ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αντι-αιμοπεταλιακή δράση από εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποιίας»

Μήτσια Γιαννούλα

Α.Μ 215034

Αθήνα, 2020

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ (Επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τέντα Ρωξάνη

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Μήτσια Γιαννούλα,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, κ.Φραγκοπούλου Ελισάβετ, για τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων, την υποστήριξη και την καθοδήγησή της. Η άμεση ανταπόκριση για την επίλυση των οποιονδήποτε απορριών και οι συμβουλές που μου δόθηκαν, παρά τις δυσκολίες της φετινής χρονιάς, βοήθησαν στην ολοκλήρωση των πειραμάτων ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτωρ, Χολέβα Μαρία, για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε στον χώρο του εργαστηρίου και για τον χρόνο που αφιέρωσε, ώστε να εξηγήσει τη διαδικασία του πειράματος και να επιλύσει τις απορίες που προέκυπταν. Η συνεχή παρουσία της ήταν πραγματικά πολύ σημαντική και η στάση της ιδιαίτερα ενθαρρυντική.

Ευχαριστώ επίσης, τους εθελοντές του πειράματος που συμμετείχαν και συνεργάστηκαν για την επίτευξη της μελέτης αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους φίλους μου, ο καθένας από τους οποίους με τον τρόπο του έδειξε τη συμπαράσταση και την κατανόηση που απαιτούσε αυτή η χρονική περίοδος.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες…… 4
Πίνακας περιεχομένων…… 5
Περίληψη…… 8
Abstract…… 9
Κατάλογος Εικόνων…… 10
Κατάλογος Πινάκων…… 11
Κατάλογος Διαγραμμάτων…… 12
Συντμήσεις…… 14
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ…… 17
Κεφάλαιο 1ο : Το κρασί…… 17
1.1. Ιστορική Αναδρομή…… 17
1.2. Σύσταση σταφυλιού – είδος Vitis Vinifera…… 17
1.3. Σύσταση οίνου…… 18
1.3.1 Αλκοόλες…… 18
1.3.2 Φαινολικές ενώσεις…… 19
-Φλαβονοειδή…… 19
-Μη φλαβονοειδή…… 22
1.3.3 Σάκχαρα…… 24
1.4. Οινοποίηση και ποικιλίες κρασιού…… 24
1.5. Επιδημιολογικά στοιχεία…… 25
1.5.1 Γαλλικό Παράδοξο…… 27
1.5.2 Συσχέτιση κατανάλωσης κρασιού με καρδιαγγειακά…… 28
1.5.3 Συστάσεις κατανάλωσης οίνου-Πρότυπα κατανάλωσης…… 31
Κεφάλαιο 2ο : Καρδιαγγειακά νοσήματα…… 33
2.1 Γενικά στοιχεία/ Επιπολασμός…… 33
2.2 Παράγοντες κινδύνου…… 33
2.3 Αθηροσκλήρωση - Περιγραφή σε επίπεδο ενδοθηλίου…… 34
2.4 Μηχανισμοί πρόκλησης…… 38
2.4.1 Οξειδωτικό στρες…… 38
-Επιπτώσεις στα μακρομόρια…… 40
-Άμυνα του οργανισμού…… 41
2.4.2 Φλεγμονή…… 43
2.4.2.1 Μεσολαβητές και κύτταρα που συμμετέχουν…… 44
2.4.3 Θρόμβωση…… 47
-Αιμόσταση…… 48

-Ινωδόλυση..... 50
2.4.4 Αιμοπετάλια..... 50
2.4.4.1 Ο ρόλος τους στην αθηροσκλήρωση..... 51
2.4.4.2 Αγωνιστές αιμοπεταλίων..... 52
Κεφάλαιο 3ο : Υποπροϊόντα Οινοποιίας..... 55
3.1 Γενικά στοιχεία/ χρήσεις..... 55
3.1.1 Στέμφυλα..... 56
3.1.2 Τσάμπουρα ή μίσχοι..... 57
3.1.3 Φύλλα σταφυλιού..... 57
3.1.4 Οινολάσπες..... 58
3.2 Αντι-αιμοπεταλιακή δράση υποπροϊόντων οινοποιίας..... 59
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 66
Κεφάλαιο 4ο : Σκοπός..... 66
Κεφάλαιο 5ο : Μεθοδολογία..... 67
5.1 Δείγματα υποπροϊόντων..... 67
5.2 Ποσοτικοί προσδιορισμοί εκχυλίσματος..... 67
5.2.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu..... 67
5.2.2 Προσδιορισμός ορθοφαινολικών συστατικών..... 69
5.2.3 Προσδιορισμός σακχάρων..... 70
5.2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου..... 71
5.3 Προσδιορισμός της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων των υποπροϊόντων..... 73
5.3.1 Πλυμένα αιμοπετάλια..... 73
5.3.2 Παραλαβή PRP από εθελοντές..... 75
5.3.3 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας και συσσωρευτικοί παράγοντες..... 76
Κεφάλαιο 6ο : Αποτελέσματα..... 77
6.1 Ποσοτικοί προσδιορισμοί εκχυλισμάτων..... 77
6.2 Πλυμένα αιμοπετάλια..... 79
6.3 Προσδιορισμός της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων των υποπροϊόντων- PRP..... 82
6.3.1 Σύγκριση διαλύτη αναδιάλυσης του εκχυλίσματος (DMSO-BSA)..... 82
6.3.2 Επίδραση εκχυλίσματος PRP σε εθελοντές..... 84
6.3.3 Παράθεση τιμών IC_{50}..... 85
6.3.4 Παράθεση τιμών EC_{50}..... 89

Κεφάλαιο 7ο : Συζήτηση…… 98

Βιβλιογραφία…… 104

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπάρχουσες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο οίνος εμφανίζει αντιοξειδωτικές και αντι-αιμοπεταλιακές ιδιότητες που οφείλονται στο πλήθος των μικροσυστατικών που αυτό περιέχει. Κατά τη διαδικασία παραγωγής του οίνου προκύπτουν τα υποπροϊόντα οινοποιίας, που μπορούν να αποτελέσουν φθηνή και αξιοποιήσιμη πηγή αυτών των φυσικών συστατικών στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η αξιολόγηση της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης εκχυλίσματος από υποπροϊόντα οινοποιίας, σε αιμοπετάλια εθελοντών από παθολογικές καταστάσεις (σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία), με στόχο τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για την ικανότητά του να δρα και σε επιβαρυμένους πληθυσμούς.

Χρησιμοποιήθηκαν υποπροϊόντα (στέμφυλα) από ερυθρές ποικιλίες και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε βιομηχανική κλίμακα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά, ορθο-φαινολικά, σάκχαρα και φώσφορο. Επίσης, εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να αναστέλλει in vitro τη συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων έναντι των συσσωρευτικών παραγόντων PAF, ADP και TRAP. Απομονώθηκε συγκεκριμένα το PRP υγιών εθελοντών αλλά και εθελοντών με ΣΔ τύπου ΙΙ και παχυσαρκία και υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} και EC_{50}, με διαλύτη την BSA.

Όσον αφορά τις τιμές IC_{50}, το εκχύλισμα παρουσιάζει μία λίγο πιο ευεργετική λειτουργία στους εθελοντές με ΣΔ ΙΙ και παχυσαρκία, με τιμές IC_{50} ελαφρώς μικρότερες από τους φυσιολογικούς, ωστόσο η έρευνα βρίσκεται σε πολύ πρώιμα στάδια και απαιτούνται περισσότεροι εθελοντές για να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα. Σχετικά με τις τιμές EC_{50}, μελετήθηκαν οι καμπύλες που παρουσιάζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στις διάφορες συγκεντρώσεις του κάθε παράγοντα, ώστε να έχουμε σαφή εικόνα της αναστολής που προκαλείται από το εκχύλισμα. Στα αποτελέσματα φαίνεται να υπάρχει ένδειξη για μεγαλύτερη ευεργετική δράση του εκχυλίσματος, παρουσία του παράγοντα PAF στα αιμοπετάλια των εθελοντών με ΣΔ ΙΙ και παχυσαρκία. Εξίσου σημαντική είναι και η δράση του εκχυλίσματος με την παρουσία του ADP.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα από υποπροϊόντα οινοποίησης είναι δραστικό και σε αιμοπετάλια διαβητικών/παχύσαρκων εθελοντών. Ωστόσο, δε μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός.

Λέξεις-κλειδιά: Στέμφυλα, αντι-αιμοπεταλιακή δράση, συσσώρευση αιμοπεταλίων, PAF, ADP

ABSTRACT

Researches that have already been conducted reveal that wine contains micro-constituents with anti-oxidant and anti-platelet properties. The wine production process results in wine-making sub-products, which can be a cheap and usable source of these natural ingredients in the food and pharmaceutical industry.

The goal of this research was the evaluation of the anti-platelet effect of a winery sub-product extract on volunteers' platelets in pathological situations (diabetes mellitus and obesity), in order to deduct conclusions for its ability to affect ailing populations.

In this particular research were used grape pomace from red grape varieties and the extraction took place at an industrial scale. Chemical determinations took place in order to calculate the extract concentration of total phenolic compounds, ortho-phenolics, sugars and phosphorus. It was also examined the ability of the extract to inhibit in vitro platelet aggregation against three aggregative factors (PAF, ADP, TRAP). It was specifically isolated the PRP of healthy volunteers and volunteers with DM II and obesity. Then, the IC_{50} and EC_{50} values were calculated using BSA as a solvent.

Concerning the IC_{50} values, the extract demonstrates a little bit more beneficial function on the platelets of the volunteers with DM II and obesity, with slightly lower IC_{50} values in comparison to the normal volunteers. However, the research is at an early stage and more volunteers are necessary, in order to deduce well-defined conclusions. Regarding the EC_{50} values, we made the curves showing the platelet aggregation at the different concentrations of each factor, in order to have a clear picture of the inhibition caused by the extract. The results indicate a greater beneficial effect of the extract on the platelets of volunteers with DM II and obesity, when PAF is present and equally important is the effect of the extract in the presence of ADP.

In conclusion, it seems that this extract from winery sub-products is also active in platelets of diabetic / obese volunteers. However, no reliable conclusions can be drawn, as the number of the sample is very small.

Key words: Grape pomace, anti-platelet effect, platelet aggregation, PAF, ADP

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Βασικός σκελετός φλαβονοειδών (Jackson, 2014)……19
Εικόνα 1.2 Απεικόνιση κατεχινών (Jackson, 2014)……20
Εικόνα 1.3 Απεικόνιση γενικής δομής φλαβονών (Jackson, 2014)……21
Εικόνα 1.4 Απεικόνιση ανθοκυανιδινών (Waterhouse, 2002)……22
Εικόνα 1.5 Υδροξυβενζοϊκά οξέα (Jackson, 2014)……23
Εικόνα 1.6 Απεικόνιση της ρεσβερατρόλης και των δομών της (Jackson, 2014)……24
Εικόνα 1.7 Μεταβολή της κατανάλωσης του οίνου από το 2014 (OIV,2019)……26
Εικόνα 2.1 Δομή φυσιολογικής αρτηρίας (Lusis, 2000)……35
Εικόνα 2.2 Απεικόνιση σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας (Rafieian-Kopaei et al., 2014)……37
Εικόνα 2.3 Πηγές οξειδωτικού στρες στα αιμοφόρα αγγεία (Singh and Jialal, 2006)……39
Εικόνα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των Τ-λεμφοκυττάρων στην αθηρογένεση και μόρια που συμμετέχουν (Libby, 2002)……45
Εικόνα 2.5 Ο ρόλος των φωσφολιποειδικών μεσολαβητών στην φλεγμονή και κατ' επέκταση την αθηροσκλήρωση (Ninio, 2005)……47
Εικόνα 2.6 Σχηματική αναπαράσταση της πρωτογενούς και δευτερογενούς αιμόστασης (Clemetson, 1999)……49
Εικόνα 2.7 Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης, προσκόλλησης, συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και των παραγόντων που συμμετέχουν (Abajo, 2011)……51
Εικόνα 3.1 Διαδικασία απομόνωσης στεμφύλων (Kalli et al., 2018)……56
Εικόνα 3.2 Τσάμπουρα, φλοιός και καρπός σταφυλιού (Kalli et al., 2018)……57
Εικόνα 6.1 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες (ολικά φαινολικά συστατικά, ορθοφαινολικά συστατικά, σάκχαρα, φώσφορος) από τον χημικό προσδιορισμό του αιθανολικού δείγματος από υποπροϊόντα οινοποιίας……78
Εικόνα 6.2 Καμπύλες συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων με προσθήκη του παράγοντα κολλαγόνο (συσσωρευματόμετρο)……80
Εικόνα 6.3 Καμπύλες συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων με προσθήκη του παράγοντα κολλαγόνο (συσσωρευματόμετρο)……81
Εικόνα 6.4 Καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι του παράγοντα PAF για τον παχύσαρκο εθελοντή(συσσωρευματόμετρο)……88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Δεδομένα από μετα-ανάλυση σχετικά με την κατανάλωση αλκοόλ και τον αγγειακό κίνδυνο (Costanzo et al., 2011)……29
Πίνακας 3.1 Μελέτες για την αντι-αιμοπεταλιακή δράση των υποπροϊόντων οινοποιίας in vitro……63
Πίνακας 5.1 Πορεία πειράματος προσδιορισμού φωσφόρου……72
Πίνακας 6.1 Αποτελέσματα ποσοτικών προσδιορισμών στο αιθανολικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως η μέση τιμή των μετρήσεων τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ± την τυπική απόκλιση……77
Πίνακας 6.2 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών……84
Πίνακας 6.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις τιμές IC_{50}……88
Πίνακας 6.4 Μεταβολή της τιμής EC_{50} των παραγόντων PAF, ADP και TRAP, λόγω απουσίας και παρουσίας 250μg εκχυλίσματος σε κάθε περίπτωση εθελοντή (συγκεντρωτικός πίνακας)……97

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1.1 Η σύσταση του σταφυλιού (Kalli et al., 2018)……18
Διάγραμμα 1.2 Απεικόνιση της κατανάλωσης του οίνου σε συνάρτηση με τον αγγειακό κίνδυνο που προκαλείται (Costanzo et al., 2011)……29
Διάγραμμα 1.3 Μεταβολή των επιπέδων της HDL σε γυναίκες (μαύρο) και άντρες (γκρι), ύστερα από την παρέμβαση (Golan et al., 2019)……30
Διάγραμμα 6.1 Καμπύλη συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων έναντι του κολλαγόνου……79
Διάγραμμα 6.2 Καμπύλη συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων έναντι του TRAP……80
Διάγραμμα 6.3 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP με διαλύτη το DMSO, σε PRP του υγιούς εθελοντή No1……83
Διάγραμμα 6.4 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP με διαλύτη την BSA, σε PRP του υγιούς εθελοντή No1……83
Διάγραμμα 6.5 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP με διαλύτη την BSA, σε PRP του υγιούς εθελοντή No1……85
Διάγραμμα 6.6 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του υγιούς εθελοντή No2……86
Διάγραμμα 6.7 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1……86
Διάγραμμα 6.8 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2……87
Διάγραμμα 6.9 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή……87
Διάγραμμα 6.10 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του υγιούς εθελοντή No1……90
Διάγραμμα 6.11 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του υγιούς εθελοντή No1……90
Διάγραμμα 6.12 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του υγιούς εθελοντή No1……91
Διάγραμμα 6.13 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του υγιούς εθελοντή No2……91
Διάγραμμα 6.14 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του υγιούς εθελοντή No2……92
Διάγραμμα 6.15 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του υγιούς εθελοντή No2……92
Διάγραμμα 6.16 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1……93
Διάγραμμα 6.17 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1……93
Διάγραμμα 6.18 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1……94
Διάγραμμα 6.19 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2……94
Διάγραμμα 6.20 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2……95
Διάγραμμα 6.21 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2……95

Διάγραμμα 6.22 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή……96
Διάγραμμα 6.23 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή……96
Διάγραμμα 6.24 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή……97

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA	arachidonic acid, αραχιδονικό οξύ
ADP	adenosine diphosphate, διφωσφορική αδενοσίνη
AUC	area under the curve, εμβαδό κάτω από την καμπύλη
BSA	bovine serum albumin, βόεια αλβουμίνη ορού
Ca	calcium, ασβέστιο
CAT	Catalase, καταλάση
CF	Cabernet Franc
$-CH_2$	ομάδα μεθυλενίου
CH_3OH	methanol, μεθανόλη
CO_2	carbon dioxide, διοξείδιο του άνθρακα
CRP	C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CS	Cabernet Sauvignon
Cu	copper, χαλκός
CVD	cardiovascular diseases, καρδιαγγειακά νοσήματα
Cys	cysteine, κυστεΐνη
DMSO	dimethyl sulfoxide,
EC_{50}	half maximal effective concentration, μισή μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση
EtOH	ethanol, αιθανόλη, εκχύλισμα αιθανόλης
FC	Folin-Ciocalteu
Fe	iron, σίδηρος
FMD	flow-mediated dilatation, διαστολή μεσολαβούμενη από τη ροή
fw	fresh weight, νωπό βάρος
GA	gallic acid, γαλλικό οξύ
GAE	gallic acid equivalents, ανάλογα γαλλικού οξέος
GPx	Glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSH	τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης
HDL	high-density lipoprotein, λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
H_2O	water, νερό
HO_2	υδροϋπεροξειδική ρίζα
H_2O_2	hydrogen peroxide, υπεροξείδιο του υδρογόνου
HOCl	hypochlorous acid, υποχλωριώδες οξύ

HRV	heart rate variability, μεταβλητότητα του καρδιακού ρυθμού
IC_{50}	half maximal inhibiting concentration, μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση
IFN-γ	interferon-γ, ιντερφερόνη-γ
IL	interleukin, ιντερλευκίνη
LDL	low density lipoprotein, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LOO·	lipid peroxyl radical, ρίζα λιποειδικού υπεροξειδίου
LOOH	hydroperoxide, υδροϋπεροξείδιο
LOX	lipoxygenase, λιποοξυγονάση
MeOH	methanol, μεθανόλη
Mn	manganese, μαγγάνιο
MPO	myeloperoxidase, μυελοϋπεροξειδάση
Na_2CO_3	sodium carbonate, ανθρακικό νάτριο
NAD(P)H	Nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide, νικοτινάμιδο-αδένινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο
NO·	nitric oxide radical, ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
NOS	nitric oxide synthase, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
NOX	NADPH oxidase, NADPH οξειδάση
O_2	oxygen, οξυγόνο
$\cdot O_2^-$	superoxide radical, ανιόν υπεροξειδίου
O_3	ozone, όζον
OH·	hydroxyl radical, ρίζα υδροξυλίου
$ONOO^-$	peroxinitrite, υπεροξυνιτρώδες ανιόν
Ξ	Ξινόμαυρο
PAF	platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH	PAF acetylhydrolase, PAF ακετυλοϋδρολάση
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1, αναστολέας-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PAI-2	plasminogen activator inhibitor-2, αναστολέας-2 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PAR	protease-activated receptors, υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες
PL	phospholipase, φωσφολιπάση
PPP	platelet poor plasma, πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PRP	platelet rich plasma, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PUFA	polyunsaturated fatty acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
P2Y	αιμοπεταλιακός υποδοχέας του ADP

RNS	reactive nitrogen species, ενεργές μορφές αζώτου
RO·	ρίζα αλκοξειδίου
ROO·	ρίζα υπεροξειδίου
ROS	reactive oxygen species, ενεργές μορφές οξυγόνου
S	Syrah
ΣΔ	σακχαρώδης διαβήτης
ΣΝ	στεφανιαία νόσος
Se	selenium, σελήνιο
SOD	superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση
TF	tissue factor, ιστικός παράγοντας
TNF-a	tumor necrosis factor a, παράγοντας νέκρωσης όγκων α
Th1	T-helper type 1 cells, τύπου-1 βοηθητικά Τ- κύτταρα
tPA	tissue plasminogen activator, ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
TRAP	thrombin receptor-activating peptide, πεπτίδιο που ενεργοποιεί τον υποδοχέα θρομβίνης
TXA_2	thromboxane A_2, θρομβοξάνιο A_2
uPA	urokinase-type plasminogen activator, ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1, μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1
vWF	von Willebrand factor, παράγοντας von Willebrand
W	water, υδατικό εκχύλισμα
XO	xanthine oxidase, οξειδάση της ξανθίνης
Zn	zinc, ψευδάργυρος

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΤΟ ΚΡΑΣΙ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Σύμφωνα με αναφορές και στοιχεία της ιστορίας, ο καρπός **Vitis Vinifera** ή αλλιώς, το σταφύλι, αλλά και η ιδέα της εκμετάλλευσής του προς παραγωγή οίνου, εμφανίστηκε για πρώτη φορά κατά τη Νεολιθική εποχή. Ξεκινώντας από την Καυκασία και φτάνοντας έως την Αίγυπτο, την Ελλάδα και δυτικότερα, έγινε ένας ευρέως γνωστός καρπός, που κατείχε σημαντική θέση στην καθημερινότητα. Η κατανάλωση του σταφυλιού και του κρασιού θεωρούνταν απαραίτητη για τον εμπλουτισμό της διατροφής με θρεπτικά συστατικά και αποτελούσε σύμβολο κοινωνικής ευημερίας και ανάπτυξης. Παρόλο που η ακριβής σύστασή του δεν ήταν γνωστή, το κρασί χρησιμοποιήθηκε και για φαρμακευτικούς σκοπούς, σαν αναλγητικό και διουρητικό από τον Ιπποκράτη, αλλά και ως επουλωτικό φάρμακο για πληγές. (Fragopoulou et al., 2009)

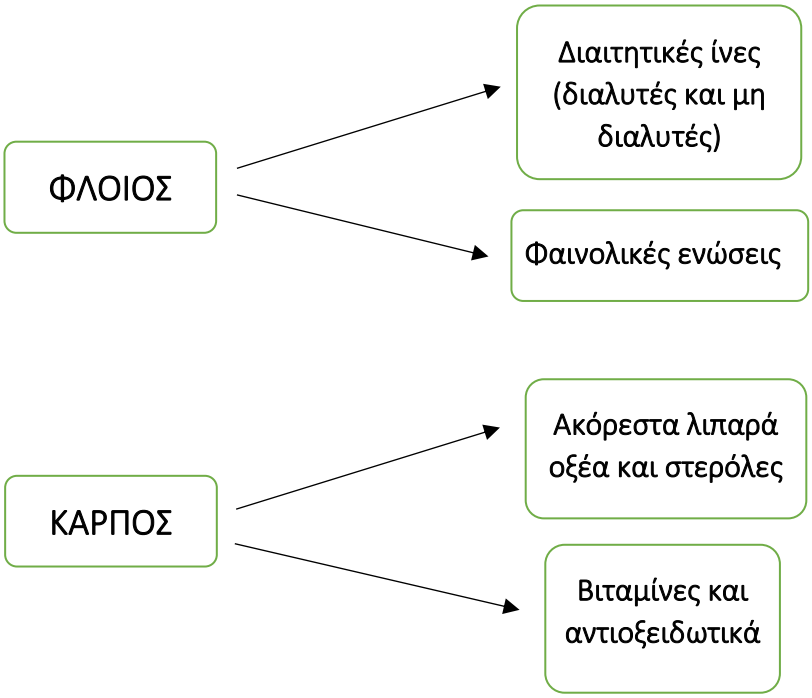
Σήμερα, ερευνητικές μελέτες συγκεντρώνουν τις ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού στην υγεία του ανθρώπου και αποδεικνύουν την αντιοξειδωτική, την αντιφλεγμονώδη και την αντιμικροβιακή δράση του. (Fernandes et al., 2017)

1.2 Σύσταση σταφυλιού- Vitis Vinifera

Το είδος αμπέλου Vitis Vinifera, ανήκει στο γένος Vitis (άμπελος) , της οικογένειας Vitaceae (αμπελοειδή). Κυρίως καλλιεργείται για τον καρπό του, το σταφύλι. Το σταφύλι αποτελείται από τα τσάμπουρα ή βόστρυχοι, που είναι τα κοτσάνια, τα κουκούτσια ή γίγαρτα, την φλούδα ή φλοιό και τη σάρκα. Ο φλοιός, η σάρκα και τα γίγαρτα, συγκροτούν τη ρόγα του σταφυλιού και τα συναντάμε σε αυτή σε αναλογία 7-12%, 83-87% και 2-6% αντίστοιχα. Επιπλέον, γλεύκος (μούστος) ονομάζεται το περιεχόμενο της ράγας, αφού αφαιρεθούν ο φλοιός και τα γίγαρτα, μετά από επεξεργασία. Η σύνθεσή του είναι 65-80% σε νερό, 17-25% σε σάκχαρα και 5-6% σε διάφορες ουσίες όπως οργανικά (τρυγικό οξύ, μηλικό οξύ) ή ανόργανα οξέα (ανθρακικό, φωσφορικό). (Haseeb et al., 2019, Jackson, 2014)

1.3 Σύσταση του οίνου

Το σταφύλι αποτελεί την πρώτη ύλη του κρασιού και ως εκ τούτου, του προσφέρει τα συστατικά του. Η σύσταση του οίνου, βασίζεται λοιπόν στο σταφύλι, στα προϊόντα της ζύμωσης του και σε ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης και αποθήκευσής του. Εντοπίζονται περισσότερες από 500 ενώσεις στο κρασί, με τις περισσότερες σε περιεκτικότητα 10^{-1} έως 10^{-6} mg/L. Ωστόσο, τα συστατικά που ευθύνονται για τη γεύση, τη μυρωδιά αλλά και την υφή του κρασιού, εκτιμάται ότι βρίσκονται σε ποσότητες της τάξης του g/L. Τα κύρια συστατικά του κρασιού είναι το νερό και η αιθανόλη, προσεγγίζοντας το 97 % w/w. Το υπόλοιπο ποσοστό αποτελούν τα σάκχαρα, οξέα, κάποιες αλκοόλες και φαινολικές ενώσεις, σε συγκέντρωση g/L. (Jackson, 2014, Haseeb et al., 2019)



Διάγραμμα 1.1 Η σύσταση του σταφυλιού (Kalli et al., 2018)

1.3.1 Αλκοόλες

Η συγκέντρωση της αιθανόλης, ως σημαντικότερη αλκοόλη στο κρασί, κυμαίνεται από 10-15 % vol και επηρεάζει την ωρίμανση, τη γεύση και το άρωμά του. Αυξάνοντας τη συγκέντρωσή της, αυξάνεται η αντίληψη της πικρής και της γλυκιάς γεύσης του οίνου, μειώνεται η

ένταση άλλων οσμών και καταστέλλεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επίσης, η αύξηση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, μειώνει την εξάτμιση πτητικών ενώσεων, όπως των φαινολών και γενικότερα, βελτιώνει την σταθερότητα του οίνου.

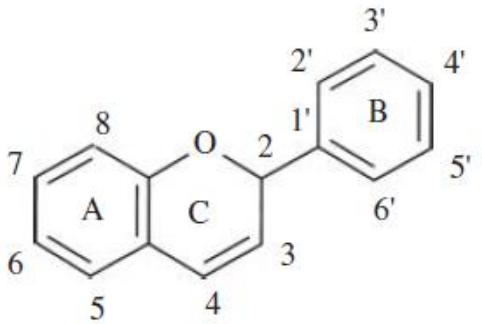
Σχετικά με τη μεθανόλη, βρίσκεται σε μικρή ποσότητα 0,01-0,2 g/L, συγκριτικά με άλλα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση και η ποσότητα αυτή δεν ασκεί άμεση επιρροή στη γεύση ή την οσμή του κρασιού. (Jackson, 2014)

1.3.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με χαρακτηριστική σημασία για το κρασί. Μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση, την υφή, τη γεύση, το άρωμα, αλλά και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του οίνου. Στη χημική δομή τους, είναι κυκλικές ενώσεις βενζολίου, που έχουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου (-OH), συνδεδεμένες απευθείας με τον δακτύλιο. Αν και περιέχουν ομάδες αλκοόλης, ωστόσο δεν εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των αλειφατικών αλκοολών. Στο κρασί, τα περισσότερα φαινολικά συστατικά που εντοπίζονται, είναι μέλη υποομάδων, είτε των φλαβονοειδών, είτε των μη φλαβονοειδών. (Jackson, 2014)

- <u>Φλαβονοειδή</u>

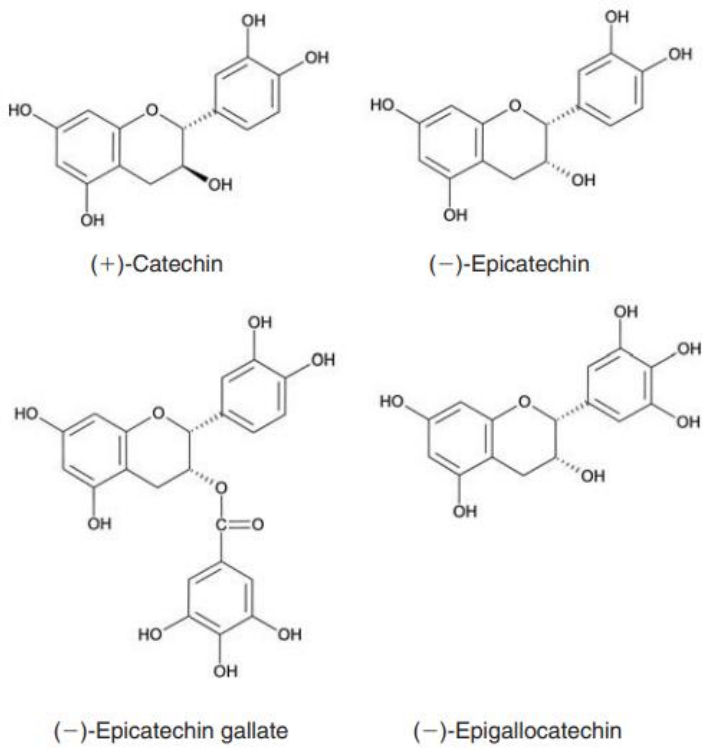
Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα, σε διάταξη δύο δακτυλίων και με μία γέφυρα τριών ανθράκων, που τους ενώνει (C_6-C_3-C_6). Συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των φυτικών κυττάρων, πριν μεταφερθεί και αποθηκευτεί στο κεντρικό χυμοτόπιό τους. Τα πιο κοινά φλαβονοειδή στο κρασί είναι οι φλαβόνες, οι κατεχίνες ή φλαβον-3-όλες και οι ανθοκυανίνες. Μπορεί επίσης, να υπάρχουν ελεύθερα και σε πολυμερή με άλλα φλαβονοειδή, σάκχαρα, μη φλαβονοειδή ή και συνδυασμό αυτών.



Εικόνα 1.1 Βασικός σκελετός φλαβονοειδών (Jackson, 2014)

Φλαβον-3-όλες ή κατεχίνες

Στο σταφύλι, από τον πολυμερισμό των κατεχινών δημιουργείται μια ομάδα πολυμερών που ονομάζονται προκυανιδίνες (συμπυκνωμένες ταννίνες). Ανάλογα με τη διάσπασή τους σε όξινες συνθήκες, χωρίζονται σε προανθοκυανιδίνες και προδελφινιδίνες. Η πιο απλή δομή προκυανιδίνης περιέχει έναν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ δύο φλαβονοειδών. Οι **κατεχίνες** του οίνου είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η (-)-γαλλική επικατεχίνη και λιγότερο συχνά η (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη διαφέρουν μόνο ως προς την στερεοχημεία, αφού η (+)-κατεχίνη αποτελεί την trans διαμόρφωση, ενώ η (-)-επικατεχίνη την cis. Η (-)-επιγαλλοκατεχίνη διαφέρει από την επικατεχίνη γιατί διαθέτει μία τρίτη υδροξυλομάδα στον δακτύλιο Β, ενώ η (-)-γαλλική επικατεχίνη έχει ένα γαλλικό οξύ εστεροποιημένο στον άνθρακα 3 (C_3).



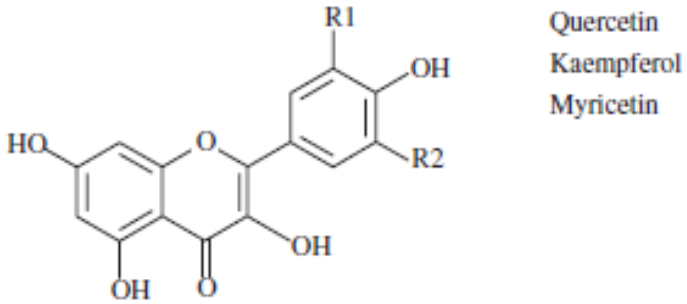
Εικόνα 1.2 Απεικόνιση κατεχινών (Jackson, 2014)

Η πλειονότητα των προκυανιδίνων στο κρασί προέρχονται από το σταφύλι, με μία μικρή ποσότητα να οφείλεται στην αποθήκευση στο βαρέλι. Δομικές διαφορές επίσης εμφανίζονται στις προκυανιδίνες του κοτσανιού, της σάρκας και του καρπού. Μεταξύ των ποικιλιών οίνου που θα αναλυθούν παρακάτω, στην αρχή της παραγωγής του, το κόκκινο κρασί περιέχει περίπου 20 φορές την περιεκτικότητα του λευκού κρασιού σε προκυανιδίνες. Ωστόσο, καθώς περνά ο

χρόνος, οι προκυανιδίνες αργά σχηματίζουν πολυμερή, καθώς ενώνονται με μονομερή φλαβονοειδών. Επιπλέον, οι ολιγομερείς προκυανιδίνες αλλά και τα πολυμερή αυτών, μπορεί να συμπυκνωθούν με ανθοκυανιδίνες και πολυσακχαρίτες. (Jackson, 2014)

Φλαβόνες

Οι σημαντικότερες φλαβόνες που εντοπίζονται στον φλοιό του σταφυλιού και στο κρασί είναι η καμφερόλη, η κερκετίνη και η μυρικετίνη. Στο κρασί ωστόσο, βρίσκονται σε μικρότερη ποσότητα σε σχέση με άλλα φλαβονοειδή, με συγκέντρωση που ποικίλλει από 1-10 % του συνολικού φαινολικού περιεχομένου. Τις συναντάμε σε μορφή γλυκοζίτη και ενώ η ταυτότητά τους σε κάποιες ποικιλίες κρασιού δεν έχει διευκρινιστεί, ωστόσο, κυρίως εμφανίζονται ως 3-γλυκοζίτες, 3-γλυκουρονίδια και διγλυκοζίτες.



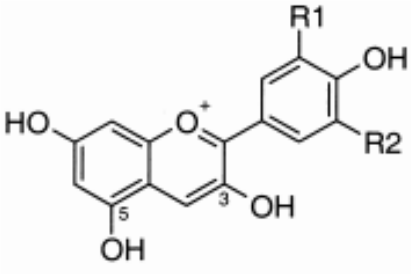
Εικόνα 1.3 Απεικόνιση γενικής δομής φλαβονών (Jackson, 2014)

Μία σημαντική ιδιότητα των φλαβονών του φλοιού είναι ότι απορροφούν, μαζί με τις ανθοκυανίνες, υπεριώδης ακτινοβολία και έτσι, προστατεύουν τα εσωτερικά στρώματα από την καταστροφή τους λόγω της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας. Σαν συμπέρασμα λοιπόν, έρευνες καταλήγουν στο ότι η ακτινοβολία του ήλιου ενισχύει την παραγωγή των φλαβονών, καθώς τα φυτά τις παράγουν, προκειμένου να προστατευτούν. (Jackson, 2014)

Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες προσδίδουν το χρώμα στο κόκκινο κρασί, αλλά και σε άλλα φυτά και τρόφιμα της διατροφής. Αντιδρούν με τις ταννίνες και παράγουν μια πιο σταθερή μορφή ανθοκυανίνης, με χρώμα, η οποία παραμένει περισσότερο άθικτη, συγκριτικά με την αρχική μορφή και επιτρέπει στο κόκκινο κρασί να διατηρεί περισσότερο το χρώμα του. Το χρώμα των ανθοκυανίνων επηρεάζεται ακόμα, από το pH. Οι χρωστικές αυτές εμφανίζουν ερυθρό χρώμα σε

όξινες συνθήκες, για pH<7 και μπλε χρώμα σε βασικές συνθήκες, για pH>7. Επίσης, ο φορτισμένος δακτύλιος C μπορεί να αντιδράσει με μόρια νερού ή με το όξινο θειώδες ανιόν, με αποτέλεσμα να χαθεί το κόκκινο χρώμα. Οι ανθοκυανιδίνες είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή του απλού σκελετού του φλαβονοειδούς της ανθοκυανίνης, συνδεδεμένο με ομάδες που τις διαφοροποιούν. Στο κρασί εντοπίζονται η κυανιδίνη, η πεονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη. (Waterhouse, 2002)



R1,R2
H,OH: κυανιδίνη
H,OCH_3 : πεονιδίνη
OH,OH : δελφινιδίνη
OH,OCH_3 : πετουνιδίνη
OCH_3 ,OCH_3 : μαλβιδίνη

Εικόνα 1.4 Απεικόνιση ανθοκυανιδινών (Waterhouse, 2002)

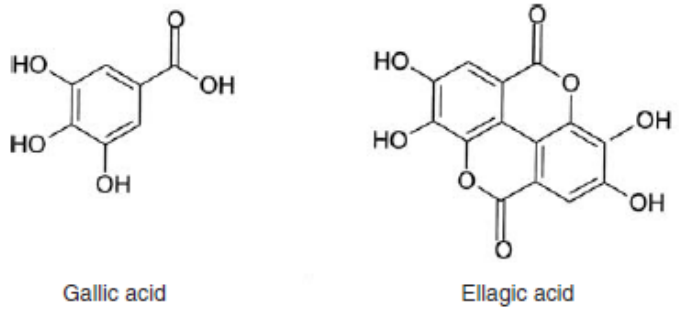
Οι ανθοκυανίνες φαίνεται να έχουν πολύ μικρή βιοδιαθεσιμότητα, σε σχέση με άλλα φλαβονοειδή, μικρότερη από το 1% της τροφής που πέπτεται και γι΄αυτόν τον λόγο, κάθε ποσότητα ανθοκυανίνων που μπορεί να προσληφθεί από την κατανάλωση κρασιού, κρίνεται σημαντική. (Fernandes et al., 2017)

Τέλος, οι ευεργετικές ιδιότητες που έχουν μελετηθεί σχετικά με τα φλαβονοειδή και κατ΄ επέκταση το κρασί, σχετίζονται με πολλά νοσήματα, με κυριότερα τα καρδιαγγειακά. Ιδιαίτερα η αντι-οξειδωτική τους δράση συνδέεται άρρηκτα με τον μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακού νοσήματος. (Fernandes et al., 2017)

- <u>Μη φλαβονοειδή</u>

Τα μη φλαβονοειδή είναι απλούστερες δομές και η προέλευσή τους στο κρασί ποικίλλει. Οι δομές που απαντώνται στον οίνο είναι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα παράγωγά τους και τα στιλβένια. Τα **υδροξυκινναμωμικά οξέα** βρίσκονται κυρίως σαν εστέρες με το τρυγικό οξύ, αλλά συνδέονται και με σάκχαρα, αλκοόλες και άλλες οργανικές ενώσεις. Κοινά παραδείγματα αυτών είναι το π-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται στη σάρκα του σταφυλιού, γι' αυτό και εντοπίζονται σε όλα τα είδη οίνου, ενώ οι συγκεντρώσεις τους διαφέρουν. Σχετικά με την επιρροή τους στην γεύση, τα υδροξυκινναμωμικά φαίνεται να έχουν ελάχιστα πικρή γεύση, που λόγω την μικρής συγκέντρωσής τους, δεν επηρεάζει την τελική αίσθηση του καταναλωτή. (Jackson, 2014, Waterhouse, 2002)

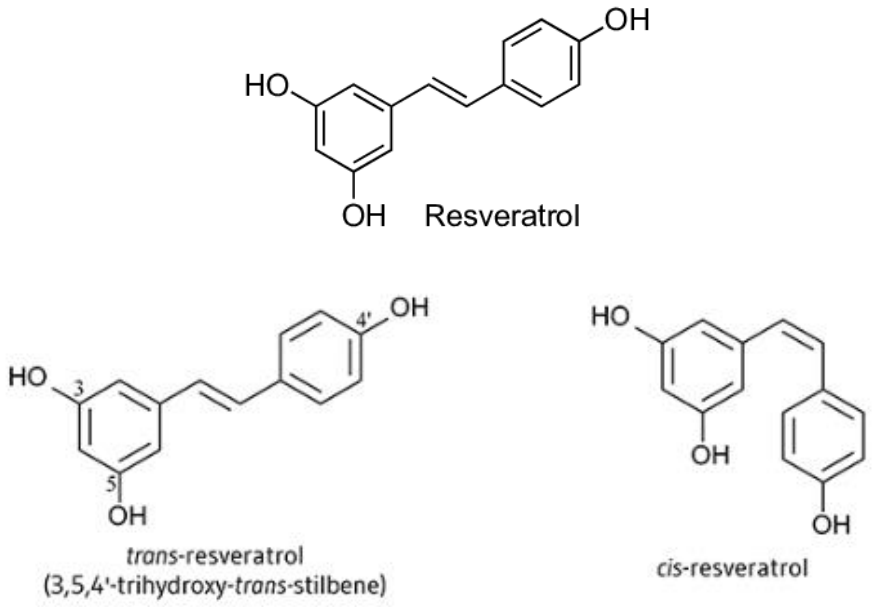
Όσον αφορά τα **υδροξυβενζοϊκά οξέα** και τα παράγωγά τους, από τα σημαντικότερα είναι το γαλλικό οξύ, το οποίο φαίνεται να είναι το πιο σταθερό στο κρασί κατά το πέρασμα των χρόνων. Αποτελεί μία από τις φαινολικές ενώσεις που εντοπίζεται με χρωματογραφικές αναλύσεις σε κόκκινα κρασιά πολλών ετών, ενώ τα επίπεδά του προσεγγίζουν τα 70 mg/L στον ερυθρό οίνο και τα 10 mg/L στον λευκό. Ακόμα, πιο σύνθετη δομή έχει το ελλαγικό οξύ, ενώ επίσης εντοπίζονται το π-υδροξυβενζοϊκό, το συριγγικό και το βανιλλικό οξύ. (Jackson, 2014, Waterhouse, 2002)



Εικόνα 1.5 Υδροξυβενζοϊκά οξέα (Jackson, 2014)

Τέλος, τα στιλβένια, με κυριότερο τη ρεσβερατρόλη, συντίθενται στο σταφύλι, προκειμένου να προστατευτεί από τις επιθέσεις των μυκήτων. Υπάρχουν διάφορες μορφές ρεσβερατρόλης, συμπεριλαμβανομένων των cis και trans δομών της, αλλά και τους γλυκοζίτες των δύο αυτών ισομερών. Όλες εντοπίζονται στο κρασί, όμως από το σταφύλι απουσιάζει η cis δομή. Τα

παράγωγα της ρεσβερατρόλης βρίσκονται μόνο στον φλοιό του σταφυλιού, επομένως περισσότερο τα εντοπίζουμε στο κόκκινο κρασί. Τα συνολικά επίπεδα για όλες τις μορφές κυμαίνονται στα 7 mg/L για το ερυθρό κρασί, στα 2 mg/L για το ροζέ και στα 0,5 mg/L για το λευκό. Η ρεσβερατρόλη θεωρείται ένα συστατικό του οίνου που πιθανότατα συμβάλει στη μείωση του κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου, με την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της. (Waterhouse, 2002)



Εικόνα 1.6 Απεικόνιση της ρεσβερατρόλης και των δομών της (Jackson, 2014)

1.3.3 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούν υπόστρωμα για την παραγωγή της αιθανόλης στο κρασί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτά ωστόσο που προέρχονται από την ατελή ζύμωση ή δεν συμμετέχουν καθόλου σε αυτή, ευθύνονται για την γλυκύτητα του οίνου. Στα σταφύλια, τα σημαντικότερα σάκχαρα είναι εξόζες, όπως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, σε συγκεντρώσεις 0,2- 4 και 0,5-1 g/L αντίστοιχα. Η σουκρόζη διασπάται σε φρουκτόζη και γλυκόζη και συναντάται σε συγκέντρωση 0-0,2 g/L. Τα σάκχαρα του σταφυλιού αποτελούν πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς της ζύμωσης (Saccharomyces cerevisiae), οι οποίοι μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη

και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), αφήνοντας πολλές φορές κάποια από αυτά ανεκμετάλλευτα. Τέλος, τα σάκχαρα μπορεί να μεταβολιστούν σε αλδεΰδες ή εστέρες λιπαρών οξέων, ενώσεις οι οποίες συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό άρωμα του οίνου. (Haseeb et al., 2019)

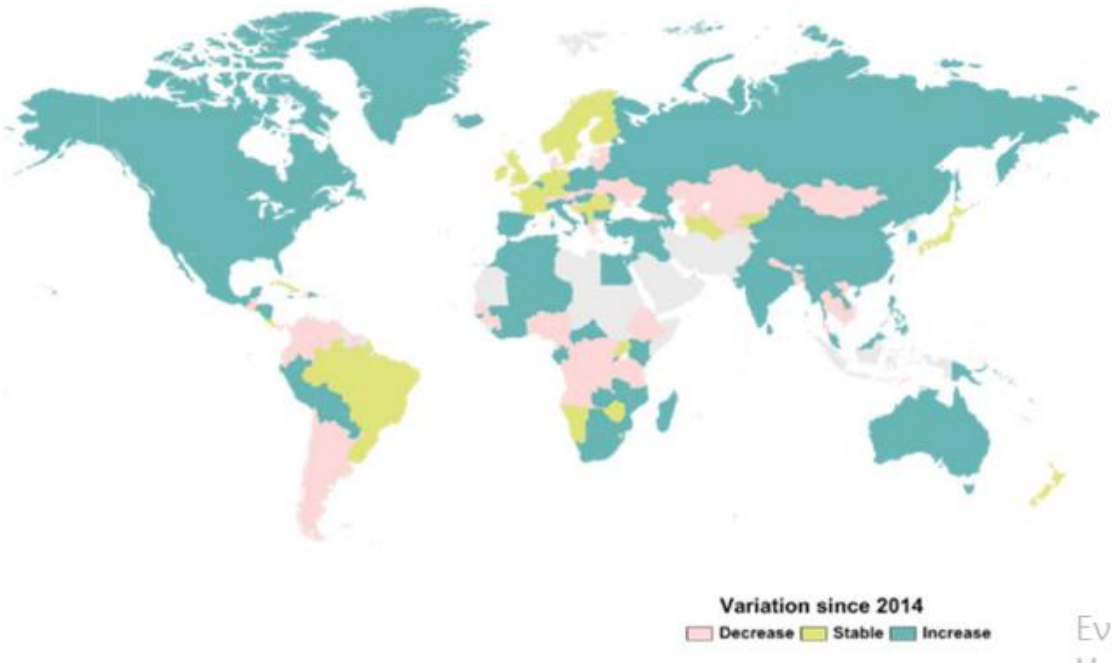
1.4 Οινοποίηση και ποικιλίες κρασιού

Η διαδικασία της οινοποίησης έχει ως σκοπό της την παραγωγή οίνου, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το σταφύλι και κυρίως, τα συστατικά του, που όπως αναφέρθηκε, προσδίδουν γεύση, χρώμα και άρωμα. Η πρώτη διαδικασία είναι ο τρύγος, δηλαδή η συγκομιδή των σταφυλιών και η μεταφορά τους στο χώρο επεξεργασίας. Η συγκομιδή πρέπει να γίνεται την κατάλληλη στιγμή, καθώς καθορίζει την περιεκτικότητα του σταφυλιού σε σάκχαρα και οξέα, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την ποσότητα της αιθανόλης του οίνου. Στη συνέχεια, διαχωρίζεται η ράγα από τα κοτσάνια και ακολουθεί η διαδικασία στο πιεστήριο, για την παραλαβή του μούστου. Ακολουθεί η αλκοολική ζύμωση, όπου δρουν οι ζυμομύκητες, μετατρέποντας τα σάκχαρα σε αιθανόλη και σε υποπροϊόντα. Διαδικασίες μετά τη ζύμωση που μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση του οίνου, είναι η αποθήκευση, το φιλτράρισμα και η τυποποίησή του σε μπουκάλι. (Haseeb et al., 2019)

Η πιο κοινή κατηγοριοποίηση του οίνου γίνεται με βάση το χρώμα, όπου και απαιτεί μικρές διαφορές στη διαδικασία οινοποίησης. Το χρώμα στο κόκκινο κρασί οφείλεται στην παρουσία του φλοιού του σταφυλιού κατά τη ζύμωση. Η εκχύλιση γίνεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και επικεντρώνεται στις χρωστικές, που βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα στον φλοιό. Παράλληλα με την αλκοολική ζύμωση, η εκχύλιση των χρωστικών ενισχύεται και δίνει το έντονο κόκκινο χρώμα. Το λευκό κρασί αντίθετα, παράγεται με την απουσία του φλοιού του σταφυλιού και η εκχύλιση των συστατικών διαρκεί λιγότερο. Ως αποτέλεσμα, η περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά είναι μικρότερη, συγκριτικά με το κόκκινο κρασί. Για την παραγωγή της κατηγορίας ροζέ, ακολουθείται η πρακτική της σύνθλιψης ερυθρών ή μαύρων σταφυλιών και στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση ή όχι, για περίπου 24 ώρες. Οι συνολικές συνθήκες περιορίζουν την απελευθέρωση των χρωστικών ουσιών, με αποτέλεσμα το ροζέ κρασί να εμφανίζει πιο απαλό χρώμα, σε σύγκριση με το κόκκινο, αν και μπορούν να παραχθούν από την ίδια ποικιλία σταφυλιού. (Haseeb et al., 2019, Jackson, 2014)

1.5 Επιδημιολογικά στοιχεία

Η παραγωγή του οίνου πλέον αποτελεί σημαντικό κλάδο σε πολλές χώρες, με πρώτη την Ιταλία, ύστερα την Γαλλία και στη συνέχεια την Ισπανία να κατέχουν τα ηνία. Σχετικά με την κατανάλωση του κρασιού, στατιστικές αναφορές του έτους 2019, αναφέρουν ως χώρα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση οίνου τις Ηνωμένες πολιτείες, ενώ ακολουθούν η Γαλλία, η Ιταλία και η Γερμανία. Στην Ελλάδα, η διακύμανση της κατανάλωσης κρασιού είναι περίπου σταθερή, με μία μικρή συνολική μείωση μεταξύ των ετών 2014-2018. (OIV, 2019)



Εικόνα 1.7 Μεταβολή της κατανάλωσης του οίνου από το 2014 (OIV, 2019)

Σύμφωνα με τον παραπάνω χάρτη, οι περισσότερες χώρες παρουσιάζουν αύξηση στην κατανάλωση του οίνου, ενώ στην Ευρώπη, κυρίως διατηρείται μία σταθερή κατανάλωση. Συγκεκριμένα στην Γαλλία, τα δεδομένα δείχνουν ότι δεν αυξήθηκε η κατανάλωση, κυρίως γιατί ήδη βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Το γεγονός αυτό, αλλά και το κατά πόσο αυτή η συνήθεια σχετίζεται με την υγεία των Γάλλων, έρχονται να μελετήσουν έρευνες, οι οποίες μιλούν για το γνωστό σε όλους «Γαλλικό παράδοξο», που θα αναλυθεί παρακάτω.

Επιπλέον, η κατανάλωση του κρασιού έχει συσχετιστεί με νοσήματα όπως για παράδειγμα, ο ΣΔ. Κλινικές μελέτες συγκέντρωσαν αποτελέσματα μελετών όσο αναφορά την επιρροή του στον μεταβολισμό της γλυκόζης και της ινσουλίνης και βρέθηκαν διαφορές στα αποτελέσματα. Οι 8 μελέτες ασχολήθηκαν με την κατανάλωση 15-30 g κρασιού την ημέρα, από νέους υγιείς εθελοντές, για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων ή περισσότερο και τα αποτελέσματά τους

έδειξαν ότι τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας δεν επηρεάστηκαν από το αλκοόλ. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν μελετώντας την κατανάλωση κρασιού σε μικρό χρονικό διάστημα, για 4 εβδομάδες. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε κλινικές δοκιμές σε υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα, που κατανάλωναν 40 g/ημέρα για 4 εβδομάδες ή 27,4 g/ημέρα για 10 εβδομάδες. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι σε μελέτες που έγιναν σε υγιείς μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο για CVD ή ασθενείς με ΣΔ, παρατηρήθηκε συσχέτιση της μέτριας κατανάλωσης κρασιού με τα επίπεδα ινσουλίνης. Σχετικά με τον ΣΔ συγκεκριμένα, φάνηκε ότι άτομα με υψηλότερες τιμές γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης ωφελήθηκαν περισσότερο από την κατανάλωση οίνου. (Fragopoulou et al., 2018)

Ακόμα, ερευνητικές μελέτες εξέτασαν την αντιφλεγμονώδη δράση του κρασιού μετά το γεύμα και την επιρροή του στην ενδοθηλιακή λειτουργία, μετρώντας τον δείκτη FMD, που αναφέρεται στη διαστολή της αρτηρίας, όταν αυξάνεται η ροή του αίματος και είναι δείκτης ενδοθηλιακής λειτουργίας. Στις περισσότερες μελέτες, ο δείκτης αυξήθηκε μετά την κατανάλωση μη αλκοολούχου κόκκινου κρασιού. Σε ποσότητα κατανάλωσης 45-65 g, ο δείκτης FMD αυξήθηκε, συγκριτικά με την αύξηση που προκαλείται από ένα άλλο μη αλκοολούχο ποτό, ενώ σε χαμηλότερη χορήγηση αλκοόλ 23g, ο δείκτης μειώθηκε, ή παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα. Συνοψίζοντας, η κατανάλωση κρασιού μαζί με ένα γεύμα υψηλό σε λιπαρά, φάνηκε να εμποδίζει εν μέρει τη δράση των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, που συμβάλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Τελικά, τα συστατικά του οίνου πιθανόν ευθύνονται για την βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας και ίσως να αντισταθμίζουν την αρνητική επίδραση του αλκοόλ στην υγεία. (Fragopoulou et al., 2018)

1.5.1 Γαλλικό Παράδοξο

Ο όρος «Γαλλικό παράδοξο» προτάθηκε το 1992 από τους Renaud και De Lorgeril, προκειμένου να περιγραφεί η επιδημιολογική παρατήρηση ότι οι Γάλλοι, παρόλο που ακολουθούν μία δίαιτα πλούσια σε κορεσμένο λίπος, ωστόσο, εμφανίζουν μικρότερο επιπολασμό στα CVD, από τον αναμενόμενο. Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται και για άλλες χώρες, όπως η Ελλάδα και η Ισπανία, στις οποίες, η θνησιμότητα των CVD είναι χαμηλότερη από την αναμενόμενη, παρά τις λανθασμένες διατροφικές συνήθειες.

Αρχικά, το ενδιαφέρον των μελετητών κέντρισαν οι παρατηρήσεις που έγιναν στην Γαλλία και στην Ελλάδα και αποτέλεσαν ενδείξεις του ότι υπάρχουν πιθανόν κι άλλα συστατικά της

δίαιτας που μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης των CVD, πέραν αυτών μιας ισορροπημένης διατροφής που ακολουθεί το μεσογειακό πρότυπο. Και με τον όρο αυτό, εννοούμε μια διατροφή, που περιλαμβάνει όλες τις ομάδες τροφίμων, με υψηλή κατανάλωση σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια και δημητριακά και μέτρια κατανάλωση ψαριού και γαλακτοκομικών προϊόντων. Σχετικά με το κρέας, προτείνεται χαμηλή κατανάλωσή του, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του κορεσμένου λίπους που προέρχεται από αυτό και παράλληλα, την αύξηση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων που προέρχονται από το ελαιόλαδο. Το πρότυπο αυτό, περιλαμβάνει την κατανάλωση αλκοόλ σε μέτρια ποσότητα και κυρίως με τη μορφή του κρασιού, μαζί με το γεύμα. Πλήθος επιδημιολογικών μελετών αποδεικνύουν ότι η Μεσογειακή δίαιτα αποτελεί πρότυπο διατροφής για την πρόληψη των CVD.

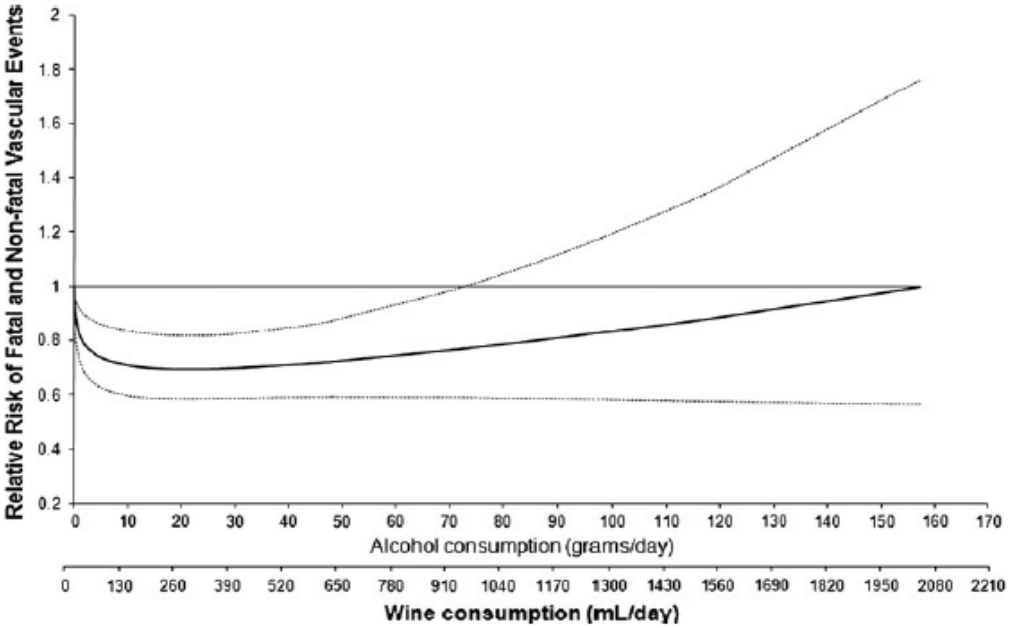
Από το 1819 λοιπόν, μελετητές ξεκίνησαν να παρατηρούν ότι η Γαλλία και οι Μεσογειακές χώρες, εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα στα CVD και με έρευνες που διεξήχθησαν, αποδείχθηκε ότι στην Κρήτη για παράδειγμα, οι τιμές της ολικής χοληστερόλης ήταν χαμηλότερες από τις αναμενόμενες για τις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού. Τα ευρήματα αυτά, οδήγησαν τους ερευνητές σε κάποιες υποθέσεις και σε περαιτέρω έρευνες για την εξήγηση αυτών των δεδομένων. Αποκλείοντας λοιπόν πολλές εξηγήσεις που αμφισβητούσαν τις μεθόδους της κύριας έρευνας ή απέδιδαν το φαινόμενο αυτό σε μεσογειακές συνήθειες διατροφής, που στην πραγματικότητα δεν υιοθετήθηκαν ποτέ από τους Γάλλους, οι ερευνητές κατέληξαν στη μελέτη της κατανάλωσης αλκοόλ μέσω του οίνου. Μέχρι σήμερα, πολλές έρευνες επιβεβαιώνουν την υπεροχή του κρασιού, συγκριτικά με άλλα αλκοολούχα ποτά, ενώ συνεχίζουν να μελετούν τις διαφορές του κόκκινου και του λευκού οίνου, αλλά και την ιδανική ποσότητα αυτού, που προάγει την υγεία. (Fragopoulou et al., 2009)

1.5.2 Συσχέτιση κατανάλωσης κρασιού με καρδιαγγειακά νοσήματα

Όσον αφορά τα CVD και την κατανάλωση αλκοόλ, σημαντική μετα-ανάλυση συγκέντρωσε πλήθος δεδομένων και εξετάζοντας τις μεταβλητές αλλά και την ετερογένεια των αποτελεσμάτων, κατέληξε σε κάποιες συσχετίσεις. Σχετικά με την κατανάλωση αλκοόλ και τον αγγειακό κίνδυνο, αναφέρεται ότι κατανάλωση μεγαλύτερη των 72 g/ημέρα αλκοόλ, σχετίζεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ ο χαμηλότερος κίνδυνος εμφανίζεται στα 21 g/ημέρα. (Costanzo et al., 2011)

Πίνακας 1.1 Δεδομένα από την μετα-ανάλυση σχετικά με την κατανάλωση αλκοόλ και τον αγγειακό κίνδυνο (Costanzo et al., 2011)

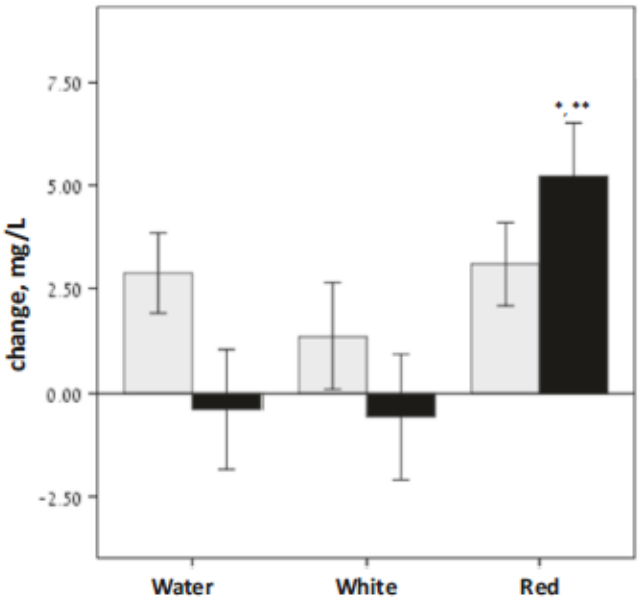
Endpoint	No of curves	No of cases	Total sample size/no of controls	Maximal protection		
				%	95% CI	g/day
Fatal and non-fatal CVD	17			31	19–42	21
Study design[a]						
Cohort studies	12	5,554	288,363	30	16–42	24
Case control studies	5	2,060	3,784	31	2–52	21
Publication bias						
Excluding studies which provided the asymmetry in the funnel plot	14			25	11–36	28
Adjustment						
Excluding studies adjusted only for age	13			25	11–37	27
Reference group						
Without former drinkers	7			28	9–44	24
Country[b]						
Mediterranean countries	5			32	11–49	25
Nordic countries	5			35	9–53	10
USA and Australia	7			24	4–44	7
Duration of follow-up[c]						
Short (≤12 years)	7			25	6–38	8
Long (>12 years)	5			35	14–51	24
CVD, CHD, IHD mortality	7	2,677	105,196	34	18–47	24
Total mortality	6	11,905	56,696	25	14–34	10



Διάγραμμα 1.2 Απεικόνιση της κατανάλωσης του οίνου σε συνάρτηση με τον αγγειακό κίνδυνο που προκαλείται (Costanzo et al., 2011)

- CASCADE

Πρόσφατα δεδομένα έχουμε και από την μελέτη CASCADE (CArdiovaSCulAr Diabetes & Ethanol), στην οποία συμμετείχαν 224 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου 2 που απείχαν από το αλκοόλ. Συμφώνησαν στην κατανάλωση κόκκινου, λευκού κρασιού ή νερού, για 2 χρόνια και ακολούθησαν μεσογειακή δίαιτα μη περιορισμένων θερμίδων. Οι γυναίκες του δείγματος κατανάλωναν 150 ml κόκκινου κρασιού ανά ημέρα για περισσότερο από δύο χρόνια και αυτό οδήγησε σε σημαντική αύξηση της HDL κατά +5,2 mg/dL. Αυτή η αύξηση ήταν σημαντικά διαφορετική από αυτή που είχαν οι γυναίκες που κατανάλωναν λευκό κρασί ή νερό. Όσο για τα αποτελέσματα στον αντρικό πληθυσμό του δείγματος, δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων παρέμβασης. Επιπλέον, ένα σημαντικό σημείο της μελέτης CASCADE ήταν η μέτρηση του μεγέθους της πλάκας, κατά την έναρξη και μετά από 2 χρόνια παρέμβασης. Αν και δεν παρατηρήθηκε συγκεκριμένη επιρροή του κρασιού, ωστόσο, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού φάνηκε πιθανόν να σχετίζεται με τον μηχανισμό της αθηροσκλήρωσης σε αυτούς με την μεγαλύτερη σχηματισμένη πλάκα, κατά την έναρξη.



Διάγραμμα 1.3 Μεταβολή των επιπέδων της HDL σε γυναίκες (μαύρο) και άντρες (γκρι), ύστερα από την παρέμβαση. (Golan et al., 2019)

Ακόμα μία παράμετρος που μελετήθηκε σε μία υποομάδα 45 ατόμων από την ομάδα κατανάλωσης κόκκινου κρασιού, ήταν η μεταβλητότητα του καρδιακού ρυθμού (HRV). Ωστόσο, δεν βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του δείκτη HRV και του βάρους, της περιφέρειας μέσης , των λιπιδίων, της αρτηριακής πίεσης και του γλυκαιμικού ελέγχου.

Σύμφωνα λοιπόν με τη συγκεκριμένη μελέτη, όσον αφορά τις αλλαγές στην HRV και τον σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας, η μέτρια κατανάλωση κρασιού είναι ασφαλής σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 που παρακολουθούνται τακτικά. (Golan et al., 2019)

Από τις πρώτες μελέτες των ευεργετικών συστατικών του κρασιού που συνδέονται με τα CVD, ήταν αυτή των Pace-Asciak et al. (1996), οι οποίοι εξέτασαν την υπόθεση ότι το κόκκινο

κρασί, λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, είναι πιο προστατευτικό έναντι της αθηροσκλήρωσης, συγκριτικά με το λευκό κρασί και επιπλέον, ότι ο χυμός σταφυλιού εμπλουτισμένος με trans-ρεσβερατρόλη, ίσως εμφανίζει τις ίδιες ευεργετικές ιδιότητες. Το δείγμα αποτελούνταν από 24 υγιείς άνδρες, ηλικίας 24-45 ετών, καθένας από τους οποίους κατανάλωνε για 4 εβδομάδες κόκκινο κρασί, λευκό κρασί, χυμό σταφυλιού του εμπορίου και τον ίδιο αυτόν χυμό, αλλά εμπλουτισμένο με trans-ρεσβερατρόλη. Αιμοληψία έγινε στην αρχή και στο τέλος του προγράμματος, για να καθοριστούν τα επίπεδα θρομβοξάνης B2 και οι τιμές EC_{50} (συγκέντρωση που απαιτείται για το 50% της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων) έναντι του ADP και της θρομβίνης, ως αγωνιστές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο είδη κρασιού αύξησαν το EC_{50} έναντι της θρομβίνης, με μεγαλύτερη αύξηση να προκαλείται από το κόκκινο κρασί ($P < 0.02$ και $P < 0.001$) και μείωσαν την θρομβοξάνη B2 , αποδεικνύοντας ότι και τα δύο είδη έχουν ισότιμη αντι-συσσωρευτική δράση, όσον αφορά αυτό το κριτήριο. Επιπλέον, κανένας χυμός σταφυλιού δεν επηρέασε τη δράση του ADP και της θρομβοξάνης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ ο εμπλουτισμένος χυμός αύξησε κατά πολύ το EC_{50} έναντι της θρομβίνης. In vitro πειράματα έδειξαν ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων με αγωνιστές το ADP και τη θρομβίνη, μειώθηκε κυρίως από το κόκκινο κρασί. (Pace-Asciak et al., 1996)

1.5.3 Συστάσεις κατανάλωσης οίνου- Πρότυπα κατανάλωσης

Σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες, μια ισορροπημένη διατροφή συστήνεται ως ακρογωνιαίος λίθος για την πρόληψη εμφάνισης των καρδιαγγειακών νοσημάτων σε όλα τα άτομα. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών πρέπει να περιορίζεται στα 2 ποτήρια / ημέρα (20 γρ. αλκοόλ) για τους άνδρες και στο 1 ποτήρι / ημέρα για τις γυναίκες. (Piepoli et al., 2016)

Επιδημιολογικές μελέτες ακόμα, συζητούν για τα πρότυπα κατανάλωσης και την επίδρασή τους στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Συμπεραίνουν μάλιστα ότι για τα άτομα που συχνά καταναλώνουν μέτρια προς μικρή ποσότητα αλκοόλ ή και καθόλου, η περιστασιακή κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αλκοόλ κάποιες φορές τον μήνα, εμφανίζει περίπου 70 % μεγαλύτερη συσχέτιση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, συγκριτικά με τα άτομα που έχουν μια σταθερή κατανάλωση, χωρίς ιδιαίτερες αυξομειώσεις. Ιδιαίτερα ευεργετική φαίνεται να είναι και η κατανάλωση αλκοόλ με τα γεύματα. Παρά τις κάποιες ωφέλιμες ιδιότητες που φαίνεται να έχει το αλκοόλ στα CVD, δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για την ενθάρρυνση

κάποιου που δεν πίνει αλκοόλ να ξεκινήσει να καταναλώνει. (Costanzo et al., 2010, Rehm et al., 2001)

Όσο για τη διατροφή, σημαντική είναι η υιοθέτηση ενός υγιεινού διατροφικού προτύπου που δίνει έμφαση στην κατανάλωση ποικιλίας φρούτων και λαχανικών, ολικής άλεσης δημητριακών, γαλακτοκομικών χαμηλών σε λιπαρά, πουλερικών και ψαριού, αλλά και ξηρών καρπών και οσπρίων. Κρίνεται αναγκαίος ο περιορισμός των κορεσμένων και τρανς λιπαρών οξέων, του αλατιού, των γλυκών και των σακχαρούχων ροφημάτων. (Piepoli et al., 2016) Συγκεκριμένα, η Μεσογειακή δίαιτα που αποτελεί ένα τέτοιο πρότυπο και συνδυάζει την κατανάλωση κρασιού στην καθημερινότητα, έχει μελετηθεί διεξοδικά και αποδεικνύεται μία αρκετά αποτελεσματική επιλογή. Στην μελέτη Predimed που δημοσιεύτηκε το 2018, τα αποτελέσματα συσχέτισαν τη Μεσογειακή δίαιτα με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης CVD, σε άτομα που πέρα από τη συγκεκριμένη διατροφή που ακολουθούσαν, κατανάλωναν προαιρετικά κρασί, μαζί με τα γεύματα, σε ποσότητα μεγαλύτερη ή ίση των 7 ποτηριών/ εβδομάδα. (Estruch et al., 2013)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο : ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

2.1 Γενικά στοιχεία/ Επιπολασμός

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι ένας όρος που περιγράφει μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων και περιλαμβάνει, την στεφανιαία νόσο(ΣΝ), την υπέρταση, την αγγειακή εγκεφαλική νόσο, την περιφερική αγγειακή νόσο, τη ρευματική καρδιοπάθεια, τη συγγενή καρδιοπάθεια, μυοκαρδιοπάθειες και τη φλεβική θρομβοεμβολή.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα CVD είναι η πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως, προκαλώντας περίπου 17,9 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο. Μάλιστα, 4 στους 5 θανάτους είναι αποτέλεσμα καρδιακής προσβολής, ενώ το 1/3 αυτών συμβαίνει σε άτομα μικρότερα των 70 ετών. Στην Ευρώπη, κάθε χρόνο 3,9 εκατομμύρια θάνατοι, αποτελώντας το 45% όλων των θανάτων οφείλονται σε αυτές τις διαταραχές, ενώ για τους άνδρες είναι η πρώτη αιτία θανάτου σε όλες τις χώρες εκτός από 12 και για τις γυναίκες σε όλες, εκτός από 2 χώρες. Στην Ελλάδα συγκεκριμένα, τα καρδιαγγειακά νοσήματα έφτασαν να ευθύνονται για τον θάνατο 30.439 ανθρώπων, που αποτελούν το 28,11% των συνολικών θανάτων. (Michas et al., 2019, Stewart et al., 2017)

2.2 Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου των CVD μπορεί να είναι τροποποιήσιμοι και μη. Στους **μη τροποποιήσιμους** περιλαμβάνονται η ηλικία, η κληρονομικότητα, το ατομικό ιστορικό και το φύλο. Αναλυτικά, όσο αυξάνεται η ηλικία των ατόμων, τα επεισόδια που σχετίζονται με διαταραχές της καρδιάς είναι περισσότερα και ο κίνδυνος αυξάνεται σημαντικά μετά την ηλικία των 55 ετών. Το οικογενειακό όσο και το ατομικό ιστορικό, αποτελούν πολύ σημαντικούς παράγοντες, καθώς αυξάνουν κατακόρυφα τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακού επεισοδίου ή επανάληψής του, εάν έχει προηγηθεί στο παρελθόν. Τέλος, το αρσενικό φύλο φαίνεται να κινδυνεύει περισσότερο συγκριτικά με το θηλυκό, γεγονός το οποίο εξισορροπείται με την αρχή της εμμηνόπαυσης.

Στους **τροποποιήσιμους παράγοντες** κινδύνου των CVD ανήκουν, η υπέρταση, το κάπνισμα, η σωματική αδράνεια, η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία, ο ΣΔ και βέβαια, ένα λανθασμένο

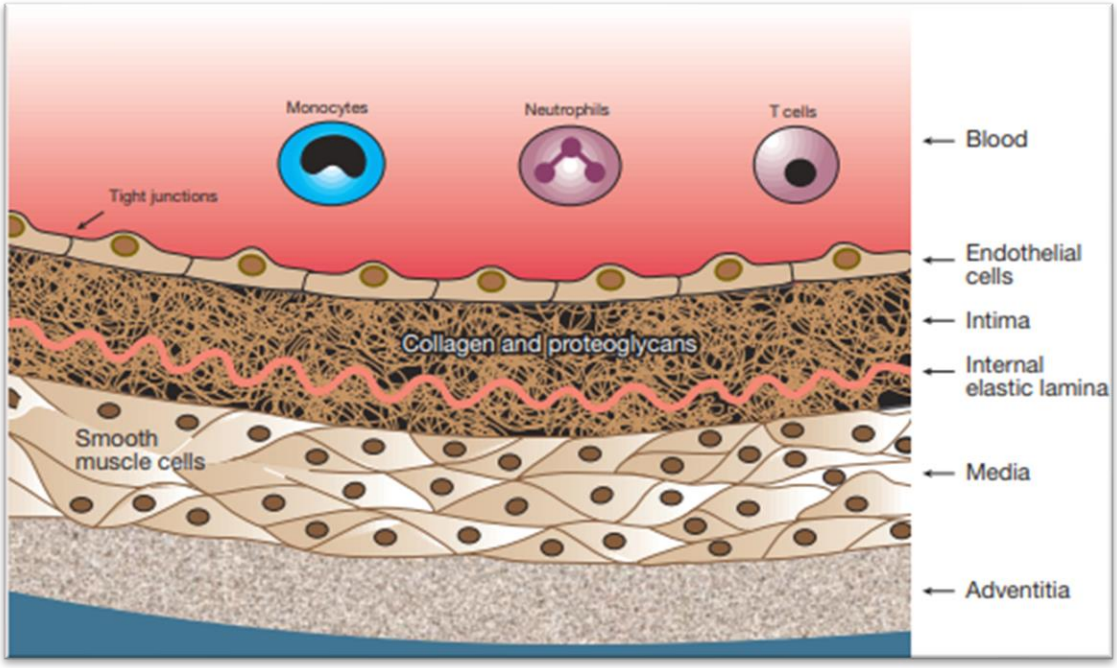
διαιτητικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, η υπέρταση είναι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης πάνω από 140/90 mmHg, για την συστολική και διαστολική αντίστοιχα και αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου. Το κάπνισμα επίσης, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο, ενώ και το παθητικό κάπνισμα είναι ιδιαίτερα επιβλαβές. Η διακοπή του κρίνεται απαραίτητη, ιδιαίτερα στις νεαρές ηλικίες, καθώς ο κίνδυνος αυξάνεται περισσότερο. Η μειωμένη σωματική άσκηση αυξάνει τον κίνδυνο για τα CVD κατά 50% τουλάχιστον και συχνά οδηγεί και στην παχυσαρκία. Το υπερβάλλον σωματικό βάρος επιδρά σε σημαντικούς δείκτες της υγείας, όπως η αρτηριακή πίεση, η γλυκόζη του αίματος, αλλά και τα επίπεδα των λιπιδίων. Επιπλέον, το λιπιδαιμικό προφίλ του ατόμου αποτελεί ένδειξη της υγείας του και των διατροφικών συνηθειών του. Η αυξημένη ολική χοληστερόλη και LDL-χοληστερόλη, αλλά και η μειωμένη HDL-χοληστερόλη, αποτελούν δείκτες που σχετίζονται με την εμφάνιση CVD και στους οποίους πρέπει να δίνεται ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ο ΣΔ ακόμα, προσθέτει έναν παραπάνω κίνδυνο στην προσβολή από κάποιο CVD, αφού η πιθανότητα εμφάνισής του είναι διπλάσια. Τέλος, ένα λανθασμένο διαιτητικό πρότυπο μπορεί να επηρεάσει πολλούς από τους προαναφερθέντες παράγοντες, όπως το λιπιδαιμικό προφίλ ή το σωματικό βάρος. Η αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων και τρανς λιπαρών οξέων, αλατιού, αλλά και η μειωμένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών, αποτελούν συνήθειες που δεν θα έπρεπε να υιοθετούνται. (Piepoli et al., 2016, Rahman and Woollard, 2017)(World Heart Federation,2016)

2.3 Αθηροσκλήρωση- Περιγραφή σε επίπεδο ενδοθηλίου

Το καρδιαγγειακό σύστημα χαρακτηρίζεται ως ένα σύστημα μεταφοράς στο ανθρώπινο σώμα, καθώς είναι υπεύθυνο για την μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και ορμονών στους ιστούς, αλλά και υποπροϊόντων του μεταβολισμού εκτός του σώματος. Αποτελείται από την καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία και το ίδιο το αίμα και είναι ένα κλειστό σύστημα, δηλαδή το αίμα κυκλοφορεί αλλά δεν απομακρύνεται από το δίκτυο των αρτηριών, φλεβών και τριχοειδών αγγείων.

Τα αιμοφόρα αγγεία διαθέτουν 3 στιβάδες: 1) Το εξωτερικό στρώμα ονομάζεται έξω χιτώνας (adventitia) και κατά μεγάλο μέρος συντίθεται από ίνες κολλαγόνου, ενώ δομεί και προστατεύει το αγγείο, 2) Τον μέσο χιτώνα (media), ο οποίος αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα, που επιτρέπουν στο αγγείο να συστέλλεται και να διαστέλλεται και τέλος, 3) τον έσω χιτώνα (intima), που επενδύεται από το ενδοθήλιο, το οποίο αποτελείται από μία

μονή στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια του αγγείου. (Peate, 2018, Lusis, 2000)



Εικόνα 2.1 Δομή φυσιολογικής αρτηρίας (Lusis, 2000)

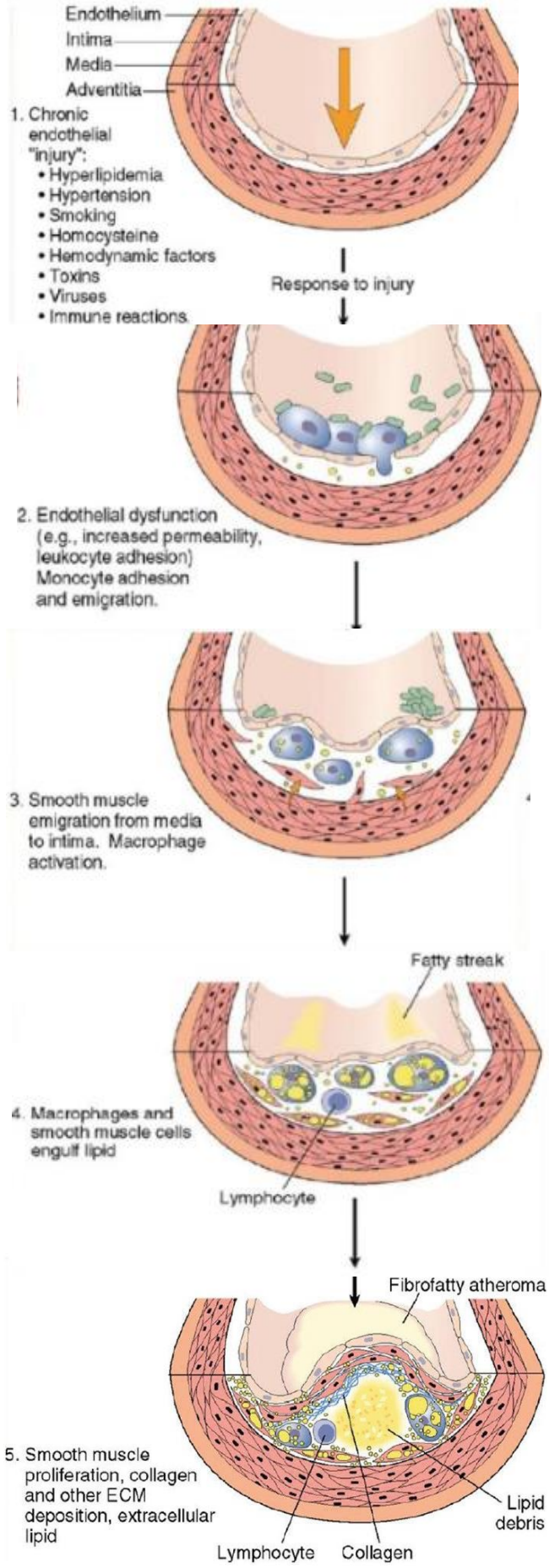
- <u>Το ενδοθήλιο</u>

Το ενδοθήλιο αποτελεί τον μεγαλύτερο αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή αδένα, που καλύπτει εσωτερικά όλα τα αγγεία. Διαθέτει ενεργά μεταβολικά κύτταρα που παράγουν ικανό αριθμό ουσιών, απαραίτητων για τις λειτουργίες του οργανισμού. Καλύπτει περίπου 700m^2 και ζυγίζει 1,5 kg. Δομικά το ενδοθήλιο είναι μια μονοστιβάδα, που παλαιότερα θεωρούταν απλά μια ημιπερατή μεμβράνη που εμπόδιζε την διάχυση μακρομορίων ανάμεσα στο αίμα και τους υποκείμενους ιστούς. Ωστόσο, σήμερα γνωρίζουμε ότι το ενδοθήλιο έχει πολλαπλούς ρόλους και συμμετέχει σε λειτουργίες, όπως η ρύθμιση του αγγειακού τόνου, η φλεγμονή, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η αγγειογένεση, η θρόμβωση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Εκκρίνει αγγειοδιασταλτικές και αγγειοσυσταλτικές ουσίες, που ρυθμίζουν αυτές τις διαδικασίες. Το μονοξείδιο του αζώτου(NO), που συντίθεται από L-αργινίνη είναι ο κυρίαρχος αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, ενώ οι σημαντικότεροι αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες είναι η ενδοθηλίνη-1, η αγγειοτενσίνη-ΙΙ και η θρομβοξάνη. Αυτές οι ουσίες προάγουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Τέλος, παράγει μόρια που ευνοούν ή εμποδίζουν τις διαδικασίες της φλεγμονής, την οξείδωσης, της ινωδόλυσης και της θρόμβωσης. (Laroia et al., 2003)

- <u>Αθηροσκλήρωση</u>

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί την πρωταρχική αιτία καρδιαγγειακής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου, καθώς στις δυτικές κοινωνίες ιδιαίτερα, ευθύνεται περίπου για το 50% των θανάτων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η διαθεσιμότητα των ερευνητικών εργαλείων έχει οδηγήσει στην κατανόηση των μηχανισμών δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας. Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι η αθηροσκλήρωση δεν είναι απλά μια αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης, αλλά μία χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση, που μπορεί να οδηγήσει σε ένα οξύ κλινικό περιστατικό, με την ρήξη της πλάκας και την θρόμβωση.

Πιο αναλυτικά, η αθηροσκλήρωση είναι μία φλεγμονώδης νόσος, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική συσσώρευση λιπιδίων και φλεγμονωδών κυττάρων, στα τοιχώματα μεσαίων και μεγαλύτερων αρτηριών. Το έναυσμα για τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας δίνεται με τον τραυματισμό του ενδοθηλίου. Στη συνέχεια συσσωρεύονται μόρια LDL- χοληστερόλης στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Σε παθολογικές καταστάσεις, η LDL οξειδώνεται και παίρνει την μορφή ox-LDL, δηλαδή οξειδωμένη. Κατά την οξείδωση της LDL παράγεται ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, μόρια τα οποία έχουν ισχυρή αντι-φλεγονώδη δράση και ενοχοποιούνται για την προ-αθηρογόνο δράση της οξειδωμένης LDL. (Demopoulos et al., 2003) Η οξειδωμένη LDL αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων στο ενδοθήλιο, οδηγώντας στο «κάλεσμα» των λευκοκυττάρων, κυρίως των μακροφάγων και των Τ- λεμφοκυττάρων, στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Με την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών των μονοκυττάρων, όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), αυτά τα κύτταρα μεταφέρονται στο εσωτερικό στρώμα του αγγείου. Τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα και αλληλεπιδρούν με την οξειδωμένη LDL. Πλέον, αυτά τα κύτταρα ονομάζονται αφρώδη, λόγω της μορφής που εμφανίζουν στο μικροσκόπιο μετά την ενσωμάτωση των λιποειδών από την οξειδωμένη LDL. Η παρουσία τους στα τοιχώματα των αρτηριών αποτελεί εγγύηση της πρώιμης εμφάνισης αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, τα Τ-λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν μία ποικιλία κυτοκινών και προάγουν τη φλεγμονή και τη γέννηση των ενεργών μορφών του οξυγόνου (ROS). Οι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από αυτά τα κύτταρα, αλλά και τα μόρια ROS, διεγείρουν τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων και σε συνδυασμό με την εναπόθεση κολλαγόνου, οδηγούν στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. (Kattoor et al., 2017, Torres et al., 2015)



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας (Rafieian-Kopaei et al., 2014)

2.4 Μηχανισμοί πρόκλησης

2.4.1 Οξειδωτικό στρες

Η παθογένεια της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση σημάτων προφλεγμονωδών μονοπατιών, την έκκριση κυτταροκινών / χημειοκινών και αυξημένο οξειδωτικό στρες. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κατάσταση σοβαρής ανισορροπίας μεταξύ των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου (reactive oxygen species-ROS και reactive nitrogen species- RNS) και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Η αιτία εμφάνισής του είναι η αυξημένη δημιουργία των ROS ή/και μειωμένη λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας του οργανισμού. (Betteridge, 2000)

Ο όρος «ενεργές μορφές οξυγόνου» αφορά τα ενδιάμεσα προϊόντα του οξυγόνου που παράγονται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων ατελούς αναγωγής και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις ελεύθερες ρίζες (ανιόν υπεροξειδίου $O2^-$, υδροϋπεροξειδική ρίζα HO_2, ρίζα υδροξυλίου OH, ρίζα αλκοξειδίου RO, ρίζα υπεροξειδίου ROO) και τις μη ελεύθερες ρίζες (υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2, όζον O_3, μονήρες οξυγόνο O_2, υποχλωριώδες οξύ HOCl κ.α.). Οι «ενεργές μορφές του αζώτου» περιλαμβάνουν το μονοξείδιο του αζώτου NO και την υπεροξυνιτρώδες ρίζα ONOO. (Singh and Jialal, 2006) Οι μορφές αυτές του οξυγόνου και του αζώτου είναι ιδιαίτερα δραστικές και παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία πολλών κυττάρων, αλλά και σε βιολογικές διεργασίες. Επίσης, συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απάντηση, στην απόπτωση, στην ανάπτυξη των κυττάρων, στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, καθώς και στην οξείδωση της LDL-χοληστερόλης. Η παραγωγή των ROS στα αγγεία αυξάνεται σε όλες τις περιπτώσεις που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης, δηλαδή, στην υπέρταση, τον ΣΔ, τη δυσλιπιδαιμία και το κάπνισμα.

Συγκεκριμένα, οι σημαντικότεροι παράγοντες στα αιμοφόρα αγγεία, που συμβάλουν στην παραγωγή των ROS και RNS, δηλαδή οι πηγές του οξειδωτικού στρες είναι η οξειδάση του φωσφορικού νικοτιναμιδίου-αδένινο-νουκλεοτιδίου ή κοινώς NADPH, η οξειδάση της ξανθίνης (XO), τα μιτοχονδριακά ένζυμα, οι λιποοξυγονάσες (LOX), οι μυελοϋπεροξειδάσες και οι συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). (Kattoor et al., 2017, Singh and Jialal, 2006)

Πηγές οξειδωτικού στρες

-Οξειδάση του NADPH (NOX)
-Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)
-Μυελοϋπεροξειδάση (MPO)
-Οξειδάση της ξανθίνης (XO)
-Λιποοξυγονάσες (LOX)
-Μιτοχονδριακά ένζυμα

Εικόνα 2.3 Πηγές οξειδωτικού στρες στα αιμοφόρα αγγεία (Singh and Jialal, 2006)

Η οξειδάση του NADPH (NOX) ιδιαίτερα, είναι το σημαντικότερο ενζυμικό σύμπλοκο του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς η ενεργοποίησή του έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του O_2^-, με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο οξυγόνο.

Η XO βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο πλάσμα και οδηγεί στην παραγωγή των O_2^- και του H_2O_2. Τα επίπεδά της έχει βρεθεί ότι αυξάνονται κατά την δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.

Τα μιτοχονδριακά ένζυμα παράγουν ανιόντα υπεροξειδίου σε φυσιολογικά επίπεδα και μπορούν να γίνουν παθολογικά εξαιτίας της δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου ή της αποτυχημένης δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι LOX παράγουν υδροϋπεροξείδια (LOOH) χρησιμοποιώντας το αραχιδονικό οξύ(AA) σαν υπόστρωμα. Τα λευκοτριένια, που είναι το τελικό προϊόν των LOX, ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα και οδηγούν στην απελευθέρωση κυτοκινών.

Οι μυελοϋπεροξειδάσες (MPO) βρίσκονται κυρίως στα ουδετερόφιλα και σε μικρό ποσοστό στα μονοκύτταρα. Παράγουν ρίζες όπως το υποχλωριώδες οξύ από την αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτό έχει βακτηριοκτόνο δράση και παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, η δυσλειτουργία αυτού του συστήματος οδηγεί στην παραγωγή ROS και συμβάλει στο οξειδωτικό στρες. (Kattoor et al., 2017)

Οι NOS είναι μία οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη και του ισχυρού αγγειοδιασταλτικού νιτρικού οξειδίου NO. (Singh and Jialal, 2006)

- <u>Επιπτώσεις στα μακρομόρια</u>

Ως μακρομόρια ορίζονται οι σύνθετες οργανικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και οι υδατάνθρακες. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί μία ποικιλία αντιδράσεων, που συμπεριλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων (οξείδωση ή μείωση του υποστρώματος), αντιδράσεις προσθήκης, θραύση, ανακατανομή των μορίων, διμερισμό, αλλαγή στην αναλογία τους και αντιδράσεις υποκατάστασης με αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες.

Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Η πρωτεϊνική αυτή καταστροφή σχετίζεται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας τους, επηρεάζοντας ενδοκυτταρικά μονοπάτια και συμβάλλοντας στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. (Davies, 2012)

Σχετικά με τα λιπίδια, ιδιαίτερα τα λιπίδια των μεμβρανών που είναι παρόντα σε υποκυτταρικά οργανίδια, είναι περισσότερο ευάλωτα σε βλάβη προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες. Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης των ελευθέρων ριζών με κυτταρικά συστατικά είναι αυτός με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που είναι συνδεδεμένα στα φωσφολιπίδια, τα οποία αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών. Το φαινόμενο αυτό καλείται "λιποειδική υπεροξείδωση" και παρατηρείται όταν υπερκεραστούν οι αμυντικοί μηχανισμοί των κυττάρων, με αποτέλεσμα την διαρκή και μη ελεγχόμενη δημιουργία ενεργών μορφών. Η έναρξη της υπεροξειδικής αλληλουχίας οφείλεται στην προσβολή από ελεύθερες ρίζες, οι οποίες αποσπούν ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου ($-CH_2$), αφήνοντας ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο άτομο άνθρακα. Η λιποειδική υπεροξείδωση αλλάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, μειώνει την ικανότητα διατήρησης μιας εξισορροπημένης βαθμίδας συγκέντρωσης και αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τη φλεγμονή. (Devasagayam et al., 2003)

Όσον αφορά το DNA, οι ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, αλλαγή στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, γεγονότα που οδηγούν στον εκφυλισμό του. (Cooke et al., 2003)

- <u>Άμυνα του οργανισμού</u>

Ο οργανισμός του ανθρώπου φυσιολογικά διαθέτει μηχανισμούς οι οποίοι αντιτίθενται στην δράση των ελευθέρων ριζών και τις εξουδετερώνουν. Έτσι επιτυγχάνεται η ισορροπία στο δυναμικό οξειδοαναγωγής και παρεμποδίζονται οι αρνητικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες, χάρη στα αντιοξειδωτικά συστατικά.

Ως ***αντιοξειδωτικό***, ορίζεται η ουσία, που καθυστερεί ή παρεμποδίζει την οξείδωση ενός υποστρώματος που πρόκειται να οξειδωθεί και παρουσιάζεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με αυτή του υποστρώματος. Το αντιοξειδωτικό δρα είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες, είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από αυτές. Οι ενώσεις αυτές χωρίζονται σε 3 κύριες κατηγορίες: 1) ενζυμικά αντιοξειδωτικά 2) μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, 3) πρωτεΐνες δέσμευσης προ-οξειδωτικών μετάλλων.

Η πρώτη κατηγορία, τα **αντιοξειδωτικά ένζυμα**, περιλαμβάνει την καταλάση (Catalase-CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase -GPx) και την υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide dismutase – SOD). Η CAT ήταν το πρώτο ένζυμο που χαρακτηρίστηκε ως αντιοξειδωτικό και καταλύει τα δύο στάδια της μετατροπής του H_2O_2 σε O_2 και H_2O όπως φαίνεται παρακάτω.

$$\text{Καταλάση} - Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow \text{ένωση I}$$

$$\text{ένωση I} + H_2O_2 \rightarrow \text{καταλάση} - Fe(III) + 2H_2O + O_2$$

Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες διαθέτει ένα μόριο αίμης (Fe^{3+} πρωτοπορφυρίνη) στο ενεργό κέντρο. Εντοπίζεται αρκετά στο κύτταρο, στα οργανίδια που ονομάζονται υπεροξυσώματα και περιέχουν επίσης τα περισσότερα ικανά ένζυμα για τον σχηματισμό του H_2O_2. Στα ζώα απαντάται σε όλους τους ιστούς με υψηλότερη συγκέντρωση στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ ο εγκέφαλος, η καρδιά και οι μύες έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Συνεπώς, η CAT έχει την ικανότητα να περιορίζει αποτελεσματικά τη συγκέντρωση του H_2O_2 στα κύτταρα, γεγονός που αποδεικνύει την επωφελή δράση της, καθώς το H_2O_2 αποτελεί ROS και σε μεγάλες συγκεντρώσεις κρίνεται επιβλαβές.

Με τον ίδιο σκοπό της απομάκρυνσης του H_2O_2, το ένζυμο GPx καταλύει την οξείδωση του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) και προκαλεί την αναγωγή του H_2O_2 σε H_2O. Δότης ηλεκτρονίων είναι πάντα η γλουταθειόνη, ωστόσο, ως υποστρώματα της υπεροξειδάσης

μπορούν να χρησιμοποιηθούν οργανικά υπεροξείδια, υπεροξείδια λιπαρών οξέων και υπεροξείδια της χοληστερόλης, τα οποία ανάγονται στις αντίστοιχες αλκοόλες, σύμφωνα με την αντίδραση :

$$ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$$

Το ενεργό ένζυμο αποτελείται από 4 υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες έχει στο ενεργό της κέντρο το αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη, γεγονός που αποδεικνύει τη σχέση της δραστικότητας του ενζύμου με το σελήνιο (Se).

Τέλος, η SOD είναι ένα μεταλλοένζυμο και απαιτεί ένα μεταλλικό συμπαράγοντα για τη δραστηριότητά του. Τα μεταλλικά ιόντα τα οποία δεσμεύονται από τη SOD είναι ο Fe, ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) και το μαγγάνιο (Mn). Η δράση του ενζύμου έγκειται στην εξουδετέρωση του O_2^- μετατρέποντας το σε H_2O_2 και μοριακό O_2, με ταυτόχρονη οξειδοαναγωγή του δραστικού μετάλλου μετάπτωσης που βρίσκεται στο ενεργό του κέντρο. Σύμφωνα με την αντίδραση: $2\ O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Η SOD είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό ένζυμο που προστατεύει τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες και τις αρνητικές συνέπειές του στα κύτταρα. (Young and Woodside, 2001)

Η δεύτερη κατηγορία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ανθρώπινου οργανισμού είναι τα **μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά**. Μερικά από αυτά είναι το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C, η γλουταθειόνη, οι τοκοφερόλες (βιταμίνη E) και τα φλαβονοειδή, που ήδη έχουν αναφερθεί.

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό μικροσυστατικό που απαιτείται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες. Αποτελεί επιπλέον, συμπαράγοντα ενζύμων, όπως στην διαδικασία σύνθεσης της καρνιτίνης και στον μεταβολισμό της τυροσίνης. Εντοπίζεται στα ζώα και τα φυτά, ενώ λαμβάνεται από την τροφή για τους ανθρώπους, καθώς δεν μπορεί να συντεθεί de novo. Στα κύτταρα επίσης, παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, λόγω της αντίδρασής του με την γλουταθειόνη. Αποτελεί το ισχυρότερο φυσικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό και απαντάται σε δύο ισομερή στα οποία αλληλομετατρέπεται, το D-ασκορβικό οξύ και το L-ασκορβικό. (Lobo et al., 2010, Pehlivan, 2017)

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο (GSH) που αποτελείται από L-γλουταμινικό, L-κυστεΐνη και γλυκίνη (γ-L-γλουτάμυλο-L-κυστεϊνογλυκίνη). Δεν απαιτείται η πρόσληψή της από την τροφή, καθώς συντίθεται στα κύτταρα από αμινοξέα. Η αντιοξειδωτική της ιδιότητα οφείλεται στην ομάδα της κυστεΐνης(Cys) που περιέχει μια ενεργή θειολική ομάδα και είναι ικανή

να δώσει ένα αναγωγικό ισοδύναμο. Στα κύτταρα παραμένει κυρίως στην ανηγμένη μορφή της με την δράση του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης, ενώ με την σειρά της, ανάγει άλλους μεταβολίτες και ενζυμικά συστήματα και αντιδρά άμεσα με οξειδωτικές ενώσεις. (Lobo et al., 2010)

Η βιταμίνη Ε περιλαμβάνει μία ομάδα λιποδιαλυτών ενώσεων και εμφανίζεται σε 8 μορφές, τις α-,β-,γ-,δ- τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες αντίστοιχα, με σημαντικότερη την α-τοκοφερόλη. Όλες οι μορφές της διαθέτουν ένα χρωμανολικό δακτύλιο και μια πλευρική αλυσίδα 16 ατόμων άνθρακα. Η πιο πλούσια διαιτητική πηγή είναι τα βρώσιμα φυτικά έλαια, ενώ άλλες πηγές είναι οι ξηροί καρποί και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Σημαντική λειτουργία της ως αντιοξειδωτικό αποτελεί η αμυντική της δράση απέναντι στην λιποειδική υπεροξείδωση, προστατεύοντας τις μεμβράνες των κυττάρων από την επίθεση των ελευθέρων ριζών. (Rizvi et al., 2014)

Τέλος, οι πρωτεΐνες δέσμευσης προ-οξειδωτικών μετάλλων είναι η τρίτη κατηγορία που περιλαμβάνει πρωτεΐνες πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων όπως η τρανσφερρίνη και η σερουλοπλασμίνη, οι οποίες απομονώνουν ή δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με το Fe και το Cu αντίστοιχα, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

2.4.2 Φλεγμονή

Ο όρος φλεγμονή αναφέρεται σε μία βιολογική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, η ενεργοποίηση της οποίας μπορεί να πυροδοτηθεί από πλήθος παραγόντων, όπως παθογόνους μικροοργανισμούς, κατεστραμμένα κύτταρα και τοξικές ενώσεις. Σε επίπεδο ιστού, η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από ερυθρότητα, οίδημα, πόνο, τοπική αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και απώλεια της λειτουργίας του ιστού, συμπτώματα τα οποία προέρχονται από τις αποκρίσεις των κυττάρων στην λοίμωξη ή τον τραυματισμό. Η φλεγμονή χωρίζεται σε δύο τύπους: την **οξεία** και την **χρόνια** φλεγμονή. (Chen et al., 2018)

Στην περίπτωση της οξείας φλεγμονής, αναφερόμαστε σε μία βραχυπρόθεσμη απόκριση, κατά την οποία αυξάνονται η ροή του αίματος και η αγγειακή διαπερατότητα, τα συμβάντα που συνοδεύονται με την αυξημένη διήθηση λευκοκυττάρων. Σκοπός αυτής της απόκρισης είναι να απομακρυνθεί το ερέθισμα που προκάλεσε το τραύμα και να διατηρηθεί η ομοιόσταση. (Freire and Van Dyke, 2013)

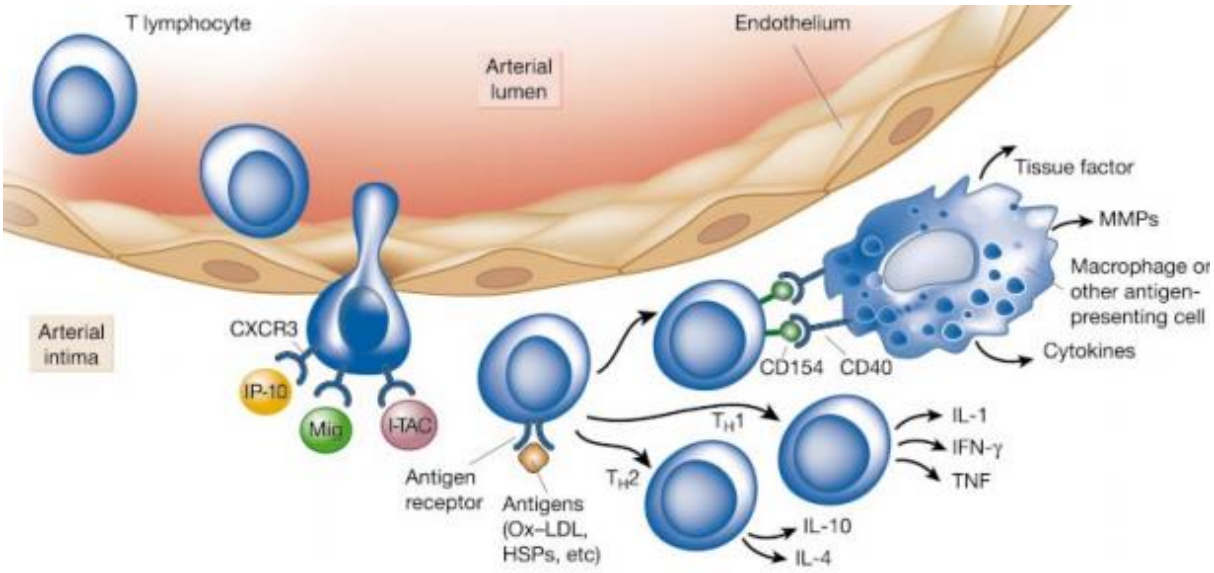
Ως χρόνια φλεγμονή ορίζεται η παρατεταμένη φλεγμονώδη απόκριση που συνεπάγεται προοδευτική αλλαγή στον τύπο των κυττάρων που υπάρχουν στη θέση της φλεγμονής. Μπορεί να διαρκέσει μήνες ή χρόνια και οι συνέπειες της στον οργανισμό ποικίλουν, ανάλογα με την αιτία πρόκλησής της, αλλά και την ικανότητα του οργανισμού να την επιδιορθώσει. (Pahwa et al., 2020) Μία υποκατηγορία θα λέγαμε της χρόνιας φλεγμονής είναι η υποβόσκουσα φλεγμονή. Στην περίπτωση αυτή, ο οργανισμός αντιμετωπίζει μία ήπια, συνεχή φλεγμονή, με χαμηλά επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων και συνήθως, συνοδεύεται από νοσήματα όπως η παχυσαρκία, ο χρόνιος πόνος κ.ά., όπως και στην χρόνια φλεγμονή. (Minihane et al., 2015)

2.4.3 Μεσολαβητές και κύτταρα που συμμετέχουν

Ποικιλία ερευνών αποδεικνύει ότι η φλεγμονή κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και κατά συνέπεια, των καρδιαγγειακών επιπλοκών. Η διαδικασία της φλεγμονής πυροδοτείτε κυρίως από την δημιουργία ενδογενών τροποποιημένων δομών, που συνήθως είναι οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες (οξειδωμένη LDL- χοληστερόλη) και διεγείρει την ειδική και μη ειδική ανοσολογική απόκριση. (Taleb, 2016)

Στην διαδικασία της φλεγμονής, συμμετέχουν μεσολαβητές και κύτταρα που καθορίζουν την εξέλιξή της. Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι ***πρωτεϊνικής φύσης***, όπως κυτταροκίνες, μερικές πρωτεΐνες οξείας φάσης και διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης ή ***λιποειδικής φύσης***, όπως τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή, ο PAF και τα εικοσανοειδή. (Koenig, 2001)

Καθώς λοιπόν, προχωρά η διαδικασία δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας όπως αναφέρθηκε με την εσωτερίκευση των λιποπρωτεϊνών και την μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα, τα μακροφάγα εκθέτουν μέρη του αντιγόνου στην επιφάνειά τους και έτσι προάγουν την φλεγμονή, με την ενεργοποίηση των Τ- κυττάρων. Κυρίως συμμετέχουν τα τύπου-1 βοηθητικά Τ- κύτταρα (Th1), τα οποία στην συνέχεια, παράγουν την ιντερλευκίνη-γ (IFN-γ). Η τελευταία, ως κυτταροκίνη, αυξάνει την σύνθεση άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-a) και της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), οι οποίες με την σειρά τους, προάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών και κυτοτοξικών μορίων στα μακροφάγα και τα κύτταρα των αγγείων. Επιπλέον, η IFN-γ συμβάλει στη μη σταθερότητα της πλάκας, καθώς αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων. Μειώνει ακόμα την παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία κύτταρα, γεγονός που άμεσα οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.



Εικόνα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των Τ-λεμφοκυττάρων στην αθηρογένεση και μόρια που συμμετέχουν (Libby, 2002)

Μία ακόμα απάντηση των βοηθητικών Τ-κυττάρων στην έκθεση του αντιγόνου, είναι η παραγωγή της πρωτεΐνης μέλους της οικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκου, CD40L (CD40 ligand). Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CD40 των μακροφάγων και η αλληλεπίδραση αυτή αποτελεί αιτία παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταλλοπρωτεϊνασών, ενώ παράλληλα διεγείρει την έκφραση του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF), από τα μακροφάγα. Ο TF συμμετέχει στο μονοπάτι πήξης του αίματος και συμβάλει στην θρόμβωση.

Σημαντική συμβολή στην φλεγμονή κατέχουν και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης, στην οικογένεια των οποίων ανήκει η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη(CRP), ένα μόριο που συνδέεται άρρηκτα με την φλεγμονή, ως δείκτης αυτής. Όπως αναφέρθηκε, μέσω της ενεργοποίησης των ανοσοποιητικών κυττάρων, παράγονται μόρια κυτταροκινών, στα οποία εκτός των άλλων, ανήκει και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6). Αυτή με την σειρά της, διεγείρει το ήπαρ, ώστε να παράγει την CRP και άλλες πρωτεΐνες οξείας φάσης. Σχετικά με την δράση της CRP στην φλεγμονή, πιθανότατα ενεργοποιεί κάποια μόρια, ωστόσο αναμένεται να γίνουν έρευνες για να εξακριβωθεί. (Christodoulidis et al., 2014, Sproston and Ashworth, 2018)

Όσον αφορά τα διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης των λευκοκυττάρων και συγκεκριμένα, του μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (VCAM-1). Αμέσως μετά την παραγωγή του, τα κύτταρα που φέρουν υποδοχείς του μορίου (μονοκύτταρα, Τ-κύτταρα), συνδέονται με

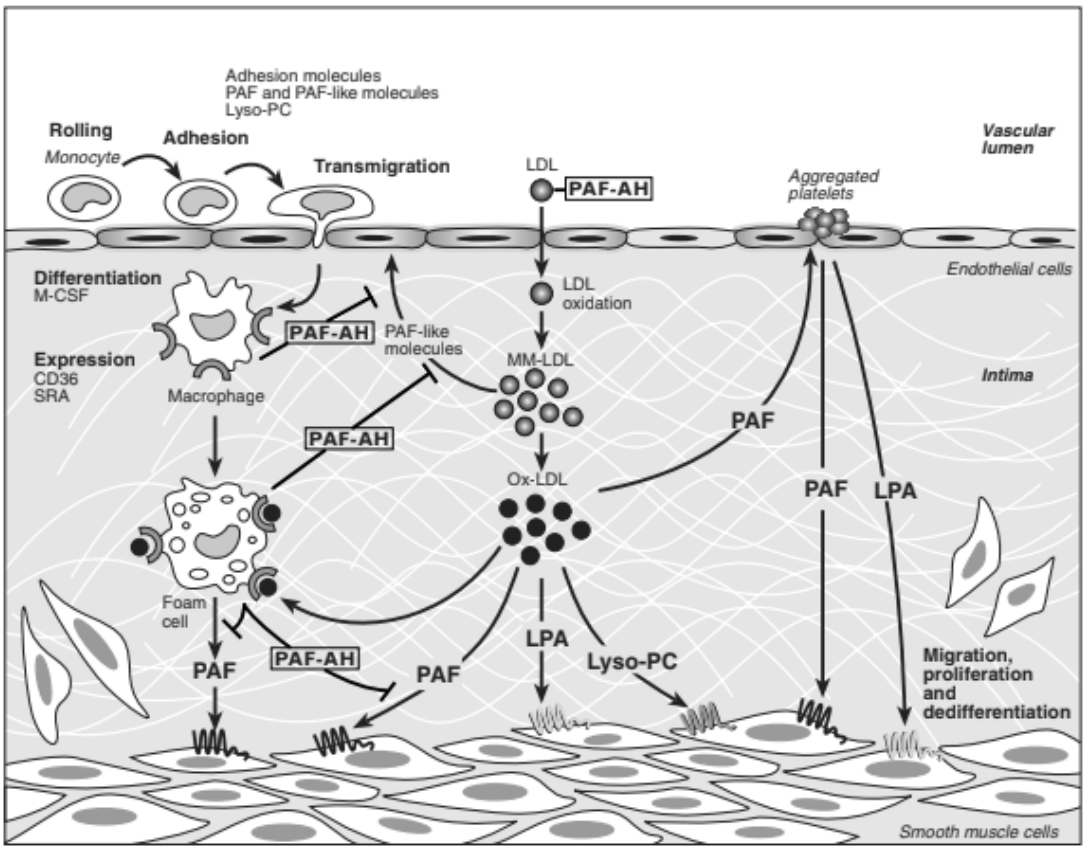
το ενδοθήλιο, διεγείρουν την παραγωγή των κυτοκινών και την «μετανάστευση» των λευκοκυττάρων στον έσω χιτώνα. (Christodoulidis et al., 2014)

Εκτός όμως από τα μόρια πρωτεϊνικής φύσης που συμμετέχουν στην διαδικασία της φλεγμονής, ως μεσολαβητές συναντάμε και μόρια λιποειδικής φύσης, με σημαντικότερα τα φωσφολιποειδή και ιδιαίτερα, τα προϊόντα οξείδωσης της φωσφατιδυλοχολίνης, τον PAF και τα εικοσανοειδή. Ιδιαίτερα τα κύτταρα που προωθούν τη φλεγμονή, παράγουν και εκκρίνουν φωσφολιπίδια ως μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένου του PAF, του φωσφατιδικού οξέος (PA), του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA), την λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) και την 1-φωσφορική-σφιγγοσίνη (S1P) κ.ά.

Τα φωσφολιποειδή παράγονται κατά την φλεγμονή από πλήθος ενζύμων, από τα προϋπάρχοντα φωσφολιποειδή της μεμβράνης και πυροδοτούν κυτταρικά σήματα, μέσω υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες. Η πλειονότητα αυτών συμμετέχουν στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, στην μετανάστευσή τους στο αγγειακό τοίχωμα και στον επακόλουθο σχηματισμό χημειοκινών, που οδηγούν σε σχηματισμό του αφρώδους κυττάρου και στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων.

Σχετικά με τον PAF, που θα αναλυθεί παρακάτω και κάποια παράγωγα της φωσφατιδυλοχολίνης, φαίνεται ότι αποικοδομούνται στο πλάσμα από το λιποπρωτεϊνικό ένζυμο, PAF-ακετυλο-υδρολάση, γνωστό ως $LpPLA_2$. Επιδημιολογικές μελέτες μάλιστα στην Καυκάσια φυλή δείχνουν ότι η υψηλή δραστικότητα του ενζύμου αυτού, ως απόκριση του οργανισμού στα υψηλά επίπεδα PAF και οξειδωμένων φωσφολιποειδών, μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων.(Ninio, 2005)

Τα εικοσανοειδή είναι βιολογικά ενεργά λιποειδή σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Αποτελούνται από τις προσταγλανδίνες, τα λευκοτριένια και τις θρομβοξάνες. Δρουν άμεσα σε περιοχές φλεγμονής μέσω ειδικών υποδοχέων που εκκινούν γεγονότα μεταγωγής σήματος, τα οποία οδηγούν σε κυτταρικές αποκρίσεις σε ερεθίσματα. Πρόκειται για ενώσεις που προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα 20 ανθράκων (C-20), με σημαντικότερο το AA, ως πρόδρομη ένωση. (Capra et al., 2013)



Εικόνα 2.5 Ο ρόλος των φωσφολιποειδικών μεσολαβητών στην φλεγμονή και κατ' επέκταση την αθηροσκλήρωση. (Ninio, 2005)

2.4.4 Θρόμβωση

Η θρόμβωση είναι ο σχηματισμός θρόμβου αίματος και μπορεί να συμβεί τόσο στο αρτηριακό, όσο και στο φλεβικό σύστημα. Τα CVD στην πλειονότητά τους αποδίδονται στην αθηροσκλήρωση, κατά την οποία η δημιουργία θρόμβου μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Μελέτες που έγιναν σε ασθενείς, έδειξαν ότι το 50-75 % των περιπτώσεων παρουσίαζαν θρόμβωση, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν υπήρχε θρόμβος, αλλά σοβαρή στένωση των αρτηριών σε ποσοστό >75%. Στην περίπτωση της θρόμβωσης, τρεις είναι οι μορφολογικές περιπτώσεις που αποτελούν την αιτία της δημιουργίας της, η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, η διάβρωσή της ή ο σχηματισμός οζιδίων ασβεστίου. Σε μεγαλύτερο ποσοστό 55-65 % ωστόσο, συμβαίνει η ρήξη της πλάκας, η διάβρωση συναντάται σε ποσοστό 30-35%, ενώ οι όζοι ασβεστίου σε ποσοστό 2-7%. (Otsuka et al., 2016)

Απαραίτητη βέβαια προϋπόθεση για την κατανόηση της διαδικασίας αυτής, είναι η μελέτη των επιμέρους διαδικασιών της αντίδρασης του οργανισμού στο τραύμα και τη θρόμβωση.

- <u>Αιμόσταση</u>

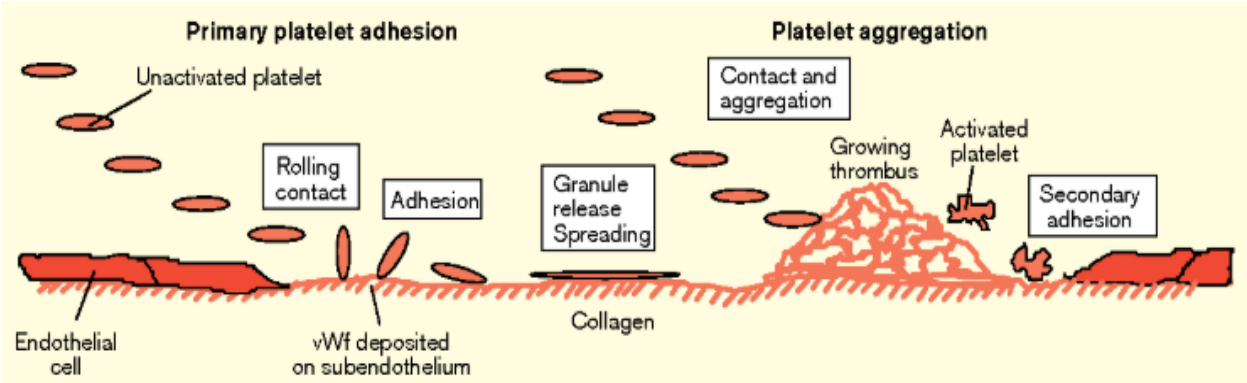
Η αιμόσταση είναι η φυσιολογική διαδικασία κατά την οποία παύει η αιμορραγία στην περιοχή του τραύματος, ενώ παράλληλα διατηρείται φυσιολογική η ροή του αίματος στην κυκλοφορία. Η αιμορραγία διακόπτεται με την δημιουργία βύσματος, παρόλο που το ενδοθήλιο διαθέτει μία αντιπηκτική επιφάνεια. Στην περίπτωση του τραυματισμού του αγγείου, συστατικά του υπο-ενδοθηλιακού στρώματος απελευθερώνονται στο αίμα. Πολλά από τα συστατικά αυτά ενεργοποιούν τις δύο κύριες διαδικασίες της αιμόστασης, την πρωτογενή και την δευτερογενή. (Gale, 2010)

Η **πρωτογενής αιμόσταση** αναφέρεται στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό αιμοπεταλιακού βύσματος. Συγκεκριμένα, η συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση, προϋποθέτει την προσκόλληση τους σε μια επιφάνεια. Παρότι τα αιμοπετάλια έχουν την τάση να προσκολλώνται σε επιφάνειες, ωστόσο δεν γίνεται αυτό στα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Σε περίπτωση κάκωσης του αγγείου, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται κυρίως, στο κολλαγόνο, με την βοήθεια μίας ουσίας-μεσολαβητή, του παράγοντα von Willebrand (vWF), που είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια (platelet adhesion). Η δέσμευσή τους στο κολλαγόνο, πυροδοτεί την απελευθέρωση του περιεχομένου των κυστιδίων των αιμοπεταλίων, τα οποία περιέχουν χημικούς παράγοντες, όπως η ADP και η σεροτονίνη. Οι ουσίες αυτές δρουν στην συνέχεια τοπικά, προκαλώντας μεταβολές στον μεταβολισμό, το σχήμα και τις πρωτεΐνες επιφανείας των αιμοπεταλίων. Ως αποτέλεσμα, προσκολλώνται νέα αιμοπετάλια στα παλιά (platelet aggregation), δημιουργώντας ένα αιμοπεταλιακό βύσμα ή θρόμβο. (Vander et al., 2001)

Στην συνέχεια, στο πλαίσιο της **δευτερογενούς αιμόστασης**, ακολουθεί η πήξη του αίματος και η δημιουργία ενός πλέγματος ινώδους που σταθεροποιεί τον θρόμβο, μέσω μίας πολύπλοκης σειράς αντιδράσεων, γνωστής και ως “καταρράκτης πήξης”. Οι παράγοντες πήξης που συμμετέχουν, είναι πρόδρομα μόρια γνωστά ως ζυμογόνα, που κυκλοφορούν σε ανενεργό μορφή και παράγονται συνήθως από το ήπαρ. Το αποτέλεσμα του καταρράκτη ενεργοποίησης των ενζύμων είναι η παραγωγή θρομβίνης, ενός μορίου που με θετικούς και αρνητικούς αναδραστικούς μηχανισμούς ελέγχει τόσο την παραγωγή του θρόμβου, όσο και τη διάλυσή του σε περιπτώσεις υπέρμετρης παραγωγής.

Συγκεκριμένα, μεταξύ των πρωτεϊνών πήξης που συμμετέχουν είναι η προθρομβίνη, το ινωδογόνο και ο TF. Η προθρομβίνη είναι μία ασταθής πρωτεΐνη του πλάσματος που διασπάται σε μικρότερα μόρια πρωτεΐνης, μία εκ των οποίων είναι και η θρομβίνη, η οποία έχει και προφλεγμονώδη δράση. Η δράση της έγκειται στην ενεργοποίηση άλλων παραγόντων πήξης, όπως του ινωδογόνου και των παραγόντων V, VII,VIII. Το ινωδογόνο συμβάλει στον σχηματισμό του θρόμβου, όντας το πρόδρομο μόριο του ινώδους, που καθορίζει την σταθερότητα του θρόμβου. Τέλος, ο TF είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στον υπο-ενδοθηλιακό ιστό και τους ινωβλάστες και δεν εκτίθεται στο αίμα μέχρι τον τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος. Αποτελεί συμπαράγοντα του παράγοντα VIIa, καθώς δημιουργείται ένα σύμπλεγμα μεταξύ τους. (Palta et al., 2014)

Ο καταρράκτης πήξης αποτελεί μία περίπλοκη διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν πολλοί παράγοντες, μερικοί από τους οποίους δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως. Ένας ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας είναι ο Xa, που είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η τελευταία, καταλύει τη μετατροπή του διαλυτού ινωδογόνου σε αδιάλυτο ινώδες και ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII, ο οποίος συμβάλει στη σταθεροποίηση του ινώδους. (Gale, 2010)



Εικόνα 2.6 Σχηματική αναπαράσταση της πρωτογενούς και δευτερογενούς αιμόστασης (Clemetson, 1999)

- Ινωδόλυση

Παράλληλα με τη δημιουργία του θρόμβου, δραστηριοποιείται το ινωδολυτικό σύστημα. Ο οργανισμός είναι σημαντικό να ελέγχει αποτελεσματικά την διαδικασία του σχηματισμού του θρόμβου, έτσι ώστε ο ίδιος, αφενός να περιορίζεται στο σημείο της βλάβης και αφετέρου να λύεται ικανοποιητικά, όταν χρειάζεται. Η ινωδόλυση αποτελεί το τελικό στάδιο της διαδικασίας της πήξης, με στόχο την αποτροπή της υπερβολικής αύξησης του θρόμβου και την διάλυσή του.

Όπως και ο καταρράκτης πήξης, η ινωδόλυση ρυθμίζεται από ένα σύνολο παραγόντων και αναστολέων. Συγκεκριμένα το μόριο της **πλασμίνης**, που συμμετέχει ενεργά στην διαδικασία αυτή, δρα προκαλώντας αδρανοποίηση των παραγόντων V, VIII, XIII και συμβάλλει στην διάσπαση του ινωδογόνου (ινωδογονόλυση) και του ινώδους (ινωδόλυση). Προέρχεται επίσης, από ένα ανενεργό προένζυμο, το πλασμινογόνο, το οποίο ενεργοποιείται με μία από τις δύο σερινοπρωτεάσες, τον ιστικό ενεργοποιητή (tPA) και τον ενεργοποιητή τύπου ουροκινάσης (uPA), που παράγεται στα νεφρικά κύτταρα.

Σχετικά με τους αναστολείς, είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την αδρανοποίηση της περίσσειας πλασμίνης ή τον περιορισμό της δραστηριότητας των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Κύριος αναστολέας της πλασμίνης θεωρείται η α2-αντιπλασμίνη (A2AP), ενώ στους αναστολείς της ενεργοποίησης του πλασμιγόνου υπάγονται: 1) Ο αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου-1 (PAI-1), που αδρανοποιεί τον tPA και 2) Ο αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου-2 (PAI-2), που αδρανοποιεί κυρίως τον uPA και δευτερευόντως τον tPA. (Chapin and Hajjar, 2015)

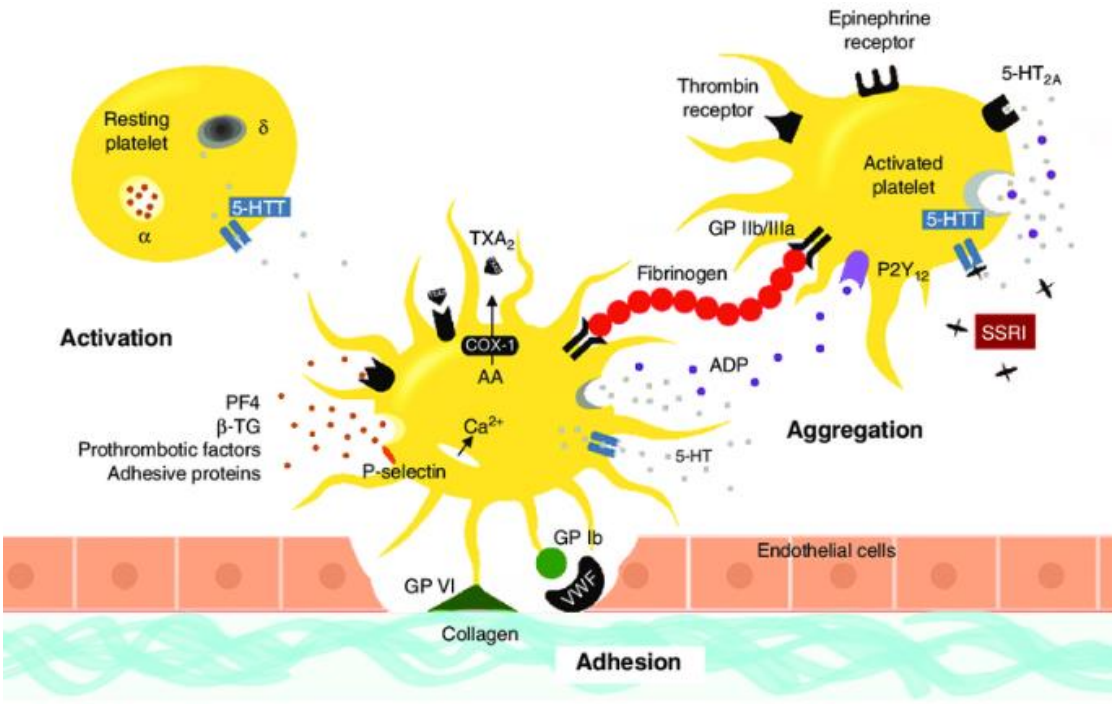
2.4.5 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα, είναι μικρά, δισκοειδή κύτταρα, που δεν έχουν πυρήνα, έχουν διάμετρο 2-3 μικρόμετρα (μm) και προέρχονται από θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία βρίσκονται στον μυελό των οστών. Ένας ενήλικας διαθέτει περίπου 1 τρισεκατομμύριο αιμοπετάλια στην κυκλοφορία, καθένα από τα οποία έχει μέσο όρο ζωής 8-10 ημέρες. Επιπλέον, η φυσιολογική ποσότητα των αιμοπεταλίων είναι 150.000-450.000 αιμοπετάλια/ μικρόλιτρο (μL) αίματος. Όσο για τις λειτουργίες τους, τα αιμοπετάλια σε μη αιμοστατικές συνθήκες, κινούνται εντός των αγγείων σε ηρεμία, χωρίς να αλληλεπιδρούν με άλλα

κύτταρα. Ωστόσο, ενεργοποιούνται κατά τον τραυματισμό των αιμοφόρων αγγείων, αλλάζοντας μορφή, εκκρίνοντας το περιεχόμενο των κοκκίων τους και τελικά, σχηματίζοντας έναν θρόμβο, κατά την συσσώρευσή τους. Βέβαια, για την ενεργοποίησή τους ευθύνονται κάποιοι παράγοντες-αγωνιστές των αιμοπεταλίων και θα αναλυθούν παρακάτω. (Thon and Italiano, 2012)

2.4.5.1 Ο ρόλος τους στην αθηροσκλήρωση

Η συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση έγκειται στην συσσώρευσή τους και τη δημιουργία θρόμβου που καλύπτει το τραυματισμένο αγγείο. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο (platelet adhesion) και η συμμετοχή του παράγοντα vWF στην επιφάνεια των εκτεθειμένων ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως αναφέρθηκε, πυροδοτεί ενδοκυτταρικά σήματα στο αιμοπετάλιο, στα οποία μεσολαβεί το Ca. Αυτό προκαλεί την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων, του ADP και της σεροτονίνης, την σύνθεση της θρομβοξάνης A_2 (TxA_2), που επίσης είναι ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων, αλλά και την αύξηση των γλυκοπρωτεινικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών. Η έκκριση του ADP και της TxA2, προκαλεί την ενεργοποίηση και άλλων αιμοπεταλίων και ενισχύει τη διαδικασία της συσσώρευσης (platelet aggregation).



Εικόνα 2.7 Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης, προσκόλλησης, συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και των παραγόντων που συμμετέχουν (Abajo, 2011)

Οι υποδοχείς, γλυκοπρωτεΐνες στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων δρουν σαν σημείο πρόσδεσης με άλλα αιμοπετάλια ή συστατικά του πλάσματος, ενώ ιδιαίτερα οι γλυκοπρωτεΐνες GPIbα και GPIIb/IIIa συμμετέχουν αποτελεσματικά στη δημιουργία ενός πρωτογενούς αιμοστατικού θρόμβου. Τέλος, τα αρνητικά φορτισμένα στοιχεία της φωσφολιποειδικής μεμβράνης, προσφέρουν μία επιφάνεια στην οποία μπορούν να δράσουν τα πηκτικά ένζυμα. Οι ενώσεις αυτές σε συνδυασμό με άλλους ενεργοποιητές, όπως η α-θρομβίνη και η επινεφρίνη, προάγουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. (Vorchheimer and Becker, 2006, Lievens and von Hundelshausen, 2011)

Στην παθολογική κατάσταση, που επέρχεται ρήξη ή διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας, τρεις κυρίως παράγοντες καθορίζουν τον σχηματισμό του θρόμβου, το μέγεθος του ρήγματος, ο βαθμός στένωσης και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας, που εκτίθεται στο αίμα της κυκλοφορίας. Η εναπόθεση των αιμοπεταλίων αυξάνεται με την αύξηση της στένωσης, ενώ το ακριβές σημείο της εναπόθεσης επηρεάζεται από το σημείο της κάκωσης και τη ροή του αίματος. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι πιο πυκνή στην κορυφή της κάκωσης του αγγείου, γεγονός που είναι κλινικά σημαντικό, αν η περιοχή του τραυματισμού είναι μεγάλη και ο σχηματισμός του θρόμβου που προκύπτει δημιουργεί μεγαλύτερη στένωση. Με την εξέλιξη αυτής της διαδικασίας, μειώνεται αισθητά η αιματική ροή, γεγονός που αποτελεί αιτία των περισσότερων αιφνίδιων στεφανιαίων επιπλοκών και του εμφράγματος. (Vorchheimer and Becker, 2006)

2.4.5.2 Αγωνιστές αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και επιτελούν τις λειτουργίες τους με τη βοήθεια κάποιων παραγόντων, καθένας από τους οποίους επηρεάζει τις διαδικασίες σε διαφορετικό βαθμό και με διαφορετικό τρόπο. Σε αυτούς κατατάσσονται το κολλαγόνο, η θρομβίνη, η TxA_2, η επινεφρίνη, η σεροτονίνη και η ADP αλλά και ο PAF. Τα αιμοπετάλια διαθέτουν υποδοχείς για τους αγωνιστές τους και καθένας από αυτούς έχει διαφορετική δράση και σημασία.

Αναφερόμενοι σε μερικούς από αυτούς, το **ADP** θεωρείται ένας ασθενής αγωνιστής των αιμοπεταλίων και βρίσκεται σε πυκνότητα στα κοκκία τους. Συγκεκριμένα, το ADP δρα συνδεόμενο με τον $P2Y_1$ πουρινεργικό υποδοχέα και προκαλεί ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και κινητοποίηση Ca που οδηγούν σε συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Όμως, ο πιο σημαντικός

υποδοχέας του ADP είναι ο υποδοχέας $P2Y_{12}$, ο οποίος μεσολαβεί στην διαδικασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μέσω της αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης (AC).

Όσον αφορά την **επινεφρίνη**, ο υποδοχέας της είναι ο α_2- αδρενεργικός υποδοχέας και θεωρείται και αυτή ασθενής αγωνιστής, καθώς η έκκρισή της εξαρτάται από την συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Το AA αποτελεί την πρόδρομη ένωση της **θρομβοξάνης A_2**, η οποία παράγεται από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 από το Ca. Η φωσφολιπάση στην συνέχεια, απελευθερώνει AA από την φωσφατιδυλο-χολίνη και την φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη. Τελικά το αραχιδονικό μετατρέπεται σε θρομβοξάνη A_2 και σε συνεργασία με την κινάση της μυοσίνης, συμβάλει στην ενεργοποίηση της πηκτικής δράσης των αιμοπεταλίων, ενισχύοντας την έκκριση των προϊόντων των κοκκίων τους.

Το **κολλαγόνο** επίσης, είναι σημαντικός παράγοντας στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Έχουν βρεθεί 2 υποδοχείς με συνεργιστική δράση στα αιμοπετάλια, ο GPIa/IIa, που συμβάλει στην προσκόλληση και ο GPVI, που είναι υπεύθυνος για την μεταγωγή σήματος και την ενεργοποίηση της διαδικασίας παραγωγής την θρομβοξάνης A_2.

Η **θρομβίνη** ωστόσο, μια πρωτεάση της σερίνης, είναι η κύρια πρωτεάση που επιδρά στην διαδικασία της πήξης και αποτελεί τον πιο ισχυρό φυσιολογικό αγωνιστή των αιμοπεταλίων, ενεργοποιώντας τους 2 υποδοχείς PAR1 (protease-activated receptor 1) και PAR4 (protease-activated receptor 4). Παρέχει το έναυσμα για την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και για την απελευθέρωση άλλων ενεργοποιητών των αιμοπεταλίων (ADP, σεροτονίνη και TxA_2), καθώς και χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων. Επίσης κινητοποιεί την P-σελεκτίνη και τον προσδέτη CD40 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη αIIb/β3. Αποτέλεσμα του παραπάνω γεγονότος είναι η ιντεγκρίνη αIIb/β3 να προσδένεται στο ινωδογόνο και στον παράγοντα vWF, ώστε να ρυθμίσει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. (Zhou and Schmaier, 2005)

Τέλος, ο **παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)** ή 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (Demopoulos et al., 1979), είναι ένας μεσολαβητής ζωτικής σημασίας για τη φλεγμονώδη απόκριση και τις ανοσολογικές διαταραχές. Συντίθεται, απελευθερώνεται και μεταβολίζεται από αρκετούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων κατά την ενεργοποίησή τους, όπως τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα, τα αφρώδη κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα επίπεδα του PAF ρυθμίζονται από τις PAF-ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AHs), που υδρολύουν την sn-

2 θέση, με αποτέλεσμα την μετατροπή του σε λυσο-μορφή (lyso-PAF). Ο παράγοντας PAF ανήκει σε μια οικογένεια λιποειδικών μορίων, που παρά την διαφορετική δομή και προέλευσή τους, μοιράζονται παρόμοια βιολογική δράση. Τα PAF-like lipids είναι οξειδωτικά τροποποιημένες φωσφατιδυλοχολίνες που ανήκουν στην οικογένεια του PAF, μιμούνται τη δομή του και αποτελούν μόρια σύνδεσης για τους PAF υποδοχείς.

Τα αιμοπετάλια διαφόρων ειδών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, έχει φανεί ότι ενεργοποιούνται και συσσωρεύονται με τη δράση του PAF. Η συσσώρευση συμβαίνει μέσω σηματοδότησης από την ιντεγκρίνη GP IIb / IIIa (αIIbβ3), με συνέπεια τη δέσμευση του ινωδογόνου.

Ισχυρές ενδείξεις μάλιστα, υποστηρίζουν ότι ο PAF είναι από τους πιο ισχυρούς μεσολαβητές της αθηροσκλήρωσης και της φλεγμονής. Αρχικά, τα υψηλά επίπεδα LDL, αλλά και οξειδωμένης LDL έχουν ως επακόλουθο την αύξηση των επιπέδων PAF και PAF-like lipids, συμβάλλοντας έτσι στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Στην συνέχεια, με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλούν τα προαναφερθέντα μόρια , πυροδοτείται η περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του PAF στο αίμα, γεγονός που πυροδοτεί μια ταχεία φλεγμονώδη απόκριση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχοντας αυξήσει τους υποδοχείς του σε αυτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου γεγονός που επάγει την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. (Demopoulos et al., 2003)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο : ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΙΑΣ

3.1 Γενικά στοιχεία/ Χρήσεις

Η διαδικασία παραγωγής του οίνου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υποπροϊόντων, ή υποπροϊόντων που αποτελούνται κυρίως από οργανικά απόβλητα, λύματα, εκπομπές αερίων και ανόργανα υπολείμματα. Η απαίτηση για φιλική προς το περιβάλλον παραγωγή, αλλά και η προσπάθεια ελαχιστοποίησης του κόστους παραγωγής, οδήγησε στην υιοθέτηση μέτρων για τη μείωση των αποβλήτων. Ωστόσο, όταν η μείωση αυτή δεν είναι εφικτή, διαδικασίες όπως η ανακύκλωση και η επαναχρησιμοποίηση είναι απαραίτητες και σχετίζονται με τη χρήση ανανεώσιμων πηγών θρεπτικών συστατικών και βιοδραστικών ενώσεων για την παραγωγή τροφίμων, φαρμάκων κ.ά.

Συγκεκριμένα για το κρασί, η αξιοποίηση των υποπροϊόντων του, υποστηρίζεται λόγω του περιεχομένου τους σε φυτοχημικά, όπως τα φαινολικά συστατικά, που εμφανίζουν ισχυρές αντι-οξειδωτικές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Τα υποπροϊόντα που θα αναλύσουμε παρακάτω, αποτελούνται από τα στέμφυλα (grape pomace), που αναφέρονται σε ένα μίγμα από φλούδες του σταφυλιού αλλά και κουκούτσια, τα τσάμπουρα ή μίσχοι που είναι τα κοτσάνια, τα φύλλα και τέλος, τους οινολάσπες, που αποτελούν το υπόλειμμα που σχηματίζεται στο κάτω μέρος του δοχείου, μετά τη ζύμωση. (Teixeira et al., 2014)

- <u>Αξιοποίηση υποπροϊόντων</u>

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναφερθεί ένας μεγάλος αριθμός διαδικασιών και προϊόντων, στα οποία χρησιμοποιούνται τα υποπροϊόντα της οινοποιίας. Στη βιομηχανία τροφίμων συγκεκριμένα, αποτελούν φυσικά πρόσθετα, καθώς η ενσωμάτωσή τους προσφέρει στο προϊόν φυσικά αντιοξειδωτικά, συντηρητικά και σταθεροποιητές χρώματος. (Kalli et al., 2018) Τα αντιοξειδωτικά παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπών και προστίθενται σε φρέσκο ή επεξεργασμένο κρέας για να αποφευχθεί η απελευθέρωση μη επιθυμητών αρωμάτων και να βελτιωθεί τη σταθερότητα του χρώματος. (Fontana et al., 2013)

Στη βιομηχανία των φαρμάκων και των καλλυντικών, τα στέμφυλα , με το πλούσιο περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες, αποτελούν μία εναλλακτική προς την κατεύθυνση

απαγόρευσης των συνθετικών συντηρητικών (πχ. Parabens), των χρωστικών και άλλων τεχνητών ουσιών. Λόγω των αντι-γηραντικών ιδιοτήτων των πολυφαινολών, εκχυλίσματα από σταφύλι έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντηλιακά και κρέμες. Επιπλέον, υποπροϊόντα του κρασιού έχουν αξιοποιηθεί και σε συμπληρώματα διατροφής, λόγω της αντιοξειδωτικής, υπογλυκαιμικής και υπολιπιδαιμικής τους δράσης.

Τα στέμφυλα κατέχουν επίσης σημαντική θέση ως οργανικό λίπασμα, καθώς έχουν μικρή περιεκτικότητα σε φωσφορικό οξύ και άζωτο, ενώ διαθέτουν πλήθος στοιχείων, όπως Ca, Mg, Fe, Zn. (Kalli et al., 2018)

3.1.1 Στέμφυλα

Κατά την οινοποίηση, τα στέμφυλα γεννιούνται κατά τη διάρκεια παραγωγής του μούστου, με την πίεση ολόκληρου του σταφυλιού. Ουσιαστικά, είναι το στερεό υπόλειμμα που μένει μετά τη διαδικασία του πιεστηρίου και τη ζύμωση και αποτελείται από τον φλοιό του σταφυλιού και τον σπόρο. Εκτιμάται μάλιστα ότι κάθε χρόνο παράγονται περίπου 9 εκατομμύρια τόνοι αυτού του οργανικού αποβλήτου σε όλο τον κόσμο και περιέχουν κατά μέσο όρο, το 20% του βάρους των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται (το ποσοστό επηρεάζεται από την ενσωμάτωση του μίσχους ή όχι). (Kalli et al., 2018)

Εικόνα 3.1 Διαδικασία απομόνωσης στεμφύλων (Kalli et al., 2018)

Όσον αφορά τη σύσταση των στέμφυλων, η υγρασία ποικίλει από 50-72% και εξαρτάται από το είδος του σταφυλιού και το επίπεδο ωρίμανσης. Τα στέμφυλα αποτελούνται συνήθως από σπόρους κατά 38-52% του ξηρού τους μέρους, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις που οι σπόροι αποτελούν μόνο το 15%. Σύμφωνα με αναλύσεις, ο σπόρος του σταφυλιού έχει σημαντική σύσταση, με περισσότερο από το 40% να αποτελείται από ίνες, 16% από απαραίτητα έλαια, 11% από πρωτεΐνη και 7% από φαινολικές ενώσεις. Ο φλοιός των σταφυλιών, που αποτελεί μέρος των στέμφυλων, καλύπτει το 65% του υλικού και αναφέρεται και αυτός ως σημαντική πηγή φαινολικών ενώσεων. (Teixeira et al., 2014) Εκχυλίσματα από στέμφυλα αποδεικνύουν ότι αποτελούν σημαντική πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, εξαιτίας των μεγάλων ποσοτήτων διαφόρων μονομερών φαινολικών ενώσεων

όπως (+)- κατεχίνη, η (-)- επικατεχίνη , καθώς και διμερών, τριμερών και τετραμερών προ-ανθοκυανιδινών. (Fontana et al., 2013)

3.1.2 Τσάμπουρα ή μίσχοι

Τα τσάμπουρα των σταφυλιών, δηλαδή τα κοτσάνια, αφαιρούνται πριν τη διαδικασία της οινοποίησης για να αποφευχθεί η υπερβολική στυπτικότητα που δίνουν στον οίνο ή η επιρροή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Η ποσότητά τους ποικίλει από 1,4 - 7.0 % της πρώτης ύλης και η εμπορική τους αξία είναι χαμηλή, καθώς χρησιμοποιούνται κυρίως ως ζωοτροφή ή για τον εμπλουτισμό του εδάφους με στοιχεία.

Σχετικά με τη σύστασή τους, η υγρασία κατά μέσο όρο κυμαίνεται από 55-80 %, με τη μεγάλη αυτή διακύμανση να οφείλεται στις διαφορετικές ποικιλίες του σταφυλιού. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά αναφέρεται περίπου στο 5,8 % σε ξηρή βάση. (Teixeira et al., 2014)

Εικόνα 3.2 Τσάμπουρα, φλοιός και καρπός σταφυλιού (Kalli et al., 2018)

3.1.3 Φύλλα σταφυλιού

Τα φύλλα του σταφυλιού αποτελούν το λιγότερο αξιοποιήσιμο υποπροϊόν. Η σύστασή τους αναφέρεται σε οργανικά οξέα, φαινολικά οξέα, ταννίνες, ανθοκυανιδίνες, λιπίδια, βιταμίνες, καροτενοειδή, τερπένια και σάκχαρα. Η πλούσια χημική τους σύσταση προσδίδει ενδιαφέρον στην μελέτη τους, υποσχόμενη ότι θα αποτελέσουν πηγή σημαντικών ενώσεων, με

θρεπτικές και βιολογικές ιδιότητες. Προς το παρόν, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή συστατικών τροφίμων αλλά και χρωστικών, ενώ το εκχύλισμα αυτών συνιστάται ως αντισηπτικό για τα μάτια. (Teixeira et al., 2014)

3.1.4 Οινολάσπες

Οι οινολάσπες είναι το ίζημα που σχηματίζεται στον πάτο των δοχείων που περιέχουν κρασί μετά τη ζύμωση, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και μετά το φιλτράρισμα ή τη φυγοκέντρηση του προϊόντος. Αντιπροσωπεύει το 2-6% του συνολικού όγκο του οίνου που παράγεται. (Kalli et al., 2018)

Η σύσταση των οινολασπών εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την προέλευση και τα χαρακτηριστικά του είδους του σταφυλιού, αλλά και από το χρονικό διάστημα παλαίωσης στα ξύλινα βαρέλια. Το συγκεκριμένο υποπροϊόν χρησιμοποιείται για την παλαίωση του οίνου με οινολάσπες, μία παραδοσιακή τεχνική που αφορά συνήθως τον λευκό και αφρώδη οίνο, ωστόσο μερικές φορές αξιοποιείται και στο κόκκινο κρασί. (Jara-Palacios, 2019)

Κυρίως συντίθενται από μικροοργανισμούς, τρυγικό οξύ, ανόργανες και φαινολικές ενώσεις. Το κατακάθι αυτό, συμβάλει σημαντικά στην οινοποίηση, καθώς αλληλεπιδρά με τις φαινολικές ενώσεις που σχετίζονται άμεσα με το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου και τις απορροφά. Επιπλέον, ελευθερώνουν ένζυμα που ευνοούν την υδρόλυση και τη μετατροπή των φαινολικών ενώσεων σε φαινόλες ιδιαίτερης σημασίας, όπως το γαλλικό οξύ ή το ελλαγικό. (Teixeira et al., 2014) Σημαντικά χαρακτηριστικά των οινολασπών είναι το όξινο pH, μεταξύ 3 με 6, η χημική ζήτηση οξυγόνου (COD), όρος που χρησιμοποιείται για την ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξείδωση των οργανικών ουσιών και είναι 30,000 mg/L, τα επίπεδα καλίου που βρίσκονται περίπου στα 2500 mg/L και οι φαινολικές ενώσεις σε ποσότητα μεγαλύτερη των 1000 mg/L. (Jara-Palacios, 2019)

3.2. Αντι-αιμοπεταλιακή δράση υποπροϊόντων οινοποιίας

Το ενδιαφέρον και η εντατική μελέτη για τα υποπροϊόντα οινοποιίας, επιβεβαίωσαν τις ευεργετικές τους δράσεις και τις ωφέλιμες ιδιότητές τους. Οι έρευνες επικεντρώνονται σε συγκεκριμένα συστατικά των υποπροϊόντων και εξετάζουν τη συσχέτιση αυτών κυρίως με το οξειδωτικό στρες, ενώ λιγότερες μελέτες αναφέρονται στην αιμοπεταλιακή λειτουργία. Παρακάτω θα αναφερθούν οι μελέτες που αναφέρονται στην επίδραση των υποπροϊόντων στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και συγκεκριμένα, στην ιδιότητά τους να συσσωρεύονται προς τη δημιουργία θρόμβου.

Πριν την αναδρομή σε παλαιότερες μελέτες, πρέπει να αναφερθεί η έρευνα στην οποία βασίστηκε και το παρακάτω πείραμα. Πραγματοποιήθηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο το έτος 2019, από τους Χολέβα et al. και αξιολογεί την αντι-αμοπεταλιακή δράση από εκχυλίσματα στεμφύλων in vitro. Τα δείγματα αποτελούνται από εκχυλίσματα από τον καρπό και τον φλοιό, από τέσσερις ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού (Sour Black (SB), Syrah (S), Cabernet Franc (CF), Cabernet Sauvignon (CS)). Αρχικά, υπολογίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινολικών συστατικών και των ανθοκυανινών στα δείγματα και ύστερα, εξετάστηκε η αντι-αιμοπεταλιακή δράση των εκχυλισμάτων έναντι τριών αγωνιστών (PAF, ADP, TRAP). Ακολουθήθηκε επίσης, το πρωτόκολλο παραλαβής PRP από εθελοντές, που αναφέρεται παρακάτω. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντι-αιμοπεταλιακή δράση των εκχυλισμάτων ήταν ανεξάρτητη της ποικιλίας του σταφυλιού, ενώ καθοριστικός παράγοντας για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για εκχύλιση. Βρέθηκε ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα είχαν την πιο ισχυρή επίδραση στα αιμοπετάλια, με τιμές IC_{50} 162,1 ± 66,9, 181,2 ± 82,3 και 156,3 ± 97,5 μg εκχυλίσματος έναντι παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. Όσον αφορά την % αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται με παρουσία του εκχυλίσματος σε ποσότητα 150μg, φάνηκε ότι η μεγαλύτερη αναστολή επιτυγχάνεται παρουσία του παράγοντα PAF και ακολουθούν οι παράγοντες ADP και TRAP. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πείραμα μελετώντας τα αιμοπετάλια από ασθενή με καρδιαγγειακό νόσημα, υπό τις ίδιες συνθήκες και βρέθηκε ότι και σε αυτή την περίπτωση το εκχύλισμα μπορεί να προκαλέσει σε κάποιο βαθμό αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. (Choleva et al., 2019)

Μελέτη του 2002, εξέτασε το συνδυασμό εκχυλισμάτων από το σπόρο και το φλοιό του σταφυλιού, που αποτελούν κύριες πηγές πολυφαινολών, αποδεικνύοντας ότι εμποδίζουν

αποτελεσματικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε in vitro, στα ανθρώπινα αιμοπετάλια και ex vivo, σε αιμοπετάλια σκύλου. Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια δε φάνηκε διαφορά στη λειτουργία, εξετάζοντας το εκχύλισμα του σπόρου ή του φλοιού. Ωστόσο, αξιοσημείωτη ήταν η επιρροή του συνδυασμού των δύο εκχυλισμάτων στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δίνοντας σημαντικά αποτελέσματα. Παρόμοια μάλιστα ήταν και τα αποτελέσματα ex vivo στα αιμοπετάλια των σκύλων. (Shanmuganayagam et al., 2002)

Σε παρόμοια μελέτη το 2005, ερευνητές χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα από τον σπόρο και το φλοιό του σταφυλιού, προκειμένου να μελετήσουν τις αντι-φλεγμονώδεις ικανότητές τους και την επιρροή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το πείραμα έγινε in vitro, σε πλυμένα αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές, τα οποία τοποθετήθηκαν μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος. Πράγματι, υπήρξε συσχέτιση των ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων με τα αιμοπετάλια και συγκεκριμένα, δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για τον παράγοντα TRAP. (Vitseva et al., 2005)

Επιπλέον, το 2004 δημοσιεύτηκε μία μελέτη κατά την οποία μελετήθηκε η διαδικασία προσκόλλησης των αιμοπεταλίων έναντι του κολλαγόνου και του ινωδογόνου. Στο πείραμα συμμετείχαν 95 υγιείς εθελοντές με συνήθη μέσο όρο κατανάλωσης αλκοόλ το περισσότερο ένα ποτό την ημέρα. Έγινε αιμοληψία και ποσότητα αίματος τοποθετήθηκε μαζί με διάφορες συγκεντρώσεις αλκοόλ, κόκκινου κρασιού και εκχυλισμάτων πολυφαινολών από σταφύλι (polyphenolic grape extracts-PGE). Το κόκκινο κρασί που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 13% vol αλκοόλ, ενώ το εκχύλισμα ήταν από σταφύλι από το είδος vitis vinifera και είχε συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες 50 ± 3%, σύμφωνα με τη μέθοδο Folin Ciocalteu και συγκέντρωση ανθοκυανιδινών 3-4%. Σημαντικά ευρήματα της έρευνας ήταν η συσχέτιση της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και των πολυφαινολών με την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο, η οποία φαίνεται να παρεμποδίζεται. (Lange et al., 2004)

Οι ίδιοι ερευνητές αξιολόγησαν και πάλι in vitro, την ενεργοποίηση που προκαλεί το εκχύλισμα των πολυφαινολών από το σταφύλι (PGE), στο μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίων (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1), μειώνοντας τον βαθμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αναστολή της συσσώρευσης στα 20μg/ml PGE ή και περισσότερο, έναντι των παραγόντων TRAP και ADP. Επιπλέον, η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλούνταν από τον παράγοντα TRAP στα 50 μg/ml PGE, ήταν της τάξης του 60% και φάνηκε πιο ισχυρή σε σχέση με αυτή από τον παράγοντα ADP. (de Lange et al., 2007)

Οι Olas et al. το 2008 και το 2012 συνέχισαν τη μελέτη για την αντι-αιμοπεταλιακή δράση από εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού, με δύο δημοσιεύσεις. Το πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε in vitro, σε πλυμένα αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές ηλικίας 23-36 ετών, με σκοπό να διερευνηθεί η αντι-αιμοπεταλιακή δράση από εκχυλίσματα τριών φυτών, ένα εκ των οποίων ήταν το σταφύλι. Τα αιμοπετάλια τοποθετήθηκαν προς εξέταση, με ποσότητα ρεσβερατρόλης ή εκχυλίσματος σπόρου σταφυλιού και παράγοντα ενεργοποίησής τους την θρομβίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κάθε περίπτωση προκαλούνταν αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με πιο ισχυρή αναστολή να προκαλείται από το εκχύλισμα του σπόρου του σταφυλιού σε συγκέντρωση 50 μg/ml. (Olas et al., 2008)

Η δεύτερη δημοσίευση των Olas et al. αναφέρεται σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε επίσης in vitro, με την απομόνωση του PRP και των αιμοπεταλίων από 5 υγιείς εθελοντές, ηλικίας 26 ετών. Όμοια με το προηγούμενο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από σπόρους σταφυλιού και ρεσβερατρόλη. Επίσης, οι παράγοντες TRAP και θρομβίνη σε ποσότητα 6μl, προστέθηκαν ως ενεργοποιητές της συσσώρευσης. Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος, το εκχύλισμα προκαλούσε μεγαλύτερη αναστολή στη συσσώρευση που είχε προκληθεί από τη θρομβίνη. (Olas et al., 2012)

Οι Bijak et al. το 2011 μελέτησαν τις αντι-πηκτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων σπόρου σταφυλιού, αναμειγνύοντάς τα με το ανθρώπινο πλάσμα και την θρομβίνη in vitro. Συμμετείχαν 16 υγιείς εθελοντές ηλικίας 23-32 ετών, προς παραλαβή του PRP, το οποίο στην συνέχεια επωάστηκε με εκχύλισμα σπόρου του σταφυλιού σε συγκεντρώσεις 0,5, 5 και 50 μg/ml. Τα αποτελέσματα έδειξαν παράταση του χρόνου πήξης που προκαλούνταν από τα εκχυλίσματα με συγκεντρώσεις 5 και 50 μg/ml. (Bijak et al., 2011)

Σε συνέχεια του παραπάνω πειράματος, οι ερευνητές μελέτησαν in vitro την αντιθρομβωτική δράση από εκχυλίσματα πολυφαινολών από το σπόρο του σταφυλιού. Για την παραλαβή του PRP συμμετείχαν υγιείς εθελοντές και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα αιμοπετάλια (bovine serum albumin Sepharose 2B gel filtration), ενώ ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η θρομβίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε κάθε περίπτωση (0,5,5,50 μg/ml), δηλαδή μείωση της ικανότητας της θρομβίνης να προκαλεί συσσώρευση και μάλιστα, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της θρομβίνης με το εκχύλισμα οδήγησε σε αλλαγή της ικανότητάς της να προκαλεί πολυμερισμό του ινωδογόνου, με πλήρη αναστολή της ιδιότητας αυτής στην μέγιστη συγκέντρωση πολυφαινολών/mL εκχυλίσματος. (Bijak et al., 2013)

Δύο χρόνια αργότερα (2013), οι Jin et al., εξέτασαν in vitro την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλούν τα εκχυλίσματα από δύο είδη σταφυλιού, το MBA (Bailey x Muscat Humburg, hybrid) και το Vitis Vinifera, που καλλιεργήθηκαν σε πειραματικό αμπελώνα. Αιμοληψία πραγματοποιήθηκε σε υγιείς εθελοντές και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των πλυμένων αιμοπεταλίων, ενώ το κολλαγόνο και το πεπτίδιο TRAP αποτέλεσαν τους κύριους αγωνιστές των αιμοπεταλίων στην προσπάθεια αυτή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 10 μg/mL MBA ή VV ήταν ικανό να προκαλέσει 50% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι των παραγόντων TRAP και κολλαγόνο. (Jin et al., 2014)

Συμπερασματικά, επιστήμονες υποστηρίζουν ότι πιθανόν κι άλλοι παράγοντες να διαθέτουν αντιθρομβωτική δράση, ωστόσο μένουν ακόμα πολλές έρευνες να γίνουν. Οι ήδη υπάρχουσες μελέτες συμφωνούν στην ύπαρξη ευεργετικών ιδιοτήτων στα εκχυλίσματα των σταφυλιών, μιας και διαθέτουν πλούσιο περιεχόμενο σε πολυφαινόλες. Μάλιστα, αναμένεται να ενταχθούν σε συμπληρώματα διατροφής, με στόχο την παρεμπόδιση των σταδίων της θρόμβωσης. Τέλος, η περαιτέρω μελέτη σχετικά με την άμεση αναστολή της θρομβίνης από τα φλαβονοειδή, ίσως βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων, βιοδιαθέσιμων από του στόματος αναστολέων θρομβίνης, που πιθανόν να αποτελέσουν μία εναλλακτική των ανταγωνιστών της βιταμίνης Κ. (Bijak et al., 2013)

Πίνακας 3.1 Μελέτες για την αντι-αιμοπεταλιακή δράση των υποπροϊόντων οινοποιίας in vitro

Εκχύλισμα Υποπροϊόντος	**Ποσότητες Εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν-Περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες**	**Δείγμα**	**Παράγοντας πρόκλησης συσσώρευσης αιμοπεταλίων**	**Αποτελέσματα**
Εκχύλισμα σπόρου και Εκχύλισμα φλοιού (Choleva et al., 2019)	Ποσότητα 150μg εκχυλίσματος Φαινολικά συστατικά: 8,79 ± 1,17μg GAE/mg fw στεμφύλων	Υγιείς εθελοντές και εθελοντής με καρδιαγγειακό νόσημα PRP	PAF (0.02×10^{-4} M) ADP (0,1mM) TRAP (0,005mM)	Τα αιθανολικά εκχυλίσματα είχαν την πιο ισχυρή επίδραση στα αιμοπετάλια, με μεγαλύτερη αναστολή να προκαλείται από το εκχύλισμα, παρουσία του παράγοντα PAF, ύστερα ADP και τέλος, TRAP. Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων βρέθηκε και σε εθελοντή με καρδιαγγειακό νόσημα.
Εκχύλισμα σπόρου **(GSD)** και Εκχύλισμα φλοιού **(GSK)** (Shanmuganayagam et al., 2002)	α)GSD (50 mg/L), β)GSK (250 mg/L), γ)GSD (50 mg/L) +GSK (250 mg/L), δ)GSD (100 mg/L), ε)GSK (500 mg/L), στ)GSD (100 mg/L) +GSK (500 mg/L)	Δείγμα από 8 υγιείς εθελοντές (20-63 ετών) Πάρθηκαν: 18 mL αίματος από κάθε άτομο	Κολλαγόνο 2 mg/L	α, β: Καμία επιρροή δ → Μέτρια επιρροή γ, στ: Αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων: 40,5 ± 10,1% (P<0,005) και 96,5 ± 3,1% (P<0,001), αντίστοιχα
Εκχύλισμα σπόρου **(GSD)** και Εκχύλισμα φλοιού **(GSK)** (Vitseva et al., 2005)	-Εκχύλισμα σπόρου 50 mg/L, 100 mg/L -Εκχύλισμα φλοιού 250 mg/L, 500 mg/L	Πλυμένα αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές ($2,5x10^5$/mL)	20 μM TRAP	Μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από 68.8 ± 19.8% σε 45 ± 3.6% για το GSD και σε 27 ± 7.2% για το GSK. Άρα: 64% Αναστολή (500mg/L GSD) 35% Αναστολή (100mg/L GSK) Επιπλέον, 78% Αναστολή (500mg/L GSD + 100mg/L GSK)

Εκχύλισμα πολυφαινολών σταφυλιού**(PGE)** (Lange et al., 2004)	Περιεχόμενο σε: -Πολυφαινόλες 50 ± 3% (FC) -Ανθοκυανιδίνες 3-4%	Δείγμα αίματος από 95 υγιείς εθελοντές	Ινωδογόνο και κολλαγόνο τύπου III	Το κόκκινο κρασί και το εκχύλισμα των πολυφαινολών από το σταφύλι εμποδίζουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο, ενώ κανένα από αυτά δεν σχετίζεται με την προσκόλληση στο κολλαγόνο.
Εκχύλισμα πολυφαινολών σταφυλιού **(PGE)** (de Lange et al., 2007)	Περιεχόμενο σε: -Πολυφαινόλες 50 ± 3% FC -Ανθοκυανιδίνες 3-4%	Δείγμα αίματος από 95 υγιείς εθελοντές	5 μM TRAP 5 μM ADP	Συγκεντρώσεις >20 μg/mL PGE αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Πιο ισχυρή βρέθηκε η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται έναντι του παράγοντα TRAP (50 μg/mL → 60% αναστολή).
Εκχύλισμα σπόρου σταφυλιού (Olas et al., 2008)	Εκχύλισμα 5–50 μg/ml Ρεσβερατρόλη: 50–100 mg ρεσβερατρόλης/mg ξηρού βάρους σπόρου	Δείγμα από υγιείς εθελοντές (23-36 ετών) Πλυμένα αιμοπετάλια ($3x10^8$ αιμοπ./ml)	20 μl Θρομβίνης (4 U/ml)	Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έως 70%, προκαλούμενη από το εκχύλισμα του σπόρου του σταφυλιού με συγκέντρωση 50μg/ml. IC_{50}= 24 μg/ml
Εκχύλισμα σπόρου (Olas et al., 2012)	Εκχύλισμα : 1,25-50μg/ml Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά: 500 mg/g εκχυλίσματος	Δείγμα από 5 υγιείς εθελοντές (Μ.Ο ηλικίας 26 ετών) Πλυμένα αιμοπετάλια ($3x10^7$/mL)	6 μl Θρομβίνη (10 U/ml) και TRAP (20 μM)	Αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε κάθε περίπτωση, με μεγαλύτερη αναστολή στη συσσώρευση που είχε προκληθεί από τη θρομβίνη. IC_{50}=50μg/mL (TRAP) IC_{50}=25μg/mL (θρομβίνη)
Εκχύλισμα σπόρου (Bijak et al., 2011)	Εκχύλισμα 0.5, 5, 50 μg/mL Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά: 409.97 ± 7.08 mg/g	Δείγμα από 16 υγιείς εθελοντές σε κατάσταση νηστείας-PRP (20-32 ετών)	Θρομβίνη	Αύξηση του χρόνου δημιουργίας θρόμβου. Αντι-πηκτικές ιδιότητες.

Εκχύλισμα σπόρου (Bijak et al., 2013)	Εκχύλισμα 0.5, 5, 50 μg/mL	Αιμοπετάλια απομονωμένα, αιώρημα 1.5 x 10^5/mL	Θρομβίνη 0.75 U/mL	Μείωση της ικανότητας της θρομβίνης να προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, με δοσο-εξαρτώμενη σχέση. IC_{50}=5μg/mL Αναστολή της πρωτεολυτικής δράσης της θρομβίνης.
Εκχύλισμα σπόρου (Jin et al., 2014)	Εκχύλισμα 10 μg/ml -Ρεσβερατρόλη, Κερκετίνη (50 μg/mL)	Δείγμα αίματος από υγιείς εθελοντές. Πλυμένα αιμοπετάλια (2 x 10^8/mL)	TRAP Κολλαγόνο (20 μg/mL)	10μg/ml εκχυλίσματος προκάλεσαν 50% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι των παραγόντων TRAP και κολλαγόνο.

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο : ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν πιστοποιήσει τις in vitro αντι-αιμοπεταλιακές ιδιότητες, σε αιμοπετάλια υγιών εθελοντών, ενός συγκεκριμένου εκχυλίσματος που προέρχεται από υποπροϊόντα οινοποιίας ερυθρών ποικιλιών. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να υιοθετηθούν και σε αιμοπετάλια παθολογικού πληθυσμού. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η εξέταση της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης του ίδιου εκχυλίσματος από υποπροϊόντα οινοποιίας σε αιμοπετάλια από παθολογικές καταστάσεις (σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία), με στόχο τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για την ικανότητά του να δρα και σε επιβαρυμένους πληθυσμούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Δείγματα υποπροϊόντων

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υποπροϊόντα από ερυθρές ποικιλίες. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με αιθανολικό διάλυμα επαρκούς ποσότητας από τα υποπροϊόντα οινοποίησης σε βιομηχανική κλίμακα με χρήση του εξοπλισμού της εταιρείας Cretan HerbalChem A.E. (www.cretanherbalchem.com), που είναι πιστοποιημένη με EN ISO 9001:2008 και EN ISO 2200:2005 (HACCP).

5.2. Ποσοτικοί προσδιορισμοί εκχυλίσματος

5.2.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC)

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα FC
- Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1mg/mL: Ζυγίζονται 0,005g γαλλικό οξύ και προστίθενται σε 5,5mL αιθανόλη
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% w/v: Ζυγίζονται 35g Na_2CO_3 και διαλύονται σε 100mL νερό
- Διαλύματα εκχυλισμάτων: Πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων σε διάλυμα απόλυτης αιθανόλης

Αρχή της μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου FC οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά οξέα του αντιδραστηρίου ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μίγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου με μπλε χρώμα, το οποίο φωτομετρείται στα 725nm.

Αναλυτική πορεία

- Τοποθετούνται σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες Σ1 – Σ6 κατάλληλες ποσότητες διαλύματος γαλλικού οξέος (2, 5, 25, 30, 45, 60μL αντίστοιχα).
- Τοποθετούνται σε άλλα σωληνάκια κατάλληλες ποσότητες δείγματος.
- Άλλος ένας δοκιμαστικός σωλήνας Τ (με προσθήκη DMSO) χρησιμοποιείται ως τυφλό διάλυμα.
- Πραγματοποιείται εξάτμιση διαλυτών μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου στους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες ποσότητα 3500μL νερού και 100μL διαλύματος FC.
- Πραγματοποιείται ανάδευση με Vortex.
- Ύστερα από παραμονή 3min προστίθενται 400μL Na_2CO_3 35% w/v και πραγματοποιείται ξανά ανάδευση.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται 1 ώρα για επώαση σε σκοτεινό μέρος.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται 200μL από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα σε ένα plate και πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 725nm.
- Τέλος, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς απορρόφηση – μg γαλλικού οξέος. Στην εξίσωση της καμπύλης εισάγονται οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων και υπολογίζεται η ποσότητα των φαινολικών συστατικών τους. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μg γαλλικού οξέος/mg εκχυλίσματος υποπροϊόντων.

5.2.2 Προσδιορισμός ορθοφαινολικών συστατικών (Arranz et al., 2008)

Όργανα- Αναλώσιμα:

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

Στερεά Αντιδραστήρια:

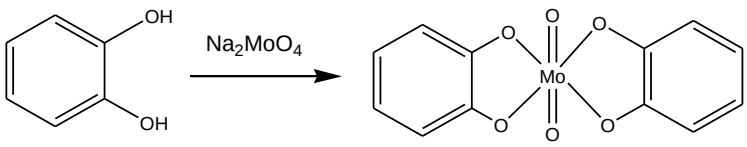
- Κερκετίνη
- Ένυδρο Μολυβδαινικό Νάτριο (Na_2MoO_4 x $2H_2O$)

Διαλύματα:

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

Αρχή μεθόδου:

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



Το σύμπλοκο αυτό έχει μέγιστη απορρόφηση στα 370nm.

Αναλυτική πορεία:

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 100μl αιθανόλης και 1150μl διαλύματος $Na_2MoO_4x2H_2O$ 1,087% w/v και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Μετά από παραμονή 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα φωτομετρείται στα 370nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός, καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα κερκετίνης, συγκέντρωσης από 5 έως 80 μM. Κατασκευάζεται τέλος η καμπύλη

αναφοράς, σύμφωνα με την οποία προσδιορίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε ορθο-φαινολικές ενώσεις.

5.2.3 Προσδιορισμός σακχάρων (Fisher et al., 1955)

Όργανα:

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

Αντιδραστήρια:

- Ορκινόλη (5-μεθυλορεσορκινόλη, 3,5-διυδροξυ-τολουόλιο)
- Γλυκόζη

Διαλύματα

- Διάλυμα Ορκινόλης 2mg/ml σε πυκνό θειικό οξύ (70%): Ζυγίζονται 0,2290g ένυδρης ορκινόλης (orcinol x H2O) σε ογκομετρική φιάλη και προστίθενται 100ml πυκνού H_2SO_4. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη.
- Διάλυμα Γλυκόζης 1,5mg/ml σε H_2O

Αρχή μεθόδου:

Οι εξόζες με την επίδραση του πυκνού H_2SO_4 σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη, που με την ορκινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 505nm. Η προσθήκη πυκνού H_2SO_4 έχει επίσης σαν αποτέλεσμα και την υδρόλυση των παραγώγων των εξοζών.

Αναλυτική πορεία:

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 1000μl H_2O και 2000μl διαλύματος ορκινόλης 2mg/ml και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Μετά από παραμονή 20 λεπτών σε θερμοκρασία 80 ^oC και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα φωτομετρείται στα 505nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός, καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, που περιέχουν από 10 έως 100g γλυκόζης,

οπότε κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς. Έτσι, με βάση αυτή προσδιορίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε σάκχαρα.

5.2.4 Προσδιορισμός Φωσφόρου (Duck-Chong, 1979)

Όργανα-Αναλώσιμα

- Φωτόμετρο
- Γυάλινοι πυρήμαχοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10ml
- Κυψελίδες φωτομέτρου (micro)

Αντιδραστήρια

- $Mg(NO_3)_2.6H_2O$
- $(NH_4)_6MoO_{27}.4H_2O$
- Πράσινος μαλαχίτης
- KH_2PO_4
- Triton X-100

Διαλύματα

- Διάλυμα $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ 10%w/v σε MeOH: Ζυγίζονται 0,5g $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ και προστίθενται 5ml MeOH.
- Διάλυμα HCl 4,5N: Λαμβάνονται 22,5ml διαλύματος HCl 6N και προστίθενται σε 7,5ml H_2O (188 ml π.HCl+312 ml H_2O).
- Διάλυμα HCl 1N: Αραίωση 1:6 του διαλύματος HCl 6N (42 ml π. HCl + 458mL H_2O).
- Διάλυμα $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 4,2%w/v σε HCl 4,5N: Ζυγίζονται 1,05 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ και διαλύονται σε 25ml HCl 4,5N.
- Διάλυμα Malachite Green 0,3%w/v σε H_2O: Ζυγίζονται 0,300 g Malachite Green και διαλύονται σε 100ml H_2O.
- Διάλυμα Χρωστικής: Λαμβάνονται 25ml διαλύματος $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2$ και 75ml διαλύματος μαλαχίτη. Το διάλυμα παραμένει για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα διηθείται. Διατηρείται για 3-5 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα KH_2PO_4 0,5μg/ml σε HCl 1N: Πριν τη ζύγιση, το KH_2PO_4 παραμένει για 1 ώρα στους 105^oC. Ζυγίζονται 0,0220 g KH_2PO_4 και διαλύονται σε 10ml HCl 1N. Το διάλυμα

περιέχει 0,5mg ανόργανου P/ml. Το διάλυμα αυτό αραιώνεται 1:1000 για να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση 0,5μg/ml.

- Διάλυμα Triton X-100 1%w/v σε H_2O: Λαμβάνονται 46,5 μL Triton X-100 (d=1,07g.ml) και διαλύονται σε 4953,5μL H_2O.

Αναλυτική Πορεία

- Η ποσότητα προς ανάλυση δείγματος εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2, σε γυάλινους σωλήνες. Για την καμπύλη αναφοράς, η παρακάτω διαδικασία ακολουθείται με άδειους δοκιμαστικούς σωλήνες. Προστίθενται 30μl διαλύματος $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ 10%w/v. Θερμαίνονται στους 85-100^oC σε υδρόλουτρο μέχρι πλήρους εξάτμισης. Έπειτα θερμαίνονται στην κορυφή φλόγας λύχνου Bunsen για 15 sec και στη συνέχεια για επιπλέον 10sec στο εσωτερικό της φλόγας. Η διαδικασία αυτή γίνεται στον απαγωγό, λόγω έκλυσης NO_2.
- Στην συνέχεια, αφού έχει επιτευχθεί ψύξη στον απαγωγό, στους σωλήνες που προορίζονται για καμπύλη αναφοράς, προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες πρότυπου διαλύματος KH_2PO_4 0,5μg/ml, για την καμπύλη αναφοράς: 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.4, 0.5 μg, και HCl 1N μέχρι τελικού όγκου 1ml, ενώ στα δείγματα προστίθεται 1ml HCl 1N. Τα διαλύματα θερμαίνονται για 15min στους 90-95^oC σε υδρόλουτρο και στη συνέχεια ψύχονται. Προστίθενται 30μl διαλύματος Triton X-100 1%w/v, για σταθεροποίηση του χρώματος.
- Τέλος, προστίθενται 2ml διαλύματος χρωστικής και αναδεύονται ισχυρά. Οι σωλήνες στη συνέχεια παραμένουν για 35min σε θερμοκρασία δωματίου και το χρώμα παραμένει σταθερό για 40 min μετά την προσθήκη της χρωστικής. Φωτομετρούνται στα 650 nm και σημειώνονται οι τιμές της απορρόφησης.

Πίνακας 5.1 Πορεία πειράματος προσδιορισμού φωσφόρου

	T	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**Δ**
	Εξάτμιση μέχρι ξηρού						
Mg(NO3)2.6H2O 10%w/v	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL	**30 μL**
	Θέρμανση 85-100^oC μέχρι πλήρους εξάτμισης						
	Θέρμανση σε λύχνο Bunsen						
KH_2PO4 0,5μg/mL	0	100 μL	200 μL	500 μL	800 μL	1000 μL	**0 μL**
HCl 1N	1000 μL	900 μL	800 μL	500 μL	200 μL	0 μL	**1000 μL**
	Θέρμανση 90-95 ^oC, 15 min						
	Ψύξη						
Triton X-100 1%	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL	**30 μL**
Χρωστική	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL	2000 μL	**2000 μL**
	35 min, Θ δωμ.						
	A650 nm						

5.3 Προσδιορισμός της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων των υ-ποπροϊόντων

5.3.1 Πλυμένα αιμοπετάλια

Αντιδραστήρια

- Απυράση (Apyrase) (stock): 200U/mL, 25μL. Η απυράση είναι μία φωσφατάση, η οποία μετατρέπει το απελευθερωμένο από τα αιμοπετάλια ADP σε ανενεργό AMP σύμφωνα με την αντίδραση : ATP -> ADP + Pi -> AMP + 2Pi
- Προσταγλανδίνη Ε1 (PGE1) (stock): 1mM, 25μL. Η PGE1 ενεργοποιεί την AC οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων του cAMP και στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμο-πεταλίων.
- ACD αντιπηκτικό: Ζυγίζονται 2,4977g κιτρικού οξέος (130mM, *C14*, Mr=192,13g/mol), 0,3706g διένυδρο κιτρικό οξύ (12,6mM, *S1*, Mr=294,1g/mol), 1,9818g γλυκόζη (110mM, *G1*, Mr=180,16g/mol), 0.1 U/ml απυράση και 0.1 μM PGE1 σε 100mL απεσταγμένο νερό.
- Buffer 2 pH=6,5: Ζυγίζονται 0,613g NaCl (103mM, *S3*, Mr=58,44g/mol), 0,0373g KCl (5mM, *P3*, Mr=74,55g/mol), 0,0901g γλυκόζης (5mM), 0,6917g κιτρικού οξέος (36mM), 0,0222g $CaCl_2$ (2mM, Mr=110,984g/mol), 0,0203g $MgCl_2$ (1mM, *M6*, Mr=203,31g/mol), 0.015 U/ml απυράση και 0.1 μM PGE1 σε 100mL απεσταγμένο νερό.
- Buffer 3 pH=7,35: Ζυγίζονται 0,8182g NaCl (140mM), 0,0224g KCl (3mM), 0,1802g γλυκό-ζης (10mM), 0,0102g $MgCl_2$ (0,5mM), 0,2383g HEPES (10mM, *H4*, Mr=238,3g/mol). Η πα-ρασκευή του πρέπει να γίνει την ημέρα του πειράματος. Για το λόγο αυτό παρασκευάζεται διάλυμα με τις παραπάνω ποσότητες σε τελικό όγκο 50mL. Για 20mL buffer 3 ζυγίζονται 0,0084g ανθρακικού νατρίου $NaHCO_3$ και αναδιαλύονται σε 10mL του έτοιμου δ/τος. Το pH ρυθμίζεται στο 7,35 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 20mL με απε-σταγμένο νερό.
- Buffer αναδιασποράς αιμοπεταλίων: 10mL Buffer 3 + 0,0084 g $NaHCO_3$ + 9 mL νερό → ρύθμιση pH=7,35 (με ½ σταγόνα NaOH 1N) => τελικός όγκος 20mL
- Διάλυμα $CaCl_2$ (12,5mM): 69,25mg + νερό => 50mL
- Buffer $CaCl_2$ (1,25mM): 10mL Buffer 3 + 0,0084g $NaHCO_3$ + 2mL $CaCl_2$ + 7 mL νερό → ρύθμιση pH=7,35 (με ½ σταγόνα NaOH 1N) => τελικό όγκος 20mL

Αναλυτική πορεία

- Παραλαβή 9mL αίματος σε πλαστικό σωλήνα των 10mL με 1mL ACD, 5μL stock apyrase και 1μL stock PGE1
- Πραγματοποιείται η πρώτη φυγοκέντρηση στα 126g για 15min χωρίς φρένο
- Μεταφορά με tip προσεκτικά του PRP, σε πλαστικό σωλήνα και μέτρηση του όγκου
- Για κάθε 2 σωλήνες αίματος 10mL συμπληρώνεται ο όγκος με buffer 2 pH=6,5, 0,75μL stock apyrase και 1μL stock PGE1 έως τα 10mL
- Πραγματοποιείται η δεύτερη φυγοκέντρηση στα 975g για 12min χωρίς φρένο
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αναδιασπείρεται σε 10mL buffer 2 pH=6,5, 0,75μL stock apyrase και 1μL stock PGE1
- Πραγματοποιείται η τρίτη φυγοκέντρηση στα 975g για 12min χωρίς φρένο
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αναδιασπείρεται σε 0,5mL buffer 3 pH=7,35
- Μέτρηση αιμοπεταλίων:
    - Μεταφορά σε κυψελίδα του 1mL: 990μL buffer 3 + 10μL αιωρήματος αιμοπεταλίων
    - Μέτρηση απορρόφησης στα 530nm (+μηδενισμός με buffer 3)
    - Ο αριθμός των κυττάρων στα 10μL δίνεται από τον τύπο:
      κύτταρα/10 μL = A x 1.25 x 10^8 , όπου A είναι η απορρόφηση
    - Υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός με βάση τον όγκο
    - Προστίθεται κατάλληλος όγκος buffer 3 ώστε να έχω 12,5 x 10^8 κύτταρα/mL
- Στην κιουβέτα τοποθετούνται 50μL αιμοπεταλίων και 200μL Buffer $CaCl_2$ (τελική συγκέντρωση $CaCl_2$ → 1mM, τελική συγκέντρωση → 2,5 x 10^8 κύτταρα/mL).

5.3.2 Παραλαβή PRP από εθελοντές

- Οι εθελοντές προκειμένου να γίνει η αιμοληψία χρειάστηκε να παρουσιαστούν στη Μεταβολική Μονάδα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου την ημέρα του πειράματος στις 9-10 π.μ. μετά από 9ωρη νηστεία. Φαινομενικά ήταν όλοι υγιείς και χωρίς να έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή με αντι-αιμοπεταλιακή δράση τις τελευταίες 20 ημέρες.
- Ξεκινώντας την διαδικασία, το αίμα (56mL συνολικά) λαμβάνεται σε 4 πλαστικά σωληνάκια των 15mL που περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (AC, anticoagulant citrate) σε αναλογία αίμα/αντιπηκτικό 10/1 (12,6mL αίμα + 1,4 mL AC) και αναδεύεται προσεκτικά.
- Πραγματοποιείται η πρώτη φυγοκέντρηση στα 140g ή 1300rpm για 12min στους 20°C χωρίς φρένο, ώστε να παραληφθεί το υπερκείμενο (Platelet-rich plasma, PRP) σε πλαστικό σωλήνα.
- Πραγματοποιείται η δεύτερη φυγοκέντρηση στα 1500g ή 3000rpm για 15min στους 20°C με φρένο, ώστε να παραληφθεί το υπερκείμενο (Platelet-poor plasma, PPP) σε πλαστικό σωλήνα.
- Ο αριθμός των αιμοπεταλίων υπολογίζεται ως εξής: Μετρείται η απορρόφηση 1mL PRP στα 530nm στο φωτόμετρο. Απορρόφηση ίση με 0,8 αντιστοιχεί σε 500.000 αιμοπετάλια/μL (έχει πραγματοποιηθεί μέτρηση των αιμοπεταλίων με αυτόματο αναλυτή και υπολογισμός του αριθμού των αιμοπεταλίων μέσω απορρόφησης). Σε περίπτωση που η απορρόφηση είναι μεγαλύτερη από 0,8, η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται στα 500.000 αιμοπετάλια/μL με προσθήκη PPP από τον ίδιο εθελοντή σύμφωνα με τον τύπο: $A_1 \times V_1 = A_2 \times V_2$

  όπου A_1 η αρχική απορρόφηση, V_1 ο συνολικός όγκος του PRP, A_2 το 0,8 και V_2 ο αρχικός όγκος του PRP συν ο άγνωστος όγκος του PPP που θα προστεθεί.

5.3.3 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας και συσσωρευτικοί παράγοντες

Αναλυτική πορεία

- Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματόμετρου (cuvettes) των 0,5mL προστίθενται 250μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει 5 x 10^5 κύτταρα/μL και στην ειδική θέση cuvette με 1mL PPP.
- Στη συνέχεια, αφήνονται για επώαση για 10min σε θερμοστατούμενες θέσεις θερμοκρασίας 37° C.
- Στις cuvettes με το PRP τοποθετείται μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200rpm (rounds per min). Στο πρώτο κανάλι τοποθετούνται 2μL του διαλύματος αναφοράς (DMSO ή BSA). Στα επόμενα τρία κανάλια τοποθετούνται από 2μL κατάλληλων αραιώσεων των δειγμάτων, διαλυμένα είτε σε DMSO, είτε σε BSA.
- Μετά από αναμονή 5min, προστίθεται ο συσσωρευτικός παράγοντας (PAF, ADP, TRAP) ορισμένης ποσότητας και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης για 4min. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας.
- Σύμφωνα με τον τύπο:

  %Αναστολή = 100*(Ύψος αναφοράς - Ύψος δείγματος)/Ύψος αναφοράς,

  υπολογίζεται η % αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τα εκχυλίσματα.
- Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC_{50}, δηλαδή η ποσότητα (μg) εκχυλίσματος που προκαλεί το 50% της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Στόχος είναι η επίτευξη αναστολής από 20-80%.

Συσσωρευτικοί παράγοντες

- Stock διάλυμα PAF 10^{-3} M σε BSA. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες από συγκεντρώσεις μεταξύ 10^{-5} -10^{-3} M.
- Stock διάλυμα ADP 50mM σε φυσιολογικό ορό. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες από συγκεντρώσεις μεταξύ 0,05-5mM.
- Stock διάλυμα TRAP 1mM σε φυσιολογικό ορό. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες από συγκεντρώσεις μεταξύ 0,1-1mM

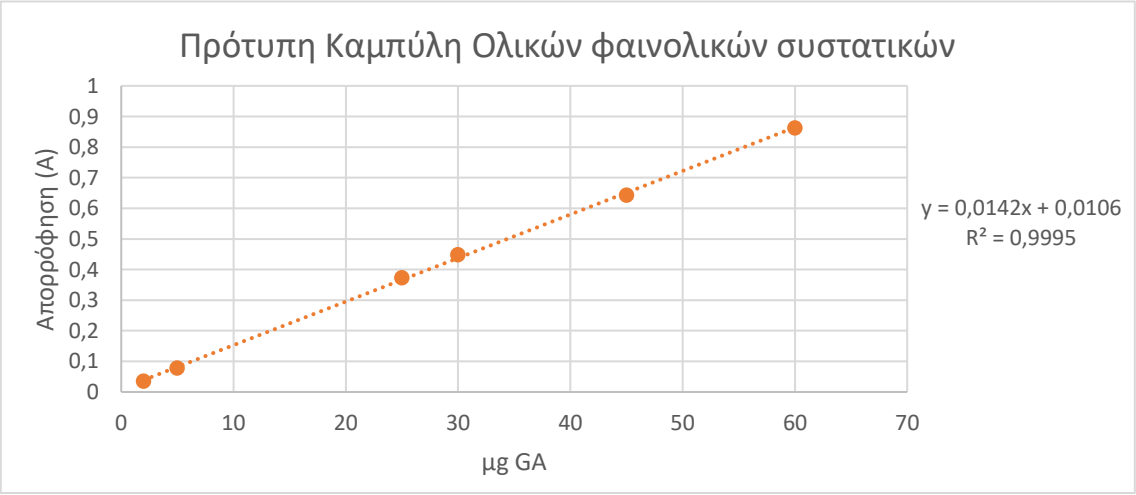
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

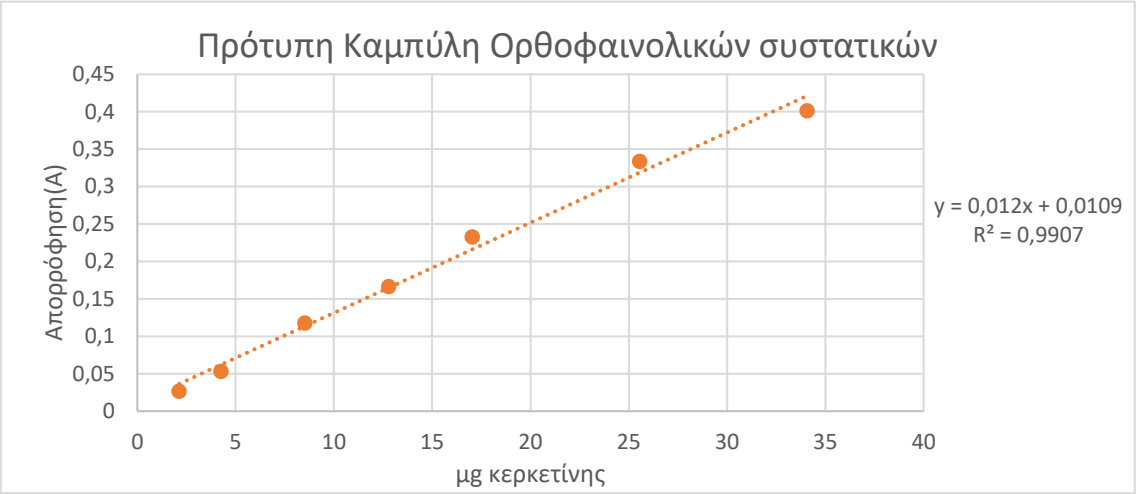
6.1 Ποσοτικοί προσδιορισμοί εκχυλίσματος

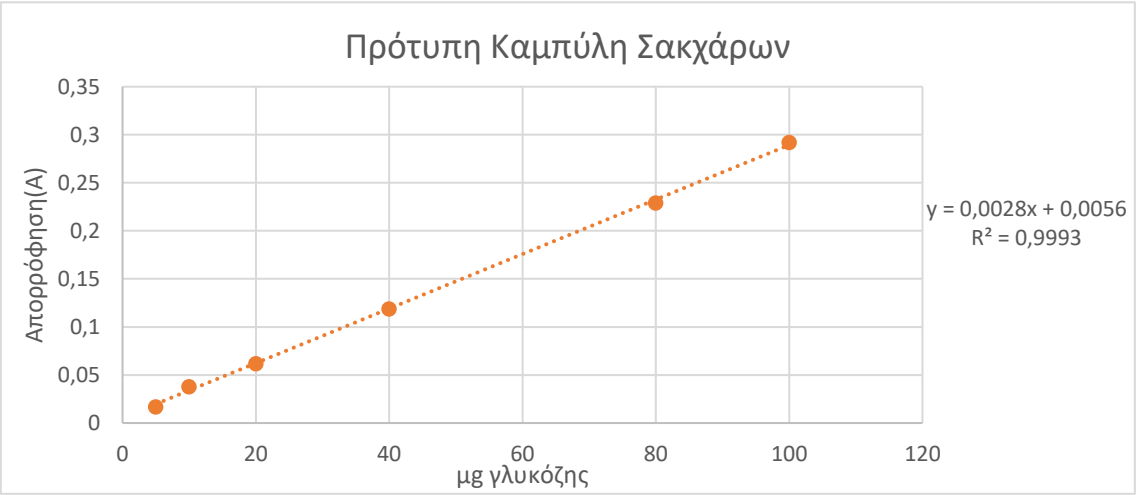
Πίνακας 6.1 Αποτελέσματα ποσοτικών προσδιορισμών στο αιθανολικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως η μέση τιμή των μετρήσεων τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ± την τυπική απόκλιση.

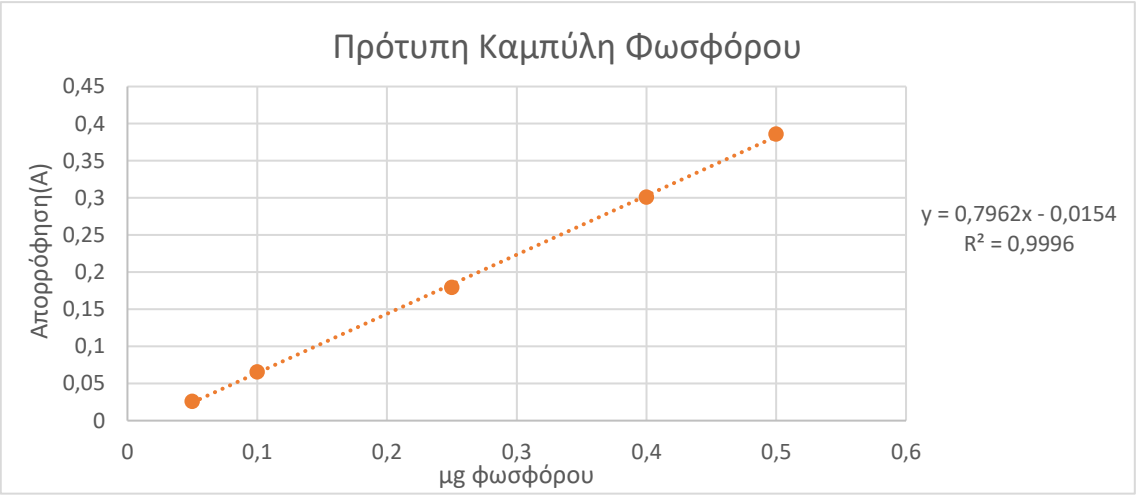
Ολικά φαινολικά συστατικά μg γαλλικού οξέος/mg εκχυλίσματος	Ορθο-φαινολικά συστατικά μg κερκετίνης/mg εκχυλίσματος	Σάκχαρα μg γλυκόζης/mg εκχυλίσματος	μg φωσφόρου/mg εκχυλίσματος
117 ± 16	31,8 ± 5,9	208 ± 34	0,62 ± 0,08

-Οι τιμές προέκυψαν από τα αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων για τον κάθε προσδιορισμό.







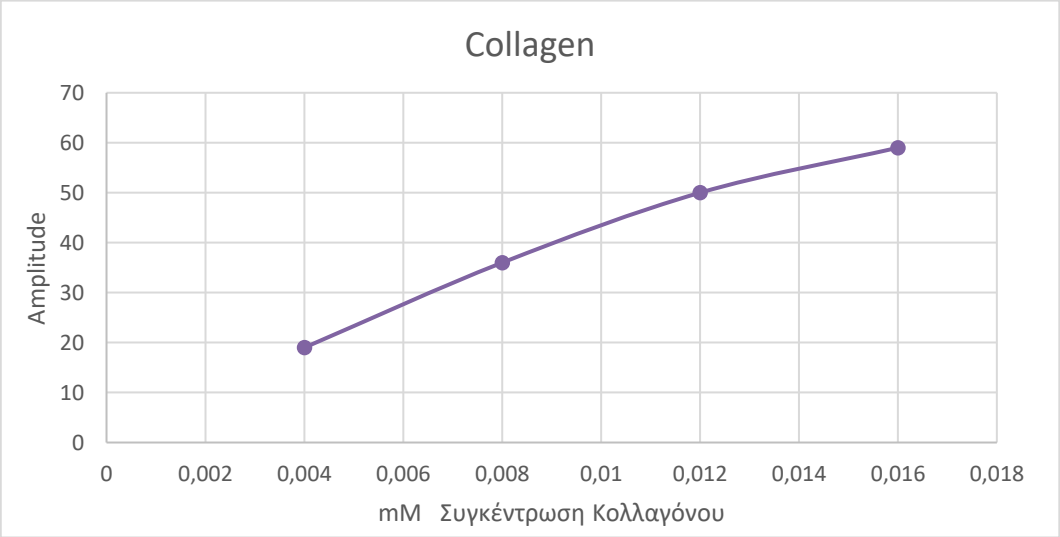


Εικόνα 6.1 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες (ολικά φαινολικά συστατικά, ορθοφαινολικά συστατικά, σάκχαρα, φώσφορος) από τον χημικό προσδιορισμό του αιθανολικού δείγματος από υποπροϊόντα οινοποιίας.

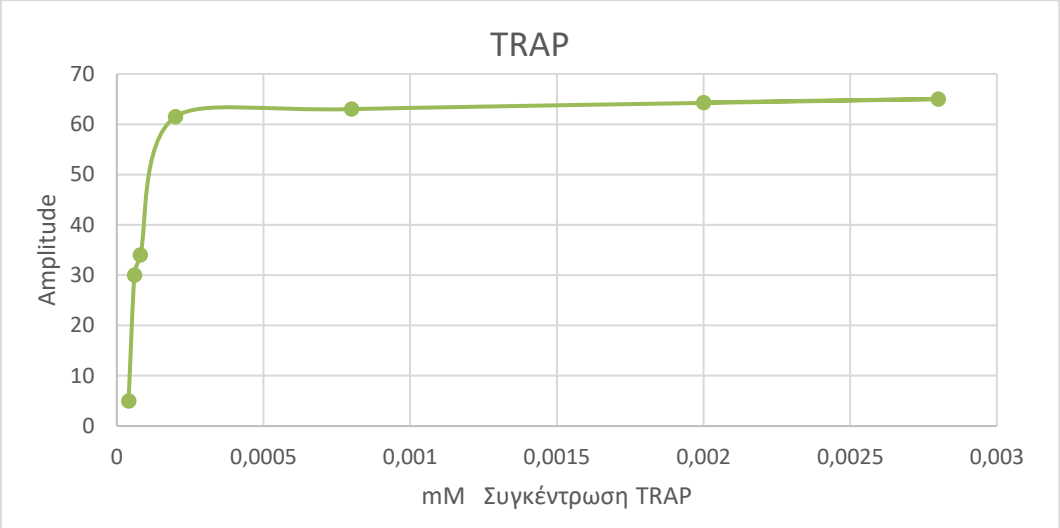
6.2 Πλυμένα αιμοπετάλια

Στο πλαίσιο της μελέτης πραγματοποιήθηκαν πρόδρομα πειράματα, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση του εκχυλίσματος σε πλυμένα αιμοπετάλια εθελοντών. Ο λόγος είναι ότι μπορεί στο PRP να υπάρχουν στο πλάσμα κάποιοι παράγοντες που να επιδρούν στην λειτουργία των αιμοπεταλίων αλλά και στη δράση του εκχυλίσματος και επιπλέον επειδή μελλοντικά θα πραγματοποιηθούν και πειράματα διερεύνησης του τρόπου δράσης του εκχυλίσματος, είναι καλύτερα να γίνουν απουσία του πλάσματος. Το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε είχε αναδιαλυθεί σε διαλύτη DMSO, ενώ για την πειραματική διαδικασία δοκιμάστηκαν δύο συσσωρευτικοί παράγοντες, ικανοί να προκαλέσουν συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων, το κολλαγόνο και ο TRAP. Στα διαγράμματα 6.1 και 6.2 φαίνονται οι καμπύλες συσσώρευσης για τους δυο συσσωρευτικούς παράγοντες.

Όσον αφορά τη δράση του εκχυλίσματος, δοκιμάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος στην συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων σε εύρος από 1-500μg. Φάνηκε ότι το συμπλήρωμα έναντι **κολλαγόνου**, σε ποσότητα ≥ 120μg παρουσίασε 100% αναστολή, σε ποσότητα 50-60μg παρουσίασε αναστολή της τάξης του 80%, ενώ σε ποσότητα 25-30μg παρουσίασε αναστολή της τάξης του 28%. Σχετικά με τη δράση του εκχυλίσματος έναντι του **TRAP**, σε ποσότητα >125μg προκαλεί επίσης 100% αναστολή, σε ποσότητα 30-100μg προκαλεί αναστολή περίπου 80%, ενώ σε ποσότητα 1-10μg, προκαλεί αναστολή 34%.

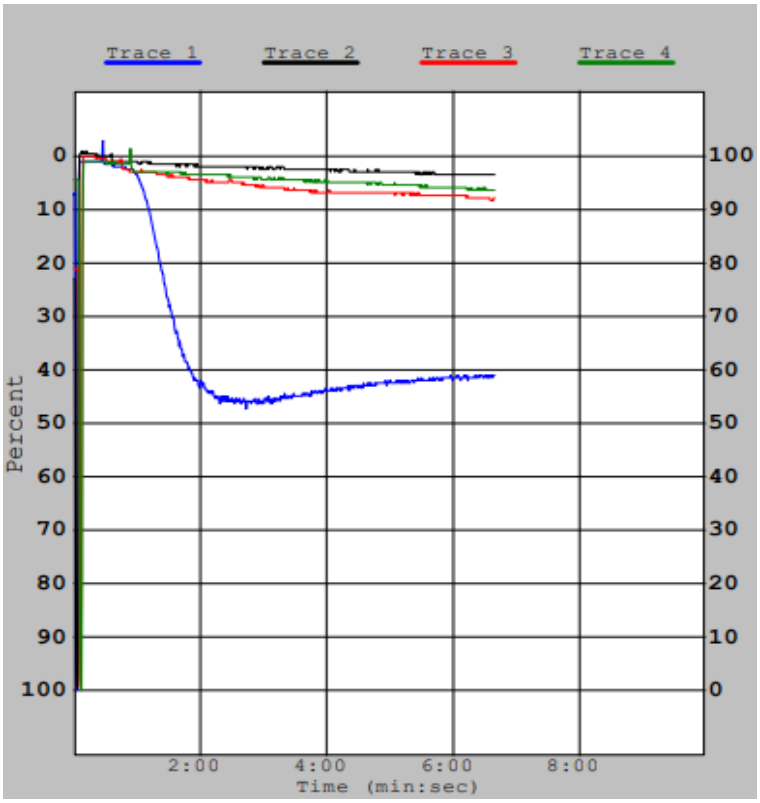


Διάγραμμα 6.1 Καμπύλη συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων έναντι κολλαγόνου.



Διάγραμμα 6.2 Καμπύλη συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων έναντι TPAP.

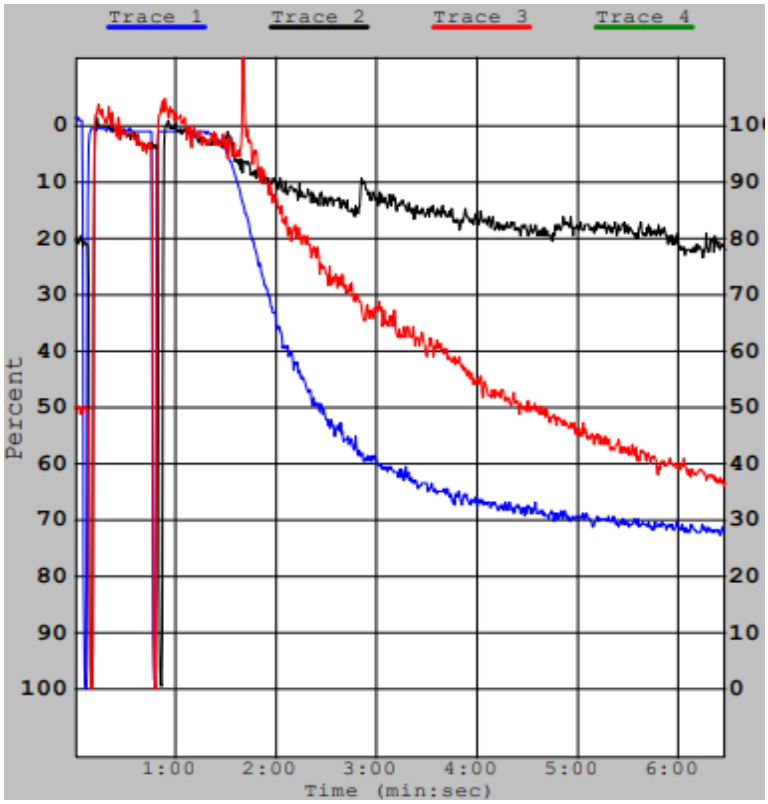
Παρακάτω παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες από το συσσωρευματόμετρο, με προσθήκη του παράγοντα κολλαγόνο και διαφόρων ποσοτήτων εκχυλίσματος, που εμφάνισαν αναστολή.



Εικόνα 6.2 Καμπύλες συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων με προσθήκη του παράγοντα κολλαγόνο (συσσωρευματόμετρο).

Στην εικόνα 6.2, η μπλε καμπύλη αναφέρεται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, απουσία εκχυλίσματος και παρουσία 7μl κολλαγόνου 0,1mg/ml, ενώ η μαύρη, κόκκινη και πράσινη καμπύλη παρουσιάζουν τη συσσώρευση, παρουσία κολλαγόνου ίδιας συγκέντρωσης και ποσότητας αλλά και εκχυλίσματος (125mg/ml), σε ποσότητες 375, 250 και 125μg αντίστοιχα.

Παρατηρούμε μικρή συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του εκχυλίσματος, άρα υπάρχει αναστολή, με την ποσότητα 250μg του εκχυλίσματος να προκαλεί μεγαλύτερη συσσώρευση (8-9%) από τα 375μg (5-6%).



Εικόνα 6.3 Καμπύλες συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων με προσθήκη του παράγοντα κολλαγόνο (συσσωρευματόμετρο).

Στην εικόνα 6.3, η μπλε καμπύλη παρουσιάζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία 5μl κολλαγόνου 1mg/ml, ενώ η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναφέρονται στη συσσώρευση, παρουσία κολλαγόνου ίδιας συγκέντρωσης και ποσότητας αλλά και εκχυλίσματος (62,5mg/ml), σε ποσότητες 62,5μg και 31,25μg. Παρατηρούμε ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων με την παρουσία μόνο του παράγοντα φτάνει στο 70%, ενώ με την παρουσία και του εκχυλίσματος φτάνει στο 19% για την ποσότητα των 62,5μg και στο 53% για τα 31,25μg εκχυλίσματος. Επομένως, μεγαλύτερη αναστολή 50% αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλίσματος, ενώ για τη μικρότερη ποσότητα η αναστολή είναι περίπου 20%.

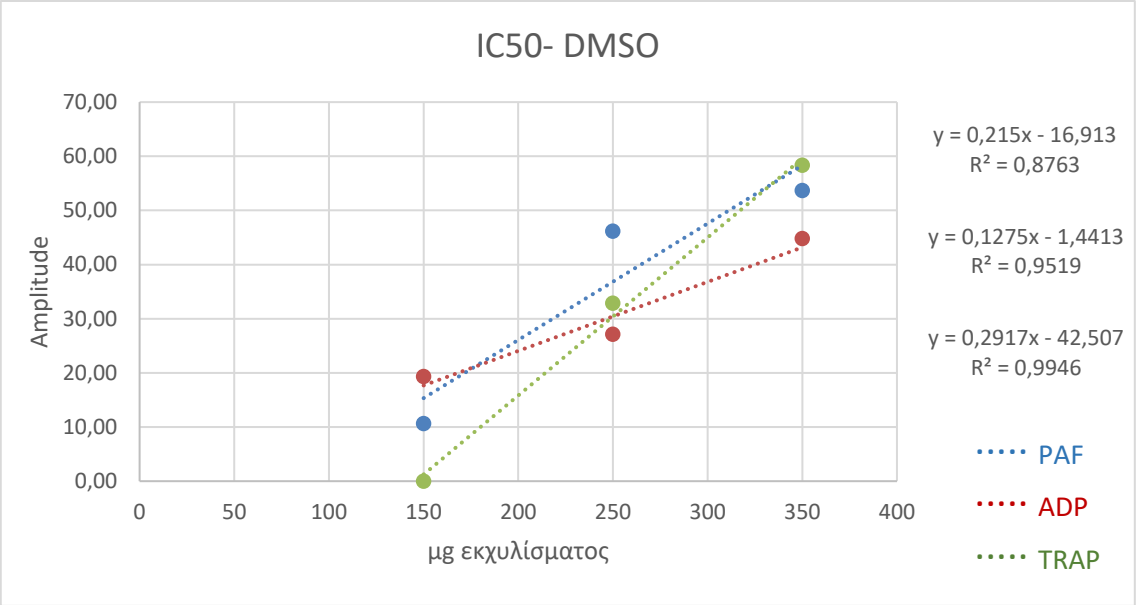
Παρόλα αυτά, φάνηκε ότι σε κάποιες ποσότητες, το εκχύλισμα προκαλεί από μόνο του συσσώρευση των αιμοπεταλίων, χωρίς την προσθήκη συσσωρευτικού παράγοντα. Όταν σταθεροποιήθηκε η ενεργοποίηση αυτή των αιμοπεταλίων, μηδενίσαμε την μέτρηση και προσθέσαμε 10μL collagen 0,1mg/ml. Και πάλι, φυσιολογικά παρατηρήσαμε συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Σαν αποτέλεσμα, η αρχική αυτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων μόνο με το εκχύλισμα, κατέστησε τη συνέχεια του πειράματος αυτού ανέφικτη.

6.3 Προσδιορισμός της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων των υποπροϊόντων οινοποιίας- PRP

6.3.1 Σύγκριση διαλύτη αναδιάλυσης του εκχυλίσματος (DMSO-BSA)

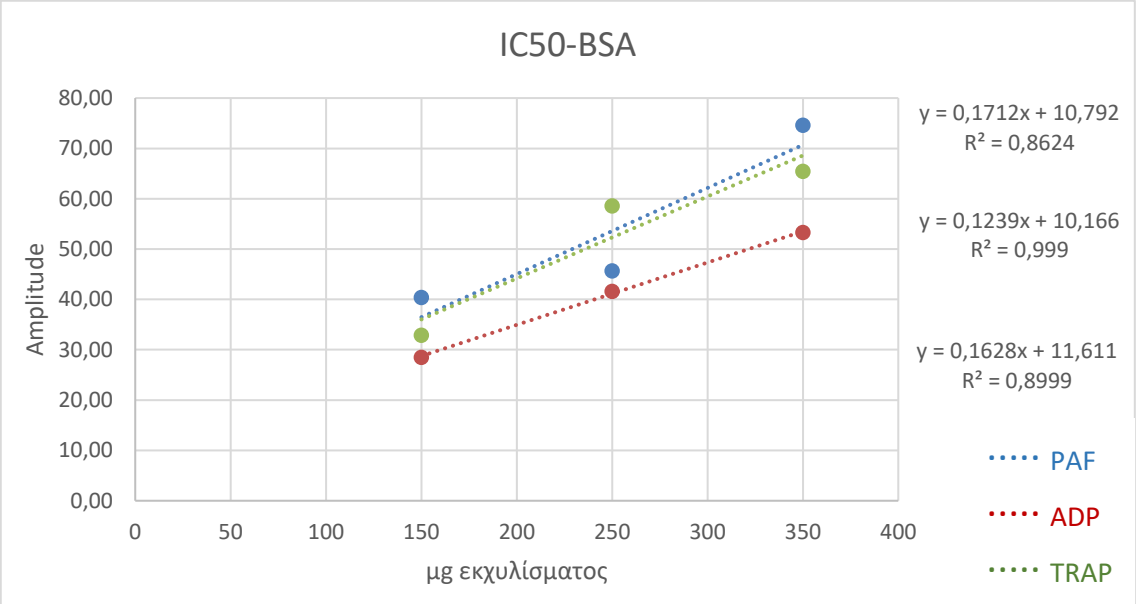
Με στόχο την εξέταση της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης του εκχυλίσματος από τα υποπροϊόντα οινοποιίας σε αιμοπετάλια από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό να επιλεχθεί ο διαλύτης αναδιάλυσης. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν δύο διαλύτες, το DMSO και η BSA. Κατασκευάστηκαν επομένως διαλύματα του εκχυλίσματος στους δυο διαλύτες και εξετάστηκε η δράση του στα αιμοπετάλια. Αξίζει να αναφερθεί ότι το DMSO εμφανίζει πολύ καλή ικανότητα διάλυσης μεγάλου εύρους συστατικών τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων, είναι όμως τοξικό για τα κύτταρα και πρέπει να χρησιμοποιείτε σε μικρές ποσότητες στο αιώρημα των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά η BSA δεν χαρακτηρίζεται από μεγάλη ικανότητα διάλυσης όλων των ενώσεων αλλά αποτελεί έναν από τους φυσικούς τρόπους μεταφοράς των λιποειδών μέσα στον οργανισμό και δεν είναι τοξική για τα κύτταρα.

Για την επιλογή του διαλύτη, έγινε σύγκριση των τιμών IC_{50} (συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί 50% αναστολή έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων), με προσθήκη των παραγόντων PAF, ADP, TRAP και διαλύτη για το εκχύλισμα το DMSO ή την BSA.



	PAF	ADP	TRAP
IC_{50}	311,2	403,5	317,1

Διάγραμμα 6.3 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP με διαλύτη το DMSO, σε PRP του υγιούς εθελοντή No1



	PAF	ADP	TRAP
IC_{50}	223,0	321,5	235,8

Διάγραμμα 6.4 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP με διαλύτη την BSA, σε PRP του υγιούς εθελοντή No1

Συγκρίνοντας τους παραπάνω τιμές των IC_{50}, παρατηρούμε ότι στον διαλύτη BSA οι τιμές είναι μικρότερες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι με διαλύτη την BSA, επιτυγχάνουμε 50% αναστολή τους συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος, σε σχέση με τον διαλύτη DMSO. Επιπλέον παράγοντας που βοήθησε να επιλέξουμε την BSA για την συνέχεια των πειραμάτων, ήταν ότι είχαμε μεγαλύτερη ευχέρεια τους χειρισμούς των ποσοτήτων, καθώς η BSA δεν είναι τοξική για τα κύτταρα, όπως αντίθετα είναι το DMSO.

6.3.2 Επίδραση εκχυλίσματος PRP σε εθελοντές

Με σκοπό να δούμε εάν το εκχύλισμα από υποπροϊόντα οινοποιίας που έχει ήδη εξεταστεί για την αντι-αιμοπεταλιακή του δράση, σε υγιή πληθυσμό σε προηγούμενη μελέτη, μπορεί να έχει παρόμοια αποτελέσματα και σε αιμοπετάλια εθελοντών με παθολογικές καταστάσεις, επιλέχθηκαν ο διαβήτης τύπου ΙΙ και η παχυσαρκία. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν μέχρι στιγμής, δύο υγιείς εθελοντές, δύο διαβητικοί, οι οποίοι ήταν και παχύσαρκοι και ένας παχύσαρκος εθελοντής με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Πίνακας 6.2 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών

	Υγιείς εθελοντές	Διαβητικοί κ' Παχύσαρκοι εθελοντές	Παχύσαρκος εθελοντής
ΗΛΙΚΙΑ	47,5 ± 3,5	53,5 ± 6,4	35
ΦΥΛΟ (Α/Γ)	1/1	2/0	0/1
BMI (kg/m^2)	25,2 ± 2	38,5 ± 9,4	36,6
ΦΑΡΜΑΚΑ	-	Glucophage 2x1000mg orizal 25x12,5 pravafenix 40mg lopresor 100gx1 competact 2x850mg	-

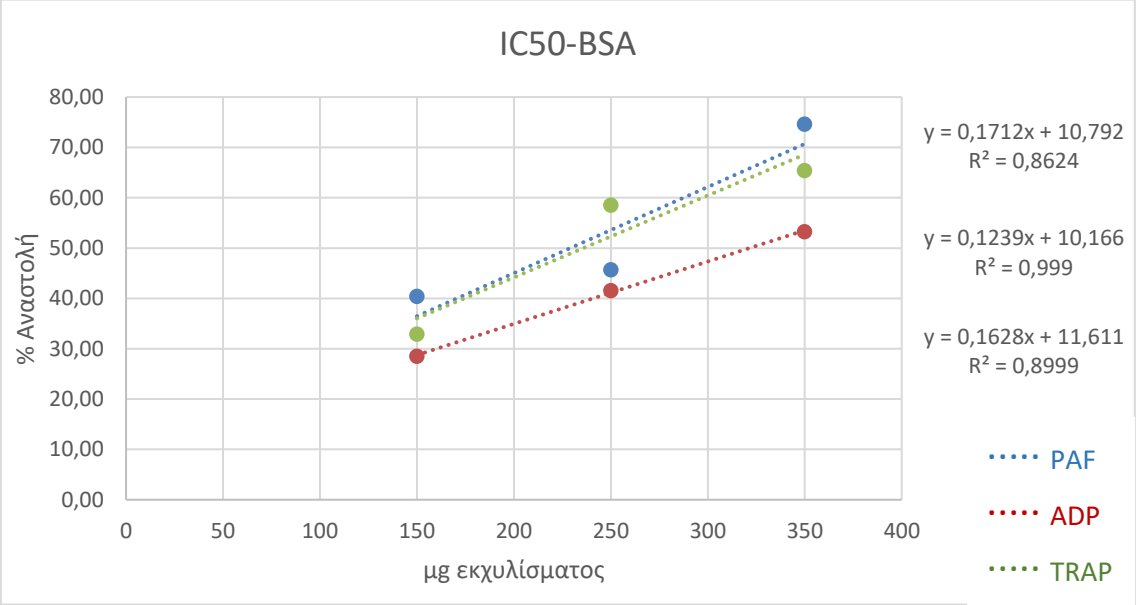
Στο πείραμα, σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε στο PRP των παραπάνω εθελοντών το IC_{50} έναντι του PAF, ADP, TRAP. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε επώαση των αιμοπεταλίων και υπολογίστηκαν οι τιμές των EC_{50} των παραγόντων, παρουσία και απουσία του εκχυλίσματος.

6.3.3 Παράθεση τιμών IC_{50}

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές και τα γραφήματα των IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP και TRAP, για τους υγιείς, τους διαβητικούς και παχύσαρκους και τον παχύσαρκο εθελοντή αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στα γραφήματα απεικονίζεται η σχέση διαφόρων ποσοτήτων εκχυλίσματος, σε συνάρτηση με το ποσοστό (%) της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκλήθηκε. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα του εκχυλίσματος σε μg, τόσο αυξάνεται η % αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται. Με βάση λοιπόν, την εξίσωση της κάθε ευθείας, υπολογίζουμε την τιμή IC_{50} έναντι των παραγόντων ενεργοποίησης για κάθε εθελοντή.

Υγιείς Εθελοντές

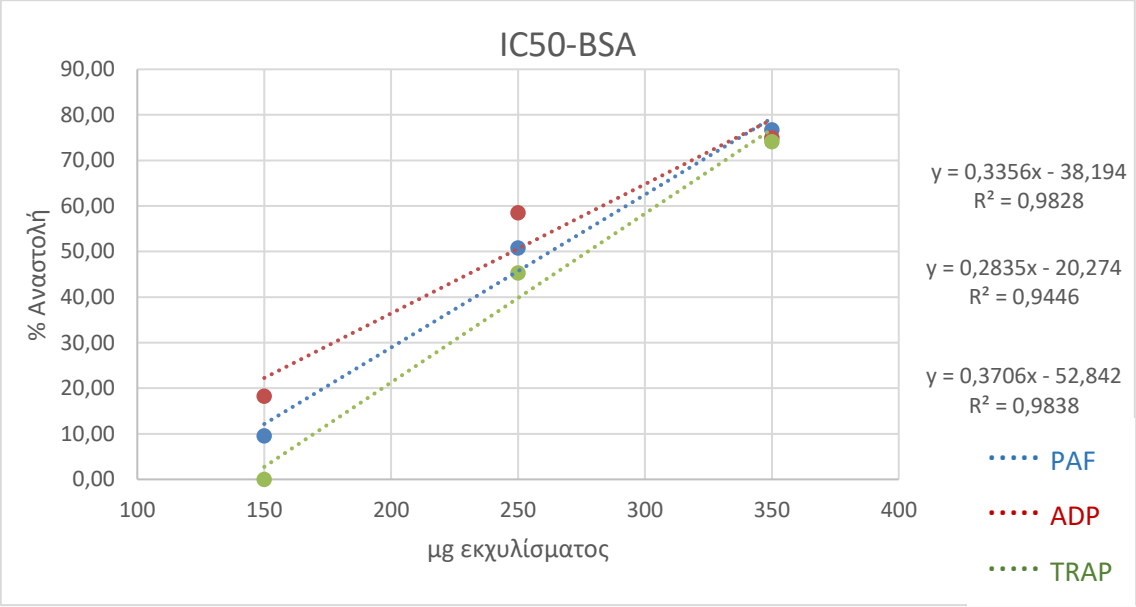
1)



	PAF	ADP	TRAP
IC_{50} (μg εκχυλίσματος)	223,0	321,5	235,8

Διάγραμμα 6.5 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP με διαλύτη την BSA, σε PRP του υγιούς εθελοντή No1

2)

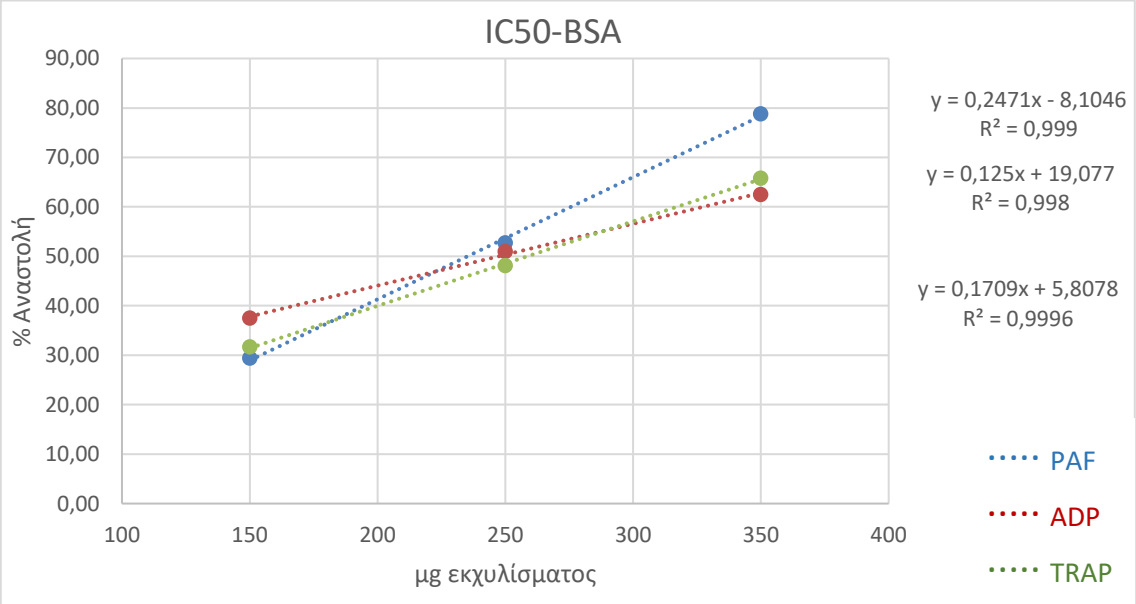


	PAF	ADP	TRAP
IC_{50} (μg εκχυλίσματος)	**264,9**	**247,9**	**277,5**

Διάγραμμα 6.6 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του υγιούς εθελοντή No2

Διαβητικοί κ' Παχύσαρκοι εθελοντές

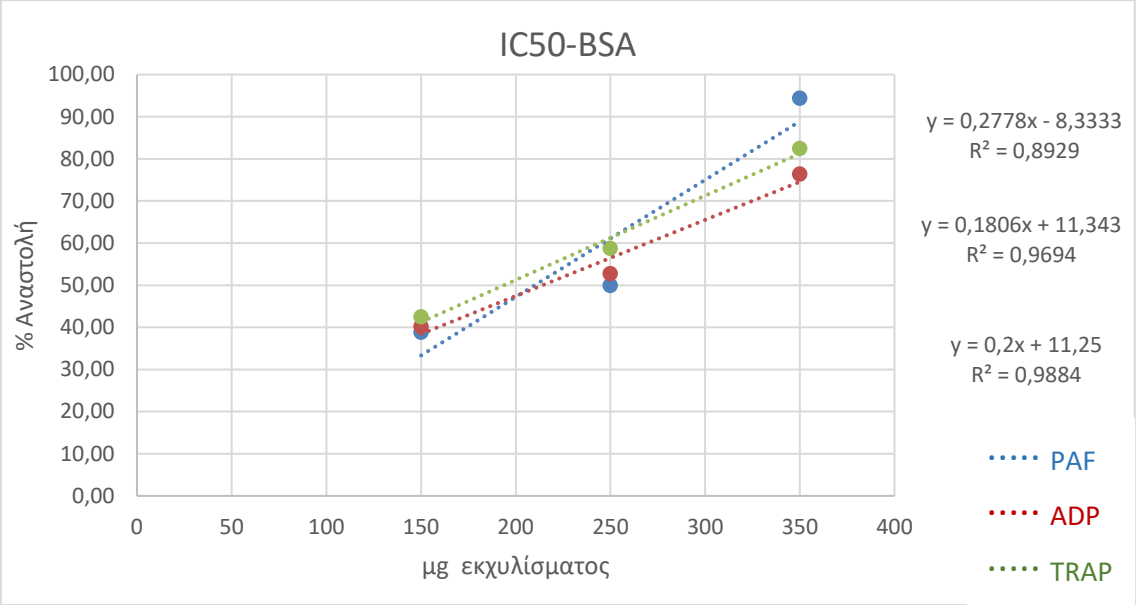
1)



	PAF	ADP	TRAP
IC_{50} (μg εκχυλίσματος)	**235,1**	**247,4**	**258,6**

Διάγραμμα 6.7 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1

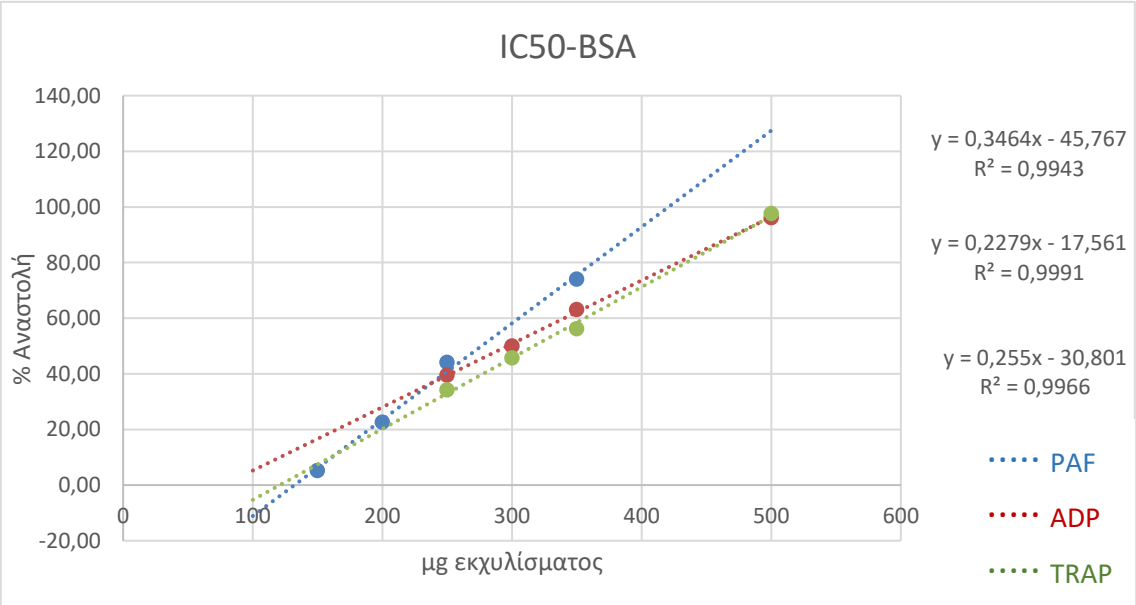
2)



	PAF	ADP	TRAP
IC_{50} (μg εκχυλίσματος)	**210,0**	**214,0**	**193,8**

Διάγραμμα 6.8 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2

Παχύσαρκος εθελοντής



	PAF	ADP	TRAP
IC_{50} (μg εκχυλίσματος)	**276,5**	**296,5**	**316,9**

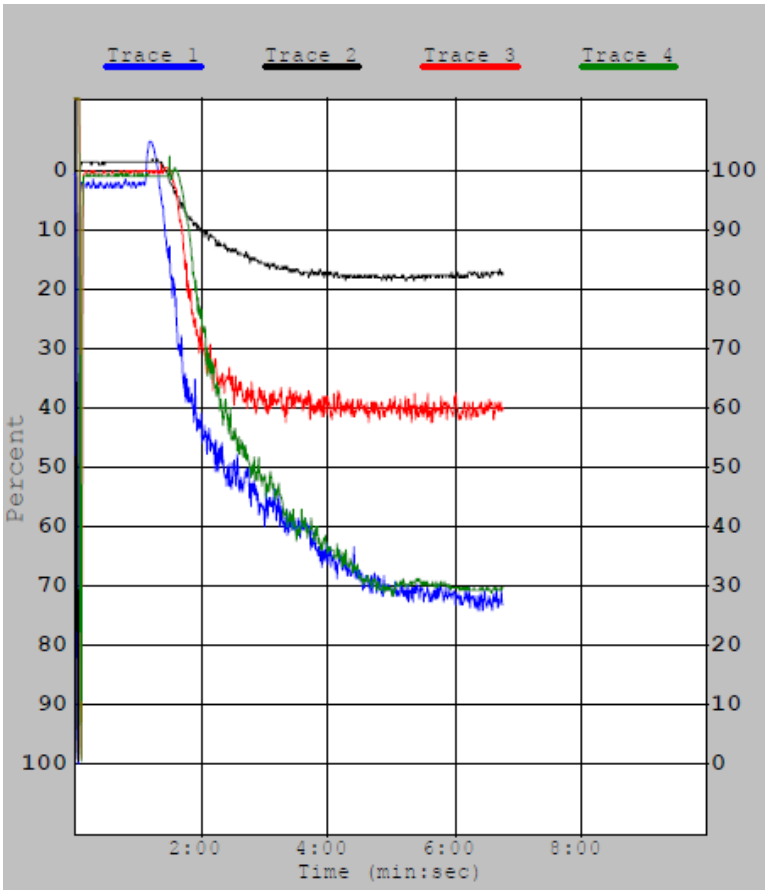
Διάγραμμα 6.9 Τιμές IC_{50} έναντι των παραγόντων PAF, ADP, TRAP σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή

Πίνακας 6.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις τιμές IC_{50}

IC_{50} (μg εκχυλίσματος)			
Εθελοντές	**PAF**	**ADP**	**TRAP**
Υγιείς	244 ± 29,7	284,7 ± 52,1	256,7 ± 29,5
Διαβητικοί κ' Παχύσαρκοι	222,6 ± 17,8	230,7 ± 23,6	226,2 ± 45,9
Παχύσαρκος	276,5	296,5	316,9

Υποσημείωση: Παρουσιάζονται οι τιμές μέσος όρος IC_{50} ± Τυπική απόκλιση, για κάθε ομάδα εθελοντών.

Σαν παράδειγμα της διαδικασίας του πειράματος που πραγματοποιήθηκε, παρουσιάζεται παρακάτω μία εικόνα από το συσσωρευματόμετρο, με τις χαρακτηριστικές καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του παχύσαρκου εθελοντή έναντι του παράγοντα PAF.



Εικόνα 6.4 Καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι του παράγοντα PAF για τον παχύσαρκο εθελοντή(συσσωρευματόμετρο).

Συγκεκριμένα, οι καμπύλες της εικόνας 6.4 αναφέρονται στα αιμοπετάλια του παχύσαρκου εθελοντή έναντι του παράγοντα PAF, με βάση τις οποίες υπολογίζεται η τιμή IC_{50}. Η μπλε καμπύλη παρουσιάζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, με την προσθήκη 2μL του παράγοντα PAF με συγκέντρωση 10^{-4} μM, απουσία εκχυλίσματος. Η μαύρη, κόκκινη και πράσινη καμπύλη αναφέρονται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έναντι του παράγοντα με ίδια συγκέντρωση και ποσότητα, αλλά και την προσθήκη του εκχυλίσματος (25mg/ml) σε ποσότητες 350, 250 και 150μg αντίστοιχα. Τα ύψη των καμπυλών βρέθηκαν 77% για την μπλε και 20%, 43% και 73% για τη μαύρη, κόκκινη και πράσινη αντίστοιχα. Παρατηρούμε λοιπόν, ότι η ποσότητα 250μg αποτελεί το IC_{50}, καθώς το ύψος της συσσώρευσης είναι οριακά το μισό της συσσώρευσης που επιτυγχάνεται μόνο με την παρουσία του παράγοντα.

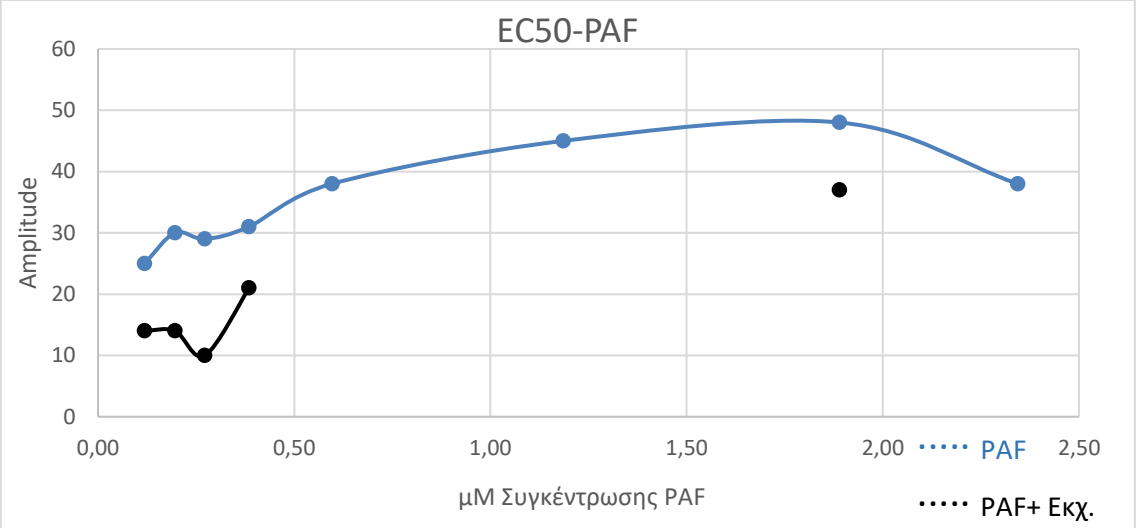
6.3.4 Παράθεση τιμών EC_{50}

Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες και οι τιμές των EC_{50} (συγκέντρωση του παράγοντα που προκαλεί το ήμισυ της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων) για τους παράγοντες PAF, ADP και TRAP, σε κάθε περίπτωση που εξετάζουμε.

Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται δύο καμπύλες για κάθε παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, σε κάθε περίπτωση εθελοντή, παρουσία και απουσία του εκχυλίσματος. Η πρώτη χρωματιστή καμπύλη απεικονίζει το ύψος της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται με την προσθήκη του παράγοντα ενεργοποίησης, απουσία εκχυλίσματος. Αντίθετα, η μαύρη καμπύλη σε κάθε διάγραμμα απεικονίζει το ύψος της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον ίδιο παράγοντα, με την διαφορά ότι έχει προστεθεί το εκχύλισμα (250μg) από τα υποπροϊόντα οινοποιίας. Σύμφωνα με τις συνθήκες αυτές, η διαφορά στα ύψη, που τελικά σχηματίζουν την καμπύλη, αποτελεί την αναστολή που προκαλείται λόγω της επίδρασης του εκχυλίσματος. Τέλος, από το γραμμικό τμήμα της κάθε καμπύλης και σύμφωνα με την εξίσωση που προκύπτει, υπολογίζονται οι τιμές EC_{50}.

Υγιείς Εθελοντές

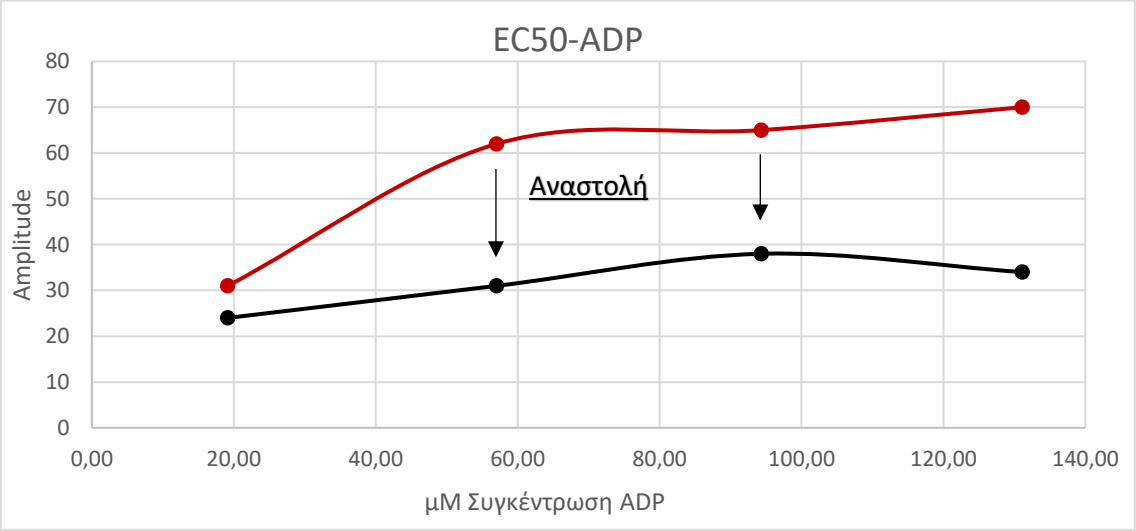
1)



	PAF	PAF + Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μΜ συγκέντρωση)	0,092	0,36

Διάγραμμα 6.10 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του υγιούς εθελοντή

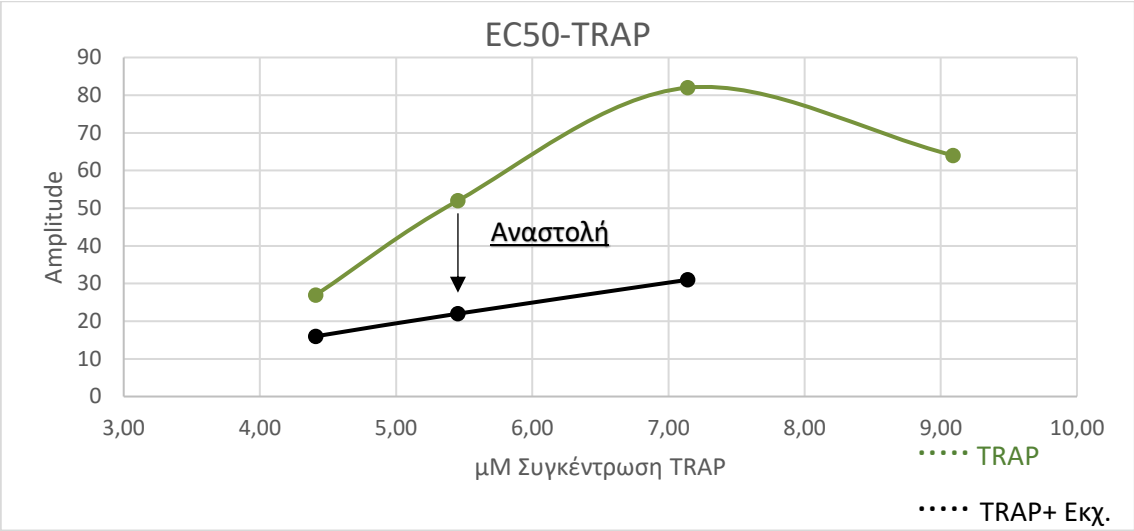
Παρατηρούμε την συνεχή αναστολή της συσσώρευσης που φαίνεται από τις δύο καμπύλες, ενώ το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος σχεδόν τετραπλασιάζεται.



	ADP	ADP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μΜ συγκέντρωση)	7,23	15,17

Διάγραμμα 6.11 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του υγιούς εθελοντή Νο1

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος διπλασιάζεται και έ-χουμε συνεχή αναστολή για διαφορετικές συγκεντρώσεις του ADP.

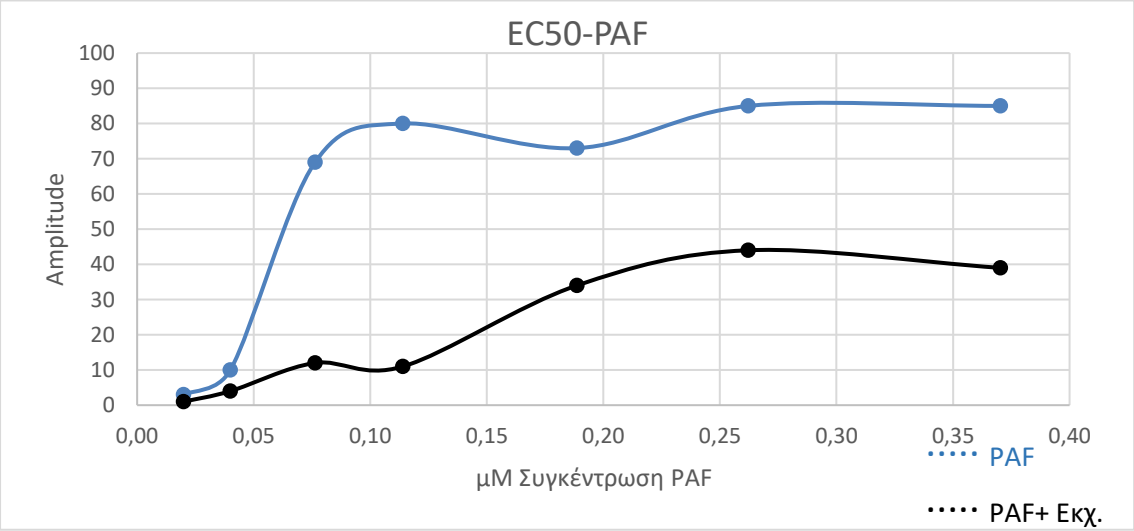


	TRAP	TRAP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μΜ συγκέντρωση)	**5,03**	**4,30**

Διάγραμμα 6.12 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του υγιούς εθελοντή No1

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παραμένει σχεδόν το ίδιο, ενώ και πάλι η αναστολή φαίνεται και για μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις. Μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων εμφανίζεται στα 7,14 μΜ απουσία του εκχυλίσματος.

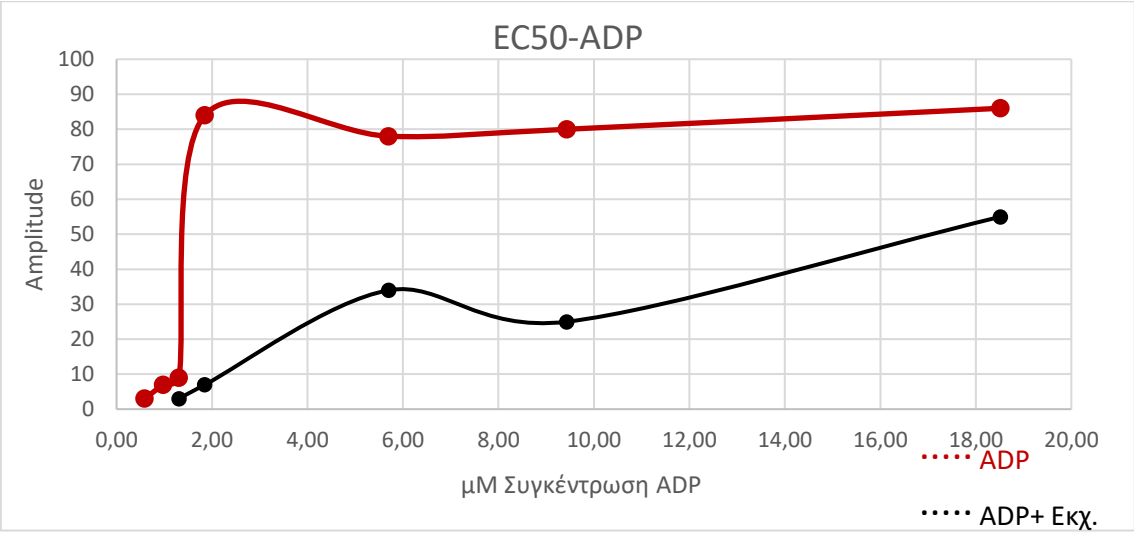
2)



	PAF	PAF + Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μΜ συγκέντρωση)	**0,06**	**0,13**

Διάγραμμα 6.13 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του υγιούς εθελοντή No2

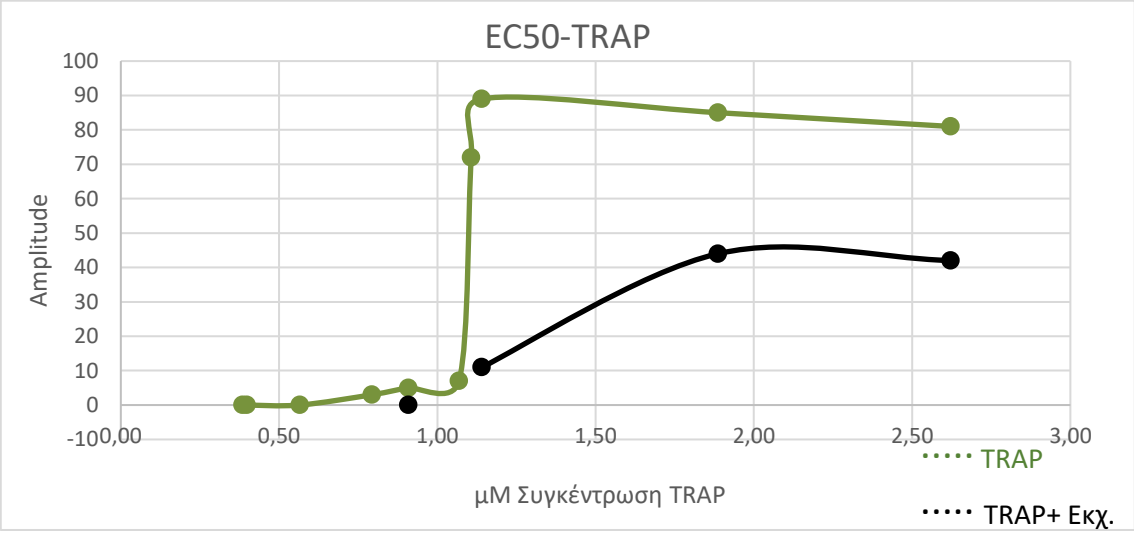
Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος διπλασιάζεται, ενώ η αναστολή που αντιστοιχεί σε μία πιο μεγάλη συγκέντρωση του PAF μπορεί να είναι μικρότερη από αυτή που αντιστοιχεί σε μία μικρότερη συγκέντρωση (πχ 0,19μΜ). Μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία και απουσία εκχυλίσματος εμφανίζεται στα 0,26 μΜ PAF.



	ADP	ADP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**1,55**	**9,49**

Διάγραμμα 6.14 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του υγιούς εθελοντή No2

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος αυξάνεται κατά έξι φορές. Μέγιστη συσσώρευση παρουσιάζεται περίπου στα 2 μM ADP, απουσία εκχυλίσματος και με ύψος στην καμπύλη περίπου 85.



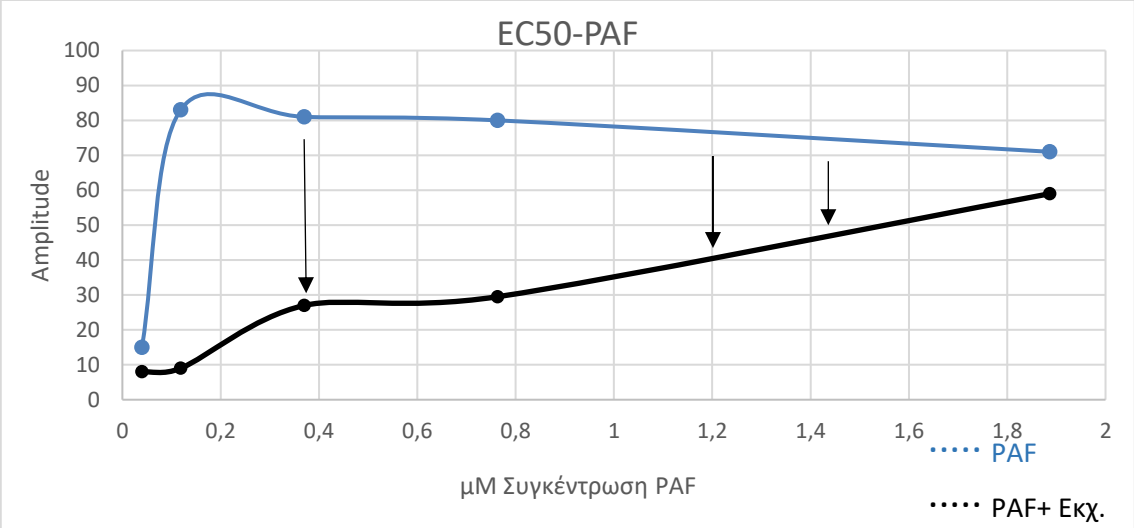
	TRAP	TRAP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**1,10**	**1,40**

Διάγραμμα 6.15 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του υγιούς εθελοντή No2

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παραμένει σχεδόν το ίδιο. Στην καμπύλη του παράγοντα χωρίς το εκχύλισμα, φαίνεται μία απότομη αλλαγή στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ένα πολύ μικρό εύρος συγκεντρώσεων του TRAP, με μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα 1,14μM TRAP.

Διαβητικοί κ' Παχύσαρκοι εθελοντές

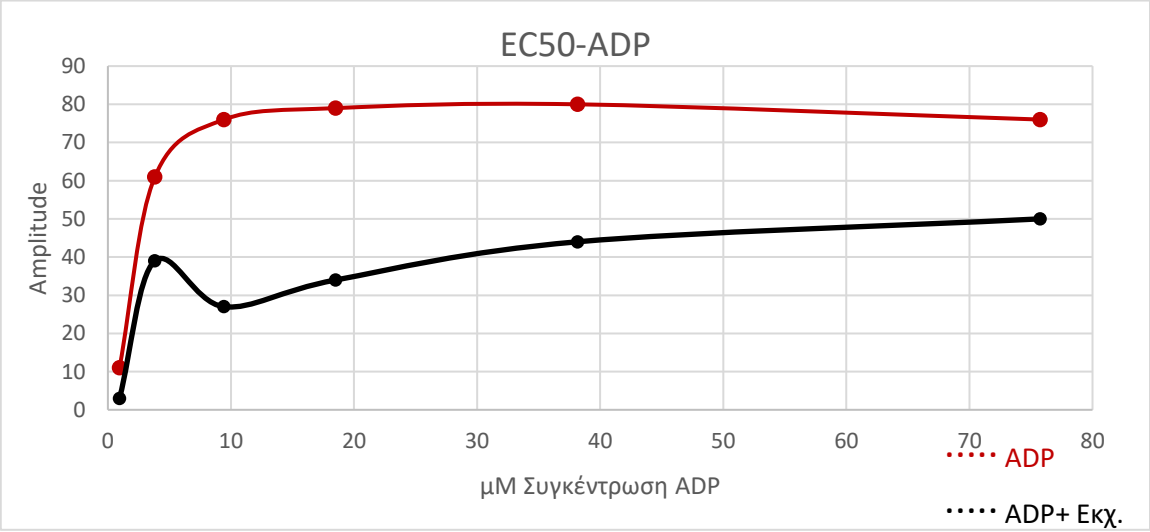
1)



	PAF	PAF + Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	0,17	0,82

Διάγραμμα 6.16 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1

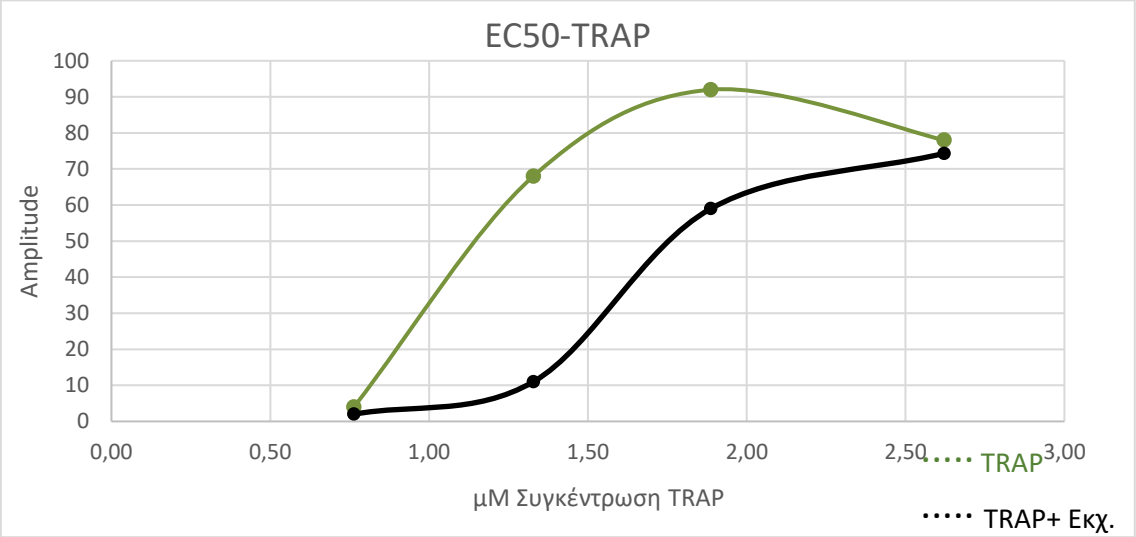
Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος αλλάζει τάξη μεγέθους και αυξάνεται αρκετά, ενώ αντιστοιχεί μεγαλύτερη αναστολή στις μικρές συγκεντρώσεις του PAF και όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του, η αναστολή μειώνεται.



	ADP	ADP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	2,58	4,75

Διάγραμμα 6.17 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντήNo1

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος σχεδόν διπλασιάζεται. Μέγιστη συσσώρευση απουσία εκχυλίσματος εμφανίζεται περίπου στα 38μM ADP και ακολουθεί ένα πλατό.

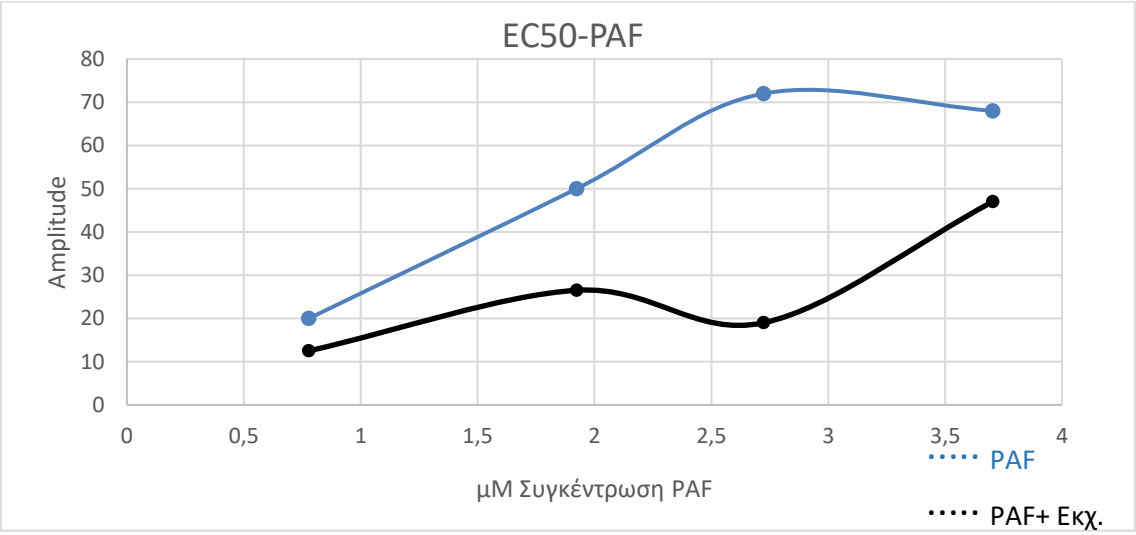


	TRAP	TRAP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**1,13**	**1,63**

Διάγραμμα 6.18 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No1

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παρουσιάζει μία μικρή αύξηση, ενώ μέγιστη αναστολή παρουσιάζεται σε συγκέντρωση 1,33 μM TRAP.

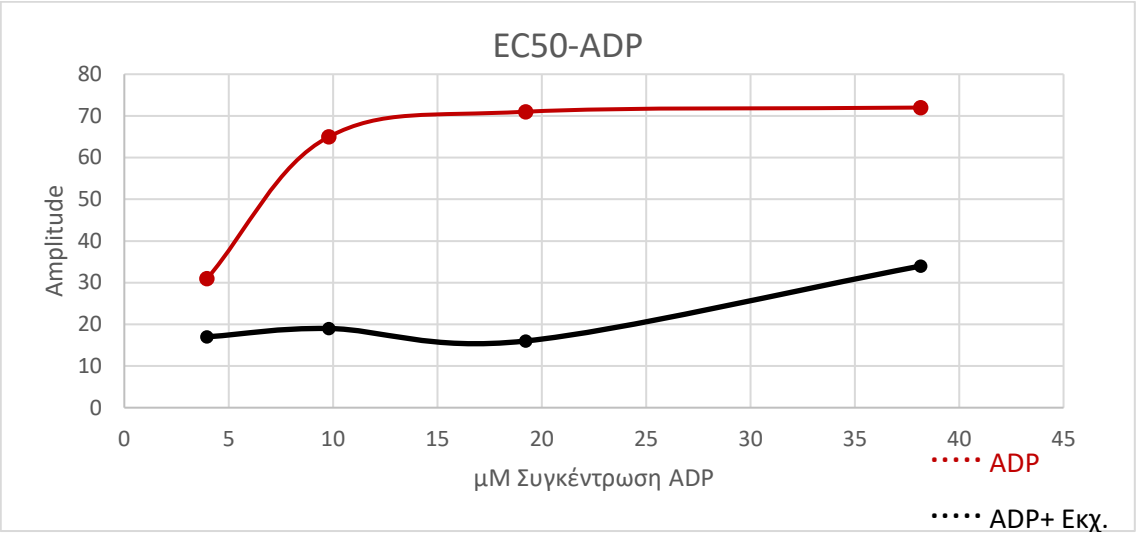
2)



	PAF	PAF + Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**1,38**	**2,01**

Διάγραμμα 6.19 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2

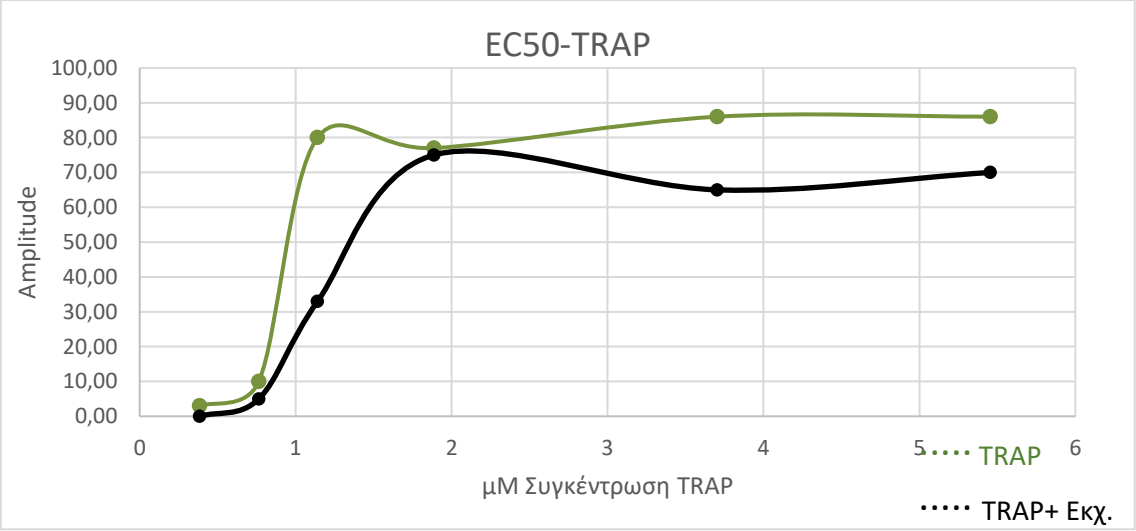
Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παρουσιάζει μικρή αύξηση, μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων απουσία εκχυλίσματος εμφανίζεται στα 2,7 μM και ύστερα συναντάμε ένα πλατό.



	ADP	ADP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**2,71**	**8,60**

Διάγραμμα 6.20 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παρουσιάζει μικρή αύξηση.

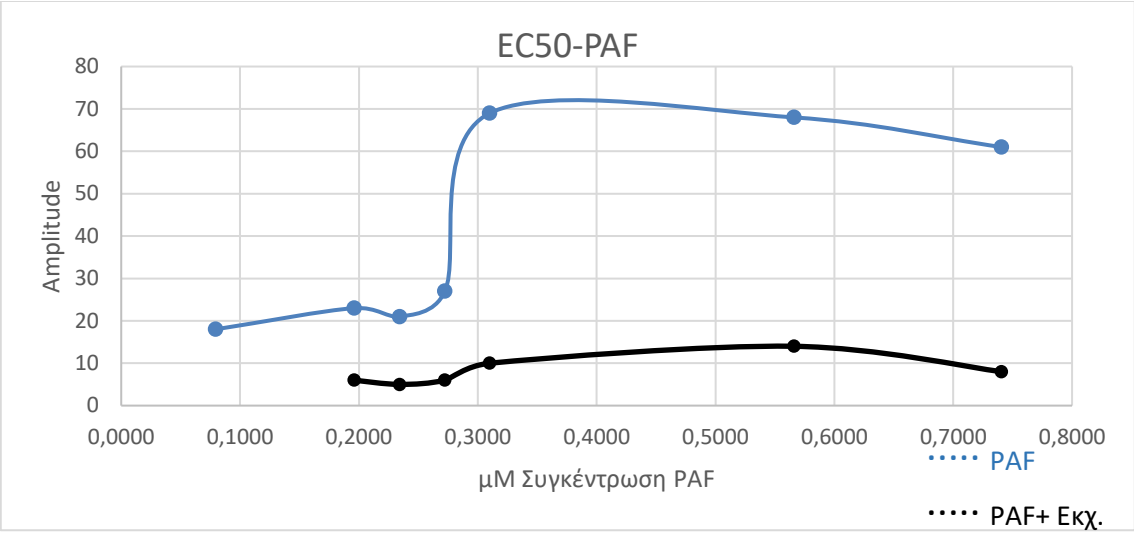


	TRAP	TRAP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**0,94**	**1,26**

Διάγραμμα 6.21 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του διαβητικού κ' παχύσαρκου εθελοντή No2

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παρουσιάζει μικρή αύξηση, σχεδόν αμελητέα. Φαίνεται να μην υπάρχει ιδιαίτερη αναστολή με βάση τις καμπύλες, παρόλα αυτά υπάρχει.

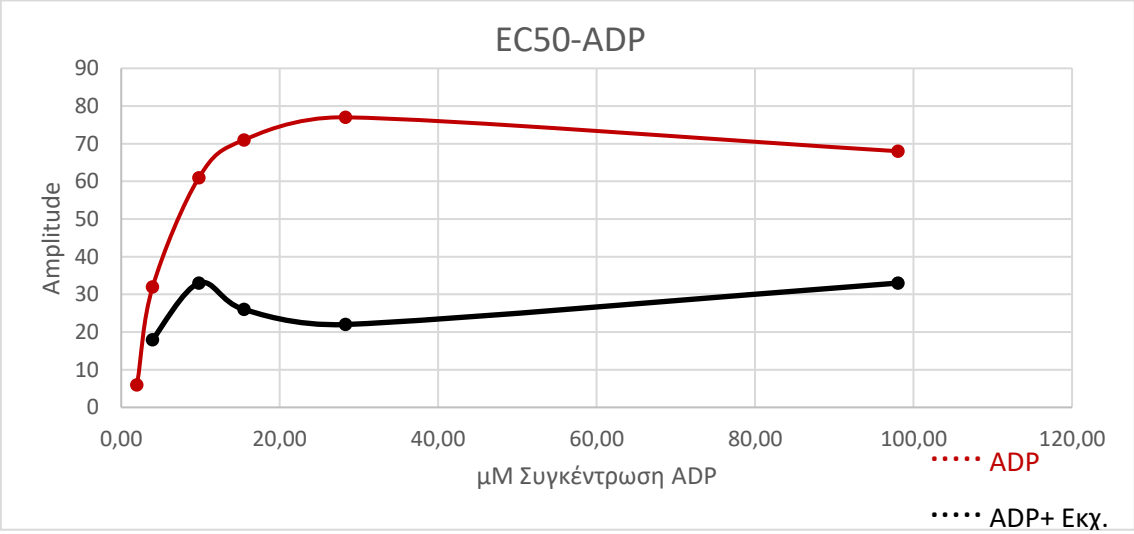
Παχύσαρκος εθελοντής



	PAF	PAF + Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**0,27**	**0,31**

Διάγραμμα 6.22 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα PAF σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή

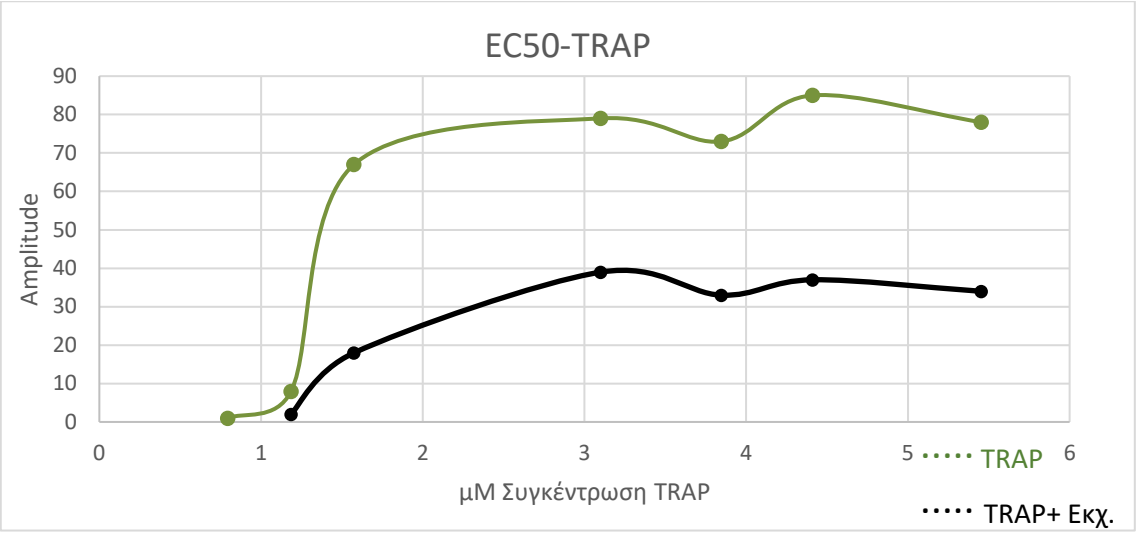
Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παραμένει ίδιο.



	ADP	ADP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**4,99**	**6,74**

Διάγραμμα 6.23 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα ADP σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παρουσιάζει μικρή αύξηση. Μέγιστη συσσώρευση αιμοπεταλίων απουσία εκχυλίσματος εμφανίζεται στα 28-30μM και ακολουθεί ένα πλατό.



	TRAP	TRAP+ Εκχύλισμα (250μg)
EC_{50} (μM συγκέντρωση)	**1,30**	**1,94**

Διάγραμμα 6.24 Τιμές EC_{50} για τον παράγοντα TRAP σε PRP του παχύσαρκου εθελοντή

Παρατηρούμε ότι το EC_{50} με την προσθήκη 250μg του εκχυλίσματος παρουσιάζει μικρή αύξηση, ενώ μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων απουσία εκχυλίσματος εμφανίζεται στα 4,4μM TRAP.

Πίνακας 6.4 Μεταβολή της τιμής EC_{50} των παραγόντων PAF, ADP και TRAP, λόγω απουσίας και παρουσίας 250μg εκχυλίσματος σε κάθε περίπτωση εθελοντή (συγκεντρωτικός πίνακας).

Εθελοντές	PAF	PAF (M.O)	ADP	ADP (M.O)	TRAP	TRAP (M.O)
Υγιής (1)	3,9	3,05	2,1	4,1	0,9	1,1
Υγιής (2)	2,2		6,1		1,3	
Διαβητικός-Παχύσαρκος (1)	4,7	3,1	1,8	2,5	1,4	1,35
Διαβητικός-Παχύσαρκος (2)	1,5		3,2		1,3	
Παχύσαρκος	1,2	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο οίνος, αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα προϊόν του σταφυλιού με ευρεία κατανάλωση, καθώς από τα αρχαία χρόνια, κοινωνικά έχει συσχετιστεί με τη χαρά και τον εορτασμό, ενώ πλέον επιστημονικά, αποδεικνύεται ωφέλιμο για την υγεία. Με αρχή το 1979, ξεκίνησε η μελέτη της προστατευτικής δράσης του ερυθρού οίνου έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων, αποδεικνύοντας αντίθετη συσχέτιση με τη θνησιμότητά τους. Προσεγγίζοντας τα σημερινά δεδομένα, γνωρίζουμε ότι το κρασί περιέχει πληθώρα βιοδραστικών μικροσυστατικών, μεταξύ των οποίων συναντάμε κάποια σάκχαρα, αλκοόλες, κλασσικά φωσφο- και γλυκο-λιποειδή, αλλά και φαινολικές ενώσεις σε σημαντική ποσότητα. Οι ενώσεις αυτές φαίνεται να ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση μέσω αντιοξειδωτικών, αντιθρομβωτικών και αντιφλεγμονωδών μηχανισμών. In vitro μελέτες μάλιστα, αποδεικνύουν τη συσχέτισή τους με την αθηροσκλήρωση, υποστηρίζοντας ότι μπορούν να αναστείλουν ή να καθυστερήσουν κάποια από τα στάδιά της. (Fragopoulou et al., 2018)

Η αθηροσκλήρωση είναι μία φλεγμονώδης νόσος, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική συσσώρευση λιπιδίων και φλεγμονωδών κυττάρων, στα τοιχώματα μεσαίων και μεγαλύτερων αρτηριών. Το έναυσμα για τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας δίνεται με τον τραυματισμό του ενδοθηλίου, ενώ οι μηχανισμοί που την πλαισιώνουν είναι το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και η θρόμβωση. Αν και σε κάποιες περιπτώσεις, ο ανθρώπινος οργανισμός αναπτύσσει μηχανισμούς άμυνας (πχ. αντιοξειδωτικά ένζυμα), ωστόσο αυτό δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικό και έτσι δίνεται το κίνητρο ώστε να ερευνήσουμε τρόπους (πχ. συστατικά τροφίμων), με τους οποίους μπορούμε να ενισχύσουμε αυτή τη διαδικασία. (Kattoor et al., 2017)

Η διαδικασία παραγωγής του οίνου περιλαμβάνει πολλά στάδια, ξεκινώντας με τη συγκομιδή του σταφυλιού, την επεξεργασία του και την απόρριψη των υποπροϊόντων (στέμφυλα, σπόροι, τσάμπουρα, φλούδες, οινολάσπες και φύλλα). Από τη διαδικασία της οινοποίησης προκύπτουν μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για τον εμπλουτισμό άλλων τροφίμων, είτε για τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής. Αποτελούν μάλιστα, πλούσιες πηγές μικροσυστατικών, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα αξιοποίησής τους για την αντιμετώπιση νοσημάτων που μαστίζουν την παγκόσμια κοινότητα. (Teixeira et al., 2014)

Έχουν ήδη πραγματοποιηθεί μελέτες εξετάζοντας την αντι-οξειδωτική κυρίως, αλλά και την αντι-αιμοπεταλιακή δράση από εκχυλίσματα υποπροϊόντων οινοποιίας, όπως είναι τα στέμφυλα. Μέχρι στιγμής τα αποτελέσματα αφορούν μελέτες in vitro, που γίνονται σε πλήρες αίμα,

PRP ή πλυμένα αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές. Σημαντική μελέτη αποτελεί αυτή της ομάδας μας, η οποία έθεσε και τα θεμέλια για την παραπάνω μελέτη και επιβεβαίωσε την αντι-αιμοπεταλιακή δράση των εκχυλισμάτων από υποπροϊόντα οινοποιίας από ερυθρές ποικιλίες σε αιμοπετάλια υγιών εθελοντών, αλλά εξέτασε και τα αιμοπετάλια ενός καρδιαγγειακού ασθενή. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση των εκχυλισμάτων σε αιμοπετάλια εθελοντών με άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η παχυσαρκία και ο ΣΔ τύπου ΙΙ. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να αξιολογήσει την αντι-αιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων από υποπροϊόντα οινοποιίας σε αιμοπετάλια εθελοντών με νοσήματα, όπως είναι η παχυσαρκία και ο ΣΔ τύπου ΙΙ, για να εξεταστεί το εάν υπάρχει επίδραση των εκχυλισμάτων στα ήδη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια των ασθενών αυτών, λόγω της προθρομβωτικής κατάστασης στην οποία βρίσκονται.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μία επιπλοκή του ΣΔ είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που χαρακτηρίζεται από αλλοίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς χάνουν τις αντιθρομβωτικές τους ιδιότητες και οδηγούνται σε ανεξέλεγκτη θρόμβωση. Τα αιμοπετάλια των ασθενών με ΣΔ τύπου Ι και ΙΙ είναι ενεργοποιημένα και παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση προς τη δημιουργία θρόμβου, γεγονός που φαίνεται να συνεισφέρει στην εμφάνιση καρδιαγγειακού νοσήματος σχετιζόμενου με τον ΣΔ. (Randriamboavonjy and Fleming, 2012) Επιπλέον, είναι γνωστό ότι ο ΣΔ ΙΙ και η παχυσαρκία χαρακτηρίζονται από συστηματική φλεγμονή, στην οποία συμμετέχουν δείκτες όπως η CRP, ο TF, οι ιντερλευκίνες και ο TNF-α, που σχετίζονται με την δυσλιπιδαιμία και την αθηροσκλήρωση. (Pretorius et al., 2018) Η επίμονη και ανεξέλεγκτη παρουσία φλεγμονωδών μορίων είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες ενεργοποίησης, συσσωμάτωσης και εξάπλωσης των αιμοπεταλίων και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα ίδια τα αιμοπετάλια να λειτουργούν ως παράγοντες φλεγμονής. Παράλληλα, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από αρκετούς υποδοχείς μεμβρανών αφού προσδεθεί ο προσδέτης, και έτσι ενεργοποιούνται τα μονοπάτια απελευθέρωσης των κοκκίων τους. Τα μόρια που ελευθερώνονται έχουν από μόνα τους φλεγμονώδη δράση στην κυκλοφορία και «ειδοποιούν» άλλα κύτταρα, όπως τα ερυθροκύτταρα. Τα τελευταία, προωθούν τη θρόμβωση, επηρεάζουν την σταθερότητα του θρόμβου και δρουν ως κυτταρικοί δείκτες του ΣΔ ΙΙ. Τέλος, η αλληλεπίδραση των ερυθροκυττάρων με τα αιμοπετάλια φαίνεται να ενισχύεται στον ΣΔ ΙΙ, λόγω της αύξησης της φωσφατιδυλοσερίνης. (Pretorius, 2019)

Όσον αφορά τη δική μας μελέτη, αρχικά πραγματοποιήθηκαν κάποιοι χημικοί προσδιορισμοί, ώστε να εξεταστεί η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος, καθώς η εκχύλιση είχε γίνει σε

βιομηχανικές συνθήκες και όχι εργαστηριακές. Οι προσδιορισμοί αξιολόγησαν την περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά, ορθοφαινολικά, σάκχαρα και φώσφορο. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αυτά της προηγούμενης μελέτης της ομάδας μας, που χρησιμοποίησε επίσης αιθανολικό εκχύλισμα από στέμφυλα, με την εκχύλιση να έχει γίνει σε εργαστηριακές συνθήκες. Ο προσδιορισμός των εκχυλισμάτων σε ολικά φαινολικά συστατικά πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, όπως και σε μελέτες που θα αναφερθούν παρακάτω. Συγκεκριμένα, στην προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας, μετρήθηκαν τα ολικά φαινολικά συστατικά σε αιθανολικά εκχυλίσματα από στέμφυλα και η συγκέντρωση υπολογίστηκε στα 96,4 ± 12,9μg GA/mg εκχυλίσματος. (Choleva et al., 2019). Οι Bijak et al. χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από τον σπόρο του σταφυλιού υπολόγισαν ότι το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά ήταν 409,97 ± 7,08 μg GAE/mg εκχυλίσματος.(Bijak et al., 2011) Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ανέρχονται σε **117 ± 16 μg GA/mg εκχυλίσματος**. Παρατηρούμε ότι υπάρχει πολύ μικρή απόκλιση σε σχέση με την προηγούμενη έρευνα της ομάδας, καθώς πρόκειται για δείγμα που αποτελείται από τις ίδιες ποικιλίες σταφυλιού με το άλλο πείραμα. Συγκριτικά με την έρευνα των Bijak et al., η συγκέντρωση είναι αρκετά μικρότερη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική μέθοδο και τις συνθήκες εκχύλισης ή στην ποικιλία του σταφυλιού.

Σχετικά με τα ορθοφαινολικά συστατικά, στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκαν στα **31,8 ± 5,9 μg κερκετίνης/mg εκχυλίσματος**, ενώ στην προηγούμενη μελέτης της ομάδας μας, η συγκέντρωση των ορθοφαινολικών συστατικών του αιθανολικού εκχυλίσματος υπολογίστηκε στα 26,9 ± 4,7 μg κερκετίνης/ mg εκχυλίσματος. (Choleva et al., 2019) Και πάλι η απόκλιση είναι μικρή, λόγω των παρόμοιων συνθηκών παραγωγής του εκχυλίσματος. Στη βιβλιογραφία, ωστόσο δεν υπάρχουν περαιτέρω δεδομένα.

Όσον αφορά τα σάκχαρα, υπολογίστηκαν στα **208 ± 34 μg γλυκόζης/ mg εκχυλίσματος** στην παρούσα μελέτη, ενώ στη μελέτη των Χολέβα et al. βρέθηκαν 53,3 ± 0 μg γλυκόζης/ mg εκχυλίσματος. (Choleva et al., 2019) Η διαφορά των δύο τιμών είναι μεγάλη, πιθανότατα επειδή πρόκειται για στέμφυλα από διαφορετικές σοδειές. Η συγκομιδή και η εκχύλιση των δύο δειγμάτων απείχε περίπου 2 χρόνια, με αποτέλεσμα να προσδίδονται άλλα χαρακτηριστικά στο κάθε εκχύλισμα.

Τέλος, ο φώσφορος στο εκχύλισμα της παρούσας μελέτης βρέθηκε **0,62 ± 0,08 μg/ mg εκχυλίσματος,** ενώ στην πρόσφατη μελέτη της ομάδας μας υπολογίστηκε στα 70,7 ± 10,2 μg

φωσφόρου/mg εκχυλίσματος. (Choleva et al., 2019) Και στην περίπτωση του φωσφόρου φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διαφορά στην περιεκτικότητα, για τον ίδιο λόγο με τα σάκχαρα.

Μελέτες in vitro που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν, καταλήγουν σε σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την επιρροή των εκχυλισμάτων στα αιμοπετάλια. Οι Olas et al. μελετώντας τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιού, παρατήρησαν αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων έως και 70%. Οι ίδιοι, σε παρόμοιο πείραμα, μελετώντας τους παράγοντες TRAP και θρομβίνη κατέληξαν σε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με μεγαλύτερη αναστολή στη συσσώρευση που είχε προκληθεί από τη θρομβίνη. Ακόμα μία μελέτη των Vitseva et al. εξέτασε την επιρροή των εκχυλισμάτων από σπόρους και φλούδες σταφυλιού σε πλυμένα αιμοπετάλια, με την παρουσία του συσσωρευτικού παράγοντα TRAP. Στα αποτελέσματα φάνηκε 64% αναστολή της συσσώρευσης προκαλούμενη από το εκχύλισμα του σπόρου με συγκέντρωση 500mg/L, 35% αναστολή για το εκχύλισμα της φλούδας με συγκέντρωση 100mg/L και 78% αναστολή προκαλούμενη από την ανάμειξη των δύο εκχυλισμάτων σε συγκεντρώσεις 500mg/L GSD και 100mg/L GSK. Ωστόσο, η έκφραση των τιμών IC_{50} διαφέρει από αυτή του πειράματός μας, με αποτέλεσμα να μην μπορούμε εύκολα να τις συγκρίνουμε. Τέλος, μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα από την ομάδα μας με παραλαβή του PRP από υγιείς εθελοντές, χρήση εκχυλισμάτων από στέμφυλα αλλά και των παραγόντων PAF, ADP και TRAP, κατέληξε σε τιμές IC_{50} 162,1 ± 66,9, 181,2 ± 82,3 και 156,3 ± 97,5μg εκχυλίσματος έναντι των παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. (Choleva et al., 2019)

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50}, καθώς αποτελούν έναν τρόπο για την μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων και μας βοηθούν να βρούμε μία ποσότητα του εκχυλίσματος που προκαλεί μία σημαντική αναστολή, ώστε με την προσθήκη αυτής της ποσότητας και με τις διάφορες συγκεντρώσεις των συσσωρευτικών παραγόντων, να κατασκευαστούν στη συνέχεια οι καμπύλες και να γίνει ο υπολογισμός των τιμών EC_{50}. Με τον υπολογισμό των EC_{50}, εξετάζουμε σε μεγάλο εύρος της συγκέντρωσης του συσσωρευτικού παράγοντα, την επίδραση του εκχυλίσματος στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς μελετώνται όλες οι φάσεις της, όταν είναι χαμηλή, υψηλή και όταν έχει φτάσει σε πλατό.

Οι τιμές **IC_{50}** για τους υγιείς εθελοντές υπολογίστηκαν σε **244 ± 29,7, 284,7 ± 52,1, 256,7 ± 29,5 μg εκχυλίσματος**, έναντι των παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά της προηγούμενης μελέτης της ομάδας μας, η διαφορά στις τιμές προκύπτει πιθανόν λόγω των διαφορετικών εθελοντών ή του διαφορετικού εκχυλίσματος. Σχετικά με τις τιμές IC_{50} στους εθελοντές με ΣΔ τύπου ΙΙ και παχυσαρκία, τα αποτελέσματα ήταν

222,6 ± 17,8, 230,7 ± 23,6, 226,2 ± 45,9 μg εκχυλίσματος, έναντι παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. Για τον παχύσαρκο ασθενή τα IC_{50} ήταν **276,5, 296,5, 316,9 μg εκχυλίσματος,** έναντι παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. Με βάση αυτές τις τιμές, θα λέγαμε ότι το εκχύλισμα έχει καλύτερη επίδραση στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια των ασθενών με ΣΔ ΙΙ και παχυσαρκία, καθώς χρειάζεται μικρότερη ποσότητα αυτού, ώστε να επιτευχθεί η 50% αναστολή της συσσώρευσης, σε σχέση με τα αιμοπετάλια των υγιών εθελοντών. Αντίθετα για τον παχύσαρκο εθελοντή συγκριτικά με τους υγιείς, το εκχύλισμα φαίνεται να δρα λίγο καλύτερα στα αιμοπετάλια των υγιών εθελοντών. Από τα αποτελέσματα αυτά ωστόσο δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα, καθώς προέρχονται από πολύ μικρό αριθμό εθελοντών και δεν ήταν δυνατή η σύγκριση μέσω στατιστικής. Χρειάζεται σίγουρα μεγαλύτερος αριθμός εθελοντών για να έχουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν έρευνες που να αναφέρονται σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στον υπολογισμό των EC_{50}, όπου εξετάσαμε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του παράγοντα ενεργοποίησης και είτε απουσία, είτε παρουσία 250μg από το εκχύλισμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι τιμές EC_{50} αυξήθηκαν για κάθε παράγοντα σε κάθε περίπτωση εθελοντή που εξετάζουμε, περισσότερο για τους PAF και ADP και λιγότερο για τον TRAP. Συγκεκριμένα για τους υγιείς εθελοντές, το EC_{50} για τον PAF με την παρουσία του εκχυλίσματος αυξήθηκε κατά 3,9 και 2,2 φορές για τον πρώτο και δεύτερο εθελοντή αντίστοιχα, ενώ για το ADP αυξήθηκε κατά 2,1 και 6,1 φορές και για τον TRAP κατά 0,9 και 1,3 φορές. Όσον αφορά τους εθελοντές με ΣΔ τύπου ΙΙ και παχυσαρκία, οι οποίοι λάμβαναν και φαρμακευτική αγωγή, το EC_{50} για τον PAF παρουσία εκχυλίσματος αυξήθηκε κατά 4,7 φορές στη μία περίπτωση και κατά 1,5 φορά στην άλλη, ενώ το EC_{50} για το ADP αυξήθηκε κατά 1,8 και 3,2 φορές και για τον TRAP κατά 1,5 φορά περίπου και στους δύο εθελοντές. Τέλος, το EC_{50} για τον PAF παρουσία εκχυλίσματος στον παχύσαρκο εθελοντή αυξήθηκε κατά 1,2 φορές, για το ADP αυξήθηκε κατά 1,4 φορές, ενώ για τον TRAP κατά 1,5 φορά. Συνολικά λοιπόν, κατά μέσο όρο, για τους υγιείς εθελοντές η αύξηση υπολογίστηκε κατά 3,05, 4,1 και 1,1 φορές, έναντι των παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα. Για του εθελοντές με ΣΔ ΙΙ και παχυσαρκία η τιμή EC_{50} αυξήθηκε κατά μέσο όρο κατά 3,1, 2,5 και 1,35 φορές, έναντι των παραγόντων PAF, ADP και TRAP αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα, φαίνεται να υπάρχει ένδειξη για εξίσου ευεργετική δράση του εκχυλίσματος, παρουσία του παράγοντα PAF στα αιμοπετάλια των εθελοντών με ΣΔ ΙΙ και παχυσαρκία, όπως και στους υγιείς. Σημαντική είναι και η δράση του εκχυλίσματος με την

παρουσία του ADP, τόσο στους υγιείς, όσο και στους διαβητικούς και παχύσαρκους εθελοντές. Όσον αφορά τα αποτελέσματα με την παρουσία του παράγοντα TRAP και του εκχυλίσματος, στην υγιή και στις παθολογικές καταστάσεις φαίνεται να μην υπάρχει ιδιαίτερη διαφορά. Ωστόσο, και πάλι δεν αναφέρονται παρόμοιες μελέτες στη βιβλιογραφία και με τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων είναι πολύ μικρός. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα πειράματα έγιναν in vitro και τα όποια συμπεράσματα, αναφέρονται σε αυτές τις συνθήκες. Σε in vivo καταστάσεις με τη χορήγηση συμπληρώματος, υπάρχει περίπτωση τα συστατικά να δρουν διαφορετικά, λόγω της ύπαρξης περισσότερων μεταβολικών μονοπατιών.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα από υποπροϊόντα οινοποίησης εμφανίζει αντι-αιμοπεταλιακή, δράση όχι μονό σε αιμοπετάλια υγιών εθελοντών, αλλά και σε αιμοπετάλια εθελοντών με παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου ΙΙ και η παχυσαρκία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ABAJO, F. 2011. Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Platelet Function Mechanisms, Clinical Outcomes and Implications for Use in Elderly Patients. *Drugs & aging,* 28**,** 345-67.

ARRANZ, S., CERT, R., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., CERT, A. & SAURA-CALIXTO, F. 2008. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chem,* 110**,** 985-90.

BETTERIDGE, D. 2000. Betteridge, D. J. What is oxidative stress? Metabolism 49, 3-8. *Metabolism: clinical and experimental,* 49**,** 3-8.

BIJAK, M., BOBROWSKI, M., BOROWIECKA, M., PODSĘDEK, A., GOLAŃSKI, J. & NOWAK, P. 2011. Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia,* 82**,** 811-7.

BIJAK, M., SALUK, J., PONCZEK, M. B. & NOWAK, P. 2013. Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Phytother Res,* 27**,** 71-6.

CAPRA, V., BÄCK, M., BARBIERI, S. S., CAMERA, M., TREMOLI, E. & ROVATI, G. E. 2013. Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. *Med Res Rev,* 33**,** 364-438.

CHAPIN, J. C. & HAJJAR, K. A. 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev,* 29**,** 17-24.

CHEN, L., DENG, H., CUI, H., FANG, J., ZUO, Z., DENG, J., LI, Y., WANG, X. & ZHAO, L. 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget,* 9**,** 7204-7218.

CHOLEVA, M., BOULOUGOURI, V., PANARA, A., PANAGOPOULOU, E., CHIOU, A., THOMAIDIS, N. S., ANTONOPOULOU, S. & FRAGOPOULOU, E. 2019. Evaluation of anti-platelet activity of grape pomace extracts. *Food Funct,* 10**,** 8069-8080.

CHRISTODOULIDIS, G., VITTORIO, T. J., FUDIM, M., LERAKIS, S. & KOSMAS, C. E. 2014. Inflammation in coronary artery disease. *Cardiol Rev,* 22**,** 279-88.

CLEMETSON, K. J. 1999. Primary haemostasis: Sticky fingers cement the relationship. *Current Biology,* 9**,** R110-R112.

COOKE, M. S., EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M. & LUNEC, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal,* 17**,** 1195-1214.

COSTANZO, S., DI CASTELNUOVO, A., DONATI, M. B., IACOVIELLO, L. & DE GAETANO, G. 2010. Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. *Circulation,* 121**,** 1951-9.

COSTANZO, S., DI CASTELNUOVO, A., DONATI, M. B., IACOVIELLO, L. & DE GAETANO, G. 2011. Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol,* 26**,** 833-50.

DAVIES, M. 2012. Oxidative Damage to Proteins.

DE LANGE, D. W., VERHOEF, S., GORTER, G., KRAAIJENHAGEN, R. J., VAN DE WIEL, A. & AKKERMAN, J. W. 2007. Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox. *Alcohol Clin Exp Res,* 31**,** 1308-14.

DEMOPOULOS, C. A., KARANTONIS, H. C. & ANTONOPOULOU, S. 2003. Platelet activating factor — a molecular link between atherosclerosis theories. *European Journal of Lipid Science and Technology,* 105**,** 705-716.

DEMOPOULOS, C. A., PINCKARD, R. N. & HANAHAN, D. J. 1979. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem,* 254**,** 9355-8.

DEVASAGAYAM, T. P., BOLOOR, K. K. & RAMASARMA, T. 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys,* 40**,** 300-8.

DUCK-CHONG, C. G. 1979. A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids,* 14**,** 492-497.

ESTRUCH, R., ROS, E., SALAS-SALVADÓ, J., COVAS, M.-I., CORELLA, D., ARÓS, F., GÓMEZ-GRACIA, E., RUIZ-GUTIÉRREZ, V., FIOL, M., LAPETRA, J., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., SERRA-MAJEM, L., PINTÓ, X., BASORA, J., MUÑOZ, M. A., SORLÍ, J. V., MARTÍNEZ, J. A. & MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A. 2013.

Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine,* 368**,** 1279-1290.

FERNANDES, I., PÉREZ-GREGORIO, R., SOARES, S., MATEUS, N. & DE FREITAS, V. 2017. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules (Basel, Switzerland),* 22**,** 292.

FISHER, H., HANSEN, R. G. & NORTON, H. W. 1955. Quantitative Determination of Glucose and Galactose. *Analytical Chemistry,* 27**,** 857-859.

FONTANA, A. R., ANTONIOLLI, A. & BOTTINI, R. 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem,* 61**,** 8987-9003.

FRAGOPOULOU, E., CHOLEVA, M., ANTONOPOULOU, S. & DEMOPOULOS, C. A. 2018. Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. *Metabolism - Clinical and Experimental,* 83**,** 102-119.

FRAGOPOULOU, E., DEMOPOULOS, C. & ANTONOPOULOU, S. 2009. Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox. *International Journal of Wine Research,* 2009.

FREIRE, M. O. & VAN DYKE, T. E. 2013. Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000,* 63**,** 149-164.

GALE, A. J. 2010. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic Pathology,* 39**,** 273-280.

GOLAN, R., GEPNER, Y. & SHAI, I. 2019. Wine and Health–New Evidence. *European Journal of Clinical Nutrition,* 72**,** 55-59.

HASEEB, S., ALEXANDER, B., SANTI, R. L., LIPRANDI, A. S. & BARANCHUK, A. 2019. What's in wine? A clinician's perspective<sup/&gt. *Trends in cardiovascular medicine,* 29**,** 97-106.

JACKSON, R. S. 2014. *Wine Science: Principles and Applications*, Elsevier Science.

JARA-PALACIOS, M. J. 2019. Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants (Basel, Switzerland),* 8**,** 45.

JIN, J. W., INOUE, O., SUZUKI-INOUE, K., NISHIKAWA, G., KAWAKAMI, Y., HISAMOTO, M., OKUDA, T. & OZAKI, Y. 2014. Grape seed extracts inhibit platelet aggregation by inhibiting protein tyrosine phosphatase. *Clin Appl Thromb Hemost,* 20**,** 278-84.

KALLI, E., LAPPA, I., BOUCHAGIER, P., TARANTILIS, P. A. & SKOTTI, E. 2018. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing,* 5**,** 46.

KATTOOR, A. J., POTHINENI, N. V. K., PALAGIRI, D. & MEHTA, J. L. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep,* 19**,** 42.

KOENIG, W. 2001. Inflammation and coronary heart disease: an overview. *Cardiol Rev,* 9**,** 31-5.

LANGE, D. W. D., SCHOLMAN, W. L. G., KRAAIJENHAGEN, R. J., AKKERMAN, J. W. N. & VAN DE WIEL, A. 2004. Alcohol and polyphenolic grape extract inhibit platelet adhesion in flowing blood. *European Journal of Clinical Investigation,* 34**,** 818-824.

LAROIA, S. T., GANTI, A. K., LAROIA, A. T. & TENDULKAR, K. K. 2003. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. *International Journal of Cardiology,* 88**,** 1-9.

LIBBY, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature,* 420**,** 868-74.

LIEVENS, D. & VON HUNDELSHAUSEN, P. 2011. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost,* 106**,** 827-38.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A. & CHANDRA, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews,* 4**,** 118-126.

LUSIS, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature,* 407**,** 233-241.

MICHAS, G., KARVELAS, G. & TRIKAS, A. 2019. Cardiovascular disease in Greece; the latest evidence on risk factors. *Hellenic J Cardiol,* 60**,** 271-275.

MINIHANE, A. M., VINOY, S., RUSSELL, W. R., BAKA, A., ROCHE, H. M., TUOHY, K. M., TEELING, J. L., BLAAK, E. E., FENECH, M., VAUZOUR, D., MCARDLE, H. J., KREMER, B. H., STERKMAN, L., VAFEIADOU, K., BENEDETTI, M. M., WILLIAMS, C. M. & CALDER, P. C. 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr,* 114**,** 999-1012.

NINIO, E. 2005. Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care,* 8**,** 123-131.

OLAS, B., WACHOWICZ, B., STOCHMAL, A. & OLESZEK, W. 2012. The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets,* 23**,** 282-9.

OLAS, B., WACHOWICZ, B., TOMCZAK, A., ERLER, J., STOCHMAL, A. & OLESZEK, W. 2008. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of Aronia melanocarpa, seeds of grape and bark of Yucca schidigera in vitro. *Platelets,* 19**,** 70-7.

OTSUKA, F., YASUDA, S., NOGUCHI, T. & ISHIBASHI-UEDA, H. 2016. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther,* 6**,** 396-408.

PACE-ASCIAK, C. R., ROUNOVA, O., HAHN, S. E., DIAMANDIS, E. P. & GOLDBERG, D. M. 1996. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica Chimica Acta,* 246**,** 163-182.

PAHWA, R., GOYAL, A., BANSAL, P. & JIALAL, I. 2020. Chronic Inflammation. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.

PALTA, S., SAROA, R. & PALTA, A. 2014. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth,* 58**,** 515-23.

PEATE, I. 2018. Anatomy and physiology, 8. The circulatory system. *British Journal of Healthcare Assistants,* 12**,** 62-67.

PEHLIVAN, F. 2017. Vitamin C: An Antioxidant Agent.

PIEPOLI, M. F., HOES, A. W., AGEWALL, S., ALBUS, C., BROTONS, C., CATAPANO, A. L., COONEY, M. T., CORRà, U., COSYNS, B., DEATON, C., GRAHAM, I., HALL, M. S., HOBBS, F. D., LØCHEN, M. L., LÖLLGEN, H., MARQUES-VIDAL, P., PERK, J., PRESCOTT, E., REDON, J., RICHTER, D. J., SATTAR, N., SMULDERS, Y., TIBERI, M., VAN DER WORP, H. B., VAN DIS, I., VERSCHUREN, W. M., DE BACKER, G., ROFFI, M., ABOYANS, V., BACHL, N., BUENO, H., CARERJ, S., CHO, L., COX, J., DE SUTTER, J., EGIDI, G., FISHER, M., FITZSIMONS, D., FRANCO, O. H., GUENOUN, M., JENNINGS, C., JUG, B., KIRCHHOF, P., KOTSEVA, K., LIP, G. Y., MACH, F., MANCIA, G., BERMUDO, F. M., MEZZANI, A., NIESSNER, A., PONIKOWSKI, P., RAUCH, B., RYDÉN, L., STAUDER, A., TURC, G., WIKLUND, O., WINDECKER, S. & ZAMORANO, J. L. 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts): Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur J Prev Cardiol,* 23**,** Np1-np96.

PRETORIUS, E. 2019. Platelets as Potent Signaling Entities in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab,* 30**,** 532-545.

PRETORIUS, L., THOMSON, G. J. A., ADAMS, R. C. M., NELL, T. A., LAUBSCHER, W. A. & PRETORIUS, E. 2018. Platelet activity and hypercoagulation in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol,* 17**,** 141.

RAFIEIAN-KOPAEI, M., SETORKI, M., DOUDI, M., BARADARAN, A. & NASRI, H. 2014. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International journal of preventive medicine,* 5**,** 927-946.

RAHMAN, M. S. & WOOLLARD, K. 2017. Atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol,* 1003**,** 121-144.

RANDRIAMBOAVONJY, V. & FLEMING, I. 2012. Platelet function and signaling in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol,* 10**,** 532-8.

REHM, J., GREENFIELD, T. K. & ROGERS, J. D. 2001. Average volume of alcohol consumption, patterns of drinking, and all-cause mortality: results from the US National Alcohol Survey. *Am J Epidemiol,* 153**,** 64-71.

RIZVI, S., RAZA, S. T., AHMED, F., AHMAD, A., ABBAS, S. & MAHDI, F. 2014. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University medical journal,* 14**,** e157-e165.

SHANMUGANAYAGAM, D., BEAHM, M. R., OSMAN, H. E., KRUEGER, C. G., REED, J. D. & FOLTS, J. D. 2002. Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. *J Nutr,* 132**,** 3592-8.

SINGH, U. & JIALAL, I. 2006. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology,* 13**,** 129-42.

SPROSTON, N. R. & ASHWORTH, J. J. 2018. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in immunology,* 9**,** 754-754.

STEWART, J., MANMATHAN, G. & WILKINSON, P. 2017. Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM cardiovascular disease,* 6**,** 2048004016687211-2048004016687211.

TALEB, S. 2016. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis,* 109**,** 708-715.

TEIXEIRA, A., BAENAS, N., DOMINGUEZ-PERLES, R., BARROS, A., ROSA, E., MORENO, D. A. & GARCIA-VIGUERA, C. 2014. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int J Mol Sci,* 15**,** 15638-78.

THON, J. & ITALIANO, J. 2012. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. *Handbook of experimental pharmacology,* 210**,** 3-22.

TORRES, N., GUEVARA-CRUZ, M., VELÁZQUEZ-VILLEGAS, L. A. & TOVAR, A. R. 2015. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res,* 46**,** 408-26.

VANDER, A. J., SHERMAN, J. H. & LUCIANO, D. S. 2001. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*, McGraw-Hill.

VITSEVA, O., VARGHESE, S., CHAKRABARTI, S., FOLTS, J. D. & FREEDMAN, J. E. 2005. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Cardiovasc Pharmacol,* 46**,** 445-51.

VORCHHEIMER, D. & BECKER, R. 2006. Platelets in Atherothrombosis. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic,* 81**,** 59-68.

WATERHOUSE, A. 2002. Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 957**,** 21-36.

YOUNG, I. S. & WOODSIDE, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology,* 54**,** 176-186.

ZHOU, L. & SCHMAIER, A. H. 2005. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol,* 123**,** 172-83.

WORLD HEART FEDERATION, Cardiovascular disease - Risk factors. 2016.

OIV. 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture; International Organisation of Vine and Wine: Paris, France, 2019