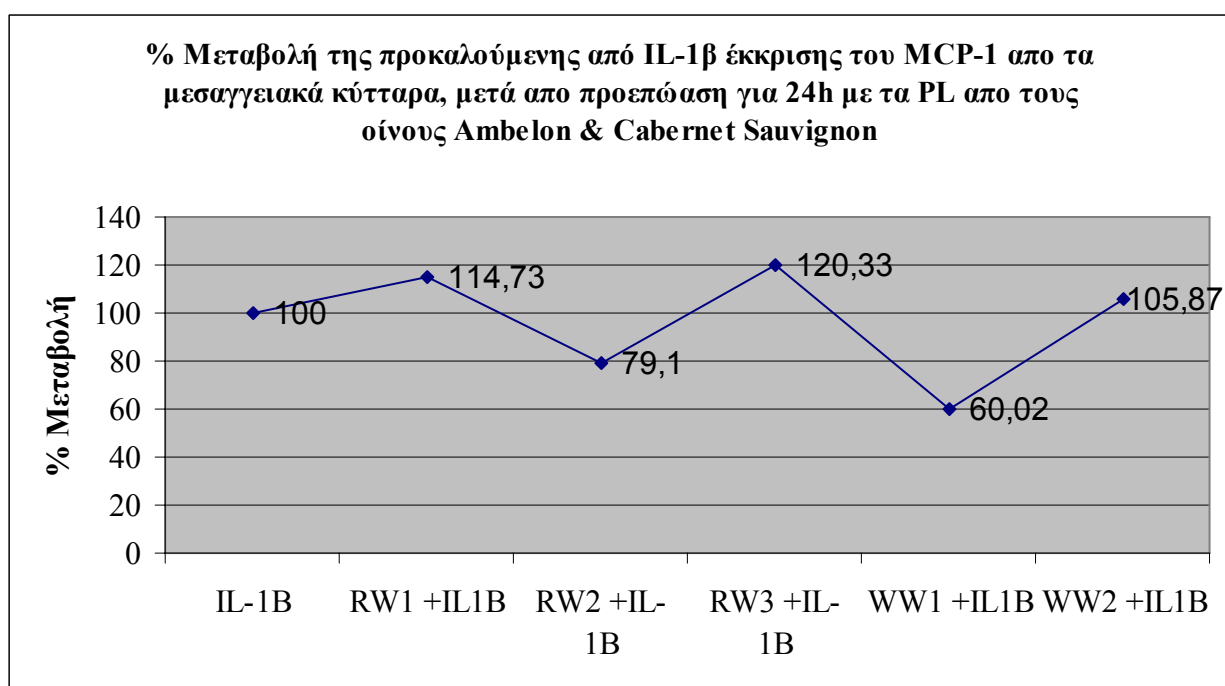
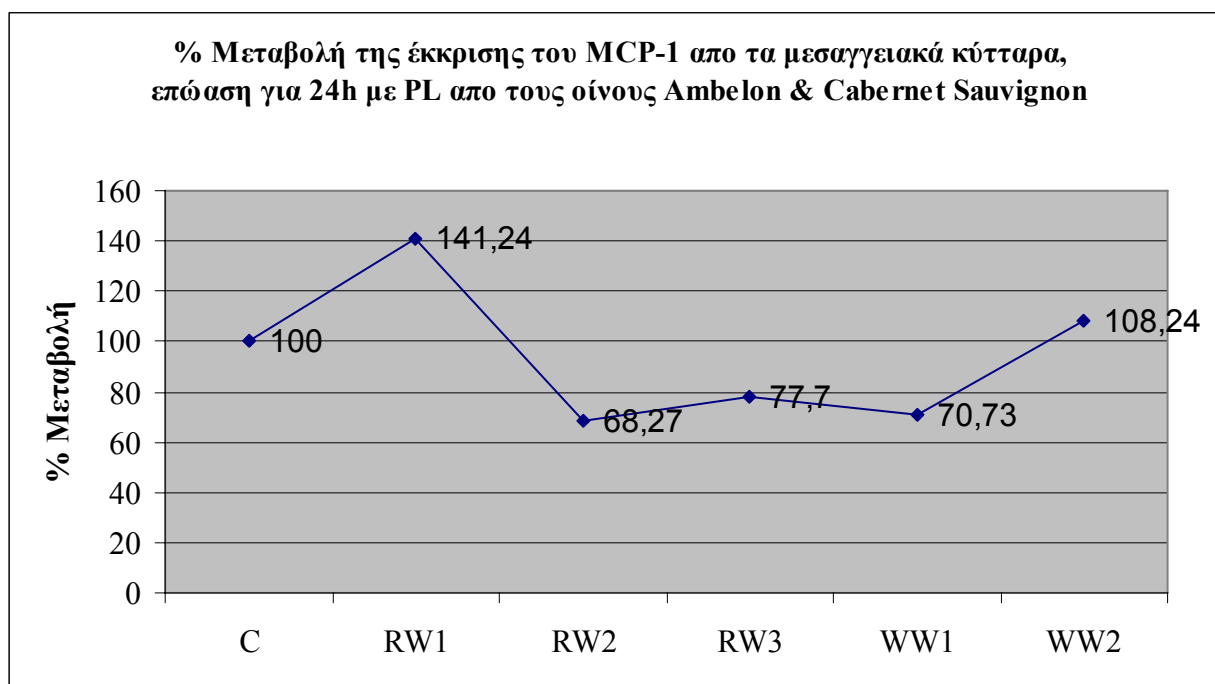
(δ) Η συνεπώαση των κυττάρων με πολικά λιποειδή ερυθρού και λευκού οίνου και με IL-1β, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης MCP-1, από τα κύτταρα, από όλα τα δείγματα PL. Μεγαλύτερη μείωση της παραγόμενης ποσότητας MCP-1 από τα κύτταρα, επήλθε υπό την επίδραση του πυκνότερου δείγματος PL από ερυθρό οίνο (↓52,33%)

Β) Προεπώση

Διάγραμμα 7.7.



Διάγραμμα 7.8.



Από τα τελευταία διαγράμματα (διάγραμμα 7.7. – 7.8.), που απεικονίζουν την έκκριση MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα μετά από προεπώασή τους για 24 ώρες με διαφορετικές ποσότητες πολικών λιποειδών ερυθρού και λευκού οίνου και με 1μg/ml της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β, φαίνεται ότι:

(α) Τα μεσαγγειακά κύτταρα από μόνα τους, χωρίς να διεγερθούν από κάποιον παράγοντα (δείγμα ελέγχου), εκκρίνουν MCP-1 (όπως είχε φανεί και στο προηγούμενο πείραμα της συνεπώασης).

(β) Μετά την επώαση των κυττάρων με τα πολικά λιποειδή του οίνου για 24 ώρες, φάνηκε πως στην πλειοψηφία τους τα PL μείωσαν την κυτταρική έκκριση MCP-1. Εξαιρέση, αποτέλεσε η αραιότερη συγκέντρωση πολικών λιποειδών του λευκού οίνου (αύξησε λίγο την έκκριση MCP-1 σε σχέση με το δείγμα ελέγχου) και η πυκνότερη συγκέντρωση πολικών λιποειδών ερυθρού οίνου (αύξησε την κυτταρική παραγωγή MCP-1 κατά 41,1% περισσότερο σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου).

(γ) Τα μεσαγγειακά κύτταρα όταν διεγέρθηκαν με IL-1β, παρήγαγαν MCP-1 και μάλιστα κατά 176% περισσότερη ποσότητα από το δείγμα ελέγχου.

(δ) Τα κύτταρα που προεπώστηκαν για 24 ώρες με PL οίνων και διεγέρθηκαν στη συνέχεια με IL-1β για 6 ώρες, παρουσίασαν διάφορα αποτελέσματα στην έκκριση MCP-1. Όσον αφορά τον ερυθρό οίνο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ποσότητα 0,002μg/ml τα PL μείωσαν σε μικρό βαθμό την έκκριση του MCP-1 ενώ οι άλλες συγκεντρώσεις προκάλεσαν μια μικρή αύξηση. Τα PL του λευκού οίνου, σε ποσότητα 0,2 μg/ml προκάλεσαν μικρή μείωση, ενώ σε μικρότερη ποσότητα σχεδόν δεν επηρέασαν την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6.

Κεφάλαιο 8^ο: Συζήτηση

Είναι πλέον δεδομένη η ευεργετική επίδραση της εφαρμογής του Μεσογειακού προτύπου διατροφής 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, την επίδραση στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και των λιπιδίων του αίματος, την πρόληψη της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και της θρόμβωσης, καθώς και την προστασία ενάντια στην καρδιακή αρρυθμία και την καρδιακή ανεπάρκεια.

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής 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.

Πλήθος ερευνών, έχουν αποδείξει την ευεργετική επίδραση του οίνου στο λιπιδαιμικό προφίλ, στη λειτουργία του ενδοθηλίου, στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στη δημιουργία θρόμβων. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες αποτελούν παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως είναι τα καρδιαγγειακά, ορισμένες νεφρικές παθήσεις και ο καρκίνος.

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.

Τα δύο συστατικά στα οποία έχει αποδοθεί μεγάλο μέρος των ευεργετικών επιδράσεων του οίνου και έχουν μελετηθεί περισσότερο από τους ερευνητές, είναι η αιθανόλη και οι φαινόλες. Η αιθανόλη έχει φανεί πως μειώνει την oxLDL και αυξάνει την HDL, ενώ μέτρια, γενικά, κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να αυξάνει τη δραστικότητα του tPA, και να μειώνει την παραγωγή ινωδογόνου, αντιθρομβίνης III, και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι φαινολικές ενώσεις από την άλλη, έχουν αντιοξειδωτικές δράσεις, περιορίζουν την οξείδωση της LDL,

δρουν εκκαθαριστικά ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής NO από το ενδοθήλιο, περιορίζουν την δραστικότητα του TF, επιδρούν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μειώνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη σύνθεση προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών παραγόντων και αναστέλλουν τη δράση διάφορων συσσωρευτικών παραγόντων όπως το ADP, ο PAF και η θρομβίνη.

Οι σπειραματικές παθήσεις είναι οι πιο κοινές παγκοσμίως και αποτελούν κύριο αίτιο πρόκλησης νεφρικής ανεπάρκειας στους ανθρώπους. Κοινό χαρακτηριστικό των παθήσεων αυτών – τις περισσότερες φορές – αποτελεί η σπειραματοσκλήρυνση. Ο όρος αυτός έχει προταθεί καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η σπειραματοσκλήρυνση και η αρτηριοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά^[232, 233, 234]. Στις ομοιότητες της αθηροσκλήρυνσης και της σπειραματοσκλήρυνσης συγκαταλέγονται ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός των λιποειδών, ο συνεχόμενος πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών ή μεσαγγειακών κυττάρων που ακολουθεί τον αρχικό τραυματισμό του ενδοθηλίου, ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, η υπερβολική απόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η νέκρωση του ιστού και τελικά η σκλήρυνση. Όπως προαναφέρθηκε, η ομοιότητα των εκδηλώσεων των δυο παθήσεων οφείλεται πιθανότατα στο ότι: (α) το σπείραμα έχει κύτταρα που ανταποκρίνονται στον τραυματισμό της αρτηρίας (*ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα του αίματος*), (β) στο γεγονός ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα ομοιάζουν των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων σε επίπεδο προέλευσης, ανατομίας, ιστοχημείας και λειτουργικότητας (*δηλ. συσταλτικότητας*) και (γ) στο ότι η βασική σπειραματική μεμβράνη έχει ικανότητα δέσμευσης των λιποπρωτεϊνών πλάσματος. Όποτε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης της αθηροσκλήρυνσης (*ως φλεγμονώδης διαδικασία*) μπορεί να βρει εφαρμογή και στην περίπτωση της σπειραματοσκλήρυνσης^[232, 233, 234].

Βασικά κύτταρα του σπειράματος είναι τα μεσαγγειακά. Τα μεσαγγειακά κύτταρα, αποτελούν κύτταρα τροποποιημένου λείου μυός τα οποία περιβάλλουν τους βρόχους των τριχοειδικών αγγείων του σπειράματος, χωρίς όμως να ανήκουν στη διηθητική οδό. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι φλεγμονώδεις μεσολαβητές (PAF, IL-1, TNF-α, MCP-1, κ.α.) μπορούν να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων τα οποία συμμετέχουν στην έναρξη και στην εξέλιξη της σπειραματικής βλάβης. Τα ενεργοποιημένα από κυτταροκίνες ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα εμφανίζουν τις ακόλουθες αλλαγές: (α) αυξάνουν σε μέγεθος, καθώς διαστέλλονται το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, αυξάνονται τα ελεύθερα ριβονώματα και πολυσώματα, (β) πολλαπλασιάζονται, (γ) αυξάνουν

την έκφραση του mRNA της IL-6 μετά από διέγερση με IL-6 ή IL-1 μαζί με IL-6, αλλά και (δ) απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες PAF και TxB₂ [235]. Οι φαινοτυπικές αυτές αλλαγές, προσομοιάζουν το ρόλο των μεσαγγειακών σε συνθήκες σπειραματοσκλήρυνσης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων για τη μελέτη των επιδράσεων των λιποειδών οίνου στην παθογένεση της σπειραματοσκλήρυνσης.

Από τις περιορισμένες μελέτες στο επίπεδο των νεφρών, ο οίνος φαίνεται να έχει θετικά αποτελέσματα στην πρόληψη νεφρικής βλάβης. Η μέτρια κατανάλωση οίνου επιδρά στην παραγωγή λιπαρών οξέων από τα νεφρά, διατηρώντας τα επίπεδα του λόγου των ω-6/ω-3 λιπαρών οξέων σε χαμηλά επίπεδα. Ταυτόχρονα, ο ερυθρός οίνος αυξάνει την HDL, προστατεύει τα νεφρά από την καταστροφή προκαλούμενη από ραβδομύλυση, και τέλος, ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των νεφρών. Επιπλέον μελέτες επισημαίνουν την ευεργετική δράση και των επιμέρους συστατικών του κρασιού. Η χορήγηση ρεσβερατρώλης, μειώνει την πίεση, τον αριθμό των σχηματισμένων θρόμβων από αιμοπετάλια, τον βαθμό νέκρωσης του ιστού αλλά και τα επίπεδα cGMP στα ούρα, παράγοντας ο οποίος είναι γνωστό ότι αυξάνει την αιματική ροή. Επίσης, σε πειραματικό μοντέλο πρόκλησης νεφρικής βλάβης από γλυκερόλη^[231], η χορήγηση ρεσβερατρώλης μειώνει τον αριθμό των μακροφάγων και λεμφοκυττάρων, την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και την κρεατινίνη του πλάσματος. Επιπρόσθετα η ρεσβερατρώλη α) μέσω ελέγχου των γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη λιποειδών συμβάλλει στην μειωμένη συγκέντρωση χοληστερόλης στα μακροφάγα, β) προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των αρτηριών από την oxLDL, και την απόπτωση. Ένα άλλο φαινολικο συστατικό του κρασιού η κερκετίνη μπορεί να αναστείλει τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* την απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων.

Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φανερώνει το μικρό αριθμό εργασιών που μελετούν την επίδραση του οίνου και των συστατικών αυτού στα νεφρά ή/και σε νεφρικές παθήσεις, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Λαμβάνοντας υπόψη, την ομοιότητα της σπειραματοσκλήρυνσης και της αθηροσκλήρυνσης, αλλά και το πλήθος των ερευνών που αφορούν τις ευεργετικές επιδράσεις του οίνου στην πρόληψη αλλά και στον περιορισμό της προόδου της αθηροσκλήρυνσης θα θεωρούσε κανείς λογικό βιολογικά δραστικά μόρια έναντι της αθηροσκλήρωσης να είναι ευεργετικά και στο επίπεδο του νεφρού. Με σκοπό να εξετασθεί αυτή η υπόθεση μελετήθηκε η επίδραση πολικών λιποειδών από λευκό και ερυθρό οίνο σε *in vitro* συνθήκες σπειραματικής

φλεγμονής. Τα εκχυλίσματα αυτά από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι περιέχουν δραστικά βιολογικά μόρια και η δομή των πιο δραστικών έχει ήδη πιστοποιηθεί. Συγκεκριμένα οι ενώσεις αυτές ανατέλλουν την προκαλούμενη από PAF ή θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Δεδομένου ότι ο PAF είναι ισχυρός φλεγμονώδης παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στην έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης τα συστατικά αυτά ασκούν αντι-φλεγμονώδη και αντι-θρομβωτική δράση προστατεύοντας έναντι της αθηροσκλήρυνσης. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η διερεύνηση των πιθανών ευεργετικών δράσεων των παραπάνω εκχυλισμάτων σε επίπεδο φλεγμονής σε νεφρικά κύτταρα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ολικών λιποειδών (TL) και διαχωρισμός σε πολικά (PL) και ουδέτερα λιποειδή (NL) από τον λευκό οίνο Ambelon (κύρια ποικιλία Ρομπόλα) και από τον ερυθρό οίνο Cabernet Sauvignon (κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κλασμάτων των λιποειδών έδειξε ο ερυθρός οίνος περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα TL (σχεδόν 70% περισσότερη μάζα). Επιπλέον και στους δυο οίνους το ποσοστό των PL ήταν πολύ μεγαλύτερο από των NL. Με σκοπό να γίνει μια αδρή ποιοτική εκτίμηση των παραπάνω εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κόκκινο κρασί περιέχει σχεδόν διπλάσια ποσότητα γλυκο-λιποειδών και φαινολικών ενώσεων, ενώ περιέχει πολύ μικρότερη ποσότητα φωσφολιποειδών σε σχέση με το λευκό κρασί. Δεδομένου ότι η ζύμωση στον ερυθρό οίνο γίνεται παρουσία των στέμφυλων σε αντίθεση με το λευκό κρασί η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι αναμενόμενη.

Με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη βιολογικά δραστικών ενώσεων στα κλάσματα των λιποειδών του ερυθρού και του λευκού οίνου, μελετήθηκε η βιολογική τους δράση σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Ειδικότερα, εξετάστηκε η ικανότητά τους είτε να προκαλούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, είτε να αναστέλλουν την επαγόμενη από PAF συσσώρευση τους. Στις ποσότητες που δοκιμάστηκαν, κανένα κλάσμα λιποειδών δεν προκάλεσε τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Αντίθετα τα κλάσματα έδειξαν να αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές IC_{50} έδειξαν ότι τα TL και των δυο οίνων προκαλούν στην ίδια τάξη μεγέθους αναστολή της δράσης του PAF. Επιπλέον η βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών οφείλεται στο κλάσμα των PL και στους δυο οίνους αφού δρουν στην ίδια τάξη μεγέθους με τα TL, ενώ το κλάσμα των NL εμφανίζει τη δράση του σε μεγαλύτερη τάξη μεγέθους. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συνάδουν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών στις ίδιες ποικιλίες οίνων αλλά και με

άλλες μελέτες που έχουν δείξει ότι το κρασί προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων από άλλους συσσωρευτικούς παράγοντες όπως το ADP^[236] ή μέσω αναστολής του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος.

Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης με σκοπό να εξετασθεί η επίδραση του δραστικού κλάσματος των λιποειδών (PL) σε επίπεδο φλεγμονής στο νεφρό χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων. Τα μεσαγγειακά κύτταρα καταλαμβάνουν κεντρικό ρόλο στο μεσάγγειο και εμπλέκονται άμεσα στην έναρξη και την εξέλιξη της σπειραματικής βλάβης. Για την προσομοίωση της φλεγμονώδους διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση των κυττάρων η προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-1β και σαν δείκτης της δράσης της μετρήθηκε η έκκριση της IL-6 και του MCP-1. Και οι τρεις κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της σπειραματικής βλάβης. Ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών επώασης των κυττάρων είχε ήδη καθοριστεί από προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο^[204]. Συγκεκριμένα η επώαση των κυττάρων με IL-1β 5 ng/ml για 6 ώρες οδηγούσε στη μέγιστη έκκριση IL-6 και MCP-1. Σε αυτές επομένως τις συνθήκες εξετάστηκε η επίδραση του κλάσματος των PL των δυο οίνων στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6 και MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα ύστερα από (α) συνεπώαση των κυττάρων με τα PL και με IL-1β για 6 ώρες ή (β) προεπώαση για 24 ώρες των κυττάρων με τα PL και κατόπιν επώαση με IL-1β για 6 ώρες. Οι δύο διαφορετικοί τρόποι επώασης επιλέχθηκαν με σκοπό εξετασθεί είτε η άμεση επίδραση (συνεπώαση) είτε η έμμεση επίδραση πιθανώς λόγω μεταγραφικής ρύθμισης (προ-επώαση) των PL στην IL-1β.

Από τα πειράματά φάνηκε πως τα μεσαγγειακά κύτταρα αυτά δεν εκκρίνουν IL-6 από μόνα τους (baseline) αλλά αντίθετα, εκκρίνουν MCP-1 (baseline έκκριση MCP-1). Ακόμη φάνηκε πως η IL-1β διεγείρει *in vitro* την παραγωγή τόσο της κυτταροκίνης IL-6 όσο και της χημειοκίνης MCP-1 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες έρευνες).

Επίδραση PL λευκού και ερυθρού οίνου στην έκκριση IL-6 και MCP-1 από HMCL.

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των PL δοκιμάστηκαν διάφορες ποσότητες από το λευκό οίνο τον ερυθρό οίνο (0,2 έως 0,002 μg/ml). Κατά την επώαση των κυττάρων με τα PL είτε για 6 ώρες είτε για 24 ώρες κανένα δείγμα δεν προκάλεσε την έκκριση IL-6 από τα HMCs (εκτός από

την αραιότερη ποσότητα PL ερυθρού οίνου η οποία προκάλεσε την έκκριση IL-6 σε μικρό ποσοστό - 5%).

Κατά τη συνεπώαση των HMCs με IL-1β αλλά και PL για 6 ώρες, παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης IL-6 από όλα τα δείγματα εκτός από αυτό με την αραιότερη ποσότητα PL λευκού οίνου. Η αναστολή της έκκρισης IL-6 που προκάλεσαν τα διάφορα δείγματα PL λευκού και ερυθρού οίνου, κυμάνθηκε από 40,5% έως 55,3%. Μετά από την προεπώαση των κυττάρων με PL για 24 ώρες και την προσθήκη στη συνέχεια, σε αυτά IL-1β για 6 ώρες τόσο το λευκό όσο και το κόκκινο κρασί σε συγκέντρωση 0,02 μg/ml προκάλεσαν μείωση της έκκρισης IL-6. Τα παραπάνω αποτελέσματα στο σύνολό τους δείχνουν πως τα PL γενικά προκαλούν μερική αναστολή της επαγόμενης από την IL-1β έκκρισης IL-6 από τα HMCs, και μάλιστα ευεργετικότερη επίδραση παρατηρείται κατά τη συνεπώαση. Στη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν έρευνες όπου να έχει μελετηθεί η επίδραση λιποειδών οίνου στην έκκριση IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα. Όμως, σε μία έρευνα όπου μελετήθηκε η προστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης έναντι του συνδρόμου Facioni ^[237] προέκυψε πως η ρεσβερατρόλη προστατεύει το νεφρικό ιστό από τη φλεγμονή, περιορίζοντας μεταξύ άλλων και την έκκριση της κυτταροκίνης IL-6.

Στο δεύτερο πείραμα εξετάστηκε η επίδραση των PL των δύο οίνων στην έκκριση MCP-1 από τα HMCs. Οι μεγάλες ποσότητες (0,2 έως 0,02 μg/ml) από τα PL ερυθρού και λευκού οίνου ανέστειλαν την βασική έκκριση MCP-1 από τα HMCs.

Μετά τη διέγερση των κυττάρων με IL-1β, αυτά –όπως ήταν αναμενόμενο– αύξησαν την έκκριση MCP-1. Η συν-επώαση των δειγμάτων PL και των δυο οίνων μείωσε επαγόμενη από IL-1β έκκριση MCP-1 από τα κύτταρα. Στη δεύτερη περίπτωση όπου τα HMCs προ-επώαστηκαν για 24 ώρες με τις διαφορετικές ποσότητες PL από τους δυο οίνους και στη συνέχεια με IL-1β τα PL (0,2 μg/ml) του λευκού οίνου και τα PL (0,02 μg/ml) ερυθρού οίνου μείωσαν την έκκριση του MCP-1 ενώ οι μικρές ποσότητες ενισχύουν την δράση της IL-1β.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δράσεις των πολικών εκχυλισμάτων που παρατηρήθηκαν δεν ήταν δοσο-εξαρτώμενες. Αυτό πιθανός οφείλεται στο γεγονός ότι είναι μίγματα διαφορετικών ενώσεων με διαφορετικές δράσεις. Η αραιώση σε διαφορετικές τάξεις μεγέθους των μιγμάτων οδηγεί κάθε φορά σε ενίσχυση είτε των αναστολέων είτε των ενεργοποιητών που υπάρχουν σε αυτά ανάλογα με το ποια μόρια είναι πιο δραστικά.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η επίδραση των πολικών λιποειδών του οίνου στις λειτουργίες των μεσαγγειακών κυττάρων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα συστατικά του οίνου μπορούν να τροποποιήσουν τη δράση της IL-1β όσο αφορά την έκκριση των κυτταροκινών από τα μεσαγγειακά. Παρόλα αυτά λόγω των λίγων επαναλήψεων των πειραμάτων, δεν ήταν δυνατό να γίνει στατιστική ανάλυση αλλά μόνο παρουσίαση των ευρημάτων. Επομένως, η περεταίρω διερεύνηση της επίδρασης των PL οίνου στην έκκριση της IL-6 και του MCP-1 σε διεγερμένα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα και η διεξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων, είναι αναγκαία. Επίσης, αναγκαία είναι και η μελέτη των μηχανισμών που μεσολαβούν στις δράσεις των συστατικών του οίνου. Τέλος, η μελλοντική έρευνα στις παραπάνω κατευθύνσεις θα οδηγήσει σε παραγωγή νέας επιστημονικής γνώσης, και με τον τρόπο αυτό θα ενισχυθεί η προσπάθεια ανάπτυξης νέων θεραπειών ενάντια στις φλεγμονώδεις νόσους.

Θεωρητικό Μέρος: Η σπειραματοσκλήρυνση είναι το κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό στις περισσότερες νεφρικές παθήσεις και σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη αυτών σε νεφρική ανεπάρκεια. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κοινώς αποδεκτό ότι η σπειραματοσκλήρυνση αποτελεί μια φλεγμονώδη νόσο. Τα μεσαγγειακά κύτταρα αποτελούν τα κύρια κύτταρα του σπειράματος και εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη της βλάβης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι φλεγμονώδεις μεσολαβητές (PAF, IL-1, TNF- α , IL-6, MCP-1, κ.α.) μπορούν να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων που οδηγεί στην έναρξη και εξέλιξη της βλάβης. Τα τελευταία χρόνια πολλά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η διατροφή μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθήσεις. Βασικό χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διατροφής, με αποδεδειγμένες ευεργετικές δράσεις, είναι η κατανάλωση οίνου. Εκχυλίσματα λιποειδών λευκών και ερυθρών οίνων, περιλαμβάνουν συστατικά (κυρίως φαινολικές ενώσεις και γλυκο- / φωσφο- λιποειδή) με αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση. Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης των πολικών λιποειδών λευκού και ερυθρού οίνου στις φλεγμονώδεις διεργασίες κυτταρικής σειράς ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων και συγκεκριμένα στην προκαλούμενη από IL-1 β έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1.

Μέθοδοι: Εκχύλιση των ολικών λιποειδών (TL) λευκού και ερυθρού οίνου με τη μέθοδο Bligh-Dyer και διαχωρισμός τους με κατανομή κατά αντιρροή σε ουδέτερα (NL) και πολικά λιποειδή (PL). Στα κλάσματα πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί φαινολικών, γλυκόζης και φωσφόρου. Εξετάσθηκε η ικανότητα των κλασμάτων να προκαλούν ή να αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (HMCL), η οποία διατηρεί τα ίδια χαρακτηριστικά με τα πρωτογενή μεσαγγειακά κύτταρα.. Εξετάσθηκε η ικανότητα των κλασμάτων να τροποποιούν την προκαλούμενη από IL-1 β έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1 με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA). Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την κυτταρική πρωτεΐνη (όπως αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford).

Αποτελέσματα: Όλα τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Δραστικότερο όμως, κλάσμα φάνηκε να είναι αυτό των PL. Η IL-1 β προκάλεσε την έκκριση της IL-6 και MCP-1 από τα HMCs. Η συνεπώαση των HMCs

με τα PL των δύο οίνων (0,002-0,2μg/ml) οδήγησε σε αναστολή της προκαλούμενης με IL-1β (5ng/ml) έκκρισης IL-6 και MCP-1. Η προεπώαση των HMCs με τα PL των οίνων είτε δεν είχε σημαντική επίδραση στην έκκριση IL-6 και MCP-1, είτε προκάλεσε αύξηση της έκκρισής τους.

Συμπεράσματα: Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι τα πολικά λιποειδή του λευκού και ερυθρού οίνου μπορούν να τροποποιήσουν την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6 και MCP-1 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Παρόλα αυτά περαιτέρω διερεύνηση της δράσης τους είναι αναγκαία ώστε να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης τους.

SUMMARY

Background: Glomerulosclerosis is the common pathological feature of most renal diseases and it is directly associated with end stage renal disease. The latest years, it has become common knowledge that glomerulosclerosis is an inflammatory disease. Mesangial cells constitute primary glomerular cells and they are implicated in the progression of renal injury. Former studies have shown that proinflammatory mediators (PAF, IL-1, TNF- α) can cause the dysregulation of mesangial cells, which participate in detriment progression. Many studies have revealed the beneficial role of the Mediterranean diet in various pathological conditions. A basic characteristic of the Mediterranean diet, which is proven to be beneficial for health, is wine consumption. Lipid extracts from red and white wines, contain antithrombotic and anti-inflammatory compounds that belong to the classes of phenolic and glyco- / phospho- lipids. The aim of this study is to investigate the effects of red and white wine polar lipids (PL) in human mesangial cells inflammatory processes and more specifically, in the secretion of IL-6 and MCP-1 when induced by IL-1 β .

Methods: Total lipids (TL) were extracted from red and white wine by using the Bligh – Dyer method, and via counter current distribution extraction procedure the TL were divided into neutral (NL) and polar (PL) lipids. Also, chemical determinations took place. The biological activity of the above wine extracts was examined through their effect on PAF-induced platelet aggregation at rabbits. Afterwards, the IL-1 β -induced secretion of IL-6 and MCP-1 was determined by the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) in a human mesangial cell line (HMCL), after co-incubating the cells for 6 hrs or pre-incubating the cells for 24 hrs with the wine PL extracts. The results were normalized to cell protein (Bradford assay).

Results: All wine lipid extracts inhibited the PAF-induced rabbit platelet aggregation. However, PL was proven to be the most active wine extract. IL-1 β induced the secretion of both IL-6 and MCP-1 by the HMCL. Co-incubation of the cells with red / white wine PL (0,002 – 0,2 μ g/ml) and IL-1 β (5ng/ml) resulted in inhibition of IL-6 and MCP-1 secretion. Pre-incubation of the cells with red / white wine PL either had no effect or enhanced the secretion of IL-6 and MCP-1.

Conclusion: The above results indicate that IL-1 β induces the secretion of IL-6 and MCP-1 in HMCL. Wine extracts could modulate IL-1 β -induced IL-6 and MCP-1 secretion from HMCL.

However, due to their diverse effects on cytokine secretion further investigation is required in order to characterize their mode of action.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ματάλα Α.Λ., *Εισαγωγή στη διατροφή*, σελ. 1-2, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2003
2. Mahan L.K., Escott-Stump S., *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy*, 11th edition, p. 1-3
3. Τριχόπουλος Δ., Καλαποθάκη Β., Πετρίδου Ε., *Προληπτική Ιατρική & Δημόσια Υγεία*, 2000, εκδόσεις «ΖΗΤΑ» σελ. 393-426
4. de Lorgeril M., Salen P., Paillard F., Laporte F., Bouche P., Joel de Leiris, *Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease*, Cardiovascular Research 54 (2002) 503–515
5. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C, *Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006 Dec;16(8):559-68.
6. Michel de Lorgeril, MD, *Mediterranean diet in the prevention of coronary heart disease*, Nutrition Vol 14, No 1, 1998
7. Keys A., *Coronary heart disease in seven countries*. Circulation 1970; 41: (suppl I)
8. Serge Renaud, Η μεσογειακή διατροφή: το τέλος του εμφράγματος και το θαύμα της μακροβιότητας, 1996, εκδόσεις Π. Τραυλός – Ε. Κωσταράκη
9. Vialettes, B.: *Dietary habits in the Mediterranean countries: A model for the world?*, Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux Volume 85, Issue SPEC. ISS. II, 1992, Pages 135-138
10. Tsarouhi, A., *Archives of Hellenic Medicine, Nutritional habits and health* Volume 14, Issue 5, 1997, Pages 499-450
11. Panagiotakos DB, Pitsavos Ch, Chrysoshoou Ch, Stefanadis Ch, Toutouzas P., *The role of traditional mediterranean type of diet and lifestyle, in the development of acute coronary syndromes: preliminary results from CARDIO 2000 study*. Cent Eur J Public Health. 2002 Jun;10(1-2):11-15
12. Chrysoshoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C., *Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study*, J Am Coll Cardiol. 2004 Jul 7;44(1):152-8.
13. Teresa T Fung, Marjorie L McCullough, PK Newboy, JoAnn E Manson, James B Meigs, Nader Rifai, Walter C Willet, Frank B Hu, *Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction*, Am. J. Clin. Nutr. 2005; 82:163-173
14. Brand-Miller, J.C., Fatima, K., Middlemiss, C., Bare, M., Liu, V., Atkinson, F., Petocz, P., *Effect of alcoholic beverages on postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults*, American Journal of Clinical Nutrition 85 (6), pp. 1545-1551, 2007
15. Lee, J.E., Hunter, D.J., Spiegelman, D., Adami, H.-O., Albanes, D., Bernstein, L., van den Brandt, P.A., Smith-Warner, S.A., *Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies*, Journal of the National Cancer Institute 99 (10), pp. 801-810, 2007
16. Rotondo, S., Iacoviello, L., Donati, M.B., De Gaetano, G., Di astelnuovo, A., *Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk* Circulation Volume 105, Issue 24, 18 June 2002, Pages 2836-2844
17. Ruidavets, J.-B., Ducimetière, P., Arveiler, D., Amouyel, P., Bingham, A., Wagner, A. Cotel, D., Perret, B., Ferrières, J., *Types of alcoholic beverages and blood lipids in a French population*, Journal of Epidemiology and Community Health Volume 56, Issue 1, 2002, Pages 24-28

18. Groønbaek, M., Mortensen, E.L., Mygind, K., Andersen, A.T., Becker, U., Gluud, C., Sørensen, T.I.A., *Beer, wine, spirits and subjective health*, Journal of Epidemiology and Community Health Volume 53, Issue 11, November 1999, Pages 721-724
19. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM., *Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention*, J Clin Lab Anal. 1997;11(5):287-313. Review.
20. 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.
21. Deibner L, Mourgues L, Cabibel-Hughes M, *Evolution d l'indice des substances aromatiques volatiles des raisins de deux cepages rouges au cours de leur maturation*. Ann Technol Agric 14:5-14, 1965
22. Dussaud A., Robillard B., Carles B., Deuteurte B., Adler V.M., J. Food Sci., 1994, 59, 148 – 167
23. Guymon, J. F., and J. E. Heitz. 1952. *The fusel oil content of California wines*. Food Technology. 6: 359-362.
24. Liu S.Q. and G.J. Pilone. 2000. *An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications*. International J. of Food Science and Technology 35:49-61
25. Jacques Belleville, *The French Paradox: Possible Involvement of Ethanol in the Protective Effect Against Cardiovascular Diseases*, Nutrition. 2002 Feb;18(2):173-7
26. Asplund, K., Tuomilehto, J., Kuulasmaa, K., Torppa, J., *Multinational stroke mortality data at the baseline of the WHO MONICA project*, 1989, Cerebral vascular disease 7: proceedings of the World Federation of Neurology 14th International Salzburg Conference. ICS858, pp. 167-170
27. Szmitko PE, Verma S., *Antiatherogenic potential of red wine: clinician update*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 May;288(5):H2023-30. Epub 2005 Jan 14
28. Camargo CA Jr, Hennekens CH, Gaziano JM, Manson JE, Goldhaber SZ, and Hennekens CH. *Prospective study of moderate alcohol consumption and mortality in US male physicians*. Arch Intern Med 157: 79-85, 1997
29. Fuchs CS, Stampfer MJ, Colditz GA, Giovannucci EL, Manson JE, Kawachi I, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, and Rosner B. *Alcohol consumption and mortality among women*. N Engl J Med 332: 1245-1250, 1995.
30. De Lorimier AA., *Alcohol, wine and health*. Am J Surg 180: 357-361, 2000
31. Gronbaek M., *Alcohol, type of alcohol, and all-cause and coronary heart disease mortality*, Ann NY Acad Sci 957: 16-20, 2002
32. N Gall, *Is wine good for your heart? A critical review*, Postgrad. Med. J. 2001;77;172-176
33. C. Pitsavos, K. Makrilakis, D. B. Panagiotakos, C. Chrysoshoou, I. Ioannidis, *The J-shape effect of alcohol intake on the risk of developing acute coronary syndromes in diabetic subjects: the CARDIO2000 II Study*, Diabetes UK. Diabetic Medicine, 22, 243-248, 2004
34. de Gaetano G, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L., *The mediterranean lecture: wine and thrombosis--from epidemiology to physiology and back*, Pathophysiol Haemost Thromb. 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):466-71. Review
35. Rakic V, Puddey IB, Dimmitt SB, et al. *A controlled trial of the effects of pattern of alcohol intake on serum lipid levels in regular drinkers*. Atherosclerosis 1998;137:243-52
36. Federico Leighton, *Changes in Cardiovascular Risk Factors Associated with Wine Consumption in Intervention Studies in Humans*, Ann Epidemiol 2007;17:S32-S36
37. Williams MJ, Sutherland WH, Whelan AP, McCormick MP, de Jong SA., *Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease*, Metabolism. 2004;53:318-323

38. Stocker, R., O'Halloran, R.A., *Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall*, American Journal of Clinical Nutrition 79 (1), pp. 123-130, 2004
39. Rifici, V.A., Schneider, S.H., Khachadurian, A.K., *Lipoprotein oxidation mediated by J774 murine macrophages is inhibited by individual red wine polyphenols but not by ethanol*, Journal of Nutrition 132 (9), pp. 2532-2537, 2002
40. Sánchez-Moreno, C., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., *LDL oxidizability indexes in measurement of antioxidant activity in selected Spanish wines*, 2002, Nutrition Research 22 (4), pp. 507-517
41. Satué-Gracia, M.T., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Frankel, E.N., *Spanish sparkling wines (cavas) as inhibitors of in vitro human low-density lipoprotein oxidation*, 1999, Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (6), pp. 2198-2202
42. Rifici, V.A., Stephan, E.M., Schneider, S.H., Khachadurian, A.K., *Red wine inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL*, 1999, Journal of the American College of Nutrition 18 (2), pp. 137-143
43. Aviram, M., Fuhrman, B., *Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis*, 1998, Atherosclerosis 137 (SUPPL.), pp. S45-S50
44. Frankel, E.N., Kanner, J., *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*, 1993, Lancet 341 (8843), pp. 454-457
45. Kerry, N.L., Abbey, M., *Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro*, 1997, Atherosclerosis 135 (1), pp. 93-102
46. Ivanov, V., Carr, A.C., Frei, B., *Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal ion-dependent and independent oxidation*, 2001, Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (9), pp. 4442-4449
47. Senault, C., Betoulle, D., Luc, G., Hauw, P., Rigaud, D., Fumeron, F., *Beneficial effects of a moderate consumption of red wine on cellular cholesterol efflux in young men*, 2000, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 10 (2), pp. 63-69
48. Pignatelli, P., Ghiselli, A., Buchetti, B., Carnevale, R., Natella, F., Germanò, G., Fimognari, F., *Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine*, 2006, Atherosclerosis 188 (1), pp. 77-8
49. Stupans, I., Kirlich, A., Tuck, K.L., Hayball, P.J., *Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants*, 2002, Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (8), pp. 2464-2469
50. Ursini, F., Sevanian, A., *Postprandial oxidative stress*, 2002, Biological Chemistry 383 (3-4), pp. 599-605
51. Wu, J.M., Wang, Z.R., Hsieh, T.C., Bruder, J.L., Zou, J.G., Huang, Y.Z., *Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review)*, 2001, International journal of molecular medicine 8 (1), pp. 3-17
52. Puddey, I.B., Croft, K.D., Abu-Amsa Caccetta, R., Beilin, L.J., *Alcohol, free radicals and antioxidants*, 1998, Novartis Foundation Symposium (216), pp. 51-67
53. Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., Merillon, J.-M., *Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests*, 1997, Life Sciences 61 (21), pp. 2103-2110
54. Montilla P, Espejo I, Muñoz MC, Bujalance I, Muñoz-Castañeda JR, Tunez I., *Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats*, Clin Nutr. 2006 Feb;25(1):146-53. Epub 2005 Nov 16

55. Shimada K, Watanabe H, Hosoda K, Takeuchi K, Yoshikawa J., *Effect of red wine on coronary flow-velocity reserve*, Lancet. 1999;354:1002
56. Urquiaga I, Guasch V, Marshall G, San Martin A, Castillo O, Rozowski J, et al., *Effect of Mediterranean and Occidental diets, and red wine, on plasma fatty acids in humans. An intervention study*, Biol Res.. 2004;37:253–261
57. Wierzbicki AS, Chowienzyk PJ, Cockcroft JR, Brett SE, Watts GF, Jenkins BS, et al., *Cardiovascular risk factors and endothelial dysfunction*, Clin Sci (Lond). 2004;107:609–615
58. Dupuis J. *Noninvasive Evaluation of endothelial vascular reactivity: should the quest continue?*, Can J Cardiol. 2005;21:1047–1051)
59. Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, et al., *The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers*, Br J Nutr. 2005;93:233–240
60. Leighton F, San Martín A, Castillo O, Pollak F, Perez DD, Strobel P, et al., *Red wine, white wine and diet, intervention study. Effect on cardiovascular risk factors*, Proc XXV Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, Paris, June 19–23, 2000. pp. 63–70
61. van der Gaag MS, Ubbink JB, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks HF., *Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine*, Lancet. 2000;355:1522
62. P. M. Ridker, D. E. Vaughan, M. J. Stampfer, R. J. Glynn and C. H. Hennekens, *Association of moderate alcohol consumption and plasma concentration of endogenous tissue-type plasminogen activator*, Vol. 272 No. 12, September 28, 1994
63. Bijnen FC, Feskens EJ, Giampaoli S, Menotti A, Fidanza F, Hornstra G, Caspersen CJ, Mosterd WL, Kromhout D., *Haemostatic parameters and lifestyle factors in elderly men in Italy and The Netherlands*, Thromb Haemost 1996;76:411–416
64. Woodward M, Lowe GDO, Rumley A, Tunstall- Pedoe H, Philippou H, Lane DA, Morrison CE., *Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: The Third Glasgow MONICA Survey. II. Relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease*, Br J Haematol 1997;97:785–797
65. Elwood PC, Beswick AD, O'Brien JR, Yarnell JW, Layzell JC, Limb ES., *Inter-relationships between haemostatic tests and the effects of some dietary determinants in the Caerphilly cohort of older men*, Blood Coagul Fibrinolysis 1993;4:529–536
66. Renaud SC, Ruf JC., *Effects of alcohol on platelet functions*, Clin Chim Acta 1996;246:77–89
67. Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM., *Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects*, Clin Chem 1996;246:163–182
68. Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotilio D, de Gaetano G, Evangelista V, Cerletti C., *Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function*, Br J Pharmacol 1998;123:1691–1699
69. Polette A, Lemaitre D, Lagarde M, Véricel E., *N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins*, Thromb Haemost 1996;75:945–949
70. Mezzano D, Leighton F, Martinez C, Marshall G, Cuevas A, Castillo O, et al. *Complementary effects of Mediterranean diet and moderate red wine intake on haemostatic cardiovascular risk factors*. Eur J Clin Nutr. 2001;55:444–451
71. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM., *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*, Clin Chim Acta 1995;235:207–219
72. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Demopoulos CA., *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must*, J Agric Food Chem. 2002 Apr 24;50(9):2684–94

73. Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L., *Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production*, Br J Pharmacol 1999;127:747-755
74. H.S. Demrow, P.R. Slane and J.D. Folts, *Coronary artery disease/platelets: administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries*, Circulation 91 (1995), pp. 1182–1188
75. D. Rein, T.G. Paglieroni, D.A. Pearson et al., *Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function*. J. Nutr. 130 (2000), pp. 2120S–2126S
76. P. Russo, I. Tedesco, M. Russo, G.L. Russo, A. Venezia and C. Cicala, *Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 11 1 (2001), pp. 25–29.
77. N. Pellegrini, F.I. Pareti, F. Stabile, A. Brusamolino and P. Simonetti, *Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers*. Eur. J. Clin. Nutr. 50 4 (1996), pp. 209–213
78. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Nomikos T, Demopoulos CA., *Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties*, Biochim Biophys Acta. 2003 Jun 10;1632(1-3):90-9
79. Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R., *Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta*, Br J Pharmacol 1997;120:1053-1058
80. Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Br J Pharmacol 2003;139:1095- 1102. Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC., *Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis*, Br J Pharmacol 2003;139:1095-1102
81. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatielopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M., *Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers*, Am Heart J. 2004;147:E5
82. Thomas Wallerath, PHD, Daniela Poleo, Huige Li, MD, PHD, Ulrich Forstermann, MD, PHD., *Red Wine Increases the Expression of Human Endothelial Nitric Oxide Synthase A Mechanism That May Contribute to its Beneficial Cardiovascular Effects*, J Am Coll Cardiol, 2003; 41:471-478
83. Suolinna EM, Buchsbaum RN, Racker E, *The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells*. Cancer Res 35:1865– 1872, 1975
84. Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA, Johson GA, Middleditch BS, Clark JH: *Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition*. J Steroid Biochem 30:71–78, 1988
85. Castillo MH, Perkins E, Campbell JH, et al.: *The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin*, Am J Sur 158:351–355, 1989
86. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, et al.: *The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells*, FEBS Lett 260:10–13, 1990
87. Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, et al.: *Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possible cell-cycle-related 17 kDa protein in human colon cancer cells*. Int J Cancer 45;1119–1124, 1990
88. Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T: *Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle*. Cancer Res 52:6676– 6681, 1992
89. Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V: *Quercetin mediates the down- regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468*. Cancer Res 54:2424– 2428, 1994

90. Wei Y, Zhao X, Kariya Y, Gukata H, Teshigawara K, Uchida A: *Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein*. Cancer Res 49:4952–4957, 1994
91. Teofili L, Pierelli L, Iovino S, et al.: *The combination of quercetin and cytosine arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth*. Leuk Res 16:479–503, 1992
92. Hoffmann J, Fiebig HH, Winterhalter BR, et al.: *Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by quercetin*, Int J Cancer 45:536–539, 1990
93. Huang MT, Wood AW, Newmark HL, et al.: *Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids*. Carcinogenesis 4:1631–1637, 1983
94. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, et al.: *Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition*. Clin Cancer Res 2:659– 668, 1996
95. Liu L, Castonguay A: *Inhibition of the metabolism and genotoxicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rat hepatocytes by (+)-catechin*. Carcinogenesis 12:1203–1208, 1991
96. Fan XJ, *In vitro effect of catechin on cell growth*, Chung Hua Chung Liu Tsa Chih 14:190–192, 1992
97. Kuenzig W, Chan J, Norkus E, et al., *Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation*, Carcinogenesis 5:309–313, 19
98. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM., *Type of wine and risk of lung cancer: A case-control study in Spain*, Thorax. 2004;59: 981-985
99. Woodward K., *A glass of red wine a day may keep prostate cancer away* [press release], Seattle, WA: Fred Hutchinson Cancer Research Center; September 22, 2004.
100. Siobhan Sutcliffe, Edward Giovannucci, Michael F. Leitzmann, Eric B. Rimm, Meir J. Stampfer Walter C. Willett and Elizabeth A. Platz: *A prospective cohort study of red wine consumption and risk of prostate cancer*, Int. J. Cancer: 120, 1529–1535 (2007)
101. Ramon Rodrigo and Gonzalo Rivera: *Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine*, Free Radical Biology & Medicine, Vol. 33, No. 3, pp. 409–422, 2002
102. Vander, MD. Sherman, PhD. Luciano, PhD. Τσακόπουλος Μ., Γελαδάς Ν.: *Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού*, 8^η έκδοση, σελ. 608 – 620, 676 – 682, 906 – 908, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 2001
103. Stephen McPhee, Μουτσόπουλος Χ.: *Παθολογική φυσιολογία*, σελ. 168, 417 – 421, 571 – 600, Ιατρικές εκδόσεις Λιτσας, 2000
104. Zimmerman, G.A., et al., *Endothelial cell-associated platelet activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion*. J Cell Biol, 1990. 115: p. 529-40
105. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. 392: p. 565-8
106. C. A. Demopoulos, H.C. Karantonis, S. Antonopoulou: *Platelet activating factor – a molecular link between atherosclerosis theories*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105 (2003) 705 – 716
107. Fragopoulou E., Iatrou C., Antonopoulou S., Ruan X.Z., Fernando R.L., Powis S.H., Moorhead J.F., Varghese Z.: *Platelet- activating factor (PAF) increase intracellular lipid accumulation by increasing both LDL and scavenger receptors in human mesangial cells*, J Lab Clin Med 2006;147:281–289
108. Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ., *Evolution of interleukin-1beta*. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Dec;13(6):483-502. Review
109. Rosenwasser LJ.: *Biologic activities of IL-1 and its role in human disease*. J Allergy Clin Immunol. 1998 Sep;102(3):344-50. Review
110. Dinarello, C., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*, Blood, 1996. 87: p. 2095-147.
111. Dinarello, C., *The biological properties of interleukin-1*. Eur Cytokine Netw, 1994. 5: p. 517-31

112. Zoja, C., et al., *Interleukin-1 regulates cytokine gene expression in human mesangial cells through the interleukin-1 receptor type-1*. *J Am Soc Nephrol*, 1992. 2(12): p. 1709-15.
113. 100. Zoja, C., Rambaldi, A., and Remuzzi, G., *Interleukin-1 and glomerular mesangial cells*. *Ren Physiol Biochem*, 1993. 16(1-2): p. 89-92.
114. Ruan, X.Z., et al., *Regulation of lipoprotein trafficking in the kidney: role of inflammatory mediators and transcription factors*. *Biochem Soc Trans*, 2004. 32(Pt 1): p. 88-91.
115. Ruan, X.Z., Varghese, Z., and Moorhead, J.F., *Inflammation modifies lipid-mediated renal injury*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. 18: p. 27-32
116. Eberhardt, W., et al., *Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways*. *J Immunol*, 2000. 165(10): p. 5788-97
117. Akool el, S., et al., *Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR*. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(14): p. 4901-16
118. Lang, D., et al., *Protein kinase C (PKC) dependent induction of tissue factor (TF) by mesangial cells in response to inflammatory mediators and release during apoptosis*. *Br J Pharmacol*, 2002. 137(7): p. 1116-24
119. Chu, A.J., *Tissue factor mediates inflammation*. *Arch Biochem Biophys*, 2005. 440(2): p. 123-32
120. Bohler, T., et al., *TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers*. *Cytokine*, 2000. 12(7): p. 986-91
121. Lee, S.K., et al., *Chemokines, osteopontin, ICAM-1 gene expression in cultured rat mesangial cells*. *J Korean Med Sci*, 1998. 13(2): p. 165-70.
122. Guo, G. and Wang, H., *[Regulative effect of nuclear factor kappa B on the expression of intercellular adhesion molecular-1 in human mesangial cells]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1998. 78(4): p. 290-2
123. Dorsam, G., et al., *Diphenyleneiodium chloride blocks inflammatory cytokine-induced up-regulation of group IIA phospholipase A(2) in rat mesangial cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 292(1): p. 271-9
124. Guan, Z., et al., *Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells*. *J Biol Chem*, 1998. 273(44): p. 28670-6
125. Tsai, C.Y., et al., *Proinflammatory cytokines enhance COX-1 gene expression in cultured rat glomerular mesangial cells*. *Int Immunopharmacol*, 2004. 4(1): p. 47-56
126. Zoja, C., et al., *Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells*. *Am J Pathol*, 1991. 138(4): p. 991-1003
127. Abbott, F., et al., *Interleukin-1 beta stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8*. *Kidney Int*, 1991. 40(4): p. 597-605
128. Xiong, Z., et al., *[Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in cultured human mesangial cells]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2002. 82(19): p. 1351-4
129. Nakazato, Y., et al., *Interleukin (IL)-1 and IL-4 synergistically stimulate NF-IL6 activity and IL-6 production in human mesangial cells*. *Kidney Int*, 1998. 54(1): p. 71-9
130. Rovin, B.H., et al., *The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin 1beta-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells*. *Cytokine*, 1999. 11(2): p. 118-26

131. Rovin, B.H. and Tan, L.C., *Role of protein kinase pathways in IL-1-induced chemoattractant expression by human mesangial cells*. *Kidney Int*, 1994. 46(4): p. 1059-68.
132. Chen, W.P., Chen, A., and Lin, C.Y., *In vitro effects of interleukins on human mesangial cells: implications for glomerulonephritis*. *J Pathol*, 1995. 175(3): p. 327-37
133. Matsukasa, T., et al., *Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin-6 and interleukin-8*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90: p. 10193-7
134. Dendorfer, U., Ottgen, P., and Libermann, T.A., *Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide*. *Mol Cell Biol*, 1994. 14: p. 4443-54
135. Sanceau, J., et al., *Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon- γ and tumor necrosis factor- α in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF- κ B, and Sp1 transcription factors*. *J Biol Chem*, 1995. 270: p. 27920-31
136. Chang, J.W., et al., *Proinflammatory cytokine-induced NF-kappaB activation in human mesangial cells is mediated through intracellular calcium but not ROS: effects of silymarin*. *Nephron Exp Nephrol*, 2006. 103(4): p. e156-65
137. Jalal, D.I. and Kone, B.C., *Src activation of NF-kappaB augments IL-1beta-induced nitric oxide production in mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(1): p. 99-106
138. Lee, M.J., et al., *Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway*. *J Immunol*, 2003. 170(5): p. 2557-63
139. Rovin, B.H., et al., *Modulation of IL-1-induced chemokine expression in human mesangial cells through alterations in redox status*. *Cytokine*, 1997. 9(3): p. 178-86
140. Yokoo, T. and Kitamura, M., *Antioxidant PDTC induces stromelysin expression in mesangial cells via a tyrosine kinase-AP-1 pathway*. *Am J Physiol*, 1996. 270(5 Pt 2): p. F806-11
141. Rovin, B.H., et al., *Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells*. *Kidney Int*, 1995. 48(4): p. 1263-71.
142. Lucio-Cazana, J., et al., *Suppression of constitutive but not IL-1beta-inducible expression of monocyte chemoattractant protein-1 in mesangial cells by retinoic acids: intervention in the activator protein-1 pathway*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. 12(4): p. 688-94
143. Stylianou, E., et al., *Interleukin 1 induces NFkB through its type I but not type II receptor in lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1992. 267: p. 15836-41
144. Lee, S.K., et al., *Exogenous nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha- or interleukin-1-beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells. Role of IkappaB-alpha and cyclic GMP*. *Nephron*, 2002. 92(4): p. 780-7
145. Coletta, I., et al., *Selective induction of MCP-1 in human mesangial cells by the IL-6/sIL-6R complex*. *Exp Nephrol*, 2000. 8(1): p. 37-43.
146. Auwardt, R.B., et al., *Regulation of nuclear factor kappaB by corticosteroids in rat mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. 9(9): p. 1620-8
147. Barton, B.E., *IL-6: Insights into novel biological activities*. *Clin Immunology and Immunopathology*, 1997. 85(1): p. 16-20
148. Saito, M., et al., *Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer gp130, and its regulated expression in vivo*. *J Immunol*, 1992. 148: p. 4066-71
149. Yin, T.e.a., *Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11 mediated signal transduction*. *J Immunol*, 1993. 151: p. 2555-61
150. Jones, S.A., et al., *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease*. *Faseb J*, 2001. 15: p. 43-58
151. Romano, M., Sironi, M., and Toniatti, C., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocytes recruitment*. *Immunity*, 1997. 6: p. 315-25

152. Naka, T., Nishimoto, N., and Kishimoto, T., *The paradigm of IL-6: from basic science to medicine*. Arthritis Res, 2002. 4 Suppl 3: p. S233-42
153. Yudkin, J.S., Kumari, M., and Humphries, S.E., *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* Atherosclerosis, 2000. 148: p. 209-14
154. Akutsu, Y., [Study of correlation between urinary IL-6 level and mesangial lesion in childhood onset IgA nephropathy]. Hokkaido Igaku Zasshi, 1994. 69(4): p. 686-96
155. Matsell, D.G., Gaber, L.W., and Malik, K.U., *Cytokine stimulation of prostaglandin production inhibits the proliferation of serum-stimulated mesangial cells*. Kidney Int, 1994. 45(1): p. 159-65
156. Hirata, E., et al., *Rapid measurement of urinary IL-6 by ELISA: urinary IL-6 as a marker of mesangial proliferation*. Nippon Jinzo Gakkai Shi, 1994. 36(1): p. 33-7
157. Ruef, C., et al., *Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells*. Kidney Int, 1990. 38(2): p. 249-57
158. Iwano, M., et al., *Induction of interleukin 6 synthesis in mouse glomeruli and cultured mesangial cells*. Nephron, 1992. 62(1): p. 58-65
159. Ihm, C.G., et al., *Effects of high glucose on interleukin-6 production in human mesangial cells*. J Korean Med Sci, 2002. 17(2): p. 208-12
160. Eitner, F., et al., *Role of interleukin-6 in mediating mesangial cell proliferation and matrix production in vivo*. Kidney Int, 1997. 51(1): p. 69-78.
161. Karkar, A.M., et al., *Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by interleukin-6*. Kidney Int, 1993. 44: p. 967-73
162. Ahmed, S. and Ivashkiv, L.B., *Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and stat activation by inflammatory and stress pathways*. J Immunol, 2000. 165: p. 5227-37
163. Deon, D., et al., *Cross talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. J Immunol, 2001. 167: p. 5397-403
164. Roth, M., et al., *Intracellular interleukin 6 mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation of nontransformed cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(5): p. 1312-6
165. Ruef, C., Kashgarian, M., and Coleman, D.L., *Mesangial cell-matrix interactions. Effects on mesangial cell growth and cytokine secretion*. Am J Pathol, 1992. 141(2): p. 429-39
166. Leonard, M., et al., *Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells*. Kidney Int, 1999. 56(4): p. 1366-77
167. Moutabarrik, A., Nakanishi, I., and Ishibashi, M., *Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells*. Scand J Immunol, 1994. 40(2): p. 181-6.
168. Schwarz, M., et al., *IFNgamma induces functional chemokine receptor expression in human mesangial cells*. Clin Exp Immunol, 2002. 128(2): p. 285-94
169. Gomez-Guerrero, C., et al., *Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation*. J Immunol, 1994. 153(11): p. 5247-55
170. van den Dobbelsteen, M.E., et al., *Soluble aggregates of IgG and immune complexes enhance IL-6 production by renal mesangial cells*. Kidney Int, 1993. 43(3): p. 544-53
171. van den Dobbelsteen, M.E., et al., *Binding of dimeric and polymeric IgA to rat renal mesangial cells enhances the release of interleukin 6*. Kidney Int, 1994. 46(2): p. 512-9
172. Moura, I.C., et al., *Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(9): p. 2667-76.
173. Schieren, G., et al., *Fibronectin modulates interleukin 6 and fibronectin synthesis of human glomerular mesangial cells in culture*. Exp Nephrol, 1996. 4(1): p. 48-55
174. Kuo, Y.C., et al., *Chinese herbs as modulators of human mesangial cell proliferation: preliminary studies*. J Lab Clin Med, 1998. 132(1): p. 76-85.

175. Chen, W.P., et al., *Intrarenal infusion of supernatant from cytokine-activated human mesangial cells may cause glomerular damage*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei), 1999. 62(10): p. 657-65
176. Horii, Y., et al., *Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis*. J Immunol, 1989. 143(12): p. 3949-55
177. Teresa J. Reape, Pieter H.E. Groot, *Chemokines and atherosclerosis*, Atherosclerosis 147 (1999) 213 – 225
178. William a. Boisvert, *Modulation of atherogenesis by chemokines*, TCM Vol. 14, No. 4, 2004
179. Shin, W.S., Szuba, A., and Rockson, S.G., *The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights*. Atherosclerosis, 2002. 160(1): p. 91-102
180. Giunti, S., et al., *The MCP-1/CCR2 system has direct proinflammatory effects in human mesangial cells*. Kidney Int, 2006. 69(5): p. 856-63
181. Luster, A.D., *Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. 338: p. 436-45
182. Holdsworth, S.R., Kitching, A.R., and Tipping, P.G., *Chemokines as therapeutic targets in renal disease*. Curr Opin Nephrol Hypertension, 2000. 9: p. 505-11
183. Charo, I.F. and Taubman, M.B., *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease*. Circ Res, 2004. 95(9): p. 858-66
184. Segerer, S., Nelson, P.J., and Schlondorff, D., *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. J Am Soc Nephrol, 2000. 11: p. 152-76
185. Luther, S.A. and Cyster, J.G., *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. Nat Immunol, 2001. 2(2): p. 102-7
186. Cavaillon JM, *Cytokines and macrophages*. Biomed Pharmacother. 1994;48(10):445-53. Review
187. Reape, T.J. and Groot, P.H., *Chemokines and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999. 147(2): p. 213-25
188. Bursill, C.A., Channon, K.M., and Greaves, D.R., *The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics*. Curr Opin Lipidol, 2004. 15(2): p. 145-9
189. Boisvert, W.A., *Modulation of atherogenesis by chemokines*. Trends Cardiovasc Med, 2004. 14(4): p. 161-5
190. Wada, T., et al., *MIP-1 α and MCP-1 contribute crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis*. Kidney Int, 1996. 56: p. 995-1003
191. Schneider, A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta*. Kidney Int, 1999. 56: p. 135-44
192. Luo Y, Lloyd C, Gutierrez-Ramos JC, Dorf ME., *Chemokine amplification in mesangial cells*, J Immunol. 1999 Oct 1;163(7):3985-92. Erratum in: J Immunol 2000 May 15;164(10):5332
193. Noris, M., S. Bernasconi, F. Casiraghi, S. Sozzani, E. Gotti, G. Remuzzi, A. Mantovani. 1995. *Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis*. Lab. Invest. 73:804
194. Prodjosudjadi, W., J. S. J. Gerritsma, L. A. Vanes, M. R. Daha, J. A. Bruijn. 1995. *Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis*. Clin. Nephrol. 44:148
195. Rovin, B. H., M. Rumancik, L. Tan, J. Dickerson. 1994. *Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis*. Lab. Invest. 71:536

196. Gesualdo, L., G. Grandaliano, E. Ranieri, R. Monno, V. Montinaro, C. Manno, F. P. Schena. 1997. *Monocyte recruitment in cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis: a pathogenetic role for monocyte chemotactic peptide-1*. *Kidney Int.* 51:155
197. Seldin Griebisch, *The kidney Physiology and Pathophysiology*, Vol. 1
198. Schlondorff, D., *Roles of the mesangium in glomerular function*. *Kidney International*, 1996. 49: p. 1583-5
199. Johnson, R.J. and Fefeehally, J., *Comprehensive Clinical Nephrology*. 2000, London.
200. Ιατρού, *Παθογενετικοί μηχανισμοί του νεφρού*. Ελληνική Νεφρολογία, 1996. 8: p. 229-36
201. Vleming, L.J., Bruijn, J.A., and van Es, L.A., *The pathogenesis of progressive renal failure*. *The Netherlands J Med*, 1999. 54: p. 114-128
202. Stahl, R.A., et al., *The platelet activating factor receptor antagonist WEB 2170 improves glomerular hemodynamics and morphology in proliferative model of mesangial cell injury*. *J Am Soc Nephrol*, 1991. 2: p. 37-44.
203. Γούμενος, Δ. and Καλλιακμάνη, Π. *Σπειραματική βλάβη και οδοί προς αποκατάστασή της ή προς ίνωση του νεφρικού ιστού*. Ελληνική Νεφρολογία, 2001. 13(1): p. 31-9
204. Γιωργος Θ. Μίλεσης, *Επίδραση μικροθρεπτικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στην έκκριση κυτταροκινών και στην έκφραση υποδοχέων λιποπρωτεϊνών από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα*, σελ. 23 – 31, διπλωματική διατριβή, 2006
205. George M. Nassar, Kamal F. Badr, *Novel approaches to treatment of glomerulonephritis*, *Journal Of Nephrology* Vol. 11 No. 4 - 1998 / 177-182, Review
206. El Nahas, A.M., et al., *Renal fibrosis: insights into pathogenesis and treatment*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. 29(1): p. 55-62
207. El Nahas, A.M., *Glomerulosclerosis: intrinsic and extrinsic pathways*. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. 11: p. 773-7.
208. Noronha, I.L., Fujihara, C.K., and Zatz, R., *The inflammatory compenent in progressive renal disease - are interventions possible?* *Nephrol Dial Transplant*, 2002. 17: p. 363-8
209. Richard J. Johnson, *The glomerular response to injury: Progression or resolution*, *Kidney International*, Vol. 45 (1994), pp. /769—1782
210. Abboud, H.E., *Growth factors in glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1993. 43: p. 252-67.
211. Buschhausen, L., et al., *Regulation of mesangial cell function by vasodilatory signaling molecules*. *Cardiovascular Res*, 2001. 51: p. 463-9
212. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Stampfer MJ., *Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones*, *Am J Epidemiol*. 1996 Feb 1;143(3):240-7
213. de Lorimier AA., *Alcohol, wine, and health*, *Am J Surg*. 2000 Nov;180(5):357-61
214. Caimi G, Carollo C, Lo Presti R., *Chronic renal failure: oxidative stress, endothelial dysfunction and wine*, *Clin Nephrol*. 2004 Nov;62(5):331-5. Review
215. Araya J, Rodrigo R, Orellana M, Garcia V., *Effects of red wine consumption on kidney FA composition*, *Lipids*. 2003 Mar;38(3):275-9
216. Araya J, Rodrigo R, Orellana M, Rivera G., *Red wine raises plasma HDL and preserves long-chain polyunsaturated fatty acids in rat kidney and erythrocytes*, *Br J Nutr*. 2001 Aug;86(2):189-95
217. Rodrigo R, Bosco C, Herrera P, Rivera G., *Amelioration of myoglobinuric renal damage in rats by chronic exposure to flavonol-rich red wine*, *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Sep;19(9):2237-44. Epub 2004 Jul 6.
218. Rodrigo R, Rivera G, Orellana M, Araya J, Bosco C., *Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine*, *Life Sci*. 2002 Nov 1;71(24):2881-95
219. Bertelli AA, Migliori M, Panichi V, Origlia N, Filippi C, Das DK, Giovannini L., *Resveratrol, a component of wine and grapes, in the prevention of kidney disease*, *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May;957:230-8
220. de Jesus Soares T, Volpini RA, Francescato HD, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM., *Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury*, *Life Sci*. 2007 Aug 2;81(8):647-56. Epub 2007 Jul 24

221. Rashidkhani B, Akesson A, Lindblad P, Wolk A., *Alcohol consumption and risk of renal cell carcinoma: a prospective study of Swedish women*, Int J Cancer. 2005 Dec 10;117(5):848-53
222. Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Albanes D, Bernstein L, van den Brandt PA, Buring JE, Cho E, Folsom AR, Freudenheim JL, Giovannucci E, Graham S, Horn-Ross PL, Leitzmann MF, McCullough ML, Miller AB, Parker AS, Rodriguez C, Rohan TE, Schatzkin A, Schouten LJ, Virtanen M, Willett WC, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA., *Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies*, J Natl Cancer Inst. 2007 May 16;99(10):801-10
223. Pechanova O, Rezzani R, Babal P, Bernatova I, Andriantsitohaina R., *Beneficial effects of Provinols: cardiovascular system and kidney*, Physiol Res. 2006;55 Suppl 1:S17-30. Review
224. Blight, E.G., Dyer W.J. *Can. J.Biochem.Physiol.*1959, 37, 911
225. Galanos D.S., Kapoulas V.M.*Lipid Res.*1962, 3,134
226. Barlett G.R., *J Biol Chem* 1959, 236, 466
227. Galanos D.S., Kapoulas V.M *Biochem. Biophys. Acta.* 1965, 98, 275
228. Singleton V.L., Joseph A., Rossi J.R., *Am. J. Enol.Vitic.*, 144 – 158
229. Stephen M., Prescott M.D., Thomas M., McIntyre M.D., Guy A., Zimmerman M.D., Diana M., Stefforini M.D., *Japanise Circulation Journal* 1996, 60 – 3: 137 – 141
230. Φραγκοπούλου Ε. Ν. *Μελέτη του μεταβολισμού και της δράσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό και νεφρικά κύτταρα, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2004*
231. Sraer, J.D., et al., Stable cell lines of T-SV40 immortalized human glomerular mesangial cells. *Kidney Int*, 1996. **49**: p. 267-70
232. Diamond, J.R. and Karnovsky, M.J., *Focal and segmental glomerulosclerosis: Analogies to atherosclerosis*. *Kidney Int*, 1988. 33: p. 917-924
233. Keane, W.F., Kasiske, B.L., and O'Donnell, M.P., *Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis*. *Am J Nephrol*, 1988. 8: p. 261-71
234. Latta, H. and Maunsbach, A.B., *Relations of the centrilobular region of the glomerulus to the juxtaglomerular apparatus*. *J Ultrastruc Res*, 1986. 6: p. 562-78
235. Chen, W.P., Chen, A., and Lin, C.Y., *In vitro effects of interleukins on human mesangial cells: implications for glomerulonephritis*. *J Pathol*, 1995. **175**(3): p. 327-37
236. De Lange, D.W., Van Golde, P.H., Scholman, W.L.G., Kraaijenhagen, R.J., Akkerman, J.W.N., Van De Wiel, A., *Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation*, *European Journal of Internal Medicine* 2003 14 (6), pp. 361-366
237. Şehirli, Ö., Şakarcı, A., Velioglu-Oğünç, A., Çetinel, S., Gedik, N., Yeğen, B.C., *Resveratrol improves ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats*, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007 222 (1), pp. 33-41