



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥΣ
ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ»



Μπάμπαλης Αθανάσιος

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ
ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΙΑ ΜΑΙΡΗ

ΑΘΗΝΑ, 2016



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥΣ
ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ»

ΜΠΑΜΠΑΛΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

A.M. 4521226

ΑΘΗΝΑ, 2016

Αφιερωμένο

Στους Λουκά, Δημήτρη και Αθηνά

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα κ. Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο βιοχημείας, για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και κατά τη διαδικασία της συγγραφής αυτής της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Ντετοπούλου για την άψογη συνεργασία που είχαμε σε όλη την περίοδο διεξαγωγής των πειραμάτων, την συνεχή βοήθεια της και τις συμβουλές της. Επίσης ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτωρ Χριστίνα Κατσαγώνη για την αγωνία που μοιραστήκαμε και την βοήθεια της, καθώς και όλα τα άτομα που δούλευαν στο εργαστήριο την ίδια περίοδο και βοήθησαν με τις εύστοχες υποδείξεις τους στην πειραματική διαδικασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον φίλο μου Δημήτρη για τις συμβουλές του στο Excel και την υποστήριξή του όταν τον χρειάστηκα οικονομικά.

Τέλος αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον αδερφό μου Λουκά και την σύντροφό μου Αθηνά για την ψυχολογική τους υποστήριξη και την πολύωρη ανοχή τους στη γκρίνια μου κατά τη διάρκεια συγγραφής της πτυχιακής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Περίληψη	1
B. Abstract	2
Γ. Εισαγωγή	
<i>Κεφάλαιο 1^ο: Καρδιαγγειακά</i>	
1.1 Καρδιαγγειακά και Νεότεροι Παράγοντες Κίνδυνου	3
1.2 Αθηροσκλήρωση	4
1.3 Ορισμός Φλεγμονής	6
1.3.1 Διαδικασία Φλεγμονής	6
1.3.2 Κύτταρα - Φορείς της Φλεγμονής και Μεσολαβητές	7
1.3.3 Κυτταροκίνες και Μόρια Προσκόλλησης	9
1.3.4 Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) και Φλεγμονή	10
1.3.5 Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A2 (Lp – PLA2)	11
1.4 Δημιουργία Θρόμβου και Πήξη του Αίματος	14
1.4.1 Παράγοντες που Δρουν Ανασταλτικά στη Θρόμβωση	16
1.4.2 Λύση θρόμβου (Ινωδόλυση)	17
<i>Κεφάλαιο 2^ο: Κρασί</i>	
2.1 Εισαγωγή	20
2.2 Επιδημιολογικά Δεδομένα	20
2.3 Σύσταση Κρασιού	23
2.4 Πιθανοί Μηχανισμοί	25
<i>Κεφάλαιο 3^ο: Μελέτες Παρέμβασης</i>	
3.1 Μεταγευματικές μελέτες	28
3.2 Μακροχρόνιες μελέτες με κρασί	29
Δ. Σκοπός	36
Ε. Μεθοδολογία	
<i>Κεφάλαιο 4^ο: Πειραματικές Μέθοδοι</i>	
4.1 Ερευνητικό πρωτόκολο	37
4.2. Ανθρωπομετρία	38
4.3 Απομόνωση ορού	38
4.4 Απομόνωση PBMC	38
4.5. Αιματολογικές αναλύσεις	39
4.6 Βιοχημικές Αναλύσεις	39

4.7 Προσδιορισμός δραστηριότητας Lp-PLA ₂	39
4.8 Παραλαβή PBMC και ενεργοποίησή τους με LPS.....	41
4.9 Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με Bradford.....	42
4.10 ELISA για προσδιορισμό TNF-a και IL-1b.....	44
4.11 Στατιστική ανάλυση.....	47
ΣΤ. Αποτελέσματα	
5.1 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος.....	48
5.2 Υποκυτταρικός πληθυσμός και κλασικοί βιοχημικοί δείκτες των εθελοντών πριν την παρέμβαση.....	48
5.3 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, υποκυτταρικός πληθυσμός και κλασικοί βιοχημικοί δείκτες των εθελοντών κατά την διάρκεια της παρέμβασης.....	50
5.4 Επίδραση της παρέμβασης στις τιμές δραστηριότητας της Lp-PLA ₂	52
5.5 Επίδραση της παρέμβασης στις τιμές της IL-1b και του TNF-a	52
Z. Συζήτηση	58
Η. Βιβλιογραφία	61
Θ. Παράρτημα	69

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή- Σκοπός: Ιδιαίτερος λόγος έχει γίνει τα τελευταία χρόνια για την ευεργετική επίδραση της μέτριας κατανάλωσης κρασιού σε παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα συμπεριλαμβανομένου της αθηροσκλήρωσης. Η φλεγμονή και η θρόμβωση αποδεδειγμένα εμπλέκονται στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνήσει κατά πόσο η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών και συγκεκριμένα κρασιού που περιέχει αναστολείς του PAF έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε δείκτες φλεγμονής ασθενών με στεφανιαία νόσο.

Μεθοδολογία: 39 άνδρες με στεφανιαία νόσο (ηλικία: 50-75 χρονών), χωρίστηκαν τυχαία σε 3 διαφορετικές ομάδες παρέμβασης. Η μια ομάδα κατανάλωνε κάθε μέρα μαζί με το δείπνο 200 mL κόκκινου κρασιού της ποικιλίας Cabernet Sauvignon (13% v.v αλκοόλ), η άλλη ομάδα κατανάλωνε 65 ml τσίπουρο (40% v.v.) και η τρίτη ομάδα απείχε από το αλκοόλ (< από 2 ποτά/εβδομάδα). Κάθε παρέμβαση είχε διάρκεια 8 εβδομάδες. Πριν την παρέμβαση, μετά από 4 εβδομάδες και στο τέλος της παρέμβασης έγινε απομόνωση ορού καθώς και των PBMC των εθελοντών. Πραγματοποιήθηκε γενική αίματος και μετρήθηκαν η γλυκόζη, η ολική χοληστερόλη, η HDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια. Επίσης έγινε μέτρηση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂. Τέλος μετρήθηκε η έκκριση των κυτταροκινών TNF-α και IL-1b από τα PBMC των εθελοντών απουσία και παρουσία LPS με ELISA και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με την ολική πρωτεΐνη.

Αποτελέσματα: Δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά στα επίπεδα των κλασσικών βιοχημικών δεικτών και στην τιμή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ τόσο ανάμεσα στις 3 ομάδες των εθελοντών όσο και κατά την διάρκεια της παρέμβασης στην κάθε ομάδα ξεχωριστά. Όσον αφορά τα επίπεδα έκκρισης των κυτταροκινών από τα PBMC φαίνεται μια μείωση τους στις 8 εβδομάδες στην ομάδα του κρασιού χωρίς όμως να είναι σημαντική. Σημαντική αύξηση είχαμε στην ομάδα του τσίπουρου στην έκκριση του TNF-α στις 4 ώρες μετά από ενεργοποίηση με LPS (P=0,05) και στις 24 ώρες τόσο παρουσία (P= 0,04) όσο και απουσία του LPS (P=0,05)

Συμπεράσματα: Φαίνεται ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της Lp-PLA₂ που θεωρείτε νεότερος παραγόντας κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Επιπλέον, η κατανάλωση αλκοόλ έχει δυσμενή δράση στην απόκριση των PBMC στην φλεγμονή κάτι που φαίνεται ότι αντισταθμίζεται από τα μικροσυστατικά του κρασιού. Περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο δείγμα θεωρείται απαραίτητη για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

B. ABSTRACT

Introduction: The latest years, the beneficial effect of wine on the risk factors that causes cardiovascular diseases and on atherosclerosis have been mentioned a lot. Inflammation and thrombosis demonstrably are involved in the pathogenesis of atherosclerosis. The aim of the study was to investigate whether moderate consumption of alcoholic drinks and especially wine which contains PAF inhibitors, have beneficial effects in patients inflammatory markers with coronary disease.

Methology: 39 men with coronary heart disease (age: 50-75 years) were randomized into three different intervention groups. One group consumed every day with dinner 200 mL red wine of Cabernet Sauvignon variety (13% vv of alcohol), the other group consumed 65 ml tsipouro (40% vv) and the third group abstained from alcohol (<2 drinks /week). Each intervention lasted eight weeks. Before intervention, after 4 weeks and at the end of the intervention serum and the PBMC of volunteers were isolated. Full blood count was made, glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured. Also the activity of Lp-PLA2 was measured. Finally the secretion of TNF-a cytokine and IL-1b from PBMC of volunteers in the absence and presence of LPS was measured by ELISA and results were normalized to total protein.

Results: There was no significant difference in the levels of classical biochemical markers and the level of the activity of Lp-PLA2 between the three groups of volunteers and during the intervention in each group separately. Regarding the levels of secretion of cytokines by PBMC there is a reduction at 8 weeks in the group of wine, without being significant. Significant growth in the secretion of TNF-a at 4 hours after activation with LPS ($P = 0,05$) and at 24 hours both in the presence ($P = 0,04$) and in the absence of LPS ($P = 0,05$) was measured at tsipouro group.

Conclusions: It appears that moderate alcohol consumption does not affect the activity of Lp-PLA2 which is considered a new risk factor for cardiovascular disease. In addition, alcohol consumption has an adverse effect on the PBMC response to inflammation, which appears to be compensated by wine. Further research on a larger sample is needed to conduct safe conclusions.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ

1.1 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΚΑΙ ΝΕΟΤΕΡΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Στις δυτικές χώρες τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας. Με τον όρο καρδιαγγειακά νοσήματα εννοούμε ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, οι οποίες προσβάλλουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία και περιλαμβάνουν τη στεφανιαία νόσο, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, τη ρευματική καρδιοπάθεια, τη συγγενή καρδιοπάθεια, τα ανευρύσματα, την εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και πνευμονική εμβολή, την περιφερική αρτηριοπάθεια και άλλα πολλά [1]

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι πολυπαραγοντικά και σύνθετης αιτιολογίας, οπότε ο μόνος τρόπος που μπορούν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς είναι η εξέταση όλων των παραγόντων κινδύνου που ενισχύει την ανάπτυξή τους. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι η δημιουργία και η εμπέδωση αθηρωματικής πλάκας που αποτελεί το νούμερο ένα παράγοντα για ανάπτυξη καρδιαγγειακών. Οι παράγοντες κινδύνου διακρίνονται σε τροποποιήσιμους και σε μη τροποποιήσιμους. [2]

Τροποποιήσιμοι Παράγοντες Κινδύνου:

- Αρτηριακή υπέρταση
- Υπερλιπιδαιμία (↑ ολική χοληστερόλη και LDL και ↓HDL)
- Κάπνισμα
- Παχυσαρκία
- Μη υγιεινή διατροφή
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Έλλειψη φυσικής δραστηριότητας
- Κατάχρηση αλκοόλ

- Φαρμακευτική αγωγή π.χ. αντισυλληπτικά
- Διαταραχές ψυχικής υγείας και στρες
- Χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο

Μη Τροποποιήσιμοι Παράγοντες Κινδύνου

- Ηλικία
- Οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου
- Φύλο
- Φυλή και εθνικότητα

Στη διάρκεια των τελευταίων ετών νεότεροι παράγοντες κινδύνου που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη των καρδιαγγειακών έχουν εντοπιστεί ή ανακαλυφθεί εκ νέου.^[3]

Νεότεροι Παράγοντες Κινδύνου

- Υπερτροφία αριστερής κοιλίας
- Ομοκυστεΐνη
- Λιποπρωτεΐνη (α)
- Δείκτες φλεγμονής (π.χ. C-αντιδρώσα πρωτεΐνη)
- Οξειδωτικό στρες
- Υπερτριγλυκεριδαμία
- Υπερπηκτικότητα και μειωμένη δραστηριότητα του ινωδολυτικού μηχανισμού
- Λοιμώδεις παράγοντες

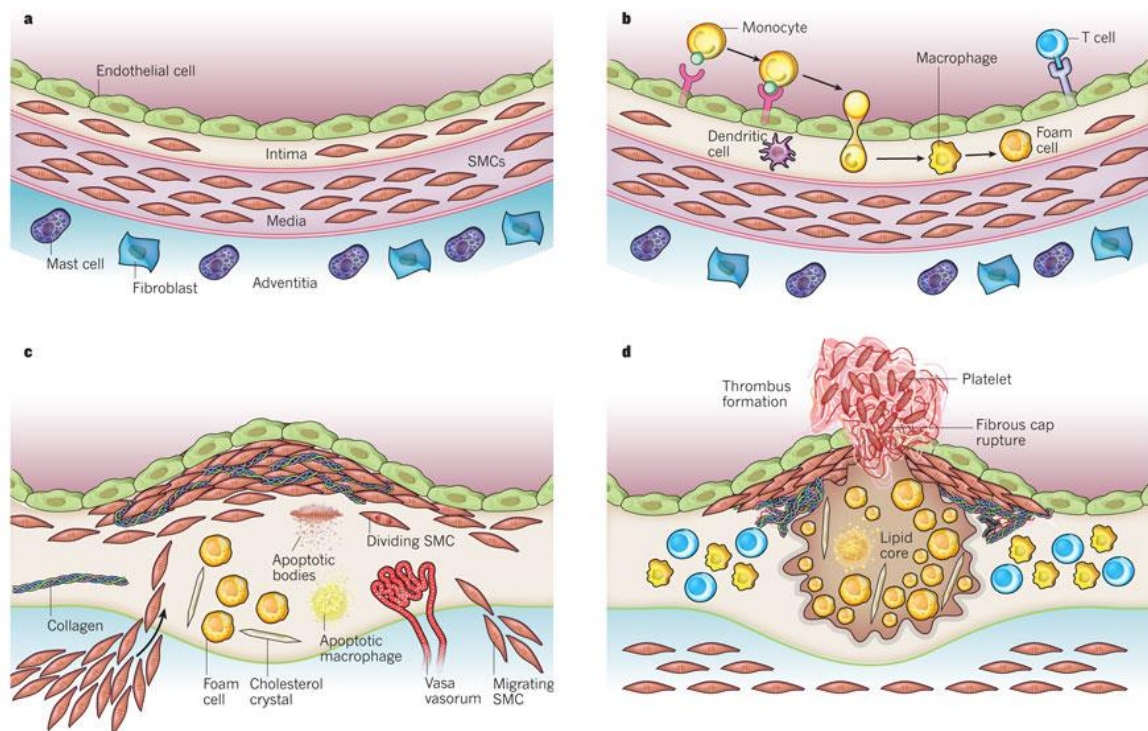
1.2 ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ^[4]

Η αθηροσκλήρωση μπορεί να τοποθετηθεί ως ένας ειδικός τύπος χρόνιας φλεγμονής, που σε σύνδεση με την ελλιπή ρύθμιση της διαδικασίας της θρόμβωσης, είναι η βασική αιτία της στεφανιαίας νόσου και μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο. Χαρακτηρίζουμε ως αθηροσκλήρωση την εναπόθεση πλάκας ανομοιογενούς σύστασης στην επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος. Η αθηροσκληρωτική πλάκα αποτελείται από ένα εξωτερικό ινώδες περίβλημα το οποίο συνίσταται από λεία μυϊκά

κύτταρα, κολλαγόνο, λιποειδή και από ένα νεκρωτικό πυρήνα αποτελούμενο από κυτταρικά αποθέματα, χοληστερόλη και ασβέστιο.

Η αθηρογένεση ξεκινάει σε νεαρή ηλικία. Η χρόνια εναπόθεση των παραπάνω συστατικών οδηγεί σε αγγειακή στένωση η οποία, όταν συμβαίνει σε καρδιακές αρτηρίες, ακολουθεί σε θάνατο του καρδιακού μυ και σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, λόγω παρεμποδίσεως της ροής του αίματος στον καρδιακό μυ από θρόμβους οι οποίοι αποφράζουν τις στεφανιαίες αρτηρίες.

Η αθηρωματική βλάβη θα μπορούσε να κατηγοριοποιηθεί στα ακόλουθα βασικά βήματα: α) δυσλειτουργία του ενδοθηλίου β) διείσδυση των σωματιδίων LDL καθώς και των λευκοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο γ) οξείδωση της LDL δ) συσσώρευση μακροφάγων που προέρχονται από τα μονοκύτταρα τα οποία τελικά αποκτούν τη μορφή αφρωδών κυττάρων ε) μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων (SMC) και εξάπλωση τους στον υποενδοθηλιακό χώρο και στ) εγκατάσταση δομικής ενδοθηλιακής βλάβης που ακολουθείται από εναπόθεση αιμοπεταλίων και σχηματισμό θρόμβου. [5]



Εικόνα 1: Στάδια αθηροσκλήρωσης

1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ^[6]

Ως φλεγμονή ορίζουμε ένα περίπλοκο σύνολο αλληλεπιδράσεων μεταξύ χημικών μηνυμάτων και κύτταρων που μπορούν να πυροδοτηθούν σε οποιοδήποτε ιστό σαν απάντηση σε κάθε είδους βλάβη (τραύμα, μόλυνση, ισχαιμία, τοξική ή αυτοάνοση αντίδραση).^[7] Ανεξαρτήτως της αιτίας όμως, η φλεγμονή είναι σχετικώς στερεότυπη αφού ο μηχανισμός πυροδότησης της περιλαμβάνει κυρίως τον κυτταρικό ή τον ιστικό τραυματισμό. Οι λειτουργίες της φλεγμονής είναι η καταστροφή ή η απενεργοποίηση των ξένων εισβολέων και η εγκατάσταση της επιδιόρθωσης της κυτταρικής βλάβης.^[8]

Εφόσον η φλεγμονή είναι μέρος της μη ειδικής άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο στην εξουδετέρωση πολλών παθογόνων οργανισμών. Κλινικά η φλεγμονή χαρακτηρίζεται και από αλλαγές μιας σειράς εργαστηριακών παραμέτρων, όπως: η αύξηση της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η αύξηση της C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), η αύξηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος, η αύξηση της α2-μακροσφαιρίνης και του ινωδογόνου, ενώ ταυτοχρόνως μειώνεται και η συγκέντρωση άλλων πρωτεϊνών όπως της αλβουμίνης και της τρανσφερίνης, ή μετάλλων όπως του σιδήρου.^[9]

1.3.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Η φλεγμονή, όπως αναφέρθηκε, είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αλληλουχία των γεγονότων που εμφανίζονται σε απάντηση στη λοίμωξη ή στην αλλοίωση των ιστών. Μπορεί να διακριθεί βάση του χρόνου διάρκειας αλλά και των ιστοπαθολογικών αλλαγών σε: οξεία φλεγμονή, η οποία αποτελεί την πρώιμη φάση της φλεγμονής και χαρακτηρίζεται από γρήγορη έναρξη και μικρή διάρκεια (ημέρες) ενώ τα κύτταρα του αίματος που συνήθως εμπλέκονται είναι τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, και σε χρόνια φλεγμονή, η οποία έχει μεγαλύτερη διάρκεια (μέχρι και χρόνια) και τα κύτταρα του αίματος που συνήθως εμπλέκονται είναι τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα.

Η οξεία φλεγμονώδης απάντηση συνοψίζεται σε 6 διακριτές φάσεις:^[8]

- 1) Είσοδος των βακτηρίων στους ιστούς ή τραυματισμός του ιστού και αναγνώριση από τον οργανισμό της ύπαρξης λοίμωξης.
- 2) Αγγειοδιαστολή στη μικροκυκλοφορία στη φλεγμαίνουσα περιοχή που οδηγεί στην αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος στην περιοχή.
- 3) Αύξηση στη διαπερατότητα των πρωτεϊνών στα τριχοειδή και στα φλεβίδια της φλεγμαίνουσας περιοχής, διάχυση πρωτεϊνών και διήθηση υγρού στο μεσοκυττάριο χώρο.
- 4) Χημειοταξία: Έξοδος των λευκοκυττάρων από τα φλεβίδια προς το μεσοκυττάριο υγρό της φλεγμαίνουσας περιοχής.
- 5) Καταστροφή των βακτηρίων στον ιστό είτε μέσω φαγοκυττάρωσης είτε μέσω μηχανισμών που δεν απαιτούν προηγούμενη φαγοκυττάρωση.
- 6) Ιστική επιδιόρθωση και λύση της φλεγμονής.

1.3.2. ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ

Με τον όρο φορείς τις φλεγμονώδους απόκρισης, αναφερόμαστε στα κύτταρα που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής καθώς και χυμικούς παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες και τα λιποειδή που αποτελούν προϊόντα αυτών των κυττάρων ή πρωτεΐνες οξείας φάσης και του συμπληρώματος. Τα κύτταρα με ρόλο κλειδί στη διαδικασία της φλεγμονής είναι τα κύτταρα που λειτουργούν σαν φαγοκύτταρα, τα πιο σημαντικά των οποίων είναι τα λευκοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα από τα οποία προέρχονται τα μονοκύτταρα και τα μακροφαγοκυτταρικά. Επίσης τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν έναν ιδιαίτερο ρόλο τόσο στη φλεγμονώδη απάντηση αλλά και στη μετέπειτα διαδικασία της αθηροσκλήρωσης όπως αναπτύχθηκε και παραπάνω. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές παράγονται από τα κύτταρα του αίματος και από κύτταρα που ανευρίσκονται στους ιστούς (connective tissue MCs, T-cell independent) και στους βλεννογόνους (mucosal MCs, T-cell dependent). Αυτά φέρουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες IgE που αποτελούν υποδοχείς για τον ξένο βιολογικό παράγοντα. Η σύνδεση του βιολογικού παράγοντα με τους υποδοχείς οδηγεί στην αποκοκκιοποίηση των κυττάρων και απελευθέρωση ηπαρίνης, ισταμίνης, σεροτονίνης, SRS-A πολύ σημαντικοί παράγοντες στην φλεγμονώδη αντίδραση. ^[9]

Οι χημικοί μεσολαβητές είναι δυο γενικότερων κατηγοριών 1) πεπτίδια (π.χ. κινίνες) που παράγονται στο σημείο της φλεγμονής μέσω ενζυμικών δράσεων σε πρωτεΐνες του πλάσματος και 2) ουσίες που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο υγρό από κύτταρα που είτε υπάρχουν ήδη στη μολυσμένη περιοχή (π.χ. μαστοκύτταρα) ή έρχονται σε αυτήν την περιοχή κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (π.χ. ουδετερόφιλα). Μερικοί σημαντικοί τοπικοί μεσολαβητές της φλεγμονής παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1.^[10]

Πίνακας 1.1 Μερικοί σημαντικοί μεσολαβητές της φλεγμονής

Μεσολαβητής	Προέλευση
Κινίνες	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Συμπλήρωμα	Παράγονται 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-6, IL-1ra κ.α.) Χημειοκινών (MCP-1, MIP, RANTES, κ.α)	Εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και αρκετούς τύπους κυττάρων που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες.
Λυσοσωμικά ένζυμα, οξείδιο του αζώτου και άλλες ουσίες που παράγονται από το οξυγόνο	Εκκρίνονται από μακροφάγα και ουδετερόφιλα

1.3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ^[9]

Οι κυτταροκίνες είναι μικρομοριακές πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην επικοινωνία των κυττάρων. Παράγονται από πολλά κύτταρα κυρίως ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, μακροφάγα αλλά και από το ενδοθήλιο και κύτταρα συνδετικού ιστού. Συμμετέχουν σε φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση αιμοποιητικών, λεμφικών και μεσεγχυματικών κυττάρων. Αν και η δράση τους έχει συνδεθεί περισσότερο με την ανοσολογική απάντηση, οι κυτταροκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Οι κυτταροκίνες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τις λειτουργικές τους ιδιότητες σε:

- Παράγοντες που διεγείρουν αποικίες όπως μακροφάγων κ.λ.π.
- Παράγοντες ανάπτυξης και διαφοροποίησης όπως ο PGDF, TGF κ.λ.π.
- Ανοσορυθμικές κυτταροκίνες όπως ιντερλευκίνες IL-2, 4, 5, 7 και 9-18, ιντερφερόνη-γ (IFN-γ).
- Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες: παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), IL-1, 6 και 8
- Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αναστολείς παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης: αναστολέας υποδοχέα ιντερλευκίνης-1, IL-4, 10 και 13, οστεοπρωτεγερίνη (OPG)

Οι χημειοκίνες, που παίζουν ίσως τον πιο σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, ανήκουν σε μια ομάδα που τα περισσότερα μέλη έχουν την ιδιότητα να δρουν ως χημειοτακτικές κυτταροκίνες και ενέχονται σε πολλές φλεγμονώδεις νόσους όπως άσθμα, οστεοαρθρίτιδα, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, αθηρωσκλήρωση κ.α.

Το κύριο ερέθισμα για την παραγωγή κυτταροκινών αποτελούν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1 που ασκούν σημαντικές δράσεις στη φλεγμονή αφού ενεργοποιούν τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και μηχανισμούς ενδαγγειακής πήξης και επιδρούν στο ενδοθήλιο.

Το ενδοθήλιο παίζει και αυτό το δικό του ρόλο στη φλεγμονή μέσω της παραγωγής PAF, προσταγλαδινών και λευκοτριενίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και με την επαγωγή μορίων προσκόλλησης που ευνοούν την είσοδο των λευκοκυττάρων στους ιστούς. Οι πιο σημαντικές είναι οι σελεκτίνες (E και P) και τα ανοσοσφαιρινικής δομής

μόρια ICAM-1 και VCAM-1. Οι σελεκτίνες είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται μετά από ενεργοποίηση στο αγγειακό ενδοθήλιο και επάγουν το αργό κύλισμα των κυττάρων πάνω στο ενδοθήλιο. Οι υποδοχείς τους είναι σιαλοβλεννίνες της μεμβράνης των κυττάρων. Τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που επάγονται στο αγγειακό ενδοθήλιο και οδηγούν σε ισχυρή προσκόλληση των κυττάρων στο ενδοθήλιο για το πέρασμα στους ιστούς. Οι υποδοχείς τους είναι οι ιντεγκρίνες.

1.3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF) ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ^[10]

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) ή 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη είναι πολύ σημαντικός μεσολαβητής της φλεγμονής. Παράγεται από διάφορα κύτταρα όπως είναι τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αφρώδη κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους. Έτσι κύτταρα πολλών ιστών μπορούν να συνθέσουν PAF είτε σε φυσιολογική κατάσταση είτε μετά την ενεργοποίησή τους. Η σύνδεση του PAF στη φλεγμονή πηγάζει από την ικανότητά του να διεγείρει τα φλεγμονώδη κύτταρα, να παρεμβάλλεται στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου- κυττάρου και στην ενδοκυτταρική σήμανση. Ο PAF φαίνεται να έχει κυρίαρχο ρόλο σε θρομβωτικές επιπλοκές, αφού προκαλεί την απελευθέρωση ενεργών ριζών, συμμετέχει στην οξείδωση της LDL και προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Επίπροσθέτως, η αυξημένη δράση του PAF στο αίμα δύναται να προκαλέσει την έναρξη μιας ταχείας φλεγμονώδους απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου της αναγνώρισης του υποδοχέα του μορίου αυτού, οδηγώντας σε αύξηση στη διαπερατότητα του ενδοθηλίου. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν και εκθέτουν PAF στην επιφάνειά τους παράγοντας περισσότερη ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων. Το γεγονός αυτό είναι ένα σημαντικό στάδιο στη γένεση αθηροσκλήρωσης όπως είδαμε παραπάνω.

Ο PAF φαίνεται πως επιδρά σε διάφορα κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία της φλεγμονής. Ο υποδοχέας του PAF στα αιμοπετάλια έχει συνδεθεί με την

σύνδεση του ινοδωγόνου με την ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta_3$, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση αραχιδονικού οξέως και στη συνέχεια διαφόρων χυμοκινών, κυττοκινών και αυξητικών παραγόντων οι οποίοι συμμετέχουν στη φλεγμονή και στη θρόμβωση. Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται από τον PAF μέσω του υποδοχέα του PAF. Αυτή η ενεργοποίηση προκαλεί την «μέσα-έξω» σηματοδότηση β_2 (CD11 / CD18) ιντεγκρινών, με επακόλουθη ενίσχυση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα φέρουν επίσης τον υποδοχέα του PAF στην πλασματική τους μεμβράνη και συνεπώς ενεργοποιούνται από τον PAF. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε έκφραση της P-σελεκτίνης. Τα μονοκύτταρα τότε συγκολλούνται με ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια τα οποία επίσης έχουν P-σελεκτίνη και η συγκόλληση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών. Αυξημένη δραστηριότητα του PAF στο αίμα μπορεί να οδηγήσει στην ταχεία φλεγμονώδη απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της αναγνώρισης του υποδοχέα του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου η οποία είναι ένα κρίσιμο γεγονός στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Οι παραπάνω διαδικασίες οδηγούν στην απελευθέρωση πολλών άλλων λιπιδικών μεσολαβητών, κυτοκινών, ενζύμων, και διαφόρων μορίων συγκόλλησης όπως οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες. Τα προϊόντα αυτά συμβάλλουν στην διάδοση της αθηροσκλήρωσης. Είναι λοιπόν προφανές ο ρόλος κλειδί του PAF στη διαδικασία της φλεγμονής και της θρόμβωσης.

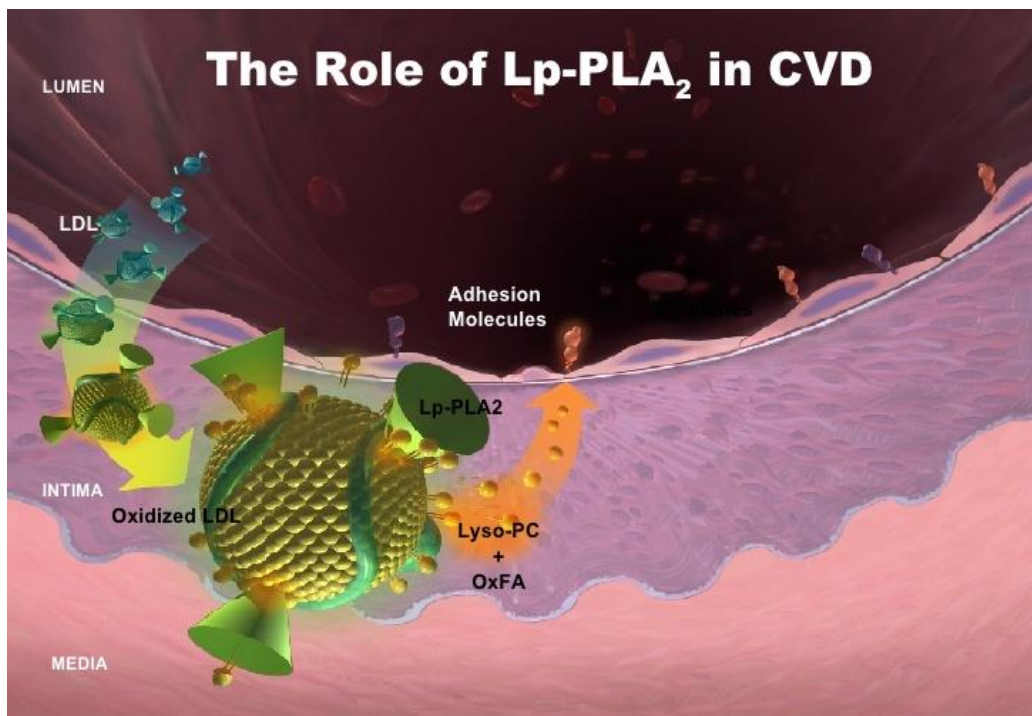
1.3.5 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A_2 (Lp – PLA₂)

Η λιποπρωτεϊνική φωσφαλιπάση A_2 (Lp-PLA₂) είναι μια φωσφολιπάση A_2 ανεξάρτητη ασβεστίου, η οποία εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα, κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, ενώ παράλληλα υπερεκφράζεται στις αθηρωματικές πλάκες σε περιοχές αυξημένης συσσώρευσης μακροφάγων.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της Lp-PLA₂ στο πλάσμα (περίπου 70% έως 80%) είναι συνδεδεμένο με την LDL ενώ το υπόλοιπο συνδέεται με τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL), τη λιποπρωτεΐνη (a) [(Lp(a)], και τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) ^[11]. Η αρχική ονομασία της Lp-PLA₂ ήταν PAF-ακετυλοϋδρολάση γιατί η πρώτη δράση που περιγράφηκε για το ένζυμο αυτό ήταν η

υδρόλυση και απενεργοποίηση του ισχυρού φωσφολιπιδιακού διαμεσολαβητή της φλεγμονής PAF (Platelet-Activating Factor; παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων).^[12] Εξαιτίας αυτής της δράσης, η Lp-PLA2 θεωρήθηκε αρχικά ότι είναι ένα αντιφλεγμονώδες και αντιαθηρογόνο ένζυμο. Ωστόσο, νεώτερες μελέτες απέδειξαν ότι η Lp-PLA2 αποικοδομεί τα πολικά οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παράγονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, ή την οξείδωση κυτταρικών μεμβρανών ή κατά την κυτταρική απόπτωση. Η υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την Lp-PLA2 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lysoPC) και οξειδωμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (oxNEFA), τα οποία εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα προφλεγμονωδών και προαποπτωτικών δράσεων.^[13,14] Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι τα προφλεγμονώδη αυτά λιποειδή έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην προαγωγή και ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Επίσης τα λιποειδή αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα, επάγοντας την απόπτωση^[15-16], την ενεργοποίηση και στρατολόγηση των λεμφοκυττάρων,^[17] των μακροφάγων και των μονοκυττάρων στην αθηρωματική πλάκα,^[18] και αναστέλλοντας την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων^[19-20]. Τα συσσωρευμένα φλεγμονώδη κύτταρα στην αθηρωματική πλάκα παράγουν και εκκρίνουν περισσότερη Lp-PLA2 με αποτέλεσμα μια κυκλικά αυξανόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ παραγωγής της Lp-PLA2 και εξέλιξης του αθηρώματος. Επιπρόσθετα τα προϊόντα υδρόλυσης των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την Lp-PLA2 (lysoPC και oxNEFA) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και τη ρήξη της ασταθούς πλάκας^[21]. Τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο της Lp-PLA2 στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.^[22] Πολλές κλινικές μελέτες τα τελευταία χρόνια απέδειξαν ότι η Lp-PLA2 αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την καρδιαγγειακή νόσο (CVD) καθώς επίσης και έναν αξιόπιστο δείκτη πρόγνωσης της CVD, τόσο στην πρωτογενή όσο και στη δευτερογενή πρόληψη.^[23-24] Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών συμφωνούν ότι τα αυξημένα επίπεδα της Lp-PLA2 στο πλάσμα συσχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο ανεξάρτητα από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για CVD.^[25] Στις μελέτες πρωτογενούς πρόληψης αποδείχθηκε η συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων Lp-PLA2 και κινδύνου για στεφανιαία επεισόδια, εγκεφαλικά επεισόδια ή παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, σε ασθενείς χωρίς ιστορικό CVD.

Παράλληλα στις μελέτες δευτερογενούς πρόληψης, παρατηρήθηκε ότι η Lp-PLA₂ βοηθάει στην ταυτοποίηση των ασθενών υψηλού και πολύ-υψηλού κινδύνου για στεφανιαίο επεισόδιο ή εγκεφαλικό ισχαιμικό επεισόδιο.^[23-24] Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν σε πρόσφατη μετα-ανάλυση 32 κλινικών μελετών που έγινε από την ομάδα συνεργασίας για τη μελέτη της Lp-PLA₂ (Lp-PLA₂ Studies Collaboration group).^[65]



Εικόνα 2: Η Lp-PLA₂

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι το αποτέλεσμα των κλινικών ερευνών για το φάρμακο Darapladib. Το φάρμακο αυτό είναι ένας αναστολέας της δράσης της Lp-PLA₂. Ενώ η κατανάλωση του φαρμάκου είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ (από 43% έως 65% ανάλογα με την δόση), δεν υπήρχε σημαντική μείωση σε κανένα παράγοντα φλεγμονής εκτός της IL-6 (12% μείωση σε σχέση με το placebo). Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι η αύξηση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ είναι μια απάντηση στη φλεγμονή και όχι η αιτία, και παρόλο τον διπλό της ρόλο, πιθανώς να υπερισχύει η αντιφλεγμονώδης δράση της. Σε κάθε περίπτωση δε αμφισβητείται ο ρόλος της ως δείκτης για καρδιαγγειακά νοσήματα.^[26]

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως σύμφωνα με την έρευνα των Hatoum et al του 2009, η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ μπορεί να επηρεαστεί από την διατροφή και τον

τρόπο ζωής. Η έρευνα έγινε σε 1731 υγιείς εθελοντές. Συγκεκριμένα έδειξε πως αντικατάσταση του 5% της ημερίσιας πρόσληψης σε υδατάνθρακες από πρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας της Lp-PLA2. Όμοια αποτελέσματα είχε η αύξηση της κατανάλωσης αλκοόλ κατα 15g/ημέρα. Αντίθετα, το κάπνισμα, η παχυσαρκία και η κατανάλωση ασπιρίνης σχετίστηκαν με αύξηση της δραστηριότητας της Lp-PLA2.^[27]

1.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΘΡΟΜΒΟΥ ΚΑΙ ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ^[28]

Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος γενικά κινητοποιείται όταν το αίμα εξέλθει από τα αγγεία και έλθει σε επαφή με «διαβρεχόμενη» επιφάνεια (κολλαγόνο, τραυματισμένο ενδοθήλιο κ.α. τότε ο μηχανισμός της πήξης του αίματος δραστηριοποιείται. Ο ρόλος του μηχανισμού πήξης είναι η αλλαγή (στη θέση βλάβης του αγγείου) του διαλυτού ινωδογόνου σε αδιάλυτο δίκτυο ινώδους (θρόμβος) και ο εγκλωβισμός ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων στο ινώδες δίκτυο αυτό, ώστε να σταθεροποιηθεί ο αιμοπεταλιακός θρόμβος. Η θρόμβωση ισχυροποιείται από την πήξη του αίματος που συμπεριλαμβάνει μια πληθώρα ενζυμικών αντιδράσεων. Η ενεργοποίησή της μπορεί να γίνει μέσω δύο πορειών είτε με ενδογενή διέγερση (ενδογενής πορεία) είτε με εξωγενή διέγερση π.χ. τραυματισμός (εξωγενής πορεία). Οι δυο πορείες μεταξύ τους δεν είναι ανεξάρτητες αλλά διεπιδρούν και απολήγουν στο σχηματισμό του ενζύμου που καταλύει την παραγωγή της θρομβίνης.

Η εξωγενής πορεία ενεργοποιείται όταν τα ιστικά κύτταρα στην περιοχή της βλάβης έρθουν σε επαφή με το αίμα. Συγκεκριμένα μια πρωτεΐνη που εκτίθεται στην επιφάνεια των ιστικών κυττάρων και ονομάζεται ιστικός παράγοντας συνδέεται με μια πρωτεΐνη του πλάσματος, τον παράγοντα VII, ο οποίος καταλύει την ενεργοποίηση του και την παραγωγή του παράγοντα VIIa. Στη συνέχεια ακολουθεί η μετατροπή του παράγοντα IX σε IXa και του παράγοντα X σε Xa.

Η ενδογενής πορεία ενεργοποιείται από μια πρωτεΐνη του πλάσματος, τον παράγοντα XII, ο οποίος μετατρέπεται στην ενεργή μορφή του (XIIa) όταν έρθει σε επαφή με συγκεκριμένες επιφάνειες, όπως το εκτεθειμένο στην περιοχή της βλάβης

κολλαγόνο. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδοχική ενεργοποίηση των παραγόντων XI σε XIa, IX σε XIa και X σε X_a.

Ο παράγοντας X_a, στον οποίο καταλήγουν και οι δύο πορείες, καταλύει την μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η παραγόμενη θρομβίνη, ενεργοποιώντας πολλά ένζυμα του καταρράκτη των ενζυμικών αντιδράσεων, ενισχύει την παραγωγή της (θετική ανατροφοδότηση). Η θρομβίνη στη συνέχεια καταλύει την υδρόλυση αρκετών αρνητικά φορτισμένων πεπτιδίων από το ινωδογόνο προς σχηματισμό μονομερούς ινώδους. Τα μονομερή του ινώδους συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα δίκτυο νηματίων, το ινώδες, το οποίο σταθεροποιείται με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Η δημιουργία των δεσμών καταλύεται από τον παράγοντα XIII, ο οποίος ενεργοποιείται σε XIIIa από τη θρομβίνη. Η δράση του παράγοντα XIIIa προκαλεί το σχηματισμό ενός σταθερού τρισδιάστατου δικτύου, το οποίο παγιδεύει τα αιμοπετάλια και τα άλλα κύτταρα σχηματίζοντας ένα θρόμβο που καλύπτει το κενό που έχει δημιουργηθεί στο αγγείο.

Αρκετές από τις αντιδράσεις του καταρράκτη πήξης απαιτούν την ύπαρξη ιόντων ασβεστίου και τη σύνδεση των συμπλόκων στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων. Επιπλέον η βιταμίνη K εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία της πήξης αφού είναι απαραίτητη για την αντίδραση καρβοξυλίωσης των ομάδων του γλουταμικού σε αρκετούς από τους παράγοντες πήξης (VII, IX, X, II).

Παράγοντας	Όνομα	Δράση
I	Ινωδογόνο	Πρόδρομο μόριο του μονομερούς ινώδους
II	Προ-θρομβίνη	Πρωτεάση σερίνης
III	Ιστικός Παράγοντας	Υποδοχέας και συμπαράγοντας
IV	Ca ²⁺	Συμπαράγοντας
V	Προ-αξελερίνη	Συμπαράγοντας
VII	Προ-κονβερτίνη	Πρωτεάση σερίνης
VIII	Αντι- αιμοφιλικός παράγοντας A	
IX	Αντι- αιμοφιλικός παράγοντας B	Πρωτεάση σερίνης

	(Christmas factor)	
X	Παράγοντας Stuart-Power	Πρωτεάση σερίνης
XI	Πρόδρομη θρομβοπλασίνη πλάσματος (plasma thromboplastin antecedent) Αντι- αιμοφιλικός παράγοντας A	Πρωτεάση σερίνης
XII	Παράγοντας Hageman	Πρωτεάση σερίνης
XIII	Παράγοντας σταθεροποίησης ινώδους	Ca ²⁺ -εξαρτώμενη τρανσγλουταμινάση
	Προκαλλικρεΐνη, Παράγοντας Fletcher	Πρωτεάση σερίνης
	Κινογόνο υψηλού MB, Παράγοντας Fitzgerald	Συμπαράγονας
HMWK	Υψηλού Μοριακού Βάρους Κινογόνο	Αμοιβαία ενεργοποίηση XII, XI, και PK
PK	Πρι-καλλικρεΐνη	Ενεργοποιεί XII διασπά HMWK
PF	Αιμοπεταλιακοί Παράγοντες	

1.4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΣΤΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ ^[28]

Ο σχηματισμός του θρόμβου πρέπει να περιοριστεί στο σημείο της βλάβης και να μην επεκταθεί σε φυσιολογικές περιοχές του ενδοθηλίου. Για αυτό το λόγο η θρόμβωση είναι μια διαδικασία που ελέγχεται από τον οργανισμό. Τα σημαντικότερα σημεία ρύθμισης είναι τα εξής:

1) Η σύνθεση και η έκκριση προστακυκλίνης (PGI₂ –αγγειοδιασταλτικός-αντιθρομβωτικός παράγων) όπως και του μονοξειδίου του αζώτου (NO-ενδοθηλιακός χαλαρωτικός παράγων), το οποίο παράλληλα με την αγγειοδιασταλτική του δράση, εμποδίζει την προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο.

2) Η ηλεκτρική αρνητικότητα στην επιφάνειά του ενδοθηλίου που απωθεί αρνητικώς φορισμένα ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και πρωτεΐνες του πλάσματος.

3) Η αποικοδόμηση του ADP των ενδοθηλιακών κυττάρων (το ADP συντελεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων).

4) Η θρομβίνη εκτός από την προ-θρομβωτική δράση εμφανίζει και αντι-θρομβωτική (αρνητική ανατροφοδότηση) η οποία εκδηλώνεται με δέσμευσή της σε ειδικό υποδοχέα στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων που ονομάζεται θρομβοτροποποιητίνη (θρομβομοντουλίνη). Η δέσμευση της θρομβίνης ενεργοποιεί την πρωτεΐνη C η οποία δεσμεύεται με την πρωτεΐνη S και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC, activated protein C) αδρανοποιεί τους παράγοντες Va και VIIIa και μειώνει την παραγωγή θρομβίνης. Επιπλέον η APC επάγει την παραγωγή προστακυκλίνης.

5) Ο αναστολέας της πορείας του ιστικού παράγοντα (TFPI, tissue factor pathway inhibitor) αποτελεί μια πρωτεΐνη του πλάσματος που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο παράγοντας αυτός αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου του ιστικού παράγοντα με τον παράγοντα VIIa και τον παράγοντα Xa.

6) Η δράση των πρωτεασών σερίνης αναστέλλεται μέσω ειδικών πρωτεϊνών οι οποίες ονομάστηκαν σεπρίνες (Serpins, serine protease inhibitors). Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα στο πλάσμα και ελέγχουν την δράση των πρωτεασών σερίνης. Η δράση τους αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι μοιάζουν με το φυσικό υπόστρωμα της κάθε πρωτεάσης και δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο εμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου. Η αντιθρομβίνη III αποτελεί μια σεπρίνη η οποία αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης. Η ηπαρίνη η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και στα κοκκία των μαστοκυττάρων είναι θετικός αλλοστερικός τροποποιητής της αντιθρομβίνης III. Η αντιθρομβίνη III μπορεί να αναστείλει τους παράγοντες XIIIa, XIa, IXa και Xa.

1.4.2 ΛΥΣΗ ΘΡΟΜΒΟΥ (ΙΝΩΔΟΛΥΣΗ) ^[28, 29]

Ο σχηματισμός του θρόμβου στο σημείο της βλάβης είναι ένα μεταβατικό στάδιο στην επιδιόρθωση του αγγείου. Ο σχηματιζόμενος επομένως θρόμβος πρέπει να απομακρυνθεί μετά την επούλωση του αγγείου. Η απομάκρυνση ή λύση του γίνεται μέσω ενός καταρράκτη ενζυμικών αντιδράσεων (παρόμοιο με αυτό της πήξης) που ονομάζεται ινωδόλυση ή θρομβόλυση. Ο μηχανισμός της ινωδόλυσης αρχίζει τη δεύτερη μέρα από την έναρξη του φαινομένου της πήξης του αίματος και διαρκεί μερικές ημέρες, έως ότου τελικά διαλυθεί ο θρόμβος. Ο σχηματισμός και η λύση του ινώδους έχουν μια

δυναμική σχέση, η οποία καθορίζει το αιμοστατικό αποτέλεσμα. Έτσι αυξημένη ινωδολυτική δραστηριότητα οδηγεί σε αιμορραγική διάθεση, ενώ αντίθετα, μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα, οδηγεί σε αυξημένη εναπόθεση ινώδους στον οργανισμό.

Τα προϊόντα που προκύπτουν από την ινωδόλυση, ασκούν σημαντικές επιδράσεις στον οργανισμό, όπως: αύξηση της σύνθεσης ινωδογόνου στο ήπαρ, μιτωτική δράση στα κύτταρα, επίδραση στην ικανότητα συγκόλλησης των αιμοπεταλίων (θετική ή αρνητική), χημειοτακτική έλξη των λεμφοκυττάρων κ.α.

Το φαινόμενο της ινωδόλυσης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως ορμόνες, βιταμίνες, ακτινοβολίες, θερμοκρασία του σώματος, ηλικία, σωματική άσκηση, το φύλλο, κ.α., παρουσιάζει δε ημερήσια διακύμανση, η οποία κυρίως οφείλεται σε διακύμανση του PAI-1. Έτσι, επειδή κατά τις πρωινές ώρες μειώνεται η ινωδολυτική δραστηριότητα του αίματος και αυξάνει η ικανότητα συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, δικαιολογείται και το αυξημένο ποσοστό εμφάνισης εμφραγμάτων κατά το χρονικό διάστημα αυτό.

Η φυσιολογία του ινωδολυτικού συστήματος είναι ανάλογη με εκείνη του συστήματος πήξης: Δημιουργείται αρχικά ένα προένζυμο του πλάσματος το πλασμινογόνο, το οποίο είναι μια πρωτεΐνη που έχει μεγάλη συγγένεια για το ινώδες και ενσωματώνεται στο σχηματιζόμενο ινώδες δίκτυο. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται στην ενεργή του μορφή που είναι η πλασμίνη, μέσω ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η ενεργοποίηση μπορεί να λάβει χώρα τόσο στο αίμα όσο και στην επιφάνεια του θρόμβου. Η πλασμίνη είναι πρωτεάση σερίνης και διασπά το ινώδες προκαλώντας λύση του θρόμβου.^[11]

Οι **παράγοντες ενεργοποίησης του πλασμινογόνου** διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες.

Ενδογενείς Παράγοντες:

- Ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (t-PA, tissue- Plasminogen Activator) παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ενσωματώνεται στο θρόμβο κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του. Ο t-PA μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή πλασμίνης στην κυκλοφορία του αίματος, όμως η πλασμίνη απενεργοποιείται γρήγορα μέσω δέσμευσης με την ειδική σερίνη την α₂-αντιπλασμίνη. Η παρουσία του ινώδους είναι σημαντική αφ' ενός για τη δράση του t-PA, αφ' ετέρου για την προστασία της πλασμίνης

από τις σεπρίνες του πλάσματος. Η APC εκτός από το να μειώνει τη θρόμβωση επάγει και την έκκριση του t-PA και ταυτόχρονα αναστέλλει τον αναστολέα του t-PA τον PAI-1 (PA Inhibitor-1).

- Η ουροκινάση ενεργοποιεί επίσης το πλασμινογόνο του πλάσματος και το πλασμινογόνο που βρίσκεται στο θρόμβο του αίματος. Έτσι όταν χορηγηθεί σε άτομο με έμφραγμα, λύει το θρόμβο.

Εξωγενείς Παράγοντες:

- Η στρεπτοκινάση σχηματίζει το ενεργό σύμπλεγμα στρεπτοκινάση-πλασμινογόνο, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί και άλλα μόρια πλασμινογόνου του πλάσματος ή των θρόμβων αίματος.

Οι ανασταλτικοί παράγοντες του ινωδολυτικού συστήματος διακρίνονται σε ανασταλτικούς παράγοντες του πλασμινογόνου και των ενεργοποιών του και σε ανασταλτικούς παράγοντες της πλασμίνης.

Ανασταλτικοί παράγοντες του πλασμινογόνου και των ενεργοποιών του πλασμινογόνου:

- Ο αναστολέας του πλασμινογόνου είναι γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος που μπορεί να δεσμεύσει μέχρι και το 50% του πλασμινογόνου.

- Οι αναστολείς των ενεργοποιών του πλασμινογόνου είναι ο PAI-1, PAI2, PAI3 και η πρωτεάση νεξίνη. Ο PAI-1 είναι γλυκοπρωτεΐνη που απαντά στο πλάσμα του αίματος και τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Η σύνθεση και η έκκρισή του επηρεάζονται θετικά από τη θρομβίνη, την IL-1, τα γλυκοκορτικοειδή, την Lp(a) κ.α. Εμφανίζεται αυξημένος κατά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε μετεγχειρητική περίοδο, σε παχυσαρκία κ.α. Αδρανοποιεί εκτός από το πλασμινογόνο και τον t-PA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΚΡΑΣΙ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενας σημαντικός παράγοντας για τη διατήρηση της υγείας είναι η διατροφή που έχει αποτελέσει σημαντικό πεδίο συζήτησης και από τα μέσα του 20ου αιώνα έχει αναγνωριστεί η τόσο σημαντική αξία της. Ποικίλες επιδημιολογικές μελέτες έχουν διερευνήσει το ρόλο διάφορων θρεπτικών συστατικών στις συνέπειες χρόνιων νοσημάτων και στην αύξηση της μακροβιότητας.^[30, 31, 32] Επομένως, για αυτό το λόγο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), συμπεριλαμβανομένου διαφόρων χωρών όπως και της Ελλάδας, έχουν κοινοποιήσει διατροφικές οδηγίες για τον πληθυσμό τους με τη μορφή προτύπων (patterns).

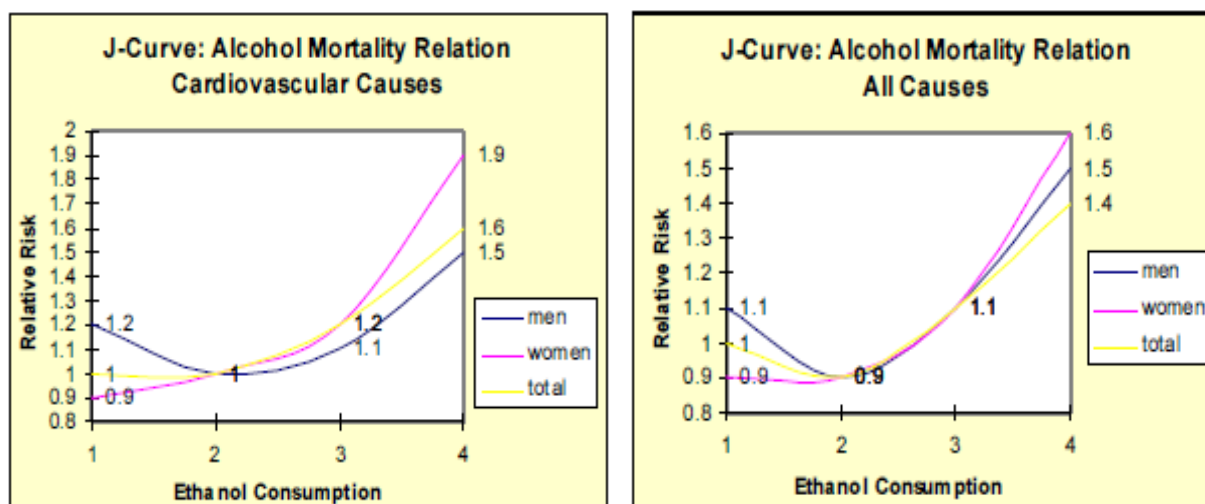
Ενα αρκετά διαδεδομένο διατροφικό πρότυπο είναι η Μεσογειακή δίαιτα, που έχει παραταθεί σε πολλές μελέτες με περιορισμένα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας από καρδιαγγειακά, εμφάνισης καρκίνου κ.α.^[31,32] Χαρακτηριστικό γνώρισμα του μοντέλου της Μεσογειακής δίαιτας, είναι η μέτρια κατανάλωση κρασιού (1-2 ποτήρια την ημέρα), το οποίο συνοδεύει συνήθως τα γεύματα.^[33]

Η κατανάλωση ελαιόλαδου και κρασιού έχουν συσχετιστεί με μείωση διαφόρων βιοχημικών δεικτών, καθώς και την πρόληψη πολλών χρόνιων νοσημάτων. Τα προαναφερθέντα έχουν βρεθεί στο στόχαστρο των ερευνητών καθώς αποτελούν δύο σημαντικά συστατικά που διαφοροποιούν τη Μεσογειακή δίαιτα από άλλα διατροφικά μοντέλα.^[21]

2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η αθηρωμάτωση, είναι μια φλεγμονώδης κατάσταση που δύναται να καταλήξει στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα τελευταία χρόνια επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση 20-30 γρ αλκοόλ την ημέρα, συσχετίζεται με ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας

νόσου, εμφράγματος του μυοκαρδίου καθώς και της θνητότητας που συνδέει τις ασθένειες αυτές. ^[34,35,36] Μάλιστα η σχέση της κατανάλωσης αλκοόλ και του κινδύνου θανάτου από διάφορα αίτια έχει σχήμα U (U- shaped curve), καθώς η υπερβολική κατανάλωση ή η μηδενική αυξάνουν τον κίνδυνο θανάτου, συγκριτικά με τη μέτρια κατανάλωση. ^[34,35]



Εικόνα 3: Κίνδυνος θανάτου από όλα τα αίτια και από καρδιαγγειακά νοσήματα σε σχέση με το αλκοόλ. 1:<1 ποτό το μήνα, 2:< 1-2 ποτά την ημέρα, 3:> 3-5 ποτά την ημέρα, 4:>6 ποτά την ημέρα

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στο κρασί και την ευεργετική του δράση όσον αφορά τα καρδιαγγειακά, στράφηκε μετά το 1992 και την παρατήρηση του Renaud De Lorgeril, το επονομαζόμενο «Γαλλικό παράδοξο». Συγκεκριμένα ο De Lorgeril προσπάθησε να διερευνήσει γιατί οι Γάλλοι που κατανάλωναν αρκετά λιπαρά μέσα από τη διατροφή που έκαναν εμφάνιζαν χαμηλή συχνότητα καρδιαγγειακών νοσημάτων, και συσχέτισε την συστηματική κατανάλωση κρασιού με μειωμένο κίνδυνο από καρδιαγγειακά νοσήματα. ^[37] Αμέσως μετά, η υποστήριξη για μια εντονότερη καρδιοπροστατευτική επίδραση της κατανάλωσης ερυθρού οίνου σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά, ήρθε από τη μελέτη Heart της Κοπεγχάγης, η οποία έγινε προοπτικά για πάνω από 12 χρόνια σε δείγμα 13.285 ανδρών και γυναικών. ^[28] Τα αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη πρότειναν ότι τα άτομα με χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση κρασιού διέτρεχαν το μισό κίνδυνο θανάτου από κάποια καρδιαγγειακή νόσο σε σχέση με εκείνους που δεν έπιναν ποτέ κρασί. Η μύρα και τα αναψυκτικά δεν έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα. Τα ευρήματα αυτά ενισχύθηκαν όταν η ίδια ομάδα, που εκτελούσε συγκεντρωτικές διαχρονικές μελέτες παρατήρησης (cohort studies), συμπεριέλαβε και

άλλους συγχυτικούς παράγοντες όπως τον τύπο του καταναλισκόμενου αλκοόλ, το κάπνισμα, το επίπεδο εκπαίδευσης, τη σωματική δραστηριότητα, και το ΔΜΣ. Τα άτομα που κατανάλωναν μια μέτρια ποσότητα αλκοόλ είχαν σχετικό κίνδυνο 0,9 σε σχέση με αυτούς που δεν έπιναν. Όμως τα άτομα που κατανάλωναν κρασί είχαν σχετικό κίνδυνο 0,66 σε σχέση με αυτούς που δεν έπιναν τίποτα. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση κρασιού μπορεί να έχει μεγαλύτερη ευεργετική επίδραση στη θνησιμότητα από κάθε αιτία σε σχέση με την προστασία που επιφέρει η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ.^[37]

Το όφελος του κρασιού για την υγεία σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά υποστηρίζεται από μια μετα-ανάλυση του Castelnuovo όπου εξετάστηκαν 26 έρευνες. Τα δεδομένα από 13 μελέτες που αφορούν 209.418 άτομα, έδειξαν ότι η μείωση του κινδύνου για αγγειακά επεισόδια που συνδέεται με την κατανάλωση κρασιού ήταν 32%, και μόνο 22% από την κατανάλωση μπύρας.^[38]

Έκτοτε πραγματοποιήθηκαν πολλές επιδημιολογικές μελέτες και μάλιστα στην τελευταία έκθεση της Framingham Study που συσχέτιζε την κατανάλωση αλκοόλ με το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, μόνο το κρασί σχετιζόταν με μειωμένο κίνδυνο και όχι η μπύρα ή τα άλλα οινοπνευματώδη ποτά.^[39]

Υπάρχουν όμως και άλλες εξίσου σημαντικές μελέτες οι οποίες καταλήγουν σε αντίθετα συμπεράσματα όσον αφορά το κρασί. Πιο αναλυτικά στην Physicians Health Study στην οποία παρακολουθούνταν 21537 γιατροί από τις ΗΠΑ για 12 χρόνια προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι άνδρες που διατηρούσαν μια μέτρια κατανάλωση 2-6 ποτών την εβδομάδα στη μορφή είτε κρασιού, είτε μπύρας, είτε κάποιου λικέρ, είχαν σημαντικά μειωμένο κίνδυνο συγκριτικά με εκείνους που δεν κατανάλωναν καθόλου ή κατανάλωναν σπάνια αλκοόλ.^[33] Επίσης σε παλαιότερες μελέτες των Klatsby et al,^[34] δεν φάνηκε υπεροχή του κρασιού σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά, κάτι που όμως φάνηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα το 2003, όπου παρατηρήθηκε ισχυρότερη συσχέτιση του κρασιού σε σχέση με την πρόσληψη αλκοόλ γενικότερα.^[40]

Βέβαια, δεν είναι εύκολο να καταλήξει κανείς στο εάν το αλκοόλ ή ειδικά το κρασί είναι αυτό που έχει ευεργετική δράση ενάντια στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθώς σε όλες σχεδόν τις έρευνες υπάρχουν περιορισμοί λόγω των διαφόρων συγχυτικών παραγόντων που δεν είναι εύκολο να ληφθούν υπόψη.

Για παράδειγμα αυτή η προστατευτική δράση μπορεί να οφείλεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των ατόμων που προτιμούν το κρασί (φύλο, κάπνισμα, κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, διατροφικές συνήθειες κ. α.) ή στον τρόπο με τον οποίο καταναλώνεται. Συνήθως το κρασί προτιμάται κατά τη διάρκεια των γευμάτων, σε αντίθεση με τη μύρα ή τα άλλα οινοπνευματώδη ποτά που συνήθως καταναλώνονται άστατα καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας.^[41,33] Αυτό επιτρέπει καλύτερη απορρόφηση της αιθανόλης και καθυστερεί τις μεταγευματικές μεταβολές των παραγόντων πήξης, φλεγμονής που επηρεάζουν αρνητικά την ενδοθηλιακή λειτουργία.^[42,43] Παρόλα αυτά το κρασί περιέχει πολλά συστατικά με αντιοξειδωτική δράση και όχι μόνο, που το καθιστούν ένα ενδιαφέρον ποτό για μελέτη. Πρέπει να πραγματοποιηθούν κλινικές παρεμβάσεις για να επιβεβαιώσουν τα δεδομένα.

2.3 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΡΑΣΙΟΥ^[44]

Μέχρι σήμερα από την ανάλυση του κρασιού με πιο σύγχρονες τεχνικές χρωματογραφίας έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 500 συστατικά. Φυσικά η ακριβής σύσταση και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών του κρασιού διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται, το χρόνο ωρίμανσης, τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, την περιοχή στην οποία αναπτύσσονται και πολλούς άλλους παράγοντες.^[45] Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι κάθε κρασί που εξετάζεται έχει δική του σύσταση, και η όποια ανάλυση των επιμέρους συστατικών του κρασιού, αφορά την πλειοψηφία των κρασιών ή το μέσο όρο των συγκεντρώσεων των συστατικών του. Αναλυτικότερα στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πιο διαδεδομένων συστατικών που απαντώνται στο κρασί.^[45]

Πίνακας 2.1 Συγκεντρώσεις των πιο διαδεδομένων συστατικών του κρασιού

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/100ml)
Νερό	80-90
Υδατάνθρακες/σάκχαρα	0.2-0.45
Αλκοόλες (κυρίως αιθανόλη)	8.0-15.3
Γλυκερόλη	0.30-1.40
Αλδεϋδες	0.01-0.050
Οργανικά οξέα (e.g. tartaric, etc.)	0.3-1.10
Συστατικά Αζώτου	0.01-0.09
Ιχνοστοιχεία (Κ, κτ.λ.)	0.15-0.40
Ολικά λιποειδή	0.04-0.08
Ολικές φαινολικές ενώσεις	0.09-0.25 κόκκινο 0.02-0.029 λευκό

Αν και έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί οι οποίοι ενδεχομένως εμπλέκονται ή υπεισέρχονται στον τρόπο δράσης του οινοπνεύματος, όπως η αύξηση της HDL, η μείωση συσσώρευσης αιμοπεταλίων και η αύξηση της ινωδόλυσης, ^[45] αρκετοί ερευνητές αποδίδουν αυτή την ευεργετική δράση στο κρασί και όχι στα άλλα αλκοολούχα ποτά.^[46] Μια σειρά από in vitro και in vivo μελέτες δείχνουν ότι διάφορα συστατικά που περιέχονται στο κρασί, πέρα από την αιθανόλη, μπορεί να διαδραματίσουν ενεργό ρόλο στην προστασία από την εμφάνιση αλλά και στον περιορισμό της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης, όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 2.2. ^[47, 48] Σύμφωνα με αρκετές μελέτες τα συστατικά στα οποία οφείλει το κρασί τις ευεργετικές του δράσεις είναι τα λιποειδή (γλυκοζίτες φαινολικών, γλυκολιποειδή, φωσφο-γλυκολιποειδή) και οι φαινολικές ενώσεις. ^[42,43,44]

Οι φαινολικές ουσίες του κρασιού, που θεωρούνται και τα κύρια βιοδραστικά συστατικά του, χωρίζονται σε δύο ομάδες, τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Το

πιο κοινό φλαβονοειδές στο κόκκινο κρασί είναι οι φλαβονόλες, όπως η κερκετίνη, και οι φλαβανόλες, όπως οι τανίνες και κατεχίνες, ενώ μεταξύ των μη φλαβονοειδών η ρεσβερατρόλη είναι η πιο γνωστή.^[49]

2.4 ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ^[37, 50]

Το αλκοόλ επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα αγγειακών και βιοχημικών λειτουργιών που έχουν τη δυνατότητα να επιδρούν καρδιοπροστατευτικά. Οι αλλαγές που επιφέρει στο προφίλ των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων της αύξησης της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μηχανισμό για τη μείωση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο. Ωστόσο, άλλες αλλαγές που μπορεί να επιφέρει στο ενδοθήλιο, στις αγγειακές, μυοκαρδιακές και αιμοστατικές λειτουργίες μπορεί να είναι εξίσου σημαντικές, συμβάλλοντας συλλογικά στη μείωση του συνολικού κινδύνου για καρδιαγγειακά. Οι εντοπιζόμενες δράσεις του αλκοόλ περιλαμβάνουν τη μειωμένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τη μειωμένη επαναιμάτωση του μυοκαρδίου λόγω ισχαιμίας, όπως και την αυξημένη δραστηριότητα του ενδοθηλίου μέσω έκκρισης αγγειοδιασταλτικών ουσιών. Επίσης αρκετές είναι και οι μελέτες που δείχνουν τη δράση του αλκοόλ σε αντι-αποπρωτικά και προ-απόπρωτικά μονοπάτια και ότι οδηγεί σε μειωμένες συγκεντρώσεις στο πλάσμα του παράγοντα VII και του ινωδογόνου. Επίσης συμβάλλει στην αύξηση της ινωδόλυσης όπως και στην αύξηση των επίπεδων του κολπικού νατριουρητικού πεπτιδίου, οδηγώντας έτσι στην αναστολή της έναρξης / εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης.

Ομοίως, πολλές μελέτες συσχετίζουν και το κρασί που του έχει αφαιρεθεί το αλκοόλ με μειωμένη εμφάνιση καρδιαγγειακών. Υπάρχουν πολλά συστατικά του κόκκινου κρασιού που θα μπορούσαν να έχουν επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα, εμποδίζοντας ή καθυστερώντας την αθηροσκλήρωση. Ο ακριβής μηχανισμός για την ευεργετική δράση του κρασιού δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αλλά μια σειρά από μονοπάτια μέσω των οποίων εμποδίζει την αθηροσκλήρωση έχουν προταθεί. Αυτές περιλαμβάνουν την αυξημένη αντιοξειδωτική του δράση μέσω της αντίστασης της LDL στην υπεροξειδωση, την αυξημένη δραστηριότητα της HDL λιποπρωτεΐνης και την

ενεργοποίησης της παραοξόνωσης του ορού. Επιπλέον πολλά βιοδραστικά συστατικά του κρασιού λειτουργούν ως αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων καθώς επίσης οδηγούν στην παραγωγή NO και αναστέλλουν των πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Μια πληθώρα μελετών έχει δείξει την ικανότητα του κόκκινου κρασιού να προκαλεί την παραγωγή του NO. Η αγγειοδιασταλτική δράση του κρασιού όμως φαίνεται να συσχετίζεται με το είδος των φαινολών. Μονομερείς κατεχίνες και απλές φαινόλες (βενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, και υδροξυκιναμωμικών οξέων) δεν έχουν αποτέλεσμα, ενώ ανθοκυανίνες και ολιγομερή προανθοκυανιδίων ασκούν σημαντική επίδραση. Το κρασί επίσης περιέχει αναστολείς του PAF. Έρευνες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη και η τυροσόλη αναστέλλουν την PAF επαγόμενη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και ότι ακετυλιωμένα παράγωγά τους εμφανίζουν την ίδια δράση. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το κρασί ή εκχυλίσματα κρασιού είναι επίσης σε θέση να αναστέλλουν σημαντικά τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα φλαβονοειδή δρουν ως αναστολείς του PLA₂, ο οποίος συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργοποίησης του PAF. Επιπλέον οι νερανζίνες, και η εσπεριδίνη έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες. Τα παραπάνω φλαβονοειδή μπλοκάρουν την παραγωγή του PAF μέσω της αναστολής της λυσο-PAF-AT και της PLA₂ και ταυτόχρονα ενισχύοντας το σχηματισμό λιγότερο βιολογικώς δραστικών λιπιδίων μεσολαβητών μέσω της PAP-εξαρτώμενης CoA ανεξάρτητης τρανσακετυλάσης (TA). Αυτό το ένζυμο υδρολύει το PAF, παράγοντας άκυλο-PAP, το οποίο έχει ανασταλτικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Πίνακας 2.2: Πιθανολογούμενοι Μηχανισμοί της καρδιοπροστατευτικής δράσης του κρασιού

Αναστολή της οξείδωσης της LDL
Εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών
Δέσμευση μεταλλοίωντων
Μεγάλη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συστατικών
Αύξηση ή διατήρηση της δραστηριότητας της παραοξονάσης
Αναστολή πολλαπλασιασμού λείων μυϊκών κυττάρων και αγγειακής υπερπλ
Cell cycle arrest
DNA strand breakage
Μείωση στην έκφραση του cyclin A
Αναστολή των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 και του PDGF
Αναστολή των P13-K και p38 MAPK
Αναστολή MMP 9
Απόπτωση
Αναστολή των αιμοπεταλίων
Αναστολή του μονοπατιού της κυκλοξυγενάσης
Αναστολή σύνθεσης της θρομβοξάνης B-2
Ενίσχυση της προσταγλαδίνης
Αύξηση των φωσφοδιεστεράσεων (cAMP, cGMP)
Αύξηση της HDL
Αυξημένη σύνθεση απολιποπρωτεΐνων A-1 & A-2
C 20:5 (omega 3)
Χαλάρωση των αρτηριών
Έκφραση eNOS
Αναστολή του PAF

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

3.1 ΜΕΤΑΓΕΥΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Δυστυχώς παρά την πληθώρα των επιδημιολογικών μελετών το ερώτημα σχετικά με το αν το κρασί ή τα άλλα αλκοολούχα ποτά ασκούν προστατευτική δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα, δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμη. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι υπάρχουν λίγες καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους που να εξετάζουν τι γίνεται όταν δίνεται κρασί ως παρέμβαση όσον αφορά βιοχημικούς δείκτες, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση.

Μελέτη των Hendriks et al. έδειξε ότι η κατανάλωση αλκοόλ κατά τη διάρκεια γεύματος 34% λίπος (είτε κρασιού, είτε μπύρας, είτε τζιν) επιφέρει μια στατιστικά σημαντική μείωση στον PAI-1. Η δραστηριότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ήταν σημαντικά υψηλότερη μετά τη λήψη αλκοόλ σε σχέση με το νερό μια, τρεις, και πέντε ώρες μετά το γεύμα. Τα επίπεδα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου αυξήθηκαν σημαντικά στις τρεις ,πέντε και εννέα ώρες μετά την κατανάλωση αλκοόλ σε σύγκριση με το νερό. Το επόμενο πρωί, 13 ώρες μετά το γεύμα, τα επίπεδα του αντιγόνου ακόμα είχαν την τάση να είναι αυξημένα μετά το αλκοόλ. ^[51]

Μελέτη των Williams et al. σε 13 άνδρες με στεφανιαία νόσο εξέτασε την οξεία επίδραση του κόκκινου και του λευκού κρασιού με ένα ελαφρύ γεύμα σε δείκτες φλεγμονής. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της IL-6 , 6 ώρες μετά το κόκκινο κρασί κατά 56% και κατά 63% στο λευκό κρασί. ^[52]

Σε παρόμοια μελέτη των Blanco- Colio et al δεκαέξι υγιείς εθελοντές μελετήθηκαν 3 φορές: μετά από μια μέτρια δόση, μια χαμηλή δόση, και μια χωρίς κρασί, καταναλώνοντας παράλληλα ένα λιπαρό πρωινό (λίπος 56.8%). Η πρόσληψη του κόκκινου κρασιού εμπόδισε τη δραστηριότητα του NF-Kb, και συσχετίστηκε με περαιτέρω μείωση των ολικών τριγλυκεριδίων. ^[53]

Μελέτη των Numminen et al εξέτασε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων επαγόμενη από διατημητική τάση μετά απο κατανάλωση κρασιού. Η έρευνα έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά την

κατανάλωση κρασιού. Επίσης τα επίπεδα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1) πλάσματος και των τριγλυκερίδιων αυξήθηκαν με τη λήψη κρασιού. [54]

Σε έρευνα των Xanthopoulos et al, 10 υγιείς άνδρες ακολούθησαν για 3 μέρες δίαιτα χαμηλή σε αντιοξειδωτικά και μετά από 12ωρη νυστεία κατανάλωσαν πρωινό γεύμα υψηλό σε λιπαρά μαζί με λευκό, κόκκινο κρασί, αιθανόλη και νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την λήψη του πρωινού αυξάνεται το EC50 του PAF, δηλαδή μειώνεται η ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, και η μέγιστη αναστολή επιτυγχάνεται μεταξύ στα 150 και 200 λεπτά στις 2 παρεμβάσεις που χρησιμοποιήθηκαν τα 2 κρασιά, ενώ δεν παρατηρούμε διαφοροποίηση για την παρέμβαση με το νερό και την αιθανόλη. [55]

3.2 ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΚΡΑΣΙ

Έρευνα των Fuhraman et al πραγματοποιήθηκε σε 17 υγιείς άνδρες, μη καπνιστές. Αυτοί χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες και κατανάλωσαν λευκό ή κόκκινο κρασί (400ml/ημέρα) για 2 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση στα υπεροξειδία των λιπιδίων, στα TBARS και στην οξείδωση της LDL και στις δυο ομάδες. [56]

Μελέτη των Pellegrini et al σε 11 υγιείς άντρες, οι οποίοι χωρίστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες, κατανάλωσαν για 4 εβδομάδες 320 ml κόκκινο κρασί, 30 g αλκοόλ σε φρουτοχυμό και 320 ml κρασί χωρίς αλκοόλ ανά ημέρα αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και του ινωδογόνου στο κρασί και στο αλκοόλ. [57]

Μελέτη των Cuews et al έγινε σε 11 υγιείς άνδρες, οι οποίοι κατανάλωναν για ένα μήνα χωρισμένοι σε 2 ομάδες δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος (HFD) και δίαιτα πλούσια σε φρούτα και λαχανικά (CD). Για δύο μήνες έπιναν 240 ml κόκκινο κρασί ανά ημέρα. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια διαφορά σε γλυκόζη, ολική χοληστερόλη LDL και TG ανάμεσα στις δύο ομάδες. [58]

Μελέτη των Retlerstot et al πραγματοποιήθηκε σε 92 υγιή άτομα, τα οποία κατανάλωναν 150 ml κόκκινο κρασί ανά ημέρα για 3 εβδομάδες, ενώ για τρεις

εβδομάδες δεν κατανάλωσαν καθόλου αλκοόλ. Παρατηρήθηκε μείωση του ινοδωγόνου.
[59]

Μελέτη των Imhof et al έγινε σε 42 υγιή άτομα. Για τρεις εβδομάδες χωρίστηκαν τυχαία σε πέντε ομάδες και κατανάλωναν 20-30 g αλκοόλ ή κόκκινο κρασί είτε μύρα είτε μη αλκοολούχα ποτά είτε νερό αντίστοιχα. Στις ομάδες του μη αλκοολούχου κρασιού και της αιθανόλης παρουσιάστηκε μείωση της MCP-1.^[60]

Μελέτη των Arenott et al πραγματοποιήθηκε σε 97 υγιείς μη καπνιστές. Χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες και κατανάλωναν για έξι εβδομάδες 200 ml κόκκινο κρασί, 172 ml κρασί χωρίς αλκοόλ και 200 ml νερό ανά ημέρα αντίστοιχα. Παρουσιάστηκε αύξηση ολικών ραινολικών στις δύο ομάδες που κατανάλωσαν κρασί.
[61]

Μελέτη των Saccaneta et al σε 35 υγιείς γυναίκες, οι οποίες χωρίστηκαν για τέσσερις εβδομάδες τυχαία σε δύο ομάδες και κατανάλωναν 200 ml κόκκινο και λευκό κρασί ανά ημέρα αντίστοιχα, έδειξε αύξηση της HDL και μείωση στις CRR IL-6, ICAM-1, VCAM-1, E-Sueetin και στα δύο κρασιά.^[62]

Έρευνα των M.Callet et al πραγματοποιήθηκε σε είκοσι νέους και είκοσι άτομα μεγαλύτερα των πενήντα ετών, η οποία διήρκεσε για δύο εβδομάδες. Τα άτομα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες που κατανάλωναν 400 ml κόκκινο κρασί και 400 ml νερό ανά ημέρα αντίστοιχα. Στην ομάδα του κρασιού παρατηρήθηκε μείωση της γλουταθειόνης.^[63]

Μελέτη των Canali et al σε δείκτες φλεγμονής κατά την κατανάλωση κρασιού επιβεβαιώνει ότι οι μεταβολίτες του κόκκινου κρασιού επηρεάζουν τη δραστηριότητα των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προετοιμασία της διαμόρφωσης της φλεγμονώδους πορείας στα ενδοθηλιακά κύτταρα.
[64]

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Ciancarelli et al σε 15 υγιείς άνδρες στην οποία κατανάλωσαν για 4 εβδομάδες 250ml ανά ημέρα κόκκινο κρασί είχε ως αποτέλεσμα αύξηση των MPV, ICAM-1, και της E-σελεκτίνης.^[65]

Έρευνα των Avellone et al έδειξε ότι κατανάλωση κόκκινου κρασιού για 4 εβδομάδες μαζί με τα γένηματα, είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του TGF-b1 και μείωση της CRP.^[66]

Μελέτη των Giovanelli et al κατά την οποία υγιείς εθελοντές είχαν χωριστεί σε 5 γκρουπ στα οποία κατανάλωσαν για 3 εβδομάδες μύρα, κρασί, δ/μα αιθανόλης, μη αλκοολούχα μύρα και μη αλκοολούχο κρασί αντίστοιχα, έδειξε πως μετά το πέρας της παρέμβασης η ομάδα του κόκκινου κρασιού παρουσίασε αύξηση της E-σελεκτίνης και μείωση του CAM-1^[67]

Αντίθετα αποτελέσματα είχε η έρευνα των Hansen et al. Για 4 εβδομάδες υγιείς άνδρες εθελοντές κατανάλωσαν καθημερινά 300ml λευκού κρασιού. Στο τέλος της παρέμβασης βρέθηκε μείωση της E-σελεκτίνης καθώς και των V-CAM1, CRP, IL-6 P-σελεκτίνης και της MCP-1.^[68] Όμοια αποτελέσματα είχε και παρέμβαση των Imhof et al κατά την οποία υγιείς άνδρες εθελοντές κατανάλωσαν για 4 εβδομάδες 200 ml κόκκινο κρασί σε δόσεις ανά ημέρα.^[69]

Μελέτη των Retterstol et al, πραγματοποιήθηκε σε άνδρες αυξημένου κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Μετά από κατανάλωση κόκκινου κρασιού για 4 εβδομάδες είχαμε αύξηση της IL-10 και μείωση των ICAM-1, IL-6, LFA-1, καθώς και αύξηση στις χυμοκίνες παραγώμενες από τα μακροφάγα.^[70]

Έρευνα των Vazquez et al στην οποία υγιείς άνδρες κατανάλωσαν για 3 εβδομάδες 250ml/ημέρα κόκκινο κρασί είχε ως αποτέλεσμα μετά το τέλος της παρέμβασης μείωση στα επίπεδα των VCAM-1, ICAM-1, CRP, και IL-1.^[71]

Τέλος πρόσφατη έρευνα των Migliori et al έδειξε πως σε δυο γκρουπ δέκα υγιών ανδρών και 10 ανδρών που πάσχουν από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, κατανάλωση για δυο εβδομάδες λευκού κρασιού και ελαιόλαδου με κενό δυο εβδομάδων ενδιάμεσα είχε ως αποτέλεσμα και στα δυο γκρουπ την μείωση των επιπέδων της CRP και της IL-6.^[72]

Πίνακας 3.1: Μελέτες παρέμβασης που εξετάζουν την αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση του κρασιού.

Πληθυσμός	Χορήγηση	Διάρκεια	Αποτελέσματα	Αναφορά
υγιείς άνδρες, μη καπνιστές	Τυχαία 2 ομάδες: • 400 ml κόκκινο κρασί(RW)/ημέρα • 400 ml λευκό κρασί /ημέρα	2 εβδομάδες	↓ υπεροξειδία των λιπιδίων ,TBARS, οξείδωση LDL	Fuhrman, 1995 ^[73]

υγιείς άνδρες	Τυχαία 3 ομάδες: • 320 ml κόκκινο • 30 g αλκοόλ διαλυμένο σε 320 ml φρουτοχυμό • 320 ml κρασί χωρίς αλκοόλ	4 εβδομάδες	• Κρασί και αλκοόλ παρόμοια μείωση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων και ινωδογόνου • Καμία διαφορά σε άλλους αιμοστατικούς παράγοντες	Pellegrini, 1996 ^[74]
υγιείς άνδρες Για ένα μήνα είχαν χωριστεί τυχαία σε 2 γκρουπ και καταλάωναν δίαιτα υψηλή σε λίπος (HFD) και δίαιτα υψηλή σε φρούτα και λαχανικά (CD)	Για 2 μήνες έπιναν: • 240 ml κόκκινο κρασί/ ημέρα για 2 μήνες • Κανένα άλλο αλκοολούχο δεν καταναλωνόταν	3 μήνες	Όχι διαφορά σε γλυκόζη, ολική χοληστερόλη, LDL, TG ανάμεσα στα δυο γκρουπ με τις 2 διαφορετικές δίαιτες	Cuevas, 2000 ^[75]
υγιή άνδρες και γυναίκες	150 ml κόκκινο κρασί/ ημέρα	• 3εβδομάδες με κρασί • 3εβδομάδες χωρίς αλκοόλ	Καμία στη CRP, ↓ ινωδογόνου	Retterstol, 2004 ^[70]
υγιείς άνδρες+ γυναίκες, μη καπνιστές	Τυχαία 2 ομάδες: • 375 ml κόκκινο κρασί(RW)/ημέρα • 375 ml νερό (WHW)/ημέρα	2 εβδομάδες	• Καμία διαφορά σε Ολική χοληστερόλη, LDL, TG, ομοκυστείνη ↑ HDL στο RW • ↓ οξείδωσης LDL στο RW	Tsang, 2004 ^[76]
υγιείς άνδρες + γυναίκες, μη καπνιστές	τυχαία από 9 άτομα σε 3 ομάδες: • 200 ml κόκκινο κρασί(RW)/ημέρα • 175 ml κρασί χωρίς αλκοόλ (DRW)/ημέρα • 200 ml νερό (W)/ημέρα	6 εβδομάδες (4 drop out)	• Ολικά φαινολικά στο πλάσμα: ↑ στο RW και στο DRW • Ουρικό οξύ ↑ στο W • Χολερυθρίνη ↓ στο DRW • DNA stand break ↓ στο RW • Καμία επίδραση σε οξείδωση λευκοκυττάρων	Arendt, 2005 ^[77]

υγιείς γυναίκες	Τυχαία 2 ομάδες: • 200 ml κόκκινο κρασί • 200 ml λευκό κρασί	4 εβδομάδες	• ↑HDL και στα δύο κρασιά • Καμία διαφορά στα άλλα λιπίδια • ↓CRP, interleukin-6, ICAM-1, CD40L, VCAM-1, E-selectin	Saccanella, 2007 ^[78]
άτομα >50 ετών υγιείς	Τυχαία 2 ομάδες: • 400 ml κόκκινο κρασί(RW)/ημέρα • 400 ml νερό(W)/ημέρα	2 εβδομάδες	• Καμία διαφορά σε γλυκόζη και λιπίδια • Γλουταθειόνη και μαλοναλδεύδη ↓ στο RW	Micallef, 2007 ^[79]
υγιείς άνδρες γυναίκες	• 20-30g αλκοόλ • κόκκινο κρασί • μπύρα • μη αλκοολούχα • νερό	3 εβδομάδες	Αιθανόλη ή μη αλκοολούχο κρασί => ↓ MCP-1, και τη μετανάστευση μονοκυττάρων	Imhof A, 2008 ^[69]
Υγιείς άνδρες	Κόκκινο κρασί 250ml/ημέρα μαζί με τα γεύματα	4 εβδομάδες	αύξηση TGFβ1, μείωση CRP, LDL	Avellone 2006 ^[66]
Υγιείς άνδρες	1. ΚΚ (12%alc) 2. Βότκα (40%alc) 3. Μπράντυ (35%alc) 4. Ρούμι (37%alc) 5. Μη αλκοολούχο ποτό (με προσθήκη ζάχαρης)	5 ημέρες	1η μέρα: αύξηση NF-κΒ Τέλος παρέμβασης μπράντυ+ρούμι vs βότκα: μείωση (δεσμευτική ικανότητα NF-κΒ στα PBMC προκαλούμενη από την ΔΠΛ by FRD, MCP-1) Τέλος παρέμβασης ΚΚ vs μπράντυ+ρούμι : μεγαλύτερη μείωση MCP-1	Beulens 2012 ^[80]
Υγιείς άνδρες και άνδρες με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια	Λευκό κρασί και ελαιόλαδο	2 εβδομάδες	Μείωση και στα δυο γκρουπ CRP και IL-6	Migliori 2015 ^[72]

Υγιείς άνδρες	Κόκκινο κρασί (250ml/ημέρα)	4 εβδομάδες	Αύξηση των MPV, ICAM-1, E- σελεκτίνης	Ciancarelli 2011 ^[65]
Υγιείς άνδρες	1. Μπίρα (5,6%ethanol) 2. ΚΚ (12,5%ethanol) 3. Διάλυμα αιθανόλης Solution (12,5%) 4.Μη αλκοολούχα μπίρα 5. Μη αλκοολούχο κρασί (ΜΑΚΚ)	2*3 εβδομάδες	ΚΚ τέλος παρέμβασης: αύξηση E-σελεκτίνη ΚΚ, ΜΑΚ, Δ. αιθαν τέλος παρέμβασης: μείωση ICAM-1	Giovannelli 2011 ^[67]
Υγιείς άνδρες	1. ΚΚ (cabernet sauvignon) 2. καθόλου αλκοόλ	3 εβδομάδες 150mL/ημέρ α(15g αιθ/ ημέρα), όποτε επιθυμούσαν	Α: ΚΚ συγκριτικά με αποχή από αλκοόλ: αύξηση CRP Γ: ΚΚ συγκριτικά με αποχή από αλκοόλ: ελαφρώς μείωση CRP Γ+Α: αποχή συγκριτικά με ΚΚ : μικρή μείωση GGT	Joosten 2008 ^[81]
Υγιείς άνδρες	1. ΛΚ (Chardonnay 12%): μέτρια πολυφαινολική συγκέντρωση 2. τζιν (40%): ίχνη πολυφαινολών	4 εβδομάδες, 300mL ΛΚ ή Τζιν 100mL/ημέρ α (30 g αιθ/ημέρα)	ΛΚ: μείωση (VCAM- 1, CRP, IL-6, P- σελεκτίνη, E- σελεκτίνη, ICAM-1, MCP-1) Τζιν: μείωση (E- σελεκτίνη, P- σελεκτίνη, VCAM-1), αύξηση MCP-1 ΛΚ vs Τζιν: Μεγαλύτερη μείωση (ICAM-1, MCP-1)	Hansen 2005 ^[82]
Άνδρες αυξημένου κινδύνου CVD	ΚΚ ή ΜΑΚΚ ή τζιν	4 εβδομάδες	ΚΚ, τζιν: αύξηση IL- 10, μείωση χημοκίνες παραγόμενες από τα μακροφάγα ΚΚ: μείωση (ICAM- 1, E-σελεκτίνη, IL-6, LFA-1 στα T- λεμφοκύτταρα και	Retterstol 2005 ^[70]

			μακροφάγα-1, Sialil-Lewis X, and C-C υποδοχέας τύπου 2 στα μονοκύτταρα) αιθανόλη + φαινόλες KK: μείωση (CD40 antigen, CD40 ligand, IL-16, MCP-1, VCAM-1)	
Υγιείς άνδρες	Κόκκινο κρασί	3 εβδομάδες	καμία επίδραση (ICAM-1, VCAM-1, IL-6, TGF-β)	Urquiaga 2004 ^[83]
Υγιείς άνδρες	Κόκκινο κρασί ή τζιν	28 ημέρες, 30 g αιθ/ ημέρα (KK 2X 160mL ή τζιν 100 mL), μαζί με το δείπνο	KK ή τζιν: μείωση (VCAM-1, ICAM-1, hs-CRP, IL-1a) KK: μείωση (LFA-1, Mac-1, VLA-4, MCP-1)	Vazquez-Agell 2007 ^[71]

Δ. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως φαίνεται από την βιβλιογραφία, παρά την πληθώρα των επιδημιολογικών μελετών, το ερώτημα σχετικά με το αν το κρασί ή τα άλλα αλκοολούχα ποτά ασκούν προστατευτική δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα, δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμη. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι υπάρχουν λίγες καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους και ιδιαίτερα σε παθολογικό πληθυσμό, που να εξετάζουν την επίδραση της μέτριας κατανάλωσης κρασιού σε βιοχημικούς δείκτες, που εμπλέκονται στην φλεγμονή και τη θρόμβωση και να συγκρίνουν την επίδραση αυτή με άλλα αλκοολούχα ποτά.

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνήσει κατά πόσο η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών και συγκεκριμένα του κρασιού έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε δείκτες φλεγμονής σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Ερευνητικό Πρωτόκολο

Οι εθελοντές που έλαβαν μέρος στην έρευνα ήταν ασθενείς με στεφανιαία νόσο (ηλικία: 50-75 χρονών). Η επιλογή τους έγινε κυρίως από Καρδιολογικό Τμήμα του Ωνάσειου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου αλλά και από άλλα συνεργαζόμενα νοσοκομεία. Κριτήρια ένταξης στην έρευνα ήταν η ύπαρξη στεφανιαίας νόσου, εξακριβωμένη με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

1. να έχει κάνει Στεφανιογραφία (Coro) και να έχει στενώσεις >50%
2. να έχει κλινικό σύνδρομο (στηθάγχη, δύσπνοια) και
 - θετική δοκιμασία κοπώσεως ή
 - θετικό δυναμικό σπινθιρογράφημα μυοκαρδίου με θάλιο ή
 - θετικό υπέρηχο (triplex) καρδιάς με ντομπουταμίνη
3. Αν δεν έχει τίποτα από τα παραπάνω πρέπει να έχει νοσηλευθεί με έμφραγμα του μυοκαρδίου

Κριτήρια αποκλεισμού ήταν ο αλκοολισμός, το ιστορικό οποιασδήποτε άλλης φλεγμονώδους ασθένειας, η παρουσία κρυώματος ή γρίπης, οξείας αναπνευστικής μόλυνσης, προβλήματα στα δόντια και νεφρικές/ηπατικές παθήσεις. Όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν ενημερωτικό έντυπο συγκατάθεσης. Κατά τη διάρκεια της αρχικής διατροφικής εκτίμησης, οι συμμετέχοντες συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων για να εξασφαλιστεί ότι ακολουθούν μια ισορροπημένη διατροφή, καθώς επίσης και ότι έχουν τη συνήθεια να καταναλώνουν 10-28g αλκοόλ την εβδομάδα. Όλοι οι εθελοντές ακολούθησαν μία αρχική περίοδο προετοιμασίας (wash out period) διάρκειας 15 ημερών, κατά την οποία απέχχαν από το αλκοόλ. Έπειτα, τυχαία, χωρίστηκαν σε 3 διαφορετικές ομάδες παρέμβασης. Η μια ομάδα καταναλώνει κάθε μέρα μαζί με το δείπνο 200 mL κόκκινου κρασιού της ποικιλίας Cabernet Sauvignon (13% v.v αλκοόλ), η άλλη ομάδα καταναλώνει 65 ml τσίπουρο (40% v.v.)

και η τρίτη ομάδα απείχε από το αλκοόλ (< από 2 ποτά/εβδομάδα). Κάθε παρέμβαση είχε διάρκεια 8 εβδομάδες. Η συμμόρφωση των εθελοντών με το πρωτόκολλο της μελέτης, αξιολογήθηκε με ημερολόγια καταγραφής τροφίμων, καθώς επίσης και με δύο 24ωρες ανακλήσεις μέσω τηλεφωνικής επικοινωνίας κάθε εβδομάδα, για τον τακτικό έλεγχο της διατροφικής τους πρόσληψης. Αιμοληψία και παραλαβή βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην αρχή και στο τέλος κάθε παρέμβασης.

4.2 Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση αναστημόμετρου σε όρθια στάση, χωρίς υποδήματα. Επίσης υπολογίστηκε ο ΔΜΣ (Kg/m^2) για κάθε εθελοντή, μετρήθηκε η περιφέρεια μέσης και έγινε λιπομέτρηση με BIA.

4.3 Απομόνωση ορού

Κατάλληλη ποσότητα αίματος μεταφέρθηκε σε vacutainers ορού (10mL). Το vacutainer παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 40min, έως ότου την πήξη του αίματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1500g για 10min σε θερμοκρασία 20 °C. Μετά την φυγοκέντηση, έγινε παραλαβή του υποκείμενου, μοιράστηκε σε σωλήνες eppendorfs ανα 500μL και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80 °C.

4.4 Απομόνωση PBMC

Αντιδραστήρια:

- Lysis buffer: διαλύονται 8,29 g NH_4Cl , 1,0012 g KHCO_3 και 0,038 g EDTA σε 1 L απιονισμένο νερό.
- PBS: Αναδιαλύονται σε 1000 ml απεσταγμένου νερού 9 g NaCl , 0.9076 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και ρυθμίζεται το pH στο 7.4.

Έγινε παραλαβή αίματος σε σωλήνα με EDTA (10ml). Έγινε αραιώση με ίσο όγκο PBS. Σε σωλήνα που περιείχε 15 ml ficol τοποθετήθηκε πάνω στην επιφάνειά του το διάλυμα αίματος. Φυγοκεντρήσαμε σε 1800 rpm για 10 λεπτά στους 20 C. Παραλάβαμε τα PBMC από την ενδιάμεση στοιβάδα και τα μεταφέραμε σε σωλήνα που περιείχε 10 ml PBS. Έγινε φυγοκέντρωση στις 1800 rpm για 20 λεπτά στους 20 C. Το ίζημα το αναδιασπείραμε σε 5 ml lysis buffer. Φυγοκεντρήσαμε σε 1800 rpm για 10 λεπτά στους 20 C. Αναδιασπείραμε το ίζημα σε 900 μl FCS και 900 μl FCS (20% DMSO). Αποθηκεύσαμε στους -80 C.

4.5 Αιματολογικές αναλύσεις

Τα λευκοκύτταρα (WBC), τα λεμφοκύτταρα (LYMPH), ο αριθμός μονοκυττάρων, βασεόφιλων και ηωσινόφιλων (Mid), τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (GRAN), η αιμοσφαιρίνη (HGB), τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC), ο αιματοκρίτης (HC) και τα αιμοπετάλια (PLT) μετρήθηκαν σε δείγματα ολικού αίματος στον βιοχημικό αναλυτή Mindray BC-3000 auto hematology analyser.

4.6 Βιοχημικές αναλύσεις

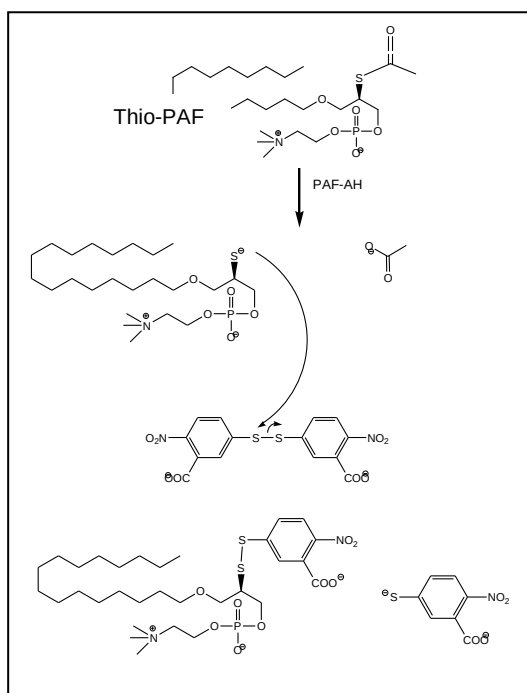
Η γλυκόζη (GLU), η χοληστερόλη (CHOL), η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), τα τριγλυκερίδια (TG) και το ουρικό οξύ (UA) μετρήθηκαν σε δείγματα ορού στον βιοχημικό αναλυτή ACE biochemical analyzer (Schiapparelli Biosystems, Inc, NJ, USA) using reagents from AlfaWassermann (Woerden, The Netherlands)

4.7 Προσδιορισμός δραστηριότητας Lp-PLA2

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF μετατρέπεται σε βιολογικά ανενεργό λυσο-PAF από το ένζυμο PAF ακετυλο-υδρολάση (PAF-AH). Οι PAF-AHs βρίσκονται και ενδοκυτταρικά (PAF-AH) και εξωκυτταρικά (Lp-PLA2).

Η υδρόλυση του θειοεστερικού δεσμού στην sn-2 θέση του υποστρώματος (thio-PAF) από την ακετυλοϋδρολάση απελευθερώνει θειό λύσο PAF που δεσμεύεται από το DTNB, όπως

φαίνεται στο σχήμα. Το 5-θειο-2-νιτρο βενζοϊκό οξύ (TNB) που παράγεται δίνει απορρόφηση στα 412nm με $\epsilon=13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



Σχήμα

Αντιδραστήρια

1. Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl / EGTA
2. Διάλυμα 1mM DTNB σε Tris-HCl
3. Διάλυμα αποθήκευσης υποστρώματος 2.5μg/ μL (4.63mM) thio-PAF
4. Διάλυμα εργασίας υποστρώματος thio-PAF. 198.5μM

Πειραματική πορεία

Σε 96 πηγαδιών plate τοποθετήθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα DTNB και δείγμα ορού, όπως φαίνεται στον πίνακα. Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση 30 λεπτών για την προσθήκη 170μL διαλύματος υποστρώματος thio-PAF, όπου γίνεται και η έναρξη της αντίδρασης. Τέλος, έγινε φωτομέτρηση στα 405 nm στις στιγμές 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 min μετά την εκκίνηση προς σχηματισμό καμπύλης.

Πίνακας 2: Ποσότητες διαλυμάτων

	Buffer (μL)	Ορός (μL)	DTNB (μL)	Επώαση για 30 λεπτά	Διάλυμα υποστρώματος (μL)
Τυφλό	15	-	40		170
Δείγμα	5	10	40		170

Η δραστικότητα του ενζύμου υπολογίστηκε ως εξής:

Αρχικά προσδιορίστηκε η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό:

Με επιλογή δύο σημείων (t_1 και t_2) από την καμπύλη $Abs=f(t)$ της ενζυμικής δοκιμασίας και υπολογισμό της μεταβολής της απορρόφησης, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\min = \frac{\Delta A_{405}}{t_2 - t_1}$$

Προσδιορίστηκε η $\Delta A_{405}/\min$ για τα blanks και αφαιρέθηκε από αυτή των δειγμάτων.

Χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος ($A=\epsilon bC$) για τον υπολογισμό της δραστικότητας της Lp-PLA2. Η ταχύτητα της αντίδρασης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή ϵ του DTNB.

$$Activity = \frac{\frac{\Delta A_{405}}{\min}}{\epsilon_{405} \times l} \times \frac{V_{assay}}{V_{enzyme}} \times (sample\ dilution)$$

Όπου $\epsilon_{414}=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{405}=12.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $l=0.784\text{ cm}$ (η οπτική διαδρομή), $V_{assay}=0.225\text{mL}$, $V_{enzyme}=0.01\text{mL}$. Η δραστικότητα εκφράζεται σε $\text{nmol}/\min/\text{mL}$.

4.8 Παραλαβή PBMC και ενεργοποίησή τους με LPS

Σε αποστειρωμένο falcon των 50ml τοποθετούμε 20ml RPMI και τα κύτταρα αφού ξεπάγωσουν πρώτα σε υδατόλουτρο των 37°C ., Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση για 20min στους 250C , 1800rpm . Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέσαμε 3 ml θρεπτικό υλικό. Για την μέτρηση των κυττάρων τοποθετούμε 20μL από τα κύτταρα και 20μL

Trypan Blue πλαστικό σωληνάκι τύπου Eppendorf, τοποθετούμε κατάλληλη ποσότητα στο αιμοκυττόμετρο μετράμε τα κύτταρα και υπολογίσαμε τον αριθμό τους με βάση τον τύπο.

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = \text{αρ. κυττάρων που μέτρησα} \times 2 \times 10.000$$

Με κατάλληλη αραίωση με θρεπτικό υλικό ρυθμίζουμε την συγκέντρωση των κυττάρων σε $2,3 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Για την ενεργοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήσαμε διάλυμα αποθήκευσης LPS συγκέντρωσης 1mg/ml. Το διάλυμα εργασίας είχε συγκέντρωση 10μg/ml. Σε κάθε εθελοντή τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε δοχεία δώδεκα πηγαδιών σε τελικό όγκο 0.5ml και επωάστηκαν απουσία LPS (control) και παρουσία LPS για 4 και 24 ώρες. Πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις σε κάθε συνθήκη.

Για την παραλαβή κυττάρων στις 4 ή στις 24 ώρες έγινε αναδιασπορά των κυττάρων μέσα στο πηγάδι και μεταφορά σε πλαστικό σωληνάκι τύπου Eppendorf. Φυγοκεντρήσαμε για 10min στα 1000g (rcf) στους 4° C. Χωρίσαμε το υπερκείμενο σε 2 Eppendorf των 230 μL και αποθηκεύσαμε στους -80° C για προσδιορισμό των κυτταροκινών. Ξεπλύνουμε το ίζημα με 1ml PBS και φυγοκεντρήσαμε για 10min στα 1000g (rcf) στους 4° C. Προσθέσαμε 950 μL PBS και μεταφέραμε 900 μL σε γυάλινο σωλήνα και προσθέσαμε 2 mL μίγματος χλωροφορμίου:μεθανόλης 1:1 (C:M 1:1) για τον προσδιορισμό του PAF (μελλοντικά). Στο eppendorf προσθέσαμε 50 μL δια/τος NaOH 0.5N και αποθηκεύσαμε στους -20°C για προσδιορισμό πρωτεΐνης με Bradford

4.9 Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με Bradford

Διαλύματα

- Πρότυπο διάλυμα αποθήκευσης BSA συγκέντρωσης 100 μg/ml: Ζυγίστηκαν 100μg BSA και διαλύθηκαν σε 1ml H₂O. Τα aliquots φυλάχθηκαν στους -20°C στην κατάψυξη.
- Διάλυμα εργασίας BSA είχε αραίωση 1:4 του stock διαλύματος BSA C_{fin}=25 μg/ml.
- Διάλυμα Bradford, σε 50ml Μεθανόλης διαλύθηκαν 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 (C.I. # 42655). Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε 100 ml διαλύματος 85% H₃PO₄ και αραιώθηκε μέχρι τελικό όγκο 200 ml με H₂O. Το τελικό διάλυμα είχε βαθύ κόκκινο χρώμα και τελικές συγκεντρώσεις 0,5 mg/ml Coomassie Blue G, 25% μεθανόλη και

42,5% H₃PO₄. Το διάλυμα φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4οC και είναι σταθερό για πάρα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Στο Working Διάλυμα Bradford έγινε αραιώση με 4 ml H₂O. Το διάλυμα ήταν σκούρου καφέ χρώματος, με pH 1.1

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική μπορεί να υπάρχει σε τρεις μορφές: την κατιονική, την ουδέτερη και την ανιονική μορφή. Οι μορφές αυτές έχουν διαφορετικό χρώμα και, ως εκ τούτου, απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος.

Κατιονική μορφή $\rightleftharpoons$ ουδέτερη μορφή $\rightleftharpoons$ Ανιονική μορφή

Κόκκινο χρώμα

Πράσινο χρώμα

Μπλέ χρώμα

470nm

650nm

595nm

Η απορρόφηση αυξάνεται όταν η χρωστική συνδέεται με την πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Λαμβάνει 2 πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε.

Πορεία εργασίας:

Κατσκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα BSA(25μg.ml) στις αραιώσεις που φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα

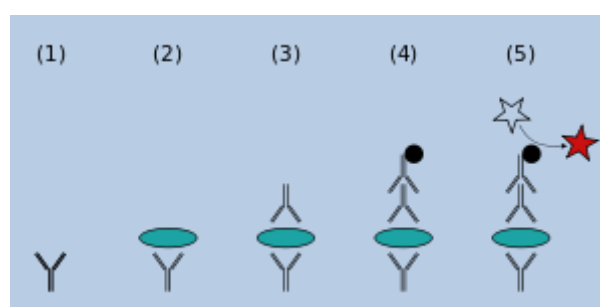
C (μg/ml)	m (μg)	V working BSA (25μg/ml)	V H ₂ O
0	0	-	200
0,625	0,12 5	5	195
1,25	0,25	10	190
2,5	0,5	20	180
5	1,0	40	160
7,5	1,5	60	140

10	2,0	80	120
15	3,0	120	80

Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 50 μ l working διαλύματος Bradford. Έγινε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φωτομέτρηση στα 595 nm.

4.10 ELISA για προσδιορισμό TNF-a και IL-1b

Η μέθοδος ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η μέθοδος Sandwich ELISA χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει τα αντιγόνα που έχουν τουλάχιστον δυο αντιγονικούς επίτοπους. Συνήθως το μικρο-πιάτο επικαλύπτεται με ένα αντίσωμα Ig-G ειδικό για τον ένα επίτοπο και οποιοσδήποτε άλλος μπλοκάρεται. Επειτα, προστίθεται το πρότυπο που είναι το αντιγόνο ή το δείγμα και επωάζεται, ακολουθεί μετά το αντίσωμα δέσμευσης -συνδεδεμένο με ένζυμο- το οποίο είναι ειδικό για τον δεύτερο επιτοπο. Η παρουσία του ενζύμου που είναι συνδεδεμένη στο αντίσωμα ανιχνεύεται με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος, συνήθως έγχρωμου, και μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm (Εικ.4.1.). Υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στο παραγώμενο σήμα (y, μονάδες απορρόφησης) και στην συγκέντρωση του αναλύτη (x)⁷⁰.



Εικόνα 4.1 : “ Σάντουιτς” ELISA. (1) Η πλάκα είναι επικαλυμμένη με ένα αντίσωμα (2) προστίθεται το δείγμα και το αντιγόνο αναγνωρίζεται από το ειδικό προς αυτό αντίσωμα (3),(4) Το αντίσωμα αυτό με τη σειρά του αναγνωρίζεται από δεύτερο αντίσωμα (‘immuno’) το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένζυμο (‘enzyme-linked’) (5) προστίθεται υπόστρωμα το οποίο αντιδρά με το ένζυμο για να παράγει προϊόν, συνήθως έγχρωμο

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 εμπορικά διαθέσιμα Kit ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των IL-1b και TNF. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής :

- DuoSet Elisa kit για ανθρώπινη TNF-a
- DuoSet Elisa kit για ανθρώπινη IL-1b

Αντιδραστήρια

- Αντίσωμα δέσμησης (capture antibody) – 1 vial – 180 µg anti-human IL-1b/TNF-a , αναδιαλύεται σε 0.5 ml PBS. Αραιώνεται με προσθήκη PBS σε συγκέντρωση εργασίας 100 µg/ml. Αποθηκεύεται στους 2-8°C για πάνω από 60 μέρες εναλλακτικά μπορεί να χωριστεί και να αποθηκευτεί στους -20°C έως -70°C για πάνω από 6 μήνες.
- Αντίσωμα αντίχνευσης (detection antibody) – 1 vial – 18 µg anti-human IL-1b/TNF-a, αναδιαλύεται σε 1,8 ml αραιωτικού αντιδραστηρίου (Reagent diluent). Αραιώνεται με προσθήκη RD σε συγκέντρωση εργασίας 10 µg/ml.
- Standard ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL-1b/TNF-a, αναδιαλύεται σε 0,5 ml απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού. Αραιώνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση εργασίας 10.000 pg/ml. Αποθηκεύεται στους 2-8°C για πάνω από 60 μέρες, ωστόσο δεν πρέπει να καταψύχεται. . Από stock διάλυμα IL-1b/TNF-a 35 ng/ml, φτιάχνουμε 7 πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 15,625 – 1000 pg/ml TNF-a και 3,9-250pg/ml IL-1b, από τα οποία θέτουμε στα κατάλληλα πηγάδια 100 µl/well και συνιστούν την πρότυπη καμπύλη
- Streptavidin-HRP – 1 vial – 1 ml streptavidin δεσμευμένη σε υπεροξειδάση αλόγου. Αραιώνονται 50 µl διαλύματος σε 9,95 ml RD. Αποθηκεύεται στους 2-8°C για πάνω από 6 μήνες.
- Substrate solution – αντιδραστήρια A (H₂O₂) και B (τετραμεθυλοβενζινιδίνη) που αναμιγνύονται με αναλογία 1:1, για να αντιδράσουν με HRP και να δώσουν μπλε χρώμα στα δείγματα.
- 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 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20

λεπτά στους 110°C. • Διάλυμα έκπλυσης wash buffer – απορρυπαντικό 0,05% Tween 20 σε διάλυμα PBS με pH 7,2-7,4. • Αντιδραστήριο αραιώσης (reagent diluent) – 1% BSA σε PBS, pH 7,2-7,4 • Μέσο οξίνισης (stop solution) – 2N H₂SO₄. • Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών • Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml • Φιαλίδια eppendorf • Πολυκάναλη πιπέτα

Πορεία

Προετοιμάζεται η πλάκα των 96 πηγαδιών για την υποδοχή των δειγμάτων, με προσθήκη 100 μl/πηγάδι διαλύματος capture antibody σε PBS (100 μl αντισώματος Il-1b/TNF-a + 9,9 ml PBS) και αφήνεται σκεπασμένο σε θερμοκρασία δωματίου και τη διάρκεια της νύχτας.

Το επόμενο πρωί ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer *4 φορές και εναποθέτουμε 300 ml reagent diluent/ πηγάδι για 1 ώρα. Μετά από 1 ώρα, ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer *4 φορές. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης από τους -80 °C, θέτουμε 100 μl/ well στα αντίστοιχα πηγάδια και τα αφήνουμε να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer *4 φορές, προσθέτουμε 100 μl/well διαλύματος detection antibody σε reagent diluent (100 μl αντισώματος Il-1b/TNF-a D.A. + 9,9 ml RD) και τα αφήνουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer *4 φορές, προσθέτουμε 100 μl/well διαλύματος HRP-Streptavidin σε reagent diluent (50 μl αντισώματος HRP + 9,95 ml RD) και τα αφήνουμε να επωαστούν για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer *4 φορές, αναμιγνύουμε με αναλογία 1:1 τα color reagent A και B (5ml CRA + 5ml CRB) θέτουμε 100 μl/well δείγματος.

Αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 50 μl/well stop solution ανακινώ καλά για να εξασφαλίσω καλή μίξη. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 450 nm και στα 570 nm.

Η διαφορά τους είναι η απορρόφηση του δείγματος που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης. Σε όσα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη την θεωρήσαμε 0,4 την απορρόφηση που είναι το όριο ανίχνευσης.

4.11 Στατιστική Ανάλυση

Ο έλεγχος της κανονικότητας των μελετώμενων παραμέτρων έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Οι συνεχείς μεταβλητές που κατανέμονται κανονικά παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση. Οι συνεχείς μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές $\pm$ ενδοεκατοστομοριακό εύρος (25^ο-75^ο εκατοστημόριο). Οι ποιοτικές- κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες τιμές και σχετικές συχνότητες (%).

Η σύγκριση των τιμών των εθελοντών κατά την εισαγωγή τους στη παρέμβαση (χρόνος 0) ανάμεσα στις τρεις παρεμβάσεις πραγματοποιήθηκε με one way ANOVA εάν τα μεγέθη ήταν κανονικά ή με Kruskal Wallis εάν τα μεγέθη ήταν μη κανονικά.

Η σύγκριση μεταξύ των χρονικών τιμών στην ίδια παρέμβαση πραγματοποιήθηκε με Friedman's 2-way ANOVA by ranks καθώς και με paired t-test (0 εβδομάδες με 4 εβδομάδες, 0 εβδομάδες με 8 εβδομάδες) εάν τα μεγέθη ήταν κανονικά ή με Wilcoxon test εάν τα μεγέθη ήταν μη κανονικά.

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης ανάμεσα στις τρεις παρεμβάσεις έγινε με Repeat measures ANOVA εάν τα μεγέθη ήταν κανονικά ή με Kruskal Wallis στη περίπτωση που οι μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή.

Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν το επίπεδο σημαντικότητας (p-value) ήταν μικρότερο του 0,05. Το στατιστικό λογισμικό, που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση είναι το SPSS 21 Inc. Chicago, IL.

ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε 39 εθελοντές. 13 αποτελούσαν την ομάδα control, 18 κατανάλωσαν κρασί και 8 τσίπουρο (αλκοόλ).

Πίνακας 5.1: Χαρακτηριστικά εθελοντών

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P
Ηλικία	61,4 ± 12,5	59,7 ± 10,9	57,4 ± 12,7	0,753
Βάρος(kg)	99,7 ± 20,3	86,5 ± 12,6	87,9 ± 20,7	0,104
Δείκτης μάζας σώματος	33,5 ± 5,8	29,2 ± 4,0	29,7 ± 6,1	0,074

Anova test

Παρατηρούμε πως δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές ανάμεσα στις 3 ομάδες στην έναρξη της μελέτης ($p > 0,05$).

5.2 ΥΠΟΚΚΥΤΑΡΙΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ

Στους πίνακες 5.2 και 5.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του υποκυτταρικού πληθυσμού καθώς και οι κλασικοί βιοχημικοί δείκτες των εθελοντών πριν την παρέμβαση. Όπως παρατηρούμε όλες οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$).

Πίνακας 5.2: Υποκυτταρικός πληθυσμός στον ορό των εθελοντών στην έναρξη της μελέτης

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P
Λευκοκύτταρα ($10^3/\text{ml}$)	7,9 ± 2,0	6,7 ± 2,5	8,0 ± 3,2	0,3
Λεμφοκύτταρα ($10^3/\text{ml}$)	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,8	2,3 ± 0,8	0,6
Μονοκύτταρα/Βασεοφιλα/Ηωσινόφιλα ($10^3/\text{ml}$)	0,6 ± 0,2	0,47 ± 0,3	0,63 ± 0,4	0,3
Πολυμορφοπύρρηνα ($10^3/\text{ml}$)	5,1 ± 1,5	4,2 ± 1,5	5,0 ± 1,9	0,2
Λεμφοκύτταρα %	26,8 ± 5,5	29,4 ± 5,4	29,4 ± 2,9	0,3
Μονοκύτταρα/Βασεοφιλα/Ηωσινόφιλα %	7,9 ± 2,5	6,7 ± 2,1	7,5 ± 2,0	0,3

Πολυμορφοπύρρηνα %	65,2 ± 7,5	63,8 ± 5,8	62,9 ± 3,4	0,6
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	14,1 ± 1,7	14,4 ± 1,3	15,2 ± 1,1	0,2
Ερυθρά αιμοσφαίρια (10 ⁶ /ml)	4,5 ± 0,8	4,1 ± 0,4	4,9 ± 0,3	0,2
Αιματοκρίτης %	42,4 ± 5,3	43,2 ± 4,1	45,7 ± 3,3	0,2
Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (fl)	85,4 ± 4,4	84,8 ± 6,4	86,3 ± 4,5	0,8
Μέσος όγκος αιμοσφαιρίνης/κύτταρο (fl)	33,2 ± 13,5	30,2 ± 3,6	30,6 ± 1,5	0,5
Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (g/dl)	39,1 ± 16,9	35,0 ± 1,2	35,5 ± 1,5	0,4
Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων %	13,7 ± 1,2	13,9 ± 1,2	13,3 ± 0,7	0,4
Εύρος κατανομής μεγέθους Ερυθροκυττάρων (fl)	40,9 ± 2,5	41,0 ± 3,9	40,8 ± 4,0	0,9
Αιμοπετάλια (10 ³ /ml)	273,8 ± 108,8	226,3 ± 41,3	223,2 ± 29,7	0,1
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fl)	8,1 ± 0,6	8,3 ± 0,7	7,9 ± 0,8	0,4
Εύρος κατανομής μεγέθους Αιμοπεταλίων %	15,7 ± 0,4	15,8 ± 0,3	15,76 ± 0,2	0,6
Αιμοπεταλιοκρίτης %	0,2 ± 0,07	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,1

Anova test

Πίνακας 5.3: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες στον ορό των εθελοντών στην έναρξη της μελέτης

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P
Γλυκόζη (mg/dL)	104,5 ± 12,9	131,6 ± 44,3	123,4 ± 25,9	0,1
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	133,2 ± 76,0	145,8 ± 86,7	195,8 ± 182,0	0,4
Χοληστερόλη (mg/dL)	157,5 ± 40,9	175,1 ± 31,7	171,2 ± 46,1	0,4
HDL-C (mg/dL)	42,0 ± 8,7	46,6 ± 13,8	43,5 ± 8,1	0,5
LDL-C (mg/dL)	88,8 ± 36,0	99,3 ± 33,2	88,5 ± 20,3	0,6

Anova test

5.3 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

Στους πίνακες 5.4 και 5.5 παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και ο υποκυτταρικός πλυθυσμός καθώς και οι κλασικοί βιοχημικοί δείκτες αντίστοιχα στις τρεις ομάδες των εθελοντών κατά την διάρκεια της παρέμβασης. Παρατηρούμε πως όλες οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) και κατα την διάρκεια της παρέμβασης.

Πίνακας 5.4: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και υποκυτταρικός πληθυσμός κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

	Ομάδα	0 εβδομάδες	4 εβδομάδες	8 εβδομάδες	P _{trial}	P _{time}	P _{time*trial}
Βάρος (Kg)	Control	94,9±16,3	94,1±15,7	94,2±15,7			
	Κρασί	87,3±14,1	87,9±14,0	87,9±13,6	0,2	0,4	0,3
	Τσίπουρο	81,8±12,6	81,0±11,3	80,5±11,1			
BMI	Control	31,7±4,3	28,9±10,4	28,9±10,5			
	Κρασί	29,5±4,4	29,7±4,2	29,7±4,2	0,4	0,1	0,3
	Τσίπουρο	30,3±4,7	24,4±10,7	24,3±10,6			
Λευκοκύτταρα (10 ³ /ml)	Control	8,1±1,8	6,8±1,1	7,3±2,1			
	Κρασί	7,2±2,6	7,2±3,1	6,9±2,5	0,9	0,1	0,1
	Τσίπουρο	7,8±3,5	7,8±4,6	7,1±2,4			
Ερ.Αιμοσφαίρια (10 ⁶ /ml)	Control	4,4±0,9	4,6±0,3	4,7±0,4			
	Κρασί	4,9±0,4	4,8±0,4	4,7±0,4	0,1	0,8	0,3
	Τσίπουρο	4,9±0,3	5,0±0,4	4,9±0,4			
Αιμοπετάλια (10 ³ /ml)	Control	282,7±121,0	225,0±40,5	255,2±93,1			
	Κρασί	233,1±41,3	228,0±67,3	231,5±54,5	1,0	0,3	0,5
	Τσίπουρο	220,9±31,3	220,6±26,4	230,3±18,2			

Tests of Between-Subjects Effects

Πίνακας 5.5: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες κατά την διάρκεια της παρέμβασης

	Ομάδα	0 εβδομάδες	4 εβδομάδες	8 εβδομάδες	P _{trial}	P _{time}	P _{time*trial}
Γλυκόζη (mg/dL)	Control	103,1±12,7	104,3±13,3	103,9±9,2			
	Κρασί	129,2±44,7	131,0±42,4	132,3±41,9	0,1	1,0	0,9
	Τσίπουρο	123,4±25,9	122,3±38,2	120,7±21,7			
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	Control	139,7±76,9	107,2±40,0	111,3±52,0			
	Κρασί	148,5±89,1	140,7±99,9	152,4±99,2	0,4	0,1	,03
	Τσίπουρο	195,9±182,1	186,9±152,0	169,9±131,9			
Χοληστερόλη (mg/dL)	Control	156,5±43,0	146,8±45,3	147,0±31,8			
	Κρασί	177,3±31,7	175,3±29,2	177,6±31,0	0,1	0,7	1,8
	Τσίπουρο	171,3±46,1	194,4±35,3	174,0±35,8			
HDL (mg/dL)	Control	41,0±8,5	42,0±9,1	42,3±9,8			
	Κρασί	46,0±14,1	46,7±11,7	47,0±15,5	0,5	0,5	1,4
	Τσίπουρο	43,6±8,2	43,1±6,7	39,7±7,0			
LDL (mg/dL)	Control	87,6±37,7	83,3±40,7	82,4±29,9			
	Κρασί	101,6±33,2	100,5±24,2	100,1±22,9	0,3	0,3	0,1
	Τσίπουρο	88,5±20,3	113,9±33,0	100,3±28,4			

Tests of Between-Subjects Effects

5.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΣΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΔΡΑΣΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp – PLA₂

Οι αρχικές τιμές δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στα τρία γκρουπ της παρέμβασης ήταν 34,7±10,7 (nmol/min/mL) στο control, 33,8±8,4 (nmol/min/mL) στην ομάδα του κρασιού και 37,5±10,8 (nmol/min/mL) στο τσίπουρο, με P=0,8. Παρατηρούμε δεν υπάρχει καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 3 γκρούπ (p> 0,05).

Στον Πίνακα 5.6 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές δραστηριότητας της Lp-PLA₂ κατά την διάρκεια της παρέμβασης. Παρατηρούμε πως οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p> 0,05) και κατά την διάρκεια της παρέμβασης.

Πίνακας 5.6: Τιμές δραστηριότητας της Lp-PLA₂ κατά την διάρκεια της παρέμβασης

	Ομάδα	0 εβδομάδες	4 εβδομάδες	8 εβδομάδες	P _{trial}	P _{time}	P _{time*trial}
Δραστηριότητα Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	Control	34,7±10,7	30,9±8,2	31,1±7,8			
	Κρασί	33,8±8,4	32,7±6,9	33,2±6,7	0,7	0,3	0,6
	Τσίπουρο	37,5±10,8	40,7±13,0	35,0±10,7			

Anova/Tests of Between-Subjects Effects

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε και Paired Samples Test στην ίδια ομάδα για σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών το οποίο δεν έδωσε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά (p>0,05).

5.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΣΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΟΥ TNF-a ΚΑΙ ΤΗΣ IL-1b

Με σκοπό να εξετασθεί η απόκριση στη φλεγμονή των PBMC των εθελοντών τα κυττάρά τους επωάστηκαν παρουσία και απουσία του LPS για 4ω και 24 ώρες και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκκρισης του TNF-a και της IL-1b. Τα αποτελέσματα αφορούν

16 εθελοντές, 6 στην ομάδα του control, 6 στο κρασί και 4 στο τσίπουρο. Η έρευνα είναι σε εξέλιξη οπότε αναμένονται περισσότερα αποτελέσματα.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές του TNF-a και της IL-1b πριν την παρέμβαση στις 3 ομάδες με (LPS) και χωρίς (c) ενεργοποίηση από τον LPS, 4 και 24 ώρες μετά την καλλιέργεια των PBMC. Παρατηρούμε πως οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) ανάμεσα στις ομάδες. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρουσία του LPS τα επίπεδα έκκρισης των κυτταροκινών από τα PBMC των εθελοντών είναι αυξημένα.

Πίνακας 5.7: Επίπεδα έκκρισής της IL-1b και του TNF-a από τα PBMC των εθελοντών στην έναρξη της μελέτης

	Ομάδα	C ₄	LPS ₄	C ₂₄	LPS ₂₄
IL-1b (pgIL-1/mg pr.)	Control	41,8 (14,4-119,5)	884,5 (323,5 -3321,6)	697,6 (261,7 - 3513,1)	1620,0 (764,6-5192,5)
	Κρασί	6,9 (2,3 - 47,5)	20,2 (6,0 - 291,0)	82,1 (10,5 - 760,2)	260,9 (60,2-1752,4)
	Τσίπουρο	6,1 (1,8 - 231,2)	125,9 (3,3 - 895,2)	20,9 (7,8-216,2)	542,2 (5,4-1084,0)
	P	0.5	0.1	0.1	0.2
TNF-a (pg Tnf-a/mg pr.)	Control	167,8 (6,5-541,6)	1190,7 (321,2-2483,5)	775,0 (156,4-4389,5)	2305,0 (314,2-3933,2)
	Κρασί	28,4 (2,3-130,7)	178,8 (2,2-3735,3)	35,6 (2,8-943,9)	153,9 (1,8-2369,7)
	Τσίπουρο	6,1 (1,8-595,0)	124,5 (3,3-1243,1)	42,5 (3,5-301,1)	114,3 (19,1-1129,0)
	P	0.5	0.5	0.2	0.2

Kruscall – Wallis test

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι τιμές του TNF-a και της IL-1b κατά την διάρκεια της παρέμβασης στις 3 ομάδες με (LPS) και χωρίς (c) ενεργοποίηση από τον LPS, 4 και 24 ώρες μετά την καλλιέργεια των PBMC.

Πίνακας 5.8: Επίπεδα έκκρισης της IL-1b(pgIL-1/mg pr) από τα PBMC των εθελοντών κατά την διάρκεια της παρέμβασης στις 4 ώρες.

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P _{trial}
C ₀ εβδομάδες	41,8 (14,4-119,5)	6,9 (2,3 - 47,5)	6,1 (1,8 - 231,2)	0,5
C ₄ εβδομάδες	13,1 (2,5-90,9)	13,1 (3,0-68,8)	13,6 (5,0-21,4)	1,0
C ₈ εβδομάδες	67,2 (3,7-361,3)	38,8 (2,3-276,7)	23,2 (2,8-72,5)	0,8
P _{time}	0,6	0,1	0,4	#
LPS ₀ εβδομάδες	884,5 (323,5 - 3321,6)	20,2 (6,0 - 291,0)	125,9 (3,3 - 895,2)	0,1
LPS ₄ εβδομάδες	592,9 (2,6-1544,6)	386,5 (24,0-1421,7)	6,2 (3,6-799,8)	0,4
LPS ₈ εβδομάδες	1017,5 (73,1-3537,2)	468,9 (280,5-4329,1)	1572,2 (469,6-2287,8)	0,8
P _{time}	0,2	0,5	0,2	#

Kruscall – Wallis test

Παρατηρούμε πως οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) κατά την διάρκεια της παρέμβασης ανάμεσα στις ομάδες .

Πίνακας 5.9: Επίπεδα έκκρισης της IL-1b(pgIL-1/mg pr) από τα PBMC των εθελοντών κατά την διάρκεια της παρέμβασης στις 24 ώρες.

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P _{trial}
C₀ εβδομάδες	697,6 (261,7 - 3513,1)	82,1 (10,5 - 760,2)	20,9 (7,8-216,2)	0,1
C₄ εβδομάδες	770,8 (5,2-10013,7)	64,0 (7,5-532,8)	122,4 (15,4-218,9)	0,7
C₈ εβδομάδες	484,7 (144,4-2448,4)	13,1 (5,7-143,9)	108,1 (27,4-340,0)	0,2
P_{time}	1,0	0,8	0,8	#
LPS₀ εβδομάδες	1620,0 (764,6-5192,5)	260,9 (60,2-1752,4)	542,2 (5,4-1084,0)	0,2
LPS₄ εβδομάδες	1455,2 (297,1-7345,6)	460,1 (22,8-1911,3)	8,0 (3,3-1093,7)	0,2
LPS₈ εβδομάδες	1783,6 (424,9-8829,8)	699,6 (14,4-1370,7)	1554,9 (1417,3-2470,9)	0,3
P_{time}	0,5	0,5	0,05	#

Kruscall – Wallis test / Friedmans two way analysis

Παρατηρούμε πως οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) κατα την διάρκεια της παρέμβασης ανάμεσα στις ομάδες. Εξαίρεση αποτελεί η σημαντική διαφορά στην ομάδα του τσίπουρου μετά την ενεργοποίηση των PBMC με LPS ($p=0,05$). Η διαφορά εστιάζεται τόσο μεταξύ του χρόνου 0 και των 8 εβδομάδων όσο και μεταξύ του χρόνου 4 και των 8 εβδομάδων ($P=0,03$) όπου φαίνεται μια αύξηση στα επίπεδα της IL-1b. Μπορούμε να παρατηρήσουμε μια μείωση στις τιμές της IL-1b στην ομάδα του κρασιού στις 8 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα control και του τσίπουρου. Η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική και θα πρέπει να ελεγχθεί σε μεγαλύτερο δείγμα.

Πίνακας 5.9: Επίπεδα έκκρισης του TNF- α (pgIL-1/mg pr) από τα PBMC των εθελοντών κατά την διάρκεια της παρέμβασης στις 4 ώρες.

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P _{trial}
C ₀ εβδομάδες	167,8 (6,5-541,6)	28,4 (2,3-130,7)	6,1 (1,8-595,0)	0,5
C ₄ εβδομάδες	63,5 (2,5-157,4)	26,7 (4,0-45,7)	10,7 (2,2-658,7)	0,7
C ₈ εβδομάδες	126,6 (3,7-569,9)	27,4 (2,3-186,1)	104,9 (7,8-707,8)	0,9
P _{time}	0,3	0,8	0,1	#
LPS ₀ εβδομάδες	1190,7 (321,2-2483,5)	178,8 (2,2-3735,3)	124,5 (3,3-1243,1)	0,5
LPS ₄ εβδομάδες	624,6 (2,1-1625,3)	218,7 (79,9-1133,0)	5,5 (2,4-992,0)	0,6
LPS ₈ εβδομάδες	1256,9 (128,7-5219,9)	680,2 (233,0-7570,9)	1057,7 (253,2-3138,3)	1,0
P _{time}	0,5	0,6	0,1	#

Kruscall – Wallis test / Friedmans two way analysis

Παρατηρούμε πως οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) τόσο ανάμεσα στα γκρούπ όσο και κατα την διάρκεια της παρέμβασης στο κάθε γκρουπ ξεχωριστά.

Πίνακας 5.10: : Επίπεδα έκκρισης του TNF- α (pgIL-1/mg pr) από τα PBMC των εθελοντών κατά την διάρκεια της παρέμβασης στις 24 ώρες.

	Control	Κρασί	Τσίπουρο	P _{trial}
C ₀ εβδομάδες	775,0 (156,4-4389,5)	35,6 (2,8-943,9)	42,5 (3,5-301,1)	0,2
C ₄ εβδομάδες	383,8 (3,2-8019,6)	43,8 (5,5-69,0)	36,0 (2,7-163,6)	0,7
C ₈ εβδομάδες	830,6 (113,8-1995,1)	73,5 (5,1-498,2)	243,3 (58,8-547,7)	0,3
P _{time}	0,7	0,8	0,04	#
LPS ₀ εβδομάδες	2305,0 (314,2-3933,2)	153,9 (1,8-2369,7)	114,3 (19,1-1129,0)	0,2
LPS ₄ εβδομάδες	1743,5 (1,6-7520,9)	347,9 (36,6-896,7)	58,7 (3,3-1149,0)	0,7
LPS ₈ εβδομάδες	972,4 (294,4-14394,0)	416,5 (226,9-1585,3)	1114,7 (656,0-2060,4)	0,4
P _{time}	1,0	0,5	0,05	#

Kruscall – Wallis test / Friedmans two way analysis

Παρατηρούμε πως οι τιμές δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) κατα την διάρκεια της παρέμβασης ανάμεσα στις ομάδες.. Εξαίρεση αποτελεί η σημαντική διαφορά είχαμε στην ομάδα του τσίπουρου πριν ($p = 0,04$) και μετά την ενεργοποίηση των PBMC με LPS ($p = 0,05$). Η διαφορά πριν απο την ενεργοποίηση με LPS εστιάζεται μεταξύ του χρόνου 4 και των 8 εβδομάδων ($P = 0,01$), ενώ η διαφορά μετά την ενεργοποίηση με LPS εστιάζεται τόσο μεταξύ του χρόνου 0 και των 8 εβδομάδων όσο και μεταξύ του χρόνου 4 και των 8 εβδομάδων ($P = 0,03$) όπου φαίνεται μια αύξηση στα επίπεδα του TNF- α . Ομοίως με την IL-1b μπορούμε να παρατηρήσουμε μια μείωση στις τιμές του TNF- α στην ομάδα του κρασιού στις 8 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα control και του τσίπουρου. Η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική και θα πρέπει να ελεγχθεί σε μεγαλύτερο δείγμα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα εξακολουθούν να είναι η κύρια αιτία θανάτου στις χώρες του Δυτικού κόσμου, με τις κύριες εκδηλώσεις τους να είναι η καρδιακή προσβολή και τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Οι εκδηλώσεις αυτές αντιπροσωπεύουν την κλινική έκβαση της αθηροσκλήρωσης που είναι μια συστηματική αγγειακή διαδικασία η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως ένα τύπος χρόνιας φλεγμονής. Πληθώρα μελετών υποστηρίζουν ότι τόσο η φλεγμονή όσο και η θρόμβωση συνθέτουν τους σημαντικότερους μηχανισμούς για την εγκατάσταση και την μετέπειτα εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης.^[1, 2, 3]

Επιδημιολογικά στοιχεία παρουσιάζουν χαμηλό το ποσοστό εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων σε πληθυσμούς που συνηθίζουν να καταναλώνουν μετριοπαθή ποσότητα κρασιού και μάλιστα για αυτό το λόγο το κρασί κατέχει ειδική θέση στο Μεσογειακό πρότυπο διαίτας. Νεότερα δεδομένα προτείνουν ότι οι ευεργετικές δράσεις του κρασιού στην υγεία δεν οφείλονται αποκλειστικά στο αλκοόλ αλλά και στα βιολογικά δραστικά συστατικά του όπως τα λιποειδή και οι φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές αυτές ενώσεις είναι συνήθως πλουσιότερες στο κόκκινο κρασί, όμως σημαντικότερο ρόλο δε φαίνεται να παίζει το χρώμα του κρασιού αλλά η ποικιλία. Τα πλουσιότερα σε πολικά λιποειδή κρασιά βρέθηκαν πως είναι το κόκκινο Cabernet Sauvignon και το λευκό Ambelon (κύρια ποικιλία Rompola)^[15, 18, 22, 47]

Αρκετές μελέτες προσπάθησαν να αξιολογήσουν πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων το κρασί φαίνεται να προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό, εστιάζοντας στην αντιφλεγμονώδη, στην αντιοξειδωτική και αντιθρομβωτική δράση, μέσω της οποίας δίνει μια ασπίδα προστασίας έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Συνοψίζοντας τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, έχει φανεί ότι η αιθανόλη οδηγεί στην αύξηση της HDL χοληστερόλης, μειώνει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση και συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι μέτρια κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να αυξάνει τη δραστικότητα του tPA, και να μειώνει την παραγωγή ινωδογόνου και αντιθρομβίνης. Οι φαινολικές ενώσεις από την άλλη, έχουν αντιοξειδωτικές δράσεις, συμβάλουν στην αύξηση της παραγωγής NO από το ενδοθήλιο, περιορίζουν τη δράση του TNF, επιδρούν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέως μειώνοντας την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη σύνθεση προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών παραγόντων και αναστέλλουν τη δράση διάφορων συσσωρευτικών παραγόντων όπως το ADP και ο PAF. Η ρεσβερατρόλη και η τυροσόλη αναστέλλουν την PAF επαγόμενη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και τα ακετυλιωμένα παράγωγά τους εμφανίζουν την ίδια δράση. Τα φλαβονοειδή δρουν ως αναστολείς του PLA2, ο οποίος συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργοποίησης του PAF. Επιπλέον οι νερανζίνες, και η εσπεριδίνη έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες. Τα παραπάνω φλαβονοειδή μπλοκάρουν την παραγωγή του PAF

μέσω της αναστολής της λυσο-PAF-AT και της PLA₂ και ταυτόχρονα ενισχύοντας το σχηματισμό λιγότερο βιολογικώς δραστικών λιπιδίων μεσολαβητών μέσω της PAP-εξαρτώμενης CoA ανεξάρτητης τρυσωστικής δραστηριότητας (TA). Αυτό το ένζυμο υδrolύει το PAF, παράγοντας άκυλο-PAP, το οποίο έχει ανασταλτικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. [26, 27, 59-67, 42,50]

Η παρούσα έρευνα είχε ως σκοπό να διερευνήσει την επίδραση της κατανάλωσης του κρασιού σε ποιο κλασικούς καρδιαγγειακούς δείκτες όπως η Lp-PLA₂ αλλά και στην απόκριση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων (PBMC) των εθελοντών στη φλεγμονή σε άτομα με στεφανιαία νόσο

Επίδραση της κατανάλωσης του κρασιού στην Lp-PLA₂

Η Lp-PLA₂ είναι μια φωσφολιπάση A₂ ανεξάρτητη ασβεστίου, η οποία εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα, κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, ενώ παράλληλα υπερεκφράζεται στις αθηρωματικές πλάκες σε περιοχές αυξημένης συσσώρευσης μακροφάγων. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται πως έχει διττή δράση. Η πρώτη δράση που περιγράφηκε για το ένζυμο αυτό ήταν η υδρόλυση και απενεργοποίηση του ισχυρού φωσφολιπιδιακού διαμεσολαβητή της φλεγμονής PAF. Εξαιτίας αυτής της δράσης, η Lp-PLA₂ θεωρείται ότι είναι ένα αντιφλεγμονώδες και αντιαθηρογόνο ένζυμο. Ωστόσο, νεώτερες μελέτες απέδειξαν ότι η Lp-PLA₂ αποικοδομεί τα πολικά οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παράγονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, ή την οξείδωση κυτταρικών μεμβρανών ή κατά την κυτταρική απόπτωση. Η υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την Lp-PLA₂ έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lysoPC) και οξειδωμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (oxNEFA), τα οποία εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα προφλεγμονωδών και προαποπτωτικών δράσεων.

Δυο μεταanalύσεις μια των Carolina et al και μια των Tew et al καταλήγουν στο συμπέρασμα πως υψηλές συγκεντρώσεις της Lp-PLA₂ σχετίζονται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα, ώστε να μπορεί η Lp-PLA₂ να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης. [50,52,65,84]

Το αποτέλεσμα της παρούσας έρευνας δεν έδειξε να υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική ($P>0,05$) συσχέτιση της κατανάλωσης κρασιού με τα επίπεδα δραστηριότητας της Lp-PLA₂. Θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω σε μεγαλύτερο δείγμα ώστε να καταλείξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Επίδραση της κατανάλωσης του κρασιού στην IL-1b και τον TNF-a

Ο TNF-a και η IL-1b ανήκουν στη κατηγορία των κυτταροκινών που επάγουν την φλεγμονή. Έχουν πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών που εξετάζουν τη δράση της κατανάλωσης του κρασιού στα επίπεδα δεικτών φλεγμονής και οι περισσότερες δείχνουν

μια τάση η κατανάλωση κρασιού να προκαλεί μια μείωση στην έκφραση τους αν και υπάρχουν κάποια αντικρουόμενα δεδομένα.^[60-83]

Τα δεδομένα όμως από *in vivo* μελέτες κλινικής παρέμβασης για την επίδραση της κατανάλωσης κρασιού σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι πολύ περιορισμένα. Σκοπός μας ήταν να εξετάσουμε την επίδραση της κατανάλωσης του κρασιού στα επίπεδα έκκρισης της IL-1b και του TNF-a από τα PBMCs των εθελοντών στα βασικά επίπεδα και μετά από την ενεργοποίησή τους με LPS.

Ένα πρώτο συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουμε είναι ότι η επαγωγή των PBMC με LPS έχει ως αποτέλεσμα την άυξηση της παραγωγής TNF και IL-1b γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες έρευνες όπως αυτή των Olas et al η οποία έδειξε αύξηση της παραγωγής του TNF-a και της IL-6 σε PBMC μετά την επαγωγή τους από LPS.^[85]

Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν έδειξαν κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση της κατανάλωσης του κρασιού στα επίπεδα των TNF-a και IL-1b. Η έρευνα παρόλα αυτά βρίσκεται σε εξέλιξη και απαιτούνται τα αποτελέσματα από μεγαλύτερο δείγμα ώστε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Παρατηρήθηκε όμως στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-a και της IL-1b από την κατανάλωση τσίπουρου (αλκοόλ). Συγκεκριμένα υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην εκκρινόμενη από PBMCs IL-1b μετά την ενεργοποίησή τους από LPS μεταξύ χρόνου 0 και 8 εβδομάδων παρέμβασης και μεταξύ 4 και 8 εβδομάδων ($P=0.03$). Επίσης υπήρξε σημαντική αύξηση στον εκκρινόμενο από PBMCs TNF-a στα βασικά επίπεδα και μετά την ενεργοποίησή τους από LPS ($P=0,04$ και $P=0,05$ αντίστοιχα). Θα μπορούσαμε εδώ να σχολιάσουμε πως το κρασί φαίνεται να αντισταθμίζει την προφλεγμονώδη δράση της αλκοόλης η οποία φαίνεται από την κατανάλωση του τσίπουρου.

Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μια πρόσφατη έρευνα του 2014 των Guido et al η οποία έγινε σε 10 υγιείς εθελοντές οι οποίοι κατανάλωσαν 5g ρεσβερατρόλης (βασικό συστατικό του κόκκινου κρασιού) καθημερινά, και η οποία έδειξε πως η ρεσβερατρόλη προκάλεσε αύξηση των επιπέδων του TNF-a καθώς μείωση της IL-10 παραγόμενων από PBMC.^[86] Κάτι που ενισχύει την άποψη ότι τα μικροσυστικά ενός τροφιμού μπορεί να έχουν συνεργιστική ή και αντίθετη δράση.

Συμπερασματικά καταλήγουμε πως τα μέχρι τώρα δεδομένα για την επίδραση της κατανάλωσης του κρασιού σε δείκτες φλεγμονής είναι πολύ περιορισμένα και είναι απαραίτητο να γίνουν επιπλέον έρευνες σε μεγαλύτερα δείγματα πλυθισμού.

1. Elisaf M. The treatment of coronary heart disease: An update. Part 1: An overview of the risk factors for cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin.* 2002;17:18-26
2. Harjai KJ. Potential new cardiovascular risk factors: left ventricular hypertrophy, homocysteine, lipoprotein (a), triglycerides, oxidative stress, and fibrinogen. *Ann Intern Med.* 1999;131:376-86
3. Hansson G. K. Mechanisms of Disease. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-95
4. Fragopoulou E., Demopoulos C. A., Antonopoulou S. Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox. Review. *International Journal of Wine Research.* 2009;1:131-143
5. Zweifach, B. W., Grant, L. & McCluskey, R. T. *The Inflammatory Process.* Academic, New York, 1965
6. Carl Nathan. Points of control in inflammation. Review. *Nature* 2002;420:846-852
7. Vander, Sherman, Luciano, M. Τσακόπουλος, Ν. Γελαδάς. Φυσιολογία του ανθρώπου ΙΙ. 8η Έκδοση: Αμυντικοί Μηχανισμοί του Ανθρώπου : Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. 2001: 908-911
8. Μοντσόπουλος Χ. Παθολογική φυσιολογία. 2η Έκδοση : Ανοσολογία: ιατρικές εκδόσεις Λίτσας. 2000:71-75
9. Demopoulos C. A., Karantonis H.C., Antonopoulou S.: Platelet activating factor- a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur. J. Lipid Science Technol.* 2003;105:705-716
10. Constantinos A. Demopoulos, Haralabos C. Karantonis, Smaragdi Antonopoulou Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 705-716
11. Tsimikas S, Tsironis LD, Tselepis AD. New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27:2094-2099.
12. Chauffe RJ, Wilensky RL, Mohler ER 3rd. Recent developments with lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitors, *Curr Atheroscler Rep* 2010, 12:43-7.

13. Carpenter KL, Challis IR, Arends MJ. Mildly oxidised LDL induces more macrophage death than moderately oxidised LDL: roles of peroxidation, lipoprotein-associated phospholipase A2 and PPARgamma, *FEBS Lett* 2003, 553:145-150.
14. Gautier EL, Huby T, Witztum JL, et al. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage, *Circulation* 2009, 119:1795-1804.
15. Shi Y, Zhang P, Zhang L, et al. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses *Atherosclerosis* 2007, 191:54
16. Quinn M, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:2805-2809.
17. Perez R, Balboa MA, Balsinde J. Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells, *J Immunol* 2006, 176:2555-2561.
18. Aprahamian T, Rifkin I, Bonaglio R, et al. Impaired clearance of apoptotic cells promotes synergy between atherogenesis and autoimmune disease, *J Exp Med* 2004, 199:1121-1131.
- 22
19. Kolodgie FD, Burke AP, Skorija KS, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:2523-2529.
20. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase, *Atheroscler Suppl* 2002, 3:57-68.
21. Epps KC, Wilensky RL. Lp-PLA2 - a novel risk factor for high-risk coronary and carotid artery disease, *J Intern Med* 2011, 269:94-106.
22. Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention, *Am J Cardiol* 2008, 101:23F-33F.
23. Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson A, Gao P, et al. Lipoprotein associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies, *Lancet* 2010, 375:1536-1544.
24. Tew DG, Boyd HF, Ashman S, et al. Mechanism of inhibition of LDL phospholipase A2 by monocyclic-beta-lactams. Burst kinetics and the effect of stereochemistry, *Biochemistry* 1998, 37:10087-10093.

25. Edgington T. R.: *Recognition coupled responses of the monocyte: activation of coagulation pathways*. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1983;25:1-6
26. Marshall A. Corson Darapladib: an emerging therapy for atherosclerosis *Ther Adv Cardiovasc Dis* (2010) 4(4) 241–248 DOI: 10.1177/1753944710375820
27. Berne M., Levy N. M. : *Physiology*. 4th Edition, Mosby, 1998
28. Keys A. Menotti A., Karvonen MJ., Aravanis A., Blackburn H., Buzina R., et al. The diet and 15- year death rate in the Seven Study. *Am J. Epidemiol*, 1986;124:903-915
29. Παναγιωτάκος Δ.Β. *Μεθοδολογία της έρευνας και της ανάλυσης δεδομένων για τις επιστήμες της υγείας*. Β.Γ. Κωστάκη, Αθήνα, 2006: 219-229
30. Keys A. Menotti A., Karvonen MJ., Aravanis A., Blackburn H., Buzina R., et al. The diet and 15- year death rate in the Seven Study. *Am J. Epidemiol*, 1986;124:903-915
31. Παναγιωτάκος Δ.Β. *Μεθοδολογία της έρευνας και της ανάλυσης δεδομένων για τις επιστήμες της υγείας*. Β.Γ. Κωστάκη, Αθήνα, 2006: 219-229
32. Trichopoulos D, Lagiou P. Dietary patterns and mortality. *Br J Nutr*.2001;85:133-4
33. Trichopoulou A, Vasilopoulou E: Mediterranean diet and longevity *British Journal Nutrition* 2000;84:205-209
34. Kok FJ, Kromhout D. Atherosclerosis: epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr*. 2004;43:1:I/2-5.
35. Bach A., Serra-Majem L., Carrasco JL., Roman B., Ngo J., Bertomeu I. The use of Indexes evaluating the adherence in the Mediterranean diet in epidemiological studies: A review. *Publ H Nutr*. 2006;9 (1A)132-46
36. Matala A.L, Zambelas A, stavrinou V, Wolinski I.. *The Mediterranean diet: Constituents and Health Promotion*. CRP Press LLC. Chapter 3: The Mediterranean diet: Definition, Epidemiological Aspects and Current Patterns. 2001
37. E.Fragopoulou, T.Nomikos, S.Antonopoulou, C.A.Mitsopoulou and C.A.Demopoulos: Separation of biologically active lipids from red wine. *J.Agricultural Food Chemistry*.2000;48:1234
38. Fragopoulou, T.Nomikos, N.Tsantila, A.Mitropoulou, I.Zabetakis and C.A.Demopoulos: Biological activity of total lipids from red and white wine/must. *J. Agric. Food Chem*. 2001;49:5186
39. E.Fragopoulou, S.Antonopoulou, and C.A.Demopoulos: Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. *J.Agric.Food Chem*. 2002;50:2684

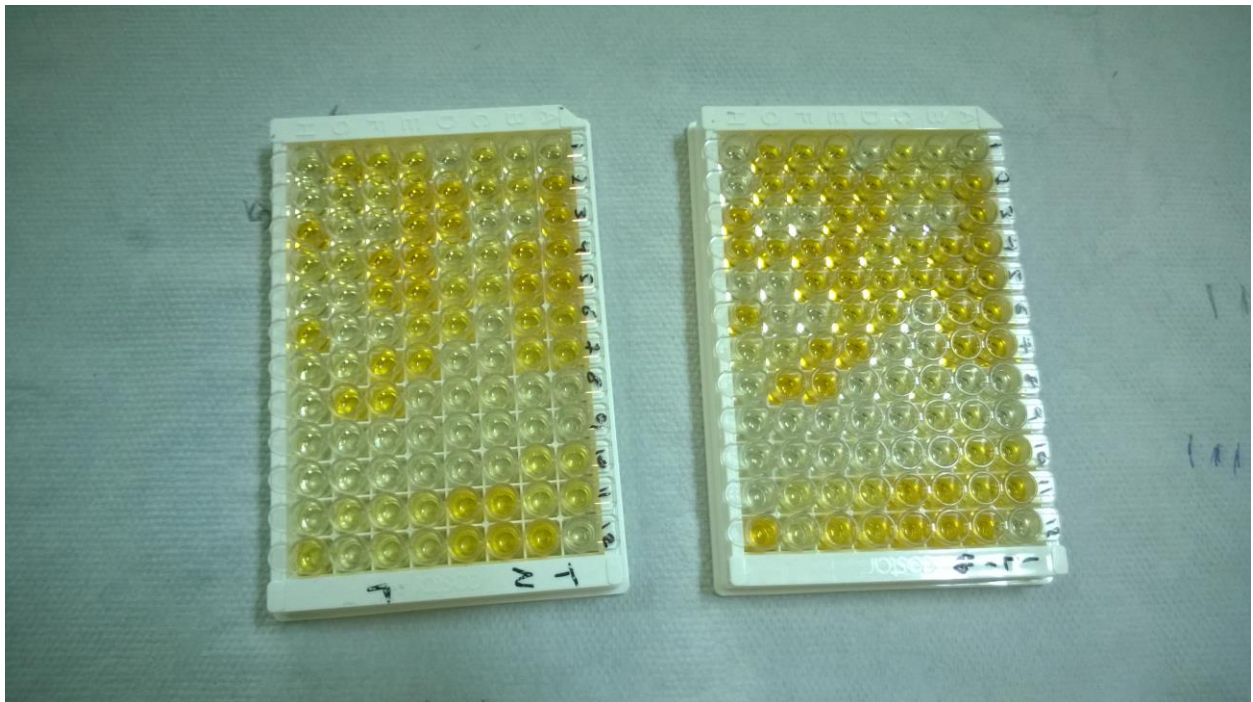
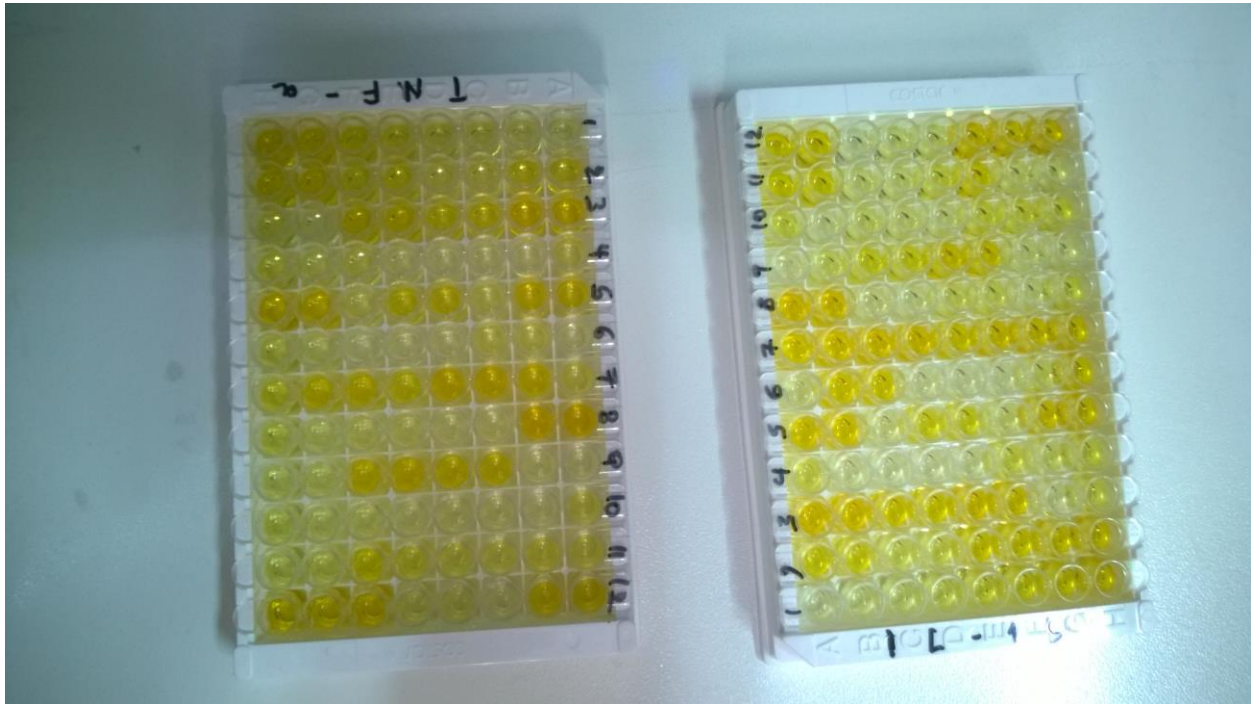
40. E. Fragopoulou, S.Antonopoulou, T.Nomikos and C.A.Demopoulos: Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties *Biochim. Biophys. Acta* 2003;90:1632
41. Xanthopoulou, M.N., E. Fragopoulou, K. Kalathara, T. Nomikos, H.C. Karantonis and S. Antonopoulou. Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chem.* 2009;120: 665-672
42. Salovainen MJ.Kesaniemi YA. Effects of alcohol on lipoproteins in relation to coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6243-50
43. Foppa M., Fuchs F., Duncan B. Alcohol and Atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol.* 2001;76:171-6
44. Szmítko P. A. and Subodh Verma. Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288: H2023–H2030
45. Rajaram S. The effect of vegetarian diet, plant foods, and phytochemicals on hemostasis and thrombosis. *Am J Clin Nut.r* 2003;78:552–8
46. Opie Lionel H. and Sandrine Lecour. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. Review. *European Heart Journal.* 2007;28:1683–1693
47. Albert C. Manson J. Cook N., Ajani U., Gaziano J., Hennekens C. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation,* 1999;10:944-950
48. Klatsby AL., et al: Red wine, White wine, liquor, beer and risk for coronary artery disease hospitalization. *Am. J. Cardiol.,* 1997;80:416-420
49. Klatsby AL., et al: Wine, liquor, beer and mortality. *Am J. Epidemiol.* 2003;158:585-595
50. E Fragopoulou C A Demopoulos S Antonopoulou Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox *International Journal of Wine Research* 2009;1
51. HFJ Hendriks, J Veenstra, E J M Velthuis-Te Wierik, G Shaafsma, C Kluft: Effect of moderate dose of alcohol with evening meal on fibrinolytic factors *BMJ* 1994;308 : 1003-7
52. Michael J.A. Williams, Wayne H.F. Sutherland, Alan P. Whelan, Maree P. McCormick, and Sylvia A. de Jong 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
53. Blanco-Colio L.M., Monica Valderrama, Luis Antonio Alvarez-Sala, Carmen Bustos, Miguel Angel Herna'ndez-Presa, Pilar Cancelas. Red Wine Intake Prevents Nuclear Factor-kB Activation in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Healthy Volunteers During Postprandial Lipemia Circulation. 2000;102:1020-1026

54. Numminen, M. Kobayashi, S. Uchiyama et al *Effects of alcohol and the evening meal on shear-induced platelet aggregation and urinary excretion of prostanoids. Alcohol and Alcoholism* 2000;35:594-600
55. Marianna N. Xanthopoulou Konstantia Kalathara Sophia Melachroinou Kalliopi Arampatzi-Menenakou, Smaragdi Antonopoulou Mary Yannakoulia, Elizabeth Fragopoulou *Wine consumption reduced postprandial platelet sensitivity against platelet activating factor in healthy men Eur J Nutr DOI 10.1007/s00394-016-1194-0*
56. Fuhrman B., A Lavy and M Aviram. *Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. Am. J. Clin. Nutr*, 1995;61:549-554
57. Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A, Simonetti P. *Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers Eur J Clin Nutr*.1996;50(4):209-13
58. Cuevas A. et al. *A High-Fat Diet Induces and Red Wine Counteracts Endothelial Dysfunction in Human Volunteers. Lipids*.2000;35:143-148
59. Retterstol Lars, Knut E, øivind Braaten, lars eikvar, Terje R. Pedersen and Leiv Sandvik *A daily glass of red wine: does it affect markers of inflammation? Alcohol and Alcoholism* 2005;46:102-105
60. Tsang C, Higgins S, Duthie GG, 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;93:233–40.
61. Arendt BM, Ellinger S, Kekic K, et al. *Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial. J Nutr* 2005;4:33.
62. Sacanella E. et al. *Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. Am J Clin Nutr* 2007;86:1463–9.
63. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. *Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. Nutr J (BioMed Central)* 2007;6:27.
64. Imhof A., Blagieva R, Marx N, Koenig W. *Drinking modulates monocyte migration in healthy subjects: a randomised intervention study of water, ethanol, red wine and beer with or without alcohol. J. Biol. Chem*.2009; 284:17808-17818

65. Canali R., Raffaella Comitato, Roberto Ambra and Fabio Virgili Red wine metabolites modulate NF-kB, activator protein-1 and cAMP response element-binding proteins in human endothelial cells *British Journal of Nutrition* 2010;103:807–814
66. Ciancarelli MG, Di Massimo C, De Amicis D et al. Moderate consumption of red wine and human platelet responsiveness. *Thromb Research* 2011, 128: 124–129
67. Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, De Simone R, Raneli G, Scaglione R, Licata G. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2006, (60): 41–47.
68. Giovannelli L, Pitozzi V, Luceri C, Giannini L, Toti S, Salvini S, Sera F, Souquet J, Cheynier V, Sofi F, Mannini L, Gori A, Abbate , Palli , Dolaro P. Effects of de-alcoholised wines with different polyphenol content on DNA oxidative damage, gene expression of peripheral lymphocytes, and haemorheology: an intervention study in post-menopausal women. *Eur J Nutr* 2011, (50):19–29.
69. Hansen A, Marckmann P, Dragsted L, Finne Nielsen I-L, Nielsen SE, Grønbæk M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors and other risk factors for cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition* 2005, (59):449–455.
70. Imhof A, Blagieva R, Marx N, Koenig W. Drinking modulates monocyte migration in healthy subjects: a randomised intervention study of water, ethanol, red wine and beer with or without alcohol. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2008, 5: 48.
71. Retterstol I, Berge K, Braaten O, Eikvar I, Pedersen TR, Sandvik I. A daily glass of red wine: Does it affect markers of inflammation? *Alcohol & Alcoholism* 2005, 40 (2):102–105.
72. Vazquez-Agell M, Sacanella E, Tobias E, Monagas M, Antunez E, Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos R, Fernandez-Sola J, Nicolas J, Estruch R. Inflammatory Markers of Atherosclerosis Are Decreased after Moderate Consumption of Cava (Sparkling Wine) in Men with Low Cardiovascular Risk. *J. Nutr.* 2007, (137): 2279–2284.
73. Migliori MI, Panichi V, de la Torre R, Fitó M, Covas M, Bertelli A, Muñoz-Aguayo D, Scatena A, Paoletti S, Ronco C. Anti-inflammatory effect of white wine in CKD patients and healthy volunteers. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):218-23. doi: 10.1159/000371570. Epub 2015 Mar 31.
74. Pellegriani N, Pareti FI, Stabile F et al. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1996, 50:209– 213
75. Cuevas A. et al. A High-Fat Diet Induces and Red Wine Counteracts Endothelial Dysfunction in Human Volunteers. *Lipids*.2000;35:143-148

76. Tsang C, Higgins S, Duthie GG, 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;93:233–40.
77. Arendt BM, Ellinger S, Kekic K, et al. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial. *J Nutr* 2005;4:33.
78. Sacanella E. et al. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1463–9.
79. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J (BioMed Central)* 2007;6:27.
80. Beulens JWJ, van der Schouw YT, Bergmann MM, Rohrmann S, Schulze MB, Buijsse B, Grobbee DE, Arriola L, Cauchi S, Tormo M-J, Allen NE, van der A DL, Balkau B, Boeing H, Clavel-Chapelon F, de Lauzon-Guillan B, Franks P, Froguel P, Gonzales C, Halkjær J, Huerta JM, Kaaks R, et al and the InterAct Consortium. Alcohol consumption and risk of type 2 diabetes in European men and women: influence of beverage type and body size. The EPIC–InterAct study. *J Intern Med* 2012, 1-13.
81. Joosten M, Beulens J, Kersten S, Hendriks H. Moderate alcohol consumption increases insulin sensitivity and ADIPOQ expression in postmenopausal women: a randomised, crossover trial. *Diabetologia* (2008) 51:1375–1381.
82. Hansen A, Marckmann P, Dragsted L, Finne Nielsen I-L, Nielsen SE, Grønbaek M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors and other risk factors for cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition* 2005, (59):449–455
83. Urquiaga I, Guasch V, Marshall G, San martin A, Castillo O, Rozowski J, Leighton F. Effect of Mediterranean and Occidental Diets, and Red Wine, on Plasma Fatty Acids in Humans. An Intervention Study. *Biol Res* 2004 (37): 253-261
84. CAROLINA A. GARZA, MD; VICTOR M. MONTORI, MD, MSC; JOSEPH P. MCCONNELL, PHD; VIREND K. SOMERS, MD, PHD; IFTIKHAR J. KULLO, MD; AND FRANCISCO LOPEZ-JIMENEZ, MD, MSC Association Between Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Cardiovascular Disease: A Systematic Review *Mayo Clin Proc.* February 2007;82(2):159-165

- 85.** K. Olas, H. Butterweck, W. Teschner, H. P. Schwarz and B. M. Reipert *Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells. 2005 British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* ,140: 478–490
- 86.** Guido A. Gualdoni , Johannes J. Kovarik , Johannes Hofer , Franziska Dose , Marc Pignitter ,Daniel Doberer , Peter Steinberger , Veronika Somoza , Michael Wolzt , Gerhard J. Zlabinger *Resveratrol enhances TNF- α production in human monocytes upon bacterial stimulation Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2014) 95–105.



Αποτελέσματα Elisa