ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Μεταγευματική επίδραση της κατανάλωσης εκχυλίσματος οινοποίησης σε δείκτες φλεγμονής σε φαινομενικά υγιείς γυναίκες»

ΣΩΦΡΟΝΑ ΦΙΛΙΤΣΑ Α.Μ.: 4521603

Αθήνα, 2021

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔ ΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ (επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΣΜΑΡΑΓΔΗ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΤΖΩΡΤΖΗΣ ΝΟΜΙΚΟΣ

Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Σωφρονά Φιλίτσα,

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 προσβάλλει 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 οποιαδήποτε μέσο ή/ και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους ασφαλείας και συντήρησης.

Ευχαριστίες

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, κα Φραγκοπούλου Ελισάβετ για την άριστη συνεργασία καθ' όλο αυτό το διάστημα. Ήταν πάντα διαθέσιμη να μου λύσει οποιαδήποτε απορία δημιουργούνταν και η συνεχής υποστήριξή της και εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν καθοριστικός παράγοντας για την ολοκλήρωση της διπλωματικής.

Ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτωρ Χολέβα Μαρία, για συνεργασία μας στην πειραματική διαδικασία. Η παρουσία της στο εργαστήριο, η βοήθειά της στις πειραματικές διαδικασίες και στην επίλυση οποιασδήποτε απορίας είχα, καθώς και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο, συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια, τους φίλους μου και τον Νίκο, για την υπομονή, κατανόηση, καθώς και την υποστήριξη που μου έδειξαν ο καθένας από αυτούς όλο αυτό το διάστημα.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ 17
Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου 21
Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου 23
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 23
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 26
1.5 Περιγραφή Αθηροσκλήρωσης στο επίπεδο του αγγείου 28
1.5 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί 37
1.5.1 Φλεγμονή 37
1.5.2 Οξειδωτικό στρες 39
1.5.2.1 Αμυντικά συστήματα έναντι των ελευθέρων ριζών 43
1.6 Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός-Μεταγευματική φλεγμονή 56
2. ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΥΡΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ 60
2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα κρασί και καρδιαγγειακά νοσήματα -«Γαλλικό παράδοξο» 60
2.2 Βιολογικές δράσεις του κρασιού στην υγεία του ανθρώπου 63
2.2.1 Σύσταση κρασιού 63
2.2.2 Βιολογικές δράσης αιθανόλης 66
2.2.3 Βιολογικές δράσεις μικροσυστατικών κρασιού 69
2.3 ΥΠΟ-ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ 72
2.3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ- ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΕΥΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ 72
ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ 73
ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ 73
2.3.2 ΕΙΔΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ 74
2.3.2.1 ΣΤΕΜΦΥΛΑ (μίγμα από φλούδες και σπόρους-grape pomace) 75
2.3.2.2 ΤΣΑΜΠΟΥΡΑ(κοτσάνια) 76
2.3.2.3 ΦΥΛΛΑ 77
2.3.2.4 ΟΙΝΟΛΑΣΠΕΣ (wine lees) 78
2.3.3 ΣΥΣΤΑΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ 79
2.3.3.1 Φαινολικά οξέα 79
2.3.3.1.1 Υδροξυβενζοϊκά οξέα 79
2.3.3.1.2 Υδροξυκινναμωμικά οξέα 79
2.3.3.2 Φλαβονοειδή 80

2.3.3.2.1 Φλαβονόλες 80
2.3.3.2.2 Φλαβανόλες 81
2.3.3.2.3 Ανθοκυανίνες 82
2.3.3.2.4 Προανθοκυανιδίνες 83
2.3.3.3 Στιλβένια 83
2.4 ΥΠΟΠΡΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΤΡΟΠΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 84
2.4.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ-ΥΓΡΟΥ 85
2.4.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΩΝ ΡΕΥΣΤΩΝ 86
2.4.3 ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟ ΝΕΡΟ (ASE) 87
2.4.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE) 88
2.4.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ(ΜΑΕ) 88
3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ 90
3.1 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ 90
3.2 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣΗΣ 95
3.2.1 IN VITRO ΔΕΔΟΜΕΝΑ 96
3.2.2 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ (in vivo) 101
4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 109
5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 110
5.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 110
5.1.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών 110
5.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο 110
5.1.3 Χαρακτηριστικά γεύματος 111
5.1.4 Πρωτόκολλο αιμοληψιών 113
5.2 Προσδιορισμός IL-6 -Μέθοδος ELIZA 114
5.3 Στατιστική επεξεργασία 118
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 119
Εισαγωγή 119
6.1 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση 119
6.2 Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση 121
6.3 Επίπεδα IL-6 κατά την έναρξη της μελέτης 124
6.4 Επίδραση των παρεμβάσεων στα επίπεδα IL-6 124
6.5 Επίδραση της παρέμβασης στην % μεταβολή των επιπέδων IL-6 126

6.6 Η επίδραση των παρεμβάσεων στα επίπεδα και στην % μεταβολή της IL-6 σε εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2 128

6.7 Η επίδραση των παρεμβάσεων στα επίπεδα και στην % μεταβολή της IL-6 σε υπέρβαρες εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2 130

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 133

8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ 139

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 139

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Εισαγωγή: Η φλεγμονή, κυρίως μεταγευματικά, αποτελεί έναν βασικό προδιαθεσικό παράγοντα στην αθηροσκλήρωση. Το κρασί περιέχει πληθώρα μικροσυστατικών που έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, και πιο γενικά καρδιοπροστατευτική δράση. Ωστόσο, η κατανάλωση κρασιού δεν μπορεί να γίνει σε υπέρμετρο βαθμό λόγω της αιθανόλης που περιέχει η οποία έχει και επιβλαβή δράση για τον οργανισμό. Γι' αυτό το λόγο, τα υπο-προϊόντα οινοποίησης αποτελούν καλή πηγή παρόμοιων μικροσυστατικών με αυτά που απαντώνται στο κρασί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον εμπλουτισμό τροφίμων . Υπάρχουν in vitro δεδομένα που υποστηρίζουν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των υπο-προϊόντων οινοποίησης, αλλά δεν υπάρχουν κλινικές δοκιμές που να μελετούν σε μεταγευματικό στάδιο την αντιφλεγμονώδη επίδραση των εκχυλισμάτων υπο-προϊόντων οινοποίησης.

Σκοπός: Της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η μεταγευματική επίδραση εκχυλίσματος υπο-προϊόντων οινοποίησης στα επίπεδα της IL-6.

Μεθοδολογία: Η μελέτη είναι μία διασταυρούμενη, διπλά τυφλή κλινική δοκιμή. Το δείγμα αποτελείται από 13 φαινομενικά υγιείς γυναίκες ηλικίας 25-30 ετών, οι οποίες κατανάλωσαν ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος και ταυτόχρονα έλαβαν το εκχύλισμα στεμφύλων ή το εικονικό εκχύλισμα (placebo). Έγινε λήψη αίματος πριν την κατανάλωση του γεύματος και για τις επόμενες 6 ώρες και μετρήθηκε η συγκέντρωση της κυτταροκίνης, ιντερλευκίνη 6 (IL-6) ,στο πλάσμα του αίματος.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα της μελέτης αφορούσαν 13 εθελόντριες, που έχουν ολοκληρώσει επιτυχώς και τις δύο παρεμβάσεις. Τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά δε διέφεραν μεταξύ των δύο παρεμβάσεων ($p<0,05$), καθώς και ούτε μεταξύ των ατόμων με ΔΜΣ>25kg/m^2(υπέρβαρες) ή ΔΜΣ<25kg/m^2(νορμοβαρείς). Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι τα μεταγευματικά επίπεδα IL-6, με τη λήψη του γεύματος πλούσιο σε λίπος, αυξάνονται με τη μέγιστη τιμή στις 3-4 ώρες. Επίσης φάνηκε ότι η παράλληλη κατανάλωση του εκχυλίσματος δεν οδηγεί σε κάποια σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων IL-6. Τέλος, όσον αφορά το διαχωρισμό με βάση το ΔΜΣ, φάνηκε ότι οι νορμοβαρείς εθελόντριες είχαν υψηλότερα επίπεδα IL-6 στη παρέμβαση με το εικονικό εκχύλισμα ($p<0,05$).

Συζήτηση: Το εκχύλισμα στεμφύλων σε νέες υγιείς γυναίκες δεν φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα της προφλεγμονώδης κυτταροκίνης IL-6 στο πλάσμα μετά την κατανάλωση γεύματος πλούσιο σε λίπος. Δεν μπορούν όμως ακόμα να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα καθώς η κλινική δοκιμή βρίσκεται υπό εξέλιξη.

ABSTRACT

Introduction: Inflammation, especially postpartum, is a major independent predictor of future cardiovascular events. Wine is a valuable source of micronutrients with cardio-protective effect, and more especially anti-inflammatory action. However, the consumption of wine cannot be made to an excessive extent, given that the presence of ethanol is a restrictive factor. Alternatively, winery by-products (especially grape pomace) is a cheap and rich source of similar-to wine microconstituents, which can be used either to enrich other foods or to be included in food supplements. There are in vitro data that support the anti-inflammatory properties of winery by-products, but there are no clinical trials to study the anti-inflammatory effect of these extracts.

Aim: The aim of this study is to determine the post-prandial effect of a grape pomace extract, in IL-6 levels, after a high-fat meal.

Methods: A cross-over, double-blind, placebo-controlled, acute clinical trial was conducted. Thirteen healthy women 25-34 years old, consumed a high fat meal along with the grape pomace supplement or the placebo. Blood was collected in a fasting state and after the meal consumption for 6 hours. The plasma concentration of pro-inflammatory cytokine, interleukin 6 (IL-6), was measured in serum sample.

Results: The results of the study concerned 13 volunteers, who have successfully completed both interventions. Anthropometric and biochemical characteristics did not differ between the two interventions ($p < 0.05$), nor between individuals with BMI> 25kg/m^2 (overweight) or BMI <25kg/m^2 (normal weight). The processing of the results showed that the postprandial IL-6 levels, with the intake of the fat-rich meal, increased with the maximum value in 3-4 hours. It also appeared that parallel consumption of the extract did not lead to any significant differentiation of IL-6 levels. Finally, in terms of BMI seperation, normalweight volunteers were found to have higher levels of IL-6 in placebo intervention ($p<0.05$).

Conclusion: The consumption of a supplement with grape pomace extract didn't seem to affect the plasma levels of pro-inflammatory cytokine IL-6 after eating a high-fat meal, in young healthy women. However, no safe conclusions can be drawn about the effectiveness of the extract until the completion of the study.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: *Αίτια θανάτων σε γυναίκες στην Ευρώπη* *19*
Εικόνα 2: *Αίτια θανάτων σε άνδρες στην Ευρώπη* *20*
Εικόνα 3: *Δομή ενδοθηλίου* ***Error! Bookmark not defined.***
Εικόνα 4: *Πολλαπλές λειτουργίες ενδοθηλίου* *30*
Εικόνα 5: *Η παρατεταμένη φλεγμονή οδηγεί σε ενδιθηλιακή βλάβη* *32*
Εικόνα 6: *Στάδια αθηρογένεσης* *35*
Εικόνα 7: *Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αθηρογένεσης σε επίπεδο αγγείου* ***Error! Bookmark not defined.***
Εικόνα 8: *Κυτταρικές πηγές ελευθέρων ριζών* *40*
Εικόνα 9: *Εμπλοκή οξειδωτικού στρες στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης* *41*
Εικόνα 10: *Σχηματισμός οξειδωτικών ριζών οξυγόνου μέσω ενζυμικών συστημάτων* *41*
Εικόνα 11: *Σχηματική αναπαράσταση της πρωτογενούς και δευτερογενούς αιμόστασης* *44*
Εικόνα 12: *Μονοκύτταρα/ μακροφάγα στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας* *48*
Εικόνα 13: *Κύτταρα που εμπλέκονται στην επίκτητη ανοσία* *51*
Εικόνα 14: *Ο ρόλος των φωσφολιποειδικών μεσολαβητών στην φλεγμονή και κατ' επέκταση στην αθηροσκλήρωση* *56*
Εικόνα 15: *Σχηματική απεικόνιση των χαρακτηριστικών του μεταγευματικού δυσμεταβολισμού* *57*
Εικόνα 16: *Πως οδηγεί η μεταγευματική υπεργλυκαιμία και λιπαιμία σε οξειδωτικό stress και φλεγμονή* *59*
Εικόνα 17: *Κίνδυνος θανάτου από όλα τα αίτια και καρδιαγγειακά νοσήματα σε σχέση με την κατανάλωση αλκοόλ* *61*
Εικόνα 18:*Επισκόπηση των επιμέρους συστατικών του κρασιού* *64*
Εικόνα 19: *Ευνοϊκές επιδράσεις των συστατικών του κρασιού για την παρεμπόδιση της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας* *71*
Εικόνα 20: *Στέμφυλα (grape pomace)* *75*
Εικόνα 21: *Τσάμπουρα (Κοτσάνια)* *77*
Εικόνα 22: *Αμπελόφυλλα* *77*
Εικόνα 23: *Οινολάσπες (wine lees)* *78*
Εικόνα 24:*Δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων* *79*
Εικόνα 25 *: Δομή υδροξυκινναμωμικών οξέων* *80*
Εικόνα 26 *:Δομή φλαβονολών* *81*
Εικόνα 27*:Δομή φλαβανολών* *82*
Εικόνα 28: *Δομή ανθοκυανινών* *82*
Εικόνα 29*: Δομή προανθοκυανιδίνων* *83*
Εικόνα 30*: Δομή στιλβενίων* *84*
Εικόνα 31: *Στάδια ELIZA* *115*
Εικόνα 32*: Δείγματα πρότυπης καμπύλης* *117*

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: *Προϊόντα εμπλουτισμένα με στέμφυλα κρασιού από τη βιβλιογραφία* *93*
Πίνακας 2: *Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες υπο-προϊόντων οινοποίησης και κρασιού in vitro* *98*
Πίνακας 3: *Κλινικές δοκιμές μακροχρόνιας δράσης υπο-προϊόντων οινοποίησης σε δείκτες φλεγμονής* *104*
Πίνακας 4*: Κλινικές δοκιμές για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του κρασιού σε μεταγευματικό στάδιο* *106*
Πίνακας 5: *Διατροφική ανάλυση του Τοστ 1* *112*
Πίνακας 6*: Διατροφική ανάλυση του Τοστ 2* *112*
Πίνακας 7 *: Συνολικό γεύμα* *113*
Πίνακας 8*: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση* *120*
Πίνακας 9: *Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά σε εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2* *121*
Πίνακας 10: *Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά σε εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2* *121*
Πίνακας 11: *Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση* *122*
Πίνακας 12: *Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες σε εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2* *123*
Πίνακας 13: *Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες σε εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2* *123*
Πίνακας 14: *Επίπεδα IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις* *125*
Πίνακας 15: *% Μεταβολή επιπέδων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις* *127*
Πίνακας 16: *Τα επίπεδα IL-6 των εθελοντριών φυσιολογικού βάρους (ΔΜΣ<25kg/m^2) στις δύο παρεμβάσεις* *128*
Πίνακας 17: *% Μεταβολή επιπέδων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις σε φυσιολογικού βάρους εθελόντριες (ΔΜΣ<25kg/m^2)* *129*
Πίνακας 18: *Τα επίπεδα IL-6 σε υπέρβαρες εθελόντριες και στις δύο παρεμβάσεις* *130*
Πίνακας 19: *% Μεταβολή επιπέδων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις σε υπέρβαρες εθελόντριες* *131*

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1*: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς* *117*
Σχήμα 2: *Μεταβολή συγκεντρώσεων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις* *126*
Σχήμα 3*:Μεταβολή συγκεντρώσεων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις για ΔΜΣ<25kg/m²και ΔΜΣ>25kg/m²* *132*

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A_2AP A_2 antiplasmin- A_2 αντιπλασμίνη

ASE Accelerated solvent extraction and subcritical water, Επιταχυνόμενη εκχύλιση με υπερκρίσιμο νερό

CAT Catalase, Καταλάση

CRP C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

CVD Cardiovascular diseases, Καρδιαγγειακές ασθένειες

ELIZA Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Ενζυμική Ανοσοδοκιμασία ELIZA

eNOS Endothelial Nitric Oxide Synthase, ενδοθηλιακή συνθετάση νιτρικού οξειδίου

FMD Flow Mediated Dilation, Διαστολή μεσολαβούμενη από ροή

GE Gallic Acid Equivalents, Ισοδύναμα γαλλικού οξέος

GP Grape pomace- στέμφυλα

GPx Glutathione Peroxidase, Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GSE Grape Seed Extract, Εκχύλισμα καρπού σταφυλιού

GSH Glutathione, Γλουταθείονη

H_2O_2 Υπεροξείδιο υδρογόνου

HDL High density lipoprotein, Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη

HOMA Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance- Ομοιοστατικό μοντέλο εκτίμησης της αντοχής στην ινσουλίνη

HUVECs Human uvblical vein endothelial cells, Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής χώρας

ICAM-1 Intercellular Adhesion Molecule-1, Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1

IFN-γ Interferon gamma, Ιντερφερόνη-γ

IL-1 Interleukin 1, Ιντερλευκίνη 1

IL-10 Interleukin 10, Ιντερλευκίνη 10

IL-4 Interleukin 4, Ιντερλευκίνη 4

IL-6 Interleukin 6, Ιντερλευκίνη 6

iNOS Inducible Nitric Oxide Synthase, Επαγόμενη συνθετάση νιτρικού οξειδίου

LDL Low density lipoprotein, Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη

LOX Lipooxygenase, Λιποοξυγονάσες

Lp(a) Lipoprotein a, Λιποπρωτεϊνη α

$LpPLA_2$ Lipoprotein-associated Phospholipase A_2- Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση Α2

LRP Leukocyte rich plasma, πλάσμα πλούσιο σε λευκοκύτταρα

Lyso-PAF AT Acetyl-CoA Lyso-PAF Acetyltransferase, Ακέτυλο συνένζυμο Α-Λυσο-PAF-ακετυλοτρανσφεραση

MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein-1, Μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεϊνη 1

M-CSF Macrophage-colony stimulating factor-1

MPO Μυελϋπεροξειδάσες

MUFA Monounsaturated fatty acid, Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα

NL Neutral Lipids, Ουδέτερα Λιποειδή

NO Nitric Oxide, Μονοξείδιο του Αζώτου

NOS Nitric Oxide Synthase, Συνθάση μονοξειδίου του αζώτου

NOX Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase-Οξειδάση NADPH

$ONOO^-$ Υπεροξυνιτρώδες ανιόν

Ox-LDL oxidative LDL, οξειδωμένη LDL

P Plasma, Πλάσμα

PAF Platelet Activating Factor, Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

PAF-CPT PAF-cholinephosphotransferase, PAF-χολινοφωσφοτρνασφεράση

PAI-1 Plasminogen Activator Inhibitor-1, Αναστολές ενεργοποίησης πλασμινογόνου-1

PAI-2 Plasminogen Activator Inhibitor-2, Αναστολέας ενεργοποίησης πλασμινογόνου-2

PECAM-1 Platelet endothelial cell adhesion molecules-1, Αιμοπεταλιακά ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης -1

PGE_2 Prostaglandin E_2, Προσταγλανδίνη E_2

PRP Platelet rich plasma, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

PUFA Polyunsaturated fatty acid, Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

RNS Reactive nitrogen species, Ενεργές ρίζες αζώτου

ROS Reactive oxygen species, Ενεργές ρίζες οξυγόνου

SdWP Seed Wine Pomace

SFE Supercritical Fluid Extraction, Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό

SkWP Skin Wine Pomace

SOD Superoxide dismutase, Δισμουτάση υπεροξειδίου υδρογόνου

SOD Superoxide Dismutase, Υπεροξειδική Δυσμουτάση

TC Total Cholesterol, Ολική χοληστερόλη

TEAC Trolox equivalent antioxidant capacity, Ισοδύναμης αντιοξειδωτικής ικανότητας

TF Tissue Factor, Ιστικός παράγοντας

TG Triglyceride, Τριγλυκερίδια

TGF-β Transforming Growth Factor, Μετατρεπτικός Παράγοντας Ανάπτυξης

TL Total lipids, Ολικά λιποειδή

TNF-a Tumor Necrosis Factor-a, Παράγοντας νέκρωσης όγκων α

t-PA Tissue Plasminogen activator, Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου

uPA Urokinase-type plasminogen activator, Ενεργοποιητής ουροκινάσης

VCAM-1 Vascular Cell Adhesion Molecule-1, Μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1

VLDL Very low density lipoprotein, Πολύ χαμηλής πυκνότητα λιποπρωτεϊνη

VWF von Willebrand factor, Παράγοντας von Willebrand

WP Wine pomace

WWP Whole Wine Pomace

XO Xanthine Oxidase, Οξειδάση της ξανθίνης

ΑΕΕ Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο

ΔΜΣ Δείκτη Μάζα Σώματος

MMPs Matrix Metalloproteinase, Μεταλλοπρωτεϊνασες της μήτρας

NKT Natural Killer T-cells, Φυσικά Κυτταροκτόνα κύτταρα

ΣΔ Σακχαρώδης Διαβήτης

TxA_2 Thromboxane A_2 ,Θρομβοξάνη A_2

8-iso-PGF2a 8-iso-prostaglandin F2a, 8-ισο προσταγλανδίνη F2a

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

1.2 Εισαγωγή-Ορισμός-Κλινικές εκδηλώσεις

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ο όρος καρδιαγγειακά νοσήματα αναφέρεται σε μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων όπου περιλαμβάνονται: η στεφανιαία νόσο (έμφραγμα), το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η υπέρταση, η περιφερειακή αρτηριοπάθεια, η ρευματική καρδιακή νόσο, η συγγενή καρδιοπάθεια και η καρδιακή ανεπάρκεια [2].

Η στεφανιαία νόσος είναι η σοβαρότερη των καρδιαγγειακών νοσημάτων και αποτελεί το κύριο αίτιο θνησιμότητας στην Ευρώπη που ευθύνεται για σχεδόν 2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως. Οι κλινικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου ποικίλλουν ανάλογα με το είδος και το βαθμό της αθηρωμάτωσης που υπάρχει στις στεφανιαίες αρτηρίες και περιλαμβάνουν την σταθερή και ασταθή στηθάγχη, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Μάλιστα φαίνεται ότι η στεφανιαία νόσος πιθανόν να μην έχει εμφανή συμπτώματα όταν βρίσκεται σε αρχικά στάδια, αφού η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης λαμβάνει χώρα προοδευτικά [3]. Οι κλινικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου είναι:

1) Η στηθάγχη είναι η πιο συχνή εκδήλωση της στεφανιαία νόσου και χαρακτηρίζεται από οπισθοστερνική δυσφορία που συνήθως εκδηλώνεται ως πόνος και μερικές φορές ως πίεση, αίσθημα καύσου ή δύσπνοιας, και βάρος [4]. Η στηθάγχη χωρίζεται σε δύο μορφές, τη σταθερή και την ασταθή στηθάγχη. Η σταθερή στηθάγχη είναι μία κλινική κατάσταση που παθοφυσιολογικά χαρακτηρίζεται από διαταραχές της ισορροπίας μεταξύ του προσφερόμενου οξυγόνου και των αναγκών του μυοκαρδίου σε οξυγόνο χωρίς την παρουσία νέκρωσης του μυοκαρδίου. Η απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών από

αθηροσκλήρωση αποτελεί την κυριότερη και πιο συχνή αιτία χαμηλής προσφοράς οξυγόνου στο μυοκάρδιο. Η σταθερή στηθάγχη μπορεί να προκύψει από παράγοντες που αυξάνουν τις καρδιακές ανάγκες σε οξυγόνο, όπως είναι η φυσική δραστηριότητα, το κάπνισμα, το άγχος και η έκθεση στο κρύο. Όσον αφορά την ασταθή στηθάγχη πρόκειται για ένα κλινικό σύνδρομο που βρίσκεται στο όριο μεταξύ της σταθερής στηθάγχης και του εμφράγματος του μυοκαρδίου ή του αιφνίδιου θανάτου. Η ασταθής στηθάγχη χαρακτηρίζεται από τα συμπτώματα στηθάγχης σε περίοδο ξεκούρασης ή κατά τη διάρκεια πολύ χαμηλής έντασης φυσικής δραστηριότητας [4].

2) Το έμφραγμα του μυοκαρδίου αναφέρεται στη νέκρωση του μυοκαρδιακού ιστού λόγω ανεπαρκούς τροφοδοσίας στο μυοκάρδιο με αίμα. Φαίνεται ότι σε αρκετές περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου προϋπάρχει βαριά αθηροσκληρυντική βλάβη. Τα κλινικά συμπτώματα του εμφράγματος του μυοκαρδίου περιλαμβάνουν τη τυπική στηθάγχη, θωρακικό άλγος παρατεταμένης όμως διάρκειας και έντασης, ενώ συχνά εκδηλώνεται και αντανακλαστικός πόνος σε άλλα μέρη του σώματος, όπως στα άνω άκρα, στο σαγόνι, στο λαιμό, στην πλάτη κτλ. καθώς και ζάλη, εφίδρωση και δύσπνοια

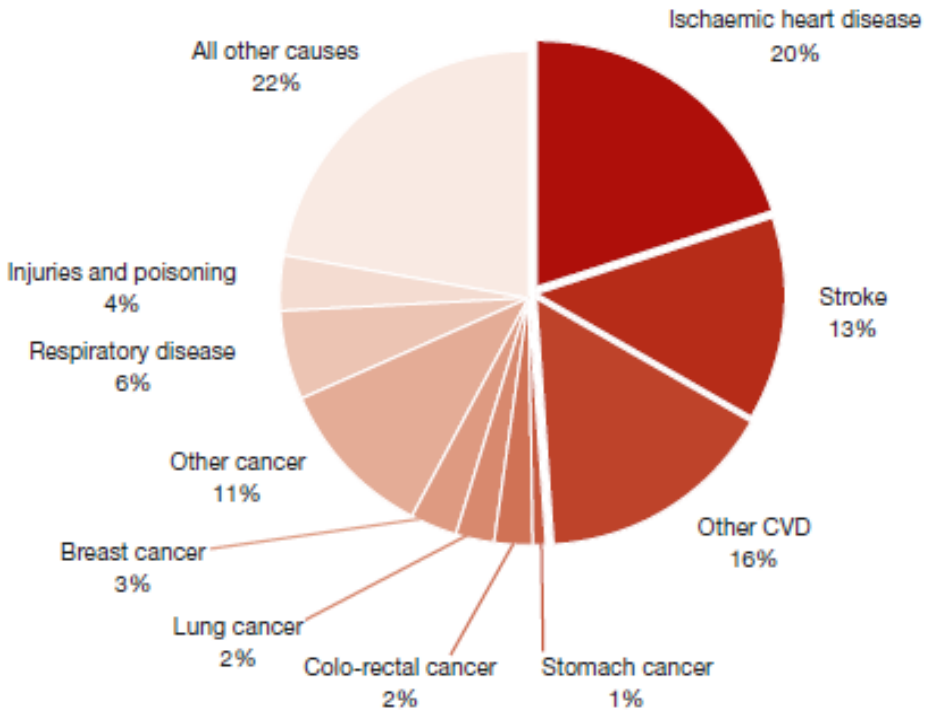
3) Τέλος, ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος, αποτελεί μία όχι και τόσο σπάνια επιπλοκή της στεφανιαίας νόσου. Μάλιστα, σύμφωνα με την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρεία, η στεφανιαία νόσος και οι επιπλοκές της ευθύνονται για το 80% περίπου των αιφνίδιων καρδιακών θανάτων, ενώ οι μισοί θάνατοι που οφείλονται σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εκδηλώνονται ως αιφνίδιοι θάνατοι. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι στο ¼ περίπου των περιπτώσεων, ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος αποτελεί την πρώτη και μοναδική εκδήλωση της νόσου [5].

1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα

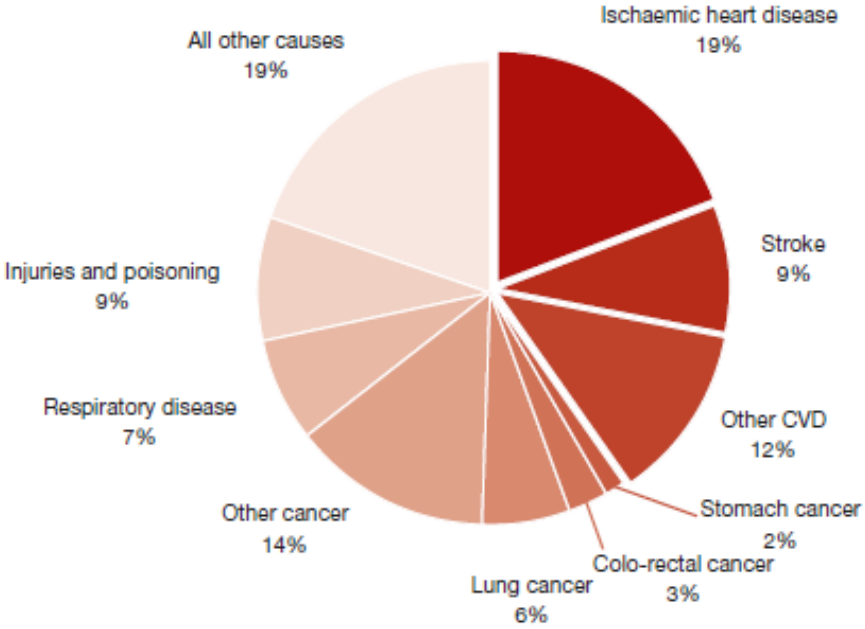
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Επομένως, τόσο η αντιμετώπιση, όσο και η πρόληψη τους, κρίνεται υψίστης σημασίας. Σύμφωνα με στοιχεία του WHO , τα καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν υπεύθυνα για το 1/3 περίπου των θανάτων για το 2016, το

οποίο ισοδυναμεί με 17,9 εκατομμύρια θανάτους ανά τον κόσμο, με το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου να ευθύνονται για το 85 % αυτών [6]. Εκτιμάται ότι τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται με γρήγορους ρυθμούς και ότι έως το 2030 θα έχουν ανέλθει στους 23,3 εκατομμύρια θανάτους ετησίως[7, 8].

Όσον αφορά, συγκεκριμένα, τα επιδημιολογικά δεδομένα στην Ευρώπη η Ευρωπαϊκή Εταιρία Καρδιολογίας (ESC) αναφέρει ότι τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την 1η αιτία θανάτου, με ποσοστό 47% των ετήσιων θανάτων [9]. Από το ευρύ φάσμα των καρδιαγγειακών νοσημάτων, η στεφανιαία νόσος αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου, υπεύθυνη για το 20% των θανάτων, ενώ ακολουθεί το ΑΕΕ. Περισσότερες γυναίκες πεθαίνουν από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) (13% σε σχέση με τους άνδρες 9%), ενώ η ισχαιμική καρδιοπάθεια οδηγεί περίπου σε παρόμοιο αριθμό θανάτων και στα δύο φύλα [1] (Εικόνα 1-2).



***Εικόνα 1**: Αίτια θανάτων σε γυναίκες στην Ευρώπη [1]*



Εικόνα 2: *Αίτια θανάτων σε άνδρες στην Ευρώπη [1]*

Στον Ελληνικό πληθυσμό, η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα είναι σχετικά χαμηλή. Από τη Μελέτη των 7 χωρών, που πραγματοποιήθηκε τη δεκαετία του ΄60, παρατηρήθηκε ότι οι Έλληνες είχαν πολύ χαμηλή θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα. Ωστόσο, τα επίπεδα αυτά έχουν πλέον αυξηθεί [3]. Όσον αφορά στον επιπολασμό της νόσου, τα νεότερα δεδομένα που διαθέτουμε είναι αυτά της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ από την οποία προκύπτει ότι αντιστοιχεί στο 11% για τους άνδρες και στο 6,1% για τις γυναίκες, ποσοστά αρκετά χαμηλότερα από τις υπόλοιπες χώρες της Ευρώπης [10].

Η Στεφανιαία νόσος ή ισχαιμική καρδιακή νόσος είναι η συχνότερη νόσος από τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ενώ αποτελεί και την βασικότερη αιτία για ανακοπή. Η στεφανιαία νόσος είναι το αποτέλεσμα της στένωσης των στεφανιαίων αρτηριών , μέσω της διαδικασίας της αθηρωμάτωσης, η οποία και θα αναλυθεί παρακάτω. Η αθηρωμάτωση των στεφανιαίων αρτηριών είναι η πιο συχνή αιτία ισχαιμίας του μυοκαρδίου δηλαδή μειωμένης τροφοδότησης αίματος προς το μυοκάρδιο, λόγω παρουσίας λιπαρών γραμμώσεων στο εσωτερικό των στεφανιαίων αρτηριών [3].

1.4 Παράγοντες κινδύνου (τροποποιήσιμοι και μη-τροποποιήσιμοι)

Ο όρος ***παράγοντας κινδύνου*** περιγράφει εκείνα τα χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Επιδημιολογικές μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία 50 χρόνια κατέδειξαν πάνω από 200 παράγοντες κινδύνου που συμμετέχουν στην αθηροσκλήρωση [11]. Οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να διαχωριστούν σε δυο κατηγορίες: τους τροποποιήσιμους, αυτούς δηλαδή που μπορούν να τροποποιηθούν και να περιοριστούν, όπως ο τρόπος ζωής, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και τους μη τροποποιήσιμους, οι οποίοι δεν είναι δυνατό να τροποποιηθούν, όπως είναι το φύλο, η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό του ατόμου [3].

Τα τελευταία χρόνια έχει διατυπωθεί η άποψη ότι εκτός από τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου υπάρχουν και άλλες παράμετροι που έχουν προγνωστική και πιθανή παθογενετική σημασία για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου [3].

Οι νεώτεροι αυτοί παράγοντες κινδύνου είναι επιγραμματικά οι εξής :

- ✓ Υπερτροφία της αριστερής κοιλίας
- ✓ Αυξημένα επίπεδα ομοκυστεϊνης
- ✓ Αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (TG)
- ✓ Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)]
- ✓ Οξειδωτικό στρες
- ✓ Λοιμώδεις παράγοντες
- ✓ Δείκτες φλεγμονής (π.χ. C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) και
- ✓ Αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου και άλλων θρομβωτικών παραγόντων

Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα συμπεριλαμβάνονται το φύλο, η ηλικία, η φυλή/ εθνικότητα, το οικογενειακό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου καθώς και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση.

ΦΥΛΟ

Πλήθος μελετών έχουν συσχετίσει το ανδρικό φύλο με υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε μικρότερη ηλικία από ότι το γυναικείο φύλο. Γεγονός το οποίο οφείλεται στην προστατευτική δράση των οιστρογόνων που παράγονται στις γυναίκες κατά την αναπαραγωγική περίοδο [12]. Ωστόσο, ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων στις γυναίκες φαίνεται να έχει υποτιμηθεί, καθώς τα ποσοστά καρδιαγγειακών νοσημάτων δεν παρουσιάζουν τόσο μεγάλες διαφορές στα δύο φύλα, ειδικά με την αύξηση της ηλικίας. Ιδιαίτερη συνιστώσα αποτελεί το γεγονός ότι κάποιοι παράγοντες κινδύνου έχουν άλλη βαρύτητα ανάλογα με το φύλο, όπως για παράδειγμα η παρουσία σακχαρώδη διαβήτη φαίνεται να αυξάνει περισσότερο τον καρδιαγγειακό κίνδυνο στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες [13, 14].

ΗΛΙΚΙΑ

Η ηλικία αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μη τροποποιήσιμους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Φαίνεται ότι τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι παρατηρούνται κάποιες διαφορές ανάλογα με το φύλο, καθώς στους άνδρες ο κίνδυνος αυξάνεται σε ηλικία >45 ετών, ενώ στις γυναίκες >55 ετών [14].

ΦΥΛΗ/ ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ

Φαίνεται ότι τα άτομα που προέρχονται από περιοχές Νοτίου Ασίας, Αφρικής ή Καραϊβικής έχουν υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο καθώς και υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη ΙΙ, ο οποίος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την καρδιαγγειακή νόσο [15, 16]. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα άτομα με την αναφερθείσα καταγωγή είναι πιο επιρρεπή σε αυξημένη αρτηριακή πίεση και συνεπώς σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο . Αντίθετα οι Ευρωπαίοι φαίνεται ότι έχουν τον χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [17].

- **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΠΡΩΙΜΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ Ή ΑΛΛΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου σε συγγενείς πρώτου βαθμού ηλικίας <55 έτη για άνδρες και <65 έτη για γυναίκες προκαλεί αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο για το ίδιο το άτομο. Καθώς επίσης και το οικογενειακό ιστορικό άλλων παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως είναι η αρτηριακή υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης, αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης μεμονωμένα αυτών των νοσημάτων αλλά και κατ' επέκταση καρδιαγγειακής νόσου [14, 17].

- **ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ**

Σημαντικός παράγοντας εμφάνισης καρδιαγγειακού νοσήματος αποτελεί επίσης και το χαμηλό κοινωνικο-οικομικό επίπεδο. Παρόλο που υπάρχουν περίπλοκες σχέσεις πίσω από αυτό, οι διατροφικές συνήθειες φαίνεται να διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο καθώς τα άτομα υψηλότερου κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη πρόσβαση σε μία ισορροπημένη διατροφή [18].

Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Οι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου έχει βρεθεί ότι εξηγούν πάνω από το 90% του κινδύνου για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και περιλαμβάνουν τόσο συμπεριφοριστικούς (πχ. Σωματική αδράνεια, χρήση καπνού, κακή διατροφή κ.α.), όσο και κλινικούς παράγοντες (πχ. Σακχαρώδης Διαβήτης, Υπέρταση, Δυσλιπιδαιμία κ.α.) [19].

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

- **ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ**

Ένας από τους πιο βασικούς ανεξάρτητους παράγοντες εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου ΙΙ. Τα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη σύμφωνα με τη Βρετανική Ένωση Καρδιάς φαίνεται να έχουν 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) [17], ενώ η εμφάνιση στεφανιαίας νόσου αποτελεί τη πιο συχνή επιπλοκή του ΣΔ καθώς και τη κύρια αιτία θανάτου σε διαβητικά άτομα.

Η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία και η αρτηριακή υπέρταση, τα οποία αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, εμφανίζονται πιο συχνά σε διαβητικά άτομα, καθιστώντας τις δύο αυτές παθήσεις άμεσα συνδεδεμένες [20].

Η προσκόλληση σε ένα ισορροπημένο πρότυπο διατροφής, η απώλεια πλεονάζοντος βάρους, η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, η διακοπή του καπνίσματος και σε ενιαία βάση η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής μπορεί να συμβάλλει στη ρύθμιση του σακχαρώδη διαβήτη ή και να αναστρέψει τον διαβήτη ή να αναστρέψει μία προδιαβητική κατάσταση και επομένως, να μειώσει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο [21].

ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η υπέρταση αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθώς και τον πιο σημαντικό παράγοντα εμφάνισης ισχαιμικού και αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η αυξημένη αρτηριακή πίεση αποτελεί την πιο σημαντική αιτία πρόωρου θανάτου παγκοσμίως [22]. Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά προσέγγιση το 50% των περιστατικών καρδιακών προσβολών και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων έχουν συσχετιστεί με υψηλή αρτηριακή πίεση [21]. Η αυξημένη πίεση αίματος στα αιμοφόρα αγγεία σχετίζεται με σκλήρυνση των αρτηριακών τοιχωμάτων και στένωση των αρτηριών, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα φραγής κάποιας αρτηρίας είτε από θρόμβους, είτε από λιπώδεις γραμμώσεις[22]. Έχει υπολογισθεί ότι μείωση της διατροφικής πρόσληψης νατρίου (Na) κατά 1gr ημερησίως, περίπου 3gr άλατος, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση κατά 50% των ατόμων που χρειάζονται αντιυπερτασική θεραπεία, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πτώση κατά 22% των θανάτων που οφείλονται σε εγκεφαλικά επεισόδια καθώς και σε πτώση κατά 16% των θανάτων που οφείλονται σε στεφανιαία νόσο [22].

ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ

Τα διαταραγμένα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα (δυσλιπιδαιμία), φαίνεται ότι συσχετίζονται με τον υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου [23]. Τα υψηλά επίπεδα ολικής, LDL-χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, καθώς και τα χαμηλά επίπεδα HDL

χοληστερόλης στο αίμα, αποτελούν παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου και ευθύνονται περίπου για το 1/3 των καρδιαγγειακών νοσημάτων σε παγκόσμιο επίπεδο.

Πιο συγκεκριμένα, η LDL χοληστερόλη έχει καθοριστική σημασία στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μείωση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης κατά 10%, σε άνδρες μέσης ηλικίας, μπορεί να οδηγήσει σε 50% μείωση της εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου μέσα σε 5 χρόνια. Τα μόρια της LDL χοληστερόλης έχουν αθηρογόνο δράση στον οργανισμό, καθώς μπορούν να διεισδύσουν στο ενδοθήλιο των αρτηριών, να οξειδωθούν και να προωθήσουν τη φλεγμονώδη διαδικασία, προκαλώντας βλάβη στο ενδοθήλιο των αρτηριών [23].

Αντίθετα, η HDL χοληστερόλη έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση για τον οργανισμό. Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης HDL φαίνεται να συσχετίζονται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, ενώ η προστατευτική δράση των οιστρογόνων σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της HDL [22].

ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ/ ΥΠΕΡΒΑΡΟ

Η παχυσαρκία και το υπέρβαρο αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, καθώς και άλλων νοσημάτων όπως σακχαρώδη διαβήτη ΙΙ, δυσλιπιδαιμία και αυξημένη αρτηριακή πίεση. Πιο συγκεκριμένα η κατανομή σωματικού λίπους, ειδικά στην περιοχή της μέσης, συσχετίζεται ισχυρά με την ανάπτυξη καρδιακής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου[24].

Σε αυξημένα επίπεδα φαίνεται να κυμαίνεται η παχυσαρκία σε εφηβική αλλά και παιδική ηλικία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 2016 41 εκ. παιδιά κάτω από την ηλικία των 5 ετών και πάνω από 340 εκ. παιδιά και έφηβοι 5-19 ετών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι. Στην παιδική ηλικία, ο αυξημένος Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου στην ενήλικη ζωή, ενώ στην εφηβική ηλικία φαίνεται να συσχετίζεται με διπλάσιο κίνδυνο θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο στην ενήλικη ζωή [25-27].

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Το κάπνισμα είναι ο σημαντικότερος τροποποιήσιμος συμπεριφοριστικός παράγοντας κινδύνου που αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το κάπνισμα αποδίδεται για το 30-40% του συνόλου των θανάτων από καρδιαγγειακή νόσο σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι καπνιστές φαίνεται ότι έχουν 2-4 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, καθώς και 2-3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας από αυτή σε σχέση με τους μη-καπνιστές. Σύμφωνα με τον Αμερικάνικο Σύλλογο Καρδιάς (AHA) εκτιμάται ότι 46.000 μη-καπνιστές πεθαίνουν ετησίως από καρδιαγγειακά νοσήματα λόγω παθητικού καπνίσματος [28, 29]. Επομένως , γι αυτό το λόγο οι καπνιστές θα πρέπει να στοχεύουν στην αποχή από το κάπνισμα και όχι μόνο στη μείωσή του. Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, φάνηκε ότι η διακοπή του καπνίσματος μείωσε σημαντικά τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και δεν παρατηρήθηκαν κλινικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων που δεν κάπνισαν ποτέ, των ατόμων που έκοψαν σχετικά πρόσφατα το κάπνισμα και των πρώην καπνιστών, αποδεικνύοντας ότι η ολική αποχή από το κάπνισμα είναι υψίστης σημασίας για την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων [28, 30].

ΑΛΚΟΟΛ

Σύμφωνα με δεδομένα μελετών φαίνεται ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μειώνει την επίπτωση της πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο φαίνεται ότι υψηλό ποσοστό ανδρών και γυναικών, 39% και 21% αντίστοιχα, καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες αλκοόλ από τις συνιστώμενες [3]. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η υπερκατανάλωση αλκοόλ έχει δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία, αυξάνοντας την αρτηριακή πίεση καθώς και το επίπεδο των τριγλυκεριδίων στο αίμα [19]. Αναδύεται λοιπόν επιτακτική η ανάγκη μικρής προς μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες, με σύσταση 2 ποτά/ημέρα και 1 ποτό/ημέρα αντίστοιχα, σε στόχο την προστατευτική δράση έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων [31].

ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Ο ρόλος της διατροφής είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Η διατροφή αποτελεί σημείο κλειδί και η αλλαγή της μπορεί να επηρεάσει όλους τους άλλους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Η προσκόλληση σε ένα πρότυπο διατροφής το οποίο είναι πλούσιο σε κορεσμένο λίπος, trans λιπαρά οξέα, απλά σάκχαρα και φτωχό σε πολυακόρεστα (PUFA), μονοακόρεστα (MUFA) λιπαρά οξέα και φυτικές ίνες φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Το παραπάνω πρότυπο διατροφής εκτιμάται ότι προκαλεί περίπου το 31% των στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων και το 11% των εγκεφαλικών επεισοδίων παγκοσμίως [22]. Αντίθετα η προσκόλληση σε ένα ισορροπημένο πρότυπο διατροφής, με μειωμένη πρόσληψη κορεσμένου λίπους και απλών σακχάρων αλλά πλούσιο σε φρούτα και λαχανικά, φαίνεται να συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης νέου καρδιακού επεισοδίου κατά 73%, καθώς επηρεάζει θετικά παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως τα διαταραγμένα επίπεδα γλυκόζης, τη παχυσαρκία / υπέρβαρο αλλά και τα επίπεδα λιπιδίων αίματος και αρτηριακής πίεσης [22].

ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΔΡΑΝΕΙΑ

Προοπτικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η σωματική αδράνεια αυξάνει την καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Στην αντίθετη πλευρά, η μέτρια φυσική δραστηριότητα όπως το περπάτημα, μειώνει σημαντικά την επίπτωση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου καθώς επηρεάζει θετικά κλασικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως το αυξημένο σωματικό βάρος, την αρτηριακή πίεση και τα επίπεδα λιπιδίων [32, 33]. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Καρδιάς, συστήνεται άσκηση μέτρια έντασης, διάρκειας 150 λεπτών την εβδομάδα που μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο κατά 30%. Ωστόσο και μικρή αύξηση της φυσικής δραστηριότητας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [14, 22].

1.5 Περιγραφή Αθηροσκλήρωσης στο επίπεδο του αγγείου

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μία πολυπαραγοντική παθολογική διαδικασία, η οποία προϋπάρχει πολλών καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πρόκειται για μια προοδευτική φλεγμονώδη παθολογική διεργασία, που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση λιπιδίων και ινώδους ιστού στον έσω χιτώνα από υπενδοθηλιακή εναπόθεση στις μεσαίου και μεγάλου μεγέθους αρτηρίες καθώς και από παρουσία στοιχείων φλεγμονής [12, 34, 35]. Η διαταραχή αυτή αρχίζει ήδη από την παιδική ηλικία, εξελίσσεται αργά μέχρι τη γεροντική ηλικία κατά την οποία είναι πλέον πολύ εκτεταμένη. Παρουσία όμως επιβαρυντικών παραγόντων εξελίσσεται πολύ πιο γρήγορα με σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία [12]. Θεωρείται ότι η γενετική προδιάθεση συμβάλλει κατά 50% στην αθηροσκληρυντική διαδικασία ενώ το άλλο 50% μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντικές επιδράσεις [36]. Η στεφανιαία νόσος (ΣΝ), το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) και η περιφερική αρτηριοπάθεια (ΡΑ) αποτελούν κύριες κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρωσης.

Η διαδικασία της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας θα μπορούσε να περιγραφεί σε 5 κύρια βήματα:

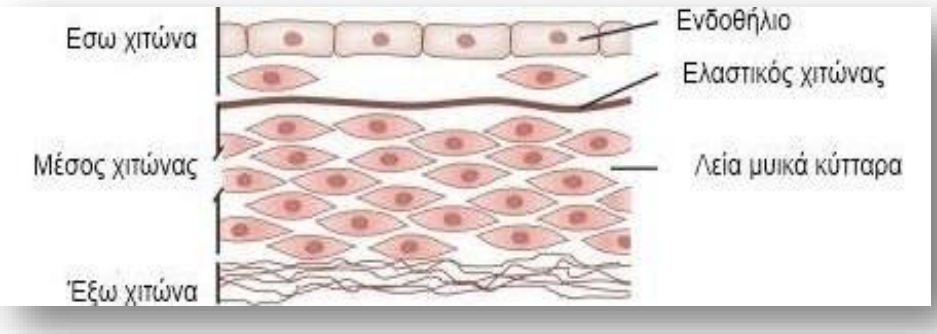
1. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
2. Διήθηση μορίων LDL και λευκοκυττάρων εσωτερικά του ενδοθηλίου - Οξείδωση των μορίων LDL
3. Δημιουργία αφρωδών κυττάρων
4. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων στο υποενδοθήλιο
5. Βλάβη στη δομή του ενδοθηλίου, που οδηγεί σε συσσώρευση αιμοπεταλίων και δημιουργία θρόμβου

1. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Φυσιολογικά, το τοίχωμα των αρτηριών αποτελείται από 3 στιβάδες,

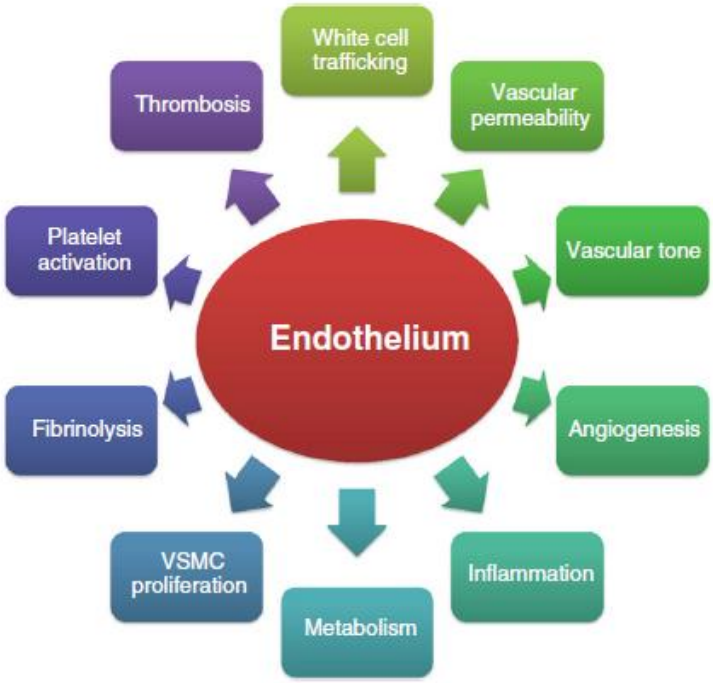
- **τον έξω χιτώνα,** ένα εξωτερικό στρώμα ινοελαστικού συνδετικού ιστού,
- **το μέσο (μυϊκό) χιτώνα,** ένα ενδιάμεσο στρώμα λείων μυϊκών ινών και ινών ελαστίνης

- **Και τον έσω χιτώνα,** που είναι το εσωτερικό και λεπτότερο στρώμα. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από μια στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που επικαλύπτουν τον αγγειακό αυλό και ονομάζεται ***ενδοθήλιο***, καθώς και από μία ποσότητα υπενδοθηλιακού ινοελαστικού στρώματος συνδετικού ιστού, που διαχωρίζουν τον αγγειακό αυλό με τη ροή του αίματος [37]. Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει τη δομή του αρτηριακού τοιχώματος:



Εικόνα 3*: Δομή ενδοθηλίου*

Το ενδοθήλιο καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια όλων των αγγείων του οργανισμού, των αρτηριών, των τριχοειδών, και των φλεβών [38] και όπως προαναφέρθηκε αποτελεί συστατικό του έσω χιτώνα του τοιχώματος που έρχεται σε επαφή με το αίμα [12]. Το ενδοθήλιο παρουσιάζει μία πληθώρα λειτουργιών, οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη φυσιολογική όσο και την παθοφυσιολογική λειτουργία του αγγείου. Το ενδοθήλιο αποτελεί τον μεγαλύτερο μεταβολικό ιστό του ανθρώπου διαθέτοντας αυτοκρινική, παρακρινική καθώς και ενδοκρινική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα το ενδοθήλιο είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου καθώς εκκρίνει ουσίες με αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, όπως η προστακυκλίνη και το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και ουσίες με αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες, όπως η ενδοθηλίνη-1. Το ενδοθήλιο ρυθμίζει ,επίσης, τη ρευστότητα και τη πήξη του αίματος καθώς παράγει ουσίες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet activating factor,PAF), στο ινωδολυτικό σύστημα (π.χ t-Pa) και στους καταρράκτες πήξης . Εν κατακλείδι, το ενδοθήλιο ρυθμίζει και την φλεγμονώδη απόκριση μέσω έκκρισης ουσιών όπως κυτοκίνες και μόρια προσκόλλησης (Εικόνα 4) [39, 40].



***Εικόνα 4**: Πολλαπλές λειτουργίες ενδοθηλίου*

Επομένως το ενδοθήλιο συμμετέχει σε λειτουργίες ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό και η δυσλειτουργία του κρίνεται κρίσιμη καθώς διαταράσσει τις προαναφερθείσες πολλαπλές λειτουργίες του και σχετίζεται με την έναρξη και εκδήλωση της αθηροσκλήρωσης [41].

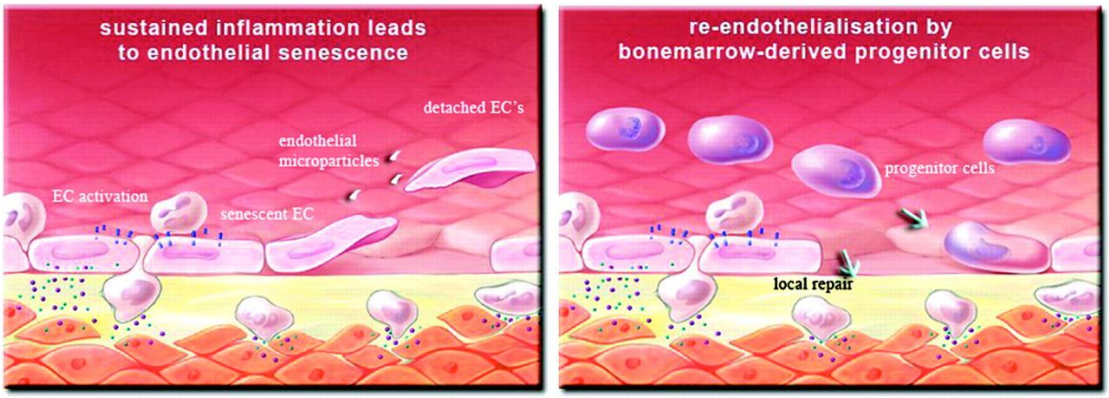
Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηρίζεται από την απώλεια ενός ή περισσότερων λειτουργιών των ενδοθηλιακών κυττάρων και αποτελεί μετάβαση από μία κατάσταση ηρεμία σε μία κατάσταση ενεργοποίησης του ενδοθηλίου. Η ενεργοποίηση αυτή, μπορεί να εκδηλωθεί λόγω απόκρισης του οργανισμού σε κάποιο ξενιστή ή λόγω κάποιων παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα (π.χ σακχαρώδη διαβήτη, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, κάπνισμα κτλ.) [38]. Η σοβαρότητα της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας έχει αποδειχθεί ότι έχει προγνωστική αξία για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και η διόρθωση αυτής φαίνεται να συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων [42].

Όταν το ενδοθήλιο παρουσιάζει ανατομική βλάβη π.χ από υπέρταση ή λειτουργική βλάβη π.χ από κάπνισμα ή διαβήτη, ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα:

1. ***Αυξημένη διαπερατότητα*** επιτρέποντας την είσοδο σε αθηρογόνες λιποπρωτεϊνες στον υπενδοθηλιακό χώρο
2. ***Έκφραση μορίων πρόσφυσης***, που επιτρέπουν τη προσκόλληση μονοκυττάρων που βρίσκονται στον αυλό του αγγείου και την είσοδό τους στην έσω στοιβάδα του τοιχώματος του αγγείου
3. ***Μειωμένη ικανότητα αγγειοχάλασης***

Το ενδοθήλιο παράγει παράγοντες με αγγειοδιασταλτική δράση, με κυριότερο εκπρόσωπο το μονοξείδιο του αζώτου (NO), καθώς επίσης τη βραδυκινίνη και τη προστακυκλίνη. Παράλληλα όμως παράγει και παράγοντες με αγγειοσυσπαστική δράση όπως είναι η ενδοθηλίνη. Όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των παραγόντων αυτών ή όταν υπάρχει δυσλειτουργία του ενζύμου ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) και επομένως μειωμένη δραστικότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO), προάγεται η έναρξη της αθηροσκλήρωσης [43-45]. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών παραμένει σε ισορροπία λόγω της δράσης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του Υδρογόνου (SOD), η οποία μετατρέπει τις ελεύθερες ρίζες σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ή σε μοριακό οξυγόνο (O_2).

Ωστόσο, η ισορροπία αυτή μπορεί να διαταραχθεί από μεταβολικές διαταραχές, όπως είναι η υπέρταση, η υπεργλυκαιμία, το κάπνισμα και τα αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα. Η μακροχρόνια παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί να εξαντλήσει τα αποθέματα σε αντιοξειδωτικά και επομένως να συμβάλλει στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, μέσω της συνεχόμενης ενεργοποίησης του ενδοθηλίου και της φλεγμονής, που οδηγούν σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες και η παρατεταμένη φλεγμονή δεν οδηγεί μόνο σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αλλά και σε απώλεια της ακεραιότητας των κυττάρων του ενδοθηλίου ,που μπορεί να οδηγηθούν σε απόπτωση και εν κατακλείδι σε τραυματισμό του ενδοθηλίου [43] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: *Η παρατεταμένη φλεγμονή οδηγεί σε ενδιθηλιακή βλάβη (αριστερά). Τοπική επιδιόρθωση του ενδοθηλίου στο συγκεκριμένο σημείο της βλάβης (δεξιά) [43]*

2. Διήθηση μορίων LDL και λευκοκυττάρων εσωτερικά του ενδοθηλίου-Οξείδωση μορίων LDL

Το δυσλειτουργικό, πλέον, ενδοθήλιο χάνει την ιδιότητά του ως επιλεκτικός φραγμός με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά του σε ουσίες με ιδιαίτερα αθηρογόνο δράση, όπως είναι η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη (LDL) ή η οξειδωμένη της μορφή (oxLDL) στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Η αύξηση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Οι LDL ή/και οι oxLDL διεισδύουν στο αγγειακό τοίχωμα και συνδέονται με συστατικά του αγγειακού τοιχώματος, συγκεκριμένα με γλυκοζαμινογλυκάνες, που αποτελούν τμήμα του εξωκυττάριου υλικού του έσω χιτώνα του τοιχώματος των αγγείων. Στο αγγειακό τοίχωμα οι LDL υφίστανται χημική τροποποίηση του μορίου τους και συγκεκριμένα οξείδωση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται τοπικά. Ιδιαίτερα αθηρογόνες θεωρούνται οι μικρές πυκνές LDL που συναντώνται κυρίως σε άτομα που παρουσιάζουν αντίσταση στην ινσουλίνη καθώς και ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης [46].

Η αύξηση της διαπερατότητας του τραυματισμένου ή δυσλειτουργικού ενδοθηλίου επιτρέπει την ανεξέλεγκτη είσοδο των μορίων LDL ή της οξειδωμένης LDL (oxLDL) εσωτερικά του ενδοθηλίου. Η οξείδωση της LDL συμβαίνει σε περιπτώσεις όπου υπάρχει αυξημένο οξειδωτικό στρες και μειωμένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών, είτε λόγω μειωμένης

πρόσληψης μέσω της τροφής, είτε λόγω μειωμένης ενδογενούς παραγωγής. Κατά την οξείδωση της LDL παράγεται ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, τα οποία θεωρούνται προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές και είναι υπεύθυνα για την προ-αθηρογόνο δράση της οξειδωμένης LDL (oxLDL). Επίσης, η οξειδωμένη LDL αναστέλλει την παραγωγή της αγγειοδιασταλτικής ουσίας, μονοξείδιο του αζώτου (NO), επηρεάζοντας τον αγγειακό τόνο [47, 48] .

Με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, εκφράζονται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου ειδικά μόρια πρόσφυσης των λευκοκυττάρων όπως το μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων -1(VCAM 1) και ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης -1 (ICAM-1), σελεκτίνες Ε και κυρίως Ρ και αυξητικοί παράγοντες, τα οποία προσελκύουν κυρίως μονοκύτταρα αλλά και Τ-λεμφοκύτταρα από τον αυλό του αγγείου [47]. Τα μόρια πρόσφυσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αλλά και έκκριση χημειοκινών, οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Μετά τη διαδικασία της πρόσφυσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα εισέρχονται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνικών μορίων (χημειοτακτική κυττοκίνη ή αλλιώς χημεικοκίνη) στον υπενδοθηλιακό χώρο. Τέτοια μόρια είναι κυρίως η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1) που είναι μία από τις κύριες χημειοκίνες, οι οποίες ρυθμίζουν τη μετανάστευση και τη διήθηση μακροφάγων και μονοκυττάρων και παράγεται από το ενδοθήλιο σαν απάντηση σε οξειδωμένες λιποπρωτεϊνες ή σε άλλα ερεθίσματα [49].

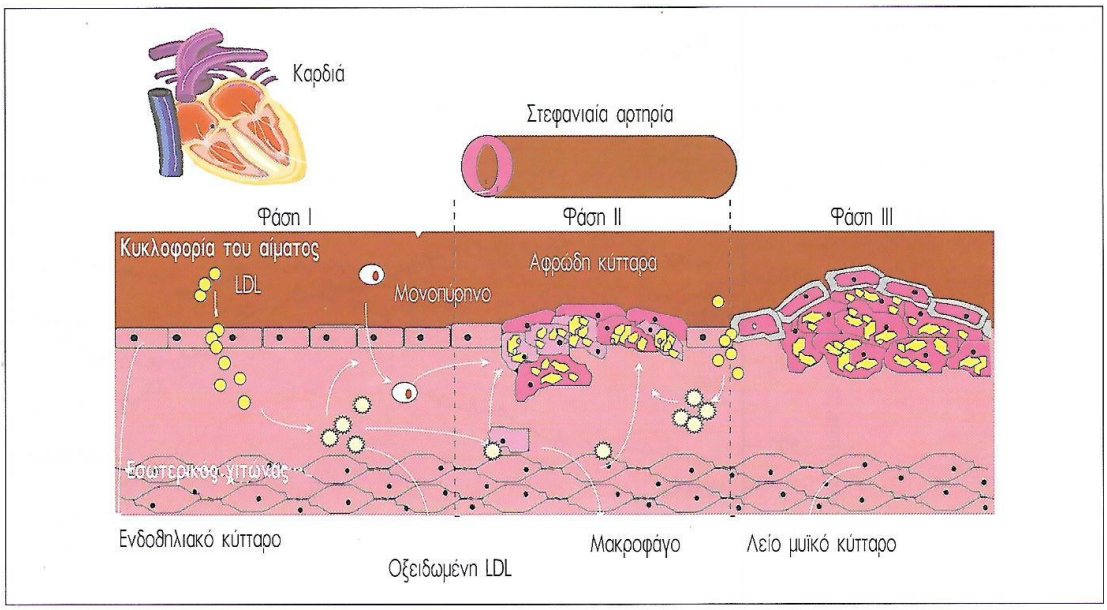
3. Δημιουργία αφρωδών κυττάρων

Εφόσον τα μονοκύτταρα εισέλθουν στον έσω χιτώνα μετατρέπονται σε μακροφάγα και εκφράζουν του «scavenger» υποδοχείς ή αλλιώς εκκαθαριστές υποδοχείς. Σήμερα είναι γνωστοί πάνω από έξι τέτοιοι υποδοχείς. Οι «scavenger» υποδοχείς (SR) περιγράφηκαν πρώτα από τους Brown και Goldstein το 1990. Έχει βρεθεί ότι οι SRAI, SRAII, SRBI και οι CD36 συμμετέχουν στην αθηροσκληρυντική διασικασία [50]. Η oxLDL προσλαμβάνεται από τους «scavenger» υποδοχείς των μακροφάγων με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση των εστέρων χοληστερόλης που περιέχει και τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Τα αφρώδη κύτταρα (foam cells) αποτελούν την εναρκτήρια διεργασία της αθηροσκλήρυνσης [51]. Η εναπόθεση

τέτοιων αφρωδών κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα οδηγεί στη δημιουργία λιποειδών ραβδώσεων. Τα μονοκύτταρα, εκτός από τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων εκκρίνουν επίσης ουσίες, όπως ο TNF-a, προθρομβωτικές ουσίες, ελεύθερες ρίζες και αυξητικούς παράγοντες [52]. (Εικόνα 6)

4. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων

Η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας είναι αποτέλεσμα της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα λεία μυϊκά κύτταρα βρίσκονται φυσιολογικά στον μέσο χιτώνα του αγγείου. Από εκεί κατά την αθηροσκληρυντική διαδικασία μεταφέρονται στον έσω χιτώνα. Πιο αναλυτικά, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα προάγουν τις φλεγμονώδεις διεργασίες παράγοντας όπως η IL-6, η IL-1 και ο TNFa, και αυξητικούς παράγοντες (platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor) που βοηθούν στον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο χιτώνα στο ενδοθήλιο [53]. Με τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων η βλάβη περιχαρακώνεται και δημιουργείται η ινώδης κάψα. Η κάψα αποτελείται από ίνες κολλαγόνου, πρωτεογλυκάνες, ενεργοποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα και παράγοντες φλεγμονής. Η βλάβη αυτή πλέον ονομάζεται αθήρωμα ή αθηρωματική πλάκα και αποτελείται από έναν πυρήνα πλούσιο σε λιπίδια, ο οποίος περιβάλλεται από την ινώδη κάψα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: *Στάδια αθηρογένεσης: Η LDL εισέρχεται στο αρτηριακό τοίχωμα. Στον εσωτερικό χιτώνα η LDL, στην οξειδωμένη μορφή της, απορροφάται από τα μακροφάγα και κατ' αυτό τον τρόπο εναποτίθεται χοληστερόλη και έτσι δημιουργούνται τα αφρώδη κύτταρα. Μακροφάγα, αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που προκαλούν την αναπαραγωγή των λείων μυϊκών κυττάρων. Μερικά λεία μυϊκά κύτταρα απορροφούν χοληστερόλη και σχηματίζουν αφρώδη κύτταρα, ενώ άλλα, συνθέτουν συστατικά συνδετικού ιστού και εισάγουν τον σχηματισμό της ινώδους πλάκας*

5. Βλάβη στη δομή του ενδοθηλίου που οδηγεί σε συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία θρόμβου

Εφόσον συνεχίζουν να υπάρχουν παράγοντες κινδύνου που οδηγούν σε αθηροσκλήρυνση, το αθήρωμα μεγαλώνει σε μέγεθος και προκαλεί στένωση του αυλού του αγγείου. Πολλά καρδιαγγειακά επεισόδια συμβαίνουν σε περιπτώσεις που δεν παρατηρείται πλήρης απόφραξη του αυλού αλλά σε ρήξη και θρόμβωση της αθηρωματικής πλάκας. Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και η επακόλουθος θρόμβωση ευθύνονται για το 60% περίπου των οξέων καρδιαγγειακών επεισοδίων. Οι ασταθείς πλάκες έχουν λεπτή κάψα και πολλά φλεγμονώδη κύτταρα.

Οι κύριοι υπεύθυνοι παράγοντες για τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας είναι[54]:

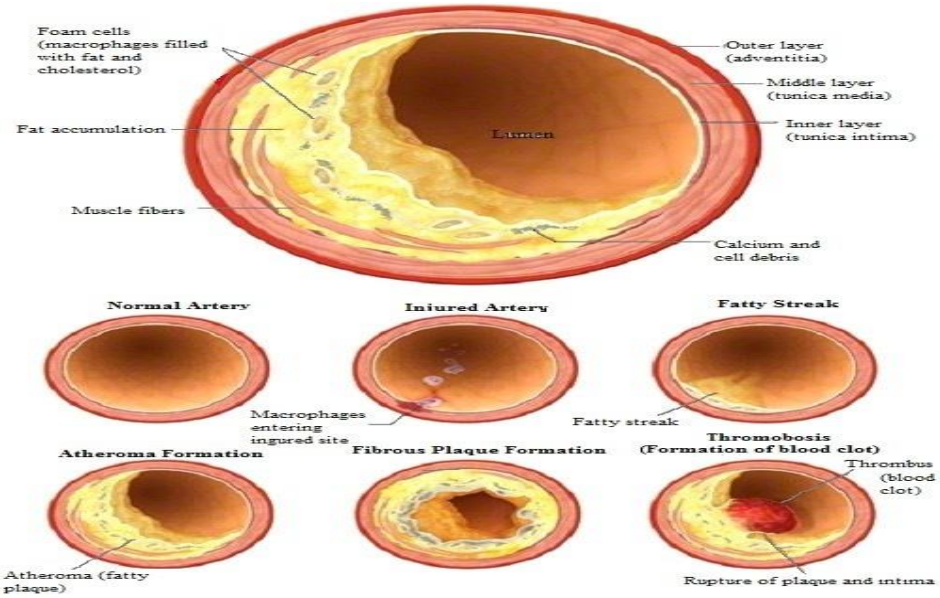
- Το μέγεθος του πυρήνα λιπιδίων (όσο πιο μεγάλη συγκέντρωση λιπιδίων, τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα ρήξης της πλάκας)
- Η παρουσία φλεγμονωδών στοιχείων

- Η σχετική έλλειψη λείων μυϊκών ινών
- Η ύπαρξη θρόμβων
- Οι διαβρώσεις της πλάκας

Πολλές επιμέρους διαδικασίες φαίνεται να συμμετέχουν στη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγουν διάφορους μεσολαβητές, όπως ο TNF-α και η ιντερφερόνη-γ (INF-γ), που αναστέλλουν την παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία αδυνατούν να επιδιορθώσουν την ινώδη κάψα και παράλληλα τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν διάφορες πρωτεινάσες από την οικογένεια των μεταλλοπρωτεινασών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs), που στη συνέχεια υποβαθμίζουν το ενδιάμεσο κολλαγόνο που τη στηρίζει. Η αναφερθείσα διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της ινώδους κάψας, η οποία μπορεί να υποστεί ρήξη, αφήνοντας εκτεθειμένο το κολλαγόνο και τα λιποειδή και οδηγώντας στη συσσώρευση και εναπόθεση αιμοπεταλίων και τελικά στη δημιουργία θρόμβου [34]. Άλλη μία αιτία της ρήξης θεωρείται η μεγάλη αύξηση σε μέγεθος του πυρήνα των λιπιδίων. Η σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας εξαρτάται επίσης από την ασβέστωση και την νεοαγγείωση της βλάβης. Όταν η ασβεστοποίηση διαδραματίζεται σε μικρό βαθμό σχετίζεται με την αυξημένη πιθανότητα ρήξης της πλάκας, σε αντίθεση με την μεγαλύτερη εναπόθεση ασβεστίου, όπου φαίνεται να σταθεροποιεί την πλάκα και να μειώνει την πιθανότητα για θρόμβωση [55].

Η πιο επικίνδυνη επιπλοκή της ρήξης της πλάκας είναι η πρόκληση θρόμβωσης με αποτέλεσμα τα οξέα ισχαιμικά συμβάματα. Το αν θα συμβεί θρόμβωση εξαρτάται από τοπικούς παράγοντες, από διαταραχή της αιματικής ροής στην περιοχή και από πιθανή θρομβοφιλική διάθεση του ατόμου. Γενικά, πιο επικίνδυνες για ρήξη θεωρούνται οι πλάκες που χαρακτηρίζονται ιστολογικά από μεγάλο πυρήνα λιπιδίων, λεπτή ινώδη κάψα με πολλά φλεγμονώδη στοιχεία, και παρουσιάζουν διαβρώσεις και θρομβώσεις ή αιμορραγία. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζουν και εξωγενείς παράγοντες όπως το μηχανικό στρες, ο τόνος των αγγείων, η πηκτικότητα του αίματος κτλ. [56].

Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 7) απεικονίζεται το αγγείο σε διάφορα στάδια της διαδικασίας της αθηρογένεσης, από το φυσιολογικό υγιές αγγείο έως την ώριμη αθηρωματική πλάκα και τη δημιουργία θρόμβου.



Εικόνα 7*: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αθηρογένεσης σε επίπεδο αγγείου*

1.5 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί

Έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί για την έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, ωστόσο σύμφωνα με τον επικρατέστερο σήμερα η αθηροσκλήρωση είναι το αποτέλεσμα τριών βασικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών ***της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και της θρόμβωσης***.

Δύο σημεία κλειδιά, που φαίνεται να έχουν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη, αλλά και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, και τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω είναι τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή, καθώς και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF). Ο παράγοντας αυτός είναι ένας ισχυρός λιποειδικός μεσολαβητής της φλεγμονής, που διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης [83].

1.5.1 Φλεγμονή

Η φλεγμονή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρωμάτωση. Με τον όρο φλεγμονή αναφερόμαστε σε μία βιολογική απάντηση του ανοσοποιητικού μας λόγω ύπαρξης κάποιων παραγόντων, όπως οι τοξικές ενώσεις, τα κατεστραμμένα κύτταρα και οι παθογόνοι

μικροοργανισμοί. Πιο συγκεκριμένα, η φλεγμονή σε επίπεδο ιστού χαρακτηρίζεται από τα εξής: οίδημα, πόνο, ερυθρότητα, αύξηση της θερμοκρασίας τοπικά καθώς και απώλεια της λειτουργίας του ιστού που φλεγμαίνει. Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά οφείλονται στις αποκρίσεις των κυττάρων στην λοίμωξη ή τον τραυματισμό. Η φλεγμονή μπορεί να διακριθεί σε οξεία και χρόνια φλεγμονή [57].

Στην πρώτη περίπτωση της οξείας φλεγμονής, αναφερόμαστε σε μια βραχυπρόθεσμη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου αυξάνεται η αιματική ροή και η αγγειακή διαπερατότητα. Επίσης, παρατηρείται και αυξημένη διήθηση λευκοκυττάρων. Στόχος της αναφερθείσας απόκρισης είναι να απομακρυνθεί το ερέθισμα που πυροδότησε το τραύμα και να επέλθει ομοιόσταση [58]. Στη δεύτερη περίπτωση της χρόνιας φλεγμονής, αναφερόμαστε σε μία παρατεταμένη φλεγμονώδη αντίδραση η οποία συνεπάγεται και σταδιακή αντικατάσταση των κυττάρων που βρίσκονται στο τόπο της φλεγμονής. Αυτός ο τύπος φλεγμονής μπορεί να διαρκέσει μήνες ή χρόνια και να έχει ποικίλα αποτελέσματα τον οργανισμό, ανάλογα και με την ικανότητα του ίδιου του οργανισμού να επιδιορθώσει την φλεγμονή [59]. Μία βασική υποκατηγορία της χρόνιας φλεγμονής είναι η υποβόσκουσα φλεγμονή, όπου ο οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος με μία συνεχόμενη, ήπια φλεγμονή, με χαμηλά επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων και τις περισσότερες φορές συνοδεύεται από χρόνια νοσήματα όπως ο χρόνιος πόνος, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση κτλ. [60].

Αρκετά επιστημονικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η φλεγμονή διαδραματίζει καταλυτικής σημασίας ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και κατ' επέκταση στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η διαδικασία της φλεγμονής εμφανίζεται μέσω του σχηματισμού ενδογενών τροποποιημένων δομών, όπως είναι η οξειδωμένη λιποπρωτεϊνη (ox-LDL), διεγείρωντας την ειδική και μη ειδική ανοσολογική απόκριση [61]. Στην διαδικασία της φλεγμονής που λαμβάνει μέρος κατά την αθηροσκλήρωση συμμετέχουν κύτταρα και μεσολαβητές που καθορίζουν την εξέλιξή της και τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω αναλυτικά.

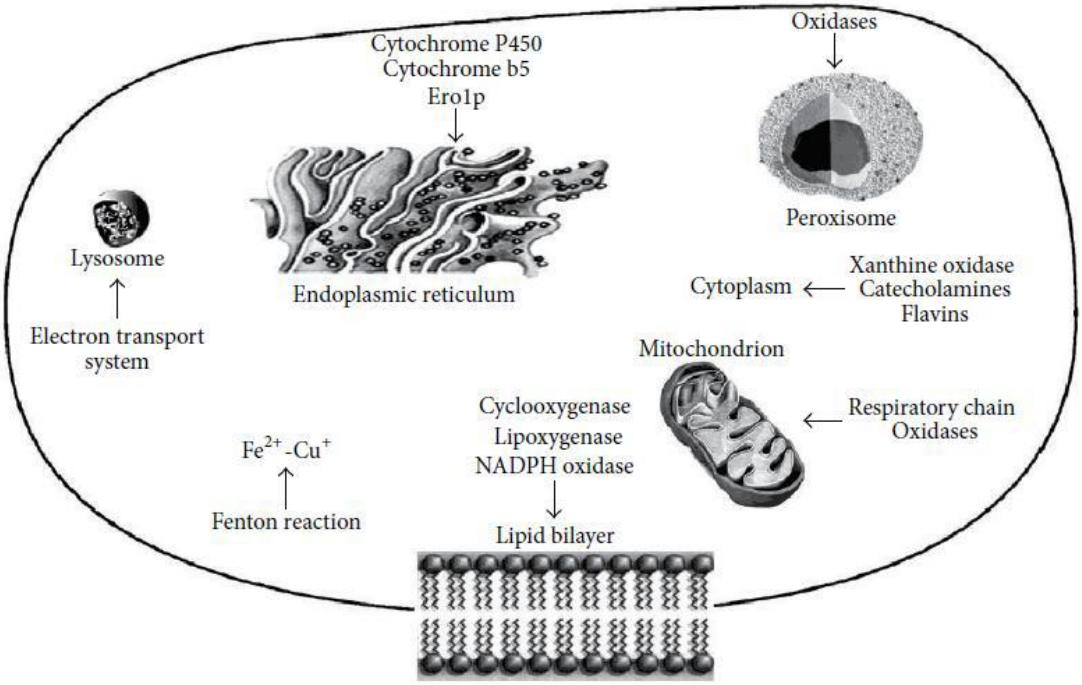
1.5.2 Οξειδωτικό στρες

Η παθογένεια της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνει 3 βασικά μονοπάτια, πρώτον την ενεργοποίηση σημάτων προφλεγμονωδών μονοπατιών, δεύτερον την έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών και τρίτον το 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 των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού, που ευνοεί τη δράση των οξειδωτικών και οδηγεί σταδιακά σε βλάβη. Η αιτία εμφάνισής του οξειδωτικού στρες είναι η αυξημένη δημιουργία των ενεργών μορφών οξυγόνου ή/και η μειωμένη λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας του οργανισμού[62].

Ο όρος «ενεργές μορφές οξυγόνου» ή αλλιώς δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνει όλες τις ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο (ανιόν υπεροξειδίου O_2- , υδροϋπεροξειδική ρίζα HO_2, ρίζα υδροξυλίου OH, ρίζα αλκοξειδίου RO, ρίζα υπεροξειδίου ROO) καθώς και όλες τις μη-ρίζες που μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε αυτές (υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2, όζον O_3, μονήρες οξυγόνο O_2, υποχλωριώδες οξύ HOCl κ.α.). Αντίστοιχα ως ενεργές μορφές αζώτου (RNS) χαρακτηρίζονται οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες περιέχουν άζωτο και οξυγόνο, καθώς και οι μη-ρίζες και περιλαμβάνουν το μονοξείδιο του αζώτου NO και την υπεροξυνιτρώδες ρίζα ONOO [63]. Τόσο οι μορφές του οξυγόνου και του αζώτου είναι ιδιαίτερα δραστικές, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην λειτουργία πολλών κυττάρων αλλά και σε βιολογικές διαδικασίες. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου-αζώτου (RONS) συμμετέχουν σε διάφορες διαδικασίες σε επίπεδο αγγείου, όπως στην φλεγμονώδη απάντηση, στην ανάπτυξη των κυττάρων, στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, στην απόπτωση των κυττάρων καθώς και στη δημιουργία της οξειδωμένης LDL (oxLDL). Σε καταστάσεις που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης όπως υπέρταση, ΣΔ, υπερλιπιδαιμία και κάπνισμα παρατηρείται αυξημένη παραγωγή των ROS στα αγγεία [64].

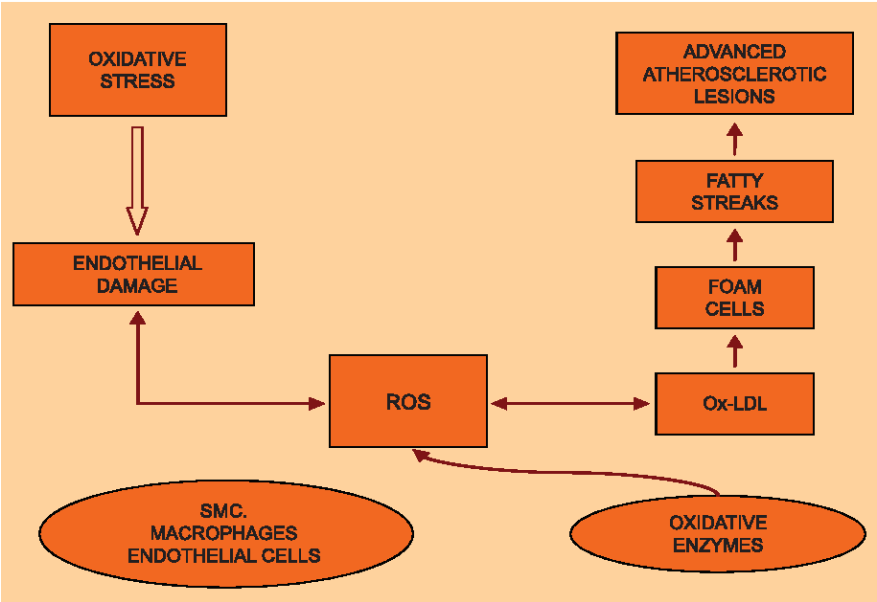
Το οξειδωτικό στρες έχει παρατηρηθεί λοιπόν ότι συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό και αποτελεί ένα σημείο κλειδί για την έναρξη αλλά και για την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου. Αιτία ενεργοποίησης του ενδοθηλίου και εν συνέχεια της δυσλειτουργίας του, το οποίο θεωρείται πρωταρχικό στάδιο της αθηροσκλήρωσης, αποτελεί το αυξημένο οξειδωτικό στρες. Σημείο κλειδί για την εξέλιξη της αθηροσκληρυντικής διαδικασίας αποτελεί η οξειδωμένη LDL λιποπρωτεϊνη (oxLDL), η οποία αυξάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών

οξυγόνου και αζώτου (RONS) . Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στην κυτταρική μεμβράνη και στα υπεροξυσώματα (Εικόνα 8) [65].



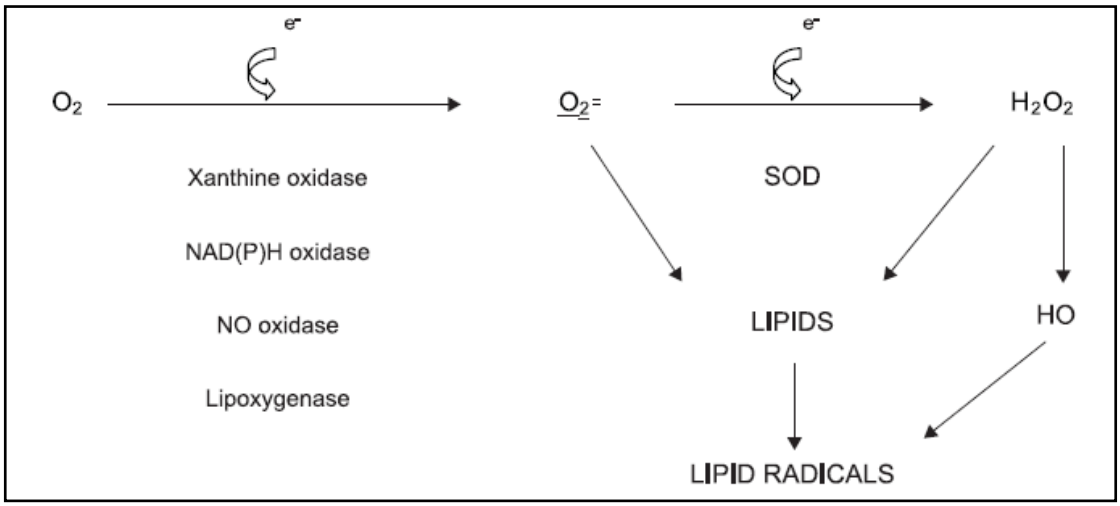
Εικόνα 8: *Κυτταρικές πηγές ελευθέρων ριζών [65]*

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) εμπλέκονται επίσης με το αγγειδιασταλτικό μόριο, μονοξείδιο του αζώτου, το οποίο αποτελεί μόριο κλειδί για την εύρυθμη λειτουργία της καρδιάς και των αγγείων. Πιο συγκεκριμένα, το ανιόν υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με το NO και να παραχθεί το υπερόξυ-νιτρώδες ανιόν (ONOO-), μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα του NO καθώς η παραγωγή του παραμένει σταθερή και η αποικοδόμησή του από τις ROS αυξάνεται [66]. Οι βασικότερες πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου στα αγγεία αποτελούν τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μακροφάγα καθώς μπορούν να παράγουν και να απελευθερώνουν οξειδωτικά μόρια (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: *Εμπλοκή οξειδωτικού στρες στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης*

Η ενδογενής παραγωγή των ROS και RNS στην αθηροσκλήρωση είναι κυρίως αποτέλεσμα της δραστηριότητας διαφόρων ενζυμικών συστημάτων, όπως η οξειδάση του NADPH (NOX), η οξειδάση της ξανθίνης (XO), οι συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), οι μυελοϋπεροξειδάσες (MPO), οι λιποοξυγονάσες (LOX) και τα μιτοχονδριακά ένζυμα (Εικόνα 10) [67].



Εικόνα 10: *Σχηματισμός οξειδωτικών ριζών οξυγόνου μέσω ενζυμικών συστημάτων*

- Οι NADPH-οξειδάσες ή αλλιώς NOX, θεωρούνται ίσως το πιο σημαντικό ενζυμικό σύμπλοκο του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην παραγωγή του O_2^-, καθώς μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο από το NADPH στο οξυγόνο. Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν σε διάφορες ισομορφές, με τις NOX5 να έχει βρεθεί ότι ρυθμίζονται θετικά σε καταστάσεις διαβήτη και υπέρτασης καθώς και να συμμετέχουν στην έκφραση μορίων προσκόλλησης, στην είσοδο των μονοκυττάρων, και τέλος στην διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων [67].

- Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο πλάσμα αλλά όχι στα λεία μυϊκά κύτταρα. Μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή των O_2^- και του H_2O_2, με τα επίπεδα της να αυξάνονται κατά τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας [67].

- Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση του ισχυρού αγγειοδιασταλτικού νιτρικού οξειδίου (NO), συμβάλλοντας στη δημιουργία ROS, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην αθηροσκλήρωση, στην υπερχοληστερολαιμία και στην υπέρταση. Υπάρχουν 3 μορφές αυτού του ενζύμου, αυτή των νευρικών κυττάρων (nNOS), η ενδοθηλιακή NOS (eNOS) και η επαγόμενη (iNOS). Η τελευταία επάγεται σε καταστάσεις φλεγμονής και η μεταγραφή του γονιδίου iNOS ενεργοποιείται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1, ο TNFa και η IFN-γ, ενώ αναστέλλεται από αντιφλεγμονώδεις παράγοντες όπως τα γλυκοκορτικοειδή και οι κυταρροκίνες IL-4, IL-10 και ο TGFβ. Όσον αφορά τη ρύθμιση των eNOS και nNOS, αυτή πραγματοποιείται κυρίως μέσω αλλαγών στη συγκέντρωση του ελεύθερου ενδοκυτταρικού ασβεστίου [63].

- Το ένζυμο λιποοξυγονάση συμμετέχει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, καθώς συμβάλλει στην οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, αλλά και στην έκκριση προφλεγμονωδών μορίων, όπως θρομβοξάνια, λευκοτριένια και προσταγλαδίνες. Επιπλέον, διεγείρουν την ενεργοποίηση των NOX στα λεία μυϊκά κύτταρα με αποτέλεσμα την περαιτέρω παραγωγή ROS [66].

- Τέλος, οι μυεολοϋπεροξειδάσες εντοπίζονται κυρίως σε ουδετερόφιλα και σε μικρό ποσοστό στα μονοκύτταρα. Τα ένζυμα αυτά παράγουν ρίζες όπως το υποχλωριώδες οξύ από την αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτά τα ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης, προκαλώντας την οξειδωτική τροποποίηση της LDL αλλά και του μονοξειδίου του αζώτου [66, 67]

1.5.2.1 Αμυντικά συστήματα έναντι των ελευθέρων ριζών

Ο ανθρώπινος οργανισμός φυσιολογικά περιλαμβάνει μηχανισμούς με τους οποίους προσπαθεί να καταπολεμήσει τη δράση των ελευθέρων ριζών και να τις εξουδετερώσει. Χάρη , λοιπόν, στα αντιοξειδωτικά συστήματα επέρχεται η ισορροπία στο δυναμικό οξειδοαναγωγής και καταπολεμούνται οι αρνητικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες. Ως αντιοξειδωτικό , θεωρείται η ουσία ,που παρεμποδίζει ή καθυστερεί την οξείδωση ενός υποστρώματος που πρόκειται να οξειδωθεί.

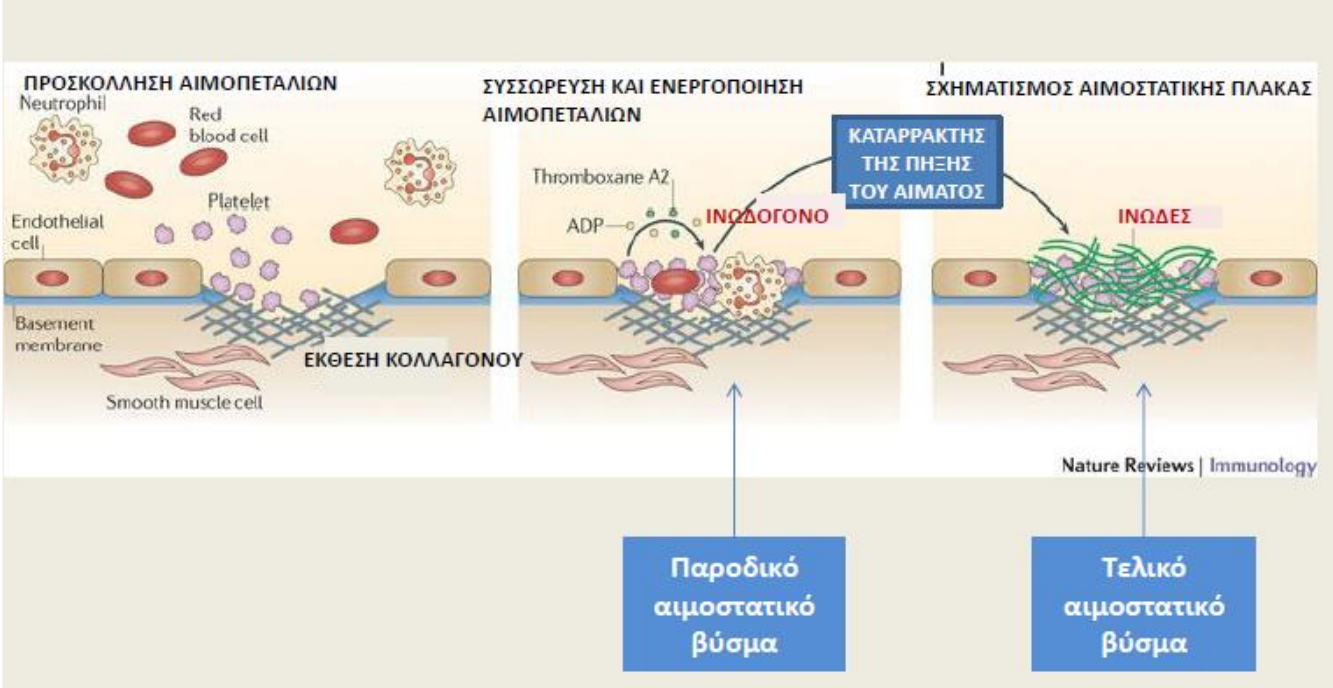
Το αντιοξειδωτικό μπορεί να δράσει με τους εξής τρόπους :είτε να σχηματίσει λιγότερο δραστικές ρίζες, είτε να επιδιορθώσει τις βλάβες που προκαλούνται από αυτές. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χωριστούν σε 3 κύριες κατηγορίες: 1) τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά 2) τα μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά 3) και στις πρωτεΐνες δέσμευσης προ-οξειδωτικών μετάλλων. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν την καταλάση (Catalase -CAT), την υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase-SOD) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase -GPx). Η δεύτερη κατηγορία αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνει τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, τα φλαβονοειδή και οι τοκοφερόλες (βιταμίνη Ε). Τέλος, η τρίτη κατηγορία αντιοξειδωτικών περιλαμβάνει πρωτεΐνες πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων όπως η τρανσφερρίνη και η σερουλοπλασμίνη, οι οποίες δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με το Fe και το Cu αντίστοιχα, και με αυτό το τρόπο εμποδίζουν τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών.

1.5.3 Θρόμβωση

Ο όρος «θρόμβωση» αναφέρεται στον σχηματισμό θρόμβου αίματος που μπορεί να συμβεί στο αρτηριοφλεβικό σύστημα. Η δημιουργία θρόμβου μπορεί να αποτελέσει μία

επιπλοκή στα καρδιαγγειακά νοσήματα και να οδηγήσει σε καταστάσεις όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου καθώς και αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Σύμφωνα με μελέτες, φαίνεται ότι το 50-75% των περιπτώσεων CVD παρουσιάζουν θρόμβωση, έναντι των υπόλοιπων περιπτώσεων που δεν παρουσιάζουν κάποιο θρόμβο αλλά σοβαρή αρτηριακή στένωση σε ποσοστό >75%. Τα αίτια της διαδικασίας της θρόμβωσης αποτελούν τα εξής: η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, η διάβρωσή της καθώς και ο σχηματισμός οζιδίων Ca ,σε ποσοστά 55-65%, 30-35% και 2-7%, αντίστοιχα [68].

Απαραίτητο, βέβαια, θεωρείται και η κατανόηση των επιμέρους διαδικασιών που συμβαίνουν από τον οργανισμό απέναντι στο τραύμα και το θρόμβο. Αρχικά, φυσιολογική διαδικασία αποτελεί η αιμόσταση κατά την οποία σταματάει η αιμορραγία στην συγκεκριμένη περιοχή του τραύματος και η υπόλοιπη κυκλοφορία του αίματος διατηρείται φυσιολογική. Όταν τραυματιστεί το αγγείο, ουσίες οι οποίες βρίσκονται στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο απελευθερώνουν συστατικά στο αίμα, ενεργοποιώντας τις δύο βασικές διαδικασίες της αιμόστασης, την πρωτογενή και τη δευτερογενή αιμόσταση (Εικόνα 11) [69].



Εικόνα 11: *Σχηματική αναπαράσταση της πρωτογενούς και δευτερογενούς αιμόστασης*

Κατά την πρωτογενή αιμόσταση συσσωρεύονται αιμοπετάλια και σχηματίζουν ένα αιμοπεταλιακό βύσμα. Πιο συγκεκριμένα, τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αιμόσταση

καθώς προσκολλώνται στο εκτεθειμένο κολλαγόνο του αγγείο που έχει υποστεί βλάβη με την βοήθεια μίας ουσίας-μεσολαβητή, του παράγοντα von Willebrand (Vwf), μια πρωτεΐνη του πλάσματος που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια (platelet adhesion). Με αυτή την προσκόλληση των αιμοπεταλίων επιτυγχάνεται η έκκριση χημικών παραγόντων από τα κυστίδια των αιμοπετάλιων, όπως η ADP και η σεροτονίνη. Αυτοί οι χημικοί παράγοντες δρουν τοπικά επηρεάζοντας τον μεταβολισμό, το σχήμα και τις πρωτεΐνες στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Τελικό αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι να προσκολλώνται νέα αιμοπετάλια στα παλιά (platelet aggregation) και να σχηματίζεται ένα αιμοπεταλιακό βύσμα ή θρόμβος [70].

Κατά τη δευτερογενή αιμόσταση, πραγματοποιείται η πήξη του αίματος (ή θρόμβωση) που αποτελείται κυρίως από ένα πρωτεϊνικό πολυμερές που λέγεται ινώδες και σταθεροποιεί τον θρόμβο, μέσω μίας τοπικής αλληλουχίας αντιδράσεων γνωστές ως «καταρράκτης πήξης». Η μετατροπή του ινωδογόνου του πλάσματος σε ινώδες καταλύεται από το ένζυμο θρομβίνη. Ο σχηματισμός θρομβίνης από την πρωτεϊνη του πλάσματος προθρομβίνη είναι το τελικό αποτέλεσμα του «καταρράκτη πήξεως», όπου μία αδρανοποιημένη πρωτεΐνη του πλάσματος ενεργοποιείται και στη συνέχεια ενεργοποιεί ενζυμικά την επόμενή της σειρά [70]. Η θρομβίνη, στη συνέχεια, ελέγχει με θετική ή αρνητική ανατροφοδότηση τόσο την παραγωγή του θρόμβου όσο και τη διάλυσή του. Το ένζυμο αυτό ενεργοποιεί άλλους παράγοντες πήξης, όπως το ινωδογόνο και τους παράγοντες V, VII, VIII. Το ινωδογόνο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του θρόμβου, καθώς είναι το πρόδρομο μόριο του ινώδους, που προσδίδει σταθερότητα στον θρόμβο. Επίσης, άλλη μία πρωτεΐνη πήξης που συμμετέχει στις αλλεπάλληλες αυτές αντιδράσεις είναι ο ιστικός παράγοντας TF, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη του υπο-ενδοθηλιακού ιστού που αποτελεί συμπαράγοντα του παράγοντα VIIa, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα μεταξύ τους [70].

Τελικό στάδιο της διαδικασίας της πήξης είναι η ινωδόλυση (διάλυση θρόμβου). Παράλληλα με τη δημιουργία του θρόμβου λοιπόν, δραστηριοποιείται και το ινωδολυτικό σύστημα. Πρόκειται για ένα σύνολο ενζύμων και αναστολέων που αποτελούν τον κύριο αμυντικό μηχανισμό, ο οποίος προστατεύει από τη θρόμβωση. Συγκεκριμένα το ανενεργό ένζυμο, πλασμινογόνο, αφού μετατραπεί σε ενεργό ένζυμο (πλασμίνη), αδρανοποιεί τους παράγοντες V, VIII, XIII και συμβάλλει στην διάσπαση του ινωδογόνου (ινωδογονόλυση) και

του ινώδους (ινωδόλυση). Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου γίνεται από διάφορες ουσίες, τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου προκειμένου να σχηματισθεί η πλασμίνη. Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου είναι: α) ο ιστικός ενεργοποιητής (tPA) που παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και β) ο ενεργοποιητής ουροκινάσης (uPA), που παράγεται στα νεφρικά κύτταρα. Όσον αφορά τους αναστολείς, είναι ιδιαίτερα σημαντικοί καθώς αδρανοποιούν την περίσσεια της πλασμίνης ή περιορίζουν τη δραστηριότητα των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Στην 1η περίπτωση κύριος αναστολέας της πλασμίνης είναι η α2-αντιπλασμίνη (A_2AP), ενώ στη 2η περίπτωση στους αναστολείς της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου κατατάσσονται : α) ο αναστολέας της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) που αδρανοποιεί τον tPA και β) ο αναστολέας της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου-2 (PAI-2) που αδρανοποιεί κυρίως τον uPA και δευτερευόντως τον tPA [71].

Συνοψίζοντας , θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι η αιμόσταση συνοψίζεται σε 3 βασικά στάδια α) την πρωτογενή αιμόσταση, που περιλαμβάνει τη σύσπαση του τραυματισμένου αγγείου και τη δημιουργία «ενός πρωτογενούς αιμοπεταλιακού θρόμβου», β)τη δευτερογενής αιμόσταση, που περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός πλέγματος ινώδους που σταθεροποιεί τον θρόμβο και τελευταία γ) την ινωδόλυση , μια διαδικασία που αποτρέπει την υπερβολική αύξηση του θρόμβου και μεσολαβεί στη διάλυσή του.

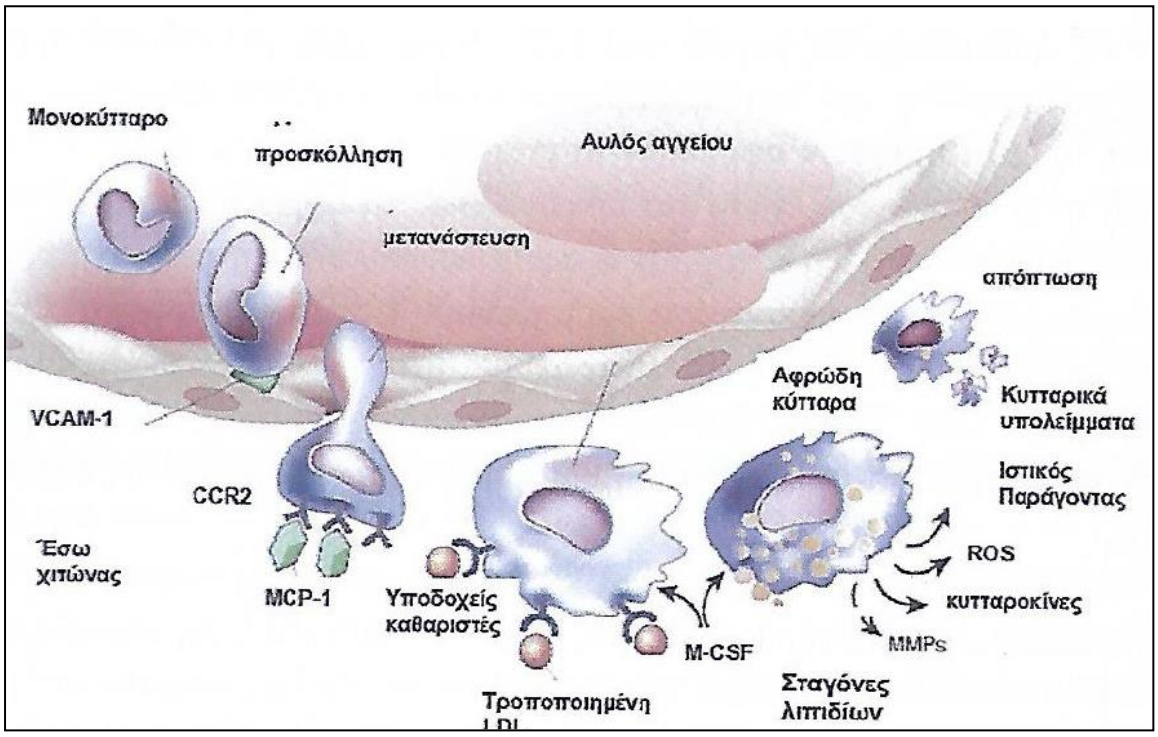
1.5.4 Κύτταρα που εμπλέκονται στη φλεγμονή και κατ' επέκταση στην αθηρωμάτωση

Στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης εμπλέκονται αρκετά κύτταρα και μεσολαβητές τα οποία θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω. Τα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηρωμάτωση είναι : τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα λεμφοκύτταρα όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα και τα Τ-φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (Natural Killer T-cells), τα δενδριτικά κύτταρα και τα σιτευτικά κύτταρα των ιστών γνωστά και ως μαστοκύτταρα ή ιστιοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν ουσίες και πρωτεϊνικούς παράγοντες γνωστούς ως κυτταροκίνες, οι οποίες διεγείρουν τα κύτταρα από τα οποία εκκρίθηκαν προκειμένου να προκαλέσουν μία σειρά αντιδράσεων που διέπουν την φλεγμονώδη αντίδραση [72].

Μονοκύτταρα / Μακροφάγα

Μελέτες έχουν αποδείξει τον καταλυτικό ρόλο των μονοκυττάρων / μακροφάγων και την πρώιμη συμμετοχή τους στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα είναι τα κύτταρα που προάγουν τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από το μέσο στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, τα οποία με τη σειρά τους πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν την ινώδη κάψα της αθηρωματικής πλάκας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μονοκύτταρα προσελκύονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν υποενδοθηλιακά, απομακρύνοντας λιπίδια από τον έσω χιτώνα. Η συσσώρευση της LDL λιποπρωτεϊνης, και ιδιαίτερα της οξειδωμένης LDL (oxLDL), προσελκύει, μέσω παραγωγής κυτταροκινών, τα μονοκύτταρα. Όταν υπάρχει δυσλειτουργικό ενδοθήλιο και ξεκινά η διαδικασία της αθηρωμάτωσης, τα μονοκύτταρα που βρίσκονται πλέον υπενδοθηλιακά, μεσολαβούν στην επικοινωνία των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα λεία μυϊκά κύτταρα μέσω κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου α(TNFa), η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (MCP-1) καθώς και ο μετατρεπτικός παράγοντας ανάπτυξης (transforming growth factor b, TGF-β).

Επιπλέον, σημαντικές ενδείξεις υποστηρίζουν τη συμμετοχή των μονοκυττάρων στη φάση της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας μέσω της παραγωγής εξωκυττάριων μεταλλοπρωτεασών (Matrix Metalloproteinases, MMP), οι οποίες διασπούν το κολλαγόνο (θεμέλια ουσία) της ινώδους κάψας της αθηρωματικής πλάκας. Ένας επιπλέον τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν τα μονοκύτταρα στη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας είναι, μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες προκαλούν λέπτυνση της ινώδους κάψας λόγω απόπτωσης των λείων μυϊκών κυττάρων. Τέλος, τα μονοκύτταρα συμβάλλουν επίσης και στην αύξηση μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας και μέσω του θανάτου που υπόκεινται τα αφρώδη κύτταρα και μέσω της προσέλκυσης των μικρών αγγείων (vasa vasorum , μικρά φυσιολογικά αγγεία που τροφοδοτούν τα μεγάλα αγγεία με θρεπτικά συστατικά) [73, 74](Εικόνα 12).



Εικόνα 12: *Μονοκύτταρα/ μακροφάγα στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας [75]*

Ενδοθηλιακά κύτταρα

Με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, εκφράζονται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου ειδικά μόρια πρόσφυσης των λευκοκυττάρων όπως το μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων -1(VCAM 1), το ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης -1 (ICAM-1) και οι σελεκτίνες Ε. Ωστόσο η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλείται από την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-a και η IL-6, με αποτέλεσμα την προσκόλληση κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα. Επίσης η μειωμένη παραγωγή μονοξείδιο του αζώτου (NO) μπορεί να ενεργοποιήσει περαιτέρω τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, λοιπόν, μπορούν να οδηγήσουν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, σε αθηροσκλήρωση και εν συνεχεία σε αγγειακή νόσο καθώς αυξάνεται η αγγειοσυστολή, πολλαπλασιάζονται τα λεία μυϊκά κύτταρα, συσσωρεύονται τα αιμοπετάλια, προσκολλούνται τα λευκοκύτταρα, οξειδώνεται η LDL και ενεργοποιούνται οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) [76].

Λείο μυϊκά κύτταρα

Τα λείο μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) αποτελούν τους μεγαλύτερους παραγωγούς της εξωκυττάριας ουσίας μέσα στο αγγειακό τοίχωμα. Μπορούν να απαντήσουν σε αθηρογόνα ερεθίσματα τροποποιώντας τον τύπο των πρωτεϊνών πλέγματος καθώς και την περιεκτικότητα σε λιπίδια της αναπτυσσόμενης αθηρωματικής πλάκας. Τα λείο μυϊκά κύτταρα διαθέτουν λειτουργίες που αποδίδονται τυπικά σε διάφορους άλλους τύπους κυττάρων . Παρομοίως με τα μακροφάγα, τα ΛΜΚ εκφράζουν μία σειρά υποδοχέων για την πρόσληψη των λιπιδίων καθώς και σχηματίζουν τα αφρώδη κύτταρα, λαμβάνοντας έτσι μέρος στην πρώιμη συσσώρευση λιπιδίων της αθηρωματικής πλάκας. Παρομοίως με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα ΛΜΚ εκφράζουν και αυτά μόρια προσκόλλησης, όπως το ICAM-1 και το VCAM-1, για τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα, οδηγώντας τα έτσι, μέσα στο τοίχωμα του αγγείου. Τα ΛΜΚ ,όπως πολλά κύτταρα εντός της αναπτυσσόμενης πλάκας, μπορούν να παράγουν πλήθος κυτταροκινών οι οποίες συμβάλλουν στην έναρξη αλλά και στην εξέλιξη της φλεγμονώδους απάντησης [77, 78].

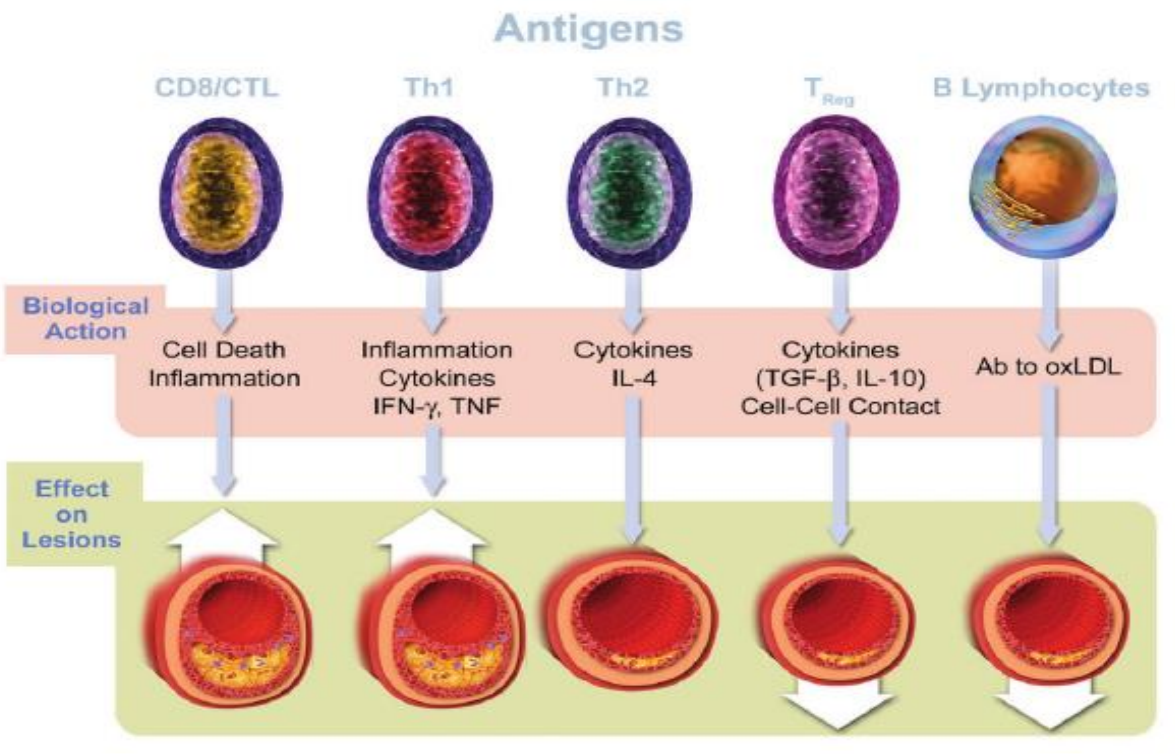
Τ-λεμφοκύτταρα

Τα Τ λεμφοκύτταρα που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία τις αθηρωμάτωσης διαθέτουν διάφορες υποκατηγορίες κυττάρων. Αρχικά, τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα έχουν υποδοχείς με ειδικές περιοχές αναγνώρισης του αντιγόνου και διαθέτουν δύο βασικές υποκατηγορίες: τα Th1 κύτταρα και τα Th2 κύτταρα. Τα Th1 λεμφοκύτταρα ενισχύουν τα προφλεγμονώδη μονοπάτια καθώς παράγουν την κυτταροκίνη, ιντερφερόνη γ (IFN-γ), επιδεινώνοντας έτσι τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. Μία άλλη υποομάδα Τ-λεμφοκυττάρων, είναι τα Th17 κύτταρα, που φαίνεται να ασκούν παρόμοια προφλεγμονώδη δράση με τα Th1 κύτταρα. Αντίθετα, τα Th2 λεμφοκύτταρα φαίνεται να καταστέλλουν τη φλεγμονή κα τη δράση των μακροφάγων εκκρίνοντας τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-4 και IL-10 καθώς επίσης και τον TGF-β.

Μία ακόμα υποομάδα Τ-λεμφοκυττάρων αποτελούν, τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα (regulatory T cells), που φαίνεται να διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αθηρωμάτωση. Τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα φαίνεται ότι σε συνδυασμό με τα Th2 αντισταθμίζουν την προαθηρογόνο δράση που προκαλούν τα κύτταρα Th1 και Th17.

Αυτοί οι τύποι κυττάρων Τ που περιγράφηκαν παραπάνω, εκφράζουν στην επιφάνεια τους CD4 δείκτες και αναγνωρίζουν αντιγόνα τα οποία παρουσιάζονται από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Σε ανθρώπινες αλλοιώσεις, το 1/3 όλων των Τ κυττάρων είναι διαφορετικού τύπου και φέρουν στην επιφάνειά τους το δείκτη CD8, όπου αναγνωρίζει αντιγόνα συνδεδεμένα με HLA (ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα) μόρια σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, τυπικά ιϊκά αντιγόνα μολυσμένων κυττάρων. Μόλις ενεργοποιηθούν, τα CD8 Τ κύτταρα επιτίθενται και σκοτώνουν τα γειτονικά κύτταρα δια μέσου επαφής. Μεσολαβητές που παράγονται, ως γνωστόν σε βλάβη, μπορούν να προσλάβουν CD8 Τ κύτταρα και να θανατώσουν λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα, διαδικασία που χειροτερεύει τη βλάβη και τις επιπλοκές της.

Όλα αυτά τα Τ κύτταρα μοιράζονται την ικανότητα αναγνώρισης πρωτεϊνικών αντιγόνων που συνδέονται με αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (HLA) στις κυτταρικές επιφάνειες. Αντιθέτως, τα Natural Killer T-cells (ή NKT ή κυτταροκτόνα κύτταρα) αντιδρούν προς τα αντιγόνα λιπιδίων που παρουσιάζονται από τα CD1 μόρια σε αντιγονοπαροσιαστικά κύτταρα. Μόλις ενεργοποιηθούν τα φονικά κύτταρα (NKT) εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προωθώντας τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης [79] (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: *Κύτταρα που εμπλέκονται στην επίκτητη ανοσία [79]*

Περιγράφονται οι λειτουργικοί ρόλοι των 5 κατηγοριών λεμφοκυττάρων που απεικονίζονται στην αθηροσκλήρωση. Τα Β κύτταρα εκκρίνουν αντισώματα (Ab) . Ο κάτω πίνακας του σχήματος απεικονίζει διαγραμματικά την επίδραση των διαφόρων κυτταρικών τύπων σε βλάβες, που βασίζονται κυρίως σε πειράματα σε ποντίκια. Τα πάνω βέλη υποδηλώνουν την επιδείνωση των αλλοιώσεων. Τα κάτω βέλη υποδηλώνουν τη μείωση των αλλοιώσεων. Αυτό το διάγραμμα συνοψίζει το "καθαρό" αποτέλεσμα που αποδίδεται στον τύπο του κυττάρου στην αθηροσκλήρωση.(CTL= κυτταρολυτικά Τ λεμφοκύτταρα, IFN=ιντερφερόνη, HSP=πρωτεΐνη θερμικού σοκ, Th =βοηθητικά κύτταρα Τ, Treg= ρυθμιστικά Τ κύτταρα, TNF=παράγοντας νέκρωσης, IL=ιντερλευκίνη)

Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα, κυτταρικά θραύσματα προερχόμενα από θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων και τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του θρόμβου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια δεν προσκολλώνται στο ενδοθήλιο, αλλά σε περιπτώσεις βλάβης του αγγειακού τοιχώματος , εκτίθεται το κολλαγόνο στην κυκλοφορία του αίματος και εκεί προσκολλώνται οι γλυκοπρωτεϊνες (ιντεγκρίνες) των αιμοπεταλίων που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Αυτή, λοιπόν, η προσκόλληση (γλυκοπρωτεϊνη-κολλαγόνο) οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η αυξημένη παρουσία των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης σχηματίζει μία στιβάδα κυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αυξάνεται το ενδοκυτταρικό

ασβέστιο, προκαλώντας αλλαγές στο σχήμα των αιμοπεταλίων (από δισκοειδές σε σφαιρικό με ψευδοπόδια) και στο μεταβολισμό τους καθώς πραγματοποιείται και η απελευθέρωση των συστατικών των κοκκίων τους (αποκοκκίωση). Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα πρόδρομα κύτταρα, μέσω της έκκρισης βιοδραστικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα αποτελεί ένα αρκετά συχνό φαινόμενο τόσο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις όσο και στη θρόμβωση [80].

1.5.5 Μεσολαβητές φλεγμονής (πρωτεϊνικής και λιποειδικής φύσης)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αδιαμφισβήτητο αποτελεί το γεγονός ότι η φλεγμονή κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Στη διαδικασία της φλεγμονής λαμβάνουν χώρα οι μεσολαβητές και τα κύτταρα που καθορίζουν την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι είτε πρωτεϊνικής φύσης, όπως κυτταροκίνες, διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης και μερικές πρωτεϊνες οξείας φάσης, είτε λιποειδικής φύσης, όπως τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή, ο PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) και τα εικοσανοειδή [81].

Αρχικά, όσον αφορά τα μόρια πρωτεϊνικής φύσης, οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από διάφορα μόρια-κύτταρα, αποτελούν βασικούς μεσολαβητές στην φλεγμονή και κατά συνέπεια στην εξέλιξης της αθηρωμάτωσης. Αφού τα μακροφάγα έχουν μετατραπεί σε αφρώδη κύτταρα, εκθέτουν μέρη του αντιγόνου στην επιφάνειά τους , ενεργοποιώντας έτσι τα Τ-κύτταρα. Τα Th1 κύτταρα παράγουν την ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), η οποία ως κυτταροκίνη διεγείρει την έκκριση άλλων φλεγμονοδών κυτταροκινών, όπως της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-a). Αυτές οι κυτταροκίνες με τη σειρά τους διεγείρουν την παραγωγή φλεγμονοδών μορίων στα μακροφάγα και στα αγγειακά κύτταρα. Ωστόσο, η δράση της IFN-γ συνεχίζεται, καθώς συμμετέχει στη μη σταθερότητα της πλάκας με τους ξής τρόπους: πρώτον αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων και δεύτερον μειώνοντας την παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα.

Τα βοηθητικά Τ-κύτταρα , ως απάντηση στην έκθεση του αντιγόνου, παράγουν ένα μεσολαβητή πρωτεϊνικής φύσης, τη πρωτεΐνη μέλους της οικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκου, CD40L (CD40 ligand). Αυτή η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CD40 των μακροφάγων, με αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταλλοπρωτεϊνασών. Επιπλέον, διεγείρεται από τα μακροφάγα και η έκφραση του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) , ο οποίος συμμετέχει στη διαδικασία πήξης του αίματος και συμβάλλει στη θρόμβωση [75].

Η πρωτεΐνη οξείας φάσης ,C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), είναι ένας εξαιρετικά ευαίσθητος δείκτης φλεγμονής που συμμετέχει στη παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης. Πιθανότατα ενεργοποιεί κάποια μόρια, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ακριβώς ο τρόπος δράσης της. Όταν ενεργοποιούνται τα ανοσοποιητικά κύτταρα, παράγονται μόρια κυτταροκινών, στα οποία περιλαμβάνεται και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) [82].

Πιο συγκεκριμένα , η ιντερλευκίνη- 6 αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη φλεγμονής και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η IL-6 αποτελεί έναν μεσολαβητή της φλεγμονής με πλειοτροπικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην αιμοποίηση, και η σύνθεσή της επάγεται από εξωγενή αντιγόνα αλλά και από την ύπαρξη ιστικής βλάβης [83]. Μετά τη σύνθεσή της μέσω της αιματικής ροής, επάγει τη σύνθεση και τη διαφοροποίηση πρωτεϊνών στα λεμφοκύτταρα, στα ηπατοκύτταρα, στους ινοβλάστες και στα κύτταρα του μυελού των οστών. Πιο συγκεκριμένα, η IL-6 στα ηπατοκύτταρα διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης όπως τη CRP, το ινωδογόνο (ίνωση), το αμυλοειδές A (αιμόλυση), την εψιδίνη (αναιμία) και αναστέλλει τη σύνθεση αλβουμίνης (οίδημα) [83]. Στα CD4 και Τ-λεμφοκύτταρα προάγει τη διαφοροποίησή τους προς Th17 και παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση προς Treg, συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη της χρόνιας αυτοάνοσης φλεγμονής. Επιπλέον, επάγει τη διαφοροποίηση των CD8+ Β-λεμφοκυττάρων προς κυτταροτοξικά και πλασματοκύτταρα αντίστοιχα, καθώς και στα κύτταρα του μυελού των οστών επάγει τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων προς αιμοπετάλια. Μία επιπλέον δράση της ιντερλευκίνης 6 είναι να διεγείρει τη σύνθεση κολλαγόνου οδηγώντας σε ίνωση του φλεγμαίνοντα ιστού και εν τέλει σε αγγειογένεση και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Αυξημένες τιμές IL-6 παρατηρούνται σε καταστάσεις όπως στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου [83].

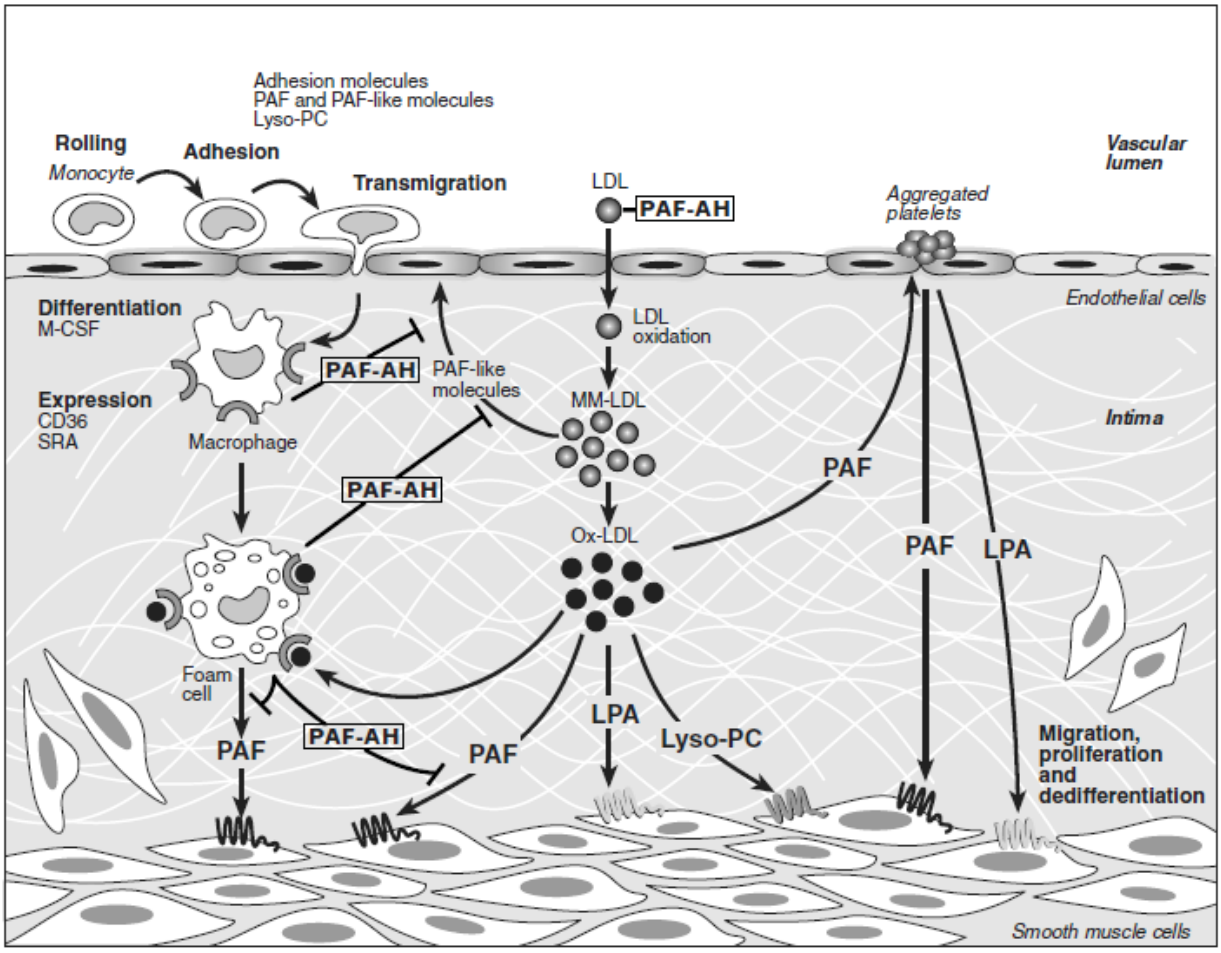
Όσον αφορά τα διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης , τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης, των λευκοκυττάρων, και συγκεκριμένα του μορίου προσκόλλησης VCAM-1. Αμέσως μετά την έκφρασή του στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα μονοκύτταρα και Τ-κύτταρα συνδέονται με το ενδοθήλιο και διεγείρουν την μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον έσω χιτώνα και την παραγωγή κυτοκινών [84].

Ωστόσο, εκτός από τους μεσολαβητές πρωτεϊνικής φύσης που συμμετέχουν στην αθηρωμάτωση , υπάρχουν και μόρια λιποειδικής φύσης με κύριους εκπροσώπους τα φωσφολιποειδή, και πιο συγκεκριμένα τα προϊόντα οξείδωσης της φωσφατιδυλοχολίνης, τα εικοσανοειδή και τον PAF. Τα κύτταρα τα οποία προωθούν τη φλεγμονή, εκκρίνουν ως μεσολαβητές φωσφολιπίδια όπου συμπεριλαμβάνονται ο PAF, το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), το φωσφατιδικό οξύ (PA), η λύσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) και η 1-φωσφορική-σφιγγοσίνη (S1P) κτλ. Τα φωσφολιποειδή αυτά , προέρχονται από τα φωσφολιποειδή που ήδη προϋπάρχουν στη μεμβράνη και τα οποία υπόκεινται στη δράση ενζύμων. Πυροδοτούν έτσι κυτταρικά σήματα με τη βοήθεια υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες. Η δράση αυτών των φωσφολιποειδών εντοπίζεται στις εξής διαδικασίες: 1) συμμετέχουν στην ενδοθηλιακή προσκόλληση των λευκοκυττάρων, 2) συμμετέχουν στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, 3) στον σχηματισμό και παραγωγή χημειοκινών, 4) στον μετέπειτα σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων καθώς και 4) στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων [85] (Εικόνα 14).

Επόμενη κατηγορία μεσολαβητών λιποειδικής φύσης αποτελεί η κατηγορία των εικοσανοειδών. Τα εικοσανοειδή αποτελούν ενώσεις οι οποίες προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα με ανθρακικό σκελετό 20 άνθρακες (C-20), κυρίως από το αραχιδονικό οξύ. Τα εικοσανοειδή ασκούν ένα ευρύ φάσμα δράσεων στον τόπου όπου παράγονται και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ανενεργή παράγωγα. Εμπλέκονται στη λειτουργία συστημάτων υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και συμμετέχουν σε παθογενετικούς μηχανισμούς αρκετών νοσημάτων. Λειτουργούν κυρίως ως τοπικοί μεσολαβητές, αλλά ταυτόχρονα ασκούν και ρυθμιστική δράση στα άλλα κύτταρα. Αποτελούνται κυρίως από τις προσταγλανδίνες, τις θρομβοξάνες και τα λευκοτριένια. Οι προσταγλανδίνες , σε συνέργεια με άλλους μεσολαβητές, προκαλούν πολλά από τα χαρακτηριστικά σημεία της φλεγμονής [86].

Όσον αφορά τον PAF , αποτελεί τον πιο γνωστό και δραστικότερο φλεγμονώδη μεσολαβητή, ο οποίος εμπλέκεται άμεσα στην αθηρωματική νόσο. Ο PAF αποικοδομείται στο πλάσμα από το λιποπρωτεϊνικό ένζυμο, PAF ακέτυλο-υδρολάση, γνωστό ως $LpPLA_2$. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφέρει την υψηλή δραστικότητα του ενζύμου αυτού ως παράγοντα κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η υψηλή δραστικότητα του ενζύμου αποτελεί απάντηση του οργανισμού στα υψηλά επίπεδα PAF και οξειδωμένων φωσφολιποειδών. Ο παράγοντας PAF ανήκει σε μία οικογένεια λιποειδικών μορίων, τα οποία έχουν διαφορετική προέλευση και δομή, ωστόσο μοιράζονται παρόμοια βιολογική δράση. Αυτά τα λιποειδικά μόρια, PAF-like lipids, είναι οξειδωτικά τροποποιημένες φωσφατιδυλοχολίνες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια του PAF, μιμούνται τη δομή του αλλά και αποτελούν απαραίτητα μόρια σύνδεσης για τους PAF υποδοχείς.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον PAF, τα υψηλά επίπεδα LDL και oxLDL έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων PAF και PAF-like lipids, συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία . Εν συνεχεία, με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πυροδοτείται επιπλέον αύξηση των επιπέδων PAF στο αίμα, κατάσταση η οποία προκαλεί μία ταχεία φλεγμονώδη απόκριση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα προαναφερθέντα γεγονότα έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και επομένως την έναρξη της αθηροσκλήρωσης [47, 48] .

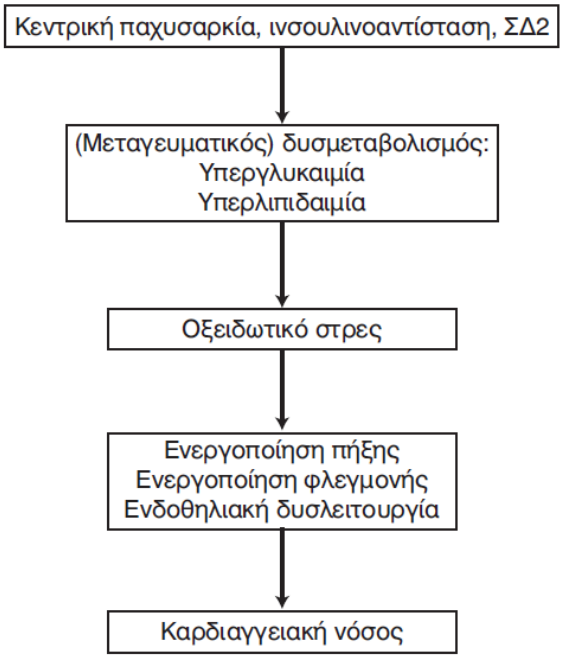


Εικόνα 14: *Ο ρόλος των φωσφολιποειδικών μεσολαβητών στην φλεγμονή και κατ' επέκταση στην αθηροσκλήρωση [85]*

1.6 Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός-Μεταγευματική φλεγμονή

Ο μεταγευματικός δυσμεταβολισμός χαρακτηρίζεται από την υπέρμετρη αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης / γλυκόζης και τριγλυκεριδίων μεταγευματικά, και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου, ακόμη και σε άτομα μη διαβητικά. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου αφορούν στην αύξηση του ενδοκυττάριου οξειδωτικού στρες, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, καθώς και στην εμφάνιση διαταραχών της πηκτικότητας κατά τη διάρκεια της μεταγευματικής υπερτριγλυκεριδαιμίας και υπεργλυκαιμίας, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 15 [87]. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής, που χαρακτηρίζεται από λήψη τροφών υψηλού γλυκαιμικού δείκτη, χαμηλή σωματική άσκηση και αυξημένο σωματικό βάρος, οδηγεί

σε ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής και διαταραχή της μεταγευματικής γλυκαιμίας και λιπαιμίας, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη και παρατεταμένη αύξηση της γλυκόζης, αλλά και των τριγλυκεριδίων μεταγευματικά [88, 89].



Εικόνα 15: *Σχηματική απεικόνιση των χαρακτηριστικών του μεταγευματικού δυσμεταβολισμού [87]*

Κατά το μεταγευματικό στάδιο που υπάρχουν μεταβολικές ανωμαλίες στον οργανισμό παρατηρείται ταυτόχρονα μία έμμεση διέγερση διαδικασιών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Γι αυτό το λόγο πιστεύετε ότι διεγείρεται η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, που είναι μία φλεγμονώδη διαδικασία, κατά το μεταγευματικό στάδιο, μέσω της αλληλεπίδρασης των λευκοκυττάρων με τα μεταγευματικά τριγλυκερίδια. Πολλές μελέτες συνηγορούν στο γεγονός ότι η πολύπλοκη μεταγευματική κατάσταση και τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων πλάσματος αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης αθηρωματικής νόσου και καρδιαγγειακών συμβαμάτων , για το λόγο ότι σε αυτό το στάδιο διεγείρεται το οξειδωτικό στρες και φλεγμονώδεις διαδικασίες [87]. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί συσχέτισης και αλληλεπίδρασης της μεταγευματικής κατάστασης με το οξειδωτικό στρες, την αγγειακή δυσλειτουργία και τη φλεγμονή, που θα αναλυθούν παρακάτω.

Κατά την κατανάλωση γευμάτων, πλούσιων σε λιπίδια και απλούς υδατάνθρακες, παρατηρείται απότομη αύξηση επιπέδων γλυκόζης, τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αυτή η υπερπροσφορά ενεργειακών υποστρωμάτων (γλυκόζη και ελεύθερα λ.ο) στον οργανισμό, έχει ως αποτέλεσμα την υπέρβαση πεπερασμένων μεταβολικών δυνατοτήτων των μιτοχονδρίων, των μυών και του λιπώδη ιστού, καθώς αδυνατούν να μεταβολίσουν τα θρεπτικά συστατικά της τροφής. Αυτό οδηγεί στην υπερπλήρωση του κύκλου του Krebs από τη γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα, διεγείροντας έτσι την υπερβολική παραγωγή NADH. Ωστόσο, λόγω ανεπάρκειας του μηχανισμού οξειδωτικής φωσφορυλίωσης , που συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα παραγόμενα NADH αυξάνουν την μιτοχονδριακή κλίση πρωτονίων, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων στο μόριο O_2 και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (π.χ. ανιόν του υπεροξειδίου). Η αλυσιδωτή αυτή διαδικασία οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου (Εικόνα 16) [90].

Σε κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε διαβητικούς και μη, φάνηκε ότι η αύξηση του οξειδωτικού στρες, που προκαλείται, οδηγεί σε αύξηση της φλεγμονώδους διαδικασίας, της συστολής των αγγείων, τη δημιουργία θρόμβων και του ρυθμού οξείδωσης των LDL λιποπρωτεϊνών. Η αύξηση της φλεγμονώδους διαδικασίας μπορεί να επαληθευτεί και από την άμεση αύξηση της εκκρινόμενης C αντιδρώσας πρωτεΐνης, που αποτελεί ένα δείκτη φλεγμονής, και από την αύξηση της παραγωγής κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης, παραγόντων πήξης και της ενδοθηλίνης-1 [90]. Αξίζει να αναφερθεί έρευνα η οποία έδειξε ότι η παροδική μεταγευματική αύξηση της γλυκόζης που διεγείρει την αύξηση του οξειδωτικού στρες, αυξάνει το οξειδωτικό στρες περισσότερο σε σχέση με τη χρόνια υπεργλυκαιμία [91].

Όσον αφορά τις θεραπευτικές παρεμβάσεις, αυτές στοχεύουν στη μείωση των μεταγευματικών επιπέδων της γλυκόζης και των λιπιδίων, που μπορεί να επιτευχθεί μέσω τροποποίησης των διαιτητικών συνηθειών, όπως για παράδειγμα είναι ο γλυκαιμικός δείκτης των τροφών, το είδος των προσλαμβανόμενων λιπαρών οξέων, ο τρόπος μαγειρέματος ή η προσθήκη συγκεκριμένων συστατικών στο φαγητό, είτε σε περίπτωση που κρίνεται αναγκαίο μέσω φαρμακευτικής αγωγής [88, 89].

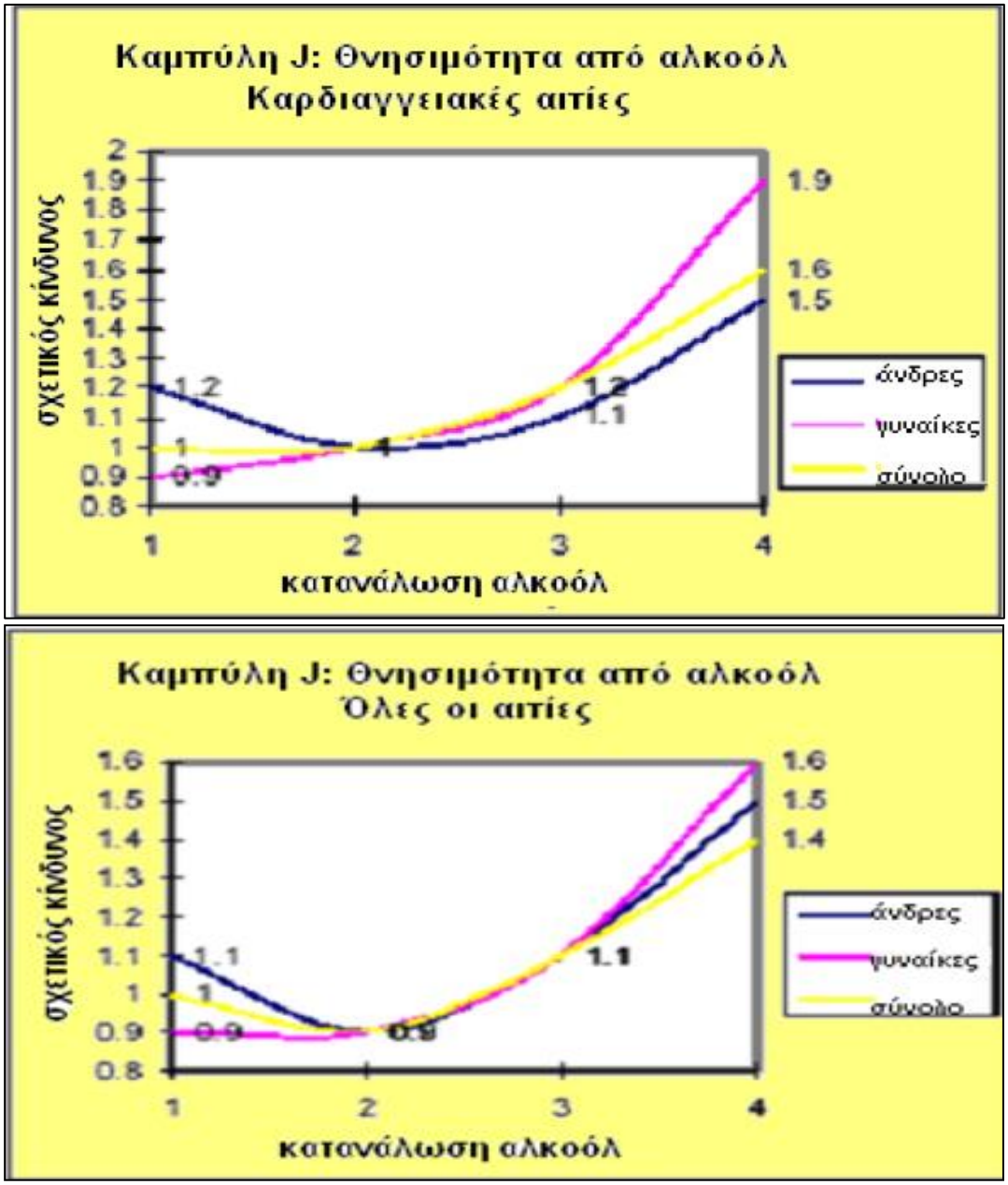
Εικόνα 16: *Πως οδηγεί η μεταγευματική υπεργλυκαιμία και λιπαιμία σε οξειδωτικό stress και φλεγμονή*

2. ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΥΡΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα κρασί και καρδιαγγειακά νοσήματα - «Γαλλικό παράδοξο»

Η σχέση μεταξύ κατανάλωσης κρασιού και καρδιαγγειακών νοσημάτων περιγράφηκε πρώτα το 1819 από έναν Ιρλανδό γιατρό, τον Samuel Black και αργότερα, το 1992 ονομάστηκε από τον Dr. Renaud, επιστήμονα στη Γαλλία, «Γαλλικό παράδοξο» [92, 93]. Ο όρος «Γαλλικό παράδοξο» δημιουργήθηκε από την επιδημιολογική παρατήρηση ότι ο πληθυσμός της Γαλλίας παρουσίαζε σχετικά χαμηλή θνησιμότητα και χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, παρά τη σχετικά υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων καθώς και την παρουσία διαδεδομένων καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου. Στο άρθρο του Renaud το 1992 , αποδόθηκε το Γαλλικό παράδοξο στη μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της Γαλλίας σε πιο αξιοσημείωτο βαθμό σε σχέση με άλλες χώρες. Εν συνεχεία, ακολούθησαν επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι η κατανάλωση αλκοόλ στο επίπεδο πρόσληψης της Γαλλίας (μέτρια κατανάλωση, 20-30g ανά ημέρα) μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (CHD-cardiovascular diseases) κατά τουλάχιστον 40%. Παρά το γεγονός ότι είχε γίνει η αρχική υπόθεση πως η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει την αθηροσκλήρωση, μέσω ευεργετικών επιδράσεων στην HDL-C χοληστερόλη και πιο συγκεκριμένα μέσω της αύξησή της, ο Renaud ανέφερε ότι τα επίπεδα HDL-C πλάσματος δεν ήταν σημαντικά υψηλότερα στο Γαλλικό πληθυσμό σε σχέση με άλλες δυτικές χώρες. Ύστερα από επαναξιολόγηση των προηγούμενων δημοσιευμένων μελετών, οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι η μείωση της εμφάνισης στεφανιαία νόσου και συνεπώς καρδιαγγειακών νοσημάτων, δεν οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων της HDL-C, αλλά μάλλον στη βελτίωση της αιμοστατικής ισορροπίας και τη μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων [93]. Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από το κρασί φαίνεται να αποτελεί μία εξήγηση για την προστασία από τη στεφανιαία νόσο στο γαλλικό πληθυσμό, αφού πιλοτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η συσσώρεσυη των αιμοπεταλίων κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα στον πληθυσμό της Γαλλίας σε σχέση με της Σκωτίας [94].

Εδώ και αρκετά χρόνια, οι επιστήμονες έχουν συμπεράνει ότι η κατανάλωση αλκοόλ και ο κίνδυνος θανάτου από διάφορα αίτια έχει σχήμα J (J-shaped curve)(Εικόνα 17), καθώς η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με τη μέτρια κατανάλωση (περίπου 20-30γρ. αιθανόλης/ημέρα), ενώ τα άτομα με μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, έχουν μικρότερη θνησιμότητα συγκριτικά με αυτούς που απέχουν πλήρως από τη χρήση αλκοόλ [95].



Εικόνα 17: *Κίνδυνος θανάτου από όλα τα αίτια και καρδιαγγειακά νοσήματα σε σχέση με την κατανάλωση αλκοόλ: 1:<1 ποτό το μήνα, 2: 1-2 ποτά ανά ημέρα, 3:3-5 ποτά ανά ημέρα και 4: >6 ποτά ανά ημέρα*

Μετά από τη διατύπωση του «γαλλικού παραδόξου» ακολούθησαν αρκετές μελέτες σχετικά με την πιθανή συσχέτιση της κατανάλωσης αλκοόλ και του καρδιαγγειακού κινδύνου, οι οποίες προσπάθησαν να δώσουν απάντηση σε ένα δίλημμα το οποίο ήταν το εξής : "όλα τα αλκοολούχα ποτά ή μόνο το κρασί έχει ευεργετική δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα"? [96]

Η πρώτη ισχυρή υποστήριξη της καρδιο-προστατευτικής δράσης του κρασιού, και πιο συγκεκριμένα του κόκκινου, σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά προήλθε από την μελέτη Copenhagen City Heart Study. Σε αυτή τη μελέτη παρακολουθήθηκαν για 12 χρόνια 13.285 άντρες και γυναίκες (ηλικία 30-70) και επιβεβαιώθηκε ότι ο κίνδυνος καρδιαγγειακής θνησιμότητας μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού, πιο συγκεκριμένα από ένα σχετικό κίνδυνο (RR) 1.00 για εκείνους που δεν έπιναν κρασί σε 0.5-0,8 για εκείνους που έπιναν τρία με πέντε ποτήρια ανά ημέρα. Επίσης, παρατηρήθηκε μια μη σημαντική επίδραση στον κίνδυνο θνησιμότητας σε εκείνους που κατανάλωναν μπύρα σε σύγκριση με όσους δεν κατανάλωναν, υποστηρίζοντας τη μη-καρδιοπροστατευτική δράση της μπύρας [97].

Ο ερευνητής St. Legar (1979) ήταν επίσης ένας από τους πρώτους που περιέγραψε μια ισχυρή προστατευτική δράση της κατανάλωσης κρασιού και της θνησιμότητας από ισχαιμική καρδιοπάθεια και μια αδύναμη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης μπύρας ή άλλων αλκοολούχων ποτών και της θνησιμότητας, βασισμένος σε δεδομένα από 18 διαφορετικές αμερικάνικες και ευρωπαϊκές χώρες [98, 99]. Σε μια μετα-ανάλυση του 2010 του Di Castelnuovo και των συνεργατών του, αναφέρθηκαν οι επιπτώσεις της κατανάλωσης κρασιού στο καρδιαγγειακό κίνδυνο, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης αγγειακής νόσου ήταν μικρότερος σε όσους κατανάλωναν κρασί σε σύγκριση με αυτούς που δεν κατανάλωναν [100].

Επιπρόσθετα, μελέτες που συνέκριναν το κόκκινο και το λευκό κρασί ανέδειξαν ότι το κόκκινο κρασί εμφάνιζε εντονότερες επιδράσεις στην καρδιαγγειακή προστασία. Στα περισσότερα πειράματα φάνηκε το κόκκινο κρασί να είναι ένα πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό σε σχέση με το λευκό με την εξήγηση ότι το λευκό έχει χαμηλότερη συγκέντρωση ευεργετικών

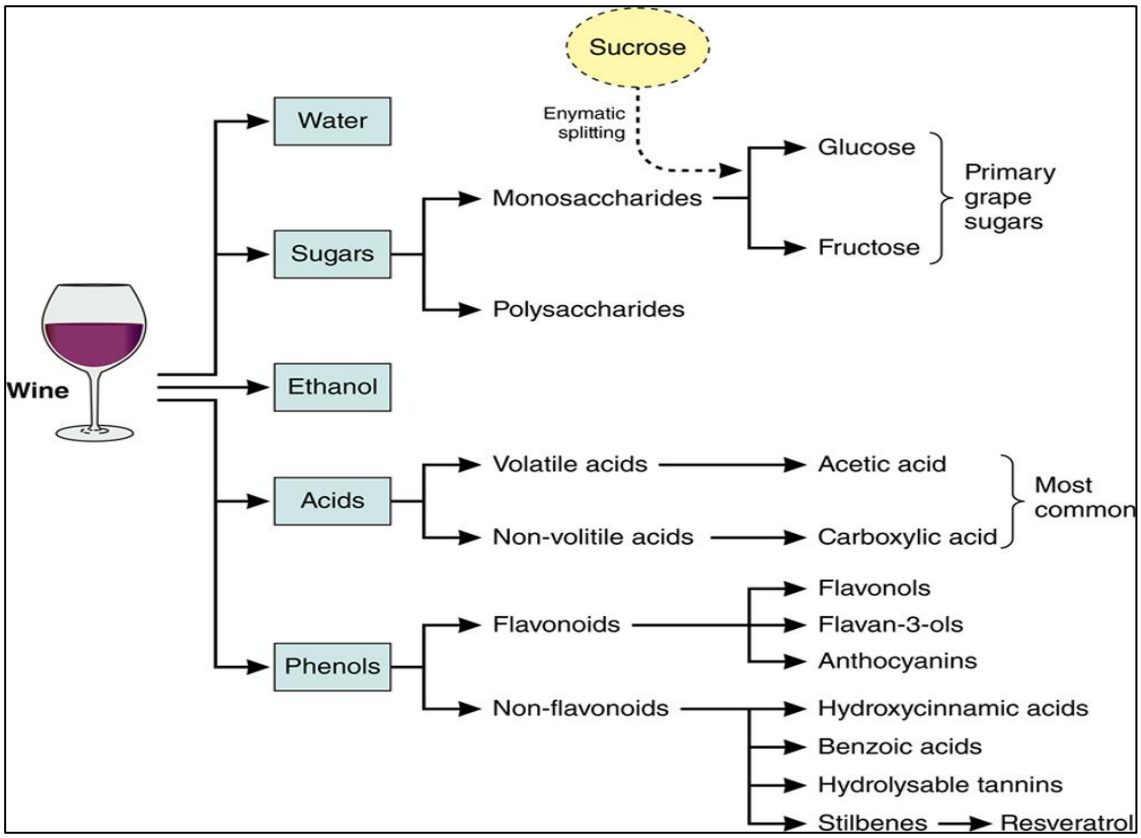
συστατικών τα οποία στερείτε λόγω του τρόπου παρασκευής του. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που δεν έχουν δείξει καμία διαφορά μεταξύ κόκκινου και λευκού [101]. Και από αυτό φαίνεται ότι η ποικιλία του σταφυλιού διαδραματίζει καθοριστική σημασία για τη βιολογική του δραστικότητα, παρά το χρώμα του [98].

Τέλος, σύμφωνα με τη μελέτη του Grobaek και των συνεργατών του (2000), ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει ο τρόπος με τον οποίο καταναλώνεται το αλκοόλ, το λεγόμενο «drinking pattern». Γενικά, το κρασί προτιμάται σε μικρές ποσότητας κατά τη διάρκεια των γευμάτων, σε αντίθεση με άλλα αλκοολούχα ποτά, τα οποία καταναλώνονται άστατα κατά τη διάρκεια της ημέρας και σε μεγάλες ποσότητες σε λίγες μέρες εβδομαδιαίως, το λεγόμενο «binge drinking» [102]. Ο τρόπος αυτός κατανάλωσης του κρασιού επιτρέπει καλύτερη απορρόφηση της αιθανόλης του οίνου, με αποτέλεσμα να καθυστερεί τις μεταγευματικές μεταβολές παραγόντων φλεγμονής, πήξης και ενδοθηλιακών παραγόντων που επηρεάζουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

2.2 Βιολογικές δράσεις του κρασιού στην υγεία του ανθρώπου

2.2.1 Σύσταση κρασιού

Σύμφωνα με τις πιο σύγχρονες τεχνικές χρωματογραφίας έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα από την ανάλυση του κρασιού περισσότερα από 500 συστατικά. Τα βασικά αυτά συστατικά είναι: 1) το νερό, 2) η αιθανόλη, 3) τα φαινολικά συστατικά, 4) σάκχαρα, 5) διάφορα οξέα και αμινοξέα, 6) κλασικά λιποειδή και 7) αρκετές άλλες ουσίες σε μικρότερες συγκεντρώσεις [103]. Εννοείται ότι η ακριβής σύσταση και οι συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών του κρασιού ποικίλει και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία του σταφυλιού, οι κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, ο χρόνος ωρίμανσης, η περιοχή στην οποία αναπτύσσονται τα σταφύλια και από πολλούς άλλους παράγοντες [104]. Αναλυτικότερα τα κύρια συστατικά του κρασιού είναι τα παρακάτω (Εικόνα 18):



Εικόνα 18:*Επισκόπηση των επιμέρους συστατικών του κρασιού*

- ***ΝΕΡΟ***

Ένα από τα πιο βασικά συστατικά τόσο του κρασιού όσο και των σταφυλιών αποτελεί το νερό και είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα χαρακτηριστικά που θα αποκτήσει. Η περιεκτικότητα του κρασιού σε νερό κυμαίνεται σε ποσοστό 75-87%, το οποίο ποικίλει ανάλογα με την επεξεργασία που έχει υποστεί κάθε φορά. Το νερό αποτελεί απαραίτητο συστατικό σε πολλές χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με στόχο την ωρίμανση των σταφυλιών και ακολούθως του κρασιού [103].

- ***ΑΙΘΑΝΟΛΗ***

Υπό κανονικές συνθήκες ωρίμανσης το αλκοόλ βρίσκεται στο κρασί σε ποσοστό 14-15%, ωστόσο στα περισσότερα κρασιά η συγκέντρωση αιθανόλης κυμαίνεται σε ποσοστό 10-13%. Βασικοί παράγοντες που ευθύνονται για την παραγωγή αιθανόλης είναι τα σάκχαρα, τα μικρόβια της ζύμωσης του μούστου και η θερμοκρασία ζύμωσης. Η αιθανόλη αποτελεί ένα

φυσικό παράγωγο της ζύμωσης και η παρουσία της στο κρασί αποσκοπεί σε έναν πολύ σημαντικό ρόλο, ο οποίος είναι να διατηρεί τη σταθερότητα των χαρακτηριστικών του κρασιού κατά το στάδιο της ωρίμανσής του. Αυτό συμβαίνει καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης στο μούστο μειώνεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών και η ζύμωση που αυτοί προκαλούν [103].

- ***ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ***

Τα φαινολικά συστατικά (ή πολυφαινόλες) αποτελούν τα βασικά βιοενεργά μικροσυστατικά του κρασιού. Αποτελούν συστατικά υψίστης σημασίας για την ποιότητα του κρασιού καθορίζοντας την εμφάνιση, το άρωμα, τη γεύση, την αίσθησή του στο στόμα και τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Οι πολυφαινόλες προέρχονται κατά τη διαδικασία της οινοποίησης κυρίως από τη φλούδα, το κουκούτσι και το τσάμπουρο του αμπελιού. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο κόκκινο κρασί υπολογίζεται περίπου στο 0,9-2,5g/L, ενώ στο λευκό κρασί υπολογίζεται στο 0,19-0,29g/L [105]. Είναι γνωστό ότι το κόκκινο κρασί περιέχει 10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών από το λευκό κρασί και αυτό διότι κατά τη διαδικασία οινοποίησης, το πρώτο ζυμώνεται για εβδομάδες μαζί με τους σπόρους και τις φλούδες του σταφυλιού [106]. Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού θα μπορούσαν να χωριστούν σύμφωνα με τον ανθρακικό τους σκελετό σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή[107].

Η πρώτη κατηγορία, τα φλαβονοειδή, αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό (85%) των φαινολικών συστατικών του κρασιού, με πληθώρα αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων. Οι κύριες κατηγορίες των φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες και οι ανθοκυανίνες [108].

Η δεύτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων αποτελείται από τα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις ταννίνες. Τα φαινολικά οξέα περιλαμβάνουν παράγωγα κινναμικού και βενζοϊκού οξέος, με τα υδροξυκινναμωνικά να βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο κρασί και στα υποπροϊόντα της οινοποίησης [109]. Όσον αφορά την κατηγορία των στιλβενίων , η συγκέντρωσή τους ποικίλλει από κρασί σε κρασί καθώς επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων, με τον πιο σημαντικό εκπρόσωπό τους να είναι η ρεσβερατρόλη. Τέλος, οι

ταννίνες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες και τις υδρολυόμενες ταννίνες ή ελαγγιταννίνες.

Το βασικό πλεονέκτημα των φαινολών του κρασιού σε σχέση με τις φαινόλες άλλων τροφίμων είναι ότι οι πρώτες είναι υδατοδιαλυτές με αποτέλεσμα να έχουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, συγκριτικά π.χ με τις φαινόλες των λαχανικών όπου βρίσκονται σε ισχυρά δεσμευμένη και αδιάλυτη μορφή, γεγονός που καθιστά την απορρόφησή τους από τον οργανισμό σε χαμηλά επίπεδα [110].

- ***ΛΙΠΟΕΙΔΗ***

Το κρασί περιέχει επίσης και λιποδιαλυτά συστατικά τα οποία είναι είτε φαινολικά συστατικά είτε κλασσικά φώσφο και γλυκο λιποειδή. Τα λιποειδή που περιέχονται στο κρασί προέρχονται κυρίως από τα λιποειδή της ζύμης. Τα λιποειδή αποτελούν το 8-15% του ξηρού βάρους στους σπόρους του σταφυλιού. Η περιεκτικότητα του κρασιού σε λιποειδή μεταβάλλεται από τη χρήση των θειωδών αλάτων. Αναλόγως το είδος του κρασιού, τα φωσφολιποειδή αποτελούν το 2-4% των ολικών λιποειδών (TL), τα ουδέτερα λιποειδή (NL) αποτελούν το 50-70% των TL και τα γλυκολιποειδή αποτελούν το 25-40% των TL. Οι κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας των γλυκολιποειδών είναι: τα μονογαλακτοζυλο διγλυκερίδια και οι κερεβοζίτες. Όσον αφορά, την κατηγορία των φωσφολιποειδών σε μεγαλύτερη αναλογία έχουν βρεθεί τα εξής φωσφολιποειδή: φωσφατιδυλο-χολίνη, φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη και φωσφατιδυλο-γλυκερόλη. Τα ακόρεστα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα συναντώνται σε σχεδόν ίσες συγκεντρώσεις, με ελαφρά υπεροχή των κορεσμένων λιπαρών οξέων [111]. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, με κύριους εκπροσώπους το λινελαϊκό και το ελαϊκό οξύ, ανιχνεύονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>89% της συνολικής συγκέντρωσης). Όσον αφορά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, το λινολεϊκό οξύ είναι το κύριο ακολουθούμενο από το λινολενικό οξύ.

2.2.2 Βιολογικές δράσης αιθανόλης

Πλήθος ερευνητικών δεδομένων υποστηρίζουν την ευεργετική δράση του κρασιού στην υγεία του ανθρώπου, με τα περισσότερα δεδομένα να αποδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες αυτές στο φαινολικό περιεχόμενο του κρασιού. Ωστόσο, ένα μέρος της ερευνητικής

κοινότητας αποδίδει τις ιδιότητες αυτές και στην περιεκτικότητα του κρασιού σε αιθανόλη. Παρόλο που η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ έχει συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις, φαίνεται ότι η χαμηλή προς μέτρια κατανάλωση αλκοόλ έχει θετικές επιδράσεις σε βιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού και συνεπώς στην υγεία του [106].

Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας, γεγονός το οποίο σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαία νόσου [112]. Επιπλέον, άλλοι ερευνητές έχουν αναδείξει ευεργετικά αποτελέσματα της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ στην ευαισθησία της ινσουλίνης, στην αντίσταση της ινσουλίνης και στο μεταβολισμό της γλυκόζης [93, 112]. Η αιθανόλη έχει βρεθεί ότι μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, μέσω οξείδωσης των λιπαρών οξέων των μυών και μειώνοντας έτσι τον λιπώδη ιστό. Αυτή η σειρά διεργασιών πιθανόν να ευνοεί τη μείωση της φλεγμονής [100]. Το αλκοόλ φαίνεται ότι μειώνει επίσης την υπεργλυκαιμία μέσω αναστολής της ηπατικής νεογλυκογένεσης, γεγονός που οδηγεί σε μείωση των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης υπεργλυκαιμίας και υπερινσυλιναιμίας, που αποτελούν δείκτες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα [113].

Πλήθος ερευνητικών δεδομένων αναδεικνύουν επίσης την ευεργετική επίδραση της αιθανόλης, ανεξαρτήτως είδους αλκοολούχου ποτού, στην αύξηση των τιμών της λιποπρωτεϊνης υψηλής πυκνότητας (HDL-C). Η αύξηση αυτή συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης αθηρωματικής νόσου. Ως γνωστόν, ο ρόλος της HDL λιποπρωτεϊνης είναι να μεταφέρει χοληστερόλη από τις αρτηρίες στο ήπαρ, με απώτερο στόχο την απέκκρισή της , αποτρέποντας την συσσώρευσή της στις στεφανιαίες αρτηρίες και ως εκ τούτου την αθηροσκλήρωση [114]. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η αιθανόλη δεν επιδρά μόνο στην αύξηση της HDL λιποπρωτεϊνης, που είναι καρδιοπροστατευτική, αλλά επιδρά και στα ακόλουθα: LDLc, VLDLc, τριγλυκερίδια, απολιποπρωτεϊνες (Apo) και λιποπρωτεϊνη α (ιδιαίτερα αθηρογόνο σωματίδιο). Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η αιθανόλη μπορεί να αυξήσει την απολιποπρωτεϊνη A1 και να μειώσει την λιποπρωτεϊνη LDL [115]. Επίσης μία μελέτη των Sharpe et al (1995) έδειξε ότι η ημερήσια κατανάλωση 200 ml κόκκινου κρασιού για 10 ημέρες μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά την συγκέντρωση της λιποπρωτεϊνης α

πλάσματος σε ποσοστό 12%. Η μείωση αυτή μπορεί να επηρεάσει και να μειώσει εν συνεχεία την καρδιαγγειακή νοσηρότητα [116].

Η θετική επίδραση της αιθανόλης στην HDL-c φαίνεται ότι μπορεί να ερμηνεύσει κατά 50% την επίδραση της κατανάλωσης αλκοόλ στην πρόληψη της αθηρωματικής νόσου, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό πιστεύεται ότι μπορεί να οφείλεται στις αντιθρομβωτικές ιδιότητες του αλκοόλ καθώς μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ινωδογόνου, παραγόντων πήξης, συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, το ιξώδες του αίματος και να αυξήσει τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού [100, 113]. Με αυτό τον τρόπο μειώνει την υπερπηκτικότητα του αίματος και επομένως τον κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακού συμβάματος [100, 113]. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί σε αρκετές μελέτες, σε ανθρώπους και σε ζώα, ότι η αιθανόλη μπορεί να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς μπορεί να αποκρίνεται σε διάφορους αγωνιστές όπως η θρομβίνη, το ADP, το κολλαγόνο και τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Ένας επιπλέον μηχανισμός που φαίνεται ότι επιδρά το αλκοόλ στην πήξη του αίματος είναι ότι μπορεί να αναστέλλει την απελευθέρωση της θρομβοξάνης A_2 (TXA_2) που προκαλείται από διάφορους αγωνιστές, αναστέλλοντας με αυτό το τρόπο τη δράση της φωσφολιπάσης A_2 των αιμοπεταλίων. Η αιθανόλη φαίνεται ότι έχει επίσης και ανασταλτική επίδραση και στη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης C, που αποτελεί τον δεύτερο τύπο ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [117].

Πλήθος μελετών έχουν αναδείξει και την επίδραση της αιθανόλης στο ινωδολυτικό σύστημα, καθώς μειώνει τη CRP και ενδεχομένως και άλλους δείκτες φλεγμονής, ομαλοποιώντας και την κατάσταση της φλεγμονής [114]. Η αιθανόλη συνδέεται επίσης με αύξηση των επιπέδων προστακυκλίνης στο τοίχωμα των αγγείων, οδηγώντας σε αύξηση της αγγειοδιαστολής και απελευθέρωση του οξειδίου του αζώτου από το ενδοθήλιο, αναστέλλοντας έτσι την δημιουργία θρόμβων στις στεφανιαίες αρτηρίες [113, 115].

Αξίζει βέβαια να αναφερθεί ότι αν και η αιθανόλη και τα φαινολικά συστατικά του κρασιού δεν φαίνεται να δρουν συνεργιστικά, το άθροισμα των επιδράσεών τους είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τις επιδράσεις που έχει το αλκοόλ από μόνο του.

2.2.3 Βιολογικές δράσεις μικροσυστατικών κρασιού

Ωστόσο, οι ιδιότητες της αιθανόλης μπορούν να εξηγήσουν μόνο ένα μέρος των ευεργετικών επιδράσεων του κρασιού στις βιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, με το μεγαλύτερο μέρος να αποδίδεται κυρίως στα μικροσυστατικά του (Εικόνα 19) ,που μπορούν να ταξινομηθούν σε λιποδιαλυτά και υδατοδιαλυτά. Μεταξύ αυτών των μικροσυστατικών ιδιαίτερη θέση κατέχουν μόρια όπως η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη, το γαλλικό οξύ καθώς επίσης φωσφο-και γλυκο-λιποειδή [118, 119].

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ/ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΔΡΑΣΗ

Τα μικροσυστατικά του κρασιού φαίνεται ότι επηρεάζουν διάφορα στάδια της αθηρωμάτωσης, από τη δημιουργία της πρώιμης αθηρωματικής πλάκας έως και την απόφραξη του αγγείου. Αρκετές μελέτες που διεξήχθησαν ,σε ανθρώπους, έχουν αποδείξει ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού, πέρα από την αιθανόλη που περιέχει, μπορεί να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου, λόγω τόσο των αντιοξειδωτικών όσο και των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους.

Πιο συγκεκριμένα , μελέτες έχουν δείξει ότι η επιγαλλοκατεχίνη μπορεί να μετριάσει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος, που προκαλείται από την ισχυρή προφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-1β, συμβάλλοντας έτσι στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης. Επιπλέον, η επιγαλλοκατεχίνη φαίνεται να ενεργοποιεί τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων και να μειώνει την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών (ROS). Αντιοξειδωτικές ιδιότητες παρουσιάζουν επίσης η κερκετίνη, οι κατεχίνες και οι ταννίνες που περιέχονται στο κρασί, δρώντας ενάντια στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, επάγοντας αντιοξειδωτικά ένζυμα και μειώνοντας της τη φλεγμονή [93, 108].

Άλλη μία φαινολική ένωση, η ρεσβερατρόλη, φαίνεται ότι έχει ευεργετική επίδραση κατά του οξειδωτικού στρες. Η ρεσβερατρόλη φαίνεται ότι μπορεί να αναστείλλει την οξείδωση της LDL που προκαλείται από χαλκό ή $ONOO^-$, καθώς και να αναστείλλει τη δράση ενζυμικών συστημάτων, όπως η NOX, η LOX, η XO και η MPO, που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) [120]. Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι αναστέλλει την οξείδωση της LDL,

μειώνει την εισροή χοληστερόλης και την πρόσληψή της από τα μακροφάγα αυξάνοντας ταυτόχρονα την εκροή της[100].

Στο πλαίσιο αυτό μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα από λευκό και κόκκινο κρασί μπορούν να μειώσουν την δράση της λιποοξυγονάσης, να εκκαθαρίσουν τις ελεύθερες ρίζες, και δεσμεύουν τον προ-οξειδωτικο σίδηρο και να αυξήσουν την αντίσταση του ορού στην προκαλούμενη από Cu οξείδωση. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη των Xanthopoulou et al φάνηκε ότι οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων οξειδάση της ξανθίνης, κυκλοοξυγονάσης και λυποξυγονάση τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία οξείδωσης της LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο. Έντονη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισε και ένα άλλο συστατικό του κρασιού, η ρεσβερατρόλη. Σε ρεσβερατρόλη χαμηλών συγκεντρώσεων επωάστηκαν καρδιακά μυϊκά κύτταρα και φάνηκε αύξηση των ενζύμων της φάσης ΙΙ και των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάσης, GSH, GR, GST και NQO1, καθώς και προστατευτική δράση έναντι της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης ROS. Επιπλέον, οι ακόλουθες φαινολικές ενώσεις: ρεσβερατρόλη, κερκετίνη και γαλλικό οξύ φάνηκε να εμφανίζουν έντονη εκκαθαριστική δράση ελευθέρων ριζών, με το γαλλικό οξύ να είναι ο κύριος εκκαθαριστής και να έπεται η κερκετίνη [121].

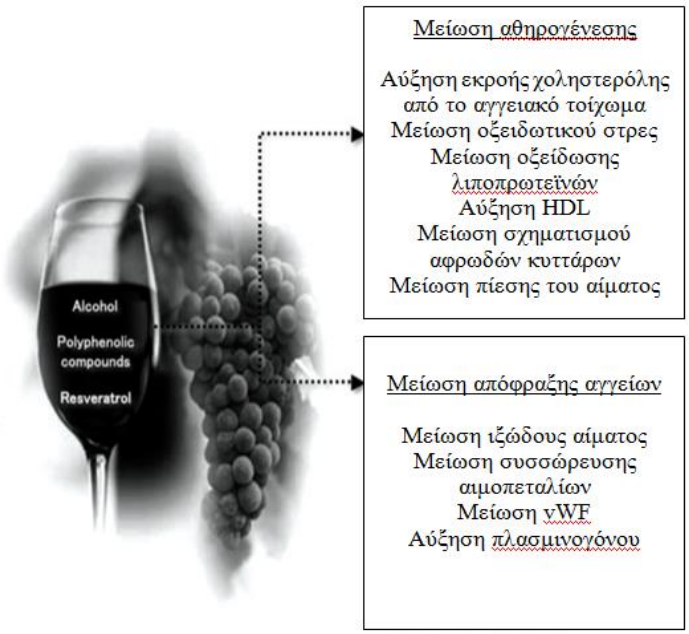
ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες που εμφανίζει το κρασί εξηγούνται και από την αιθανόλη, αλλά και από τα πολυφαινολικά συστατικά. Πληθώρα ερευνητικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους και ζώα ανέδειξαν ότι τα φαινολικά συστατικά μπορούν να μειώσουν τη σύνθεση προσταγλανδινών, θρομβοξανών και προστακυκλινών, καθώς και να μειώσουν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Παρόλο αυτά παρατηρείται ένα rebound φαινόμενο υπέρ-συσσώρευσης αιμοπεταλίων μετά από υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, κάτι το οποίο όμως δεν παρατηρείται με την κατανάλωση του κρασιού.

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ρεσβερατρόλη αλλά και η κερκετίνη μπορούν να αναστείλλουν, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση τους, την έκκριση και τη συσσώρευση

των αιμοπεταλίων που διεγείρονται από το κολλαγόνο, τη θρομβίνη, το ADP και PAF [122-124]. Υπάρχουν στοιχεία επιπλέον που αποδεικνύουν ότι η ρεσβερατρόλη έχει αντιθρομβωτική δράση καθώς μπορεί να μειώσει τη σύνθεση προθρομβωτικών μεσολαβητών (σύνθεση εικοσανοειδών) και την έκφραση του γονιδίου του ιστικού παράγοντα. Φαίνεται να μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+}, μειώνοντας με αυτό το τρόπο την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ακόμα, η ρεσβερατρόλη αναστέλλοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και ρυθμίζοντας την έκκριση μονοξειδίου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγεί σε μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων[122].

Διάφορες in vitro μελέτες έχουν αναδείξει και τις ευεργετικές επιδράσεις της κατεχίνης και της επικατεχίνης του κρασιού στην ινωδόλυση, προκαλώντας ευνοϊκή γενετική διαμόρφωση των ινωδολυτικών πρωτεϊνών[93]. Φαίνεται ότι τα συστατικά αυτά μπορούν να αναστείλλουν δοσοεξαρτώμενα, την επαγόμενη από το αραχιδονικό οξύ, συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αντιθρομβωτικές ιδιότητες παρουσιάζει επίσης , in vitro, και η κερκετίνη καθώς φαίνεται να ενισχύει τα αντιθρομβωτικά αποτελέσματα της προστακυκλίνης [125]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα από κόκκινο και λευκό κρασί περιέχουν αναστολείς του PAF με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων[126, 127].



***Εικόνα 19**: Ευνοϊκές επιδράσεις των συστατικών του κρασιού για την παρεμπόδιση της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας*

2.3 ΥΠΟ-ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ- ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΕΥΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο οίνος προκύπτει από την αλκοολική ζύμωση των σταφυλιών ή του μούστου τους και διαφοροποιείται ανάλογα με το χρώμα σε λευκά, ερυθρά ή ροζέ. Το χρώμα του σταφυλιού δεν καθορίζει απαραίτητα και το χρώμα του κρασιού, καθώς οι χρωστικές του σταφυλιού ανιχνεύονται στο σάρκωμα. Επομένως μόνο αν το σάρκωμα του σταφυλιού συμμετέχει στη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να αποδώσει το ανάλογο χρώμα στον οίνο. Γίνεται κατανοητό λοιπόν ότι το λευκό κρασί μπορεί να παραχθεί από κάθε ποικιλία, αφαιρώντας τη σάρκα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης , σε αντίθεση με τα ερυθρά και ροζέ κρασιά που παράγονται μόνο από μαύρες ή ερυθρές ποικιλίες.

Η συγκομιδή των σταφυλιών αποτελεί το πρώτο στάδιο για την παραγωγή του κρασιού και στη συνέχεια ακολουθεί η γλευκοποίηση, δηλαδή η παραλαβή του μούστου (γλεύκος) μέσω της διαδικασίας της σύνθλιψης μεγάλων ποσοτήτων σταφυλιών. Ο όρος «οινοποίηση» αναφέρεται σε μία σειρά αλλεπάλληλων ενζυμικών αντιδράσεων μικροοργανισμών, κυρίως ζυμομυκήτων, τα οποία βρίσκονται αδρανοποιημένα στο φλοιό του σταφυλιού και στη συνέχεια ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται και τα οποία ευθύνονται για το σημαντικότερο τμήμα της διαδικασίας που είναι η αλκοολική ζύμωση σακχάρων. Η διαδικασία αυτή διαρκεί συνήθως 8-25 ημέρες και οδηγεί στην παραγωγή της αιθανόλης και του διοξειδίου του άνθρακα από πρώτη ύλη τα σάκχαρα του σταφυλιού(CO_2) [128]. Μετά την αλκοολική ζύμωση ακολουθεί και μία δευτερεύουσα αντίδραση, η μηλογαλακτική ζύμωση, που πραγματοποιείται από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, μειώνοντας την οξύτητα και αυξάνοντας το pH[129].

ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά την ερυθρή οινοποίηση, παραλαμβάνονται αρχικά τα σταφύλια από ερυθρές ποικιλίες (όπως Μαυροδάφνη, Πικροδάφνη, Αγιωργίτικο, Ξινόμαυρο, Merlot, Cebernet Sauvignon κ.α) ,απομονώνονται οι ρώγες και απομακρύνονται τα κοτσάνια για να μην μεταδοθεί η στυφή γεύση στο μούστο. Εν συνεχεία, οι ρώγες σπάνε ελαφρώς και ακολουθεί η εκχύλισή τους ,κατά την οποία ο μούστος παραμένει μαζί με το φλοιό του σταφυλιού ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η αλκοολική ζύμωση στους 26-30ºC. Μόλις τα συστατικά του φλοιού του σταφυλιού έχουν περάσει στον μούστο, απομακρύνεται ο φλοιός και συνεχίζεται η ζύμωση απουσία του. Κάποιες φορές ακολουθεί και μηλογαλακτική ζύμωση, μετατροπή του μηλικού σε γαλακτικό οξύ από τα μηλογαλακτικά βακτήρια, προκειμένου να μειωθεί η οξύτητα του κρασιού. Τέλος, έχουμε την επεξεργασία και την εμφιάλωση του κρασιού σε βαρέλια ή/και φιάλες [128, 130].

ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Για την παραγωγή λευκού οίνου παραλαμβάνονται αρχικά τα σταφύλια κυρίως από λευκές ποικιλίες (όπως η Μαλαγουζιά, το Μοσχοφίλερο, η Ρομπόλα, το Chardonnay, το Sauvignon blanc κ.α), ερυθρές ποικιλίες με λευκή σάρκα ή ερυθρωπές. Τα βήματα της διαδικασίας της λευκής οινοποίησης είναι παρόμοια με αυτά της ερυθρής με μόνη εξαίρεση τη διαδικασία της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, ο μούστος παραλαμβάνεται σε δύο στάδια, πρώτον αυτός που ρέει ελεύθερα και δεύτερον ο υπόλοιπος μούστος που παράγεται με ελαφρά σύνθλιψη. Ακολουθεί η απολάσπωση του μούστου, όπου παραμένει για 24 ώρες σε θερμοκρασία 8-10ºC με σκοπό τη καθίζηση των αιωρούμενων συστατικών του μούστου. Η προαναφερθείσα θερμοκρασία είναι σημαντική καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία αναστέλλετε η δράση των ζυμομυκήτων και έτσι δεν ξεκινά η ζύμωση. Αντίθετα με την ερυθρή οινοποίηση, η αλκοολική ζύμωση στην λευκή οινοποίηση πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (16-20º C) ώστε να παραμείνουν αναλλοίωτα τα αρώματα του κρασιού. Στο τέλος, το λευκό κρασί επεξεργάζεται (διαύγηση, μετάγγιση και σταθεροποίηση) και εμφιαλώνεται[128, 130].

2.3.2 ΕΙΔΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Ένα σημαντικό ποσοστό των σταφυλιών κατευθύνεται προς οινοποίηση, η οποία συνδέεται με την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανεπιθύμητων υπο-προϊόντων. Τα υπο-προϊόντα οινοποίησης περιλαμβάνουν οργανικά απόβλητα (σπόρους, σάρκα, φλούδα, τσάμπουρο, φύλλα), λύματα, εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (CO2, πτητικές οργανικές ενώσεις, κ.λπ.) και ανόργανα απόβλητα (γη διατόμων, άργιλο μπεντονίτη και περλίτη). Εκτιμάται ότι μόνο στην Ευρώπη, παράγονται 14,5 εκατομμύρια τόνοι υπο-προϊόντων σταφυλιών ετησίως. Τα οργανικά υπο-προϊόντα έχουν αξιολογηθεί για το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικές ενώσεις και φαίνεται ότι περιέχουν πληθώρα ευεργετικών συστατικών τα οποία προέρχονται από το σταφύλι [131]. Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, μέρος των ωφέλιμων συστατικών του σταφυλιού μεταφέρεται στο κρασί, αλλά σημαντική ποσότητα μένει και στα υπο-προϊόντα. Πολλοί παράγοντες, όπως η ποικιλία, οι αγρο-κλιματολογικές συνθήκες και ο βαθμός ωρίμανσης, μεταξύ άλλων, είναι υπεύθυνοι για τις μεγάλες διακυμάνσεις στο φυτοχημικό προφίλ τους.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα εκατομμύρια τόνους υπο-προϊόντων, από τη βιομηχανία οινοποίησης, έχει δημιουργηθεί μεγάλη ανάγκη για την αναζήτηση τρόπων διαχείρισης των αποβλήτων αυτών τόσο από οικολογικής όσο και από οικονομικής άποψης. Τα υπο-προϊόντα οινοποίησης, όντας πλούσια πηγή φυτοχημικών και βιοενεργών συστατικών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων, όπως και σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα [109]. Τα κυριότερα κατάλοιπα από την οινοπαραγωγική διαδικασία είναι οργανικά απόβλητα: τα στέμφυλα ή αλλιώς grape pomace, τα τσάμπουρα (μίσχοι) και τα φύλλα των σταφυλιών καθώς και οι οινολάσπες (wine lees).

2.3.2.1 ΣΤΕΜΦΥΛΑ (μίγμα από φλούδες και σπόρους-grape pomace)

Τα στέμφυλα ή «grape pomace» (GP) (Εικόνα 20) είναι ένα από τα υποπροϊόντα οινοποίησης που λόγω της μεγάλης ποικιλίας από ευεργετικές ενώσεις που κατέχει και μετά τη διαδικασία της οινοποίησης, έχει λάβει τη πλήρη προσοχή της ερευνητικής κοινότητας. Τα στέμφυλα προέρχονται από την παραγωγή του μούστου μέσω της σύνθλιψης ολόκληρων των σταφυλιών [109].

***Εικόνα 20**: Στέμφυλα (grape pomace)*

Οι ρώγες του σταφυλιού επεξεργάζονται για την παραγωγή του κόκκινου κρασιού, και οι φλούδες και οι σπόροι παραμένουν σε επαφή για αρκετές ημέρες με το μούστο της ζύμωσης. Το υπόλειμμα μετά τη ζύμωση είναι το GP, που αποτελείται κυρίως από φλούδες και σπόρους και περιέχει υψηλά επίπεδα φαινολικών συστατικών. Αυτό το γεγονός το καθιστά ένα προϊόν ιδιαίτερα σημαντικό για την προαγωγή της υγείας [132].

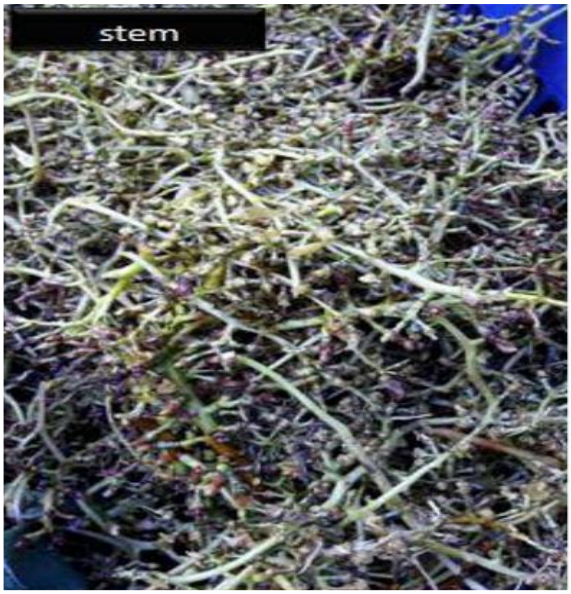
Το GP καταλαμβάνει το 20% της συνολικής ποσότητας των επεξεργασμένων σταφυλιών και είναι γνωστό ότι η παραγωγή 6 λίτρων κρασιού αποφέρει περίπου 1Kg GP [132]. Όσον αφορά τη σύνθεσή του, το 50-72% καταλαμβάνει η υγρασία αναλόγων την ποικιλία σταφυλιών και την ωρίμανσή τους. Επιπλέον οι σπόροι του σταφυλιού αποτελούν το 13% του συνολικού βάρους των σταφυλιών και κατά μέσο όρο το 52% του ξηρού βάρους των στέμφυλων, εξαρτώμενο πάντα από τη διαδικασία οινοποίησης. Σύμφωνα με την ανάλυση των σπόρων του σταφυλιού, περιέχουν 40% φυτικές ίνες, 11% πρωτεΐνη, 16% αιθέριο έλαιο και τέλος 7% ουσίες όπως ανόργανα άλατα και σάκχαρα. Η πολυφαινολική περιεκτικότητα των σπόρων του σταφυλιού κυμαίνεται σε ποσοστό 60% έως 70% του συνόλου των εκχυλίσιμων ενώσεων από το σταφύλι. Αυτό το ποσοστό καθιστά τους σπόρους ιδιαίτερα σημαντικό υποπροϊόν, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι κατά τη σύνθλιψη των

σταφυλιών και τη διαδικασία της οινοποίησης, μεταφέρεται ένα μικρό μόνο ποσοστό από αυτές τις ενώσεις και επομένως το υπόλοιπο παραμένει στο υποπροϊόν [109].

Όσον αφορά τη φλούδα φαίνεται να δρα ως υδρόφοβος φραγμός και να προστατεύει το σταφύλι από φυσικές και κλιματολογικές συνθήκες που ενδεχομένως προκαλέσουν τραυματισμό, από αφυδάτωση, από μυκητιασική λοίμωξη και από υπεριώδη ακτινοβολία [133] . Περιλαμβάνει πληθώρα φαινολικών ενώσεων, η ποικιλότητα των οποίων εξαρτάται από τη διαδικασία της οινοποίησης καθώς και από τη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται για την παραλαβή τους [109].

2.3.2.2 ΤΣΑΜΠΟΥΡΑ(κοτσάνια)

Αυτό το υποπροϊόν οινοποίησης αποτελεί πηγή στυπτικών ενώσεων, κυρίως των προανθοκυανιδινών. Τα τσάμπουρα (ή αλλιώς κοτσάνια) (Εικόνα 21) αφαιρούνται από την αρχή πριν ξεκινήσει η διαδικασία της οινοποίησης, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική στυφή γεύση του κρασιού και η κακή επιρροή στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Παρόλο που τα τσάμπουρα αποτελούν ένα αδιαμφισβήτητο υπόλειμμα που παράγεται δεν ενδείκνυται η εξέτασή του στο πλαίσιο της διαδικασίας οινοποίησης. Το μέσο ποσοστό υγρασίας του τσάμπουρου έχει φανεί ότι κυμαίνεται από 55% έως 80%, με έντονες διακυμάνσεις βέβαια , που οφείλονται στην ποικιλία του σταφυλιού. Τα αλκοολούχα αδιάλυτα κατάλοιπα από τα τσάμπουρα εκτιμώνται κατά μέσο όρο στο 71% της ξηράς ουσίας, χωρίς διαφορές μεταξύ κόκκινων και λευκών ποικιλιών [131].



Εικόνα 21: *Τσάμπουρα (Κοτσάνια)*

2.3.2.3 ΦΥΛΛΑ

Τα αμπελόφυλλα (Εικόνα 22) αποτελούν το λιγότερο μελετημένο από τα υποπροϊόντα της οινοποίησης και της. Από τα ελάχιστα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για τη σύστασή τους φαίνεται ότι περιέχουν διάφορα λιπίδια, βιταμίνες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, ένζυμα καθώς και πλήθος φαινολικών ενώσεων [109]. Το χρώμα τους κυμαίνεται από κίτρινες μέχρι κόκκινες και καφέ αποχρώσεις, αναλόγως την ποικιλία του σταφυλιού, το οποίο υποδεικνύει την παρουσία φλαβονοειδών με κύριες τις φλαβονόλες, τις ανθοκυανίνες και τις ανθοκυανιδίνες [134].

Εικόνα 22*:Αμπελόφυλλα*

2.3.2.4 ΟΙΝΟΛΑΣΠΕΣ (wine lees)

Οινολάσπες (Εικόνα 23) είναι όλα τα υποπροϊόντα που σχηματίζονται στον πυθμένα των δοχείων που περιέχουν το κρασί μετά την ζύμωση ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Μπορούν αν κατηγοριοποιηθούν σε πρώτες και δεύτερες οινολάσπες ανάλογα με το στάδιο οινοποίησης που παράγονται. Μετά από την αλκοολική ζύμωση παράγονται οι πρώτες και μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση οι δεύτερες οινολάσπες. Υπάρχουν βέβαια και οι οινολάσπες παλιωμένου κρασιού που σχηματίζονται κατά την παλαίωση του κρασιού σε ξύλινα βαρέλια. Η σύσταση των οινολασπών αποτελείται από την υγρή φάση, που περιλαμβάνει την αιθανόλη και τα οργανικά οξέα (οξικό και γαλακτικό οξύ) και από τη στερεή φάση, που περιλαμβάνει ζύμες, αδιάλυτους υδατάνθρακες, οργανικά οξέα (κυρίως ταρταρικό οξύ), πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα και φαινολικά συστατικά που φτάνουν σε συγκέντρωση μέχρι και 1000 mg/L [109].

Οι οινολάσπες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του κρασιού καθώς αλληλεπιδρούν και απορροφούν φαινολικές ενώσεις που σχετίζονται με το χρώμα και άλλες οργανοληπτικές ιδιότητές του κρασιού. Επιπρόσθετα, οι οινολάσπες απελευθερώνουν ένζυμα που διεγείρουν την υδρόλυση φαινολικών υποστρωμάτων σε φαινόλες όπως το ελλαγικό οξύ ή το γαλλικό οξύ .

***Εικόνα 23**: Οινολάσπες (wine lees)*

2.3.3 ΣΥΣΤΑΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

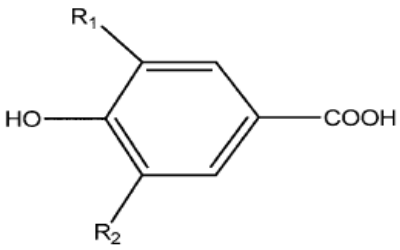
Η σύσταση των υποπροιόντων σε φαινολικά συστατικά είναι παρόμοια με αυτή του κρασιού, παρακάτω γίνεται μια σύντομη αναφορά.

2.3.3.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα διαθέτουν ένα φαινολικό δακτύλιο και ανήκουν στην κατηγορία των απλών φαινολών. Στα φαινολικά οξέα, περιλαμβάνονται παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέος, με τα υδροξυκινναμωνικά να εμφανίζουν όμως τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στα υποπροϊόντα οινοποίησης και στον οίνο. Συνήθως, εμφανίζονται ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα ή ως εστέρες σικιμικού, κιννικού και τρυγικού οξέος[109].

2.3.3.1.1 Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Το γαλλικό οξύ είναι το πιο γνωστό παράγωγο υδροξυβενζοϊκού οξέος και ανιχνεύεται κυρίως στα τσάμπουρα, στις φλούδες και στους σπόρους, ενώ ακολουθεί το συριγγικό οξύ που ανιχνεύεται στα τσάμπουρα και το πρωκατεχικό στα στέμφυλα [132]. Η δομή του υδροξυβενζοϊκού οξέος φαίνεται στο διπλανό σχήμα (Εικόνα 24)



Compound	R_1	R_2
Gallic acid	OH	OH
p-Hydroxybenzoic acid	H	H
Protocatechuic acid	OH	H
Syringic acid	OCH_3	OCH_3

***Εικόνα 24**:Δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων*

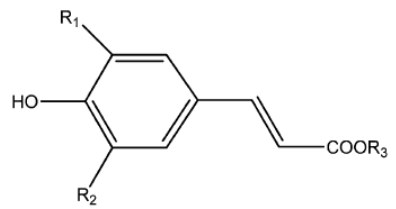
(J Agric Food Chem. 2013)

2.3.3.1.2 Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα ανιχνεύονται σε όλα τα μέρη του σταφυλιού και κυρίως στις φλούδες. Κυριότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής αποτελούν το καφταρικό οξύ, το φερταρικό και το κουταρικό. Στις

φλούδες των ερυθρών ποικιλίων σταφυλιών ανιχνεύεται το χλωρογενικό οξύ, ενώ στις λευκές ποικιλίες σταφυλιών ανιχνεύετα κατά κύριο λόγο το καφταρικό οξύ και το κουταρικό οξύ.

Όσον αφορά τους σπόρους των ερυθρών ποικιλιών σταφυλιών έχει αναφερθεί η ύπαρξη υδροξυκινναμωμικών οξέων, κυρίως του χλωρογενικού οξέος), σε αντίθεση με τις λευκές ποικιλίες σταφυλιών που δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη υδροξυκινναμωμικών οξέων [132]. Στο διπλανό σχήμα (Εικόνα 25) εμφανίζεται η δομή των υδροξυκινναμωμικών οξέων.



Compound	R_1	R_2	R_3
Cafeic acid	OH	H	H
p-coumaric acid	H	H	H
Ferulic acid	OCH_3	H	H
Sinapic acid	OCH_3	OCH_3	H
Caftaric acid	OH	H	Tartaric acid
Coutaric acid	H	H	Tartaric acid
Fertaric acid	OCH_3	H	Tartaric acid

Εικόνα 25 *: Δομή υδροξυκινναμωμικών οξέων*

(J Agric Food Chem. 2013 25;61(38):8987-900)

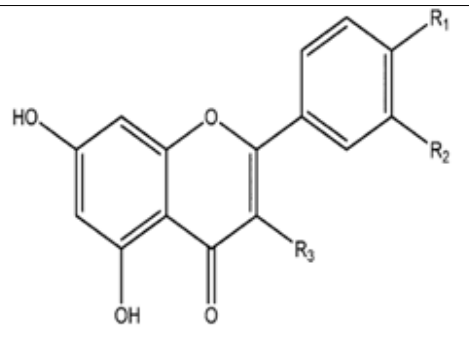
2.3.3.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που συντίθενται από 15 μόρια άνθρακα C. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις εξής υποκατηγορίες, τις φλαβονόλες, τις φλαβανόλες ή φλαβαν-3-ολες, τις προανθοκυανιδίνες και τις ανθοκυανίνες , οι οποίες ανιχνεύονται σε υποπροϊόντα οινοποίησης [132].

2.3.3.2.1 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων C2 και C3, και μία ομάδα υδροξυλίου στο C3. Η δομή τους εμφανίζεται στην Εικόνα 26. Στις φλαβονόλες μπορούν να συνδεθούν διαφορετικά σάκχαρα και να παραχθούν γλυκοζίτες, διγλυκοζίτες και γαλακτοζίτες. Στα τσάμπουρα των ερυθρών ποικιλιών έχει παρατηρηθεί σημαντική ποσότητα κερκετίνης, η οποία εμφανίζεται με τη μορφή του 3-γλυκουρονιδίου της κερκετίνης. Άλλες σημαντικές φλαβονόλες που ανιχνεύονται στα τσάμπουρα ως γλυκοζίτες είναι οι 3-γλυκοζίτες, 3-γαλακτοζίτες και 3-ραμνοζίτες της κερκετίνης. Οι λευκές ποικιλίες παρουσιάζουν χαμηλότερη

συγκέντρωση των συστατικών αυτών. Η κερκετίνη, με τη μορφή του 3-γλυκουρονιδίου της κερκετίνης απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα στέμφυλα και στις φλούδες. Σε αντίθεση, στους σπόρους των σταφυλιών παρατηρείται χαμηλή συγκέντρωση φλαβονολών. Επίσης , η παρουσία των φλαβονολών στα φύλλα, η οποία είναι αξιοσημείωτη και ξεπερνάει τη συγκέντρωση στα άλλα τμήματα του σταφυλιού, έχει ζωτική σημασία καθώς σχετίζεται με την ικανότητα των φύλλων να προστατεύουν τις κυτταρικές δομές του φυτού από την υπεριώδη ακτινοβολία[132].

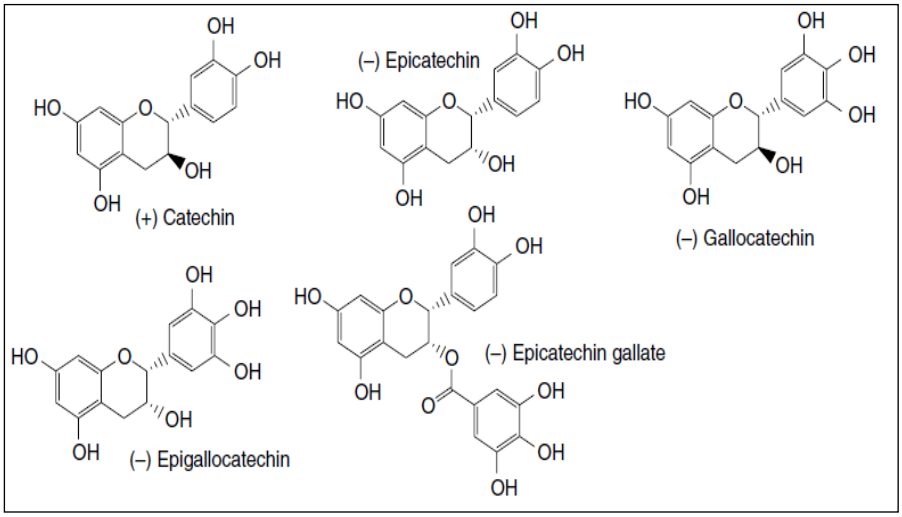


Compound	R_1	R_2	R_3
Kaempferol	OH	H	H
Quercetin	OH	OH	H
Isorhamnetin 3-O-glucoside	OH	OCH_3	glucose
Kaempferol 3-O-glucoside	OH	H	glucose
Quercetin 3-O-glucoside	OH	OH	glucose
Quercetin 3-O-galactoside	OH	OH	galactose
Quercetin 3-O-glucuronide	OH	OH	glucuronic acid
Quercetin 3-O-rhamnoside	OH	OH	rhamnose
Rutin	OH	OH	rutinose

Εικόνα 26 *:Δομή φλαβονολών (J Agric Food Chem. 2013 25;61(38):8987-9003)*

2.3.3.2.2 Φλαβανόλες

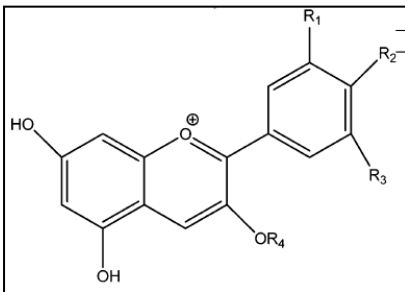
Οι φλαβανόλες ή φλαβαν-3-όλες είναι μία υποκατηγορία φλαβονοειδών, που η δομή τους χαρακτηρίζεται από μία ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα C3 και μία ομάδα καρβονυλίου στον άνθρακα C4, όπως βλέπετε στην Εικόνα 27. Ανιχνεύονται κατά κύριο ρόλο στον μίσχο του σταφυλιού, αλλά και στη φλούδα και στον καρπό όμως σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι οι κατεχίνες και οι επικατεχίνες, τα οποία αποτελούν το 60% του φαινολικού περιεχομένου στον καρπό του σταφυλιού. Οι φλαβανόλες αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη δημιουργία των ταννινών και επηρεάζουν επομένως σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού και κυρίως τη γεύση και την στυπτικότητα του κρασιού[108, 132, 135].



***Εικόνα 27**:Δομή φλαβανολών (J Agric Food Chem. 2013 25;61(38):8987-900)*

2.3.3.2.3 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι μία υποκατηγορία των φλαβονοειδών που ευθύνεται άμεσα για το χρώμα στο ερυθρό σταφύλι και κρασί. Η μη συνδεδεμένη με σάκχαρο ανθοκυανιδίνη αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο (A) συνδεδεμένο με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο (C) που περιέχει οξυγόνο και συνδέεται με έναν τρίτο αρωματικό δακτύλιο (B), όπως βλέπετε τη δομή τους στην Εικόνα 28. Ο αρωματικός δακτύλιος B σχηματίζει ενώσεις με οργανικά οξέα και σάκχαρα για να παράγει πλήθος ανθοκυανινών διαφόρων χρωμάτων. Οι ενώσεις αυτές ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως στη φλούδα των σταφυλιών, με το πιο συχνό να είναι ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης και το αμέσως επόμενο ο 3-γλυκοζίτης της πεονιδίνης [119, 132].

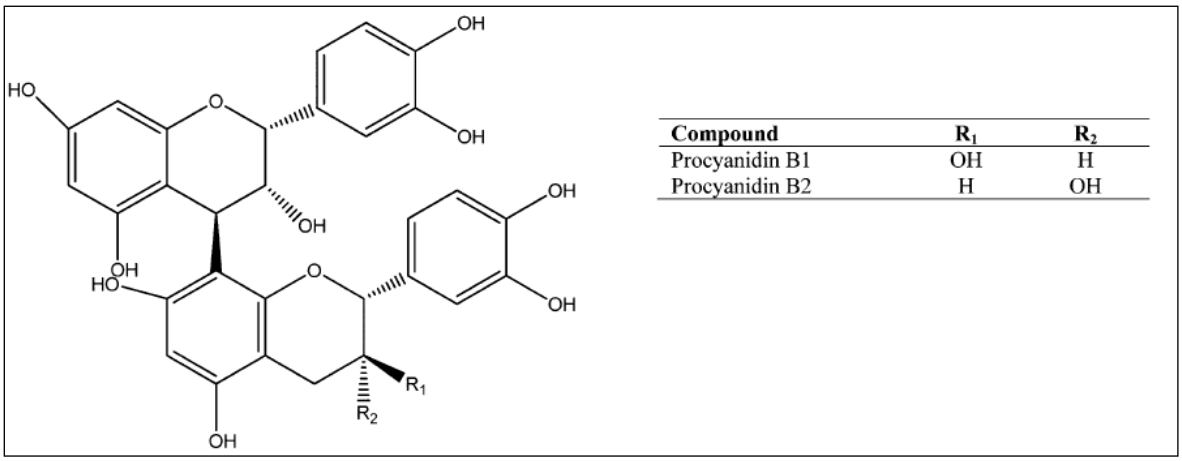


Compound	R_1	R_2	R_3	R_4
Cyanidin	OH	OH	H	H
Cyanidin 3-O-glucoside	OH	OH	H	glucose
Cyanidin 3-O-p-coumaroylglucoside	OH	OH	H	p-coumaroyl-glucose
delphinidin	OH	OH	OH	H
delphinidin 3-O-glucoside	OH	OH	OH	glucose
delphinidin 3-O-acetylglucoside	OH	OH	OH	acetyl-glucose
Malvidin	OCH_3	OH	OCH_3	H
Malvidin 3-O-glucoside	OCH_3	OH	OCH_3	glucose
Malvidin 3-O-acetylglucoside	OCH_3	OH	OCH_3	acetyl-glucose
Malvidin 3-O-p-coumaroylglucoside	OCH_3	OH	OCH_3	p-coumaroyl-glucose
Peonidin	OCH_3	OH	H	H
Peonidin 3-O-glucoside	OCH_3	OH	H	glucose
Peonidin 3-O-acetylglucoside	OCH_3	OH	H	acetyl-glucose
Peonidin 3-O-p-coumaroylglucoside	OCH_3	OH	H	p-coumaroyl-glucose
Petunidin	OCH_3	OH	OH	H
Petunidin 3-O-glucoside	OCH_3	OH	OH	glucose
Petunidin 3-O-acetylglucoside	OCH_3	OH	OH	acetyl-glucose
Petunidin 3-O-p-coumaroylglucoside	OCH_3	OH	OH	p-coumaroyl-glucose

***Εικόνα 28**: Δομή ανθοκυανινών (J Agric Food Chem. 2013 25;61(38):8987-9003)*

2.3.3.2.4 Προανθοκυανιδίνες

Οι προανθοκυανιδίνες ή αλλιώς συμπυκνωμένες ταννίνες, αποτελούνται από υπομονάδες μονομερών φλαβαν-3-ολών και οι δομές τους διαφέρουν ανάλογα με τα συστατικά των υπομονάδων τους, τις θέσεις ένωσής τους και το βαθμό πολυμερισμού. Η δομή των προανθοκυανιδινών παρουσιάζεται στην Εικόνα 29. Τα τσάμπουρα παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση προανθοκυανιδινών , με τη μορφή της προκυανιδίνης Β3, σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του σταφυλιού, και ιδιαίτερα στις ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού. Ενώ έχουν παρατηρηθεί σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις οι προκυανιδίνες Β1-Β4 στα στέμφυλα. Στις λευκές ποικιλίες απαντάται η ένωση της προκυανιδίνης Β1, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις της να βρίσκονται στα τσάμπουρα του σταφυλιού[119, 132].



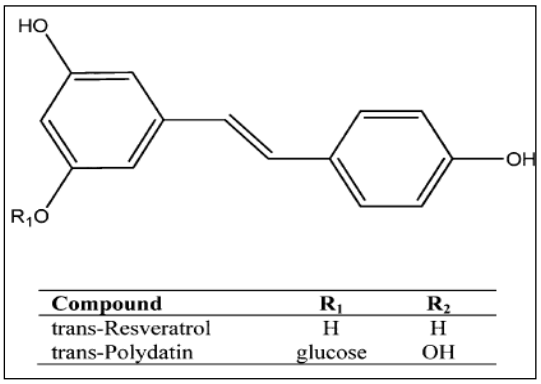
Compound	R_1	R_2
Procyanidin B1	OH	H
Procyanidin B2	H	OH

Εικόνα 29: *Δομή προανθοκυανιδίνων (J Agric Food Chem. 2013 25;61(38):8987-9003)*

2.3.3.3 Στιλβένια

Τα στιλβένια αποτελούν μία υποκατηγορία φαινολικών ενώσεων, που αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με μία γέφυρα αιθυλενίου (βλ. Εικόνα 30). Τα στιλβένια σχηματίζονται από τους ιστούς των φύλλων των αμπελιών, ως απάντηση σε καταστάσεις στρες, περνώντας έτσι στο μούστο κατά την οινοποίηση.

Γίνεται αντιληπτό λοιπόν ,ότι τα στιλβένια λειτουργούν ως μηχανισμός άμυνας για το αμπέλι προστατεύοντας το από την υπεριώδη ακτινοβολία, από μυκητιάσεις και από μικροβιακές. Στις ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών τα στιλβένια ανιχνεύονται στα τσάμπουρα, στα στέμφυλα και στα φύλλα, ενώ στις λευκές ποικιλίες στα τσάμπουρα και στη φλούδα. Ο κύριος εκπρόσωπος αυτής της υποκατηγορίας των πολυφαινολών είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία εντοπίζεται κυρίως στους σπόρους και στη φλούδα των σταφυλιών [132, 136].



Εικόνα 30: *Δομή στιλβενίων (J Agric Food Chem), 2013*

2.4 ΥΠΟΠΡΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΤΡΟΠΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η δημιουργία εκχυλισμάτων πλούσιων σε φαινολικά συστατικά αποτελεί έναν από τους κύριους τρόπους αξιοποίησης των πλούσιων, σε φυτοχημικές ενώσεις, υποπροϊόντων οινοποίησης. Επομένως, η εξαγωγή των πολύτιμων αυτών μικροσυστατικών αποτελεί σημαντικό βήμα προς αυτή την κατεύθυνση, για την απομόνωση και την ταυτοποίηση αυτών των μικροσυστατικών. Αν και υπάρχουν αρκετές μέθοδοι εξαγωγής, η πιο κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται για τη παραλαβή των εκχυλισμάτων από τα υποπροϊόντα οινοποίησης είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού και η εκχύλιση Soxhlet. Παρόλο αυτά, οι τεχνικές αυτές είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και έχουν υψηλές απαιτήσεις σε αντιδραστήρια καθώς και υπάρχει κίνδυνος απώλειας μικροσυστατικών λόγω θέρμανσης, βρασμού, κ.α.. Γι’ αυτό το λόγο, διερευνώνται και νέες ,πιο αποτελεσματικές και οικονομικές μέθοδοι εκχύλισης των υποπροϊόντων οινοποίησης, οι οποίες παρατίθενται παρακάτω.

2.4.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ-ΥΓΡΟΥ

Η εκχύλιση στερεού-υγρού αποτελεί την πιο κοινή τεχνική που χρησιμοποιείται για τα υποπροϊόντα οινοποίησης και ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία μεταφέρεται η μάζα από το στερεό δείγμα στην υγρή φάση του διαλύτη που έρχεται σε επαφή. Η επιτυχία της εκχύλισης εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία του σταφυλιού, ο χρόνος εκχύλισης, ο τύπος διαλύτη, η θερμοκρασία και το ph που θα πραγματοποιηθεί η εκχύλιση καθώς και από την αλληλεπίδραση όλων αυτών των παραγόντων[132].

Ο τύπος του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί στην εκχύλιση είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της εκχύλισης, καθώς λόγω της πολικότητας των φαινολικών συστατικών, διαλύονται πιο εύκολα σε πολικά διαλύματα δηλαδή σε διαλύματα αιθανόλης και νερού. Πιθανότατα ο κάθε τύπος φαινολικού συστατικού φαίνεται να συνδυάζεται ιδανικά/αποτελεσματικότερα με ένα τύπο διαλύτη, ώστε να υπάρξει μέγιστη αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Επίσης, η αύξηση της θερμοκρασίας βελτιώνει τη διαλυτότητα του ουσιών και τη διάχυσή τους στην υγρή φάση. Αυτή η αύξηση θερμοκρασίας πρέπει να γίνεται μέχρι ένα όριο , όχι πάνω από τους 50°C καθώς υπάρχει κίνδυνος μετουσίωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών και μείωσης επομένως της ακεραιότητας των φαινολικών. Ευνοϊκό φαίνεται να είναι επίσης ένα οξυνισμένο μίγμα διαλύτη (pH<7), καθώς φαίνεται ότι αυξάνεται η αποτελεσματικότητας της εκχύλισης [137].

Πρόσφατα σε μία μελέτη του Pintac και των συνεργατών του , αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα 6 διαφορετικών τύπων διαλύτη, οι οποίοι ήταν οι εξής : 80% μεθανόλη, 80% αιθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστρέρας, μεθανόλη με προσθήκη οξέος 50% και 80%) στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών από στέμφυλα. Το αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε το διάλυμα του οξικού αιθυλεστέρα ως το ιδανικό για την βέλτιστη εκχύλιση πολυφαινολών , όπως τα φαινολικά οξέα, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες και τα στιλβένια. Επίσης φάνηκε το διάλυμα της μεθανόλης ως το πιο ιδανικό για την καλύτερη εκχύλιση των ότι ανθοκυανίνων από υποπροϊόντα οινοποίησης [138].

Ωστόσο, η μέθοδος της εκχύλισης στερεού-υγρού παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η μεγάλη διάρκεια της εκχύλισης, τα ακριβά αντιδραστήρια, η

χαμηλή επιλεκτική ικανότητα καθώς και η πιθανή απώλεια ευαίσθητων φαινολικών ενώσεων στη θερμοκρασία[132, 139].

2.4.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΩΝ ΡΕΥΣΤΩΝ

Η εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (supercritical fluid extraction, SFE) είναι μία περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος εκχύλισης, που εφαρμόζεται στην παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από τα υποπροϊόντα οινοποίησης. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται υπερκρίσιμα ρευστά που έχουν τη δυνατότητα να συμβάλλουν στην εκχύλιση και παραλαβή οργανικών ουσιών από στερεά δείγματα. Τα υπερκρίσιμα ρευστά διαθέτουν τις εξής ιδιότητες: χαμηλό ιξώδες, μεγάλη ικανότητα διάχυσης και σχεδόν μηδενική επιφανειακή τάση. Τα θετικά χαρακτηριστικά της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν απαιτεί χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυμάτων, είναι ταχύτατη διαδικασία και αυτοματοποιημένη. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των υπερκρίσιμων ρευστών επιτρέπουν μία γρήγορη μεταφορά μάζας στην υπερκρίσιμη φάση, βελτιώνοντας παράλληλα την ικανότητα διείσδυσης στους πόρους της στερεής φάσης και οδηγώντας σε μία επιτυχή και αποτελεσματική εκχύλιση από τα υποπροϊόντα οινοποίησης [140].

Το πιο ευρέως γνωστό υπερκρίσιμο υγρό που χρησιμοποιείται ως διαλύτης φαινολικών ενώσεων, τα τελευταία χρόνια, είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Το υγρό αυτό είναι οικονομικό, μη τοξικό , δρα σε χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλή πίεση, απουσία αέρα και φωτός, προστατεύοντας έτσι τις φωτοευαίσθητες φαινολικές ενώσεις [141]. Επίσης, η προσθήκη συστατικών, όπως η αιθανόλη ή η μεθανόλη, μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, καθώς επηρεάζει την πολικότητα του διαλύτη και οδηγεί σε πιο επιλεκτική εκχύλιση των συστατικών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την παραλαβή αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων από στέμφυλα και από έλαιο σπόρων σταφυλιού [139].

2.4.3 ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟ ΝΕΡΟ (ASE)

Η μέθοδος της επιταχυνόμενης εκχύλισης με υπερκρίσιμο νερό (accelerated solvent extraction and subcritical water-ASE) είναι διαδεδομένη και ως εκχύλιση υγρού υπό πίεση. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί συμβατικούς διαλύτες σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες για την εκχύλιση οργανικών ενώσεων από στερεά δείγματα. Η υψηλή πίεση βελτιώνει την ικανότητα διάχυσης του διαλύτη, ενώ η υψηλή θερμοκρασία βελτιώνει την διαλυτότητα των μικροσυστατικών καθώς και τη ταχύτητα της εκχύλισης [139].

Στην προαναφερθείσα μέθοδο χρησιμοποιείται ως διαλύτης το υπερκρίσιμο νερό σε θερμοκρασία 140 °C, οδηγώντας στην παραλαβή φαινολικών συστατικών παρόμοια με τη χρήση συμβατικών διαλυτών. Βασικό πλεονέκτημα της εκχύλισης υπό πίεση με υπερκρίσιμο νερό είναι ότι επιτρέπει την επιλεκτική απομόνωση συστατικών, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία. Ήδη, η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται για την παραλαβή διαφόρων φαινολικών συστατικών όπως είναι: οι φλαβανόλες, οι κατεχίνες και οι ανθοκυανίνες από στέμφυλα ερυθρής ποικιλίας σταφυλιών καθώς και για την εκχύλιση ρεσβερατρόλης από σπόρους σταφυλιού [142, 143].

Συμπερασματικά, η μέθοδος της επιταχυνόμενης εκχύλισης με υπερκρίσιμο νερό φαίνεται να πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες κοινές μεθόδους, καθώς επιτρέπει την παραλαβή εκχυλισμάτων υψηλής ποιότητας σε μικρότερη διάρκεια με χαμηλότερο κόστος εκχύλισης. Ωστόσο, παραμένει αναπάντητο το ερώτημα για την βέλτιστη θερμοκρασία που εξασφαλίζει τη σταθερότητα και την ποιότητα των πολυφαινολών.

2.4.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί υπερηχητικά κυμάτων ,τα οποία διευκολύνουν την διάλυση των μικροσυστατικών στο διαλύτη και ενισχύουν, με αυτό το τρόπο, την παραλαβή τους από την πρώτη ύλη. Η επιτυχία της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα των υπερήχων να επιταχύνουν την ενυδάτωση και τη δημιουργία κυτταρικών θραυσμάτων από τις μεμβράνες, διευκολύνωντας έτσι την απομόνωση των μικροσυστατικών και την μεταφορά τους στον διαλύτη.

Πιο συγκεκριμένα, οι υπέρηχοι δημιουργούν ταλαντώσεις στη στερεή ύλη και όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του κύματος τόσο αυξάνεται και η ποσότητα του διαλύτη που εισχωρεί στα κύτταρα. Επίσης αυξάνεται και η ποσότητα των συστατικών προς εκχύλιση, τα οποία μπορούν να διαπεράσουν πιο εύκολα την κυτταρική μεμβράνη και τα τοιχώματα του φυτού. Η χρήση της μεθόδου αυτή, αφορά κυρίως την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φλούδες σταφυλιών, με μικρή διάρκεια εκχύλισης και υψηλή απόδοση [144, 145]. Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον, όντας καινούργια και ενεργειακά πιο οικονομική μέθοδο σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Ταυτόχρονα, έχει ελαχιστοποιήσει τη διάρκεια της εκχύλισης και την επίδραση της θερμοκρασίας, γεγονός υψίστης σημασίας όταν επρόκειτο για θερμοευαίσθητες ενώσεις, όπως οι φαινολικές ενώσεις[139].

2.4.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ(MAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα είναι μία ακόμη καινούργια μέθοδος για την εκχύλιση και παραλαβή των μικροσυστατικών από υποπροϊόντα οινοποίησης. Η βάση της εκχύλισης αυτής στηρίζεται στο ότι η παραγωγή θερμότητας με μικροκύματα μπορεί να επιταχύνει την μεταφορά ενέργειας και να μειώσει το θερμικό φορτίο ανέπαφα.

Κύριος στόχος και σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης, όπως και στη μέθοδο με υπερήχους, είναι η θραύση των κυτταρικών μεμβρανών και συγκεκριμένα η υδρόλυση των δεσμών της κυτταρίνης, που αποτελεί το βασικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η κατάσταση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της θερμότητας που παράγεται από

τα μικροκύματα, οδηγώντας έτσι στη θραύση των κυτταρικών μεμβρανών και ακολούθως στην απελευθέρωση των μικροσυστατικών που είναι προς εκχύλιση στο διαλύτη [139]. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή φαινολικών συστατικών και συγκεκριμένα προανθοκυανιδινών, από σπόρους σταφυλιού[146]. Ωστόσο, παραμένουν κάποιες αμφιβολίες για τη συγκεκριμένη μέθοδο εκχύλισης και συγκεκριμένα για την επίδραση της θερμοκρασίας στις φαινολικές ενώσεις, καθώς και για την μειωμένη απόδοση της μεθόδου στην εκχύλιση μη πολικών συστατικών[139].

Στο πλαίσιο αυτό, σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση στερεού-υγρού με χρήση διαφορετικών διαλυτών ώστε να βρεθεί ο βέλτιστος διαλύτης εκχύλισης με σκοπό το εκχύλισμα, το οποίο εκτός από φαινολικά συστατικά περιέχει και άλλα μικρο-συστατικά των στεμφύλων, να παρουσιάζει την καλύτερη αντι-αιμοαπεταλιακή δράση. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη Choleva και συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2019, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (νερό, 80% αιθανόλη, εξάνιο και με τη μέθοδο Bligh–Dyer) με σκοπό να προσδιοριστεί το εκχυλίσμα με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και τη βέλτιστη αντι-αιμοπεταλιακή ικανότητα. Το εκχύλισμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης η αιθανόλη εμφάνισε βέλτιστα χαρακτηριστικά . Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι το εκχύλισμα με διαλύτη την αιθανόλη, παρουσίασε την πιο ισχυρή αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων και ήταν το πιο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, φωσφο-ενώσεις και λιπαρά οξέα. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά υπολογίστηκε στα 8,7mg γαλλικού οξέος/g υποπροϊόντος. Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η κερκετίνη από τα φαινολικά συστατικά, καθώς και τα λινολενικό, λινελαϊκό και παλμιτικό από τα λιπαρά οξέα βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο εκχύλισμα με διαλύτη την αιθανόλη. Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι το εκχύλισμα ήταν ικανό να αναστείλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων ακόμα και σε ασθενή με στεφανιαία νόσο. Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν στο ότι το εκχύλισμα αιθανόλης από υπο-προϊόντα οινοποίησης παρουσιάζει ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση και η αξιοποίησή του θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες [147].

3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

3.1 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Είναι γεγονός ότι η παραγωγή κρασιού αποτελεί μία από τις βασικότερες δραστηριότητες σε παγκόσμιο επίπεδο, επομένως είναι αναμενόμενο να παράγονται ετησίως τεράστιες ποσότητες υποπροϊόντων οινοποίησης, που είναι ιδιαίτερα πλούσια όπως αναφέρθηκε η σύστασή του σε συστατικά με αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντιαιμοπεταλιακή δράση, κυρίως λόγω των πολυφαινολών αλλά και άλλων μικρο-συστατικών. Ιδιαίτερα αυξημένο είναι το ενδιαφέρον για αξιοποίηση αυτών των υποπροϊόντων οινοποίησης για περαιτέρω χρήση και εκμετάλλευση αυτών, σε πολλούς τομείς, όπως είναι η αγροτική βιομηχανία, η βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών και η βιομηχανία τροφίμων.

Αγροτική βιομηχανία

Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει με το πέρας της διαδικασίας της οινοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα υψηλά επίπεδα πολυφαινολών του υποπροϊόντος μπορεί να αναστέλλουν τη βλάστηση των σπόρων, κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για ορθή χρήση. Ως πρόσθετο συστατικό σε ζωοτροφές έχουν χρησιμοποιηθεί και τα στέμφυλα, όπου φαίνεται ότι μειώνουν την πεπτικότητα και οι πολυμερείς πολυφαινόλες αναστέλλουν πρωτεολυτικά και άλλα ένζυμα. Επομένως, όταν το υλικό είναι προσαρμοσμένο εντός των ζωοτροφών, ίσως απαιτείται κάποια επιπρόσθετη διαδικασία ζύμωσης για να αποφευχθούν τυχόν γαστρεντερικές διαταραχές. Το πλούσιο φυτοχημικό προφίλ της φλούδας των σταφυλιών, μπορεί να αποτελέσει μια αστείρευτη πηγή βιοενεργών φυτοχημικών και άλλων συστατικών. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης κατάλληλων διαδικασιών αξιοποίησης, καταλήγει να χρησιμοποιείται κυρίως ως λίπασμα ή να πετάγεται σε ανοικτές περιοχές που μπορεί να προκαλέσει περιβαλλοντικά προβλήματα [109]. Άλλη μία πιθανή χρήση της φλούδας αναδείχθηκε στη μελέτη του κ. Μανιού και των συνεργατών του το 2004,

ως ένα υπόστρωμα για την καλλιέργεια φράουλας, η οποία είχε και θετική έκβαση. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα υποπροϊόντα οινοποίησης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βελτιωτικά του εδάφους αλλά και ως προσροφητικά για βαρέα μέταλλα από υδατικά διαλύματα. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένα υποπροϊόντα περιέχουν βαρέα μέταλλα γεγονός που τα καθιστά μη κατάλληλα για να καλλιεργηθούν στο έδαφος [148, 149].

Τέλος, μία πιθανή χρήση του τσάμπουρου, φθηνό υποπροϊόν, στην αγροτική βιομηχανία θα ήταν κυρίως ως ζωοτροφή ή σε τροποποιήσεις του εδάφους. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ενδεχομένως ως μία καλή πηγή διαιτητικών ινών και αντιοξειδωτικών, αν και τα δεδομένα είναι ελλιπή και υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα [109].

Βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών

Τα στέμφυλα αποτελούν ένα φθηνό υποπροϊόν πλούσιο σε φυτοχημικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών [132]. Αυτή χρήση των υποπροϊόντων οινοποίησης, στην βιομηχανία των καλλυντικών, αποτελεί μία αποτελεσματική, κερδοφόρα και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση[150].

Η φλούδα του σταφυλιού θεωρείται ως το καλύτερο υπόστρωμα για την παραγωγή της πουλουλάνης (pullulan), ενός πολυσακχαριδικού πολυμερούς που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία φαρμάκων. Η χρήση του είναι συχνή, στην παρασκευή βρώσιμων μεμβρανών και πόσιμων προϊόντων υγιεινής (αποσμητικά αναπνοής, στοματικά διαλύματα) καθώς και στη δημιουργία ταμπλετών ως παράγοντας που εμποδίζει την οξείδωση [148].

Βιομηχανία τροφίμων

Στη βιομηχανία τροφίμων το βασικό υποπροϊόν οινοποίησης που χρησιμοποιείται είναι τα στέμφυλα. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως προσθετικά για τον εμπλουτισμό τροφίμων, την προστασία από την οξείδωση κατά την αποθήκευση, το

χρωματισμό των τροφίμων, την παρασκευή «λειτουργικών» τροφίμων αλλά και διατροφικών συμπληρωμάτων.

Ο εμπλουτισμός συνεπάγεται την ενσωμάτωση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών μέσα σε ένα τρόφιμο ανεξαρτήτως του εάν υπάρχει ήδη ή όχι. Η σύσταση των στεμφύλων σε φαινολικά συστατικά, διαιτητικές ίνες και μέταλλα οδήγησε στο να χρησιμοποιηθούν ως μέσα εμπλουτισμού τροφίμων, με στόχο να συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του τροφίμου. Αρκετά είναι τα τρόφιμα που έχουν εμπλουτιστεί έως τώρα με τα φαινολικά συστατικά των στεμφύλων, συγκεντρώνοντας κάποιες και ομαδοποιώντας τες στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 1).

Τα προϊόντα δημητριακών, κυρίως το ψωμί και τα μπισκότα, είναι η κατηγορία τροφίμου με τις περισσότερες εφαρμογές εμπλουτισμού και επόμενη κατηγορία είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Βέβαια, φάνηκε ότι η αποτελεσματικότητα του εμπλουτισμού γαλακτοκομικών προϊόντων ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τον εμπλουτισμό στα προϊόντα δημητριακών. Αυτό συνέβη λόγω αστάθειας και καταστροφής των φαινολικών συστατικών κατά την επεξεργασία και αποθήκευση των γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και άλλων τεχνολογικών προβλημάτων [151]

Πίνακας 1: Προϊόντα εμπλουτισμένα με στέμφυλα κρασιού από τη βιβλιογραφία

Κατηγορία	Τρόφιμα	Τμήμα στέμφυλου	Επίπεδο	Εμπλουτισμός με:	Συμπληρωματικοί στόχοι	Αναφορές
ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΩΝ	ΨΩΜΙ	Αλεύρι σπόρου	2,5-10%	Φαινόλες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Hoye and Ross (2011)[152]
			5-25%	Φαινόλες/ ίνες	Φυσικές ιδιότητες	Aghamirzaei (2015)[153]
			2,5-7,5%	Φαινόλες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Meral and Dogan (2013)[154]
			10%	Λιπαρά οξέα/μέταλλα	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Munteanu (2013)[155]
		WWP σκόνη	5-10%	Ίνες/ φαινόλες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες/ εμπλουτισμός μετάλλων	Smith and Yu (2015)[156]
		SkWP σκόνη	4-10%	Φαινόλες/Ίνες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Mildner-Szkudlarz (2011)[157]
	ΜΠΙΣΚΟΤΑ	SdWP σκόνη	5%	Φαινόλες/ μέταλλα	Πρόληψη οξείδωσης λιπών/ Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Aksoylu (2015)
		WWP σκόνη	10-30%	Φαινόλες/ Ίνες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Mildner-Szkudlarz (2013)[158]
		WWP σκόνη	20-30%	Ίνες/ πρωτεΐνη	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Karnopp (2015)[159]
		Χωρίς σπόρο, ολόκληρο, SdWP	5-15%	Ίνες/ πρωτεΐνη	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Acun and Gul(2014)[160]
		SkWP σκόνη	5-10%	Μέταλλα/Ίνες	Αισθητηριακές ιδιότητες	Canett Romero (2004)[161]
			10-50%	Ίνες/πρωτεΐνη	Αισθητηριακές ιδιότητες	
	ΨΩΜΙ ΚΑΙ MUFFIN	WWP σκόνη	5-20%	Φαινόλες/ Ίνες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Walker (2013) [162]
	MUFFIN	SkWP σκόνη	20%	Φαινόλες	Μείωση CML (γλυκοτοξίνη)	Mildner-Szkudlarz (2015)[163]
	ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ ΠΡΩΙΝΟΥ	WP άλευρο	5-20%	Φαινόλες/ Ίνες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Oliviera (2013)[164]
	ΜΠΑΡΕΣ/PANCAKE/ NOODLES	SdWP άλευρο	5-30%	Φαινόλες	Αισθητηριακή ανάλυση	Rosales Soto (2012)[165]
	ΖΥΜΑΡΙΚΑ	Εκχύλισμα WP	-	Φαινόλες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Marinelli (2015)[166]
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	ΖΥΜΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ	WP εκχύλισμα	100mg GAE/L	Φαινόλες	Αισθητηριακές ιδιότητες	Aliakbarian (2015)[167]
		WP αλεύρι	10-50g/L	Φαινόλες	Κινητική ζύμωσης	Frumento (2013)[168]
		SdWP εκχύλισμα	50-100mg/kg	Φαινόλες	Φυσικές ιδιότητες	Chouchouli (2013)[169]
	ΓΙΑΟΥΡΤΙ	WWP εκχύλισμα και σκόνη	1-3%	Φαινόλες	Αναστολή οξείδωσης λιπών	Tseng and Zhao (2013)[170]
	ΤΥΡΙ	WWP εκχύλισμα	1%	Φαινόλες	Φυσικές/ αισθητηριακές ιδιότητες	Karaaslan (2011)[171]
		SkWP αλεύρι	6%	Φαινόλες		Marchiani (2016)[172]
		WWP σκόνη	0,8-1,6%	Φαινόλες	Μικροβιακές/ φυσικές ιδιότητες	Marchiani (2015)[173]
		WWP εκχύλισμα	0,5mg/mL	Φαινόλες	Φυσικές ιδιότητες	Han (2011)[174]
		SkWP,WWP,SdWP εκχυλίσματα	0,1-0,3%	Φαινόλες	Φυσικές ιδιότητες	Felix da Silva (2015)[175]
	ΠΑΓΩΤΟ	Εκχύλισμα καρπού	0,4%	Φαινόλες	Αισθητήριο	Sagdic (2012a)[176]
ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ	ΛΟΥΚΑΝΙΚΟ	SdWP αλεύρι	0,5-5%	Ίνες	Αντιοξειδωτικό/ αντιμικροβιακό	Ozvural and Vural (2011)[177]
	ΒΟΕΙΟ ΚΡΕΑΣ	Έλαιο καρπού	10%	Λιπαρά οξέα	Ενίσχυση ποιότητας και ασφάλειας	Jung (2012)[178]
	ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ	SkWPP σκόνη	3%	Ίνες/ φαινόλες	Αντιοξειδωτικό/ αντιμικροβιακό	Ribeiro (2013) [179]
ΑΛΛΑ	ΠΟΥΡΕΣ	SkWP σκόνη	3,2%	Φαινόλες	Αισθητήριο	Lavelli (2014) [180]
	ΕΓΧΥΣΕΙΣ	SkWP εκχύλισμα	50-100%	Φαινόλες	Χρώμα/ Αντιική δραστηριότητα	Bekhit (2011)[181]

WP:wine pomace, WWP:whole wine pomace, SkWP: skin wine pomace, SdWP:seed wine

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, διάφορα συστατικά τροφίμων μπορούν να υποβληθούν σε οξείδωση και να μειώσουν έτσι την ποιότητα και τις θρεπτικές ιδιότητες των τροφίμων. Η χημική σύσταση τους (περιεκτικότητα σε μέταλλα, προφίλ λιπαρών οξέων κ.ο.κ.) και οι συνθήκες αποθήκευσης όπως η ατμόσφαιρα, η έκθεση στο φως και η θερμοκρασία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη οξειδωτικών αντιδράσεων. Επιπρόσθετα, εκτός από τη χημική σύσταση και τις συνθήκες αποθήκευσης, και η διαδικασία παρασκευής όπως το άλεσμα ή το μαγείρεμα μπορεί να αυξήσουν την οξειδωτική αστάθεια λόγω της απώλειας της αρχικής δομής και της απελευθέρωσης των προ-οξειδωτικών ενώσεων από το κύτταρο. Η βιομηχανία τροφίμων έχει παραδοσιακά χρησιμοποιήσει συνθετικά αντιοξειδωτικά για να μετριάσει την οξείδωση των τροφίμων, χωρίς όμως μεγάλη επιτυχία λόγω της σύνδεσης ορισμένων από αυτών με διάφορες τοξικολογικές επιδράσεις. Οπότε, γίνεται αντιληπτό ότι αυξάνεται η ανάγκη για εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών χωρίς συνθετικά πρόσθετα. Τα υποπροϊόντα οινοποίησης έχουν αναφερθεί ως εξαιρετική εναλλακτική λύση στα φυσικά αντιοξειδωτικά, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες. Μάλιστα, έχει αναφερθεί μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση των στεμφύλων σε σχέση με την αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση των απομονωμένων φαινολικών ενώσεων, κατάσταση που υποδηλώνει μια συνεργιστική επίδραση μεταξύ των φαινολικών ενώσεων στο μίγμα του υποπροϊόντος. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το κρέας και τα προϊόντα του, η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών είναι αναγκαία και προτιμάται έναντι των συνθετικών αντιοξειδωτικών [151] .

Άλλη μία χρήση των υποπροϊόντων ονοποίησης φαίνεται να είναι για τη τροποποίηση των αισθητικών ιδιοτήτων προϊόντων διατροφής, και κυρίως για χρωματικά χαρακτηριστικά. Η συνηθέστερη εφαρμογή είναι η χρήση των ανθοκυανιδινών που προέρχονται από το κρασί ως φυσικές χρωστικές των τροφίμων. Οι ανθοκυανιδίνες που προέρχονται από το κρασί έχουν αρκετή σταθερότητα και ένταση ώστε να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα οίνου έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως χρωστικές τροφίμων σε συγκεντρώσεις εύρους 20 και 60 ppm. Η χρήση αυτή των ανθοκυανιδινών έχει παρατηρηθεί σε ένα ευρύ φάσμα ποικιλίας τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων (γιαούρτι, επιδόρπια, παγωτά), των ποτών(αναψυκτικά, λικέρ, κρασί) και σε παρασκευάσματα φρούτων και μαρμελάδας [151].

Επιπρόσθετα, τα στέμφυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και για την παραγωγή πουλλουλάνης. Η πουλλουλάνη είναι ένας μη ιονικός εξωπολυσακχαρίτης που παράγεται από τον μύκητα Aureobasidium και είναι αδιαπέραστη από οξυγόνο, βιοδιασπώμενη, αδιαπέραστη, μη αναγωγική και μη υγροσκοπική, διαλύεται εύκολα σε ζεστό και κρύο νερό. Η κύρια χρήση της, εκτός από τη βιομηχανία φαρμάκων, είναι να προστίθεται σε τρόφιμα με στόχο να βελτιώσει την υφή και να αποδώσει μεγάλο όγκο με πολύ λίγες θερμίδες. Επιπλέον, εφαρμογές της πουλλουλάνης περιλαμβάνουν την παρασκευή σαμπουάν , κόλλες οδοντοστοιχιών και κάψουλες συμπληρωμάτων [148] .

Τέλος, αναφορικά με τη χρήση των σπόρων του σταφυλιού παράγεται ένα έλαιο με σχετικά υψηλό σημείο βρασμού (216º C), καθιστώντας το χρήσιμο και κατάλληλο για το μαγείρεμα. Το έλαιο αυτό, έχει υψηλή περιεκτικότητα στο απαραίτητο ω-6 λιπαρό οξύ, το λινολεϊκό οξύ (76%) καθώς και σε πληθώρα αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι οι προανθοκυανιδίνες, τα καροτενοειδή και οι βιταμίνες Ε και C. Εκτός από την παραγωγή του ελαίο, οι σπόροι του σταφυλιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν λόγω της υψηλής φαινολικής τους περιεκτικότητας, και ως προσθετικά τροφίμων ή σε συμπληρώματα διατροφής [151].

3.2 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣΗΣ

Λόγω των περιορισμένων δεδομένων και του μικρού αριθμού μελετών που υπάρχουν σχετικά με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των υποπροϊόντων οινοποίησης τόσο in vivo όσο και in vitro, θα παρουσιαστούν και μελέτες που αφορούν το κρασί και δείκτες φλεγμονής λόγω των παρόμοιων φαινολικών συστατικών που περιέχονται τόσο στο κρασί όσο και τα υποπροϊόντα οινοποίησης.

3.2.1 IN VITRO ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Αρκετές in vitro μελέτες δείχνουν ότι τα μικροσυστατικά τόσο των εκχυλισμάτων από τα υπο-προϊόντα οινοποίησης όσο και του κρασιού θα μπορούσαν να ρυθμίσουν φλεγμονώδη μονοπάτια. Οι φαινολικές ενώσεις του περιέχονται στα υπο-προϊόντα οινοποίησης αλλά και στο κρασί έχουν αναφερθεί ότι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων και αναστέλλουν τόσο την έκκριση όσο και την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω τροποποίησης παραγόντων μεταγραφής.

Στην παρούσα μελέτη μετά από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βρέθηκαν και παρουσιάζονται **8 μελέτες**, οι οποίες εξετάζουν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και την επίδραση σε προφλεγμονώδεις παράγοντες των εκχυλισμάτων από υπο-προϊόντα οινοποίησης. Οι μελέτες αφορούν κυρίως ερυθρές ποικιλίες και λίγες λευκές, ωστόσο υπάρχουν και μελέτες στις οποίες δεν αναφέρεται η ποικιλία που χρησιμοποιείται. Οι παρακάτω in vitro μελέτες που παρουσιάζονται χρησιμοποιούν εκχυλίσματα είτε από το κουκούτσι του σταφυλιού **[182-185]** , είτε από τη φλούδα **[186]** είτε από τα στέμφυλα **[187-189]**. Παρουσιάζονται επίσης και **6 μελέτες** που αφορούν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες εκχυλισμάτων κρασιού, με τις 5 μελέτες **[190-194]** να αναφέρονται σε ερυθρή ποικιλία και σε 1 μελέτη **[195]** να μην αναφέρεται το είδος σταφυλιού (Πίνακας 1).

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες εξετάζονται αξιολογώντας την επίδραση των εκχυλισμάτων από τα υπο-προϊόντα οινοποίησης σε διάφορους παράγοντες όπως : στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), στη δραστικότητα ενζύμων όπως η NOS και η COX-2, στην έκφραση μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, ICAM-1), στην παραγωγή προσταγλαδινών , στην έκφραση του mRNA διαφόρων προφλεγμονωδών μορίων όπως TNF-α, TLR-4, IL-1 κτλ. Σε αρκετές μελέτες, η επίδραση των εκχυλισμάτων οινοποίησης σε δείκτες φλεγμονής ελέγχεται με την προσθήκη τους σε κύτταρα που ήδη βρίσκονται σε φλεγμονώδη μονοπάτια ύστερα από την προσθήκη είτε LPS είτε IFN-γ είτε TNF-a. Σε κάποιες μελέτες γίνεται επίσης σύγκριση αντιφλεγμονοδών ιδιοτήτων μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών σταφυλιού που χρησιμοποιούνται καθώς και μεταξύ διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται για τη εκχύλιση.

Πιο συγκεκριμένα, μία από τις μελέτες που ανέδειξε τα θετικά αποτελέσματα των εκχυλισμάτων από υπο-προϊόντα οινοποίησης είναι η μελέτη των Chia-Lun Chao και

συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2011 και ανέδειξε ότι εκχύλισμα από σπόρο σταφυλιού (50-100μg/ml) σε κύτταρα HUVECs επαγόμενα από TNF-a μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα του NF-κB, την έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 και της κυκλοοξυγενάσης-2, αλλά και να μειώσει την παραγωγή της προσταγλανδίνης E_2 (PGE_2). Σε παρόμοια αποτελέσματα οδηγήθηκε και η μελέτη των B. Rodríguez-Morgado και συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2014, που ανέδειξε ότι ενζυμικό εκχύλισμα στεμφύλων (σε συγκέντρωση 10μg/ml πολυφαινολών) σε N13 κύτταρα διεγερμένα με LPS, μπορεί να μειώσει την ανοδική ρύθμιση mRNA όλων των προφλεγμονωδών παραγόντων (TNF-a κατά 90%, IL-1β κατά 42%, Iba-1 και iNOS κατά 72%).

Από το σύνολο των μελετών φαίνεται ότι τα μικροσυστατικά τόσο των υπο-προϊόντων οινοποίησης όσο και του κρασιού μπορούν να ρυθμίσουν φλεγμονώδη μονοπάτια. Οι περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις φαίνεται ότι μπορούν να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων και να αναστέλλουν τόσο την έκκριση όσο και έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μέσω τροποποίησης παραγόντων μεταγραφής. Τα εκχυλίσματα, τόσο των υπο-προϊόντων οινοποίησης όσο και του κρασιού, φαίνεται ότι μπορούν να αναστείλουν προφλεγμονώδη ένζυμα όπως η κυκλοοξυγενάση-1, η λιποοξυγενάση, καθώς και τα ένζυμα βιοσύνθεσης του PAF, lyso-PAF-AT και PAF-CPT, οδηγώντας έτσι στην καταστολή των προφλεγμονωδών εικοσανοειδών και της σύνθεσης του PAF, αντίστοιχα. Επιπλέον, αρκετές μελέτες ανέδειξαν ότι εκχυλίσματα υπο-προϊόντων αλλά και κρασιού μειώνουν την έκφραση μορίων πρόσφυσης όπως VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, E-Σελεκτίνη, MCP-1 και M-CSF, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των εκχυλισμάτων αυτών, οφείλονται και στο γεγονός ότι παρεμποδίζουν την έκφραση βασικών προφλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων όπως το NF-κβ και την AP-1 (activator protein-1).

Συνοψίζοντας, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των εκχυλισμάτων υπο-προϊόντων οινοποίησης και κρασιού in vitro, φαίνεται ξεκάθαρα η αντιφλεγμονώδη δράση τους, δημιουργώντας την ανάγκη για περισσότερες κλινικές δοκιμές in vivo που εξετάζουν τη δράση τους στη φλεγμονή, στο οξειδωτικό στρες, στη θρόμβωση, και κατ΄επέκταση τη συμβολή τους στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Πίνακας 2: Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες υπο-προϊόντων οινοποίησης και κρασιού in vitro

Ερευνητές	Χρώμα/ή και ποικιλία	Είδος υπο-προϊόντος	Αντιφλεγμονώδης διαδικασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα
María De La Luz Cádiz-Gurrea et al., 2017 **[182]**	Vitis vinifera	Εκχύλισμα σπόρου σταφυλιού	• Έκφραση MCP-1 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβα (HUVECs)	• ↓ mRNA έκφρασης MCP-1, όταν συγκέντρωση εκχυλίσματος >60mg/dL ($p<0,05$) • Προανθοκυανιδίνες εκχυλίσματος οδήγησαν σε μείωση IL-8 (προφλεγμονώδη δράση)και αύξηση έκκρισης IL-4 (αντιφλεγμονώδη δράση)
Perez et al., 2015 **[183]**	Vitis vinifera	Έλαιο σπόρου σταφυλιού	• Αξιολόγηση της αναστολής παραγωγής νιτρώδους (ένα από τα τελικά προϊόντα της οξείδωσης του NO)	• Αναστολή παραγωγής NO μετά από διέγερση Raw 264.7 μακροφάγων με LPS (λιποπολυσακχαρίτη που επάγει τη φλεγμονή)
Germano M. G. Et al., 2020 **[189]**	Ερυθρές ποικιλίες Malbec Syrah	Στέμφυλα	• Επίδραση εκχυλισμάτων στη δραστηριότητας της συνθάσης NO (iNOS)	• Μείωση δραστικότητας συνθάσης NO → μείωση παραγωγής NO μετά από διέγερση Raw 264.7 κυττάρων με LPS όταν συγκέντρωση εκχυλίσματος 1mg/dL ($p<0,001$)
Chia-Lun Chao et al., 2011 **[184]**	Δεν αναφέρεται	Εκχύλισμα σπόρου σταφυλιού	• Παραγωγή PGE_2 • Έκφραση ICAM-1 και COX-2 • Δραστηριότητα NF-kB	Προσθήκη GSE (50–100 μg/mL) σε κύτταρα HUVECs επαγόμενα από TNF-α • Μείωση δραστηριότητας NF-kB , έκφρασης ICAM-1 και COX-2 • Μείωση παραγωγής PGE_2
Ximena Terra et al., 2007 **[185]**	Δεν αναφέρεται	Εκχύλισμα σπόρου σταφυλιού (εκχύλισμα προκυανιδινών)	• Παραγωγή NO • NF-κB • Σύνθεση PGE_2	Προσθήκη εκχυλίσματος προκυανιδινών (PE 65μg/ml) σε Raw 264.7 μακροφάγα επαγόμενα με LPS και IFN-γ • Μείωση της βιοσύνθεσης και υπερπαραγωγής NO (δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη σχέση) • Ρύθμιση της μετατόπισης του NF-κB στον πυρήνα • Μείωση παραγωγής IkBα mRNA (δοσοεξαρτώμενη σχέση) • Αναστολή σύνθεσης/παραγωγής PGE_2 Καλύτερα αποτελέσματα εκχυλίσματος προκυανιδινών σε σύγκριση με ΜΣΑΦ και δεξαμεθαζόνη

Ερευνητές	Χρώμα/ή και ποικιλία	Είδος υπο-προϊόντος	Αντιφλεγμονώδης διαδικασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα
Gabriele Carullo et al., 2020 **[188]**	*Λευκές ποικιλίες* *Mantonico* *Pecorello*	*Στέμφυλα*	• *Ικανότητα εξασθένησης παραγωγής NO σε κύτταρα μακροφάγων RAW 264.7*	• *Μείωση παραγωγής NO σε κύτταρα μακροφάγων RAW 264.7 που είχαν διεγερθεί από LPS* • *Ανασταλτική επίδραση των καροτενοειδών του εκχυλίσματος στο μονοπάτι του NF-kB*
B. Rodríguez-Morgado et al., 2014 ***[187]***	*Δεν αναφέρεται*	*Στέμφυλα*	• *Μελετώνται τα εξής προφλεγμονώδη μόρια: TNF-α, TLR-4, IL-1 β, iba-1 iNOS*	*Ενζυμικό εκχύλισμα στεμφύλων (GP-EE) - επίδραση στα N13 κύτταρα διεγερμένα με LPS-max δράση στα 10μg/ml πολυφαινολών* • *Καμία επίδραση στα control κύτταρα (χωρίς LPS)* • ***Μείωση** της ανοδικής ρύθμισης* **mRNA** *όλων των προφλεμονωδών παραγόντων (TNF-α κατά 90%, TLR-4 κατά 40,6%, IL-1 β κατά 42%, Iba-1 κατά 75% και iNOS κατά 72%) στα 10μg/ml*
Nawel Benbouguerra et al., 2021 ***[186]***	Ερυθρές ποικιλίες Merlot Tannat Syrah	*Φλούδα*	• *Μέτρηση NO*	• *Μείωση κατά 50% της ενδοκυτταρικής παραγωγής NO μετά από* Raw 264.7 μακροφάγων με LPS
Xanthopoulou M. N. et al., 2014 ***[193]***	*Ερυθρή:Cabernet Sauvignon* *Λευκή: Robola*	*Εκχύλισμα κρασιού*	• *Δραστικότητα ενζύμων βιοσύνθεσης και καταβολισμού PAF*	• *Μείωση δραστικότητας των ενζύμων βιοσύνθεσης του PAF 1)lyso-PAF AT και 2)PAF CPT* • *Δεν επηρέασε κανένα εκχύλισμα κρασιού τη δραστικότητα του ενζύμου :PAF ακετυλο-υδρολάση (PAF-AH)*
Carla Nunes et al., 2013 ***[195]***	*Δεν αναφέρεται*	*Εκχύλισμα κόκκινου κρασιού*	• *Παραγωγή IL-8* • *Δραστηριότητα ενζύμων NOS και COX-2* • *Ενεργοποίηση NF-kB*	• *Εκχύλισμα κόκκινου κρασιού σε επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου HT-29 διεγερμένα με κυτοκίνες → ευεργετική επίδραση στην εντερική φλεγμονή → μειώνει την παραγωγή της προγλεφμονώδης Il-8 και την έκφραση της COX-2 (παραγωγή προσταγδαδινών)*

Ερευνητές	Χρώμα/ή και ποικιλία	Είδος υπο-προϊόντος	Αντιφλεγμονώδης διαδικασία (μονάδα μέτρησης)	Κύρια ευρήματα
Nadia Calabriso et al., 2015 **[191]**	*Ερυθρές ποικιλίες Primitivo Negroamaro*	*Εκχύλισμα κρασιού*	• *Επίπεδα MCP-1 και M-CSF* • *Έκφραση μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνη* • *Ενεργοποίηση AP-1 και NF-kB*	*Εκχύλισμα πολυφαινολών (1 μg/mL) και από τις 2 ποικιλίες κρασιού σε κύτταρα* HUVEC με LPS • *Μείωση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη καθώς επίσης και τη χημειοκίνη MCP-1 και τη κυττοκίνη M-CSF , και στο mRNA και στα επίπεδα πρωτεΐνης* • *Φλαβονόλες: μεγαλύτερη παρεμπόδιση ενεργοποίησης NF-kB*
Canalli Raffaella et al., 2010 ***[192]***	*Ερυθρή ποικιλία Teroldego Rotaliano*	*Εκχύλισμα κρασιού*	• *Δραστηριότητα μεταγραφικών παραγόντων*	• *Καταστολή φλεγμονοδών μεταγραφικών παραγόντων , AP-1 και NF-kB*
*Gabriela Angel-Morales et al., 2012****[190]***	*Ερυθρή ποικιλία Le Noir*	*Εκχύλισμα κρασιού*	• *Έκφραση mRNA μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 και του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB*	*Επίδραση σε κύτταρα CCD-18Co* μυοϊνοβλαστών • *Μείωση έκφρασης mRNA των μορίων προσκόλλησης VCAM-1, ICAM-1 και PECAM-1 σε κύτταρα διεγερμένα με LPS* • *Αύξηση miR-126 (παρεμποδίζει την έκφραση πρωτεϊνών π.χ VCAM-1)*
Pauline Chalons et al., 2018 ***[194]***	*Ερυθρή ποικιλία Santenay*	*Εκχύλισμα κρασιού*	• *IL-1β* • *NLRP3 φλεγμονώδες μονοπάτι*	• *Μείωση έκκρισης IL-1β → μείωση του φλεγμονώδους μονοπατιού NLRP3* • *Μείωση γονιδιακής έκφρασης στα μακροφάγα* • *Μείωση έκφρασης MSC πρωτεΐνης*

3.2.2 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ (in vivo)

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, από την επιστημονική κοινότητα, για την ανάδειξη της πιθανής σχέσης των εκχυλισμάτων από υπο-προϊόντα οινοποίησης και της κατάστασης της φλεγμονής, λαμβάνοντας υπόψη τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις in-vitro μελέτες. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη κλινικών δοκιμών που να εξετάζουν τη σχέση αυτή σε μεταγευματικό στάδιο, με ελάχιστες να επικεντρώνονται στην επίδραση των υπο-προϊόντων οινοποίησης σε δείκτες οξειδωτικού στρες.

Λόγω της έλλειψης αυτής θα παρουσιαστούν στον Πίνακα 3, 5 μελέτες που αφορούν τη μακροχρόνια επίδραση συμπληρωμάτων από εκχυλίσματα υπο-προϊόντων οινοποίησης (σπόροι και στέμφυλα), σε δείκτες φλεγμονής. Σε 1 [196] μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υπο-προϊόντα οινοποίησης ,ως δωρεά από οινοποιία, σε 3 [197-199] μελέτες εξετάστηκε η δράση εμπορικών σκευασμάτων, με εκχύλισμα από σπόρους σταφυλιού, ενώ σε 1 [200] μελέτη δεν αναφέρεται η προέλευση του συμπληρώματος. Οι εθελοντές, που συμμετείχαν στις παραπάνω κλινικές δοκιμές, βρίσκονταν σε καταστάσεις, όπου αναμένεται φλεγμονώδη κατάσταση όπως σε άτομα με ΣΔΙΙ [197], με υπερβάλλον σωματικό βάρος [200], που καπνίζουν [198], με αυξημένο κίνδυνο για Μεταβολικό Σύνδρομο [196] και για καρδιαγγειακά νοσήματα [199]. Η αντιφλεγμονώδης ικανότητα των υπο-προϊόντων οινοποίησης αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητα μείωσης φλεγμονωδών δεικτών όπως CRP, oxLDL, IL-1β, IL-10, TNF-a, PGF καθώς και την ικανότητας μείωσης έκφρασης φλεγμονωδών γονιδίων.

Στις κλινικές δοκιμές αυτές [196-200] εξετάστηκε η μακροπρόθεσμη επίδραση της κατανάλωσης συμπληρώματος, η οποία είχε διάρκεια 4 έως 10 εβδομάδες. Επιπλέον, σε μία μελέτη εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδης δράση συμπληρώματος, το οποίο περιείχε εκτός από υπο-προϊόντα οινοποίησης και άλλες ουσίες, όπως omija φρούτο. Στις περισσότερες μελέτες παρατηρήθηκε μία θετική επίδραση των υπο-προϊόντων οινοποίησης στη φλεγμονή και μία μόνο μελέτη δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε δείκτες φλεγμονής μετά από μακροπρόθεσμη χορήγηση των υποπροϊόντων οινοποίησης [199].

Επιπρόσθετα, λόγω των ελλιπών κλινικών δοκιμών που υπάρχουν σε μεταγευματικό στάδιο όσον αφορά τα υπο-προϊόντα οινοποίησης θα παρουσιαστούν στον Πίνακα 4 , 7 κλινικές δοκιμές που εξετάζουν την μεταγευματική επίδραση κρασιού, κόκκινου ή λευκού, (καθώς περιέχουν παρόμοια φαινολικά συστατικά με τα υπο-προϊόντα οινοποίησης), σε δείκτες φλεγμονής όπως CRP, IL-6, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, oxLDL, PAF-CPT, Lyso-PAF AT, NF-Kb, FMD (flow-mediated-dilation) και LpPLA2. Οι εθελοντές που συμμετείχαν στις κλινικές δοκιμές ήταν είτε υγιείς [201-206] είτε καρδιαγγειακοί ασθενείς [207].

Σχετικά με τους φλεγμονώδεις δείκτες που αξιολογήθηκαν στις παρακάτω μελέτες, φάνηκε η αντιφλεγμονώδη ιδιότητα του κρασιού σε μεταγευματικό στάδιο. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη των Blanco-Colio και των συνεργατών του ανέδειξε ότι το κόκκινο κρασί μεταγευματικά μειώνει την ενεργοποίηση του NF-kB στις 6 και 9ώρες μετά την κατανάλωσή του σε σύγκριση με τη βότκα [202]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κλινική δοκιμή που μέτρησε την ποσοστιαία αλλαγή της έκφρασης αρκετών φλεγμονωδών γονιδίων μετά την κατανάλωση κρασιού μαζί με γεύμα, η έκφραση του NF-κB δεν είχε μειωθεί σημαντικά, αλλά η IL-6 μειώθηκε σε σύγκριση με τα αρχικά επίπεδα και το MCP-1 μειώθηκε σε σύγκριση με την ομάδα του γεύματος αναφοράς [204]. Μεταγευματικά τα επίπεδα της CRP [204] ή άλλων ανοσοποιητικών παραγόντων [203], δεν διέφεραν μεταξύ των παρεμβάσεων.

Τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό, κλινική δοκιμή της Αργυρού και των συνεργατών της, αναφέρθηκε στη δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του παράγοντα PAF στα λευκοκύτταρα, ονόματι Lyso-PAF AT και PAF-CPT , όπου παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων αυτών μετά την κατανάλωση κόκκινου ή λευκού κρασιού, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες (απλή αιθανόλη ή νερό)[206].

Παρόλο αυτά τα δεδομένα, δεν επαρκούν για να διαπιστώσουμε τις δυνητικές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των υπο-προϊόντων οινοποίησης, καθώς δεν υπάρχει κλινική δοκιμή που να έχει διεξαχθεί μέχρι σήμερα και να μελετά εκχύλισμα υπο-προϊόντος οινοποίησης και μεταγευματική επίδραση σε δείκτες φλεγμονής. Επομένως, μόνο μεταγευματικές μελέτες που αφορούν το κρασί (κόκκινο ή κρασί) μπορούν να δώσουν κάποιες πληροφορίες σχετικά με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες λόγω των

περιεχόμενων παρόμοιων φαινολικών συστατικών που περιέχει, με τα υπο-προϊόντα οινοποίησης.

Πίνακας 3: Κλινικές δοκιμές μακροχρόνιας δράσης υπο-προϊόντων οινοποίησης σε δείκτες φλεγμονής

Ερευνητές	*Χρώμα/ή και ποικιλία*	*Είδος υπο-προϊόντος*	*Πειραματική διαδικασία*	*Μετρήσεις*	*Κύρια ευρήματα*
Urquiaga et al., 2018 [196]	**Ερυθρή ποικιλία Cabernet Sauvignon**	**Μπιφτέκι με αλεύρι από στέμφυλα (beef burger -WGPF)**	**Σχεδιασμός: Διασταυρούμενη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: N=27 άνδρες, 30-65 ετών, ≥1 παράγοντα κινδύνου Μεταβ. συνδ. (MetS)** **Παρέμβαση :** ➢ **100 γρ μοσχ. Μπιφτέκι/ημέρα με 7% προσθήκη WGPF/d (3,5% διαιτητικές ίνες, 1.2 mg GE/gr πολυφαινολών) για το 1ο μήνα** ➢ **Κανένα μπιφτέκι, για το 2ο μήνα** ➢ **100 γρ. μοσχ. Μπιφτέκι/ημέρα (ελέγχου), για το 3ο μήνα**	***Μετρήσεις πλάσματος:*** **Ανθρωπομετρικές, Α.Π., Γλυκόζη, HOMA, Λιπιδαιμικό προφίλ, Βιταμίνη C και E, Ουρικό οξύ και βασικός δείκτης φλεγμονής : oxLDL**	✓↓ **γλυκαιμίας, HOMA, ουρικού οξέος και oxLDL** ✓↑ **Βιταμίνης C**
Han et al., 2016 [200]	**Καμία αναφορά**	**Εκχύλισμα από στέμφυλα+φρούτο omija (GO)**	**Σχεδιασμός: Τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή ελεγχομένη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: N=76, 30-70 ετών, ΔΜΣ ≥ 23 kg/m²** **Παρέμβαση : 3 ομάδες για 10 εβδ.** ➢ **1η ομάδα (N=24): Εικονικό συμπλήρωμα (placebo) 4gr/d άμυλο** ➢ **2η ομάδα (N=26): Low-GO (342.5 mg/d εκχ. στεμφύλων+57.5 mg/d εκχ. φρούτο omija)** ➢ **3η ομάδα (N=26): High-GO (685 mg/d εκχ. Στεμφύλων+ 115 mg/d εκχ. φρούτο omija)**	**Ανθρωπομετρικές, Α.Π., Λιπιδαιμικό προφίλ, ApoA, ApoB, IL, TNF-α, GSH-Px, SOD, Καταλάση, TBARS, GR, H_2O_2**	**Low-GO** ✓↑ **SOD vs. αρχή** ✓↓ **πλάσμα IL-1b vs. αρχή** **High-GO** ✓↓ **Ολική χοληστερόλη, LDL, μη-HDL, Lp(a), IL-1, TNF-α, δείκτης αθηρωμάτωσης vs. αρχή** ✓↓ **TBARS και H_2O_2 vs. placebo & αρχή**
Kar et al. 2009, [197]	**Καμία αναφορά**	**Εκχύλισμα από γίγαρτα (σπόροι)**	**Σχεδιασμός: Τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη ελεγχομένη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: N=32 (Γ: 50%), 18-70 ετών, ΣΔ II & ↑ κινδύνου CVD** **Παρέμβαση :** ❖ **600 mg/d εμπορικό εκχ. σπόρων ή εικονικού σκευάσματος για 4 εβδ. (2 εβδ. wash out)**	**Λιπιδαιμικό προφίλ, CRP**	**Εμπορικό εκχύλισμα σπόρων:** ✓↓ **hsCRP και ολικής χοληστερόλης vs. αρχή**

Ερευνητές	*Χρώμα/ή και ποικιλία*	*Είδος υπο-προϊόντος*	*Πειραματική διαδικασία*	*Μετρήσεις*	*Κύρια ευρήματα*
Mellen et al. 2010 [199]	**Muscadine**	**Εκχύλισμα από γίγαρτα (σπόροι)**	**Σχεδιασμός: Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, διασταυρούμενη, ελεγχόμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: N=50 (Γ: 50%), 18-65 ετών με ≥1 παράγοντα κινδύνου για CVD** **Παρέμβαση :** ➢ **Λήψη 1300mg/ημ. εκχυλίσματος σπόρων ή εικονικού σκευάσματος (placebo) για 4 εβδομάδες το καθένα (με 4 εβδ. washout)**	**Μετρήσεις:** **Α.Π., Γλυκόζη, Λιπιδαιμικό προφίλ, FMD, CRP**	➢ **Σημαντική ↑ διαμέτρου αρτηρίας του βραχίονα σε ηρεμία vs. placebo και αρχή** ➢ **Καμία μεταβολή σε δείκτες φλεγμονής (CRP-υπεροξείδωση λιπιδίων), δείκτες οξειδωτικούς στρες και % αλλαγή FMD**
Weseler et al. 2011[198]	**Δεν αναφέρεται**	**Εκχύλισμα από γίγαρτα (σπόροι)**	**Σχεδιασμός: Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, παράλληλη, ελεγχόμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: N=28 άνδρες, 30-60 ετών, καπνιστές** **Παρέμβαση για 8 εβδομάδες:** ➢ **1η Ομάδα: (N=15) 200 mg MOF (Μονο- και Ολιγομερείς φλαβονόλες από σπόρους σταφυλιού)** ➢ **2η Ομάδα: (N=13) Εικονικό εκχύλισμα (placebo)** **Μετρήσεις στην αρχή, στις 4 και στις 8 εβδομάδες και στις 2 ομάδες**	**Λιπιδαιμικό προφίλ, FMD** **Δείκτες φλεγμονής: IL-10, TNFα** **Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TEAC)** **Αντιοξειδωτικά ένζυμα: GSH/GSSG** **Δείκτες υποροξείδωσης λιποειδών:8- iso-PGF2α πλάσματος**	**MOF** ➢ ↓ **Ολικής χοληστερόλης ,LDL, TNFa vs. αρχή** ➢ ↑ **GSH/GSSG** ➢ **Μη σημαντικές διαφορές σε 8-iso-PGF2a** ➢ **Μη σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα** ❖ **αντιφλεγμονώδη δράση έναντι της ex vivo προστιθέμενης βακτηριακής ενδοτοξίνης** **-Μειώνοντας σημαντικά την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων στα λευκοκύτταρα**

Πίνακας 4: Κλινικές δοκιμές για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του κρασιού σε μεταγευματικό στάδιο

Ερευνητές	*Χρώμα/ή και ποικιλία*	*Πειραματική διαδικασία*	*Αξιολόγηση αντιφλεγμονώδους ικανότητας*	*Κύρια ευρήματα*
Luc Djousse et al., 1999 [201]	**Ερυθρή ποικιλία Cabernet sauvignon**	**Σχεδιασμός: Μεταγευματική διασταυρούμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: N=13 (A:7), 23-41 ετών, υγιείς, μη καπνιστές** **Διπλή παρέμβαση -1 εβδ. wash out:** **Α) high fat γεύμα (0,8γρ. λίπους/kg ΣΒ)+ 3ml/kg ΣΒ κόκκινο κρασί (12%v/v)** **Β) Ίδιο γεύμα+ ισοθερμιδικό μη αλκοολούχο ποτό (control)** • **Χαρακτηριστικά γεύματος: 15kcal/kg ΣΒ (Fat:48%, Cho:19% και Pro:20%)**	**Μετρήσεις:** • **FMD / Παράγοντας πήξης VII/ Ινωδογόνο/ Λιποπρωτεϊνες (LDL/HDL/HDL$_3$/TC/VLDL/TG)** → **0, 2, 4 και 6h**	• **Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 παρεμβάσεων (κόκκινο κρασί vs. control ποτό) στους παράγοντες που μετρήθηκαν** • **Καμία συσχέτιση κόκκινο κρασί και ενδοθηλιακή λειτουργία**
Blanco-Colio et al., 2000 [202]	**Κόκκινο κρασί**	**Σχεδιασμός: Μεταγευματική διασταυρούμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: 16 υγιείς εθελοντές, μη καπνιστές (A:8), 22-33 ετών** **Παρέμβαση :** **Α) Κόκκινο κρασί: 20g (Α), 12g(Γ)** **Β)Κόκκινο κρασί: 12g(Α), 7,2g (Γ)** **Γ)Βότκα: 12g (Α), 7,2g (Γ)** **Δ)Νερό + ζάχαρη** } **+ high fat γεύμα** • **Χαρακτηριστικά γεύματος: Fat(56,8%)-602kcal**	• **NF-kB σε περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα αίματος (PBMC-peripheral blood mononuclear cells)** • **Λιπιδαιμικό προφίλ** → **0, 3, 6 και 9h**	**Κόκκινο κρασί (Α και Β) vs. Βότκα/νερό** • **6 και 9h: ↓ NF-kB**
Bernhard Watzl et al., 2002 [203]	**Ερυθρή ποικιλία Lemberger**	**Σχεδιασμός: Μεταγευματική τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: 6 άνδρες, 29-33 ετών, υγιείς, μη-καπνιστές, ΔΜΣ: 20-15kg/m2** **Παρέμβαση: Κατανάλωση 500ml** **Α) Κόκκινο κρασί (46,8gr. Αιθ.)** **Β)Μη-αλκοολούχο κρασί** **Γ)Χυμός κόκκινου σταφυλιού** **Δ)Αιθανόλη (46,8gr.)** } ***+2 λευκά rolls (150gr.)*** ***+2 standard γεύματα (200 λεπτά μετά)*** • **1 εβδ. wash out ανάμεσα στις παρεμβάσεις**	• **Έκκριση TNF-a, IL-2 και IL-4 σε PBMC** • **Φαγοκυτταρική δραστηριότητα/ ένταση , λυτική δραστηριότητα NK (natural killers) κυττάρων** → **0, 1, 3 και 24h**	• **Καμία μεταγευματική διαφορά στους δείκτες φλεγμονής και στη λυτική δραστηριότητα των NK μεταξύ των 4 διαφορετικών ποτών έως και 24 ώρες μετά**

Ερευνητές	*Χρώμα/ή και ποικιλία*	*Πειραματική διαδικασία*	*Αξιολόγηση αντιφλεγμονώδους ικανότητας*	*Κύρια ευρήματα*
Michael J.A. Williams et al. 2004 [207]	Ερυθρή ποικιλία Pinot Noir Λευκή Ποικιλία Sauvignon Blanc	Σχεδιασμός: Μεταγευματική τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή Δείγμα: 13 άνδρες, 52-66 ετών, καρδιαγγειακοί ασθενείς Παρέμβαση: Α) Κόκκινο κρασί (4ml/ kg ΣΒ, 45 ±7gr.) Β) Λευκό κρασί (4ml/kg ΣΒ, 45 ±7gr.) } +ΓΕΥΜΑ Γ)Μη-αλκοολούχο ποτό • Χαρακτηριστικά γεύματος: 513kcal (Fat:20%, Cho:62% και Pro:18%)	Μέτρηση φλεγμονωδών δεικτών: IL-6, VCAM-1, ICAM-1 ➔ 0, 1 και 6h	• ↑ IL-6 6h :κρασί (λευκό - 63% αύξηση και κόκκινο-56%) vs baseline/μη-αλκοολούχο ποτό-11% (στατιστικά σημαντικό) • Καμία διαφορά στα μόρια προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1
Laura Di Renzo et al., 2015 [204]	Κόκκινο κρασί εμπλουτισμένο με ρεσβερατρόλη	Σχεδιασμός: Μεταγευματική τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή Δείγμα: 30 εθελοντές, 26-47 ετών Παρέμβαση: Α)Ομάδα ελέγχου Β) Μόνο γεύμα Γ)Γεύμα+250ml κρασί (30γρ. αλκοόλ) Δ) 250ml κρασί (3 εβδ. Wash out) • Γεύμα: 1144kcal (Cho:26,8%, Fat:55%, Pro:18,2%)	• Μέτρηση επιπέδων oxLDL, CRP, NF-kB mRNA , IL-6 mRNA ,MCP-1 mRNA (χημειοτακτική πρωτεϊνη μονοκυττάρων-1) ➔ 0 και 3h	• ↑ oxLDL μόνο γεύμα (Β) vs ομάδα ελέγχου(Α) • ↓ oxLDL γεύμα +κρασί(Γ) vs μόνο γεύμα(Β) • Μείωση έκφρασης IL-6 στην ομάδα Δ (κρασί) vs με την ομάδα ελέγχου(Α) • Μείωση έκφρασης MCP-1 στην ομάδα Δ (κρασί) vs ομάδα Β(μόνο γεύμα)
Covas M. I. et al., 2003 [205]	Κόκκινο κρασί	Δείγμα: 10 άνδρες, 20-22ετών, ΔΜΣ: 20,6-26,3kg/m2 Παρέμβαση: 1η και 4η ημέρα: 250mL/ημ. κρασιού το πρωί. Λήψη αίματος στην αρχή, μετά από 1 και 4 ώρες 2η και 3η ημέρα: 250mL/ημ. κρασιού μετά το γεύμα [Ολική συγκέντρωση φαινολικών 3250mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος]	• Γλυκόζη, Λιπιδαιμικό προφίλ, oxLDL, GSH-Px (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης)	• Ημέρα 1η: ↓ oxLDL, GSH-Px (στη 1 ώρα) • Ημέρα 4η: ↓ LDL/HDL, oxLDL (στις 4 ώρες) και ↑ GSH-Px (στη 1 ώρα)

Ερευνητές	*Χρώμα/ή και ποικιλία*	*Πειραματική διαδικασία*	*Αξιολόγηση αντιφλεγμονώδους ικανότητας*	*Κύρια ευρήματα*
Argyrou et al. 2017 [206]	**Ερυθρή ποικιλία** **Cabernet Sauvignon** **Λευκή ποικιλία** **Robola**	**Σχεδιασμός: Μεταγευματική τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή** **Δείγμα: 10 άνδρες, υγιείς, 25-39 ετών, ΔΜΣ=22-26kg/m^2** **Παρέμβαση 4ml ποτού/kg ΣΒ :** **Α)Κόκκινο κρασί (42 ±4,7gr)** **Β) Λευκό κρασί (42 ±4,7gr)** **Γ)Αιθανόλη (42 ±4,7gr)** **Δ)Νερό** **+ high fat γεύμα** ❖ **Γεύμα: 850kcal (Cho:32%, Fat:53%, Pro:13%)** **Wash out→ 2εβδ.**	• **Μέτρηση IL-6, δραστηριότητα Lyso-PAF AT & PAF-CPT και δραστηριότητα LpPLA$_2$** ➔ **-0,25, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 και 6h**	• **Λευκό κρασί vs Αιθανόλη: ↓ Δραστηριότητα Lyso-PAF AT & Επίπεδα IL-6 (1 & 2h)** • **Λευκό/ κόκκινο κρασί vs αιθανόλη: ↓ Δραστηριότητα PAF-CPT** • **Κόκκινο κρασί vs αιθανόλη: ↓ IL-6 επίπεδα (3 & 4h)** • **Καμία διαφορά στο δείκτη LpPLA$_2$**

4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι να εξετάσει την in vivo αντι-φλεγμονώδη δράση ενός πιστοποιημένου in-vitro εκχυλίσματος από υποπροϊόντα οινοποίησης (στέμφυλα). Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος, που καταναλώθηκε παράλληλα με ένα τυποποιημένο γεύμα, στα επίπεδα της κυτταροκίνης IL-6, σε φαινομενικά υγιείς εθελόντριες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

5.1.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μία διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη και ελεγχόμενη μελέτη με placebo κλινική δοκιμή. Στο πρωτόκολλο συμμετείχαν φαινομενικά, υγιείς γυναίκες, ηλικίας 25-45 ετών και με ΔΜΣ=20-29kg/m^2. Για 2 ημέρες οι εθελόντριες δεν κατανάλωσαν τρόφιμα πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως είναι τα εξής: φρούτα, λαχανικά, τσάϊ, καφέ, οινοπνευματώδη και ενεργειακά ποτά. Είχαν ενημερωθεί να μην έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή για 2 εβδομάδες, και να μην έχουν υπάρξει σε κατάσταση φλεγμονής για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

5.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

Η διατροφική πρόσληψη των εθελοντριών αξιολογήθηκε μέσω 2 τηλεφωνικών ανακλήσεων 24ώρου, 1 ανάκληση 24ώρου την ημέρα του πειράματος καθώς και μέσα από τη συμπλήρωση ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων για το τελευταίο μήνα. Οι εθελόντριες συμπλήρωσαν επίσης και ένα ερωτηματολόγιο καταγραφής της φυσικής τους δραστηριότητας. Οι εθελόντριες προσήλθαν νηστικοί για τουλάχιστον 8 ώρες και προσκομίζοντας και δείγμα πρωινών ούρων σε ουροσυλλέκτη.

Κατά την άφιξή τους στο χώρο της Μονάδας Μεταβολισμού του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου λήφθηκαν τα εξής ανθρωπομετρικά του χαρακτηριστικά:

- Σωματικό βάρος: ζύγιση χωρίς παπούτσια (καταγραφή στο πλησιέστερο 0,1kg)

- Ύψος: μέτρηση στο αναστημόμετρο (χωρίς παπούτσια, καταγραφή στο πλησιέστερο 0,1cm)
- Περιφέρεια μέσης: μέτρηση με μεζούρα στη μικρότερη δυνατή περιφέρεια
- Περιφέρεια ισχύων: μέτρηση με μεζούρα στη μεγαλύτερη δυνατή περιφέρεια
- Λιπομέτρηση με το μηχάνημα MC-980MA

Με το πέρας των ανθρωπομετρικών μετρήσεων, τοποθετήθηκε φλεβοκαθετήρας στην εθελόντρια και 10 λεπτά αργότερα πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος αίματος νηστείας. Εν συνεχεία, οι εθελόντριες κατανάλωσαν ένα προκαθορισμένο γεύμα πλούσιο σε λίπος σε χρονικό διάστημα 10-15 λεπτών, μαζί με 6 κάψουλες που περιείχαν το σκεύασμα με το εκχύλισμα ή 6 κάψουλες με το εικονικό σκεύασμα (placebo). Η σειρά με την οποία έλαβαν οι εθελόντριες τις κάψουλες (εκχύλισμα ή placebo) ήταν τυχαία και τυφλή ως προς τον εθελοντή και τους ερευνητές. Αφού καταναλώθηκε το προκαθορισμένο γεύμα ξεκίνησε η διαδικασία της αιμοληψίας, η οποία συνέβαινε ανά 30 λεπτά για 6 ώρες.

5.1.3 Χαρακτηριστικά γεύματος

Το γεύμα που κατανάλωναν οι εθελόντριες ήταν πλούσιο σε λίπος και αποτελούνταν από 2 τοστ, η διατροφική ανάλυση των οποίων παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα . Συνολικά, οι εθελόντριες κατανάλωσαν 1131 kcal, εκ των οποίων το 19,7 % προερχόταν από υδατάνθρακες (222,4 kcal), το 11,2% από πρωτεΐνες (126,7 kcal) και το 66,7 % από λίπος (754 kcal). Οι 6 κάψουλες, που κατανάλωσαν οι εθελοντές μαζί με το γεύμα αποτελούνταν από εκχύλισμα στεμφύλων με αιθανόλη, από 4 ερυθρές ποικιλίες (Sour Black, Syrah, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon), ως δωρεά από τα Κτήματα Χατζημιχάλη και περιείχαν 660 mg πολυφαινολικών συστατικών (110 mg πολυφαινολικών συστατικών/ κάψουλα), ενώ το placebo περιείχε διάλυμα μαλτοδεξτρίνης. Η κατανάλωση του γεύματος πραγματοποιήθηκε σε 15 λεπτά και στη διάρκεια των 6h οι εθελόντριες μπορούσαν να καταναλώσουν 1 ποτήρι νερό στις 3h.

Πίνακας 5: Διατροφική ανάλυση του Τοστ 1

Τοστ 1	γρ.	Ποσότητα γεύματος	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γρ.)	Πρωτεΐνη (γρ.)	Λίπος (γρ.)
Ψωμί σταρένιο ΔΕΚΑ Καραμολέγκος	27,5	55	170	26,8	4,6	4,6
Μανούρι Θεσσαλίας	28	28	153	0,39	2,07	13,38
Σαλάμι αέρος ΝΙΚΑΣ	9	18	76	0,2	3,6	6,8
Βούτυρο Όλυμπος Soft	10	20	146	0,1	0,2	16
Σύνολο			**545**	27	10	41
Θερμίδες/ομάδα				109,96	41,88	367,02
% ομάδας				**20,2**	**7,7**	**67,3**

Πίνακας 6: Διατροφική ανάλυση του Τοστ 2

Τοστ 2	γρ.	Ποσότητα γεύματος	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γρ.)	Πρωτεΐνη (γρ.)	Λίπος (γρ.)
Ψωμί σταρένιο ΔΕΚΑ Καραμολέγκος	27,5	55	170	26,8	4,6	4,6
Cheddar Ιρλανδίας	20	40	156	0,4	10,4	12,8
Μορταδέλα ΑΒ	20	40	114	0,8	6	9,6
Βούτυρο Όλυμπος Soft	10	20	146	0,1	0,2	16
Σύνολο			**586**	28	21	43
Θερμίδες/ομάδα				112,4	84,8	387
% ομάδας				**19,2**	**14,5**	**66,0**

Πίνακας 7 : Συνολικό γεύμα

Σύνολο γεύματος	Θερμίδες (kcal)	Υδατάνθρακες (γρ.)	Πρωτεΐνη (γρ.)	Λίπος (γρ.)
2 ΤΟΣΤ	1131	56	32	84
Θερμίδες/ομάδα		222,4	126,7	754,0
% ομάδας		***19,7***	***11,2***	***66,7***

5.1.4 Πρωτόκολλο αιμοληψιών

Η αιμοληψία πραγματοποιείται μία φορά πριν την κατανάλωση γεύματος (χρόνος Π), στον χρόνο 0, που είναι αμέσως μετά την κατανάλωση του γεύματος και μετά στους χρόνους 30min, 60min, 90min, 120min, 150min, 180min, 210min, 240min, 300min και 360min.

Απομόνωση πλάσματος (Ρ)

Για τη συγκεκριμένη μελέτη είναι απαραίτητη μόνο η απομόνωση του πλάσματος από τα δείγματα και γι αυτό θα γίνει επεξήγηση της διαδικασίας.

Για την απομόνωση πλάσματος ακολουθείται :

- Παραλαβή 4ml αίματος στις εξής χρονικές στιγμές: Π, 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 και 360 , και τοποθέτηση σε μωβ Vacutainer με EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1200g για 10min
- Συλλογή του υπερκείμενου διαμοιρασμός του σε ειδικούς σωλήνες eppedorfs Τέλος, ακολουθεί αποθήκευση στους -80° C

5.2 Προσδιορισμός IL-6 -Μέθοδος ELIZA

5.2.1 Αντιδραστήρια

Το Human IL-6 ELIZA kit παρέχει τα εξής αντιδραστήρια για την πειραματική διαδικασία:

- 1 μπουκαλάκι (50mL) διάλυμα Wash Buffer συγκέντρωσης 20x.

  Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash buffer) (x1): Σε κυλινδρικό σωλήνα 1000ml προστίθεται 950ml απεσταγμένο νερό και 50ml Wash Buffer, με τελικό όγκο 1000ml. Γίνεται ανάδευση απαλά και μεταφέρεται σε μπουκάλι, όπου αποθηκεύεται στους 2-25° C έως και 30 ημέρες.
- 1 μπουκαλάκι 5ml Assay Buffer συγκέντρωσης 20x.

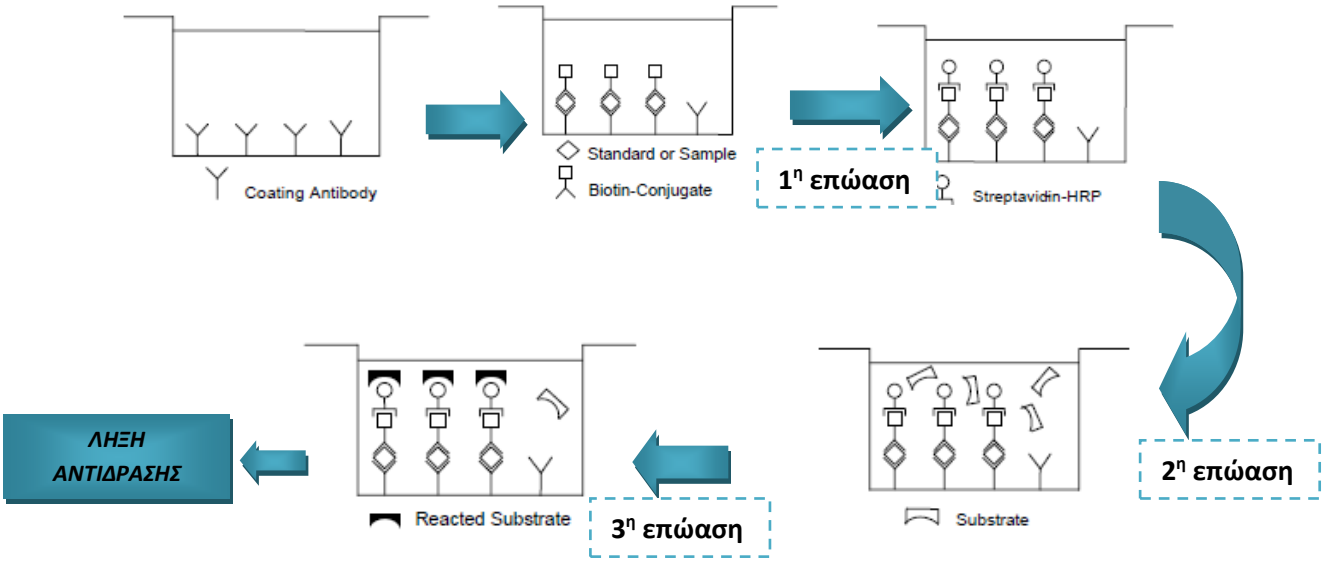
  Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος δοκιμασίας (Assay buffer) (1x): Σε κύλινδρο χωρητικότητας 100ml προστίθεται 95ml απεσταγμένο νερό και 5ml Assay Buffer, με τελικό όγκο 100ml. Γίνεται ανάδευση απαλά και αποθηκεύεται στους 2-8° C έως και 30 ημέρες.
- 1 φιαλίδιο (70 μL) αντι-ανθρώπινο IL-6 μονοκλωνικό αντίσωμα σύζευξης βιοτίνης (Biotin-Conjugate anti-human IL-6 monoclonal antibody).

  Παρασκευή διαλύματος Biotin-Conjugate: Πραγματοποιείται αραίωση 1:100, προσθέτοντας 60 μL από το προαναφερθέν φιαλίδιο και 5,95ml από το διάλυμα Assay Buffer (1x), το οποία διατηρείται για 30 λεπτά.
- 1 φιαλίδιο (150μL) Στρεπταβιδίνη-HRP

  Παρασκευή διαλύματος Στρεπταβιδίνης-HRP: Πραγματοποιείται αραίωση 1:200, αναμειγνύοντας 0,06ml από το φιαλίδιο και 11,94ml από το διάλυμα Assay Buffer(1x) σε έναν καθαρό πλαστικό σωλήνα, το διάλυμα αυτό διατηρείται για 30 λεπτά.
- 2 φιαλίδια ανθρώπινη IL-6 standard, λυοφιλοποιημένα , 200pg/ml κατά την ανασύσταση για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης
- 1 φιαλίδιο Control low
- 1 φιαλίδιο (15μL) διάλυμα υποστρώματος (τετραμεθυ-1-βενζιδίνη)
- 1 φιαλίδιο (15μL) διαλύματος τερματισμού (Stop Solution) (1M φωσφορικό οξύ)

5.2.2 Αρχή μεθόδου ELIZA

Η τεχνική της ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (ELIZA-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων τα οποία παρέχουν εξαιρετική εξειδίκευση ως αντιδραστήρια για τον καθορισμό της ποσότητας μίας πρωτεΐνης, στη συγκεκριμένη περίπτωση της IL-6, ή κάποιου άλλου αντιγόνου. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία είναι η εξής : αρχικά, ένα αντίσωμα προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια (Eliza sandwich), μετά προστίτεθαι το δείγμα μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο (IL-6) και γίνεται πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Κατόπιν, προστίθεται αντίσωμα που ανιχνεύει το αντιγόνο. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση με την χρήση ενός ενζύμου που δεσμεύεται έμμεσα με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Έπειτα προστίθεται το υπόστρωμα και γίνεται ενζυμική αντίδραση που δίνει έγχρωμο σύμπλοκο, το οποίο μετριέται. Συνοπτικά η διαδικασία αυτή περιγράφεται στην Εικόνα 31.

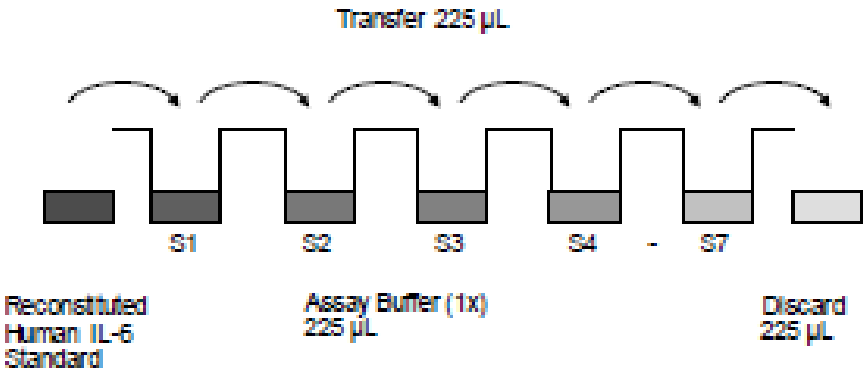


Εικόνα 31: *Στάδια ELIZA*

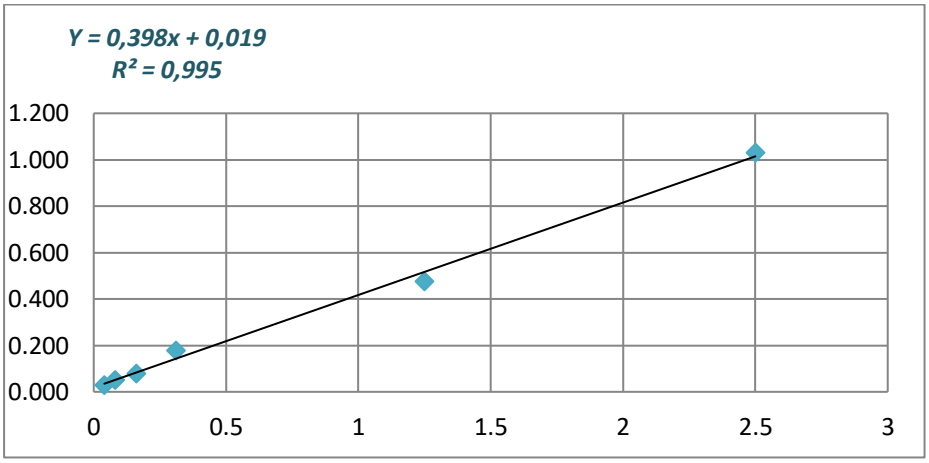
Η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση του βιομορίου, στην προκειμένη περίπτωση η IL-6. Μία τέτοια μέτρηση, γρήγορη και ευαίσθητη μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες πρωτεΐνης μικρότερες από το νανογραμμάριο. Επομένως η τεχνική της ELIZA sandwich επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αντιγόνου. Η ποσοτικοποίηση αυτή, στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη , ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου.

5.2.3 Αναλυτική πορεία

- ✓ Αρχικά καθορίζεται ο επιθυμητός αριθμός δειγμάτων που απαιτούνται να τοποθετηθούν στα «πηγαδάκια» στο πλακάκι που εμπεριέχεται στο kit ELIZA, καθώς επίσης και ο αριθμός των blank και standards δειγμάτων.
- ✓ Πραγματοποιείται πλύση των κυψελιδίων 2 φορές με 400 μL Wash buffer , για 10-15 λεπτά, με προσοχή να μην καταστραφούν τα κυψελίδια. Μετά το 2^{ο} πλύσιμο, αδειάζετε το περιεχόμενο του Wash buffer, χτυπώντας το πλακίδιο πάνω σε απορροφητικό χαρτί.
- ✓ Στη συνέχεια πραγματοποιείται πρότυπη αραίωση της ανασυσταμένης human IL-6 standard για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Σημειώνονται 7 δοκιμαστικοί σωλήνες για κάθε σημείο της πρότυπης καμπύλης S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 και S8 και γίνονται σειριακές αραιώσεις 1:2 για την πρότυπη καμπύλη (Σχήμα 1) ως εξής:
  1) Μεταφέρονται 225 μL Assay Buffer (1x) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
  2) Στη συνέχεια, με πιπέτα μεταφέρονται 225 μL του ανασυσταμένου standard IL-6 (συγκ. 200pg/ml) στον 1^{ο} σωλήνα (S1) και αναδεύεται με τελική συγκέντρωση 100pg/ml.
  3) Ακολουθεί προσθήκη 225 μL διαλύματος από το σωλήνα S1, στο δοκιμαστικό σωλήνα S2 και ανάδευση.
  4) Επανάληψη των διαδοχικών αραιώσεων 5 φορές ώστε να δημιουργηθούν όλα τα σημεία της πρότυπης καμπύλης, όπως φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 32.



Εικόνα 32: *Δείγματα πρότυπης καμπύλης*



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

- ✓ Εν συνεχεία, προστίθεται διπλή φορά 100 µL Assay Buffer (1x) στα κενά πηγάδια.
- ✓ Προστίθεται 50 µL Assay Buffer (1x) στα πηγάδια με το δείγμα, καθώς και 50 µL από κάθε δείγμα εις διπλούν στα πηγάδια αυτά.
- ✓ Προετοιμασία του συμπλέγματος βιοτίνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην ενότητα των αντιδραστηρίων και προσθήκη 50 µL αυτού του διαλύματος σε κάθε πηγάδι.
- ✓ Όλα τα πηγαδάκια καλύπτονται με μία αυτοκόλλητη ταινία και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (18-25° C) για 2 ώρες, με μικρή κίνηση στα 400rpm.
- ✓ Προετοιμάζεται το διάλυμα Στρεπταβιδίνης-HRP, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην ενότητα των αντιδραστηρίων.

- ✓ Μετά το πέρας της επώασης, ξεκολλάτε η ταινία και αδειάζονται τα πηγαδάκια. Πραγματοποιείται πλύση με Wash buffer και μετά προσθήκη 100 μL διαλύματος στρεπταβιδίνης σε όλα τα πηγαδάκια . Καλύπτονται με ταινία και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου (18-25° C) για 1 ώρα και ελαφριά κίνηση στα 400rpm.
- ✓ Μετά το πέρας της επώασης, ξεκολλάτε η ταινία και αδειάζονται τα πηγαδάκια . Πραγματοποιείται πλύση με Wash buffer και μετά αμέσως προσθήκη 100 μL του TMB Substrate solution σε όλα τα πηγάδια. Ακολουθεί επώαση στους 18-25° C για 10 λεπτά, αποφεύγοντας την έκθεση σε έντονο φως.
- ✓ Η ανάπτυξη χρώματος στο πλακάκι πρέπει να παρατηρείται και να γίνει παύση της αντίδρασης μόλις το υψηλότερο πρότυπο αναπτύξει ένα σκούρο μπλε χρώμα. Εναλλακτικά, η ανάπτυξη χρώματος μπορεί να ελεχθεί από τον αναγνώστη ELIZA στα 620nm και η αντίδραση υποστρώματος πρέπει να σταματήσει μόλις η απορρόφηση του S1 φτάσει σε απορρόφηση 0,45-0,475.
- ✓ Για τη λήξη της αντίδρασης του υποστρώματος πρέπει να προστεθούν 100μL Stop Solution αμέσως σε όλα τα «πηγαδάκια», προκειμένου να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα. Στο τέλος, πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος τα 450nm μετά τη προσθήκη του Stop Solution, και σύμφωνα με την απορρόφηση στα δείγματα

5.3 Στατιστική επεξεργασία

Ο έλεγχος της κανονικότητας των επιπέδων της IL-6 στις χρονικές στιγμές των παρεμβάσεων έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Σε διάφορες χρονικές στιγμές τα επίπεδα IL-6 των εθελοντριών δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, γι αυτό το λόγο επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικά κριτήρια για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ο έλεγχος συσχέτισης των επιπέδων IL-6 των εθελοντριών στην έναρξη της μελέτης με τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης Pearson. Ο έλεγχος για τυχόν διαφορές των επιπέδων IL-6 των εθελοντριών κατά την έναρξη των δύο παρεμβάσεων ελέγχθηκαν με Mann Whitney U test. Ο έλεγχος για μεταβολές των επιπέδων IL-6 στον χρόνο σε κάθε παρέμβαση έγινε με το στατιστικό τεστ Friedman. Ενώ, ο έλεγχος για τυχόν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα IL-6 σε κάθε χρονική στιγμή κάθε παρέμβασης συγκριτικά με τα

επίπεδα κατά την έναρξη της παρέμβασης, πραγματοποιήθηκε με το Wilcoxon test. Η σύγκριση των επιπέδων IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων κάθε χρονική στιγμή ελέγχθηκε με το Mann Whitney U test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%, και όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 21.0, SPSS 2012, Chicago, USA).

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συμπεριλαμβάνονται οι μετρήσεις από δεκατρείς εθελόντριες που πληρούν τα κριτήρια και έχουν ολοκληρώσει μέχρι στιγμής και τις δύο παρεμβάσεις. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα μελέτη αποτελεί τμήμα διασταυρούμενης διπλά τυφλής ελεγχόμενης με εικονικό σκεύασμα μεταγευματικής κλινικής δοκιμής, που βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Πιο αναλυτικά, στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται συνοπτικά σε πινακάκια τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και οι κύριοι βιοχημικοί δείκτες των εθελοντριών πριν την έναρξη της κάθε παρέμβασης, δηλαδή και στην παρέμβαση με το εικονικό εκχύλισμα αλλά και με το εκχύλισμα στεμφύλων. Τέλος, οι δεκατρείς εθελόντριες διαχωρίστηκαν με βάση το Δείκτη Μάζας Σώματος σε νορμοβαρείς (<25kg/m^2) και σε υπέρβαρες (>25kg/m^2) και ελέγχθηκαν αν διαφοροποιούνται τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους και στις δύο παρεμβάσεις.

6.1 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση

Στην παρούσα μελέτη, συμμετείχαν δεκατρείς φαινομενικά υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικία (25-30 ετών), με δείκτη μάζα σώματος 21-29kg/m^2. Όλες οι εθελόντριες ολοκλήρωσαν επιτυχώς τις δύο παρεμβάσεις (εικονικό σκεύασμα και εκχύλισμα υπο-προϊόντων οινοποίησης), χωρίς να αναφέρουν κάποια παρενέργεια. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντριών πριν από κάθε παρέμβαση παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, ως μέσο όρο± τη τυπική απόκλιση. Πιο συγκεκριμένα , η

μέση ηλικία των συμμετεχόντων ήταν τα 27,3±2,5 έτη, η μέση τιμή του δείκτη μάζας σώματος ήταν 25,1±3,2kg/m^2 πριν τη λήψη του εικονικού σκευάσματος και 24,6±3,6 kg/m^2 πριν τη λήψη του εκχυλίσματος. Ο βασικός μεταβολικός ρυθμός των εθελοντριών ήταν 1438,4±130,9kcal και 1412,7±138,3kcal πριν τη λήψη του εικονικού σκευάσματος και του εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Η περιφέρεια μέσης ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων (<88cm) και χωρίς μεγάλες μεταβολές μεταξύ των δύο παρεμβάσεων (placebo: 74,3±7,1 cm και εκχύλισμα: 74,2±7,5 cm) , όπως και ο λόγος περιφέρεια μέσης/ περιφέρεια ισχύων πριν από κάθε παρέμβαση (0,7±0,0) ήταν εντός των συστάσεων (<0,8 για γυναίκες και <0,9 για άνδρες). Η μέση διαστολική (72,2±10,1mmHg και 70,5±9,1 mmHg, για εικονικό σκεύασμα και εκχύλισμα αντίστοιχα) και συστολική αρτηριακή πίεση (112,2±8,1mmHg και 106,9±8,9mmHg, για εικονικό σκεύασμα και εκχύλισμα αντίστοιχα) ήταν επίσης εντός των φυσιολογικών τιμών (Διαστολική αρτηριακή πίεση <85mmHg) και συστολική αρτηριακή πίεση <130mmHg). Καμία από τις μεταβλητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 δεν διέφερε σημαντικά στην αρχή των δύο παρεμβάσεων, σύμφωνα με τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας (p>0,05).

Πίνακας 8: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντριών πριν την παρέμβαση

N=13	Placebo	Εκχύλισμα	P*
Ηλικία (έτη)	27,3±2,5	27,3±2,4	0,954
Δ.Μ.Σ.(kg/m^2)	25,1±3,2	24,6±3,6	0,735
BMR (kcal)	1438,4±130,9	1412,7±138,3	0,638
Περιφέρεια μέσης (cm)	74,3±7,1	74,2±7,5	0,984
Περιφέρεια μέσης/ περιφέρεια ισχίων	0,7±0,0	0,7±0,0	0,798
Διαστολική Α.Π. (mmHg)	72,2±10,1	70,5±9,1	0,679
Συστολική Α.Π. (mmHg)	112,2±8,1	106,9±8,9	0,154

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (μέγιστη και ελάχιστη τιμή). Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των παρεμβάσεων (*one-way ANOVA). BMR: Βασικός μεταβολικός ρυθμός ηρεμίας, Α.Π.: Αρτηριακή πίεση, Δ.Μ.Σ.: Δείκτης μάζας σώματος*

Στους Πίνακες 11 και 12 παρουσιάζονται τα ίδια ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά με παραπάνω και στις δύο παρεμβάσεις , αλλά με κριτήριο διαχωρισμού το Δείκτη Μάζας

Σώματος, στις εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2 (νορμοβαρείς, Πίνακας 11) και στις εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2 (υπέρβαρες-Πίνακας 12). Καμία από τις μεταβλητές που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες δε διέφερε σημαντικά στην αρχή των δύο παρεμβάσεων ανάλογα το ΔΜΣ (p>0,05).

Πίνακας 9: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά σε εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2

ΔΜΣ<25kg/m^2	Placebo	Εκχύλισμα	P
Ηλικία (έτη)	26,1±0,9	26,4±1,1	0,658
ΔΜΣ(kg/m^2)	22,7±1,0	22,3±1,3	0,456
BMR (kcal)	1355,6±29,7	1335,4±42,6	0,313
Περ. μέσης (cm)	70±3,7	69,6±4,6	0,867
Περ. μέσης/ισχίων	0,7±0,0	0,7±0,0	0,976
Διαστολική πίεση (mmHg)	69,3±11,4	69,5±10,7	0,978
Συστολική πίεση (mmHg)	111,7±8,3	1335,4±42,6	0,079

Πίνακας 10: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά σε εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2

ΔΜΣ>25kg/m^2	Placebo	Εκχύλισμα	P
Ηλικία (έτη)	28,8±3,3	28,8±3,3	1
ΔΜΣ(kg/m^2)	28,3±2,1	28,3±2,7	1
BMR (kcal)	1554,4±130,3	1536,4±151,9	0,846
Περ. μέσης (cm)	80,3±6,3	81,6±4,7	0,723
Περ. μέσης/ισχίων	0,7±0,0	0,7±0,0	0,477
Διαστολική πίεση (mmHg)	75,6±8,1	72,5±5,3	0,531
Συστολική πίεση (mmHg)	112,8±8,9	114,3±5,6	0,786

6.2 Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται οι κύριοι βιοχημικοί δείκτες των εθελοντριών πριν από την κάθε παρέμβαση. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 13, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους βιοχημικούς δείκτες μεταξύ των δύο παρεμβάσεων πριν την κατανάλωση του γεύματος (p>0,05). Πιο συγκεκριμένα, στους κλασικούς βιοχημικούς δείκτες που μετρήθηκαν ήταν οι εξής: γλυκόζη νηστείας, ουρικό οξύ, ολική χοληστερόλη, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη HDL, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη LDL και τα τριγλυκερίδια. Πιο αναλυτικά, η γλυκόζη νηστείας των εθελοντριών κυμάνθηκε σε φυσιολογικά όρια (<100mg/dL) και στις δύο παρεμβάσεις και συγκεκριμένα μετρήθηκε στα 83,1±4,7mg/dL και στα 86,1±5,9mg/dL, για τις παρεμβάσεις με το εικονικό σκεύασμα και το εκχύλισμα , αντίστοιχα.

Πίνακας 11: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες εθελοντριών πριν την παρέμβαση

N=13	Placebo	Εκχύλισμα	P
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	83,1±4,7	86,1±5,9	0,171
Ουρικό οξύ (mg/dL)	3,5±1,0	4,0±0,7	0,180
Ολική χοληστερόλη(mg/dL)	149,9±32,6	1501±21,8	0,985
HDL (mg/dL)	49,3±14,9	42,6±8,7	0,187
LDL (mg/dL)	93,8±27,2	100,6±19,1	0,482
TAG (mg/dL)	35,3±19,0	34,2±16,4	0,889

*Τα δεδομένα εκφράζοναι ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (μέγιστη και ελάχιστη τιμή). Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των παρεμβάσεων (*one-way ANOVA). HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, TAG: Τριακυλογλυκερόλες*

Επιπρόσθετα , τόσο ο μέσος όρος των τιμών όσο και η μέγιστη τιμή του ουρικού οξέος ήταν εντός των φυσιολογικών τιμών [πριν το εικονικό σκεύασμα 3,3±0,9mg/dL(2,4-4,2 mg/dL), πριν το εκχύλισμα 4,0±0,7mg/dL (3,3-4,7 mg/dL)], οι οποίες ορίζονται ως 2,6-5,7mg/dL για τις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικία και 3,5-7,0mg/dl για τους άνδρες και τις γυναίκες κατά την εμμηνόπαυση. Όσον αφορά την ολική χοληστερόλη, η συγκέντρωσή της βρέθηκε μικρότερη των 200mg/dL και συνεπώς εντός των φυσιολογικών ορίων (placebo: 149,0±35,6mg/dL και εκχύλισμα: 153,1±27,0mg/dL). Η μέση τιμή της HDL (πριν το εικονικό

σκεύασμα: 48,8±18,6mg/dL, πριν το εκχύλισμα 43,6±11,50mg/dL), ήταν ελαφρώς χαμηλότερη από τις Φ.Τ (Φ.Τ.>45mg/dL για τις γυναίκες και >40mg/dL για τους άνδρες). Εντός φυσιολογικών τιμών (Φ.Τ.) ήταν ο μέσος όρος της LDL (πριν το εικονικό σκεύασμα: 92,7±27,5mg/dL και πριν το εκχύλισμα :102,5±23,3 mg/dL), με Φ.Τ.<116mg/dL και των τριγλυκεριδίων (πριν το εικονικό σκεύασμα: 39,4±19,9mg/dL και πριν το εκχύλισμα: 34,5±20,5mg/dL), με Φ.Τ. <150mg/dL.

Στους Πίνακες 14 και 15 παρουσιάζονται οι ίδιοι βιοχημικοί δείκτες και στις δύο παρεμβάσεις , αλλά με κριτήριο διαχωρισμού το Δείκτη Μάζας Σώματος των εθελοντριών, στα άτομα με ΔΜΣ<25kg/m^2 (νορμοβαρείς, Πίνακας 14) και στα άτομα με ΔΜΣ>25kg/m^2 (υπέρβαρες-Πίνακας 15). Καμία από τις μεταβλητές που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες δε διέφερε στατιστικά σημαντικά στην αρχή των δύο παρεμβάσεων ανάλογα το ΔΜΣ (p>0.05).

Πίνακας 12: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες σε εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2

ΔΜΣ<25kg/m^2	Placebo	Εκχύλισμα	P
Γλυκόζη (mg/dL)	83,0±5,1	84,4±6,4	0,660
Ουρικό οξύ (mg/dL)	3,3±0,9	4,0±0,7	0,132
Ολική χοληστερόλη(mg/dL)	149,0±35,6	153,1±27,0	0,816
HDL (mg/dL)	48,8±18,6	43,6±11,5	0,546
LDL (mg/dL)	92,7±27,5	102,5±23,3	0,500
TAG (mg/dL)	39,4±19,9	34,5±20,5	0,670

Πίνακας 13: Κλασικοί βιοχημικοί δείκτες σε εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2

ΔΜΣ>25kg/m^2	Placebo	Εκχύλισμα	P
Γλυκόζη (mg/dL)	83,3±4,7	88,6±4,4	0,090
Ουρικό οξύ (mg/dL)	3,7±1,2	3,9±0,6	0,754
Ολική χοληστερόλη(mg/dL)	150,9±32,2	146±13,5	0,758
HDL (mg/dL)	50±10,8	41,3±2,3	0,112

LDL (mg/dL)	94,8±29,5	97,9±13,1	0,831
TAG (mg/dL)	31,1±18,8	33,9±10,5	0,776

6.3 Επίπεδα IL-6 κατά την έναρξη της μελέτης

Αρχικά, εφαρμόστηκε το στατιστικό τεστ Kolmogorov Smirnov με στόχο να ελέγξουμε την κανονικότητα των επιπέδων ιντερλευκίνης 6 (IL-6) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της παρέμβασης. Από την ανάλυση φάνηκε λοιπόν ότι τα επίπεδα IL-6 ακολουθούν κανονική κατανομή στις χρονικές στιγμές 120’, 180’ και 300’, όπου $p>0,05$. Αντιθέτως οι τιμές για την IL-6 δεν ακολουθούν κανονική κατανομή κατά τις χρονικές στιγμές Π, 60’ και 240’, όπου $p<0,05$. Επομένως, προκειμένου να υπάρχει ομοιογένεια στην επεξεργασία των δεδομένων επιλέχθηκαν μη παραμετρικά κριτήρια για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τις δύο παρεμβάσεις (εικονικό εκχύλισμα και εκχύλισμα στέμφυλων). Οι τιμές για τα επίπεδα της IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις θα εκφράζονται ως η διάμεσος τιμή (25^{ο} τεταρτημόριο-75^{ο} τεταρτημόριο). Τέλος, με το μη παραμετρικό στατιστικό τεστ Mann Whitney U διαπιστώνεται ότι οι εθελόντριες ξεκίνησαν από παρόμοια επίπεδα IL-6 κατά την έναρξη και των δύο παρεμβάσεων (placebo και εκχύλισμα) ($p=0,857$, $p>0,05$).

6.4 Επίδραση των παρεμβάσεων στα επίπεδα IL-6

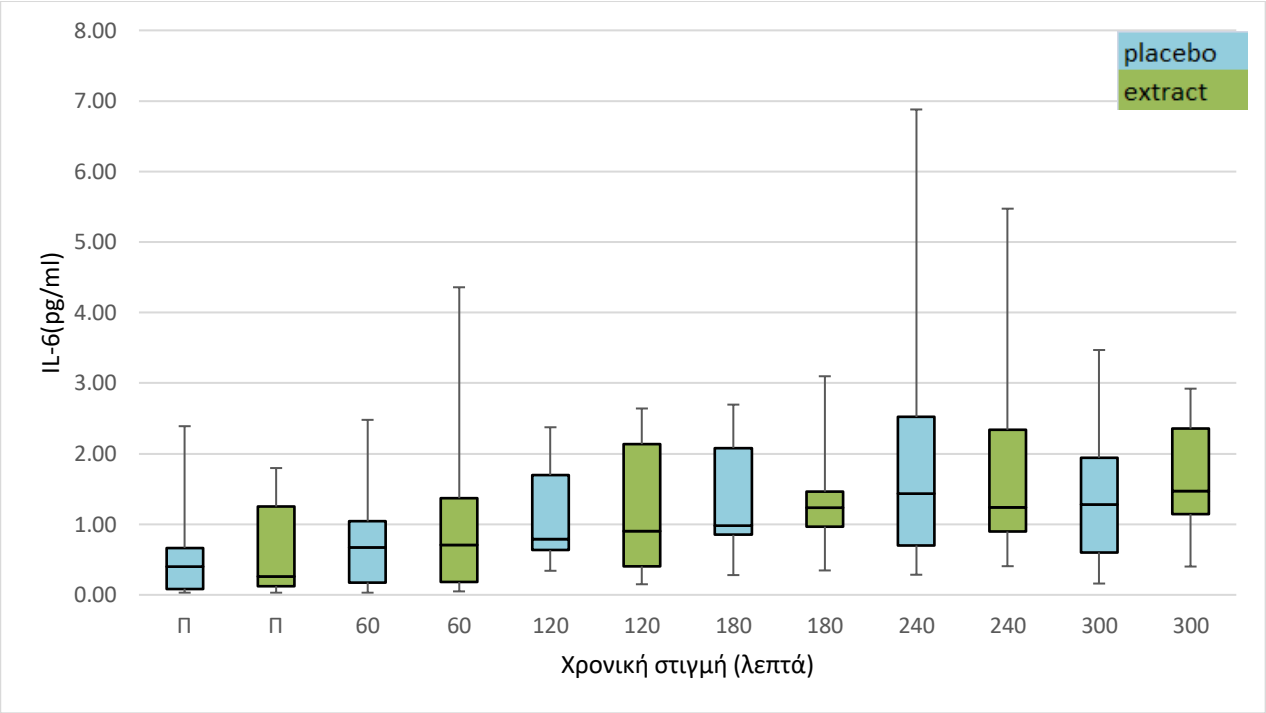
Στον Πίνακα 14 (και στο Σχήμα 2) παρουσιάζεται η διάμεσος των συγκεντρώσεων της IL-6 για κάθε χρονική στιγμή στο σύνολο των εθελοντριών και στο εκχύλισμα και στο placebo. Χρησιμοποιώντας το στατιστικό εργαλείο Friedman test εξετάστηκε αν υπάρχουν διαφοροποιήσεις των επιπέδων IL-6 στο χρόνο στις δύο παρεμβάσεις. Βρέθηκε λοιπόν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τη πάροδο του χρόνου στη συγκέντρωση της IL-6 τόσο στη παρέμβαση placebo όσο και στη παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων (placebo: $p_{time}=0,002$ και εκχύλισμα: $p_{time}=0,000$, αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, στην παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα IL-6 των εθελοντριών στους εξής χρόνους: 60’, 120’, 180’, 240’ και 300’

(p=0,010, p=0,004, p=0,004, p=0,002, p=0,028 αντίστοιχα), όπου οι συγκεντρώσεις IL-6 ήταν αυξημένες. Όσον αφορά, στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων, παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της IL-6 συγκριτικά με τα επίπεδά της κατά την έναρξη της παρέμβασης στους εξής χρόνους: 120', 180', 240' και 300' (p=0,002, p=0,009, p=0,002, p=0,002 αντίστοιχα), όπου οι συγκεντρώσεις βρέθηκαν αυξημένες σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα. Μόνο τη χρονική στιγμή 60' στην παρέμβαση με το εκχύλισμα δεν βρέθηκε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης της IL-6 (p=0,173) σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των επιπέδων IL-6 ανάμεσα στις δύο παρεμβάσεις τις ίδιες χρονικές στιγμές, χρησιμοποιώντας το τεστ Mann Whitney U, το οποίο ανέδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων οποιαδήποτε χρονική στιγμή (p_{trial}>0,05 σε όλες τις χρονικές στιγμές).

Πίνακας 14: Επίπεδα IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις

Χρονική στιγμή	Π	60'	120'	180'	240'	300'	p_{time}
Placebo IL-6(pg/ml)	0,32 (0,09-0,68)	0,84* (0,18-1,68)	0,79* (0,54-1,75)	1,24* (0,86-2,08)	1,44* (0,83-2,83)	1,28* (0,64-2,24)	**0,002**
Εκχύλισμα IL-6(pg/ml)	0,26 (0,05-0,80)	0,71 (0,18-1,08)	0,93* (0,56-1,93)	1,25* (0,97-1,54)	1,72* (1,08-2,29)	1,56* (1,20-2,16)	**0,000**
p_{trial}	0,857	0,590	0,980	0,739	1,000	0,341	

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως διάμεσοι (25° και 75° τεταρτημόριο), *ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, ptime: Η επίδραση του χρόνου (within group) εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman test. Η σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών συγκριτικά με το baseline (Π) (p<0,05), υπολογίστηκε με τον στατιστικό έλεγχο Wilcoxon test.*



Σχήμα 2: Μεταβολή συγκεντρώσεων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις

6.5 Επίδραση της παρέμβασης στην % μεταβολή των επιπέδων IL-6

Επιπλέον, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν και ως % των αρχικών επιπέδων για κάθε εθελόντρια και στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται η ποσοστιαία μεταβολή της IL-6 σε σχέση με τη χρονική στιγμή Π (πριν τη λήψη του γεύματος). Χρησιμοποιώντας το στατιστικό κριτήριο Kolmogorov Smirnov ελέγχθηκε η κανονικότητα του μεγέθους, όπου φάνηκε ότι δεν ακολουθείται κανονική κατανομή τις χρονικές στιγμές Π, 60’ και 240’, όπου $p<0,05$, ενώ ακολουθείται κανονική κατανομή τις χρονικές στιγμές 120’, 180’ και 300’, όπου $p>0.05$. Επομένως, προκειμένου να υπάρξει ομοιογένεια στην επεξεργασία των δεδομένων θα επιλεχθούν μη παραμετρικά κριτήρια για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων των δύο παρεμβάσεων, και οι τιμές για τα επίπεδα της IL-6 στις δύο παρεμβάσεις θα εκφράζονται ως διάμεσος τιμή (25° τεταρτημόριο-75° τεταρτημόριο).

Πίνακας 15: % Μεταβολή επιπέδων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις

Χρονική στιγμή	Π	60'	120'	180'	240'	300'	p_{time}
Placebo %IL-6	100	146,67* (105,16-339,49)	227,19* (156,87-820,13)	243,89* (158,97-1336,67)	323,70* (246,02-2519,92)	259,53* (104,64-2955,23)	**0,002**
Εκχύλισμα %IL-6	100	154,34* (79,27-254,70)	189,87* (123,83-1681,67)	437,97* (117,77-1837,27)	496,00* (224,06-1812,58)	496,00* (181,71-2444,04)	**0,000**
p_{trial}	1	0,555	0,858	0,980	0,624	0,231	

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως διάμεσοι της ποσοστιαίας μεταβολής της IL-6 σε σχέση με την IL-6 τη χρονική στιγμή Π, (25° και 75° τεταρτημόριο), *ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, ptime: Η επίδραση του χρόνου (within group) εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman test. Η σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών συγκριτικά με το baseline (Π) (p<0,05), υπολογίστηκε με τον στατιστικό έλεγχο Wilcoxon test.*

Αρχικά, εξετάστηκε με το τεστ Friedman αν υπάρχει διαφοροποίηση των επιπέδων IL-6 στον χρόνο και στις δύο παρεμβάσεις, όπου φάνηκε ότι υπάρχουν σημαντικές μεταβολές και στις δύο παρεμβάσεις (placebo: p=0,002, εκχύλισμα: p=0,000). Πιο συγκεκριμένα, στην παρέμβαση με το εικονικό σκεύασμα σημαντικές % μεταβολές των επιπέδων IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα, φάνηκαν στις εξής χρονικές στιγμές: 60', 120', 180', 240' και 300' (p=0,010, p=0,002, p=0,003, p=0,002 και p=0,012, αντίστοιχα), όπου φαίνεται ότι αυξήθηκαν σημαντικά. Όσον αφορά την παρέμβαση με το σκεύασμα στέμφυλων, σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα IL-6 συγκριτικά με τα αρχικά της επίπεδα ανιχνεύθηκαν στις εξής χρονικές στιγμές: 60', 120', 180', 240' και 300' (p=0,039, p=0,003, p=0,005, p=0,002 και p=0,002, αντίστοιχα), όπου φαίνεται ότι αυξήθηκαν σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα IL-6. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των % επιπέδων IL-6 ανάμεσα στις δύο παρεμβάσεις τις ίδιες χρονικές στιγμές, με το τεστ Mann Whitney U, το οποίο έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων οποιαδήποτε χρονική στιγμή (p_{trial}>0,05 σε όλες τις χρονικές στιγμές).

6.6 Η επίδραση των παρεμβάσεων στα επίπεδα και στην % μεταβολή της IL-6 σε εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται τα επίπεδα IL-6 για τις εθελόντριες φυσιολογικού σωματικού βάρους (ΔΜΣ<25kg/m^2). Αρχικά με τη χρήση του Test Friedman πραγματοποιήθηκε έλεγχος αν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές αναφορικά με τα επίπεδα IL-6, στον χρόνο σε κάθε παρέμβαση. Έτσι λοιπόν, φάνηκε ότι υπήρχαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων IL-6 μόνο στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων (p=0,000) και όχι στην παρέμβαση με το placebo (p=0,074>0.05), στις εθελόντριες με ΔΜΣ<25kg/m^2. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του τεστ Willcoxon παρατηρήθηκε ότι στην παρέμβαση με το placebo αυξήθηκαν τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 60’, 120’, 180’ και 240’ (p=0,028, p=0,043, p=0,028, p=0,028 αντίστοιχα). Στην παρέμβαση με το εκχύλισμα των στέμφυλων, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 120’, 240’και 300’ (p=0,018, p=0,018, p=0,018 αντίστοιχα), σε εθελόντριες φυσιολογικού βάρους. Τέλος, με το στατιστικό τεστ Mann Whitney U ελέγχθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, όπου δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο παρεμβάσεων (p_{trial}>0,05 για όλες τις χρονικές στιγμές).

Πίνακας 16: Τα επίπεδα IL-6 των εθελοντριών φυσιολογικού βάρους (ΔΜΣ<25kg/m^2) στις δύο παρεμβάσεις

Χρονική στιγμή	Π	60’	120’	180’	240’	300’	p_{time}
Placebo IL-6(pg/ml)	0,65 (0,03-1,80)	0,96* (0,04-2,48)	1,13* (0,77-2,38)	2,05* (0,98-2,70)	2,57* (0,79-3,92)	1,64 (0,53-2,68)	**0,074**
Εκχύλισμα IL-6(pg/ml)	0,66 (0,03-0,86)	0,84 (0,07-1,01)	0,93* (0,74-1,91)	1,06 (0,92-1,55)	1,74* (0,86-3,06)	1,80* (1,12-2,29)	**0,000**
p_{trial}	0,846	0,655	0,406	0,141	0,668	0,886	

*Τα δεδομένα εκφράζοναι ως διάμεσοι (25° και 75° τεταρτημόριο), *ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, ptime: Η επίδραση του χρόνου (within group)*

εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman test. Η σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών συγκριτικά με το baseline (Π) (p<0,05), υπολογίστηκε με τον στατιστικό έλεγχο Wilcoxon test.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται η % μεταβολή των επιπέδων IL-6 για τις εθελόντριες με φυσιολογικό σωματικό βάρος (ΔΜΣ<25kg/m^2). Αρχικά με τη χρήση του Test Friedman πραγματοποιήθηκε έλεγχος αν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές αναφορικά με τα επίπεδα % μεταβολής της IL-6, στον χρόνο σε κάθε παρέμβαση. Έτσι λοιπόν, φάνηκε ότι υπήρχαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων IL-6 μόνο στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων (p=0,000) και όχι στην παρέμβαση με το placebo (p=0,074>0.05). Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του τεστ Willcoxon παρατηρήθηκε ότι στην παρέμβαση με το placebo αυξήθηκαν τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 60’, 120’, 180’ και 240’ (p=0,028, p=0,028, p=0,028, p=0,028 αντίστοιχα). Στην παρέμβαση με το εκχύλισμα των στέμφυλων, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 120’, 180’, 240’και 300’ (p=0,018, p=0,043, p=0,018 και p=0,018 αντίστοιχα), σε εθελόντριες φυσιολογικού βάρους. Τέλος, με το στατιστικό τεστ Mann Whitney U ελέγχθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, όπου δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο παρεμβάσεων (p_{trial}>0,05 για όλες τις χρονικές στιγμές).

Πίνακας 17: % Μεταβολή επιπέδων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις σε φυσιολογικού βάρους εθελόντριες (ΔΜΣ<25kg/m^2)

Χρονική στιγμή	Π	60’	120’	180’	240’	300’	p_{time}
Placebo %IL-6	100	146,67* (103,77-242,57)	364,26* (146,97-1303,33)	413,50* (145,54-3260,00)	376,44* (256,17-4281,67)	218,93 (88,67-6869,17)	**0,074**
Εκχύλισμα %IL-6	100	154,34 (62,03-230,00)	189,87* (119,32-2473,33)	405,02* (120,97-3060,00)	333,52* (238,93-2876,67)	308,68* (154,61-3880,00)	**0,000**
p_{trial}	1	0,482	0,749	0,655	1,000	0,475	

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως διάμεσοι της ποσοστιαίας μεταβολής της IL-6 σε σχέση με την IL-6 τη χρονική στιγμή Π, (25° και 75° τεταρτημόριο), *ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, ptime: Η επίδραση του χρόνου (within group) εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman test. Η σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών συγκριτικά με το baseline (Π) (p<0,05), υπολογίστηκε με τον στατιστικό έλεγχο Wilcoxon test.*

6.7 Η επίδραση των παρεμβάσεων στα επίπεδα και στην % μεταβολή της IL-6 σε υπέρβαρες εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα επίπεδα IL-6 για τις εθελόντριες αυξημένου σωματικού βάρους (ΔΜΣ>25kg/m^2). Αρχικά με τη χρήση του Test Friedman πραγματοποιήθηκε έλεγχος αν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές αναφορικά με τα επίπεδα IL-6, στον χρόνο σε κάθε παρέμβαση. Έτσι λοιπόν, φάνηκε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές των επιπέδων IL-6 μόνο στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων (p=0,028) και όχι στην παρέμβαση με το placebo (p=0,065>0.05), στις εθελόντριες με ΔΜΣ>25kg/m^2. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του τεστ Willcoxon παρατηρήθηκε ότι στην παρέμβαση με το placebo αυξήθηκαν τα επίπεδα της IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 120', 180', 240' και 300' (p=0,028, p=0,046, p=0,028, p=0,046 αντίστοιχα). Στην παρέμβαση με το εκχύλισμα των στέμφυλων, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 120', 240'και 300' (p=0,046, p=0,046, p=0,046 αντίστοιχα), σε υπέρβαρες εθελόντριες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των % επιπέδων IL-6 ανάμεσα στις δύο παρεμβάσεις τις ίδιες χρονικές στιγμές, με το τεστ Mann Whitney U, το οποίο έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων οποιαδήποτε χρονική στιγμή (p_{trial}>0,05 σε όλες τις χρονικές στιγμές).

Πίνακας 18: Τα επίπεδα IL-6 σε υπέρβαρες εθελόντριες και στις δύο παρεμβάσεις

Χρονική στιγμή	Π	60'	120'	180'	240'	300'	p_{time}
Placebo IL-6(pg/ml)	0,32 (0,20-0,47)	0,59 (0,20-1,65)	0,69* (0,41-1,24)	0,86* (0,50-1,32)	1,26* (0,67-1,86)	0,94* (0,57-1,86)	**0,065**
Εκχύλισμα Il-6(pg/ml)	0,26 (0,13-0,78)	0,58 (0,32-1,48)	1,28* (0,33-2,38)	1,31 (0,89-1,56)	1,48* (1,16-1,97)	1,51* (1,41-2,16)	**0,028**
p_{trial}	0,749	1	0,423	0,200	0,631	0,128	

*Τα δεδομένα εκφράζοναι ως διάμεσοι (25° και 75° τεταρτημόριο), *ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, ptime: Η επίδραση του χρόνου (within group)*

εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman test. Η σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών συγκριτικά με το baseline (Π) (p<0,05), υπολογίστηκε με τον στατιστικό έλεγχο Wilcoxon test.

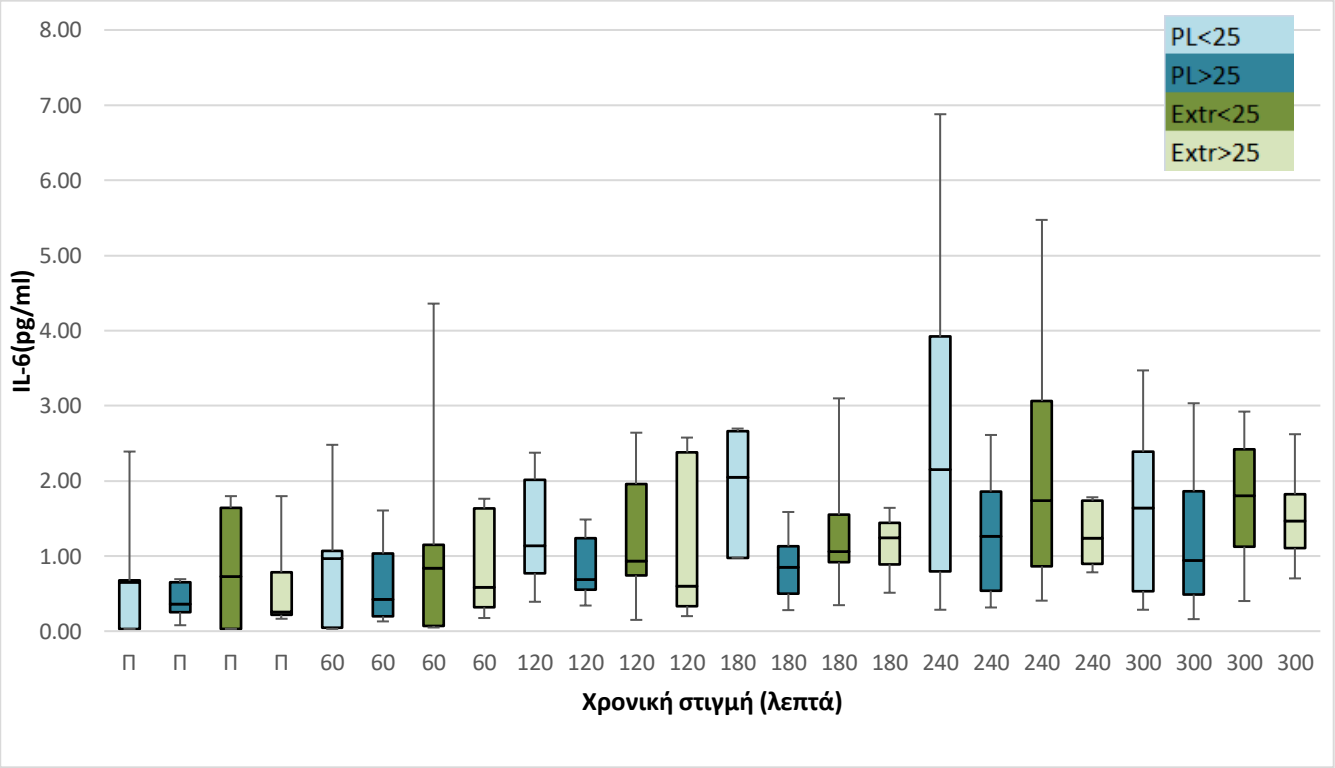
Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται η % μεταβολή των επιπέδων IL-6 για τις εθελόντριες με αυξημένο σωματικό βάρος (ΔΜΣ>25kg/m^2). Αρχικά με τη χρήση του Test Friedman πραγματοποιήθηκε έλεγχος αν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές αναφορικά με τα επίπεδα % μεταβολής της IL-6, στον χρόνο σε κάθε παρέμβαση. Έτσι λοιπόν, φάνηκε ότι υπήρχαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων IL-6 μόνο στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων (p=0,028) και όχι στην παρέμβαση με το placebo (p=0,065>0.05). Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του τεστ Willcoxon παρατηρήθηκε ότι στην παρέμβαση με το placebo αυξήθηκαν τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 120', 180', 240' και 300' (p=0,028, p=0,046, p=0,028, p=0,046 αντίστοιχα). Στην παρέμβαση με το εκχύλισμα των στέμφυλων, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα IL-6 σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα στις εξής χρονικές στιγμές: 120', 180', 240'και 300' (p=0,046, p=0,046, p=0,046 και p=0,046 αντίστοιχα), σε υπέρβαρες εθελόντριες. Τέλος, με το στατιστικό τεστ Mann Whitney U ελέγχθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα IL-6 μεταξύ των δύο παρεμβάσεων σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, όπου δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο παρεμβάσεων (p_{trial}>0,05 για όλες τις χρονικές στιγμές).

Πίνακας 19: % Μεταβολή επιπέδων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις σε υπέρβαρες εθελόντριες

Χρονική στιγμή	Π	60'	120'	180'	240'	300'	p_{time}
Placebo %IL-6	100	200,15 (90,41-487,82)	205,30* (152,57-482,68)	236,54* (160,26-627,38)	323,70* (199,46-1122,75)	259,53* (172,33-1183,85)	**0,065**
Εκχύλισμα %IL-6	100	149,64 (83,90-1414,55)	199,93* (127,51-2160,83)	515,38* (108,76-1736,74)	590,69* (180,85-2673,86)	690,73* (269,01-2429,39)	**0,028**
p_{trial}	1	1	0,873	0,522	0,522	0,150	

*Τα δεδομένα εκφράζονται ως διάμεσοι της ποσοστιαίας μεταβολής της IL-6 σε σχέση με την IL-6 τη χρονική στιγμή Π, (25° και 75° τεταρτημόριο), *ptrial: Σύγκριση μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney, ptime: Η επίδραση του χρόνου (within group) εξετάσθηκε με τον στατιστικό έλεγχο Friedman test. Η σύγκριση των διαφορετικών χρονικών στιγμών συγκριτικά με το baseline (Π) (p<0,05), υπολογίστηκε με τον στατιστικό έλεγχο Wilcoxon test.*

Τέλος, με τον στατιστικό έλεγχο Mann Whitney U φαίνεται ότι η ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων IL-6 ανάμεσα στις νορμοβαρείς και υπέρβαρες εθελόντριες δεν διαφοροποιείται ούτε στο εικονικό εκχύλισμα αλλά ούτε στο εκχύλισμα στέμφυλων. Αντιθέτως, όταν ελέγχθηκε πάλι με τον στατιστικό έλεγχο Mann Whitney U η απόλυτη τιμή των επιπέδων IL-6 ανάμεσα στις νορμοβαρείς και υπέρβαρες εθελόντριες, φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων IL-6 στη χρονική στιγμή 180’ (p=0,022) μετά τη λήψη του εικονικού σκευάσματος, ενώ καμία διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων. Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα της μεταβολής των συγκεντρώσεων IL-6 και για τις δύο παρεμβάσεις στις νορμοβαρείς (ΔΜΣ<25kg/m^2) και υπέρβαρες (ΔΜΣ>25kg/m^2) εθελόντριες σε σχέση με το χρόνο.



Σχήμα 3:Μεταβολή συγκεντρώσεων IL-6 και στις δύο παρεμβάσεις για ΔΜΣ<25kg/m^2 και ΔΜΣ>25kg/m^2

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου στις χώρες του Δυτικού κόσμου, με τις βασικές εκδηλώσεις τους να είναι τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και η καρδιακή προσβολή. Οι εκδηλώσεις αυτές εκπροσωπεύουν την κλινική έκβαση της αθηροσκλήρωσης, μία συστηματική αγγειακή διαδικασία που μπορεί να θεωρηθεί σαν έναν τύπο χρόνια φλεγμονής. Πληθώρα μελετών υποστηρίζουν ότι η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η θρόμβωση αποτελούν τους σημαντικότερους μηχανισμούς για την εγκαθίδρυση και την μετέπειτα εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας [3].

Επιπρόσθετα, ο μεταγευματικός δυσμεταβολισμός (υπέρμετρη αύξηση των επιπέδων τριγλυκεριδίων και γλυκόζης στο μεταγευματικό στάδιο) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων, ακόμα και σε άτομα που δεν είναι διαβητικά [89]. Τόσο η μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία όσο και η μεταγευματική υπεργλυκαιμία μπορούν να προσκαλέσουν βλάβη αγγειακού τοιχώματος μέσω ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, που αποτελεί το 1° στάδιο έναρξης της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης και συνεπώς των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πολλές μελέτες συνηγορούν στο γεγονός ότι η πολύπλοκη μεταγευματική κατάσταση και τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων πλάσματος αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης αθηρωματικής νόσου και καρδιαγγειακών συμβαμάτων , για το λόγο ότι σε αυτό το στάδιο διεγείρεται το οξειδωτικό στρες και φλεγμονώδεις διαδικασίες [87]. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία οφείλεται σε ένα ποσοστό, στη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα μονοξειδίου του αζώτου (NO), που οδηγεί σε εξασθένιση της αγγειοδιαστολής του ενδοθηλίου. Αξίζει να αναφερθεί ότι, τόσο η μεταγευματική δυσλιπιδαιμία όσο και η μεταγευματική υπεργλυκαιμία χωριστά έχουν ανεξάρτητη επιβλαβή δράση σε δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας, αλλά και συνεργιστικά.

Δεδομένου ότι υπάρχει ανάγκη για καταπολέμηση των φλεγμονωδών διαδικασιών αυτών, που προκαλούνται κατά το μεταγευματικό στάδιο, αναδύονται τα οφέλη από πολυάριθμες μελέτες για την μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (≤ 2ποτά/ημέρα για άνδρες και ≤ 1 ποτό/ημέρα για γυναίκες), και πιο συγκεκριμένα λευκού και κόκκινου κρασιού. Αυτές

οι μελέτες έχουν αναδείξει ότι η πρόσληψη κόκκινου κρασιού έχει συσχετιστεί αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του κρασιού, έχουν αποδοθεί κυρίως στην παρουσία πληθώρας φαινολικών ενώσεων, όπως η ρεσβερατρόλη, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η ανθοκυανίνη και η κερκετίνη, καθώς και κλασικών φώσφο- και γλυκο-λιποειδών [111] . Οι μηχανισμοί δράσης δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο γνωρίζουμε ότι λαμβάνουν χώρα αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ, μειώνεται η αντίσταση στην ινσουλίνη, μειώνεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και το οξειδωτικό στρες [135]. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτες in vivo σε υγιείς άνδρες εθελοντές φάνηκε ότι η κατανάλωση κρασιού παράλληλα με ένα γεύμα μειώνει μεταγευματικά την επαγόμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τη δραστικότητα των ενζύμων βιοσύνθεσης του PAF καθώς και τα επίπεδα IL-6 σε υγιείς άντρες εθελοντές [206, 208].

Ωστόσο, η κατανάλωση κρασιού δεν πρέπει να γίνεται σε υπέρμετρο βαθμό λόγω της παρουσίας της αιθανόλης που έχει και επιβλαβή δράση για τον οργανισμό. Αντιθέτως, τα υπο-προϊόντα οινοποίησης αποτελούν πηγή μικροσυστατικών παρόμοιων με αυτά που ανιχνεύονται στο κρασί, καθιστώντας τα ιδανικά για τον εμπλουτισμό τροφίμων καθώς στερούνται αιθανόλης. Τα υπο-προϊόντα οινοποίησης αποτελούν επίσης και καλή πηγή φυτικών ινών, που συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτης της ερευνητικής μας ομάδα, των Choleva και συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2019, εξετάστηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση του εκχυλίσματος in vitro που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και βρέθηκε ότι το εκχύλισμα στέμφυλων, μπορούσε να αναστείλει αποτελεσματικά τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και είχε αντιοξειδωτικές ιδιότητες [147].

Αφορμώμενοι, λοιπόν, από τα θετικά αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας in vitro, στη παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση in vivo του εκχυλίσματος στέμφυλων, στην ικανότητα μείωσης των επιπέδων της προφλεμονώδης κυτταροκίνης, ιντερλευκίνη-6 (IL-6), σε μεταγευματικό στάδιο σε φαινομενικά υγιή γυναικείο πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, οι εθελόντριες κατανάλωσαν ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος, είτε μαζί με κάψουλες που περιείχαν το εκχύλισμα στέμφυλων (660mg συνολικών φαινολικών συστατικών) είτε μαζί με εικονικές κάψουλες (placebo) που είχαν μαλτοδεξτρίνη. Οι

εθελόντριες κατανάλωσαν ένα γεύμα 1131kcal αποτελούμενο από 32γρ. πρωτεΐνης (11,1%), 55γρ. υδατανθράκων (19,7%) και 84γρ. λίπους (66,7%), με το μεγαλύτερο ποσοστό να είναι κορεσμένο λίπος (βούτυρο).

Για την εκτίμηση των φλεγμονωδών δεικτών μεταγευματικά μετρήθηκαν τα επίπεδα ιντερλευκίνης 6 (IL-6) στο πλάσμα αίματος των εθελοντριών. Αξίζει να αναφερθεί, ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις IL-6, της παρούσας μελέτης βρέθηκε στα 0,26-0,32pg/ml πλάσματος. Αυτές οι συγκεντρώσεις φαίνεται να συνηγορούν και με άλλες μελέτες , όπως στη μελέτη Peluso και συνεργατών του, που δημοσιεύτηκε το 2012, με αρχικές τιμές IL-6 σε υγιείς υπέρβαρους εθελοντές με μέση τιμή 0.39±0.27pg IL-6/ml πλάσματος [209], στη μελέτη Arjunan και συνεργατών του με αρχικές τιμές IL-6 , σε υγιείς άνδρες με μέσο όρο ηλικίας 22 έτη και ΔΜΣ=22,7± 2,2kg/m^2, 0,34pg/ml(0,21-0,55) [210], καθώς και στη μελέτη Sanders και συνεργατών, στην οποία συμμετείχαν 50 υγιείς άνδρες και γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 24 έτη και ΔΜΣ=23,3±3,4kg/m^2, με αρχικές τιμές IL-6 πλάσματος 0,4±0,1pg/ml [211]. Παρόλο αυτά, υπάρχουν και μελέτες που εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα IL-6 σε σχέση με αυτά που εμφανίζονται στην παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη του Gill και συνεργατών του (2003), οι αρχικές τιμές IL-6 νηστείας ανέρχονται στα 1,34±1,16pg/ml σε 8 υγιείς νορμοβαρείς άνδρες με μέσο όρο ηλικία 27±12 έτη [212], στη μελέτη της Kracmerova και συνεργατών το 2014, τα επίπεδα IL-6 ανιχνεύονται στα 0,899±0,509pg/ml σε 10 υγιείς, νορμοβαρείς άνδρες με μέσο όρο ηλικία 26,1±1,04 [213] , και τέλος, στη μελέτη του Wood και συνεργατών του, το 2011, τα επίπεδα IL-6 νηστείας ανέρχονται στα 0,8±0,2pg/ml σε 21 νορμοβαρείς εθελοντές, άντρες και γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας τα 49,6±4,6 έτη [214]. Τα υψηλότερα επίπεδα IL-6 στις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, πιθανότατα οφείλονται στο γεγονός ότι το δείγμα ήταν τις περισσότερες φορές ανδρικός πληθυσμός καθώς και άτομα με υψηλότερο μέσο όρο ηλικίας, σε σχέση με το δείγμα της παρούσας μελέτης.

Όσον αφορά, την μεταγευματική επίδραση του γεύματος (>60% λίπος), τόσο στην παρέμβαση placebo όσο και στην παρέμβαση με το εκχύλισμα στέμφυλων, φάνηκε ότι αύξησε σημαντικά ($p<0,05$) τα επίπεδα IL-6 σε όλες τις εθελόντριες που ολοκλήρωσαν και τις δύο παρεμβάσεις. Μόλις πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων IL-6 κάθε χρονικών

στιγμών με τα επίπεδα στην αρχή της παρέμβασης, βρέθηκε αύξηση των επιπέδων IL-6 σε όλες τις χρονικές στιγμές και στις δύο παρεμβάσεις (εκτός από τη χρονική στιγμή 60' της παρέμβασης με το εκχύλισμα, όπου p=0,173>0,05), καθώς και αύξηση της ποσοστιαίας μεταβολής σε όλες τις χρονικές στιγμές και στις δύο παρεμβάσεις (p<0,05). Τα αποτελέσματα αυτά της παρούσας μελέτης έρχονται σε πλήρη συμφωνία και με άλλες μελέτες της βιβλιογραφίας που συνηγορούν στην αύξηση φλεγμονωδών δεικτών, και συγκεκριμένα της IL-6, μετά την κατανάλωση λιπαρού γεύματος. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη του Gill και συνεργατών, που δημοσιεύτηκε το 2003, συμμετείχαν 8 υγιείς, νορμοβαρείς άνδρες με μέσο όρο ηλικίας 27,8±12,1 και ΔΜΣ=23,6±1kg/m^2, οι οποίοι κατανάλωσαν γεύμα 1075kcal που περιείχε 80γρ. λίπος (67% της συνολικής ενέργειας), 80γρ. υδατανθράκων και 11,4γρ. πρωτεΐνης, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων IL-6 (από αρχικά επίπεδα 1,34±1,16pg/ml→ 6,93±5,77pg/ml στις) στις 4 και 6 ώρες (p<0,05) [212]. Η αύξηση της IL-6, έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μεταγευματικές μελέτες με χαμηλότερο, ωστόσο, ποσοστό λίπους στο γεύμα. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Kracmerova και συνεργατών (2014), 10 υγιείς, νορμοβαρείς άνδρες με μέσο όρο ηλικίας 26,3±1,04 και ΔΜΣ=23,11±0,59kg/m^2, κατανάλωσαν γεύμα 1470kcal αποτελούμενο από 47% λίπος, 32,8% υδατάνθρακες και 11,3% πρωτεΐνη, και βρέθηκε ότι τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών, και συγκεκριμένα της IL-6, αυξήθηκαν μεταγευματικά από 0,899±0,509pg/ml→ 2,168±0,44pg/ml (μέγιστη τιμή) στις 4 ώρες [213]. Μία επιπλέον μελέτη με παρόμοια αποτελέσματα, είναι η μελέτη του Wood και συνεργατών του (2011), όπου 21 υγιείς, νορμοβαρείς άνδρες και γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 49,6±4,6 έτη και ΔΜΣ=24±0,7kg/m^2, κατανάλωσαν γεύμα 919kcal αποτελούμενο από 49% λίπος, 33% υδατάνθρακες και 18% πρωτεΐνη, και βρέθηκε ότι τα επίπεδα IL-6 αυξήθηκαν σημαντικά στο μεταγευματικό στάδιο από 0,8±0,2pg/ml→1,1±4,4pg/ml [214].

Συγκρίνοντας τώρα το μεταβολικό προφίλ και τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών, και συγκεκριμένα της IL-6, μετά την κατανάλωση γεύματος πλούσιο σε λίπος σε νορμοβαρή, υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα, οι περισσότερες μελέτες συνηγορούν στο γεγονός ότι οι τιμές φλεγμονωδών δεικτών προγευματικά αλλά και μεταγευματικά στα παχύσαρκα άτομα κυμαίνονται σε υψηλότερα επίπεδα. Χαρακτηριστικά, μία διασταυρούμενη κλινική δοκιμή του Manning και των συνεργατών του, όπου συμμετείχαν 15 παχύσαρκες γυναίκες (ηλικίας 54±9 έτη, ΔΜΣ=37,3±5,5kg/m^2) και 14 νορμοβαρείς

γυναίκες (ηλικία 53±10 έτη), ΔΜΣ=22,9±1,9kg/m^2) κατανάλωσαν γεύμα πλούσιο σε κορεσμένο λίπος και πραγματοποιήθηκε αιμοληψία έως και 6 ώρες μεταγευματικά. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι παχύσαρκες εθελόντριες είχαν υψηλότερα προγευματικά επίπεδα IL-6 από τις νορμοβαρείς εθελόντριες καθώς και υψηλότερα μεταγευματικά επίπεδα IL-6 στις 4 ώρες σε σχέση με τις νορμοβαρείς εθελόντριες [215]. Αντίθετα αποτελέσματα φαίνονται από τη μελέτη του Phillips και συνεργατών του, όπου αξιολογήθηκε η μεταγευματική επίδραση λιπαρού γεύματος σε άνδρες νορμοβαρείς, παχύσαρκους και με σακχαρώδη διαβήτη τύπου ΙΙ και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων IL-6 μεταγευματικά στους νορμοβαρείς και μείωση των επιπέδων στην ομάδα με το σακχαρώδη διαβήτη ΙΙ [216]. Σε παρόμοια πλαίσια, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη του Schwander και συνεργατών του, όπου συμμετείχαν 19 νορμοβαρείς και 18 παχύσαρκοι άνδρες και κατανάλωσαν γεύματα 500kcal, 1000kcal και 1500kcal (60,5% λίπος), αναδεικνύοντας μία σχέση δόσης γεύματος και φλεγμονώδης απάντησης. Πιο συγκεκριμένα, οι παχύσαρκοι εθελοντές εμφάνιζαν υψηλότερες τιμές IL-6 σε σχέση με τους νορμοβαρείς, μόνο στο γεύμα 1500kcal, και όχι στα υπόλοιπα γεύματα όπου δεν είχαν καμία διαφοροποίηση στα επίπεδα IL-6 [217].

Όσον αφορά το εκχύλισμα στέμφυλων, στη παρούσα μελέτη δεν φάνηκε καμία επίδραση μεταγευματικά στις εθελόντριες. Παρόλο που τα in vitro αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, δεν υπάρχουν μελέτες in vivo που να εξετάζουν την αντιφλεγμονώδη ικανότητα υπο-προϊόντων οινοποίησης σε μεταγευματικό στάδιο. Στο πλαίσιο αυτό, των in-vitro δεδομένων, μελέτη της δικής μας ερευνητικής ομάδας εξέτασε την αντιαιμοπεταλιακή και αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος στέμφυλων, που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη, σε διαφορετικούς διαλύτες, με την αιθανόλη να αναδεικνύεται ο καταλληλότερος διαλύτης [147].

Αποτελέσματα άλλων μελετών που διερευνούν την μεταγευματική επίδραση μεμονομένων φαινολικών συστατικών όπως η ρεσβερατρόλη, οι κατεχίνες κτλ., δηλαδή συστατικά που βρίσκονται και στο συμπλήρωμα στέμφυλων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, αναδεικνύουν διαφορετικά αποτελέσματα επίδρασης μεταγευματικά. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη Ghanim και συνεργατών του, φάνηκε ότι η κατανάλωση

συμπληρώματος ρεσβερατρόλης (100mg ρεσβερατρόλης+75γρ. φαινολικών συστατικών από εκχύλισμα σταφυλιών) σε 10 υγιείς, νορμοβαρείς εθελοντές (Α:4, Γ:6),με μέσο όρο ηλικίας 37±4 έτη, παράλληλα με ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος (950kcal) μπορεί να μείωσει τα επίπεδα φλεγμονής και συγκεκριμένα φάνηκε ότι μειώνονται τα επίπεδα IL-1β[218]. Σε παρόμοια αποτελέσματα συνηγορεί και η μελέτη Di Renzo και συνεργατών (2015), όπου δόθηκε κόκκινο κρασί εμπλουτισμένο με ρεσβερατρόλη παράλληλα με ένα λιπαρό γεύμα (55% λίπος, 1144kcal) σε 30 υγιείς εθελοντές, ηλικίας 26-47 ετών, φάνηκε ότι οδηγεί σε σημαντική μείωση της oxLDL στην ομάδα που κατανάλωσε γεύμα+κρασί σε σχέση με την ομάδα που κατανάλωσε μόνο το γεύμα. Παρατηρήθηκε, επίσης, μείωση και άλλων φλεγμονωδών δεικτών όπως IL-6 και μείωση έκφρασης MCP-1 (χημειοτακτική πρωτεϊνη μονοκυττάρων-1), υποδεικνύοντας μείωση του φλεγμονωδούς προφίλ των εθελοντών μεταγευματικά [204]. Σε άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε σκόνη από καφέ (πλούσιο σε κατεχίνες) σε 18 εθελοντές με ΣΔ τύπου ΙΙ, φάνηκε ότι καταναλώνοντας ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος (766kcal, 59% λίπος, 26γρ. υδατάνθρακες και 16% πρωτεΐνη) μαζί με 20γρ. σκόνης κακάου (που αποδίδουν 40mg επικατεχίνης), μειώνεται η μεταγευματική φλεγμονή και πιο συγκεκριμένα μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα της IL-18 στις 6 ώρες, αναδεικνύοντας έτσι την ευεργετική επίδραση των κατεχινών που περιέχονται στο κακάο [219].

8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Ωστόσο η παρούσα διασταυρούμενη διπλά τυφλή ελεγχόμενη μεταγευματική κλινική δοκιμή, περιείχε δείγμα μόνο υγιών γυναικών αναπαραγωγικής ηλικία (27±3 έτη), γεγονός που καθίσταται ένας βασικός περιορισμός της μελέτης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα δε θα μπορούσαν να γενικευτούν στον γενικό πληθυσμό.

Επιπλέον, η μεταγευματική επίδραση του εκχυλίσματος στέμφυλων σε δείκτες φλεγμονής πιθανότατα να ήταν διαφορετική αν το δείγμα των εθελοντριών μας είχε κάποια παθολογική κατάσταση που να χαρακτηρίζεται από αυξημένο επίπεδο φλεγμονής, όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, καρδιαγγειακά νοσήματα κτλ. Παρόλο αυτά, επειδή ήταν η πρώτη κλινική δοκιμή που εξετάζει το συγκεκριμένο εκχύλισμα ήταν πιο ασφαλές να χορηγηθεί σε πρώτη φάση σε υγιή πληθυσμό.

Ένας επιπλέον περιορισμός της μελέτης μας, αποτελεί το γεγονός ότι στην παρούσα μεταγευματική μελέτη αξιολογήθηκε μόνο μία δόση από το εκχύλισμα στέμφυλων και δεν αξιολογήθηκε αν διαφορετική (ενδεχομένως μεγαλύτερη) δοσολογία θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα. Ωστόσο, αυτό θα ήταν αρκετά δύσκολο καθώς ήδη το παρόν πρωτόκολλο είναι αρκετά απαιτητικό και ο κάθε εθελοντής επαναλαμβάνει τουλάχιστον δύο φορές από δώδεκα αιμοληψίες σε χρονικό εύρος 6 ωρών. Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα στην παρούσα εργασία αφορούν ένα μέρος μόνο της μεταγευματικής αυτής κλινικής δοκιμής, που βρίσκεται σε εξέλιξη, και επομένως δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή και γενικά συμπεράσματα.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η κατανάλωση εκχυλίσματος στέμφυλων παράλληλα με ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος (>60%), φάνηκε ότι δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα IL-6 μεταγευματικά σε καμία χρονική στιγμή έως και 6 ώρες μετά, σε νέες φαινομενικά υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, νορμοβαρείς και υπέρβαρες. Ωστόσο, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα καθώς η κλινική δοκιμή βρίσκεται ακόμα υπό-εξέλιξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *European Crdiovascular Disease Statistics 2017 edition* European Heart Network 2017.
2. WHO, *Cardiovascular diseases (CVDs).* 2015.
3. Ζαμπέλας, Α., *Κλινική διαιτολογία και διατροφή σε στοιχεία παθολογίας.* 2007: p. 240-241.
4. Γουδέβενος Ι, Π.Α., *Παθοφυσιολογία Κυκλοφορικού συστήματος Από : Βασικές αρχές Παθοφυσιολογίας* Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας 1991: p. 209-64.
5. Λεμπιδάκης Δημήτρης, Λ.Μ., Χαμηλός Μιχάλης, Σκαλίδης Εμμανουήλ., *ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.* ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΙΑ (Hellenic Society of Cardiology).
6. WHO, *Cardiovascular diseases (CVDs).* World Health Organisation 2017.
7. WHO, *Cardiovascular diseases (CVDs).*
8. WHO, *Global Health Observatory Data (GHO).* 2017.
9. *European Cardiovascular Disease Statistics* European Society of Cardiology, 2012
10. Panagiotakos, D.B., et al., *Five-year incidence of cardiovascular disease and its predictors in Greece: the ATTICA study.* Vasc Med, 2008. **13**(2): p. 113-21.
11. WHO, *CVD Risk factors.* 2002.
12. Stephen J. McPhee, M., *Pathophysiology of Disease* Appleton & Lange 2009: p. 393-394.
13. Group, E.U.C.C.S., et al., *Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes.* Eur Heart J, 2016. **37**(1): p. 24-34.
14. Association, A.D., *Cardiovascular Disease Risk Factors* 2018.
15. Chaturvedi, N., *Ethnic differences in cardiovascular disease.* Heart, 2003. **89**(6): p. 681-6.
16. Yiu, K.H., et al., *Ethnic differences in cardiovascular risk in rheumatic disease: focus on Asians.* Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(10): p. 609-18.
17. -BHF, B.H.F., *Risk factors of vardiovascular diseases*
18. Psaltopoulou, T., et al., *Socioeconomic status and risk factors for cardiovascular disease: Impact of dietary mediators.* Hellenic J Cardiol, 2017. **58**(1): p. 32-42.
19. Timmis, A., et al., *European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019.* Eur Heart J, 2020. **41**(1): p. 12-85.
20. Federation, I.D., *Care and Prevention Cardiovascular Disease* 2020.
21. Foundation, B.H., *Diabetes - Causes, symptoms & treatments.* 2017.
22. Federation, W.H., *Risk Factors Cardiovascular Diseases-Fact Sheets* 2017
23. Wadhera, R.K., et al., *A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality.* J Clin Lipidol, 2016. **10**(3): p. 472-89.
24. AHA, A.H.A., *Understand Your Risks to Prevent a Heart Attack.* 2016.
25. Umer, A., et al., *Childhood obesity and adult cardiovascular disease risk factors: a systematic review with meta-analysis.* BMC Public Health, 2017. **17**(1): p. 683.
26. Ayer, J., et al., *Lifetime risk: childhood obesity and cardiovascular risk.* Eur Heart J, 2015. **36**(22): p. 1371-6.
27. WHO , W.H.O., *Obesity and overweight.* 2020.
28. Keto, J., et al., *Cardiovascular disease risk factors in relation to smoking behaviour and history: a population-based cohort study.* Open Heart, 2016. **3**(2): p. e000358.
29. AHA, A.H.A. and A.S.A. ASA, *What Are You Smoking?*

Smoking and Cardiovascular Disease (CVD) 2007.

30. Hackshaw, A., et al., *Low cigarette consumption and risk of coronary heart disease and stroke: meta-analysis of 141 cohort studies in 55 study reports.* BMJ, 2018. **360**: p. j5855.
31. Schmid, H.H., L.L. Jones, and H.K. Mangold, *Detection and isolation of minor lipid constituents.* J Lipid Res, 1967. **8**(6): p. 692-3.

32. Bijnen, F.C., C.J. Caspersen, and W.L. Mosterd, *Physical inactivity as a risk factor for coronary heart disease: a WHO and International Society and Federation of Cardiology position statement.* Bull World Health Organ, 1994. **72**(1): p. 1-4.
33. *Physical activity guidelines for Americans.* Okla Nurse, 2008. **53**(4): p. 25.
34. Libby, P., et al., *Atherosclerosis.* Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 56.
35. Vander AJ, S.J., Luciano DS, Geladas N, Tsakopoulos M., *Φυσιολογία του Ανθρώπου-Μηχανισμοί Λειτουργίας του οργανισμού.* Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2001.
36. Μελιδώνης, Α., *Καρδιομεταβολικός κίνδυνος.* Ιατρικές εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, 2007: p. σελ. 29.
37. Pugsley, M.K. and R. Tabrizchi, *The vascular system. An overview of structure and function.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(2): p. 333-40.
38. Η. Ευθυμίου, Μ.Μ., *Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2* Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 19,4 2006.
39. Galley, H.F. and N.R. Webster, *Physiology of the endothelium.* Br J Anaesth, 2004. **93**(1): p. 105-13.
40. Sena, C.M., A.M. Pereira, and R. Seica, *Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(12): p. 2216-31.
41. Favero, G., et al., *Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 801896.
42. Endemann, D.H. and E.L. Schiffrin, *Endothelial dysfunction.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 1983-92.
43. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance.* Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
44. Yang, Z. and X.F. Ming, *Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis.* Clin Med Res, 2006. **4**(1): p. 53-65.
45. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis.* Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
46. Semenkovich, C.F., *Insulin resistance and atherosclerosis.* J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1813-22.
47. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
48. Demopoulos CA, K.H., Antonopoulou S., *Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories.* Eur J Lipid Sci Technol, 2003. **105:705–716**.
49. Hwang, S.J., et al., *Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study.* Circulation, 1997. **96**(12): p. 4219-25.
50. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
51. Li, A.C. and C.K. Glass, *PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis.* J Lipid Res, 2004. **45**(12): p. 2161-73.
52. Rafieian-Kopaei, M., et al., *Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes.* Int J Prev Med, 2014. **5**(8): p. 927-46.
53. Paoletti, R., A.M. Gotto, Jr., and D.P. Hajjar, *Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy.* Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III20-6.
54. Maseri, A. and V. Fuster, *Is there a vulnerable plaque?* Circulation, 2003. **107**(16): p. 2068-71.
55. Madamanchi, N.R., A. Vendrov, and M.S. Runge, *Oxidative stress and vascular disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 29-38.
56. Libby, P., M. DiCarli, and R. Weissleder, *The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets.* J Nucl Med, 2010. **51 Suppl 1**: p. 33S-37S.

57. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs.* Oncotarget, 2018. **9**(6): p. 7204-7218.
58. Freire, M.O. and T.E. Van Dyke, *Natural resolution of inflammation.* Periodontol 2000, 2013. **63**(1): p. 149-64.
59. Pahwa, R., et al., *Chronic Inflammation*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
60. Minihane, A.M., et al., *Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation.* Br J Nutr, 2015. **114**(7): p. 999-1012.
61. Taleb, S., *Inflammation in atherosclerosis.* Arch Cardiovasc Dis, 2016. **109**(12): p. 708-715.
62. Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress.* Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1147-50.
63. Singh, U. and I. Jialal, *Oxidative stress and atherosclerosis.* Pathophysiology, 2006. **13**(3): p. 129-42.
64. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease.* Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
65. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions.* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
66. Vogiatzi, G., D. Tousoulis, and C. Stefanadis, *The role of oxidative stress in atherosclerosis.* Hellenic J Cardiol, 2009. **50**(5): p. 402-9.
67. Kattoor, A.J., et al., *Oxidative Stress in Atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2017. **19**(11): p. 42.
68. Otsuka, F., et al., *Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis.* Cardiovasc Diagn Ther, 2016. **6**(4): p. 396-408.
69. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis.* Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
70. VANDER, A.J., SHERMAN, J. H. & LUCIANO, D. S., *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function.* McGraw-Hill, 2001.
71. Chapin, J.C. and K.A. Hajjar, *Fibrinolysis and the control of blood coagulation.* Blood Rev, 2015. **29**(1): p. 17-24.
72. Libby, P. and P. Theroux, *Pathophysiology of coronary artery disease.* Circulation, 2005. **111**(25): p. 3481-8.
73. Moroni, F., et al., *The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis.* Mediators Inflamm, 2019. **2019**: p. 7434376.
74. Frostegard, J., *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease.* BMC Med, 2013. **11**: p. 117.
75. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
76. Liao, J.K., *Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation.* J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 540-1.
77. Durham, A.L., et al., *Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness.* Cardiovasc Res, 2018. **114**(4): p. 590-600.
78. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 812-9.
79. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
80. Palomo, I., C. Toro, and M. Alarcon, *The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis (Review).* Mol Med Rep, 2008. **1**(2): p. 179-84.
81. Rizvi, A.A., *Inflammation markers as mediators of vasculo-endothelial dysfunction and atherosclerosis in the metabolic syndrome.* Chin Med J (Engl), 2007. **120**(21): p. 1918-24.
82. Sproston, N.R. and J.J. Ashworth, *Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 754.
83. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(10): p. a016295.

84. Christodoulidis, G., et al., *Inflammation in coronary artery disease.* Cardiol Rev, 2014. **22**(6): p. 279-88.
85. Ninio, E., *Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(2): p. 123-31.
86. Capra, V., et al., *Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke.* Med Res Rev, 2013. **33**(2): p. 364-438.
87. Tushuizen, M.E., M. Diamant, and R.J. Heine, *Postprandial dysmetabolism and cardiovascular disease in type 2 diabetes.* Postgrad Med J, 2005. **81**(951): p. 1-6.
88. N., K., *Η κλινική σημασία της μετά φαγητό τριγλυκεριδαιμίας* Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 1996. **13:274-274**.
89. Β., Λ., *Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός* Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 2014. **27:13-26**.
90. Ceriello, A. and E. Motz, *Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(5): p. 816-23.
91. Monnier, L., et al., *Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes.* JAMA, 2006. **295**(14): p. 1681-7.
92. *The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators.* J Clin Epidemiol, 1988. **41**(2): p. 105-14.
93. Lippi, G., et al., *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox".* Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(1): p. 59-70.
94. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.* Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
95. da Luz, P.L. and S.R. Coimbra, *Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms.* Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(9): p. 1275-95.
96. Fuchs, F.D., *Vascular effects of alcoholic beverages: is it only alcohol that matters?* Hypertension, 2005. **45**(5): p. 851-2.
97. Schnohr, P., et al., *[The Copenhagen City Heart Study. A prospective cardiovascular population study of 20,000 men and women].* Ugeskr Laeger, 1977. **139**(32): p. 1921-3.
98. Fragopoulou, E., et al., *Biological activity of total lipids from red and white wine/must.* J Agric Food Chem, 2001. **49**(11): p. 5186-93.
99. Cordova, A.C., et al., *The cardiovascular protective effect of red wine.* J Am Coll Surg, 2005. **200**(3): p. 428-39.
100. Arranz, S., et al., *Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer.* Nutrients, 2012. **4**(7): p. 759-81.
101. Goldberg, D.M., et al., *Wine: does the colour count?* Clin Chim Acta, 1996. **246**(1-2): p. 183-93.
102. Gronbaek, M., et al., *Type of alcohol and drinking pattern in 56, 970 Danish men and women.* Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(2): p. 174-6.
103. Soleas, G.J., E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg, *Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention.* J Clin Lab Anal, 1997. **11**(5): p. 287-313.
104. McDonald, M.S., et al., *Survey of the Free and Conjugated Myricetin and Quercetin Content of Red Wines of Different Geographical Origins.* J Agric Food Chem, 1998. **46**(2): p. 368-375.
105. Cheynier, V., *Polyphenols in foods are more complex than often thought.* Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 223S-229S.
106. Covas, M.I., et al., *Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans.* Atherosclerosis, 2010. **208**(2): p. 297-304.

107. Scalbert, A., I.T. Johnson, and M. Saltmarsh, *Polyphenols: antioxidants and beyond.* Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 215S-217S.
108. Markoski, M.M., et al., *Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits.* Nutr Metab Insights, 2016. **9**: p. 51-7.
109. Teixeira, A., et al., *Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 15638-78.
110. Lesschaeve, I. and A.C. Noble, *Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences.* Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 330S-335S.
111. E Fragopoulou, C.A.D., S Antonopoulou, *Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox.* International Journal of Wine Research, 2009.
112. Zhang, X.Y., et al., *Dietary Patterns, Alcohol Consumption and Risk of Coronary Heart Disease in Adults: A Meta-Analysis.* Nutrients, 2015. **7**(8): p. 6582-605.
113. Mathews, M.J., L. Liebenberg, and E.H. Mathews, *The mechanism by which moderate alcohol consumption influences coronary heart disease.* Nutr J, 2015. **14**: p. 33.
114. Mukamal, K.J., et al., *Moderate Alcohol Consumption and Chronic Disease: The Case for a Long-Term Trial.* Alcohol Clin Exp Res, 2016. **40**(11): p. 2283-2291.
115. Chiva-Blanch, G., et al., *Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies.* Alcohol Alcohol, 2013. **48**(3): p. 270-7.
116. Sharpe, P.C., et al., *Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis.* QJM, 1995. **88**(2): p. 101-8.
117. Ruf, J.C., *Alcohol, wine and platelet function.* Biol Res, 2004. **37**(2): p. 209-15.
118. FRAGOPOULOU E, D.C., ANTONOPOULOU S., *LIPID MINOR CONSTITUENTS IN WINES. A BIOCHEMICAL APPROACH IN THE FRENCH PARADOX.* INT J WIN RESEARCH 2009;1:131–43.
119. Waterhouse, A.L., *Wine phenolics.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **957**: p. 21-36.
120. Gresele, P., et al., *Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update.* J Nutr Biochem, 2011. **22**(3): p. 201-11.
121. Marianna N. Xanthopoulou, E.F., Konstantia Kalathara, Tzortzis Nomikos, Haralabos C. Karantonis, Smaragdi Antonopoulou, *Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine.* Food Chemistry, 2010.
122. Vilahur, G. and L. Badimon, *Antiplatelet properties of natural products.* Vascul Pharmacol, 2013. **59**(3-4): p. 67-75.
123. Wang, Z., et al., *Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro.* Int J Mol Med, 2002. **9**(1): p. 77-9.
124. Fragopoulou, E., et al., *Separation of biologically active lipids from red wine.* J Agric Food Chem, 2000. **48**(4): p. 1234-8.
125. Beretz, A., et al., *Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin.* Biochem Pharmacol, 1982. **31**(22): p. 3597-600.
126. Fragopoulou, E., S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must.* J Agric Food Chem, 2002. **50**(9): p. 2684-94.
127. Fragopoulou, E., et al., *Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1632**(1-3): p. 90-9.
128. Ευάγγελος, Σ.Η., *Οινολογία.* Επιστήμη και τεχνογνωσία **Τόμος Ι**.
129. Moreno-Arribas, M.V. and M.C. Polo, *Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends.* Crit Rev Food Sci Nutr, 2005. **45**(4): p. 265-86.
130. Αργύρης, Τ.Ν., *Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί* Εκδόσεις Ψύχαλος 1994. **Αθήνα 1994**.
131. C., G., *Handbook of Grape Processing By-Products.* 2017.

132. Fontana, A.R., A. Antoniolli, and R. Bottini, *Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics.* J Agric Food Chem, 2013. **61**(38): p. 8987-9003.
133. Zhu, L., Y. Zhang, and J. Lu, *Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations.* Int J Mol Sci, 2012. **13**(3): p. 3492-510.
134. Bordiga, M., *Valorization of wine making by-products*. xviii, 365 pages.
135. Castaldo, L., et al., *Red Wine Consumption and Cardiovascular Health.* Molecules, 2019. **24**(19).
136. Fernández-Mar MI, M.R., García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E., *Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review.* Food Chem. 2012;130:797–813.
137. Teles, A.S.C., et al., *Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds.* Food Res Int, 2019. **120**: p. 441-448.
138. Diandra Pintac`, T.M., Ljilja Torovic, Dejan Orcic, Ivana Beara, Natasa Simin, Neda Mimica-Dikic, Marija Lesjak *Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace* Industrial Crops & Products 111 (2018) 379-390.
139. Efstathia Kalli, I.L., Pavlos Bouchagier, Petros A. Tarantilis and Efstathia Scotti, *Novel application and industrial exploitation of winery by-products* Bioresour. Bioprocess. (2018) 5:46.
140. Herrero, M., et al., *Optimization of the extraction of antioxidants from Dunaliella salina microalga by pressurized liquids.* J Agric Food Chem, 2006. **54**(15): p. 5597-603.
141. Da Porto C, N.A., *Optimization of the extraction of phenolic compounds from red grape marc (Vitis vinifera L.) using response surface methodology* J Wine Res 29:26-36, 2018.
142. Vergara-Salinas, J.R., et al., *Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation.* J Agric Food Chem, 2013. **61**(28): p. 6929-36.
143. Garcia-Marino M, R.-G.J., Ibanez E, Garcia-Moreno C, *Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction.* Anal Chimica Acta 563:44-50, 2006.
144. Liazid, A., et al., *Stability of anthocyanins from red grape skins under pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction conditions.* Molecules, 2014. **19**(12): p. 21034-43.
145. Tan, J., et al., *Ultrasound-assisted enzymatic extraction of anthocyanins from grape skins: optimization, identification, and antitumor activity.* J Food Sci, 2020. **85**(11): p. 3731-3744.
146. Zhang L, S.X., Wang S, Tan T, *Micowave extraction of proanthocyanidins from grape seeds* Chin Tradit Herbal Med 38:1808-1811, 2007b.
147. Choleva, M., et al., *Evaluation of anti-platelet activity of grape pomace extracts.* Food Funct, 2019. **10**(12): p. 8069-8080.
148. Arvanitoyannis, I., *Potential uses and applications of treated wine waste: a review.* International Journal of Food Science & Technology, 2006.
149. Manios, T., *The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete.* Environ Int, 2004. **29**(8): p. 1079-89.
150. Mattos, G.N., et al., *Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review.* J Sci Food Agric, 2017. **97**(4): p. 1055-1064.
151. Javier García-Lomillo, M.G.-S., *Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017.
152. Hoye, C., Jr. and C.F. Ross, *Total phenolic content, consumer acceptance, and instrumental analysis of bread made with grape seed flour.* J Food Sci, 2011. **76**(7): p. S428-36.

153. Aghamirzaei M, P.S., Azadmard-Damirchi S, Majzoobi M., *Effects of grape seed powder as a functional ingredient on flour physicochemical characteristics and dough rheological properties.* J Agric Sci Technol 17:365–73, 2015.
154. Meral, R. and I.S. Dogan, *Grape seed as a functional food ingredient in bread-making.* Int J Food Sci Nutr, 2013. **64**(3): p. 372-9.
155. Munteanu MF, G.R., Alexa E, Poiana AM, Onet M., *Determination of the nutritional properties from grape seed flour.* Curr Opin Biotechnol 24:S115, 2013.
156. Smith I, Y.J., *Nutritional and sensory quality of bread containing different quantities of grape pomace from different grape cultivars.* EC Nutr 2:291–301, 2015.
157. Mildner-Szkudlarz S, Z.-W.R., Szwengiel A, Pacy´nski M., *Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread.* Intl J Food Sci Technol 46:1485–93, 2011.
158. Mildner-Szkudlarz, S., et al., *White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits.* J Sci Food Agric, 2013. **93**(2): p. 389-95.
159. Karnopp AR, F.A., Los PR, Teles JC, Sim˜oes DRS, Barana AC, Kubiaki FT, de Oliveira JGB, Granato D, *Effects of whole-wheat flour and Bordeaux grape pomace (Vitis labrusca L.) on the sensory, physicochemical and functional properties of cookies.* Food Sci Technol 35:750–6, 2015.
160. Acun S, G.u.H., *Effects of grape pomace and grape seed flours on cookie quality.* Qual Assur Saf Crop 6:81–8, 2014.
161. Canett Romero R, L.O.A., Maribel Robles R, Morales Castro SR, Le´on Mart´ınez L, Le´on-G´alvez R., *Caracterizaci´on de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva.* Archivos Latinoamericanos de Nutrici´on 54:93–9, 2004.
162. R, W., *Feasibility of developing wine grape pomace fortified baked goods for health promotion.* Oreg., USA: Dept. of Food Science and Tecnology, Oregon State Univ., 2013.
163. Mildner-Szkudlarz, S., et al., *Natural compounds from grape by-products enhance nutritive value and reduce formation of CML in model muffins.* Food Chem, 2015. **172**: p. 78-85.
164. Oliveira DM, M.D., Kwiatkowski A, Monteiro ARG, Clemente E, *Sensory analysis and chemical characterization of cereal enriched with grape peel and seed flour.* Acta Sci Tech 35:427–31, 2013.
165. Rosales Soto MU, B.K., Ross CF, *Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products.* Intl J Food Sci Technol 47:592–602, 2012.
166. Marinelli V, P.L., Nardiello D, Del Nobile MA, Conte A., *New approach to enrich pasta with polyphenols from grape marc.* J Chem 2015, Article ID 734578: 1–8., 2015.
167. Aliakbarian B, C.M., Paini M, Casazza AA, Lanteri S, Perego P., *Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy.* LWT – Food Sci Technol 62:376–83., 2015.
168. Frumento D, S.A., Aliakbarian B, Casazza AA, Gallo M, Converti A, Perego P., *Development of milk fermented with Lactobacillus acidophilus fortified with Vitis vinifera marc flour.* Food Technol Biotechnol 51:370–5., 2013.
169. Chouchouli V, K.N., Konteles SJ, Karvela E, Makris DP, Karathanos VT., *Fortification of yoghurts with grape (Vitis vinifera) seed extracts.* LWT – Food Sci Technol 53:522–9, 2013.
170. Tseng, A. and Y. Zhao, *Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing.* Food Chem, 2013. **138**(1): p. 356-65.
171. Karaaslan M, O.M., Vardin H, Turkoglu H., *Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts.* LWT – Food Sci Technol 44:1065–72, 2011.

172. Marchiani R, B.M., Belviso S, Giordano M, Ghirardello D, Torri L, Piochi M, Zeppa G., *Yogurt enrichment with grape pomace: effect of grape cultivar on physicochemical, microbiological and sensory properties.* J Food Quality 39:77–89., 2016.
173. Marchiani, R., et al., *Physicochemical and nutritional qualities of grape pomace powder-fortified semi-hard cheeses.* J Food Sci Technol, 2016. **53**(3): p. 1585-96.
174. Han J, B.M., St-Gelais D, Champagne CP, Fustier P, Salmieri S, Lacroix M., *Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese.* Food Chem 124:1589–94., 2011.
175. Felix da Silva, D., et al., *Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk.* J Dairy Sci, 2015. **98**(3): p. 1552-62.
176. Sagdic O, O.I., Cankurt H, Tornuk F., *Interaction between some phenolic compounds and probiotic bacterium in functional ice cream production.* Food Bioprocess Tech 5:2964–71, 2012a.
177. Ozvural, E.B. and H. Vural, *Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters.* Meat Sci, 2011. **88**(1): p. 179-83.
178. Jung Y, J.S., Lee HJ, Kang M, Lee SK, Kim YJ, Jo C., *Effect of high pressure after the addition of vegetable oil on the safety and quality of beef loin.* Korean J Food Sci An 32:68–76., 2012.
179. Ribeiro B, C.C., Silva HA, Serrano C, Ramos C, Santos PC, Mendes R., *Effect of grape dietary fibre on the storage stability of innovative functional seafood products made from farmed meagre (Argyrosomus regius).* Intl J Food Sci Technol 48:10–21., 2013.
180. Lavelli, V., et al., *Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: the effect of particle size on product quality.* Food Chem, 2014. **152**: p. 162-8.
181. Bekhit Ael, D., et al., *Antioxidant activities, sensory and anti-influenza activity of grape skin tea infusion.* Food Chem, 2011. **129**(3): p. 837-45.
182. Cadiz-Gurrea, M.L., et al., *Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(2).
183. Perez, C., et al., *Supercritical fluid extraction of grape seeds: extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells.* Food Funct, 2015. **6**(8): p. 2607-13.
184. Chao, C.L., et al., *Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells.* Eur J Nutr, 2011. **50**(6): p. 401-9.
185. Terra, X., et al., *Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway.* J Agric Food Chem, 2007. **55**(11): p. 4357-65.
186. Benbouguerra, N., et al., *Polyphenolic Characterization of Merlot, Tannat and Syrah Skin Extracts at Different Degrees of Maturity and Anti-Inflammatory Potential in RAW 264.7 Cells.* Foods, 2021. **10**(3).
187. Rodriguez-Morgado, B., et al., *Obtaining from grape pomace an enzymatic extract with anti-inflammatory properties.* Plant Foods Hum Nutr, 2015. **70**(1): p. 42-9.
188. Carullo, G., et al., *Mantonico and Pecorello Grape Seed Extracts: Chemical Characterization and Evaluation of In Vitro Wound-Healing and Anti-Inflammatory Activities.* Pharmaceuticals (Basel), 2020. **13**(5).
189. Germano, M.J., et al., *Anti-oxidant and anti-inflammatory effect of polar extracts obtained from waste product of wine making.* Nat Prod Res, 2020: p. 1-5.
190. Angel-Morales, G., G. Noratto, and S. Mertens-Talcott, *Red wine polyphenolics reduce the expression of inflammation markers in human colon-derived CCD-18Co myofibroblast cells: potential role of microRNA-126.* Food Funct, 2012. **3**(7): p. 745-52.
191. Calabriso, N., et al., *Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression.* Eur J Nutr, 2016. **55**(2): p. 477-489.

192. Canali, R., et al., *Red wine metabolites modulate NF-kappaB, activator protein-1 and cAMP response element-binding proteins in human endothelial cells.* Br J Nutr, 2010. **103**(6): p. 807-14.
193. Xanthopoulou, M.N., et al., *Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells.* Food Chem, 2014. **165**: p. 50-9.
194. Chalons, P., et al., *Study of Potential Anti-Inflammatory Effects of Red Wine Extract and Resveratrol through a Modulation of Interleukin-1-Beta in Macrophages.* Nutrients, 2018. **10**(12).
195. Nunes, C., et al., *Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells.* Food Funct, 2013. **4**(3): p. 373-83.
196. Urquiaga, I., et al., *The Consumption of Beef Burgers Prepared with Wine Grape Pomace Flour Improves Fasting Glucose, Plasma Antioxidant Levels, and Oxidative Damage Markers in Humans: A Controlled Trial.* Nutrients, 2018. **10**(10).
197. Kar, P., et al., *Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity.* Diabet Med, 2009. **26**(5): p. 526-31.
198. Weseler, A.R., et al., *Pleiotropic benefit of monomeric and oligomeric flavanols on vascular health--a randomized controlled clinical pilot study.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28460.
199. Mellen, P.B., et al., *Effect of muscadine grape seed supplementation on vascular function in subjects with or at risk for cardiovascular disease: a randomized crossover trial.* J Am Coll Nutr, 2010. **29**(5): p. 469-75.
200. Han, H.J., et al., *Combined Supplementation with Grape Pomace and Omija Fruit Ethanol Extracts Dose-Dependently Improves Body Composition, Plasma Lipid Profiles, Inflammatory Status, and Antioxidant Capacity in Overweight and Obese Subjects.* J Med Food, 2016. **19**(2): p. 170-80.
201. Djousse, L., et al., *Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects.* Am J Cardiol, 1999. **84**(6): p. 660-4.
202. Blanco-Colio, L.M., et al., *Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia.* Circulation, 2000. **102**(9): p. 1020-6.
203. Watzl, B., et al., *Acute intake of moderate amounts of red wine or alcohol has no effect on the immune system of healthy men.* Eur J Nutr, 2002. **41**(6): p. 264-70.
204. Di Renzo, L., et al., *Changes in LDL Oxidative Status and Oxidative and Inflammatory Gene Expression after Red Wine Intake in Healthy People: A Randomized Trial.* Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 317348.
205. Covas, M.I., et al., *Postprandial effects of wine consumption on lipids and oxidative stress biomarkers.* Drugs Exp Clin Res, 2003. **29**(5-6): p. 217-23.
206. Argyrou, C., et al., *Postprandial effects of wine consumption on Platelet Activating Factor metabolic enzymes.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017. **130**: p. 23-29.
207. Williams, M.J., et al., *Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease.* Metabolism, 2004. **53**(3): p. 318-23.
208. Xanthopoulou, M.N., et al., *Wine consumption reduced postprandial platelet sensitivity against platelet activating factor in healthy men.* Eur J Nutr, 2017. **56**(4): p. 1485-1492.
209. Peluso, I., et al., *High fat meal increase of IL-17 is prevented by ingestion of fruit juice drink in healthy overweight subjects.* Curr Pharm Des, 2012. **18**(1): p. 85-90.
210. Arjunan, S.P., et al., *The effect of prior walking on coronary heart disease risk markers in South Asian and European men.* Eur J Appl Physiol, 2015. **115**(12): p. 2641-51.

211. Sanders, T.A., et al., *Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism.* Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6): p. 1433-41.
212. Gill, J.M., et al., *Effects of short-term detraining on postprandial metabolism, endothelial function, and inflammation in endurance-trained men: dissociation between changes in triglyceride metabolism and endothelial function. j.gill@bio.gla.ac.uk.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4328-35.
213. Kracmerova, J., et al., *Postprandial inflammation is not associated with endoplasmic reticulum stress in peripheral blood mononuclear cells from healthy lean men.* Br J Nutr, 2014. **112**(4): p. 573-82.
214. Wood, L.G., M.L. Garg, and P.G. Gibson, *A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1133-40.
215. Manning, P.J., et al., *Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(9): p. 2046-52.
216. Phillips, L.K., et al., *Postprandial total and HMW adiponectin following a high-fat meal in lean, obese and diabetic men.* Eur J Clin Nutr, 2013. **67**(4): p. 377-84.
217. Schwander, F., et al., *A dose-response strategy reveals differences between normal-weight and obese men in their metabolic and inflammatory responses to a high-fat meal.* J Nutr, 2014. **144**(10): p. 1517-23.
218. Ghanim, H., et al., *A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. 1409-14.
219. Davis, D.W., et al., *Effects of Acute Cocoa Supplementation on Postprandial Apolipoproteins, Lipoprotein Subclasses, and Inflammatory Biomarkers in Adults with Type 2 Diabetes after a High-Fat Meal.* Nutrients, 2020. **12**(7).