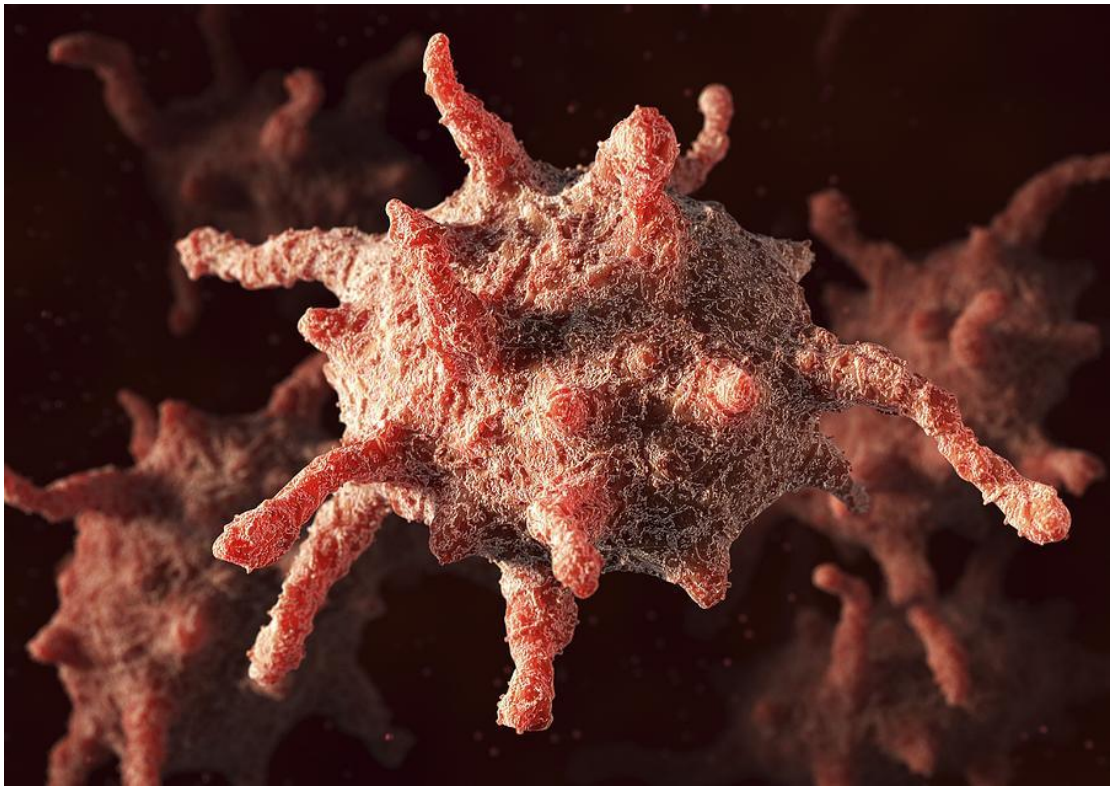
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Εφαρμοσμένης Δικαιολογίας - Διατροφής | Κατεύθυνση Μοριακή Διατροφή

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ ΠΛΟΥΣΙΑ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ



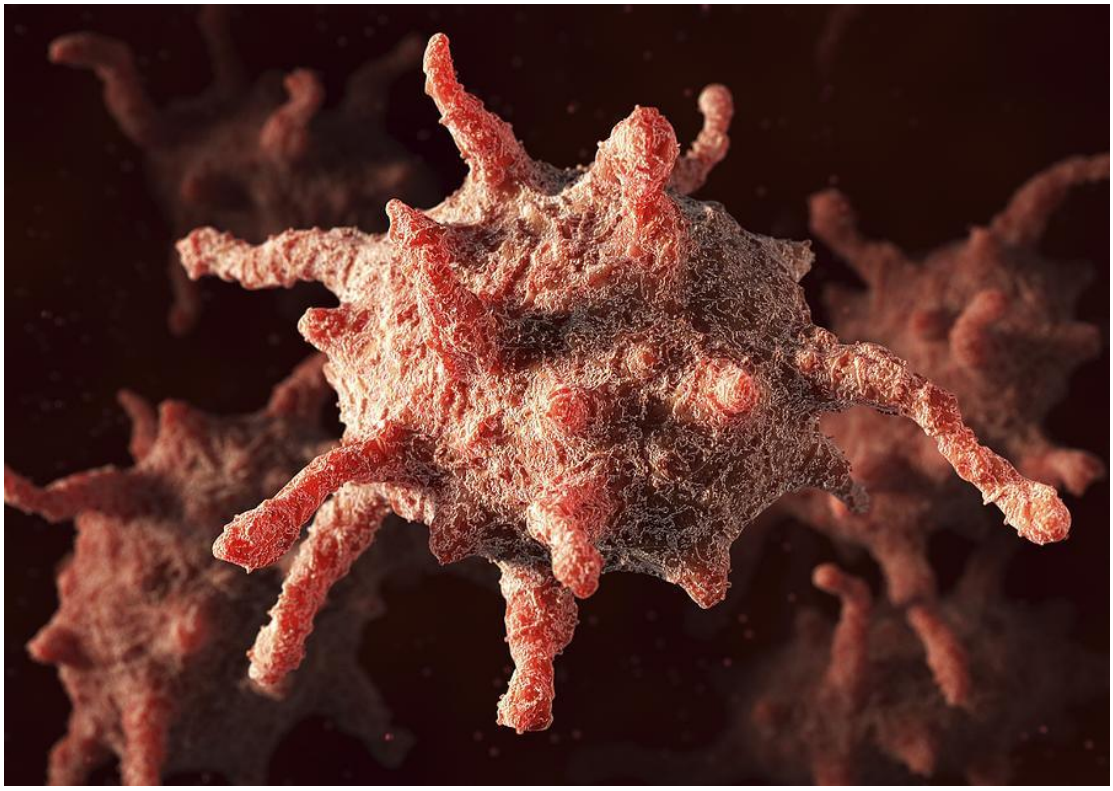
Μαρίνα Ορφανού - ΑΜ: 4521804
Βιοχημικός Βιοτεχνολόγος
Αθήνα 2022

HAROKOPIO UNIVERSITY
SCHOOL OF HEALTH
SCIENCE & EDUCATION
DEPARTMENT OF NUTRITION & DIETETICS

Postgraduate Program (Master of Science, M.Sc.) "Applied Nutrition and Dietetics" | Discipline Molecular Nutrition

Master's thesis

ANTIPLATELET ACTIVITY OF OLIVE OIL'S BIOACTIVE PHENOLIC COMPOUNDS AND EXTRACTS FROM PHENOLIC RICH OLIVE OILS



Marina Orfanou - RN: 4521804
Biochemist Biotechnologist
Athens 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τζώρτζης Νομικός (Επιβλέπων)
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ελισάβετ Φραγκοπούλου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνοπούλου Σμαραγδή
Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Μαρίνα Ορφανού

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

3) Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Τζώρτζη Νομικό, επιβλέπων καθηγητή, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης για την αμέριστη συνεργασία και στήριξη για την υλοποίηση αυτής της διατριβής. Η βοήθεια και η καθοδήγησή του υπήρξε ιδιαίτερα πολύτιμη και καθοριστική για την ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την καθηγήτρια Σμαραγδή Αντωνοπούλου και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την πολύτιμη συμμετοχή τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Μέρφη Κατσά για την συνεχή βοήθειά, στήριξη και πειραματική καθοδήγησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τα παιδία του εργαστηρίου, τη Μαρία, τη Φιλιώ και τη Μαρία που ήταν πάντα εκεί για ό,τι και αν χρειαζόμουν.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τα ερεθίσματα που μου έδωσαν στην αναζήτηση της γνώσης, αλλά και τη μικρή μου αδερφή που με στήριζε σε όλη την προσπάθεια.

Last but not least, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Νίκο και το γάτο μας.

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων 6
Περίληψη 8
Abstract 9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 10
1.1 Φυσιολογία του αιμοπεταλίου – Εμπλοκή σε χρόνιες παθήσεις 10
1.1.1 Το αιμοπετάλιο 10
1.1.2 Ιστορία του αιμοπεταλίου 13
1.1.3 Φυσιολογική ενεργοποίηση αιμοπεταλίων 13
1.2 Το αιμοπετάλιο και χρόνιες παθήσεις 15
1.2.1 Αθηροσκλήρωση 15
1.2.2 Νόσος Alzheimer (AD) 17
1.2.3 Καρκίνος 17
1.2.4 Ηπατική νόσος 18
1.3 Αιμοπετάλια, αντίσταση στην ινσουλίνη και διαβήτης 20
1.3.1 Σακχαρώδης διαβήτης και μεταβολικό περιβάλλον της νόσου 20
1.3.2 Επιδράσεις της υπεργλυκαιμίας και του σακχαρώδη διαβήτη στην πήξη και την αιμόσταση 23
1.3.3 Αντίσταση στην ινσουλίνη 25
1.4 Φαινολικά συστατικά ελαιολάδου – Βιολογικές δράσεις 26
1.4.1 Χημικές ενώσεις ελαιόλαδου – πολυφαινολικές ενώσεις 26
1.4.2 Ελαιοκανθάλη (OC) 27
1.4.2.1 Αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες της OC 28
1.4.2.2 Νευροπροστατευτικές Επιδράσεις της Ελαιοκανθάλης (OC) 30
1.4.3 Υδροξυτυροσόλη (HT) 30
1.4.3.1 Οφέλη της υγείας από την υδροξυτυροσόλη 31
1.4.3.2 Αντικαρκινική δράση της υδροξυτυροσόλης 32
1.4.4 Ελευρωπαΐνη (OE) 32
1.4.4.1 Ευεργετικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης 33
1.4.4.2 Αντικαρκινική δράση της ελευρωπαΐνης 33
1.4.5 Τυροσόλη (T/ Tyr) 34
1.4.5.1 Οφέλη της υγείας από την τυροσόλη (Tyr) 34
1.4.6 Ελαιασίνη (OA) 36
1.4.6.1 Οφέλη της υγείας από την ελαιασίνη (OA) 36
1.5 Ελαιόλαδο και αιμοπετάλια 37
2. Σκοπός 42
3. Μεθοδολογία 43

3.1 Προσδιορισμός της προσκόλλησης αιμοπεταλίων σε μικροπλακίδια επιστρωμένα με πρωτεΐνες προσκόλλησης – επίδραση φαινολικών ενώσεων 43
3.2 Διαδικασία εκχύλισης ελαιόλαδου και βουτύρου 46
3.3 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με τη μέθοδο της Folin-Ciocalteu 47
3.4 Μέτρηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας 49
3.5 Μεταγευματική μελέτη 52
3.6 Προσδιορισμός sP-selectin σε ορό με τη μέθοδο ELISA 54
3.7 Στατιστική ανάλυση 57
4. Αποτελέσματα 58
4.1 Βελτιστοποίηση μεθόδου εκτίμησης της προσκόλλησης αιμοπεταλίων 58
4.2 Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από βούτυρο και ελαιόλαδο διαφορετικών συγκεντρώσεων ελαιοκανθάλης 76
4.3 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα ελαιολάδου και βουτύρου 78
4.4 Αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας 79
4.5 Οξεία επίδραση ελαιολάδων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης στα επίπεδα sP-selectin 81
5. Συζήτηση 86
Συμπέρασμα 96
Βιβλιογραφία 97

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου ΙΙ είναι μια ασθένεια που προκαλεί ποικίλες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ασθενή. Είναι γνωστό ότι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και αυτό οφείλεται εν μέρει στην αυξημένη προσκόλληση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο των αρτηριών, προκαλώντας αθηρωματική πλάκα. Ωστόσο, η μεσογειακή διατροφή, που είναι πλούσια σε ελαιόλαδο, φαίνεται ότι ασκεί μια προστατευτική δράση στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη πολυφαινολών από το ελαιόλαδο. Η παρούσα εργασία εξετάζει την in vitro αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων από έξτρα παρθένα ελαιόλαδα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα σε ελαιοκανθάλη στα αιμοπετάλια διαβητικών και υγειών εθελοντών. Παράλληλα, διερευνεί την in vivo αντιαιμοπεταλιακή δράση ελαιολάδων πλούσιων σε ελαιοκανθάλη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου ΙΙ. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας την ικανότητα των φαινολικών ενώσεων και των εκχυλισμάτων ελαιολάδου (3 εκχυλίσματα ελαιολάδου και 1 εκχύλισμα βουτύρου) στο να αναστέλλουν την ex vivo συσσώρευση αιμοπεταλίων, επαγομένη από ADP, καθώς και την προσκόλληση τους σε επιφάνεια επιστρωμένη με κολλαγόνο αλλά και με τη μέτρηση της sP-σελεκτίνης σε πλάσμα ασθενών με διαβήτη τύπου ΙΙ, που είχαν καταναλώσει τα ελαιόλαδα που αναφέρθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ελαιολάδου, που ήταν πλούσια σε ελαιοκανθάλη, μείωσαν περισσότερο την συσσώρευση αιμοπεταλίων διαβητικών ασθενών, σε σχέση με το ελαιόλαδο δίχως ελαιοκανθάλη. Όσον αφορά την in vivo μελέτη, παρατηρήθηκε ότι τα ελαιόλαδα με ελαιοκανθάλη δεν επηρέασαν τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης. Ωστόσο, στην πειραματική ομάδα, που χορηγήθηκε εκχύλισμα βουτύρου παράλληλα με λήψη ιβουπροφαίνης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της sP-σελεκτίνης. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η αντιαιμοπεταλιακή δράση του ελαιολάδου οφείλεται σε κάποιο βαθμό στην ελαιοκανθάλη. Αντίθετα, τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης δεν επηρεάζονται από την λήψη ελαιολάδου πλούσιου σε ελαιοκανθάλη. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να μελετηθεί η αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων ελαιολάδου, ώστε η διεξαγωγή θετικών συμπερασμάτων να συμβάλλει στη χρήση του ελαιολάδου που είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, σαν λειτουργικό τρόφιμο για μεταβολικές ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης.

Abstract

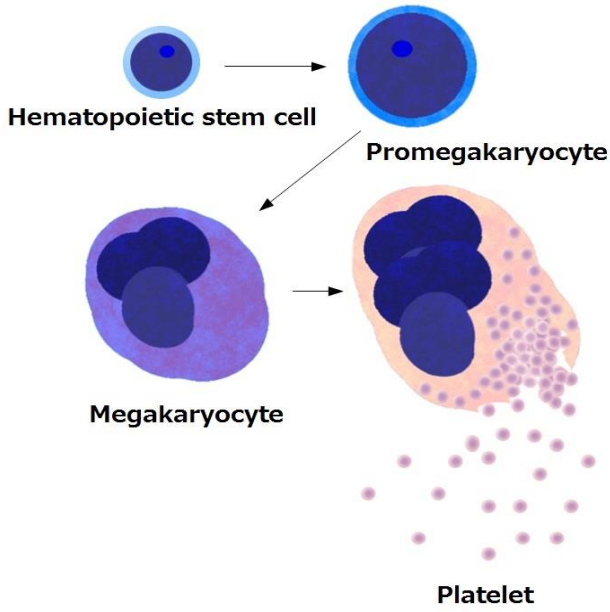
Type II diabetes is a disease that causes a variety of negative effects on health. It is known that patients with diabetes mellitus have an increased incidence of cardiovascular disease and this is partly due to increased adhesion of activated platelets to the endothelium of arteries, causing atherosclerotic plaque. On the other hand, the Mediterranean diet, which is rich in olive oil, seems to exert a protective effect on the occurrence of cardiovascular disease and this is possibly due to the increased intake of olive oil polyphenols. Present work examines the in vitro antiplatelet activity of extracts from extra virgin olive oils rich in phenolic compounds and especially in oleocanthal on healthy and diabetic volunteers' platelets. Alongside, it investigates the in vivo antiplatelet effect of olive oils rich in oleocanthal in patients with type II diabetes. The antiplatelet effect was assessed by determining the ability of phenolic compounds and olive oil extracts (3 olive oil extracts and 1 butter extract) to inhibit ex vivo ADP-induced platelet aggregation and adhesion to a collagen-coated surface and by measuring sP-selectin in plasma of patients with type II diabetes, who had consumed the mentioned olive oils. The results showed that olive oil extracts rich in oleocanthal reduced the diabetic patients' platelet aggregation more than olive oil without oleocanthal. Regarding the in vivo study, it was observed that olive oils with oleocanthal did not affect the levels of sP-selectin. However, a significant reduction in sP-selectin levels was observed in the experimental group that was administered butter extract along with ibuprofen. In conclusion, it seems that the antiplatelet effect of olive oil is due to some extent to oleocanthal. In contrast, sP-selectin levels are not affected by olive oil intake rich in oleocanthal. Further research is needed in order to study the antiplatelet activity of olive oil extracts, so that positive conclusions can contribute to the use of olive oil, which is rich in phenolic compounds, as a functional food for metabolic diseases such as diabetes.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυσιολογία του αιμοπεταλίου – Εμπλοκή σε χρόνιες παθήσεις

1.1.1 Το αιμοπετάλιο

Το αίμα αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων που συγκρατούνται μέσα στο πλάσμα. Στο άμορφο αυτό συστατικό του αίματος κυκλοφορούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα είναι μικρά δισκοειδή, διάφανα, απύρηνα κύτταρα με διάμετρο 2 έως 5 μm με μικρή διάρκεια ζωής (~ δέκα ημέρες) που εντοπίζονται κυρίως στον ενδαγγειακό χώρο σε φυσιολογικές συνθήκες (Garraud et al., 2017), προερχόμενα από θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων. Η παραγωγή αιμοπεταλίων από μεγακαρυοκύτταρα είναι μια συστηματική και ρυθμιζόμενη διαδικασία που πιστεύεται ότι συμβαίνει είτε στον μυελό των οστών είτε, όπως έχει αποδειχθεί πιο πρόσφατα, στον πνεύμονα (Lefrançais et al., 2017). Τα μεγακαρυοκύτταρα των θηλαστικών υφίστανται πολυπλοειδοποίηση κατά τη διαφοροποίησή τους· αυτή η διαδικασία οδηγεί σε αξιοσημείωτη αύξηση του μεγέθους τους και του κυτταροπλάσματός τους. Διαφέρει από την κλασική μίτωση, καθώς επιτρέπει με οικονομικό τρόπο την παραγωγή αιμοπεταλίων που προκύπτουν από τον κατακερματισμό του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων. Η πολυπλοειδοποίηση λαμβάνει χώρα με αρκετούς γύρους αντιγραφής του DNA με μια αποτυχημένη μίτωση στο τέλος κάθε γύρου στην όψιμη φάση της κυτταροκίνησης. Για την παραγωγή αιμοπεταλίων απαιτείται η παράλληλη ανάπτυξη οργανιδίων των μεγακαρυοκυττάρων όπως τα μιτοχόνδρια, τα κοκκία και το σύστημα μεμβράνης οριοθέτησης. Η πολυπλοειδοποίηση των μεγακαρυοκυττάρων ρυθμίζεται από εξωγενείς παράγοντες, όπως η θρομβοποιητίνη (TPO) και από μεταγραφικούς παράγοντες όπως RUNX1, GATA1 και FLI1 που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων (Vainchenker and Raslova, 2020).



Εικόνα 1: Κατακερματισμός του μεγακαρυοκυττάρου προς παραγωγή αιμοπεταλίων ("Trombocit," 2021)

Τα αιμοπετάλια είναι πολύπλοκα κύτταρα που περιέχουν τρεις διαφορετικούς (Kaur et al., 2018) τύπους κοκκίων: α-κοκκία, πυκνά ή δ-κοκκία και λυσοσώματα. Τα α-κοκκία περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες, χημειοκίνες, κυτταροκίνες, και αυξητικούς παράγοντες που συγκεντρώνονται στα αιμοπετάλια από τα μεγακαρυοκύτταρα και είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπεταλιακά δ-κοκκία περιέχουν μικρά μόρια όπως ADP, σεροτονίνη, πολυφωσφορικά, γλουταμικό, ισταμίνη και ασβέστιο που είναι απαραίτητα για την αιμόσταση. Τα λυσοσώματα περιέχουν ένζυμα όπως γλυκοϋδρολάσες και ένζυμα που αποικοδομούν γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και γλυκοζαμινογλυκάνες. Τα αιμοπετάλια μπορεί να μην έχουν πυρήνα αλλά περιέχουν προσυσκευασμένες πρωτεΐνες και διάφορες μορφές RNA από τα πρόδρομα κύτταρα τους (Koupenova et al., 2018).

Η θρομβοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή των αιμοπεταλίων, ενώ η μεγακαρυοποίηση σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων. Τα μεγακαρυοκύτταρα, όπως και τα άλλα κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού, προέρχονται από το αρχέγονο πρόδρομο αιμοποιητικό κύτταρο. Η διαφοροποίηση προς μια συγκεκριμένη οδό ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα αναδομούν το κυτταρόπλασμά τους και επεκτείνουν τις

ψευδοποδικές προεξοχές που αναφέρονται σε προπετάλια, μέσω κυττάρων του ημιτονοειδούς ενδοθηλιακού στρώματος και απελευθερώνουν αιμοπετάλια στην κυκλοφορία. Η σταθερή παροχή εξασφαλίζεται με συνεχή παραγωγή και εκκαθάριση $1*10^{11}$ αιμοπεταλίων καθημερινά για τη διατήρηση των επιπέδων από 150–$400*10^9$/L στο αίμα (Machlus et al., 2014; Yun et al., 2016).

Λόγω των ακραίων δυνάμεων διάτμησης, που εκτίθενται τα αιμοπετάλια στα αγγεία καθώς και των περιορισμών που επιβάλλονται στο αιμοπετάλιο λόγω της απουσίας πυρήνα. η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων περιορίζεται σε 5 έως 9 ημέρες μετά το σχηματισμό και τον διαχωρισμό από το μεγακαρυοκύτταρο. Κατά τη διάρκεια του κανονικού κύκλου ζωής τους, τα αιμοπετάλια μειώνονται σε μέγεθος, έτσι ώστε τα νεαρά αιμοπετάλια να είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα γηραιότερα. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η ρύθμιση της αιμόστασης και της θρόμβωσης. Μετά από τραυματισμό, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται στο αίμα με αποτέλεσμα την προσκόλληση τους στην εκτεθειμένη εξωκυτταρική μήτρα που βρίσκεται κάτω από το ενδοθήλιο. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτός ο ρόλος, τα αιμοπετάλια ρέουν μέσω του αγγείου σε κοντινή απόσταση από το τοίχωμα του αγγείου λόγω της βιοφυσικής φύσης των συστατικών του αίματος και των δυνάμεων διάτμησης μέσα στο αγγείο. Αυτή η στενή εγγύτητα με το τοίχωμα του αγγείου επιτρέπει τη γρήγορη απόκριση όταν εμφανίζεται αγγειακή προσβολή ή τραυματισμός. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν αποθηκευτικά κοκκία, άλφα κοκκία και πυκνά (δ) κοκκία, που λειτουργούν σαν εκκριτικά οργανίδια και βοηθούν στην πρόσληψη επιπρόσθετων αιμοπεταλίων για το σχηματισμό ενός βύσματος και στη συνέχεια οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβου που σταθεροποιείται με ενεργοποίηση της πήξης και την εξαρτώμενη από θρομβίνη εναπόθεση ινώδους. Ωστόσο, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συσσωρεύονται επίσης στη θέση ρήξης της αθηροσκληρωτικής πλάκας ή της διάβρωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, διεγείροντας το σχηματισμό θρόμβων και προάγοντας την αθηροθρομβωτική νόσο. Τα αιμοπετάλια αφού ολοκληρώσουν τον κύκλο της ζωής τους στα αγγεία ή μετά από πλήρη ενεργοποίηση τους και ενσωμάτωση σε έναν σχηματιζόμενο θρόμβο, αφαιρούνται από το αγγείο από ουδετερόφιλα και μακροφάγα και μεταφέρονται στον σπλήνα για απομάκρυνση από το σώμα. Τα αιμοπετάλια είναι απαραίτητα και σε μία μεγάλη ποικιλία μη αιμοστατικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων φλεγμονωδών αποκρίσεων, ρευματοειδής

αρθρίτιδας, μετάστασης καρκίνου, αγγειογένεσης όγκου και θανάτωσης ενδο - ερυθροκυτταρικών παρασίτων μεταξύ άλλων (Wachowicz et al., 2016).

1.1.2 Ιστορία του αιμοπεταλίου

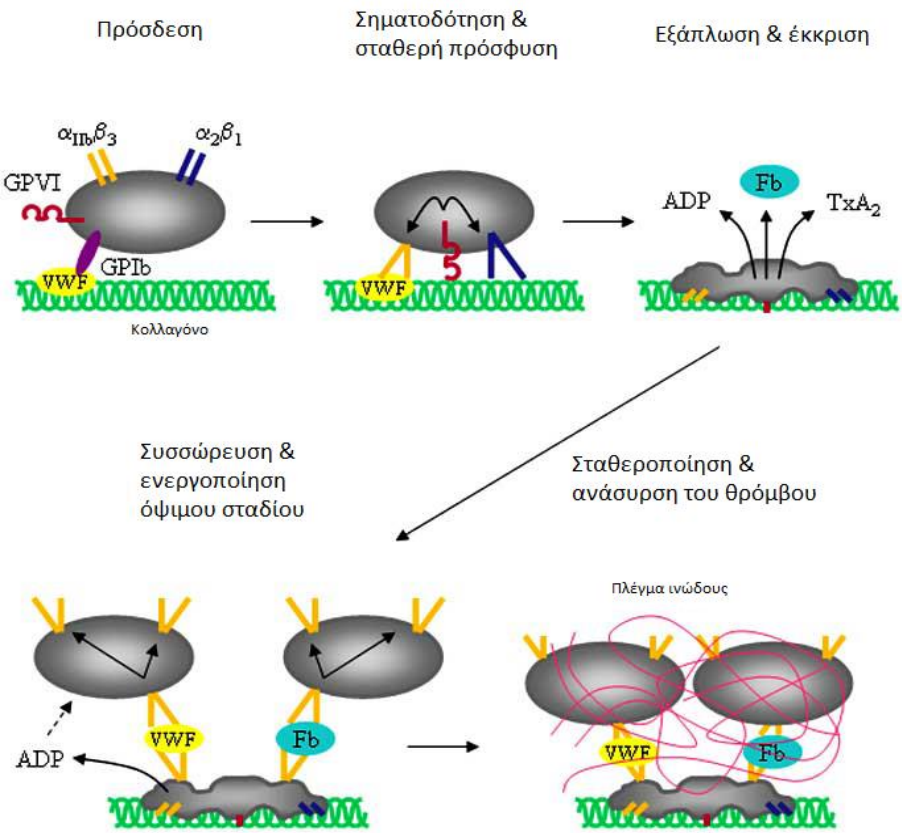
Η πρώτη ακριβή και πειστική περιγραφή των αιμοπεταλίων έγινε από τον Max Schultze σε δημοσίευση ως μέρος μιας μελέτης αφιερωμένης κυρίως στα λευκά αιμοσφαίρια το 1865. Τα αναγνώρισε ως φυσιολογικό συστατικό του αίματος. Το 1882, ο Bizzozero απέδειξε την αξία αυτής της σύστασης στην πολύ πιο ολοκληρωμένη μελέτη του. Τα παρατήρησε μικροσκοπικά στην κυκλοφορία του αίματος ζώων αλλά και στο αίμα που αφαιρέθηκε από τα αιμοφόρα αγγεία. Σε καλά σχεδιασμένα πειράματα, έδειξε ότι ήταν το πρώτο συστατικό του αίματος που προσκολλήθηκε σε κατεστραμμένα τοιχώματα αιμοφόρων αγγείων in vivo και in vitro ήταν τα πρώτα συστατικά του αίματος που προσκολλήθηκαν σε νημάτια που στη συνέχεια καλύφθηκαν με ινώδες (Brewer, 2006). Ο ρόλος τους αρχικά συσχετίστηκε με τη θρόμβωση παρά με την αιμόσταση. Για πολλά χρόνια άλυτο πρόβλημα ήταν ότι ο χρόνος πήξης ήταν φυσιολογικός ακόμη και σε σοβαρή θρομβοπενία. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960, το ενδιαφέρον πολλών εμπειρογνωμόνων μετακινήθηκε από την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τη διαδικασία της πήξης του αίματος στην αλληλεπίδραση αυτών των κυττάρων με το αγγειακό τοίχωμα (προσκόλληση) και μεταξύ τους (συσσωμάτωση) (de Gaetano, 2001). Η ανακάλυψη του ρόλου της ADP ως εκκινητή της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων ακολουθήθηκε γρήγορα από άλλες σημαντικές ανακαλύψεις όπως οι ιδιότητες συσσωμάτωσης από το κολλαγόνο και τη θρομβίνη, η αντίδραση απελευθέρωσης, ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος και η ανασταλτική επίδραση της ασπιρίνης (Gresele et al., 2017).

1.1.3 Φυσιολογική ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η προσκόλληση αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα παρεμποδίζεται από την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω της αντιθρομβωτικής τους φύσης και της συνεχούς απελευθέρωσης αντι-αιμοπεταλιακών παραγόντων από το ενδοθήλιο. Ωστόσο μετά από τραυματισμό, το ενδοθήλιο καταστρέφεται τοπικά και μένει εκτεθειμένη η εξωκυτταρική μήτρα που βρίσκεται

κάτω από το ενδοθήλιο. Η προσκόλληση αιμοπεταλίων στην υποενδοθηλιακή εξωκυτταρική μήτρα είναι το πρώτο βήμα στην πρωτογενή αιμόσταση. Η απόκριση αυτή ξεκινάει μέσω της αρχικής αλληλεπίδρασης της μήτρας με συγκεκριμένους υποδοχείς στα αιμοπετάλια συμπεριλαμβανομένου του συμπλέγματος GP1b/V/IX που δεσμεύεται στον παράγοντα Von Willebrand καθώς και των υποδοχέων GPVI και αIIβ1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων που συνδέονται με το κολλαγόνο της εξωκυτταρικής μήτρας. Μετά από αυτή την αρχική πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο τοίχωμα του αγγείου, η επακόλουθη σταθερή προσκόλληση έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή σήματος αυτοκρινώς με αποτέλεσμα την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων τους (Holinstat M., 2017).

Στη συνέχεια η σταθερή προσκόλληση, οδηγεί στον αρχικό σχηματισμό θρόμβου, όπου τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια που δεσμεύονται στο θρόμβο αρχίζουν να ενσωματώνουν νέα αιμοπετάλια από την κυκλοφορία μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αιμοπεταλίων με μεσολάβηση του υποδοχέα ιντεγκρίνης αIIbβ3 (Εικ. 2). Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια στην κυκλοφορία αλλά και τα χαλαρά συνδεδεμένα αιμοπετάλια θα ενεργοποιηθούν μέσω της θετικής ανατροφοδότησης που ξεκινά μέσω του σχηματισμού δευτερογενών σημάτων μέσω των οξυγενασών COX-1 και 12-LOX καθώς και μέσω της έκκρισης των κοκκίων των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Το δεσμευμένο ινωδογόνο ή ο παράγοντας vWF σε υποδοχείς ιντεγκρίνης αIIbβ3 μεταξύ αιμοπεταλίων συμβάλλει στη σταθεροποίηση του θρόμβου (Holinstat M., 2017).



Εικόνα 2: Βήματα προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, ενεργοποίησης και σχηματισμού θρόμβου (Watson, 2009)

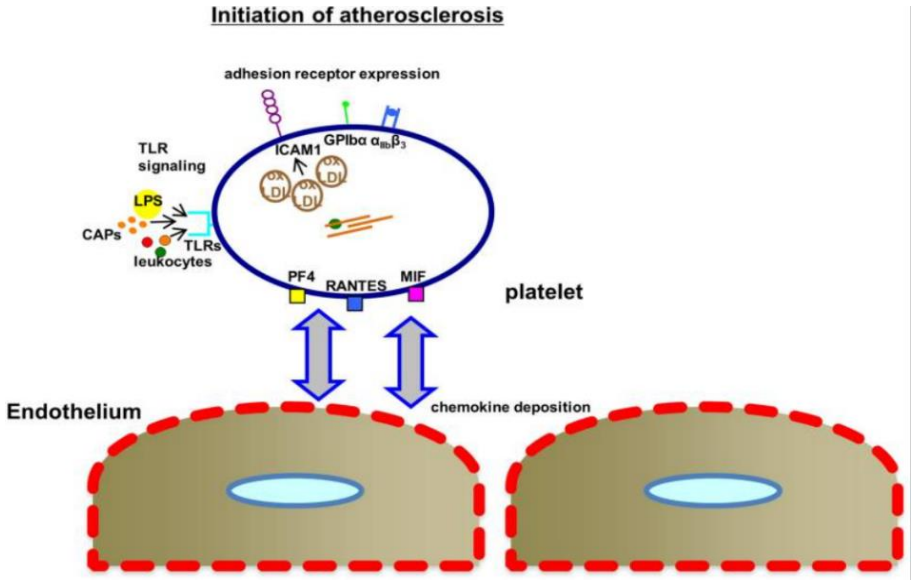
1.2 Το αιμοπετάλιο και χρόνιες παθήσεις

1.2.1 Αθηροσκλήρωση

Τα αιμοπετάλια εκτός από το ρόλο τους στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, εμπλέκονται επίσης σε πολλές άλλες παθολογικές διεργασίες του αγγειακού συστήματος, όπως ο σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας. Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια αγγειακή φλεγμονώδης νόσος, που δημιουργείται προοδευτικά, όταν τα τοιχώματα των αρτηριών και των αγγείων του κυκλοφορικού συστήματος του οργανισμού αρχίζουν να υφίστανται βλάβες. Αυτές οι βλάβες με αργό ρυθμό προκαλούν τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών στην εσωτερική πλευρά, κυρίως των αρτηριών, κάτι σαν μια μορφή εκτεταμένων συσσωματωμάτων τα οποία αποτελούνται από λιπώδεις ενώσεις, χοληστερόλη, κυτταρικά θραύσματα, ασβέστιο και ινώδες. Καθώς συσσωρεύεται στις αρτηρίες, τα τοιχώματα των αρτηριών παχαίνουν και γίνονται άκαμπτα. Με την πάροδο του χρόνου, η αθηρωματική πλάκα διογκώνεται,

μειώνοντας την εσωτερική διάμετρο των αρτηριών, και μπορεί να μειώσει και αυτή των αγγείων (ιδίως στα άκρα του ανθρωπίνου σώματος) προκαλώντας έτσι μια ευρεία στένωση. Παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν μη φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης, αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών, υψηλή αρτηριακή πίεση, διαβήτη, κάπνισμα, παχυσαρκία, οικογενειακό ιστορικό και ανθυγιεινή διατροφή (Kim and Conway, 2019; Huilcaman et al., 2022).

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια παίζουν φλεγμονώδη ρόλο ως κύτταρο του ανοσοποιητικού και συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Όταν η διατμητική τάση της ροής του αίματος αλλάζει απότομα ή το αγγειακό μικροπεριβάλλον μεταβάλλεται, τα αιμοπετάλια που κυκλοφορούν στο αίμα μπορούν γρήγορα να αντιληφθούν τα σήματα αυτά και να ανταποκριθούν με ενεργοποίηση κατά τη διάρκεια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, στη συνέχεια προσκολλώνται σε κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία για να διατηρήσουν την ακεραιότητα των αιμοφόρων αγγείων. Περαιτέρω, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στρατολογούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, προάγουν τη μετανάστευσή τους στο εσωτερικό και επιταχύνουν τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης με εμπλοκή επιφανειακών υποδοχέων ή απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων (Kim and Conway, 2019).



Εικόνα 3: Μηχανισμοί μέσω των οποίων τα αιμοπετάλια επηρεάζουν την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Κατά την ενεργοποίηση εντός του μικροπεριβάλλοντος της αθηροσκληρωτικής πλάκας ή ακόμη και σε πολύ πρώιμα στάδια αθηρογένεσης σε περιοχές υψηλής διατμητικής καταπόνησης, τα αιμοπετάλια εκφράζουν αυξημένα επίπεδα υποδοχέων φλεγμονώδους προσκόλλησης (ICAM1, GPIbα, αIIbβ3) που σχετίζονται με τη δέσμευση της oxLDL στα αιμοπετάλια. Η σηματοδότηση με τη μεσολάβηση TLR μπορεί να συμβάλει μέσω δέσμευσης λιποπολυσακχαριτών (LPS), αλληλεπίδρασης λευκοκυττάρων ή δέσμευσης καρβοξυαλκυλοπυρρολών (CAPs). Το σύστημα του συμπληρώματος συμβάλλει επίσης στην αθηρογένεση (Nording et al., 2015)

1.2.2 Νόσος Alzheimer (AD)

Η AD είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή του εγκεφάλου που οδηγεί αργά σε σοβαρή γνωστική εξασθένηση. Τα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου αποτελούν τον σχηματισμό ενδοκυττάριου νευροϊνιδιακού σωρού και την εναπόθεση αμυλοειδούς-β (Αβ) στον εγκεφαλικό ιστό και στα εγκεφαλικά αγγεία (αποκαλούμενη εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια, CAA), που συνοδεύεται από νευροφλεγμονή καθώς και νευρωνική και συναπτική απώλεια. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αιμοπετάλια αποτελούν την κύρια πηγή του πεπτιδίου αμυλοειδούς-β (Αß) και της πρόδρομης πρωτεΐνης του, της πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (APP), στο αίμα, καθώς εκκρίνονται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Rawish et al., 2020). Τα στοιχεία δείχνουν ότι και τα δύο και το APP παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της θρόμβωσης και της αιμόστασης. Σε ασθενείς με AD έχει καταδειχθεί ενισχυμένη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και προσκόλληση σε συστατικά της υπο- ενδοθηλιακής μήτρας σε μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών (Canobbio et al., 2016). Ακόμα, είναι ενδιαφέρον ότι πριν από το σχηματισμό πλάκας Αß, τα συσσωματωμένα αιμοπετάλια εμφανίστηκαν ως πρώτο παθολογικό σημάδι σε μοντέλο ποντικού AD, υποδηλώνοντας τα αιμοπετάλια ως θεραπευτικό στόχο στις αρχές της νόσου (Kniewallner et al., 2016). Πέρα από την πιθανή θεραπευτική συνάφεια των αιμοπεταλίων, μεταβολομική ανάλυση αποκάλυψε ότι οι φωσφατιδυλοχολίνες των αιμοπεταλίων αποτελούν πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες για τη διάγνωση της AD (Oberacher et al., 2017) και της CAA (Foidl et al., 2020).

1.2.3 Καρκίνος

Η θρομβοεμβολή θεωρείται ότι έχει σημαντική επίδραση στην εξέλιξη ασθενών με καρκίνο. Αν και η πρόοδος στη θεραπεία του καρκίνου και η εμφάνιση νέων αντικαρκινικών παραγόντων, όπως τα μοριακά στοχευμένα φάρμακα, έχουν βελτιώσει τη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο, η συχνότητα θρομβοεμβολής που σχετίζεται με τη θεραπεία του καρκίνου αυξάνεται. Ο καρκίνος σχετίζεται στενά με τη θρόμβωση. Ο σχηματισμός θρόμβου προκύπτει από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως ιστικούς παράγοντες, ανωμαλίες πήξης, ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση προσκόλλησης και δυσλειτουργία ενδοθηλιακών

κυττάρων. Η θρόμβωση έχει αντίκτυπο στον πολλαπλασιασμό και την επέκταση του καρκίνου. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως ’’θρόμβωση που σχετίζεται με τον καρκίνο’’ (CAT) και πρέπει επομένως να αντιμετωπίζεται διαφορετικά από τη θρόμβωση σε ασθενείς χωρίς καρκίνο.

Ο καρκινικός ιστός βρίσκεται σε κατάσταση πήξης, φλεγμονής και υποξίας, και διάφορες ουσίες παράγονται από την επαγωγή γονιδίων πολλαπλασιασμού του καρκίνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβων. Η σειρά των αντιδράσεων που εμπλέκονται στο σχηματισμό θρόμβων σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση του καρκίνου. Οι ιστικοί παράγοντες (TF) που παράγονται από καρκινικά κύτταρα θεωρούνται το σημείο εκκίνησης των αντιδράσεων πήξης που πυροδοτούν το CAT. Ο TF ενεργοποιεί τον παράγοντα VII και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ του παράγοντα VII και του TF. Το σύμπλεγμα TF προάγει την ενεργοποίηση του παράγοντα X, οδηγώντας στον σχηματισμό του παράγοντα Xa. Από την άλλη πλευρά, ορισμένοι τύποι καρκινικών κυττάρων παράγουν τον καρκινικό προπηκτικό παράγοντα (CP) και δρουν άμεσα στον παράγοντα Xa. Ο παράγοντας Xa που ενεργοποιείται από αυτούς τους παράγοντες παράγει θρομβίνη και ταυτόχρονα διεγείρει και ενισχύει τον καταρράκτη της πήξης. Ο ενισχυμένος καταρράκτης πήξης προάγει περαιτέρω την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οδηγώντας στο σχηματισμό πολλών θρόμβων στο αγγειακό ενδοθήλιο (Mukai and Oka, 2018).

1.2.4 Ηπατική νόσος

Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ηπατική νόσο. Στοιχεία υποδηλώνουν ότι στο τραυματισμένο ήπαρ, τα αιμοπετάλια είναι παρόντα και αλληλεπιδρούν με τα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα, επηρεάζοντας τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση άλλων φλεγμονωδών κυττάρων. Τα ιγμοροειδή είναι αγγειακά κανάλια χαμηλής πίεσης που λαμβάνουν αίμα από τους τερματικούς κλάδους της ηπατικής αρτηρίας και της πυλαίας φλέβας στην περιφέρεια των λοβίων και το μεταφέρουν στις κεντρικές φλέβες. Τα ιγμοροειδή είναι επενδεδυμένα με ενδοθηλιακά κύτταρα και πλαισιώνονται από πλάκες ηπατοκυττάρων, τα οποία εκτίθενται σε ελάχιστη διατμητική τάση και εμφανίζουν λειτουργίες σαρωτή. Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι τα αιμοπετάλια μπορεί να απομονώνονται στα ηπατικά

ημιτόνια και μπορεί να παίζουν ρόλο στη στρατολόγηση λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Σε αρκετούς τύπους ηπατικής βλάβης, τα ουδετερόφιλα παίζουν βασικό ρόλο στην παθογένεση της ηπατικής βλάβης. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι τα κυκλοφορούντα συσσωματώματα αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων μπορεί να παίζουν ρόλο στην πρόκληση βλάβης οργάνων σε ασθενείς με κίρρωση. Είναι ενδιαφέρον ότι ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην ηπατική νόσο φαίνεται να είναι χρονικά συγκεκριμένος σε αυτή την πρόκληση θρομβοπενίας σε ορισμένα μοντέλα χρόνιας ηπατικής νόσου μπορεί να επιδεινώσει τη λειτουργία του ήπατος προκαλώντας ηπατική ίνωση ενώ σε άλλες μορφές ηπατικής νόσου, η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία μπορεί να μετριάσει τη βλάβη του ήπατος (Lambert, 2016).

Ωστόσο, ασθενείς με ηπατική νόσο έχουν συχνά θρομβοπενία και αυτό συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της ηπατικής δυσλειτουργίας και της ίνωσης σε πολλές μελέτες. Ο επιπολασμός της θρομβοπενίας εξαρτάται από τους ακριβείς ορισμούς που χρησιμοποιούνται και τον πληθυσμό ασθενών που μελετάται με μη κιρρωτικούς ασθενείς, με τη χρόνια ηπατική νόσο να έχει χαμηλότερα ποσοστά της θρομβοπενίας (6%). Στην κίρρωση του ήπατος, η ήπια έως μέτρια θρομβοπενία είναι συχνή, εμφανίζεται έως και στο 76% των ασθενών, αν και μόνο το 13% των ασθενών έχει πιο σοβαρή θρομβοπενία. Δυσλειτουργία αιμοπεταλίων έχει επίσης αναφερθεί σε ορισμένους ασθενείς με σοβαρή ηπατική νόσο, συμπεριλαμβανομένων ελαττωματικής σύνθεσης TxA2, ανεπάρκειας δεξαμενής αποθήκευσης, και ανωμαλιών του GPIb. Σε αντίθεση με ασθενείς με ουραιμία στους οποίους μελέτες πήξης γενικά δεν μεταβάλλονται σημαντικά, οι ασθενείς με ηπατική νόσο έχουν συχνά παράταση του χρόνου προθρομβίνης και ενεργοποιημένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης επειδή πολλαπλοί παράγοντες πήξης είναι χαμηλοί στο πλάσμα σε αναλογία με το βαθμό δυσλειτουργίας στη σύνθεση πρωτεϊνών. Η θρόμβωση της πυλαίας φλέβας αναπτύσσεται στο 10% έως 20% των ασθενών με κίρρωση, ενώ υπάρχουν και πολλές αναφορές για εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης και ανάπτυξης εμβολικής νόσου (Lambert, 2016).

1.3 Αιμοπετάλια, αντίσταση στην ινσουλίνη και διαβήτης

1.3.1 Σακχαρώδης διαβήτης και μεταβολικό περιβάλλον της νόσου

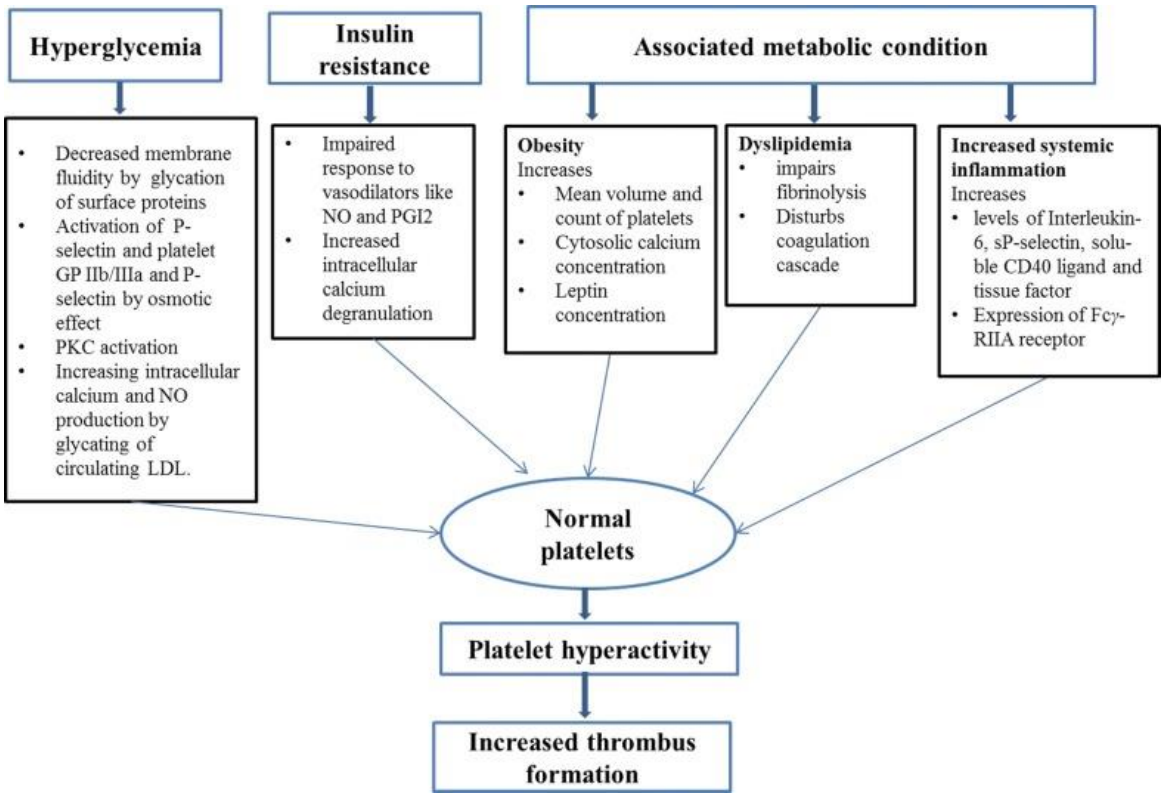
Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια χρόνια υπεργλυκαιμική πάθηση που αποδίδεται σε ελαττωματική έκκριση ή δράση ινσουλίνης ή και στα δύο. Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κύησης. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2), είναι η πιο διαδεδομένη μορφή διαβήτη και αντιπροσωπεύει περίπου το 90-95% των συνολικών περιπτώσεων διαβήτη παγκοσμίως. Η επίπτωση και ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη αυξάνεται ραγδαία παγκοσμίως. Ο ΣΔ2 χαρακτηρίζεται από προοδευτική ανεπάρκεια ινσουλίνης και διαταραχή της λειτουργίας των β-κυττάρων στο πάγκρεας, που προσθετικά οδηγούν στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Είναι μια πολυσυστηματική νόσος που επηρεάζει την ικανότητα του σώματος να χρησιμοποιεί γλυκόζη και σχετίζεται τόσο με μικροαγγειακές όσο και με μακροαγγειακές επιπλοκές. Στις μικροαγγειακές επιπλοκές περιλαμβάνεται η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η νευροπάθεια και η νεφροπάθεια. Οι μακροαγγειακές επιπλοκές εκδηλώνονται ως επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση που οδηγεί σε σοβαρή περιφερική αγγειακή νόσο, πρόωρη στεφανιαία νόσο (CAD) και αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλοαγγειακών παθήσεων. Η αθηροσκλήρωση έχει τεκμηριωθεί ότι είναι ο βασικός παράγοντας που οδηγεί σε αγγειακές επιπλοκές σε ασθενείς με ΣΔ2. Περίπου το 80% της διαβητικής θνησιμότητας αποδίδεται στα θρομβωτικά επεισόδια, από τα οποία το 75-80% των θανάτων προκαλούνται από καρδιαγγειακές επιπλοκές. Επιπλέον, οι ασθενείς με ΣΔ2 έχουν διπλάσιο έως τέσσερις φορές υψηλότερο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων αθηροθρομβωτικών επεισοδίων και αγγειακών επιπλοκών σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς ΣΔ (Kaur et al., 2018).

Το μεταβολικό περιβάλλον του ΣΔ2, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης στην ινσουλίνη, της υπεργλυκαιμίας και της απελευθέρωσης περίσσειας ελεύθερων λιπαρών οξέων, μαζί με άλλες μεταβολικές ανωμαλίες επηρεάζει το αγγειακό τοίχωμα από μια σειρά συμβάντων όπως ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, υπερκινητικότητα αιμοπεταλίων, οξειδωτικό στρες και υποκλινική φλεγμονή. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι το γεγονός που πυροδοτεί τους φλεγμονώδεις μηχανισμούς που

σχετίζονται με αγγειακές επιπλοκές σε ασθενείς με ΣΔ2. Η ενεργοποίηση αυτών των συμβάντων ενισχύει περαιτέρω την αγγειοσυστολή και προάγει το σχηματισμό θρόμβων, με αποτέλεσμα τελικά την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Στην προθρομβωτική αυτή κατάσταση η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων διαδραματίζει κεντρικό ρόλο. Ενεργοποίηση του ενδοθηλίου με αυξημένη απελευθέρωση κυτταροκινών και έκφραση μορίων προσκόλλησης μεσολαβεί στην ενεργοποίηση και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Η εξασθενημένη ενδογενή αναστολή των αιμοπεταλίων καθιστά τα αιμοπετάλια πιο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση και το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο παρέχει περισσότερα μόρια προσκόλλησης και αγωνιστές αιμοπεταλίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στη συνέχεια μεσολαβούν στην πρόσληψη λευκοκυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούνται με επακόλουθη αλληλεπίδραση. Στη συνέχεια, μετά από σταθερή προσκόλληση στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν και παρουσιάζονται στα λιπίδια και τα κύτταρα στο τοίχωμα των αγγείων. Αυτό επιταχύνει τις περαιτέρω φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο αγγειακό τοίχωμα και προάγει τις αθηροσκληρωτικές αγγειακές επιπλοκές. Όλα αυτά τα στοιχεία υποστηρίζονται από κλινικές δοκιμές που αναφέρουν τη σημασία της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και της υπερδραστηριότητας των αιμοπεταλίων στην παθογένεση των αθηροσκληρωτικών αγγειακών επιπλοκών.

Το ενδοθήλιο περιλαμβάνει ένα στρώμα κυττάρων που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια του αγγειακού αυλού και δρα ως εμπόδιο μεταξύ του αίματος και του τοιχώματος των αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτελούν πολλαπλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της κυτταρικής προσκόλλησης, της ανάπτυξης των ιστών και του μεταβολισμού, της αγγειογένεσης, των φλεγμονωδών αποκρίσεων, της ακεραιότητας των αγγείων, της αιμόστασης, της αγγειακής διαπερατότητας, του πολλαπλασιασμού των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, της ινωδόλυσης, του σχηματισμού θρόμβων και της διατήρησης του αίματος. Το ενδοθήλιο είναι επίσης υπεύθυνο για τη διατήρηση του αγγειακού τόνου με την παραγωγή αγγειοδιασταλτικών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένου του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της προστακυκλίνης (PGI2) και αγγειοσυσταλτικών μεσολαβητών όπως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), η αγγειοτενσίνη II και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν επίσης προθρομβωτικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα Von Willebrand (vWF) (προάγει τη

συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων), τον αναστολέα-1 ενεργοποιητή πλασμινογόνου (PAI-1) (αναστέλλει την ινωδόλυση) και τα αντιθρομβωτικά μόρια που περιλαμβάνουν NO και PGI2 (αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων) (Kaur et al., 2018).



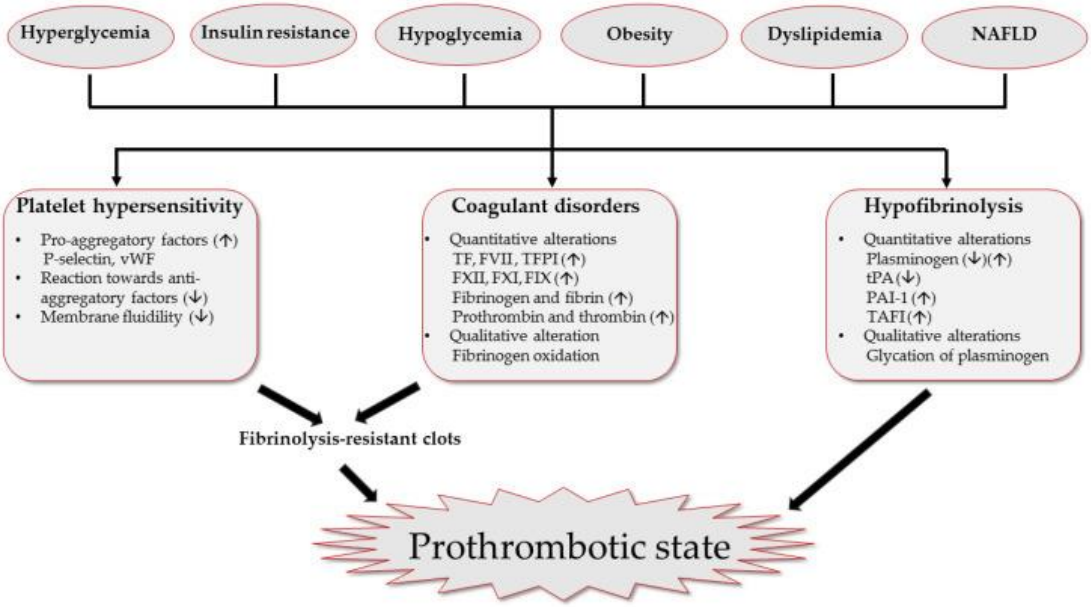
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση διάφορων βιοχημικών παραγόντων που ευθύνονται για την υπερδραστηριότητα των αιμοπεταλίων στον ΣΔ2 (Kaur et al., 2018)

Με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά ενδείξεις ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη ενισχύει την προσκόλληση, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Καθώς, έχει τεκμηριωθεί ότι η συσσώρευση αιμοπεταλίων από την αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται με θρομβωτικές επιπλοκές. Περαιτέρω έρευνα των μηχανισμών υποδηλώνουν ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να αυξήσει τον αριθμό και τον όγκο των αιμοπεταλίων και να προάγει τη δράση της ινσουλίνης στη σηματοδότηση και τη λειτουργία των αιμοπεταλίων μέσω της επαγωγής του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα-1 (IGF-1)- και του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα-2 (IGF-2) μέσω φωσφορυλίωσης των IRS-1, Akt και GSK3beta και εκκίνηση της ενεργοποίησης αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση εκκινητών CRP και μηχανισμών που εξαρτώνται από cGMP και NO. Η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται με τις ανωμαλίες του αγγειακού ενδοθηλίου που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυξημένη πρόσφυση και συσσώρευση αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Deng et al., 2017).

1.3.2 Επιδράσεις της υπεργλυκαιμίας και του σακχαρώδη διαβήτη στην πήξη και την αιμόσταση

Σε ασθενείς με διαβήτη, οι μεταβολικές διαταραχές διαταράσσουν τη φυσιολογική ισορροπία της πήξης και της ινωδόλυσης, οδηγώντας σε μια προθρομβωτική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υπερευαισθησία στα αιμοπετάλια, διαταραχές πήξης και υποϊνωδόλυση. Η υπεργλυκαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη προκαλούν αλλαγές στον αριθμό και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς και ποιοτικές ή/και ποσοτικές τροποποιήσεις των πηκτικών και ινωδολυτικών παραγόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβων ανθεκτικών στην ινωδόλυση σε ασθενείς με διαβήτη. Άλλοι συνυπάρχοντες παράγοντες όπως η υπογλυκαιμία, η παχυσαρκία και η δυσλιπιδαιμία συμβάλλουν επίσης σε διαταραχές πήξης σε ασθενείς με διαβήτη. Η διαχείριση της προθρομβωτικής κατάστασης περιλαμβάνει αντιαιμοπεταλιακές και αντιπηκτικές θεραπείες για ασθενείς με διαβήτη με ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου είτε με υψηλότερο κίνδυνο δημιουργίας θρόμβου, αλλά οι τρέχουσες κατευθυντήριες γραμμές δεν έχουν συστάσεις για τη βέλτιστη αντιθρομβωτική θεραπεία για αυτούς τους ασθενείς. Οι μεταβολικές βελτιστοποιήσεις όπως ο έλεγχος της γλυκόζης, η μείωση των λιπιδίων και η απώλεια βάρους βελτιώνουν επίσης τις διαταραχές πήξης των ασθενών με διαβήτη. Ενδιαφέροντα, φάρμακα μείωσης της γλυκόζης, ειδικά καρδιαγγειακά ευεργετικά μέσα, όπως αγωνιστές υποδοχέα πεπτιδίου-1 τύπου γλυκαγόνης και αναστολείς συν-μεταφορέα γλυκόζης νατρίου, έχουν αποδειχθεί ότι ασκούν άμεσες αντιπηκτικές επιδράσεις σε ασθενείς με διαβήτη.

Η πήξη και η αιμόσταση περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιστών και παραγόντων πήξης καθώς και αίματος και ενδοθηλιακών κυττάρων, καταλήγοντας τελικά στο σχηματισμό θρόμβων ινώδους που σταματούν την αιμορραγία. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το ινωδολυτικό σύστημα αποσυνθέτει τους δημιουργούμενους θρόμβους για να αποτρέψει τον εκτεταμένο σχηματισμό θρόμβων και την αγγειακή απόφραξη. Σε ασθενείς με ΣΔ, οι μεταβολικές διαταραχές διαταράσσουν αυτούς τους φυσιολογικούς μηχανισμούς, οδηγώντας σε μια προθρομβωτική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υπερευαισθησία στα αιμοπετάλια, διαταραχές του παράγοντα πήξης και υποινιδόλυση.



Εικόνα 5: Τροποποιήσεις του συστήματος πήξης και ινωδόλυσης σε ΣΔ (Li et al., 2021)

Η υπεργλυκαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη ενισχύουν τον αριθμό και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της αύξησης του επιπέδου του παράγοντα Von Willebrand (vWF) και της αναστολής της αντισυσσωματωτικής αποτελεσματικότητας του μονοξειδίου του αζώτου και της προσταγλανδίνης I2. Η υπεργλυκαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη αυξορυθμίζουν το επίπεδο των μεσολαβητών πήξης όπως ο ιστικός παράγοντας (TF), οι παράγοντες πήξης (FVII, FXII, FXI και FIX) και η θρομβίνη. Ο διαβήτης διαταράσσει επίσης την ινωδόλυση μειώνοντας τον ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου (tPA) καθώς και αυξάνοντας τον αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1) και τον αναστολέα ινωδόλυσης ενεργοποιητή θρομβίνης (TAFI). Εκτός από την υπεργλυκαιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη, οι συνυπάρχουσες μεταβολικές διαταραχές όπως η υπογλυκαιμία, η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία και η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) συμβάλλουν επίσης στην προθρομβωτική κατάσταση των ασθενών με ΣΔ.

Επιπλέον, η υψηλή γλυκόζη στο αίμα επιδεινώνει τη φυσιολογική αντίδραση των αιμοπεταλίων στις αντισυσσωματωτικές επιδράσεις του μονοξειδίου του αζώτου (NO), της προσταγλανδίνης I2 (PGI2) και της ινσουλίνης, παρεμβαίνοντας στις ανασταλτικές οδούς σηματοδότησης. Τόσο η οξεία όσο και η χρόνια υπεργλυκαιμία αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων

(π.χ. CD31, CD49b και CD63), μια επίδραση που είναι αναστρέψιμη με τη βελτιστοποίηση του ελέγχου της γλυκόζης. Η χρόνια υπεργλυκαιμία αυξάνει την έκφραση του ενεργοποιημένου από πρωτεάση υποδοχέα 4 σε ασθενείς με ΣΔ, προάγοντας με τη σειρά του την απελευθέρωση ενεργοποιημένων μικροσωματιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια (PMPs) μέσω της οδού Ca2+-καλπαΐνης. Τα PMP ενεργοποιούν έπειτα την έκκριση ιντερλευκίνης-6, ενός προθρομβωτικού και προφλεγμονώδους μεσολαβητή στον διαβήτη. Μέσω της γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης, η υπεργλυκαιμία μειώνει επίσης τη ρευστότητα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και οδηγεί σε αυξημένη ενδοκυτταρική εισροή ασβεστίου, προάγοντας άμεσα την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η υπεργλυκαιμία επίσης βλάπτει τη λειτουργία του ενδοθηλίου προκαλώντας φλεγμονή και οξειδωτικό στρες, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση και την απελευθέρωση των PGI2 και NO, προάγοντας τελικά περαιτέρω τη συσσώρευση αιμοπεταλίων (Li et al., 2021).

1.3.3 Αντίσταση στην ινσουλίνη

Οι ασθενείς με ΣΔ2 είχαν μεγαλύτερο μέσο όγκο αιμοπεταλίων (MPV) και αυξημένη παραγωγή αιμοπεταλίων σε σύγκριση με ασθενείς με ΣΔ1. Δεδομένου ότι ο ΣΔ1 χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια ινσουλίνης και ο ΣΔ2 χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη, αυτά τα δεδομένα μπορεί να υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της ευαισθησίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη στη δυσλειτουργία της πήξης. Ένας πιθανός υποκείμενος μηχανισμός είναι μια τροποποιημένη σηματοδότηση ινσουλίνης στα αιμοπετάλια που σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη: σε υγιή άτομα, η ινσουλίνη δεσμεύεται με υποδοχείς ινσουλίνης στις επιφάνειες των αιμοπεταλίων οδηγώντας στην παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και χαμηλότερο ενδοκυτταρικό ασβέστιο μέσα στα αιμοπετάλια, αναστέλλοντας έτσι τη συσσώρευσή τους (Li et al., 2021). Αντίθετα, το διαβητικό αιμοπετάλιο χαρακτηρίζεται από αυξημένο κύκλο εργασιών αιμοπεταλίων, αυξημένο ενδοκυτταρικό Ca2+, αυξημένη ρύθμιση της σηματοδότησης P2Y12 και από οξειδωτικό στρες, αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης και γλυκοπρωτεΐνης, μειωμένη ανταπόκριση σε NO και προστακυκλίνη, αντίσταση στην ασπιρίνη, μειωμένη ρευστότητα μεμβράνης. Οι κύριοι υπαίτιοι αυτών των κυτταρικών ανωμαλιών είναι οι

μεταβολικές διαταραχές που χαρακτηρίζουν το ΣΔ2 όπως αντίσταση στην ινσουλίνη, υπεργλυκαιμία, διαβητική δυσλιπιδαιμία, παχυσαρκία και υποκλινική φλεγμονή (Kaur et al., 2018; Rollini et al., 2013).

1.4 Φαινολικά συστατικά ελαιολάδου – Βιολογικές δράσεις

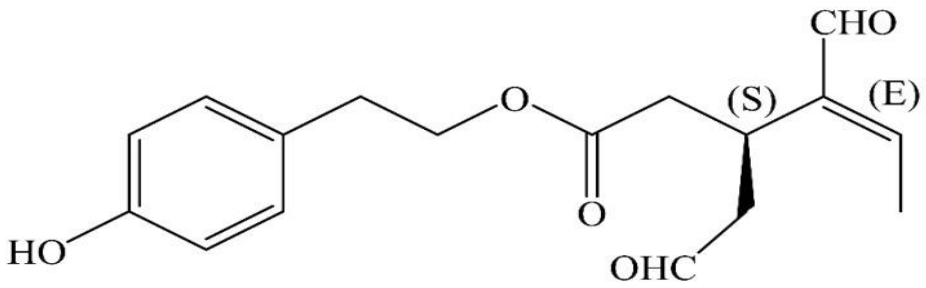
1.4.1 Χημικές ενώσεις ελαιόλαδου – πολυφαινολικές ενώσεις

Το ελαιόλαδο είναι η κύρια πηγή διατροφικού λίπους στη μεσογειακή διατροφή. Η ημερήσια πρόσληψη ελαιολάδου στους μεσογειακούς πληθυσμούς εκτιμάται στα 30–50 mL. Η υψηλή διατροφική πρόσληψη ελαιολάδου σχετίζεται με χαμηλότερες περιπτώσεις καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων, μεταβολικών παθήσεων, νόσου Alzheimer και οστεοπόρωσης. Το ελαιόλαδο και οι φαινολικές ενώσεις του είναι γνωστό ότι διαθέτουν βιολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών και αντιδιαβητικών δράσεων. Η διαιτητική πρόσληψη παρθένου ελαιολάδου έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή σε ανθρώπινες μελέτες. Το παρθένο ελαιόλαδο έχει αρκετές βιολογικές δραστηριότητες που δεν έχουν άλλα φυτικά έλαια. Για παράδειγμα, αναφέρθηκε ότι η ημερήσια πρόσληψη έξτρα παρθένου ελαιολάδου για έξι μήνες βελτίωσε τη συναπτική ακεραιότητα και μείωσε τη συσσώρευση αδιάλυτων πρωτεϊνών σε ένα μοντέλο αρουραίου με νόσο του Αλτσχάιμερ. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι το παρθένο ελαιόλαδο προστατεύει τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας από την οξείδωση σε ασθενείς, ενώ το ηλιέλαιο όχι. Το ηλιέλαιο και το καλαμποκέλαιο απέτυχαν να επιδείξουν τις ίδιες αντιμικροβιακές δράσεις με εκείνες του παρθένου ελαιολάδου. Τα τριγλυκερίδια του ελαϊκού οξέος είναι το κύριο συστατικό του ελαιολάδου. Ωστόσο, τα ευεργετικά αποτελέσματα του ελαιολάδου μπορεί να προκύψουν από τα δευτερεύοντα συστατικά της ελιάς. Περισσότερες από 200 διαφορετικές χημικές ενώσεις ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών οξέων, στερολών, καροτενοειδών, τερπενοειδών, φλαβονοειδών, τοκοφερολών και πολυφαινολών της ελιάς. Οι πολυφαινόλες της ελιάς είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και αποτελούνται από πολλαπλές φαινολικές δομές. Παραδείγματα κύριων πολυφαινολών της ελιάς είναι η

τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, η ελαιοκανθάλη (OC), η ελαιασίνη, η λιγκστροσίδη της ελιάς και η ελευρωπαΐνη. Μεταξύ αυτών των πολυφαινολών της ελιάς, η OC λαμβάνει περισσότερη επιστημονική προσοχή λόγω των ενδιαφέρων βιολογικών της δραστηριοτήτων, παρόλο που αποτελεί μόνο το 10% των πολυφαινολών της ελιάς (100–300 mg/kg ελαιόλαδο).

1.4.2 Ελαιοκανθάλη (OC)

Η OC ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1992 και η χημική της δομή αποκαλύφθηκε από τους Montedoro et al. το 1993. Η χημική σύνθεση της OC έχει επιχειρηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Η φυσική OC υπάρχει στη διαμόρφωση S του χειρόμορφου άνθρακα, ενώ η συνθετική OC υπάρχει στη διαμόρφωση R. Το όνομα OC αποδόθηκε από τους Beauchamp et al. (2005), όπου το oleo- σημαίνει ελιά, το -canth- για την αίσθηση του τσιμπήματος και το -al για την παρουσία ομάδων αλδεΰδης στη χημική του δομή. Το όνομα της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) για την OC είναι 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθυλ(3S,4E)-4-φορμυλ-3-(2-οξοαιθυλο)εξ-4-ενοϊκό και με αριθμό CAS 289030-99-5.



Εικόνα 6: Η χημική δομή για τη φυσική OC ("Oleocanthal," 2022)

Η OC μεταβολίζεται κυρίως μέσω του μεταβολισμού της φάσης I, δηλαδή της υδρογόνωσης, της υδροξυλίωσης και της ενυδάτωσης. Μερικοί από τους υδρογονωμένους μεταβολίτες της OC μεταβολίζονται περαιτέρω μέσω του μεταβολισμού της φάσης II, δηλαδή της γλυκουρονιδίωσης (Pang and Chin, 2018).

1.4.2.1 Αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες της ΟC

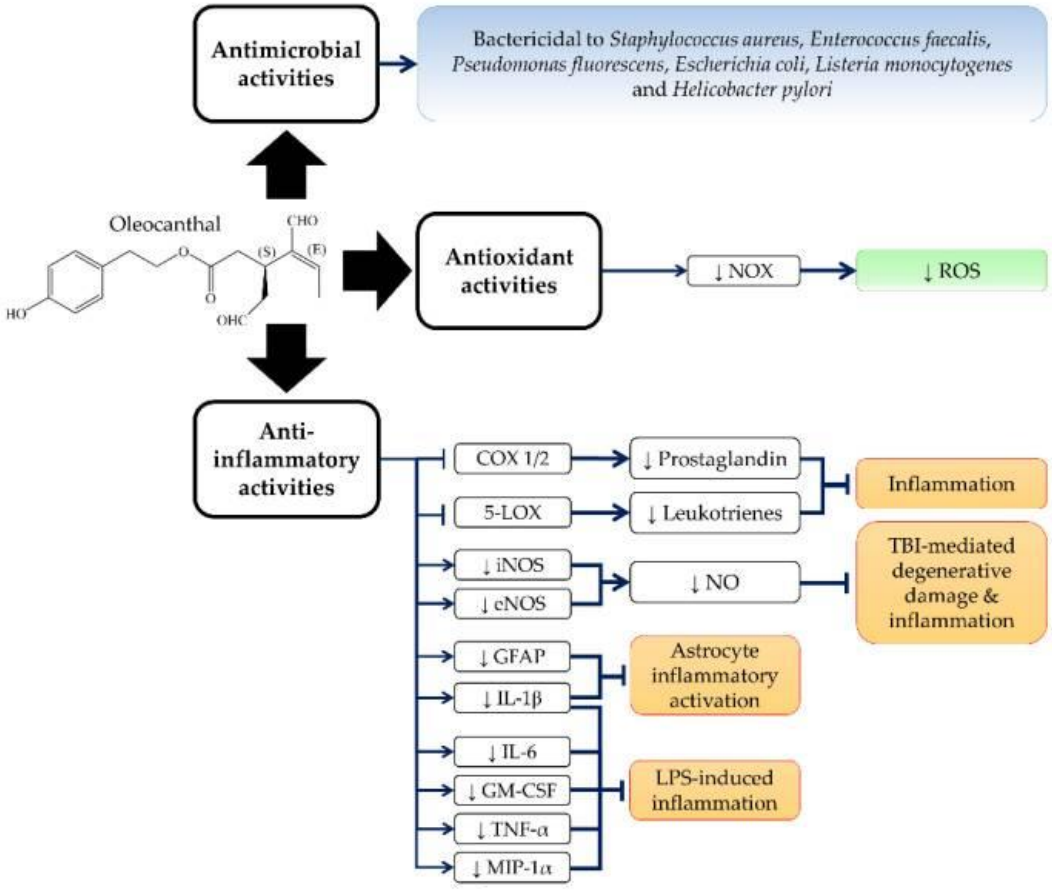
Η ΟC είναι υπεύθυνη για την πικάντικη και ερεθιστική αίσθηση του παρθένου ελαιολάδου στο λαιμό και την στοματοφαρυγγική περιοχή. Μια μοριακή μελέτη που διεξήχθη από τους Peyrot des Gachons et al. (2011) εντόπισαν ότι η σχετιζόμενη με την ΟC αίσθηση ερεθισμού στο λαιμό προκλήθηκε μέσω της ενεργοποίησης του υποτύπου A1 (TRPA1) του καναλιού κατιόντων δυνητικού παροδικού υποδοχέα (Gachons et al., 2011). Οι μελέτες δομικής δραστηριότητας αποκάλυψαν περαιτέρω ότι η μεσολαβούμενη από ΟC ενεργοποίηση TRPA1 εξαρτιόταν σε μεγάλο βαθμό από τα ακόρεστα καρβονυλικά τμήματα διαλδεΰδης.

Η ΟC έχει παρόμοια αίσθηση ερεθισμού του λαιμού με την ιβουπροφαίνη (μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, ΜΣΑΦ), αν και είναι δομικά διακριτά. Η ΟC αναστέλλει τις δραστικότητες της κυκλοοξυγενάσης-1 και -2 (COX1 και COX2), των ενζύμων που καθορίζουν τον ρυθμό για τη σύνθεση των προσταγλανδινών, οι οποίες ρυθμίζουν τη φλεγμονή. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της ΟC έχουν αποδειχθεί ότι είναι πιο ισχυρές από την ιβουπροφαίνη. Εφόσον η ενεργοποίηση του TRPA1 έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί νευρογενή και χρόνια φλεγμονή, η αντιφλεγμονώδης δράση της ΟC μπορεί να σχετίζεται με αυτόν τον υποδοχέα. Επιπλέον, η ΟC αποδείχθηκε ότι αναστέλλει σημαντικά την προκαλούμενη από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) αυξορύθμιση του COX2 mRNA με 96% αναστολή σε απομονωμένα ανθρώπινα φυσιολογικά μονοκύτταρα. Περαιτέρω, η ΟC ανέστειλε τη δραστηριότητα της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης 5-λιποξυγενάσης (5-LOX) σε 52,2 ± 0,6% σε συγκέντρωση 10 μM, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στη δραστηριότητα της 15-λιποξυγενάσης (15-LOX). Η 5-LOX είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση των προφλεγμονωδών λευκοτριενίων. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου που σχετίζονται με τα ΜΣΑΦ προκαλούνται εν μέρει από την αδυναμία τους να αναστέλλουν την 5-LOX. Ως εκ τούτου, η ΟC χρησιμεύει ως καλύτερος υποψήφιος ΜΣΑΦ αναστέλλοντας τα COX1/2 και 5-LOX ταυτόχρονα.

Έχει αναφερθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ΟC και της αντιμικροβιακής δράσης του παρθένου ελαιολάδου έναντι της Escherichia coli και της Salmonella enterica. Επιπλέον, η ΟC ασκεί σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι

της Listeria monocytogenes και θα μπορούσε να εξαλείψει εντελώς την ανάπτυξη των στελεχών του Helicobacter pylori LMG 19449 ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ελαιολάδου και των πολυφαινολών του έχουν αναφερθεί ξανά στο παρελθόν. Ωστόσο, οι μελέτες για τις αντιοξειδωτικές δράσεις της OC είναι περιορισμένες. Η OC (100 μM) αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης (NOX) και μείωσε περαιτέρω το ενδοκυτταρικό επίπεδο ανιόντων υπεροξειδίου (μείωση 36% σε σύγκριση με τον έλεγχο) σε απομονωμένα ανθρώπινα μονοκύτταρα (Pang and Chin, 2018).



Εικόνα 7: Αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις της OC (Pang and Chin, 2018)

Η χρόνια φλεγμονή χρησιμεύει ως παράγοντας προαγωγής στο πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης, ειδικά στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ως εκ τούτου, η OC μπορεί να χρησιμεύσει ως χημειοπροληπτικός υποψήφιος στα τρόφιμα λόγω των υποσχόμενων αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της. Επιπλέον, η OC έχει δείξει κάποιες υποσχόμενες αντικαρκινικές δραστηριότητες σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές

που προέρχονται από μελάνωμα, καρκίνο του μαστού (Mohyeldin et al., 2016), καρκίνο προστάτη, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Cusimano et al., 2017), καρκίνο του παχέος εντέρου, πολλαπλό μυέλωμα και λευχαιμία. Η δράση της OC είναι εκλεκτική στα καρκινικά κύτταρα και έχει λιγότερες ή καθόλου κυτταροτοξικές επιδράσεις σε πρωτογενείς ή μη ογκογενείς κυτταρικές σειρές.

Ωστόσο, μια υψηλή συγκέντρωση OC (25 μM) αποδείχθηκε ότι είναι κυτταροτοξική για τα ανθρώπινα χονδρογονικά κύτταρα ATDC-5 με ενεργοποίηση p38. Επιπλέον, οι αντικαρκινικές δραστηριότητες της OC έχουν αποδειχθεί σε μελέτες σε ζώα. Η OC ανέστειλε την ανάπτυξη και τη μετάσταση όγκου ξενομοσχευμάτων καρκινικών κυττάρων χωρίς να παράγει σημαντικές τοξικές επιδράσεις σε αθυμικά γυμνά ποντίκια (Pang and Chin, 2018).

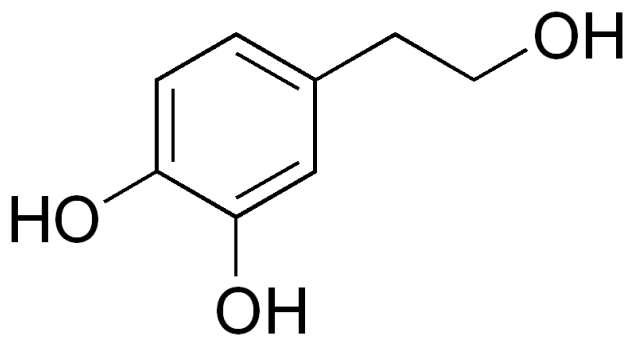
1.4.2.2 Νευροπροστατευτικές Επιδράσεις της Ελαιοκανθάλης (OC)

Η OC έχει δείξει πολλά υποσχόμενα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα σε in vitro και in vivo μελέτες. Συγκεκριμένα, η OC μπόρεσε να διασυνδέσει και να καταργήσει την ινιδοποίηση της πρωτεΐνης κατασκευής tau T40 και K18 μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης σε μια in vitro δοκιμασία. Αποδείχθηκε επίσης ότι η OC ότι αναστέλλει τη συσσώρευση πρωτεΐνης tau που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ σε ινιδώδεις δομές (Pang and Chin, 2018). Επιπροσθέτως, η OC αναφέρθηκε επίσης ότι επάγει εκροή και κάθαρση αμυλοειδούς β (Αβ) σε ένα in vitro μοντέλο της νόσου του Alzheimer (Qosa et al., 2015). Επιπλέον, η OC προήγαγε την αποικοδόμηση του Αβ, μείωσε την αστροκυτταρική φλεγμονώδη ενεργοποίηση και αποκατέστησε την έκφραση της νευρο-υποστηρικτικής πρωτεΐνης σε κύτταρα αστροκυττάρων και νευροβλαστώματος (Batarseh et al., 2017). Η OC έχει προταθεί ότι δρα απευθείας στα νευρωνικά κύτταρα, αλλά όχι στα αστροκύτταρα, κατά την άσκηση των νευροπροστατευτικών της επιδράσεων.

1.4.3 Υδροξυτυροσόλη (HT)

Η υδροξυτυροσόλη (HT) είναι ένα φαινυλαιθανοειδές, ένας τύπος φαινολικού φυτοχημικού, ανήκει στις πολυφαινόλες, με αντιοξειδωτικές ιδιότητες in vitro. Στη

φύση, η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται κυρίως σε ελιές, φύλλα ελιάς και ελαιόλαδο με τη μορφή του εστέρα του ελενολικού οξέος, της ελευρωπαΐνης. Το κατά IUPAC όνομα της HT είναι 4-(2-Υδροξυαιθυλ)βενζολο-1,2-διόλη και CAS αριθμό 10597-60-1 ("Hydroxytyrosol," 2022). Στη φύση, η υδροξυτυροσόλη παράγεται από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης που συμβαίνει κατά την ωρίμανση της ελιάς. Η ελευρωπαΐνη συσσωρεύεται στα φύλλα και στους καρπούς της ελιάς ως αμυντικός μηχανισμός έναντι παθογόνων και φυτοφάγων. Κατά την ωρίμανση της ελιάς ή όταν ο ιστός της ελιάς έχει υποστεί βλάβη από παθογόνα, φυτοφάγα ή μηχανική βλάβη, το ένζυμο β-γλυκοσιδάση καταλύει τη σύνθεση υδροξυτυροσόλης μέσω υδρόλυσης από ελευρωπαΐνη.



Εικόνα 8: Η χημική δομή της HT ("Hydroxytyrosol," 2022)

1.4.3.1 Οφέλη της υγείας από την υδροξυτυροσόλη

Οι ευεργετικές της ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία σχετίζονται στενά με την ικανότητα του μορίου να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου/αζώτου καθώς και να ενεργοποιεί ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα στο σώμα. Οι ιδιότητες δέσμευσης ελεύθερων ριζών της HT έχουν επιβεβαιωθεί πειστικά σε μελέτες σε αρουραίους με σακχαρώδη διαβήτη που προκαλείται από αλλοξάνη. Οι μελέτες για την κυτταρική σειρά λιποκυττάρων 3T3-L1 έχουν δείξει ότι η HT διεγείρει τη μιτοχονδριακή βιοσύνθεση η οποία μειώνεται στην πορεία του σακχαρώδους διαβήτη. Πιθανότατα, η HT αυξάνει το μονοπάτι της μιτοχονδριακής βιοσύνθεσης μέσω της ανοδικής ρύθμισης του PGC-1α. Σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης στα λιποκύτταρα αυξάνουν την έκφραση όλων των συμπλοκών της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένης της συνθάσης ATP. Η HT προστατεύει τα μιτοχόνδρια από τη μείωση της σύνθεσης του μιτοχονδριακού DNA και ρυθμίζει τη δραστηριότητα των κρίσιμων παραγόντων μεταγραφής, όπως ο

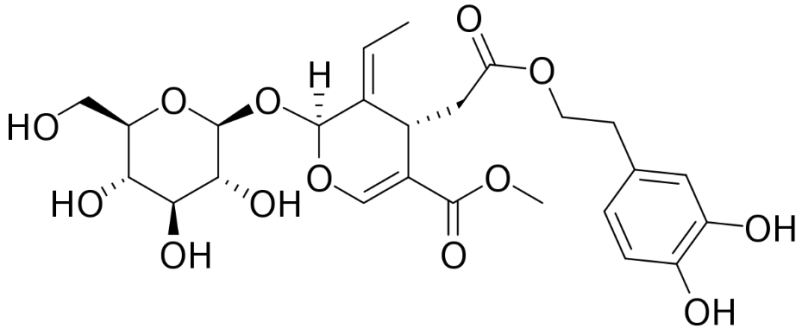
Nrf1 (πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας 1) και ο Tfam (παράγοντας μεταγραφής Α, μιτοχονδριακός). Όλες αυτές οι μοναδικές ιδιότητες της ΗΤ αποδίδονται σε πιθανή μείωση του κινδύνου για την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

1.4.3.2 Αντικαρκινική δράση της υδροξυτυροσόλης

Η θεραπεία των ανθρώπινων κυττάρων του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου με πολυφαινόλες ελαιολάδου ανέστειλε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρά τις σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης στο ελαιόλαδο, οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε εύρος υψηλών μικρογραμμομοριακών συγκεντρώσεων στο κόλον μετά από γαστρική υδρόλυση και κολική ζύμωση σεκοϊριδοειδών που υπάρχουν φυσικά στο ελαιόλαδο. Στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου η ΗΤ μειώνει το επίπεδο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) προάγοντας την αποδόμησή του. Το EGRF είναι ένας από τους βασικούς υποδοχείς που πυροδοτούν την καρκινογένεση του παχέος εντέρου καθώς ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η ΗΤ βρέθηκε να είναι ένας αποτελεσματικός κυτταροτοξικός παράγοντας σε μοντέλα κυττάρων καρκίνου του μαστού. Ανέστειλε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1 μειώνοντας το επίπεδο της κυκλίνης D1 (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

1.4.4 Ελευρωπαΐνη (ΟΕ)

Η ελευρωπαΐνη είναι ένα γλυκοζυλιωμένο (σεκο)ιριδοειδές, ένας τύπος φαινολικής πικρής ένωσης που βρίσκεται στο δέρμα, τη σάρκα, τους σπόρους και τα φύλλα της πράσινης ελιάς και το έλαιο αργκάν. Ο όρος ελευρωπαΐνη προέρχεται από τη βοτανική ονομασία της ελιάς, Olea europaea. Λόγω της πικρής γεύσης της, η ελευρωπαΐνη πρέπει να αφαιρεθεί εντελώς ή να αποσυντεθεί για να γίνουν βρώσιμες οι ελιές. Το κατά IUPAC όνομα της είναι Μεθυλ (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-Διυδροξυφαινυλ) αιθοξυ]-2-οξοαιθυλ} -3-αιθυλιδενο-2- {[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6- (υδροξυμεθυλ) οξαν - 2-υλ]οξυ}-2Η-πυραν-5-καρβοξυλικό και CAS αριθμό 32619-42-4 (“Oleuropein,” 2022).



Εικόνα 9: Η χημική δομή της ΟΕ ("Oleuropein," 2022)

1.4.4.1 Ευεργετικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης

Η ΟΕ είναι αποτελεσματική έναντι διαφόρων στελεχών βακτηρίων, ιών, μυκήτων και επίσης μούχλας ή ακόμα και παρασίτων. Επιπλέον, αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η από του στόματος θεραπεία με ελευρωπαΐνη οδηγεί σε μειωμένο αριθμό αιμοφόρων αγγείων που αποδεικνύουν ισχυρές αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες. Οι φαινολικές ενώσεις (ελευρωπαΐνη, πρωτοκατεχουϊκό οξύ) του παρθένου ελαιολάδου έχει επίσης αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την οξείδωση της LDL που προκαλείται από τα μακροφάγα. Τα εκχυλίσματα φύλλων και φρούτων ελιάς που περιέχουν ελευρωπαΐνη προστατεύουν τη β-κυτταρική σειρά που παράγει ινσουλίνη (INS-1) από τη βλαβερή επίδραση των κυτταροκινών (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

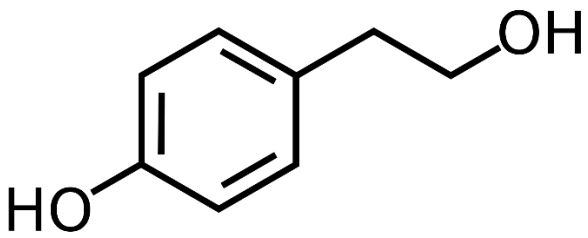
1.4.4.2 Αντικαρκινική δράση της ελευρωπαΐνης

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που επιβεβαιώνουν την αντικαρκινική δράση της ελευρωπαΐνης, όπως παρατηρείται σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως: αδενοκαρκίνωμα μαστού (κυτταρική σειρά MCF-7, MDA), μελάνωμα (κυτταρική σειρά RPMI 7951), καρκίνωμα ουροδόχου κύστης (κυτταρική σειρά T-24), αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (κυτταρική σειρά HT 29, Caco-2, LoVo), καρκίνος προστάτη (κυτταρική σειρά TF1), καρκίνωμα πνεύμονα (κυτταρική σειρά A549), γλοιοβλάστωμα (κυτταρική σειρά LN 18), αδενοκαρκίνωμα νεφρικών κυττάρων (κυτταρική σειρά 786-O) και γλοίωμα (κυτταρική σειρά U251, A172). Βρέθηκε ότι η ελευρωπαΐνη εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστικές, προαποπτωτικές επιδράσεις, συνολική αντικαρκινική δραστηριότητα και συγκεκριμένα ικανότητα μείωσης της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, καθώς και πρόκληση απόπτωσης καρκινικών

κυττάρων. Μπορεί να θεωρηθεί ως μια νέα αντικαρκινική ένωση για επικουρική θεραπεία που όχι μόνο στοχεύει διαφορετικά στάδια ανάπτυξης καρκίνου, αλλά και ανακουφίζει ορισμένες ανεπιθύμητες δράσεις κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας του καρκίνου. Όσον αφορά τις έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης, προστατεύει τα κύτταρα από γενετικές βλάβες, που οδηγούν δυνητικά σε ογκογένεση. Οι αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης εμποδίζουν ή τουλάχιστον επιβραδύνουν την ανάπτυξη όγκου (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

1.4.5 Τυροσόλη (T/ Tyr)

Η Tyr είναι ένα φαινυλαιθανοειδές, ένα παράγωγο της φαιναιθυλικής αλκοόλης. Είναι ένα φυσικό φαινολικό αντιοξειδωτικό που υπάρχει σε διάφορες φυσικές πηγές. Η κύρια πηγή στην ανθρώπινη διατροφή είναι το ελαιόλαδο. Στο ελαιόλαδο, η τυροσόλη σχηματίζει εστέρες με λιπαρά οξέα. Το όνομα της κατά IUPAC είναι 4-(2-Υδροξυαιθυλ)φαινόλη και CAS αριθμό 501-94-0 (“Tyrosol,” 2022).



Εικόνα 10: Η χημική δομή της Tyr (“Tyrosol,” 2022)

1.4.5.1 Οφέλη της υγείας από την τυροσόλη (Tyr)

Η Tyr είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό, οι ευεργετικές της ιδιότητες σχετίζονται στενά με την ικανότητα του μορίου να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη οξυγόνου/αζώτου καθώς και να ενεργοποιεί ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα στον οργανισμό. Οι ιδιότητες δέσμευσης ελεύθερων ριζών έχουν επιβεβαιωθεί πειστικά σε μελέτες με αρουραίους με σακχαρώδη διαβήτη που προκαλείται από αλλοξάνη.

Μελέτη διερεύνησης των επιδράσεων της Tyr στη διαμόρφωση των ανοδικών οδών που ρυθμίζουν την επαγόμενη από τον LPS φλεγμονώδη απόκριση, επιβεβαίωσε

ότι η Tyr θα μπορούσε να ασκήσει τα ευεργετικά της αποτελέσματα κατά της υπέρτασης, της αθηροσκλήρωσης, της στεφανιαίας νόσου, της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της παχυσαρκίας διαμορφώνοντας την ανοδική ρύθμιση της ομάδας διαφοροποίησης 14 (CD14) και αναστέλλοντας τη φλεγμονή (Chang et al., 2019).

Η Tyr μειώνει τις οξειδωτικές τροποποιήσεις σε HDL διατηρώντας τις φυσικοχημικές της ιδιότητες, βελτιώνει τη λειτουργικότητα της HDL και ιδίως την ικανότητα να προάγει την εκροή χοληστερόλης. Διαθέτει επίσης αντιαθηρογόνο δράση λόγω της αναστολής της παραγωγής λευκοτριενίου B4 που επηρεάζει την ενδοθηλιακή λειτουργία. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η Tyr επάγει την προστασία του μυοκαρδίου έναντι του στρες που σχετίζεται με την ισχαιμία και θα μπορούσε να θεωρηθεί ως θεραπεία κατά της γήρανσης (Karković Marković et al., 2019).

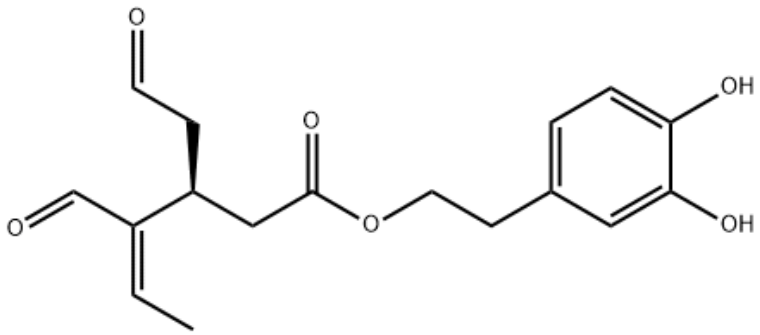
Η Tyr μπορεί επίσης να έχει καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Οι Samson et al. έδειξαν ότι τα ζώα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τυροσόλη εμφάνισαν σημαντική αύξηση στη φωσφορυλίωση των Akt, eNOS και FOXO3a. Επιπλέον, η τυροσόλη προκάλεσε την έκφραση της πρωτεΐνης SIRT1 στην καρδιά μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε επίμυες (Samuel et al., 2008).

Στην οξεία εγκεφαλική ισχαιμία-επαναιμάτωση, η Tyr μειώνει το ιξώδες του αίματος και την ένταση του οξειδωτικού στρες στον εγκεφαλικό ιστό. Η θεραπεία με Tyr βελτίωσε, επίσης, την υπεργλυκαιμία ρυθμίζοντας βασικά ένζυμα του μεταβολισμού των υδατανθράκων σε διαβητικούς αρουραίους που προκαλούνται από στρεπτοζοτοκίνη.

Αποδείχθηκε ότι η Tyr αναστέλλει τη λιπιδική σύνθεση σε πρωτογενώς καλλιεργημένα ηπατοκύτταρα αρουραίου. Η Tyr ασκεί επίσης ευεργετική επίδραση στη NAFLD, όπου το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που ευθύνονται για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου (Karković Marković et al., 2019).

1.4.6 Ελαιασίνη (OA)

Η ελαιασίνη είναι φαινολική ένωση και αλκοόλη. Αυτή η φυσική φαινολική ένωση έχει βρεθεί τόσο στο ελαιόλαδο όσο και στο γιασεμί. Είναι από τις πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Το όνομα της κατά την IUPAC είναι 2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)αιθυλ (Z)-4-φορμυλ-3-(2-οξοαιθυλ)εξ-4-ενοϊκός και έχει CAS αριθμό 149183-75-5 (PubChem, n.d.).



Εικόνα 11: Η χημική δομή της OA (PubChem, n.d.)

1.4.6.1 Οφέλη της υγείας από την ελαιασίνη (OA)

Η ελαιασίνη έχει συνδεθεί με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντι-πολλαπλασιαστική και αντιμικροβιακή δράση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μειώνει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Πρώτα, αναγνωρίστηκε ότι η ελαιασίνη δρα ως εκκαθαριστής ελεύθερων ριζών. Αργότερα, αποδείχθηκε ότι η αντιοξειδωτική της δράση σχετίζεται με επίδραση στη λειτουργία των ανθρώπινων ουδετερόφιλων. Μελέτες in vitro έδειξαν ότι η ελαιασίνη μειώνει την παραγωγή ROS από ουδετερόφιλα που διεγείρονται από N-Φορμυλμεθειονίνη-λευκυλ-φαινυλαλανίνη (f-MLP) και φορβολικό μυριστικό εστέρα (PMA). Τα διεγερμένα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν επίσης τη μυελοϋπεροξειδάση (MPO), η οποία είναι το ένζυμο που είναι ικανό να καταλύει το σχηματισμό HOCl, ενός εξαιρετικά δραστικού είδους υπεύθυνου για τις αντιδράσεις οξείδωσης και χλωρίωσης. Η ελαιασίνη μειώνει σημαντικά την απελευθέρωση MPO από τα ουδετερόφιλα με συγκρίσιμη δράση με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ινδομεθακίνη.

Επιπλέον, η ελαιασίνη ενισχύει την αντιφλεγμονώδη δράση των ανθρώπινων μακροφάγων αυξάνοντας την έκφραση του υποδοχέα CD163 και μειώνοντας την

απελευθέρωση ελαστάσης, MMP-9 και ιντερλευκίνης IL-8. Επιπλέον, αποτρέπει την αύξηση της έκφρασης CD11b/18 στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων καθώς και αναστέλλει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1, ICAM-1 και E-σελεκτίνης και κατά συνέπεια μειώνει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ανθρώπινα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ελαιασίνη έχει επίσης την ικανότητα να μειώνει την αποσταθεροποίηση της καρωτιδικής πλάκας και θα μπορούσε να είναι δυνητικά χρήσιμη στη μείωση του κινδύνου ισχαιμικού εγκεφαλικού.

Η ελαιασίνη υποδεικνύει μια προστατευτική δράση έναντι της συσσώρευσης κοιλιακού λίπους, της αύξησης βάρους και της στεάτωσης του ήπατος, με βελτίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων που εξαρτάται από την ινσουλίνη. Η ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη που σχετίζεται με δίαιτες πλούσιες σε λίπος (HFD) μπορεί να προληφθεί εν μέρει με την από του στόματος χορήγηση ελαιασίνης (Karković Marković et al., 2019).

1.5 Ελαιόλαδο και αιμοπετάλια

Το ελαιόλαδο είναι το λάδι που λαμβάνεται από τον καρπό των ελαιόδεντρων (Olea europaea L.). Σύμφωνα με το Παράρτημα VII (Μέρος VIII) του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1308/2013 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, Τα ελαιόλαδα μπορούν να ταξινομηθούν σε 8 κατηγορίες ποιότητας, συγκεκριμένα σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (EVOO), παρθένο ελαιόλαδο (VOO), ελαιόλαδο (OO), πυρηνέλαιο, λαμπάντε, εξευγενισμένο ελαιόλαδο, ραφιναρισμένο πυρηνέλαιο και ακατέργαστο πυρηνέλαιο. Ανάμεσά τους οι πρώτοι τέσσερις τύποι ΟΟ είναι οι εδώδιμοι. Όλα τα ΟΟ αποτελούνται από ένα σαπωνοποιήσιμο και ένα μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα. Το 98% του σαπωνοποιήσιμου κλάσματος αποτελείται από τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FA). Χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό MUFA, κυρίως ελαϊκό οξύ (55–83%) και μικρότερες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), κυρίως λινολεϊκό οξύ (3–21%) και κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) (παλμιτικό οξύ: 8–20% και στεατικό οξύ: 0,5–5%). Ωστόσο, το ασαπωνοποίητο κλάσμα των OOs, αν και χαμηλή σε ποσότητα, προσδίδει τις ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες του ΟΟ λόγω της παρουσίας πάνω από 250 βιολογικά ενεργών φυτοχημικών. Αυτά περιλαμβάνουν

σκουαλένιο (800–8000 mg/Kg), β-καροτένιο και λουτεΐνη (4–10 mg/Kg), στερόλες (1000–3000 mg/Kg), τριτερπενικές ενώσεις (200–300 mg/Kg), τοκοφερόλες/ τοκοτριενόλες (250–350 mg/Kg) και πολυφαινόλες (200–1500 mg/Kg) (Jimenez-Lopez et al., 2020).

Οι φαινολικές ουσίες του ελαιολάδου είναι δευτερεύοντες φυτικοί μεταβολίτες, παράγονται από κύτταρα ελιάς για την καταπολέμηση παρασίτων και βακτηρίων. Είναι υπεύθυνα για το άρωμα και τη γεύση των OOs αλλά προσδίδουν επίσης οξειδωτική σταθερότητα στο λάδι. Οι τοκοφερόλες/τοκοτριενόλες είναι οι κύριες λιποδιαλυτές φαινολικές ενώσεις ενώ τουλάχιστον 40 υδρόφιλες φαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί στο ελαιόλαδο. Σύμφωνα με τη χημική τους δομή μπορούν να ταξινομηθούν σε φαινολικά οξέα (φωτοκατεχοϊκό, βανιλικό οξύ), φαινολικές αλκοόλες (υδροξυτυροσόλη HT, τυροσόλη Tyr), σεκοϊριδοειδή (ελευρωπαΐνη OE, ελευρωπαΐνη αγλυκόνη OEA, λιγκστροσίδη αγλυκόνη), φλαβονοειδή (λουτεολίνη-LU, απιγενίνη-AP), λιγνάνες και υδροξυ-ισοχρωμάνια. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) περιέχει την υψηλότερη ποσότητα ολικών φαινολικών (200–800 mg/Kg), ακολουθούμενη από το παρθένο ελαιόλαδο (VOO) (60–350 mg/Kg) και το εξευγενισμένο ελαιόλαδο (60–200 mg/Kg). Όσον αφορά τις βιολογικές ιδιότητες και την ποσότητα, η Tyr, η HT, τα σεκοϊριδοειδή παράγωγά τους ελαιασίνη και ελαιοκανθάλη, η OEA και η λιγκστροσίδη είναι οι πιο σημαντικές φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο (Jimenez-Lopez et al., 2020; Rigacci and Stefani, 2016; Souza et al., 2017).

Πολυάριθμες in vitro και προκλινικές μελέτες έχουν δείξει την πλειοτροπική δράση των φαινολικών εκχυλισμάτων ή μεμονωμένων φαινολών του EVOO για τη φλεγμονή, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την πήξη, την δυσλιπιδαιμία και το οξειδωτικό στρες (Karković Marković et al., 2019; Souza et al., 2017). Αυτοί οι παθολογικοί μηχανισμοί βρίσκονται στη βάση της πλειοψηφίας των χρόνιων νοσημάτων και η ρύθμισή τους από τις φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου μπορεί εν μέρει να εξηγήσει τις ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου στην υγεία.

Οι κυτταρικές μελέτες σε απομονωμένα αιμοπετάλια είναι ένας τρόπος για τον έλεγχο των αντιαιμοπεταλιακών ιδιοτήτων των βιοδραστικών ενώσεων και της διερεύνησης των πιθανών μηχανισμών που αυτές οι ενώσεις ασκούν την

αντιαιμοπεταλιακή τους δράση. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετές φαινολικές ενώσεις και εκχυλίσματα ελαιολάδου είναι ικανά να αναστείλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα περισσότερα στοιχεία υπάρχουν για την υδροξυτυροσόλη από πολλές κυτταρικές μελέτες, που έχουν αποδείξει τις αντισυσσωματωτικές της δυνατότητες. Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να αναστείλει την επαγώμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων από κολλαγόνο, διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και υποδοχέα θρομβίνης ενεργοποιημένου πεπτιδίου (TRAP) (Mizutani et al., 2020; Petroni et al., 1995). Μεταξύ των άλλων φαινολικών ενώσεων, η ελευρωπαΐνη, η ελευρωπαΐνη αγλυκόνη, η τυροσόλη, η αποακετοξύ ελαιοευρωπαΐνη αγλυκόνη (DHPG) και η οξική υδροξυτυροσόλη (HTA) έχουν δείξει αντισυσσωματωτικές ιδιότητες σε τουλάχιστον μια μελέτη (Correa et al., 2009; Dell'Agli et al., 2008; Mizutani et al., 2020; Rubio-Senent et al., 2015).

Εκχυλίσματα πλούσια σε φαινόλες από ελαιόλαδο, λύματα νερού, alperujo (ένα στερεό παραπροϊόν της εκχύλισης ελαιολάδου) και το επεξεργασμένο με ατμό alperujo δείχνουν επίσης ισχυρές αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες (de Roos et al., 2011; Dell'Agli et al., 2008; Petroni et al., 1995; Rubio-Senent et al., 2015). Τα φαινολικά εκχυλίσματα φαίνεται να έχουν καλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση σε σύγκριση με τις καθαρές ενώσεις πιθανώς λόγω της συνεργιστικής δράσης των φαινολικών.

Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων για την αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων εξαρτάται από τον παράγοντα συσσώρευσης. Δύο ισοχρωμάνια που βρέθηκαν στο EVOO ανέστειλαν την απόκριση των αιμοπεταλίων σε αραχιδονικό οξύ και κολλαγόνο, αλλά όχι σε ADP. Τα ισοχρωμάνια, μέσω της δραστηριότητάς της εξουδετέρωσης ριζών μπορούν να αναστείλουν μόνο τις αρχικές, ευαίσθητες σε οξειδοαναγωγή φάσεις της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, που προκαλούνται από το κολλαγόνο και το αραχιδονικό οξύ (Togna et al., 2003).

Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη βιολογική πηγή των αιμοπεταλίων, υποδεικνύοντας ότι τα φαινολικά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα αιμοπετάλια είτε άμεσα με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής αγωνιστών/ανταγωνιστών που ρυθμίζουν τα αιμοπετάλια από άλλα κύτταρα του

αίματος. Μελέτη έδειξε ότι η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη δεν μπόρεσαν να αναστείλουν την επαγόμενη από το κολλαγόνο συσσώρευση αιμοπεταλίων στο ολικό αίμα (Turner et al., 2005) αλλά τα ίδια μόρια ανέστειλαν τη συσσωμάτωση που προκαλείται από κολλαγόνο στο PRP (Petroni et al., 1995).

Η δομή των φαινολικών ενώσεων φαίνεται να καθορίζει τις αντιαιμοπεταλιακές τους ιδιότητες. Σε μια μελέτη που συγκρίνει διαφορετικές φαινολικές ενώσεις, η υδροξυτυροσόλη ήταν καλύτερος αναστολέας της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από κολλαγόνο σε σύγκριση με ελευρωπαΐνη, λουτεολίνη και απιγενίνη (Petroni et al., 1995). Ομοίως, σε μια άλλη μελέτη, μόνο τα περισσότερα λιπόφιλα ισοχρωματικά παράγωγα έδειξαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της επαγόμενης από κολλαγόνο συσσωμάτωσης (Togna et al., 2003). Επιπρόσθετα, μια μελέτη έδειξε ότι η ελευρωπαΐνη έχει ελαφρώς καλύτερη αντισυσσωματωτική δράση σε φυσιολογικά αιμοπετάλια σε σύγκριση με τα διαβητικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις (10μM) (Zbidi et al., 2009).

Η ικανότητα των φαινολικών του ελαιολάδου να αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς, αλλά η αναστολή της παραγωγής θρομβοξάνης A_2 (TxA_2) από εικοσανοειδή φαίνεται να είναι ο πιο σχετικός (Correa et al., 2009). Τα ισοχρωμάνια του ελαιολάδου μπορούν επίσης να αναστείλουν την κινητοποίηση του αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων που επάγεται από τη θρομβίνη και το κολλαγόνο, υποδεικνύοντας άμεση αναστολή της φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2) (Togna et al., 2003). Η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη μπορούν επίσης να επηρεάσουν την κινητοποίηση ασβεστίου που επάγεται από τη θρομβίνη, με μεγαλύτερη επίδραση στα αιμοπετάλια από άτομα με ΣΔ2 (Zbidi et al., 2009). Φαινολικά εκχυλίσματα από ελαιόλαδο με υψηλή και χαμηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά ήταν ικανά να αναστείλουν το αποικοδομητικό ένζυμο της κυκλικής 3' 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), cAMP φωσφοδιεστεράσης, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μείωση των επιπέδων cAMP εντός αιμοπεταλίων, που είναι ένας κρίσιμος μηχανισμός της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Dell'Agli et al., 2008). Επιπλέον, η πρωτεομική ανάλυση έχει αποκαλύψει ότι τα πλούσια σε φαινολικά εκχυλίσματα, συγκεκριμένα ένα εκχύλισμα alperujo που περιέχει υδροξυτυροσόλη και αποακετοξύ ελαιοευρωπαΐνη αγλυκόνη, έχουν οξείες επιδράσεις στο πρωτέωμα των αιμοπεταλίων που ρυθμίζει πολλαπλές οδούς που εμπλέκονται στη

συσσώρευση αιμοπεταλίων, την πήξη, τη σηματοδότηση και την απόπτωση (de Roos et al., 2011). Συμπερασματικά, οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου, κυρίως η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη εμφανίζουν αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες που επηρεάζουν πολλαπλές οδούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Katsa and Nomikos, 2022).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της in vitro αντιαιμοπεταλιακής δράσης φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου, εκχυλισμάτων από έξτρα παρθένα ελαιόλαδα πλούσια σε ελαιοκανθάλη και η διερεύνηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης in vivo έπειτα από κατανάλωση των πλούσιων σε φαινολικά ελαιολάδων από ασθενείς με διαβήτη τύπου ΙΙ. Η μελέτη αυτή έχει σαν στόχο τη διερεύνηση των ωφέλιμων συστατικών του ελαιολάδου με έμφαση στην αντιαιμοπεταλιακή τους δράση. Η διεξαγωγή θετικών συμπερασμάτων θα συμβάλλει στη χρήση του ελαιολάδου που είναι πλούσιο σε φαινολικές και όχι μόνο ενώσεις σαν συμπλήρωμα για μεταβολικές ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης.

3. Μεθοδολογία

3.1 Προσδιορισμός της προσκόλλησης αιμοπεταλίων σε μικροπλακίδια επιστρωμένα με πρωτεΐνες προσκόλλησης – επίδραση φαινολικών ενώσεων

Αρχή Μεθόδου

Ο προσδιορισμός της προσκόλλησης αιμοπεταλίων σε μικροπλακίδια είναι μία μέθοδος ανίχνευσης της ικανότητας προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε κατάλληλη προσκολλητική επιφάνεια που έχει επιστρωθεί με πρωτεΐνες προσκόλλησης (κολλαγόνο, ινοδωγόνο, κ.α.). Η προσκόλληση αιμοπεταλίων βασίζεται στον φυσιολογικό μηχανισμό της αιμόστασης, όπου συμβαίνει για την αναστολή της απώλειας αίματος μετά από τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος. Υπό τέτοιες συνθήκες τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται σε συνδυασμό με εκτεθειμένες πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας όπως το κολλαγόνο και απελευθερώνουν παράγοντες ενεργοποίησης όπως η ADP και τοπικά παράγεται θρομβίνη. Η μέτρηση της ικανότητα των αιμοπεταλίων να προσκολλώνται βασίζεται στην ενεργοποίηση PRP με κατάλληλους αγωνιστές και μέτρηση του ποσοστού αιμοπεταλίων που προσκολλώνται χρησιμοποιώντας ως δείκτης της ποσότητα των αιμοπεταλίων τη δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης που είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Eriksson and Whiss, 2005).

Οργανολογία

- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακιδίων
- Φυγόκεντρος αιωρούμενων υποδοχέων
- Αναλυτικός Ζυγός (4 δεκαδικών)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Μετρητής pH
- Πιπέτες 1-10μL και 20-200μL & πολυπιπέτα 20-200μL

Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Φυσιολογικός ορός
- Αντιπηκτικό́ διάλυμα κιτρικού οξέος - Citrate buffer 0,105 M, pH=7,4 για συλλογή αιμοπεταλίων
- Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,1M που περιέχει φωσφορικό εστέρα της p-νιτροφαινόλης (p-NPP) 5mM και 0,1% Triton X-100
- NaOH 2N
- Κολλαγόνο 1mg/mL

Πορεία – βήματα

Συλλογή PRP (Platelet Rich Plasma) και PPP (Platelet Poor Plasma) από φλεβικό αίμα

1. Προσθέτουμε 1,4ml αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών σε πλαστικούς σωλήνες των 15ml
2. Συμπληρώνουμε με αίμα μέχρι τα 14ml (αναλογία 1/10)
3. Αναδεύουμε ήπια άμεσα μετά την προσθήκη του αίματος
4. Φυγοκεντρούμε για 10min στα 200g
5. Συλλέγουμε τα 2/3 του υπερκειμένου σε νέο πλαστικό σωλήνα
6. Το ίζημα της φυγοκέντρησης επαναφυγοκεντρείται στα 700g για 15 min.
7. Συλλέγουμε το PPP σε νέο πλαστικό σωλήνα

Μέτρηση περιεκτικότητας PRP σε αιμοπετάλια

1. Σε πλαστική κυψελίδα του 1ml προσθέτουμε 1ml από το PPP
2. Σε μια δεύτερη κυψελίδα προσθέτουμε 1ml από το PRP
3. Μετράμε την απορρόφηση στα 530nm του PRP έχοντας πρώτα μηδενίσει με PPP
4. Η επιθυμητή απορρόφηση είναι ~0,800 που αντιστοιχεί σε 300.000 Ptls /μL
5. Κάνουμε αραίωση εάν χρειάζεται για να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση αιμοπεταλίων

Προετοιμασία μικροπλακιδίων

1. Προσθέτουμε 100μL πρωτεΐνης προσκόλλησης (κολλαγόνο ή ινωδογόνο) (1mg/mL) το μικροπλακίδια παραμένει σε ψύξη (+4^{o}C) για μία νύχτα

2. Την ημέρα του πειράματος ξεπλένουμε το μικροπλακίδια με 100μL φυσιολογικού ορού για δύο φορές

Πείραμα προσκόλλησης

1. Προστίθενται στα βοθρία οι κατάλληλες συγκεντρώσεις ενεργοποιητικών παραγόντων, αναστολέων, PRP και PPP και συμπλήρωση μέχρι τελικού όγκου100μL
2. Επώαση στον επιθυμητό χρόνο (30-60min) στους 37 ^{o}C
3. Ξέπλυμα 2 φορές με φυσιολογικό ορό
4. Προσθήκη 140μL διαλύματος p-NPP
5. Επώαση 30 min στους 37 ^{o}C με ήπια ανάδευση
6. Προσθήκη 50μL NaOH 2N για τερματισμό της αντίδρασης
7. Μέτρηση απορρόφησης στα 405nm

Υπολογισμοί – Αποτελέσματα

1. Γίνεται μέτρηση της Α όταν το σύνολο του PRP που χρησιμοποιείται στα πειράματα επωάζεται με το διάλυμα p-NPP. Η Α αυτή αντιστοιχεί στην δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης που βρίσκεται στο σύνολο του PRP.
2. Γίνεται μέτρηση της Α που προκύπτει από την επώαση του PRP στα βοθρία χωρίς τη ύπαρξη ενεργοποιητικού παράγοντα. Η Α αυτή αντιστοιχεί στην ποσότητα αιμοπεταλίων που έχουν προσκολληθεί μη ειδικά στην προσκολλητική επιφάνεια.
3. Γίνεται μέτρηση της Α που προκύπτει από την επώαση του PRP κάτω από διάφορες συνθήκες ενεργοποίησης και αναστολής. Αφαιρείται η Α της μη ειδικής προσκόλλησης από αυτή την απορρόφηση και το υπόλοιπο είναι η Α που αντιστοιχεί στην ποσότητα των αιμοπεταλίων που έχουν προσκολληθεί στην προσκολλητική επιφάνεια κάτω από τις διαφορετικές συνθήκες ενεργοποίησης. Ο λόγος αυτής της απορρόφησης προς την Α του σταδίου 1, αντιστοιχεί στο ποσοστό αιμοπεταλίων που έχουν προσκολληθεί.

3.2 Διαδικασία εκχύλισης ελαιόλαδου και βουτύρου

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος της εκχύλισης αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού την οποία χρησιμοποιούμε για να παραλάβουμε μία ή περισσότερες ουσίες από ένα δείγμα. Βασίζεται στη χρήση ενός διαλύτη στην συγκεκριμένη περίπτωση του ακετονιτρίλιου (CH_3CN) που εκχυλίζει εκλεκτικά μία ουσία. Η εκχύλιση βασίζεται στον νόμο κατανομής, κατά τον οποίο όταν σε ένα σύστημα δυο διαλυτών που δεν αναμιγνύονται, υπάρχει μία ουσία που είναι διαλυτή και στους δύο διαλύτες, τότε η ουσία κατανέμεται μεταξύ των 2 διαλυτών έτσι ώστε ο λόγος των ενεργοτήτων της ουσίας στους δύο διαλύτες να είναι σταθερός σε σταθερή θερμοκρασία. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με ένα διαλύτη ενός υγρού ή στερεού που είναι διαλυμένο σε άλλο διαλύτη, εξαρτάται από τη διαλυτότητα, και άρα την κατανομή της ουσίας που διαχωρίζεται μεταξύ των δύο υγρών (Siddique et al., 2019).

Οργανολογία

- Υπερκαταψύκτης (-80 ^oC)
- Διαχωριστικές χοάνες

Αντιδραστήρια – Διαλύτες

- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN)

Πορεία – βήματα

1. Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο ή βούτυρο (40 mL) αναμειγνύεται με 40 mL ακετονιτριλίου (CH_3CN) σε διαχωριστική χοάνη χωρητικότητας 250 mL
2. Ανακινείται έντονα τρεις φορές με ενδιάμεσους εξαερισμούς και αφήνεται 15–25 λεπτά για τη φάση του διαχωρισμού.
3. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για δύο επιπλέον φορές, κάθε φορά χρησιμοποιούνται 40 mL CH_3CN.
4. Οι οργανικές στιβάδες ακετονιτριλίου συνδυάστηκαν και υποβλήθηκαν σε υπερκατάψυξη για 1 ώρα στους -80 ^oC.
5. Το μίγμα στη συνέχεια διηθήθηκε αμέσως σε διηθητικό χαρτί.
6. Η υπερκατάψυξη επαναλήφθηκε για δύο επιπλέον φορές ακολουθούμενη από

διήθηση για να δώσει διαυγές ελαιώδες διάλυμα που περιέχει ελαιοκανθάλη (OC).

7. Το τελικό διαυγές διάλυμα εξατμίστηκε με υγρό άζωτο για να απομακρυνθεί το ακετονιτρίλιο και επαναδιαλύθηκε σε αιθανόλη, όπου αποθηκεύτηκε στους -20 ^{o}C.

Υπολογισμοί – Αποτελέσματα

Στα εκχυλίσματα υπολογίσαμε την τελική συγκέντρωση διαιρώντας το ξηρό βάρος κάθε εκχυλίσματος με τον όγκο αιθανόλης που αναδιαλύθηκαν.

3.3 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με τη μέθοδο της Folin-Ciocalteu

Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) (Singleton and Rossi, 1965; Vermerris and Nicholson, 2006). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων (P2W18O62-7 → H4P2W18O62-8, H2P2Mo18O62-6 → H6P2Mo18O62-7). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 725 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3, αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης (BANCUTA et al., 2016).

Οργανολογία

- Φωτόμετρο
- Γυάλινοι σωλήνες των 10 ml
- Κυψελίδες φωτομέτρου των 3 mL

Αντιδραστήρια – Διαλύματα

- Πρότυπο διάλυμα Folin-Ciocalteu (Merck)
- Πρότυπο διάλυμα Τυροσόλης 1 mg/ml
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% (w/v)

Πορεία – βήματα

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στην συνέχεια προστίθενται διαδοχικά 3,5 ml νερό, 0,1ml Folin-Ciocalteu και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Μετά από παραμονή 3 λεπτών προστίθενται 0,4 ml Na_2CO_3 35% και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως, αφήνεται προς αντίδραση για μια ώρα και φωτομετρείται στα 725 nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα φαινολικών ενώσεων που περιέχουν από 1 έως 60 μg οπότε και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε φαινολικά του αγνώστου δείγματος.

Υπολογισμοί – Αποτελέσματα

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης της τυροσόλης. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραίωση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της τυροσόλης κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση y = 0,0172 + 0,0554 με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman r =0,996. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως μmol Tyr/ μg & μmol Tyr/ μL (Tyrosol, Tyr) εκχυλίσματος.

3.4 Μέτρηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας αποτελεί ειδική μέθοδο εκλογής και εφαρμόζεται κυρίως σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Fragopoulou et al., 2012). Η μέθοδος χρησιμοποιείται στις περισσότερες μελέτες ελέγχου της ανταπόκρισης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή. Την ανακάλυψε στις αρχές του 1960 ο Born, που παρατήρησε ορατές θολωσιμετρικές αλλαγές, μετά την προσθήκη του ADP σε διάλυμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. Για τη εφαρμογή της μεθόδου, παρασκευάζεται το PRP και πραγματοποιείται σε ειδικό όργανο, το συσσωρευματόμετρο που αποτελεί ένα θολωσίμετρο σταθερού μήκους κύματος.

Οργανολογία

- Συσσωρευματόμετρο (Aggregometer) Chrono-log
- Φυγόκεντρος Eppendorf, Centrifuge 5810 R
- Φωτόμετρο Novaspec II, Pharmacia Biotech
- Βιοχημικός αναλυτής Auto Hematology Analyzer BC-3000 plus, Mindray
- Πιπέτες 1-10μL και 100-1000μL

Αντιδραστήρια – Διαλύτες

- Φυσιολογικός ορός
- Υγρό άζωτο
- Αντιπηκτικό́ διάλυμα κιτρικού οξέος 0,105 M, pH=7,4
- TRAP (1mM)
- ADP (0,123 mM και 1,23 mM)

Πορεία – βήματα

Απομόνωση αιμοπεταλίων από τους εθελοντές

1. Έπειτα από αιμοληψία από τον εθελοντή, παραλαμβάνονται 50ml αίματος σε 4 βιδωτούς πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 1400μL αντιπηκτικού διαλύματος

κιτρικού οξέος ο καθένας.

2. Απευθείας ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200g για 10 λεπτά.
3. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πιπέτα και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 ml.
4. Τα δείγματα τοποθετούνται ξανά για φυγοκέντρηση 700g για 20 λεπτά. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση παραλαμβάνεται ξανά το υπερκείμενο (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια, PPP) και μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα των 50 ml.
5. Η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ελέγχεται με τον βιοχημικό αναλυτή ή με το φωτόμετρο και πρέπει να είναι περίπου $300x10^3$/uL. Σε περίπτωση που η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη, γίνεται αραίωση με κατάλληλο όγκο του PPP.

<u>Προετοιμασία εκχυλισμάτων</u>

1. Για την χρήση των εκχυλισμάτων χρειάστηκε αναδιάλυση τους σε άλλο διαλύτη από την αιθανόλη που ήταν αποθηκευμένα. Για το λόγο αυτό πάρθηκαν 50μL από κάθε εκχύλισμα και τοποθετήθηκαν αν διάλυση σε προζυγισμένα eppendorf tubes 1,5ml.
2. Έγινε εξάτμιση τους με υγρό άζωτο και ζυγίστηκαν, έτσι ώστε να υπολογιστεί το ξηρό βάρος.
3. Στη συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε 50μL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), και υπολογίστηκε η συγκέντρωση τους.
4. Έπειτα από 10 λεπτά τα εκχυλίσματα ήταν έτοιμα για χρήση.

<u>Εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης των εκχυλισμάτων</u>

1. Στις γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματόμετρου προστίθενται 250μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C.
2. Στην ειδική θέση του συσσωρευματόμετρου τοποθετείται μία γυάλινη κυψελίδα που περιέχει 500μL από το PPP.
3. Στην συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στις ειδικές θερμοστατούμενες θέσεις του συσσωρευματόμετρου μαζί με ένα μικρό μαγνητικό αναδευτήρα που περιστρέφεται με 1200 rpm και προστίθενται διάφορες ποσότητες του συσσωρευτικού παράγοντα (ADP ή TRAP) ή/και του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε DMSO ή φυσιολογικό ορό και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της

διαπερατότητας.

4. Στη σειρά αυτή των πειραμάτων πριν την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα, προστίθενται διάφορες ποσότητες του αναστολέα, ακολουθεί επώαση για 1 min και στη συνέχεια προστίθεται ο συσσωρευτικός παράγοντας που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων.
5. Ο συνολικός όγκος διαλύματος μέσα στην κυψελίδα είναι πάντοτε 300μL.
6. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Υπολογισμοί – αποτελέσματα

Η ανασταλτική ικανότητα των δειγμάτων εκτιμάται με το δείκτη IC_{50} (Inhibitory Concentration for 50% inhibition). Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί στην ποσότητα εκείνη του εκχυλίσματος που προκαλεί αναστολή της δράσης του αγωνιστή ίση με το 50% της μεγίστης παρατηρούμενης συσσώρευσης. Όσο πιο μικρό είναι το IC_{50} τόσο πιο δραστικό θεωρείται το δείγμα που μελετάται, αφού έχει την ικανότητα να προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του αγωνιστή σε μικρότερη ποσότητα.

Για να υπολογιστεί το IC_{50} (με βάση το ύψος συσσώρευσης) πρέπει να αποκτηθούν τουλάχιστον δύο καμπύλες συσσώρευσης από τις οποίες η μία θα πρέπει να φτάνει περίπου το 20% της συσσώρευσης που προκαλεί ο εκάστοτε συσσωρευτικός παράγοντας όταν προστεθεί μόνος του στο δείγμα των αιμοπεταλίων, ενώ η άλλη περίπου στο 80%. Στη συνέχεια προσδιορίζεται μέσω του υπολογιστή, το ύψος (Amplitude-A) η κλίση (slope-S) και το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve-AUC) για κάθε μία από τις καμπύλες συσσώρευσης των εκχυλισμάτων αλλά και του συσσωρευτικού παράγοντα, η οποία χρησιμοποιείται και ως control. Έπειτα, υπολογίζεται το ποσοστό της αναστολής (% inhibition) του εκχυλίσματος σε κάθε ποσότητα που έχει χρησιμοποιηθεί, με βάση τον τύπο:

$$\% \text{ inhibition} = (A_{control} - A_{εκχυλίσματος}) / A_{control}$$

και γίνεται γραφική παράσταση με συνάρτηση της μορφής $y=\alpha x+\beta$. Τοποθετούμε όπου y το 50 για να βρούμε το IC_{50}.

3.5 Μεταγευματική μελέτη

Αρχή μεθόδου

Η παρούσα μελέτη είναι μια τυχαιοποιημένη, μονά τυφλή, διασταυρούμενη μεταγευματική μελέτη σε ασθενείς με ΣΔτ2, τόσο άντρες όσο και γυναίκες. Οι εθελοντές έπρεπε να ολοκληρώσουν 5 μεταγευματικές δοκιμασίες με διαφορετικά είδη γεύματος τα οποία διέφεραν κατά βάση στο είδος του χορηγούμενου λίπους. Πιο συγκεκριμένα, οι εθελοντές πραγματοποίησαν έξι επισκέψεις στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Στην πρώτη επίσκεψη έγινε αναλυτική ενημέρωση για το σκοπό και τη διαδικασία της μελέτης και η λήψη ιατρικού ιστορικού και δεδομένων για τη φαρμακευτική αγωγή, τις συνήθειες φυσικής δραστηριότητας και τις καπνιστικές συνήθειες. Συγκεκριμένα, συμπληρώθηκαν τα εξής έντυπα:

- Συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής
- Ερωτηματολόγιο δημογραφικών δεδομένων
- Ερωτηματολόγιο Συχνότητας Τροφίμων (FFQ)
- Ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας
- Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (Βάρος, Ύψος, Περιφέρεια μέσης, Περιφέρεια ισχίου, DXA)
- Ενημερωτικό φυλλάδιο για το τι πρέπει να καταναλωθεί την ημέρα πριν την παρέμβαση-δειγματοληψία.

Μεταξύ πρώτης και δεύτερης επίσκεψης οι ερευνητές αποφάσισαν βάσει προγράμματος τυχαιοποίησης, ποιο γεύμα θα καταναλώσει στις επόμενες επισκέψεις ο εκάστοτε εθελοντής. Σε κάθε επίσκεψη, πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος νηστείας για t=0’, ακολουθήθηκε η κατανάλωση ενός από τα πέντε γεύματα, κι στη συνέχεια έγινε η δειγματοληψία στους χρόνους t=30’, t=60’, t=120’, t=180’ και t=240’. Μετά το τέλος της κάθε διαδικασίας, δόθηκε στον εκάστοτε εθελοντή χυμός πορτοκάλι και τοστ. Επίσης, κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών συμπληρώθηκε ανάκληση 24ώρου της προηγούμενης ημέρας. Οι επισκέψεις απείχαν μεταξύ τους διάστημα τουλάχιστον μίας εβδομάδας με εξαίρεση την περίπτωση όπου ο εθελοντής είχε λάβει το γεύμα με ιβουπροφαίνη οπότε και η επόμενη επίσκεψη γινόταν μετά από 15 μέρες τουλάχιστον. Η μελέτη έχει λάβει έγκριση από την ΕΗΔΕ του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (79548-16/5/2019) και έχει δηλωθεί στην βάση κλινικών μελετών clinicaltrials.gov (NCT04419948).

Οι εθελοντές της μελέτης

Τα κριτήρια επιλογής των εθελοντών της μελέτης ήταν τα εξής:

- ασθενείς με ΣΔ2, μη ινσουλινοεξαρτώμενοι, των οποίων η διάγνωση τέθηκε από κλινικό ενδοκρινολόγο ή παθολόγο
- ηλικία άνω των 18 ετών
- σταθερό σωματικό βάρος (+3 Kg) τους τελευταίους δύο μήνες

Το φύλο και η εμμηνόπαυση δεν αποτέλεσαν πρόβλημα στη συμμετοχή στη μελέτη. Ως κριτήρια αποκλεισμού τέθηκαν οι χρόνιες παθήσεις όπως χρόνια φλεγμονώδης νόσος, αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνος καθώς και πιθανή με ελεγχόμενη θυρεοειδοπάθεια. Επιπλέον, η λήψη αντιφλεμονωδών, αντιαιμοπεταλιακών, ασπιρίνης και ινσουλίνης απέτρεψαν τη συμμετοχή στη μελέτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ενημέρωση πιθανών εθελοντών για τη μελέτη έγινε με τη βοήθεια των μέσων κοινωνικής δικτύωσης, κατάλληλα διαμορφωμένης αφίσας, και σε συνεργασία με τους συνεργαζόμενους κλινικούς γιατρούς, μέσω των οποίων ήρθαμε σε τηλεφωνική επικοινωνία με τους πιθανούς εθελοντές. Έως τώρα την μελέτη έχουν ολοκληρώσει πλήρως 6 εθελοντές, ασθενείς με ΣΔ2 (3 άντρες και 3 γυναίκες).

Τα γεύματα

Τα γεύματα που έλαβαν οι εθελοντές ήταν τα παρακάτω:

1. Λευκό ψωμί (5 φέτες, 120γρ) + βούτυρο ποσότητας 40 ml (BU)
2. Λευκό ψωμί (5 φέτες, 120γρ) + 40 ml εξευγενισμένο ελαιόλαδο δίχως ελαιοκανθάλη (OO)
3. Λευκό ψωμί (5 φέτες, 120γρ) + 40 ml εξευγενισμένο ελαιόλαδο με 250 mg ελαιοκανθάλη/Kg (OO 250)
4. Λευκό ψωμί (5 φέτες, 120γρ) + 40 ml εξευγενισμένο ελαιόλαδο με 500 mg ελαιοκανθάλη/Kg (OO 500)
5. Λευκό ψωμί (5 φέτες, 120γρ) + βούτυρο ποσότητας 40 ml+400 mg ibuprofen (BU-IBU)

Το ψωμί ήταν της εταιρείας Καραμολέγκος (Καραμολέγκος Ψωμί Τοστ Ψίχα Σταρένιο) και το βούτυρο της εταιρείας Lurpak.

Συλλογή βιολογικών δειγμάτων

Ανάλογα τη χρονική στιγμή της αιμοληψίας συλλεγόταν ποσότητα αίματος σε φιαλίδια με κατάλληλο αντιπηκτικό για τη συλλογή πλάσματος, ερυθροκυττάρων και πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια αλλά και σε φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό για τη απομόνωση ορού. Το αίμα της κάθε αιμοληψίας, φυλασσόταν στο ψυγείο μέχρι το τέλος των αιμοληψιών οπότε και γινόταν η διαδικασία της απομόνωσης των βιολογικών δειγμάτων. Ο ορός παραλήφθηκε από vacutainer ορού μετά από φυγοκέντρηση στα 1500g x 25min, 4oC. Το πλάσμα παραλήφθηκε από vacutainer με αντιπηκτικό EDTA ύστερα από φυγοκέντρηση του 45 ολικού αίματος στις 1500g x 10min, 4^{o}C. Ο ορός και το πλάσμα μοιράζονταν σε σωληνάρια eppendorf τα οποία φυλάσσονταν στους -80 ^{o}C έως τη στιγμή της ανάλυσης.

3.6 Προσδιορισμός sP-selectin σε ορό με τη μέθοδο ELISA

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος ELISA αποτελεί μια βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η διαδικασία που εφαρμόζεται είναι η εξής: Αρχικά, το αντίσωμα δέσμευσης της sP-selectin προσκολλάται πάνω σε μία σταθερή επιφάνεια, μετά προστίθεται το δείγμα μέσα στο οποίο περιέχεται το επιθυμητό αντιγόνο δηλαδή η πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων και γίνεται πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Έπειτα, γίνεται η ποσοτικοποίηση με την χρήση ενός ενζύμου που δεσμεύεται έμμεσα με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Τέλος προστίθεται κατάλληλο υπόστρωμα και γίνεται ενζυμική αντίδραση που δίνει έγχρωμο σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του ανιχνευόμενου αντιγόνου (“The principle and method of ELISA | MBL Life Science -JAPAN-,” n.d.).

Αντιδραστήρια – Διαλύτες

Όλα τα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αντιδραστήρια αφήνονται σε ηρεμία για 15 λεπτά αφού έχει προηγηθεί ήπια ανάδευση

μετά την αρχική ανασύσταση. Τα διαλύματα παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται άμεσα.

- Στρεπταβιδίνη-HRP: 1,0 mL στρεπταβιδίνης συζευγμένη με υπεροξειδάση αγριοραπανίδας
- Αντίσωμα σύλληψης αντι-ανθρώπινης P-σελεκτίνης ποντικιού
- Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης αντι-ανθρώπινης P-σελεκτίνης προβάτου
- Πρότυπο ανασυνδυασμένης ανθρώπινης P-Selectin
- PBS (pH 7,2 -7,4)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (wash buffer): 0,05% Tween σε PBS (pH 7,2 -7,4)
- Αραιωτικό αντιδραστηρίου (reagent diluent): 1% BSA σε PBS (pH 7,2 -7,4)
- Διάλυμα υποστρώματος (substrate solution): 1:1 έγχρωμο αντιδραστήριο A (H_2O_2) και έγχρωμο αντιδραστήριο B (τετραμεθυλοβενζιδίνη)
- Διάλυμα διακοπής (stop solution): 2N H_2SO_4

Πορεία – Βήματα

<u>Προετοιμασία πλάκας</u>

1. Αραιώνεται το αντίσωμα δέσμευσης στη συγκέντρωση εργασίας σε PBS χωρίς πρωτεΐνη φορέα. Αμέσως μετά επιστρώνεται μια μικροπλάκα 96-φρεατίων με 100 μL ανά φρεάτιο του αραιωμένου αντισώματος δέσμευσης. Σφραγίζεται η μιρκοπλάκα με αυτοκόλλητη ταινία και επωάζεται όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Αναρροφάται κάθε φρεάτιο και πλένεται με διάλυμα πλύσης. Αυτό επαναλαμβάνεται δύο φορές. Συνολικά γίνονται τρεις πλύσεις. Πλένεται κάθε πηγαδάκι με διάλυμα πλύσης (300 μL) με χρήση πολυπιπέτας για την προσθήκη του buffer. Η πλήρης απομάκρυνση του υγρού σε κάθε βήμα είναι απαραίτητη για την καλή απόδοση.
3. Γεμίζονται τα βοθρία προσθέτοντας 300 μL αραιωτικού αντιδραστηρίου σε κάθε φρεάτιο. Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
4. Επαναλαμβάνεται η αναρρόφηση/πλύση όπως στο βήμα 2. Τα πλακίδια είναι τώρα έτοιμα για την προσθήκη δείγματος.

<u>Διαδικασία προσδιορισμού</u>

1. Προστίθενται 100 μL δείγματος ή προτύπων σε reagent diluent ή ένα κατάλληλο αραιωτικό, ανά φρεάτιο. Σκεπάζεται η μικροπλάκα με αυτοκόλλητη ταινία και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Επαναλαμβάνεται η αναρρόφηση/πλύσιμο όπως στο βήμα 2 της προετοιμασίας πλακών.
3. Προστίθενται 100 μL του αντισώματος ανίχνευσης, αραιωμένο σε διαλυτικό αντιδραστηρίου, σε κάθε πηγάδι. Καλύπτεται με μια νέα αυτοκόλλητη ταινία και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Επαναλαμβάνεται η αναρρόφηση/πλύση όπως στο βήμα 2 της προετοιμασίας πλακών.
5. Προστίθενται 100 μL της αραίωσης εργασίας Streptavidin-HRP σε καθένα φρεάτιο. Καλύπτεται η πλάκα και επωάζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αποφεύγεται η τοποθέτηση της πλάκας σε άμεσο φως.
6. Επαναλαμβάνεται η αναρρόφηση/πλύση όπως στο βήμα 2.
7. Προστίθενται 100 μL του διαλύματος υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο. Επωάζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αποφεύγεται η τοποθέτηση της πλάκας σε άμεσο φως.
8. Προστίθενται 50 μL stop solution σε κάθε φρεάτιο. Αναδεύεται απαλά το πιάτο για να εξασφαλιστεί η ανάμειξη.
9. Προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα κάθε φρεατίου αμέσως, χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο πλακιδίων στα 450 nm.

Υπολογισμοί - Αποτελέσματα

1. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των διπλών μετρήσεων για κάθε πρότυπο, στοιχείο ελέγχου και δείγμα και αφαιρείται η μέση μηδενική τυπική οπτική πυκνότητα (O.D.).
2. Δημιουργείται μια τυπική πρότυπη καμπύλη με τα δεδομένα χρησιμοποιώντας υπολογιστικό λογισμικό.
3. Με βάση την εξίσωση της καμπύλης που προκύπτει υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

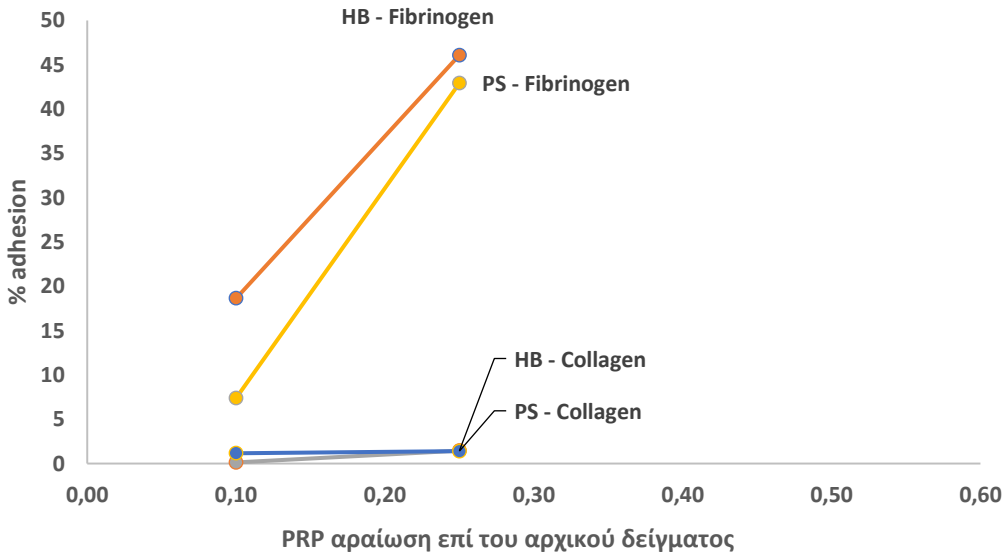
3.7 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάστηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov - Smirnov. Όλες οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SD (standard deviation, τυπική απόκλιση). Για τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου της παρέμβασης, καθώς και του είδους της παρέμβασης στις μεταβολές των μετρούμενων παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η απλή συσχετισμένη ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Εξαιτίας των πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση κατά Bonferroni, προκειμένου να γίνει διόρθωση του σφάλματος τύπου Ι, ώστε να προσεγγίζει το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί για τους στατιστικούς ελέγχους αυτής της μελέτης. Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων (p) βασίζονται σε αμφίπλευρους ελέγχους και συγκρίνονται στο επίπεδο σημαντικότητας του 5%. Για όλους τους στατιστικούς υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS έκδοση 18.0 (Statistical Package for social sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.).

4. Αποτελέσματα

4.1 Βελτιστοποίηση μεθόδου εκτίμησης της προσκόλλησης αιμοπεταλίων

Αρχικά, έγινε μια προσπάθεια μέσα από μια σειρά πειραμάτων για να εντοπίσουμε τις βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της προσκόλλησης αιμοπεταλίων σε μικροπλακίδια επιστρωμένα με πρωτεΐνες προσκόλλησης. Η πρώτη συνθήκη που εξετάσαμε ήταν η προσκόλληση σε πλάκα υψηλής προσκόλλησης (High Binding plate) ή σε πλάκα πολυστυρενίου (Polystyrene plate) σε συνδυασμό με δύο διαφορετικές πρωτεΐνες προσκόλλησης, το ινωδογόνο (fibrinogen) και το κολλαγόνο (collagen). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα 1.

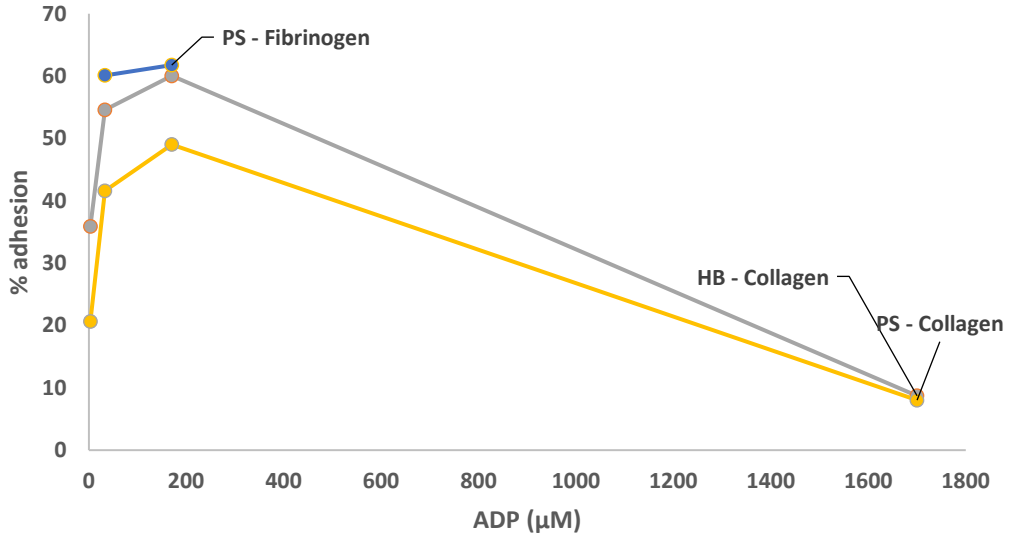


Διάγραμμα 1: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του PRP με το είδος του plate και την πρωτεΐνη προσκόλλησης.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο οδηγεί σε μεγάλη μη ειδική προσκόλληση σε σύγκριση με το κολλαγόνο. Η ίδια τάση φαίνεται να επικρατεί και στα δύο είδη μικροπλακιδίων.

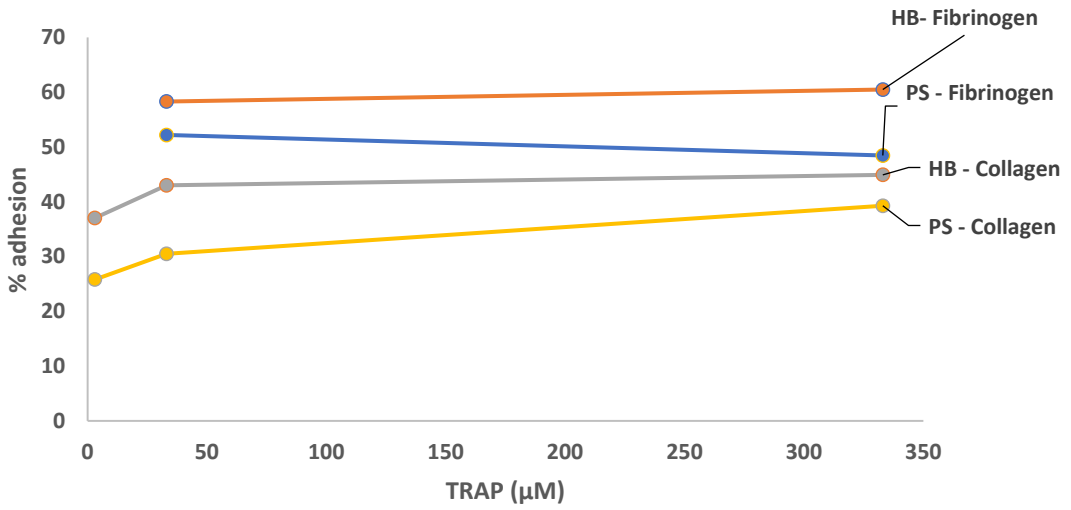
Στη συνέχεια, δοκιμάσαμε τρεις διαφορετικούς ενεργοποιητικούς παράγοντες (ADP, TRAP, PAF) σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (plate HB με πρωτεΐνη

προσκόλλησης ινωδογόνο, plate HB με πρωτεΐνη προσκόλλησης κολλαγόνο, plate PS με πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο, plate PS με πρωτεΐνη προσκόλλησης κολλαγόνο) σε αραίωση 1/4 PRP του αρχικού δείγματος. Για το ADP τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 2, για το TRAP τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 3 και για τον PAF τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 4.



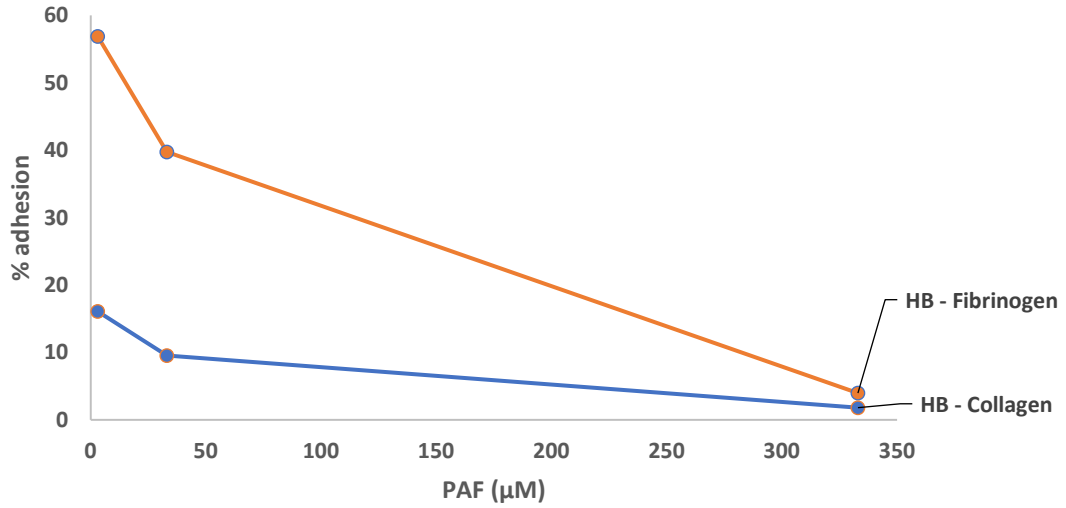
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του ADP σε δύο είδη μικροπλακιδίων με διαφορετική πρωτεΐνη προσκόλλησης

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι υπάρχει μια διαφορά στην επί της % προσκόλληση μεταξύ των μικροπλακιδίων υψηλής προσκόλλησης και πολυστυρενίου, με μεγαλύτερη την προσκόλληση στο μικροπλακίδιο υψηλής προσκόλλησης ανεξαρτήτου της πρωτεΐνης προσκόλλησης. Επίσης, το ADP φαίνεται να προκαλεί μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση στα μικροπλακίδια που έχουν ως πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο σε σύγκριση με το κολλαγόνο. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει η ίδια δοσοεξαρτώμενη τάση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών προσκόλλησης.



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του TRAP σε δύο είδη μικροπλακιδίων με διαφορετική πρωτεΐνη προσκόλλησης

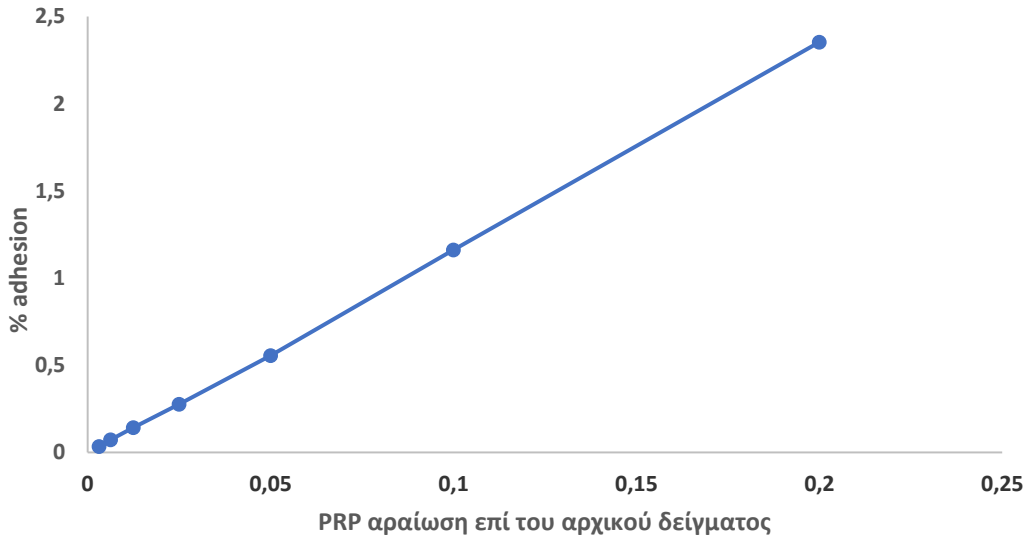
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι υπάρχει μια διαφορά στην επί της % προσκόλληση μεταξύ των μικροπλακιδίων υψηλής προσκόλλησης και πολυστυρενίου, με μεγαλύτερη την προσκόλληση στο μικροπλακίδιο υψηλής προσκόλλησης ανεξαρτήτου της πρωτεΐνης προσκόλλησης. Επίσης, το TRAP φαίνεται να προκαλεί μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση στα μικροπλακίδια που έχουν ως πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο σε σύγκριση με το κολλαγόνο. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει δοσοεξαρτώμενη τάση από τον ενεργοποιητικό παράγοντα TRAP στα μικροπλακίδια που έχουν ως πρωτεΐνη προσκόλλησης το κολλαγόνο.



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του PAF σε δύο είδη μικροπλακιδίων με διαφορετική πρωτεΐνη προσκόλλησης

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι ο PAF φαίνεται να προκαλεί μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση στο μικροπλακίδιο που έχει ως πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο σε σύγκριση με το κολλαγόνο. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει παρόμοια τάση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών προσκόλλησης, η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη από τον ενεργοποιητικό παράγοντα PAF. Όσον αφορά στο μικροπλακίδιο πολυστυρενίου δεν έχουμε αποτελέσματα καθώς δεν δούλεψε το πείραμα.

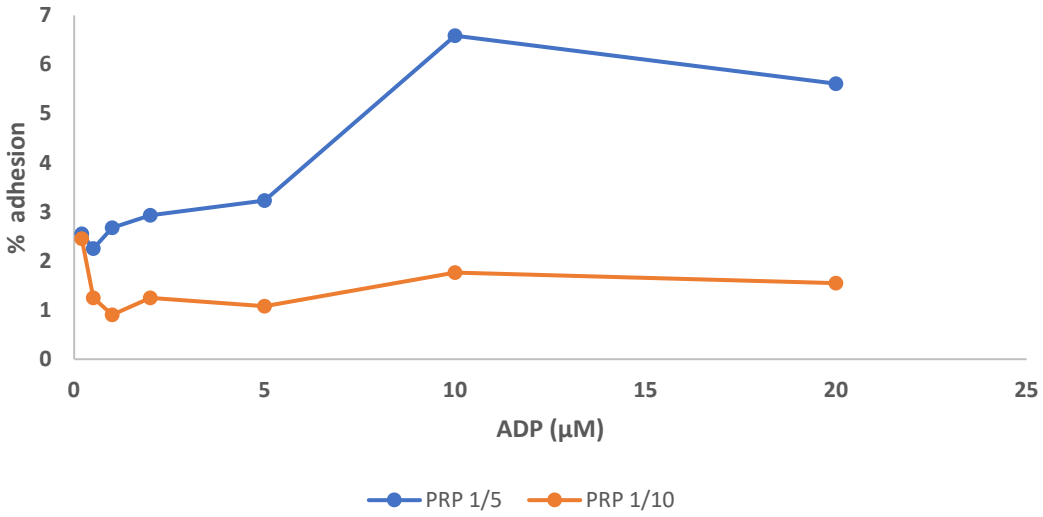
Στη συνέχεια, ακολούθησε ένα πείραμα για να δούμε την επίδραση του αριθμού των αιμοπεταλίων (μέσω αραίωσης του PRP) στην ευαισθησία της μεθόδου. Το αποτέλεσμα φαίνεται στο διάγραμμα 5.



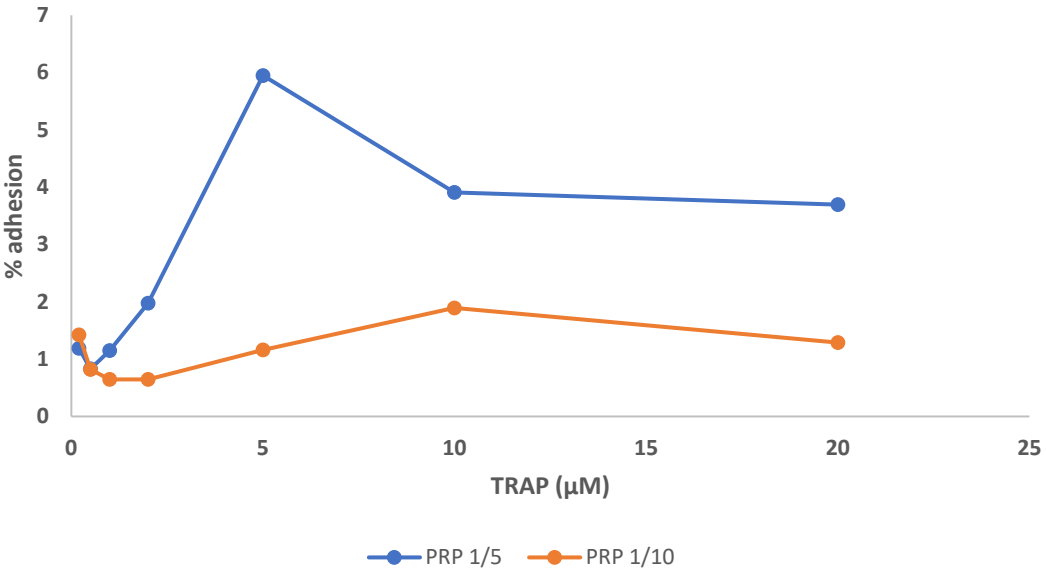
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση τη συγκέντρωση τους, χωρίς να έχει προηγηθεί επίστρωση του plate με πρωτεΐνη προσκόλλησης.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε, μια γραμμική σχέση μεταξύ της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και της αραίωσης τους επί του αρχικού δείγματος PRP.

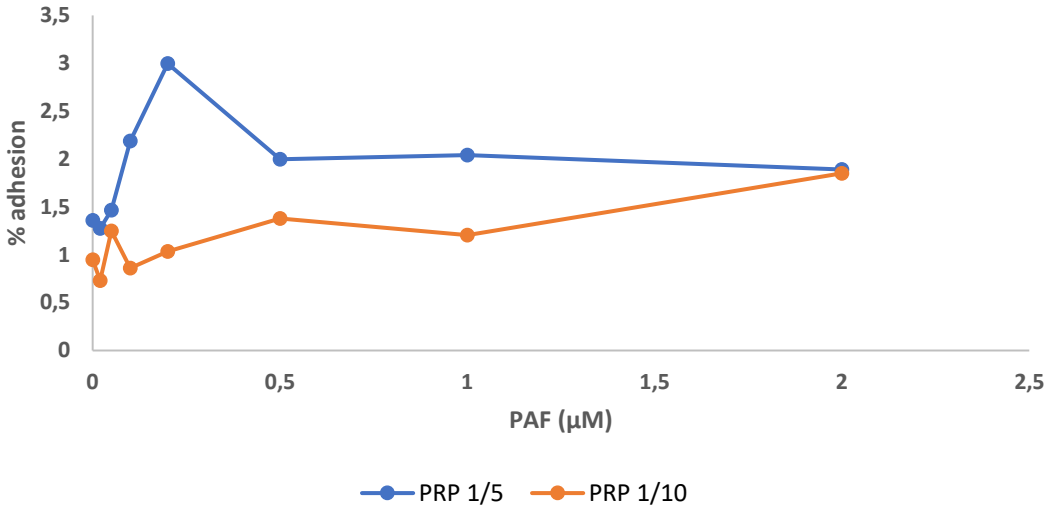
Από τις παραπάνω αραιώσεις του αρχικού δείγματος PRP, επιλέξαμε την αραίωση 1/5 (0,2) και 1/10 (0,1) και δοκιμάσαμε τους ενεργοποιητικούς παράγοντες ADP, TRAP και PAF σε επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις για να δούμε αν υπάρχει δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα 6, 7 και 8.



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε δύο αραιώσεις επί του αρχικού δείγματος PRP (1/5 & 1/10) σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP.



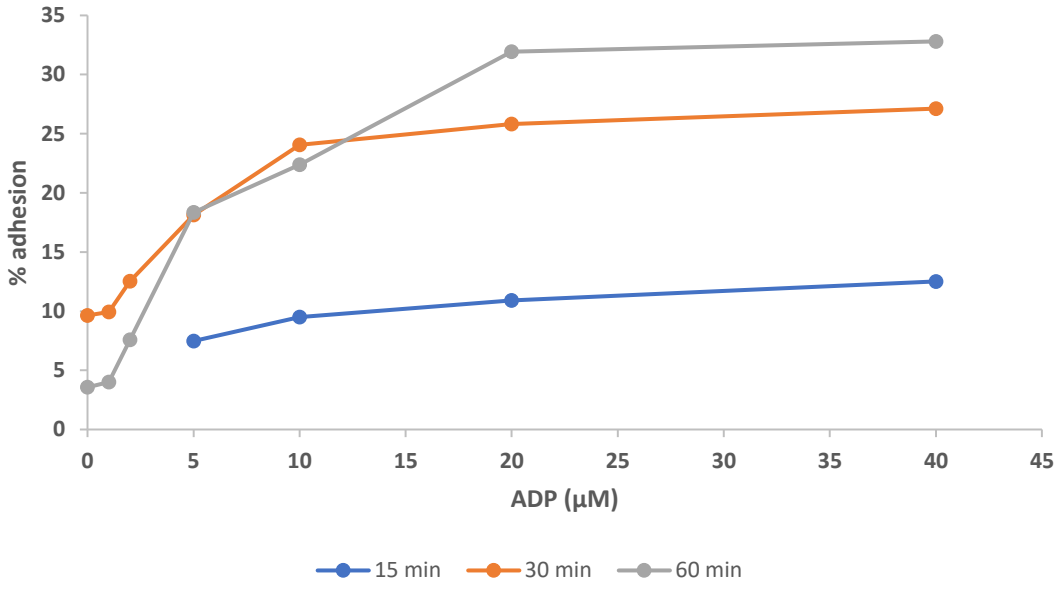
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε δύο αραιώσεις επί του αρχικού δείγματος PRP (1/5 & 1/10) σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης TRAP.



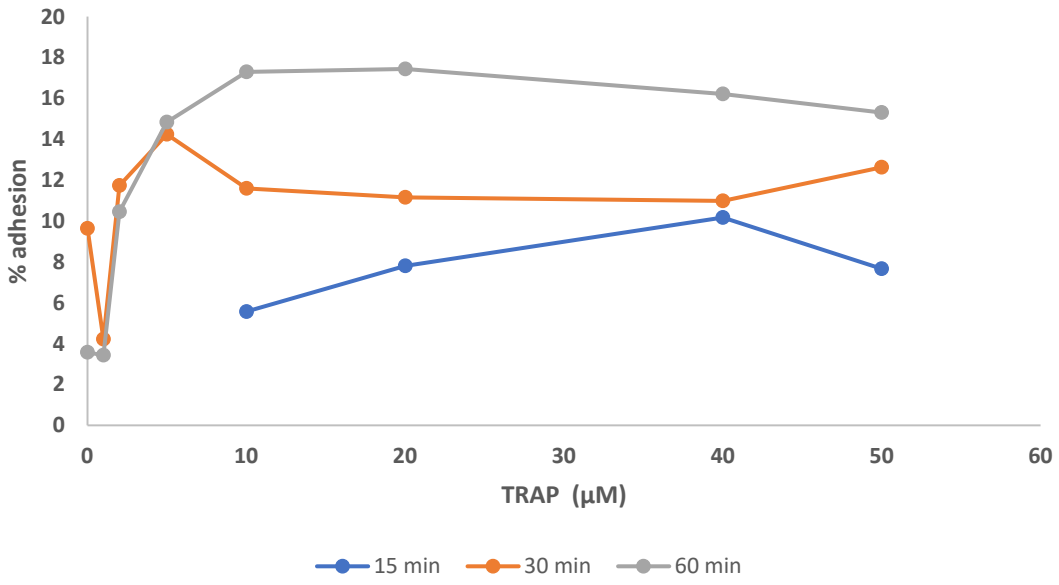
Διάγραμμα 8: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε δύο αραιώσεις επί του αρχικού δείγματος PRP (1/5 & 1/10) σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης PAF.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αραίωση αιμοπεταλίων 1/10 επί του αρχικού δείγματος έχουν πολύ μικρή προσκόλληση στις περισσότερες συγκεντρώσεις και των τριών ενεργοποιητικών παραγόντων. Αντίθετα στην αραίωση αιμοπεταλίων 1/5 επί του αρχικού δείγματος, υπάρχει μια περισσότερο δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων και των τριών ενεργοποιητικών παραγόντων. Ωστόσο όσον αφορά τον ενεργοποιητικό παράγοντα PAF, τα αποτελέσματα επί της % προσκόλλησης του διαλύτη του BSA (σχηματικά απεικονίζεται ως PAF 0μM), δείχνουν ότι υπάρχει μια προσκόλληση 0,95% με μέγιστη προσκόλληση στην υψηλότερη συγκέντρωση PAF 1,85%, δηλαδή δεν υπάρχει διαφορά μεγαλύτερη από 1% μεταξύ BSA και PAF.

Επόμενο βήμα ήταν να εξεταστεί η επίδραση του χρόνου επώασης στην επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τη χρήση δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, ADP και TRAP. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα 9 και 10.



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP σε τρεις διαφορετικούς χρόνους επώασης (15, 30 και 60 λεπτά)

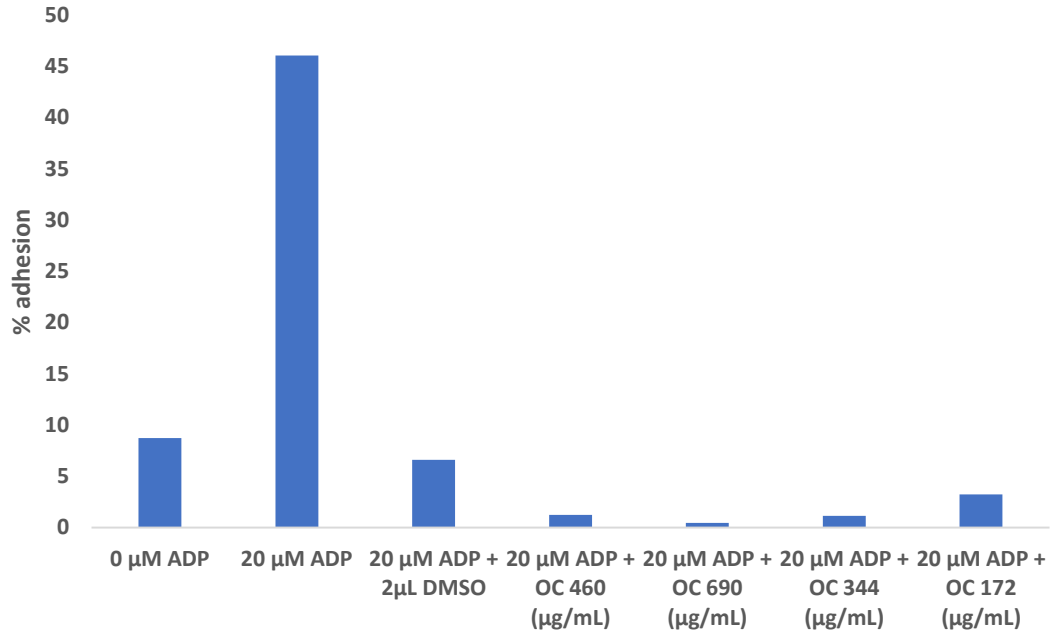


Διάγραμμα 10: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης TRAP σε τρεις διαφορετικούς χρόνους επώασης (15, 30 και 60 λεπτά)

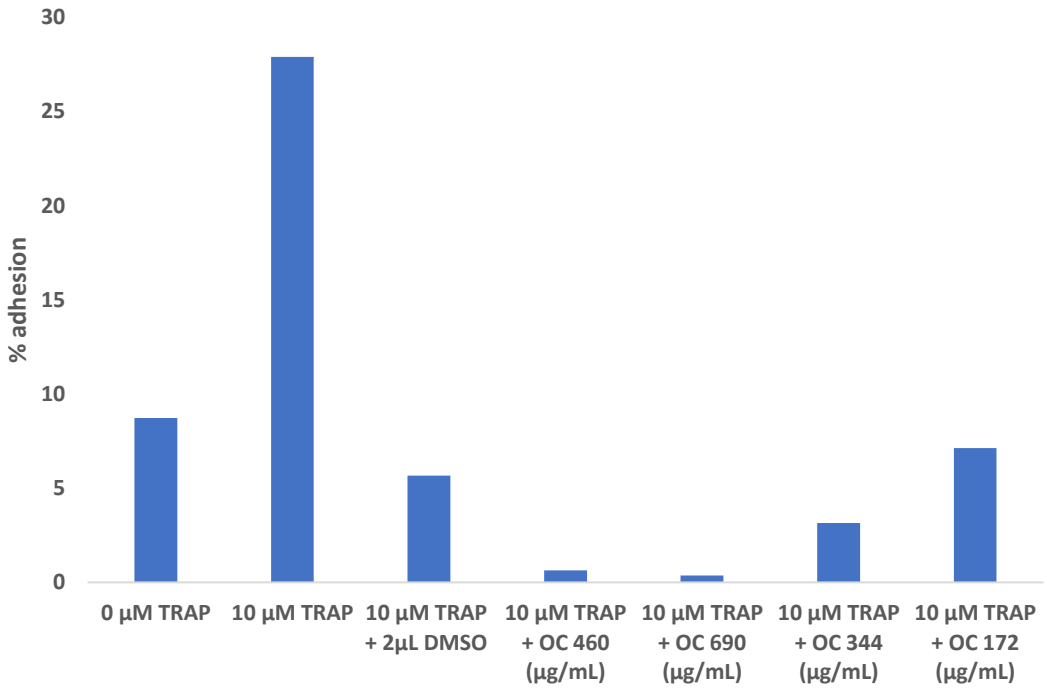
Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι στην επώαση των 60 λεπτών επιτυγχάνεται υψηλότερη προσκόλληση των αιμοπεταλίων συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενεργοποιητικού παράγοντα, τόσο του ADP όσο και του TRAP. Συγκεκριμένα, από τη συγκέντρωση 20μM για τον ADP μεταξύ της επώασης 30 και 60 λεπτών και από τη συγκέντρωση 10μM για τον TRAP μεταξύ της επώασης 30 και 60 λεπτών. Στην

επώαση των 15 λεπτών έχουμε χαμηλότερη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ανεξαρτήτου συγκέντρωσης του ενεργοποιητικού παράγοντα.

Ακολούθησε ένα πείραμα αναζήτησης για της βέλτιστες συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης που προκαλούν αναστολή στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, παρουσία δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, των ADP και TRAP. Ακόμα, ήταν σκόπιμο να ελεγχθεί πως αντιδρά ο διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε συνδυασμό με τους ενεργοποιητικούς παράγοντες, καθώς αποτελεί διαλύτη φαινολών και φαινολικών διαλυμάτων, και θέλαμε να γνωρίζουμε την επίδραση που ασκεί στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα 11 και 12.



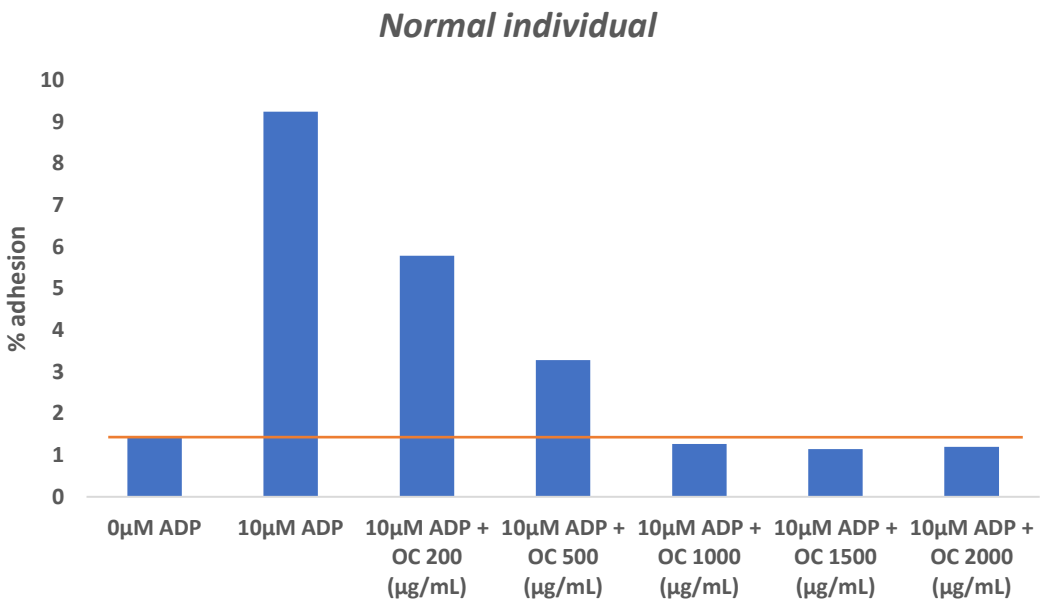
Διάγραμμα 11: Διάγραμμα απεικόνισης σε στήλες της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP και της φαινολικής ένωσης ελαιοκανθάλης.



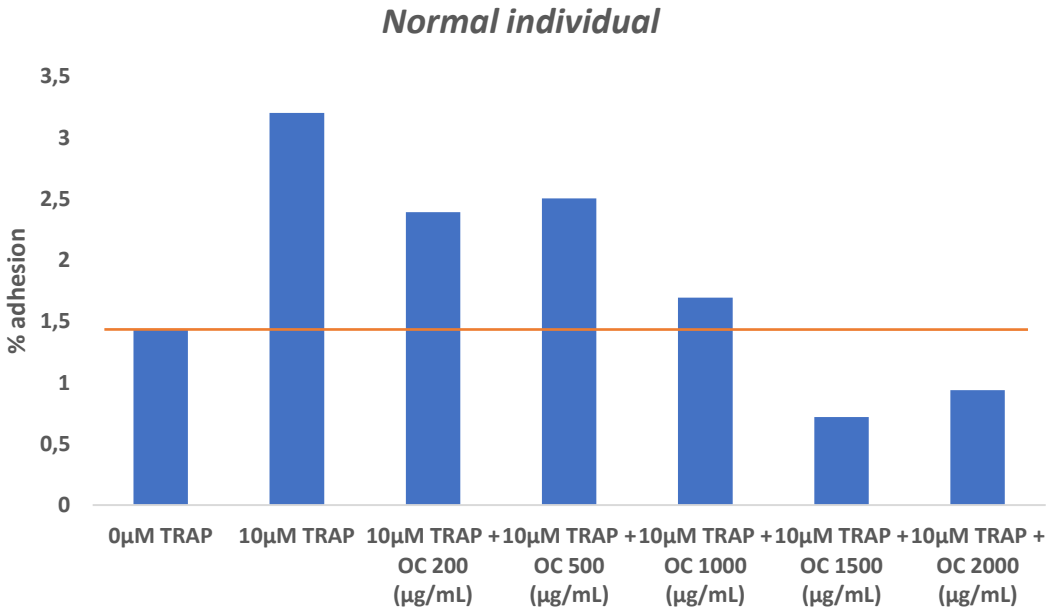
Διάγραμμα 12: Διάγραμμα απεικόνισης σε στήλες της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα TRAP και της φαινολικής ένωσης ελαιοκανθάλης.

Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι ο διαλύτης DMSO είναι τοξικός για τα αιμοπετάλια, καθώς καταφέρνει να αναστείλει τελείως την ενεργοποίηση που προκαλεί ο ADP και ο TRAP και μάλιστα κάτω από τα επίπεδα προσκόλλησης που προκαλείται μη ειδικά παρουσία μόνο των αιμοπεταλίων στην αραίωση που δουλεύουμε. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης που δοκιμάσαμε, φαίνεται ότι είναι αρκετά υψηλές, καθώς η δράση τους είναι επίσης τοξική απέναντι στα αιμοπετάλια, τα οποία μάλλον καταστρέφονται τελείως καθώς τα ποσοστά προσκόλλησης είναι πολύ πιο χαμηλά από τα επίπεδα προσκόλλησης που προκαλούνται μη ειδικά παρουσία μόνο των αιμοπεταλίων στην αραίωση που δουλεύουμε, τόσο παρουσία ADP όσο και TRAP.

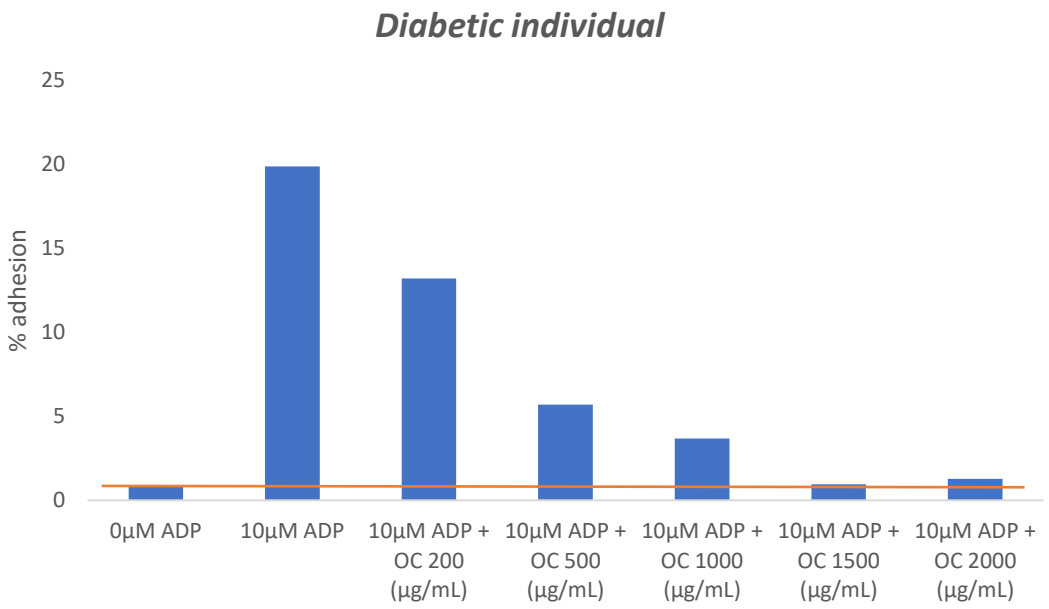
Αφού παρατηρήσαμε ότι το DMSO σαν διαλύτης είναι τοξικός για τα αιμοπετάλια, κάναμε πειράματα όπου η ελαιοκανθάλη ήταν διαλυμένη σε λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA). Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα 13 και 14 για φυσιολογικό εθελοντή και στα διαγράμματα 15 και 16 για διαβητικό εθελοντή.



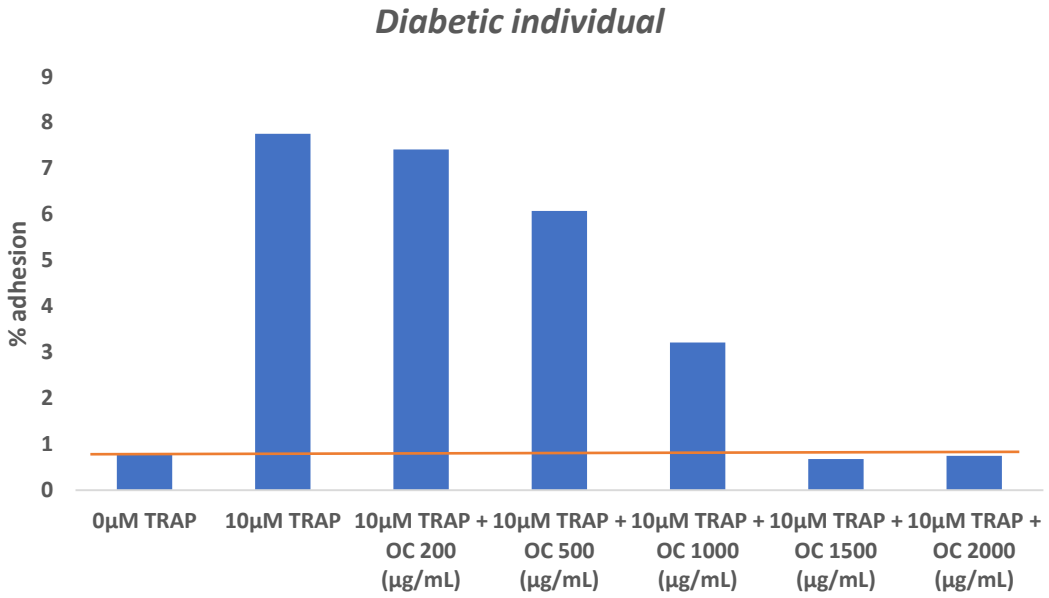
Διάγραμμα 13: Διάγραμμα απεικόνισης σε στήλες της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε σταθερή συγκέντρωση και της φαινολικής ένωσης ελαιοκανθάλης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις για φυσιολογικό εθελοντή.



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα απεικόνισης σε στήλες της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα TRAP σε σταθερή συγκέντρωση και της φαινολικής ένωσης ελαιοκανθάλης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις για φυσιολογικό εθελοντή.



Διάγραμμα 15: Διάγραμμα απεικόνισης σε στήλες της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε σταθερή συγκέντρωση και της φαινολικής ένωσης ελαιοκανθάλης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις για διαβητικό εθελοντή.



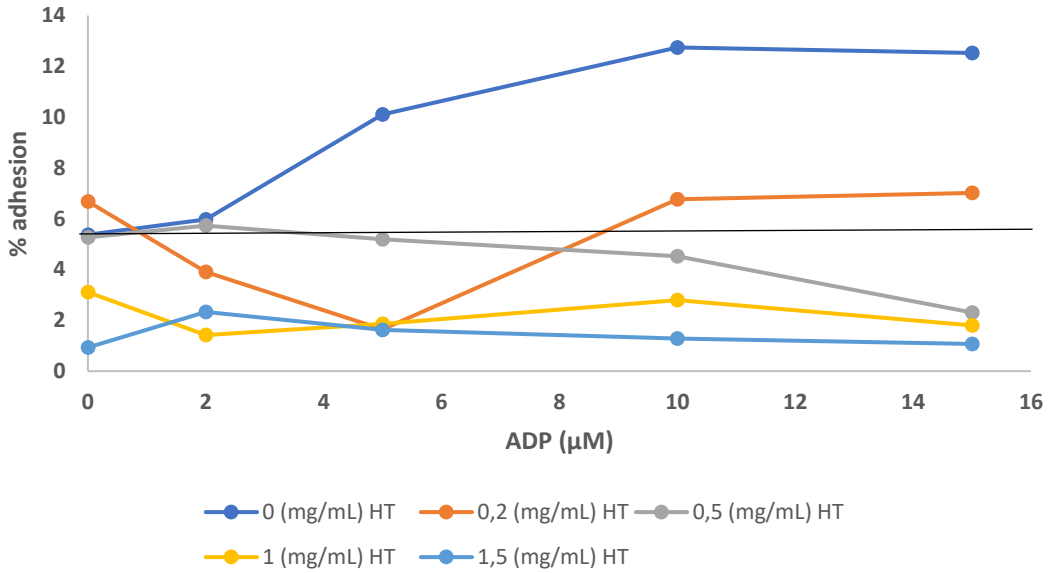
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα απεικόνισης σε στήλες της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα TRAP σε σταθερή συγκέντρωση και της φαινολικής ένωσης ελαιοκανθάλης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις για διαβητικό εθελοντή.

Από τα διαγράμματα 13 και 14 για τον φυσιολογικό εθελοντή παρατηρούμε ότι υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ της αναστολής της επί της % προσκόλλησης και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης παρουσία και των δύο ενεργοποιητικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ADP η συγκέντρωση της

ελαιοκανθάλης που προκαλεί τη βέλτιστη αναστολή προσκόλλησης είναι 500 μg/mL, ενώ παρουσία TRAP είναι 1000 μg/mL αντίστοιχα. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης φαίνεται ότι καταστρέφουν τα αιμοπετάλια καθώς τα επίπεδα προσκόλλησης είναι χαμηλότερα από την μη ειδική προσκόλληση που δίνουν τα αιμοπετάλια του συγκεκριμένου εθελοντή.

Από τα διαγράμματα 15 και 16 για τον διαβητικό εθελοντή παρατηρούμε ότι υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ της αναστολής της επί της % προσκόλλησης και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης παρουσία και των δύο ενεργοποιητικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ADP η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης που προκαλεί τη βέλτιστη αναστολή προσκόλλησης είναι 1000 μg/mL, ενώ παρουσία TRAP είναι 1000 μg/mL αντίστοιχα. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης φαίνεται ότι έχουν φτάσει σε πλατό και ίσως καταστρέφουν τα αιμοπετάλια καθώς τα επίπεδα προσκόλλησης είναι στο όριο ή χαμηλότερα από την μη ειδική προσκόλληση που δίνουν τα αιμοπετάλια του συγκεκριμένου διαβητικού εθελοντή.

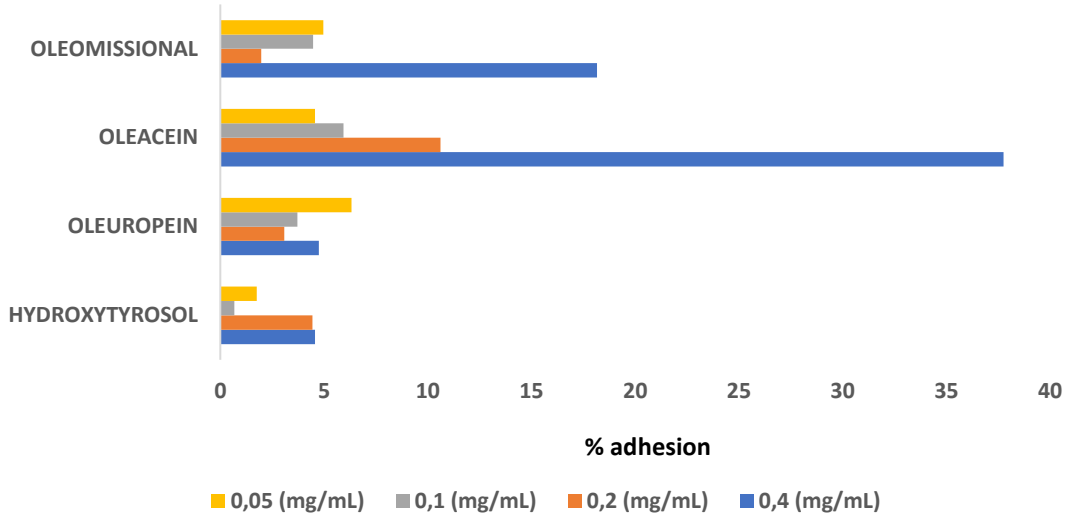
Ακολούθησε ένα πείραμα για την εύρεση των βέλτιστων συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης (HT) σε λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA) που προκαλούν αναστολή στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε διαβητικό εθελοντή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 17.



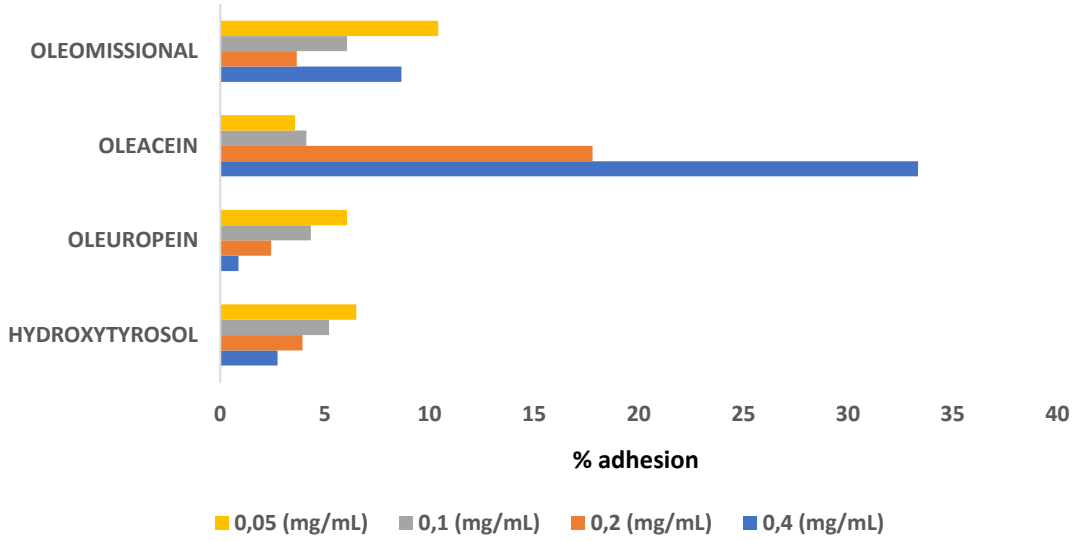
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP και της φαινολικής ένωσης Υδροξυτυροσόλης (HT) σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Απουσία της φαινόλης έχουμε την καμπύλη προσκόλλησης από τον ενεργοποιητικό παράγοντα ADP.

Τα αποτελέσματα παρουσία ADP δείχνουν την αναστολή της προσκόλλησης από την υδροξυτυροσόλη σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, μόνο οι δύο συγκεντρώσεις της υδροξυτυροσόλης 0,2 και 0,5 mg/mL αναστέλλουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων οριακά στο επίπεδο της μη ειδικής προσκόλλησης. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της φαινόλης φαίνεται ότι δρουν κυτταροτοξικά.

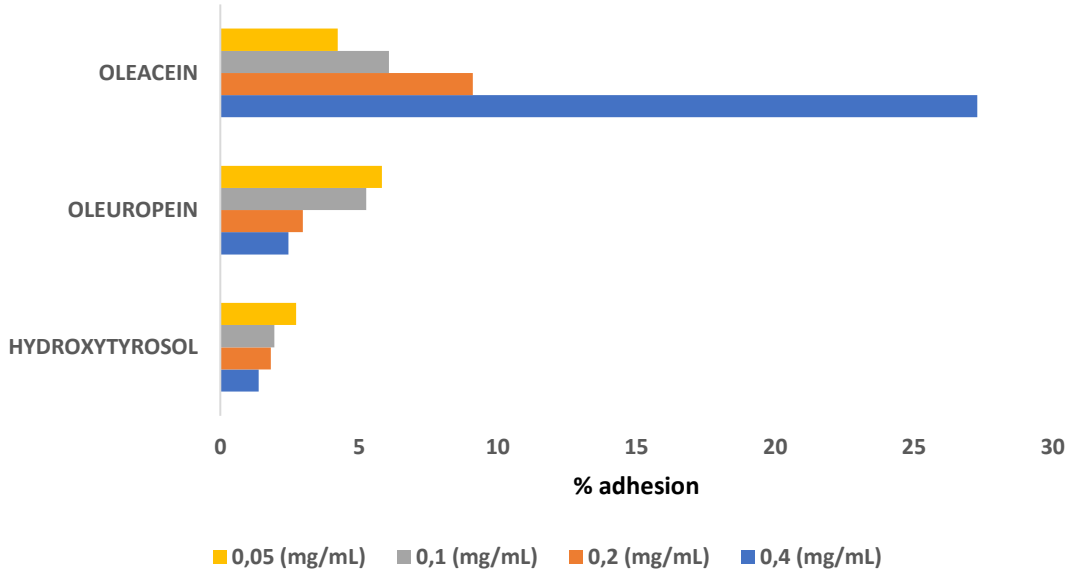
Ακολούθησε ένα πείραμα με τη χρήση τεσσάρων φαινολικών ενώσεων, της υδροξυτυροσόλης (HT), της ελαιασίνης (OA), της ελευρωπαΐνης (OE) και της ελαιομισσιονάλης σε λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA), παρουσία δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, του ADP και TRAP σε φυσιολογικό εθελοντή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα 18, 19 και 20.



Διάγραμμα 18: Διάγραμμα απεικόνισης σε ράβδους της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες συγκεντρώσεων των τεσσάρων φαινολικών ενώσεων, υδροξυτυροσόλης (HT), ελαιασίνης (OA), ελευρωπαΐνης (OE) και ελαιομισσιονάλης απουσία ενεργοποιητικών παραγόντων. Η κάθετη μαύρη γραμμή συμβολίζει την επί της % μη ειδική προσκόλληση των αιμοπεταλίων χωρίς την παρουσία κάποιου ενεργοποιητικού παράγοντα ή φαινόλης. Η μη ειδική προσκόλληση ήταν 3,04%.



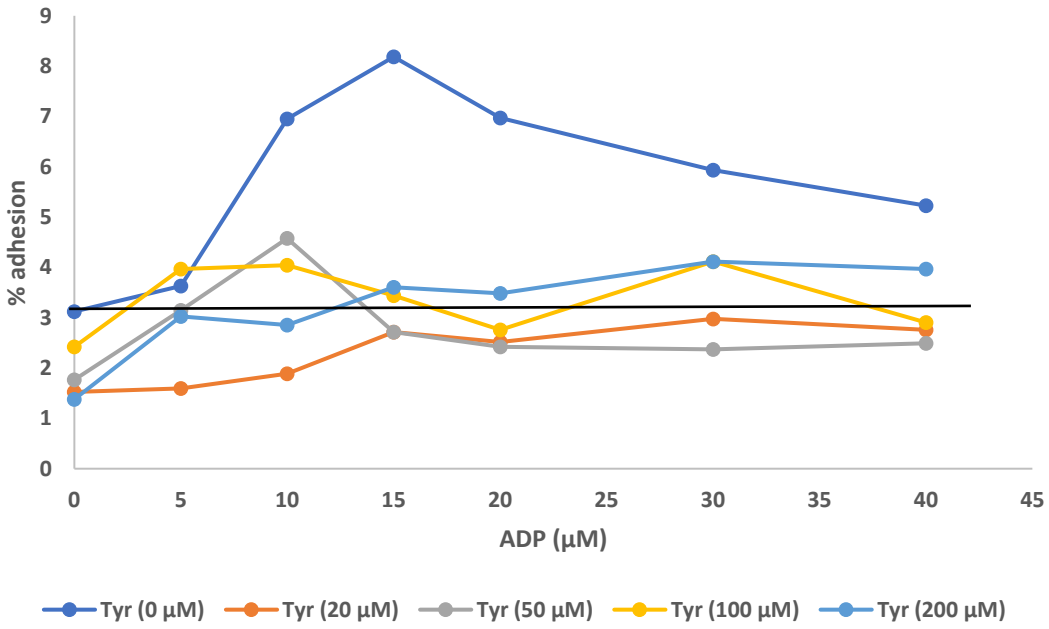
Διάγραμμα 19: Διάγραμμα απεικόνισης σε ράβδους της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες συγκεντρώσεων των τεσσάρων φαινολικών ενώσεων, υδροξυτυροσόλης (HT), ελαιασίνης (OA), ελευρωπαΐνης (OE) και ελαιομισσιονάλης παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε συγκέντρωση 15 (μM). Η κάθετη μαύρη γραμμή συμβολίζει την επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων παρουσία μόνο του ADP. Η προσκόλληση παρουσία του ADP ήταν 5,62%.



Διάγραμμα 20: Διάγραμμα απεικόνισης σε ράβδους της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με καθορισμένες συνθήκες συγκεντρώσεων των τεσσάρων φαινολικών ενώσεων, υδροξυτυροσόλης (HT), ελαιασίνης (OA), ελευρωπαΐνης (OE) και ελαιομισσιονάλης παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα TRAP σε συγκέντρωση 20 (μM). Η κάθετη μαύρη γραμμή συμβολίζει την επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων παρουσία μόνο του TRAP. Η προσκόλληση παρουσία του TRAP ήταν 4,49%.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις από μόνες τους (διάγραμμα 18) σε μερικές από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν πιθανώς έχουν ενεργοποιητική δράση στα αιμοπετάλια, καθώς παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ειδικά στις πυκνές συγκεντρώσεις της ελαιασίνης και της ελαιομισσιονάλης. Στο διάγραμμα 19, παρουσία ADP, φαίνεται να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση αναστολής της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των φαινολών της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης. Αντίθετα, οι φαινόλες της ελαιασίνης και της ελαιομισσιονάλης φαίνεται πως έχουν κάποια δράση στις πιο αραιές συγκεντρώσεις, καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ειδικά στις δύο πυκνές συγκεντρώσεις της ελαιασίνης. Στο διάγραμμα 20, παρουσία TRAP, έχουμε δεδομένα για τις τρεις από τις τέσσερις φαινολικές ενώσεις, την υδροξυτυροσόλη, την ελαιασίνη και την ελευρωπαΐνη. Αντίστοιχα και με το διάγραμμα 19, φαίνεται να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση αναστολής της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των φαινολών της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης. Όσον αφορά την ελαιασίνη, φαίνεται πως έχει δράση στις πιο αραιές συγκεντρώσεις, καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων.

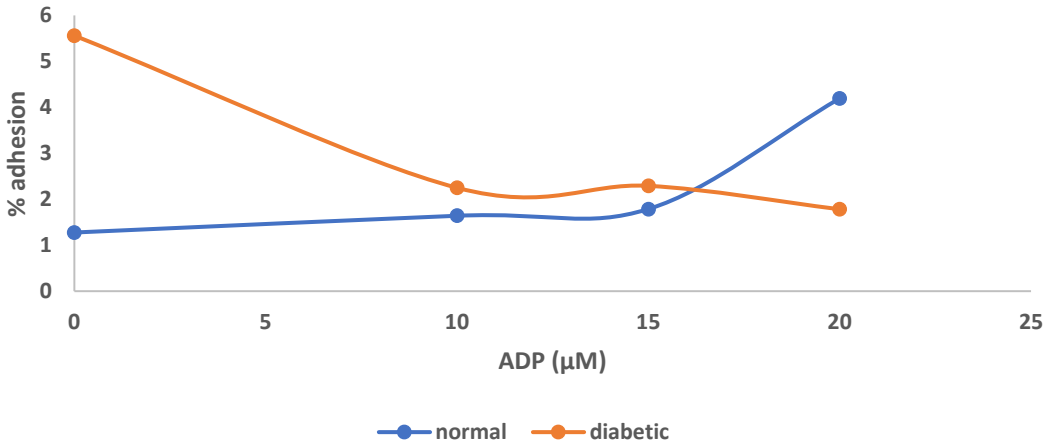
Στο επόμενο πείραμα, αλλάξαμε τις συνθήκες, πραγματοποιώντας αρχικά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εκτός μικροπλακιδίων σε σωλήνες eppendorf για 30 λεπτά. Η αλλαγή αυτή έγινε, καθώς είδαμε ότι είχαμε πολύ μεγάλες προσκολλήσεις με τις φαινολικές ενώσεις και ίσως κάτι γινόταν με την BSA και επηρέαζε την τελική προσκόλληση. Η δεύτερη αλλαγή ήταν, η διαφορετική αραίωση των αιμοπεταλίων, καθώς πλέον ήταν δυνατό να γνωρίζουμε την ακριβή ποσότητα αιμοπεταλίων στο δείγμα μας, μέσω μέτρησης στον βιοχημικό αναλυτή. Δουλέψαμε σε συγκέντρωση 60.000 plt/μL. Στο πείραμα που ακολούθησε χρησιμοποιήσαμε την φαινολική ένωση της τυροσόλης (Tyr) σε BSA, παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε φυσιολογικό εθελοντή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 21.



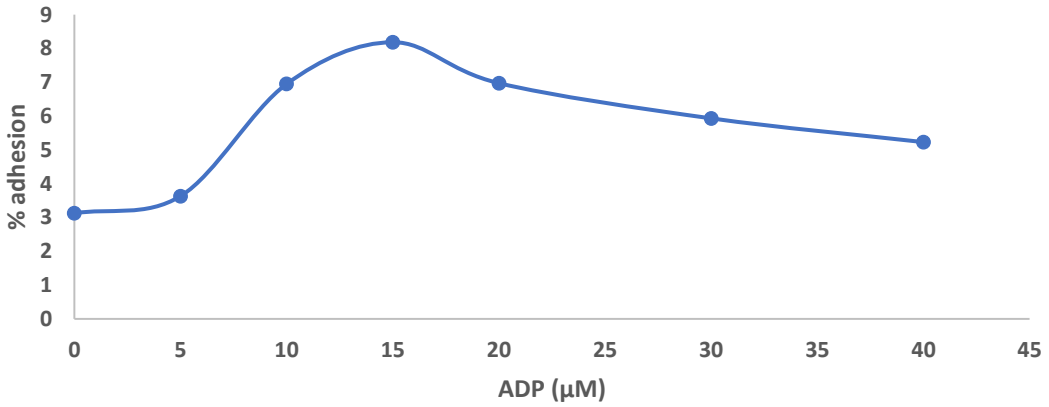
Διάγραμμα 21: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP και της φαινολικής ένωσης Τυροσόλης (Tyr) σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Απουσία της φαινόλης έχουμε την καμπύλη προσκόλλησης από τον ενεργοποιητικό παράγοντα ADP.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις της τυροσόλης είναι αρκετά μεγάλες καθώς προκαλούν σχεδόν πλήρη αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων.

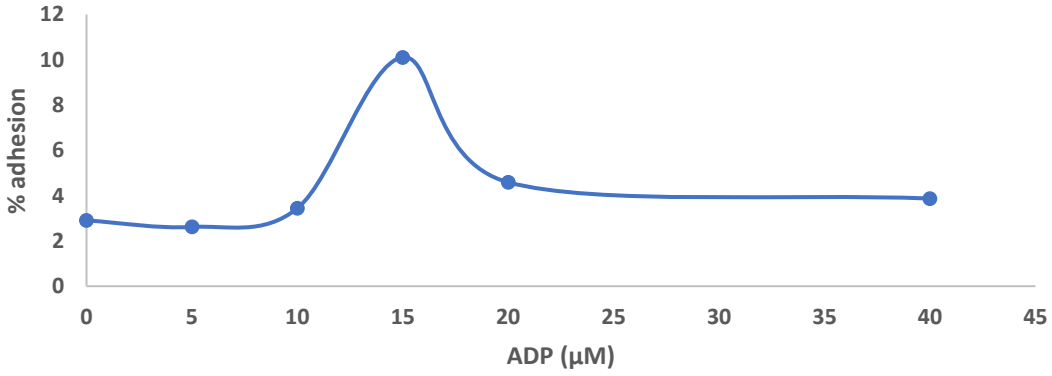
Στα επόμενα πειράματα, καταγράψαμε τη σχέση ενεργοποίησης μεταξύ του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με διαφορετικούς εθελοντές. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα 22, 23 και 24.



Διάγραμμα 22: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP.



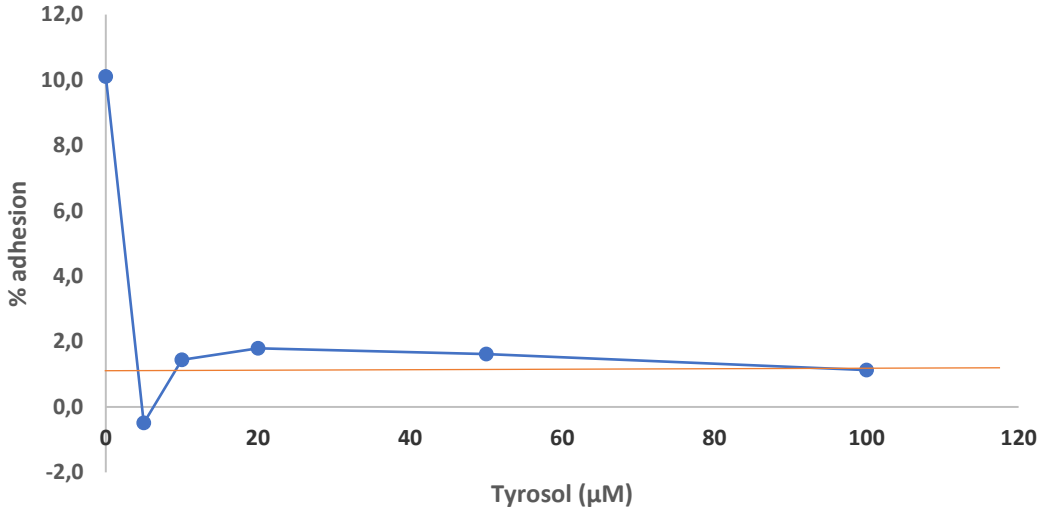
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP σε φυσιολογικό εθελοντή.



Διάγραμμα 24: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP σε φυσιολογικό εθελοντή.

Τα αποτελέσματα και των τριών διαγραμμάτων επισημαίνουν τη διαφορετικότητα κάθε εθελοντή, δείχνοντας ότι η βέλτιστη συγκέντρωση του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP, μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο.

Στο τελευταίο πείραμα, καταγράψαμε εκτός από την καμπύλη ενεργοποίησης ADP και τη δράση της φαινολικής ένωσης τυροσόλης (Tyr), παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε σταθερή συγκέντρωση σε φυσιολογικό εθελοντή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 25.



Διάγραμμα 25: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε σταθερή συγκέντρωση του παράγοντα ενεργοποίησης ADP και της φαινολικής ένωσης Τυροσόλης (Tyr) σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Απουσία της φαινόλης, δηλαδή, για Tyr 0μM έχουμε το ποσοστό της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων παρουσία ADP 15μM. Η οριζόντια γραμμή συμβολίζει τη μη ειδική προσκόλληση των αιμοπεταλίων.

Από το διάγραμμα βλέπουμε ότι υπάρχει μια σημαντική αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων από τον ανασταλτικό παράγοντα που είναι η τυροσόλη, χωρίς να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση, κάτι που δείχνει ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις τυροσόλης έχουμε πιάσει πλατό και θα ήταν χρήσιμο να δούμε πως θα λειτουργούσε η αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε μικρότερες συγκεντρώσεις τυροσόλης.

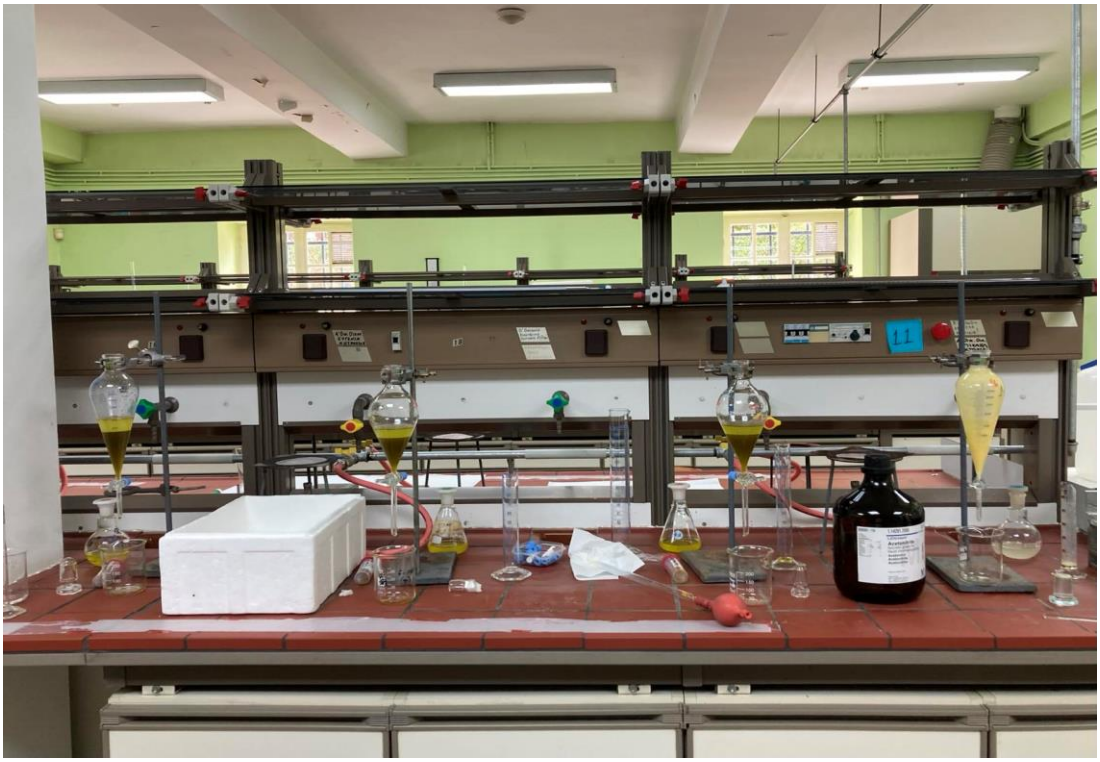
4.2 Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από βούτυρο και ελαιόλαδο διαφορετικών συγκεντρώσεων ελαιοκανθάλης

Η μέθοδος της εκχύλισης αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού την οποία χρησιμοποιούμε για να παραλάβουμε μία ή περισσότερες ουσίες από ένα δείγμα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε βασίζεται στη χρήση του διαλύτη ακετονιτρίλιου (CH_3CN). Πραγματοποιήσαμε τέσσερις εκχυλίσεις σε τέσσερα διαφορετικά υποστρώματα. Τα τρία εκ των οποίων αφορούσαν ελαιόλαδο και το τέταρτο ήταν βούτυρο. Πιο συγκεκριμένα, εκχυλίσαμε βούτυρο ποσότητας 40 ml (BU) της εταιρείας Lurpak, 40 ml ελαιόλαδο δίχως ελαιοκανθάλη (OO), 40 ml έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 250 mg ελαιοκανθάλη/Kg (EVOO 250mg OC) και 40 ml έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 500 mg ελαιοκανθάλη/Kg (EVOO 500mg OC). Οι τελικές ποσότητες που εκχυλίσαμε σε μάζα εκχυλίσματος, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, όπου έχει υπολογιστεί και η συγκέντρωση.

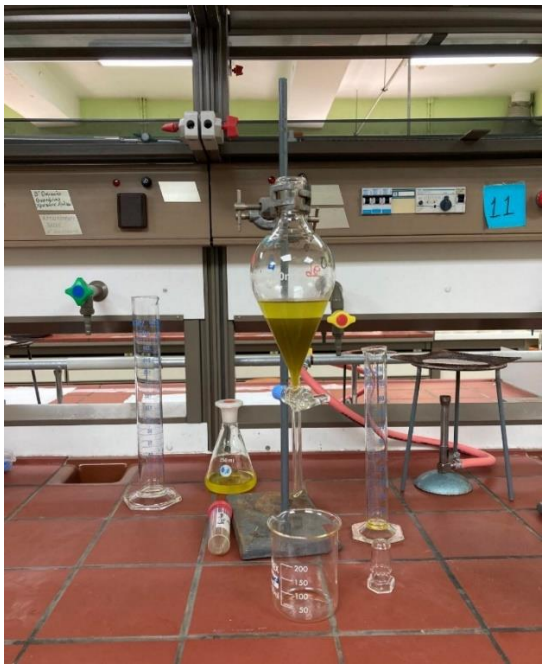
Πίνακας 1: Καθαρό βάρος μάζας εκχυλισμάτων και συγκέντρωση

Εκχυλίσματα	**Καθαρό βάρος μάζας εκχυλισμάτων (g)**	**Συγκέντρωση (mg/mL)**
Butter	0,2519	50,38
OO 0mg OC	0,148	29,6
EVOO 250mg OC	0,1611	32,22
EVOO 500mg OC	0,1738	34,76

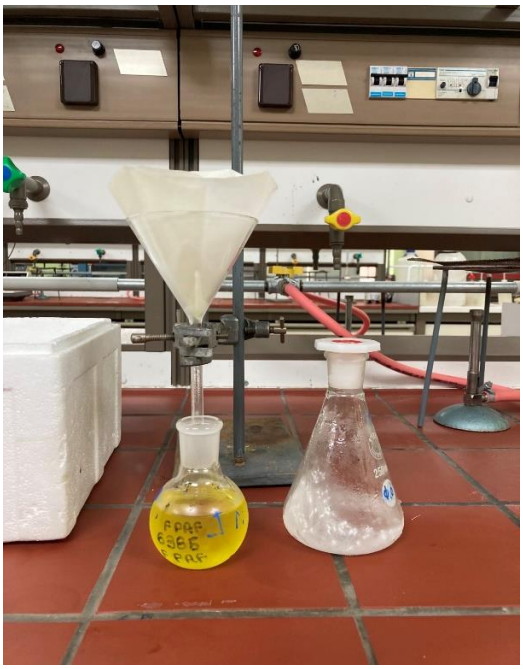
Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η πορεία της εκχύλισης.



Εικόνα 12: Εκχύλιση τριών ελαιόλαδων διαφορετικής συγκέντρωσης ελαιοκανθάλης και βουτύρου



Εικόνα 13: Απόρριψη ελαιώδους φάσης και συλλογή φάσης ακετονιτριλίου σε κωνική φιάλη με πώμα, η οποία θα υπερψυχθεί (-80 ºC)



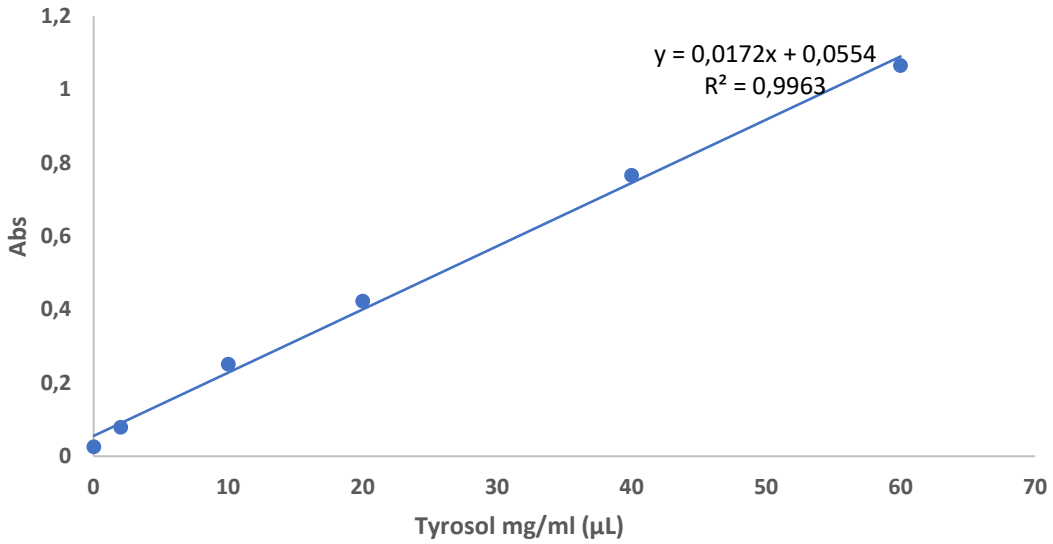
Εικόνα 14: Διήθηση της φάσης ακετονιτριλίου σε διηθητικό χαρτί μετά από υπερκατάψυξη μιας ώρας στους -80 ºC

4.3 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα ελαιολάδου και βουτύρου

Ο προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα έγινε με τη μέθοδο της Folin-Ciocalteu με πρότυπο διάλυμα Τυροσόλης 1 mg/mL. Τα συνολικά φαινολικά Tyr ανά εκχύλισμα φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων εξεφρασμένα σε ισοδύναμα τυροσόλης ανά εκχύλισμα

Εκχυλίσματα	μmol Tyr/ mL	μmol Tyr / mg
Butter	3,569	0,071
OO 0mg OC	5,732	0,194
EVOO 250mg OC	10,737	0,333
EVOO 500mg OC	20,055	0,577



Διάγραμμα 26: Πρότυπη καμπύλη Τυροσόλης

4.4 Αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας

Τα πειράματα αντιαιμοπεταλιακής δράσης φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας, έγιναν με τη χρήση ως ανασταλτικών παραγόντων, των εκχυλισμάτων ελαιολάδου διαφορετικών συγκεντρώσεων ελαιοκανθάλης (0mg, 250mg & 500mg) και βουτύρου σε διαβητικούς εθελοντές. Από το σύνολο των πειραμάτων υπολογίσαμε την IC_{50}, τη συγκέντρωση του ανασταλτικού παράγοντα που προκαλεί 50% αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: IC_{50} εκχυλισμάτων ελαιολάδου με συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης 0mg, 250mg & 500mg.

Εκχυλίσματα	IC_{50} (μg/μL)	n (πλήθος πειραμάτων)
OO 0mg OC	0,078933	3
EVOO 250mg OC	0,029008	3
EVOO 500mg OC	0,026597	4

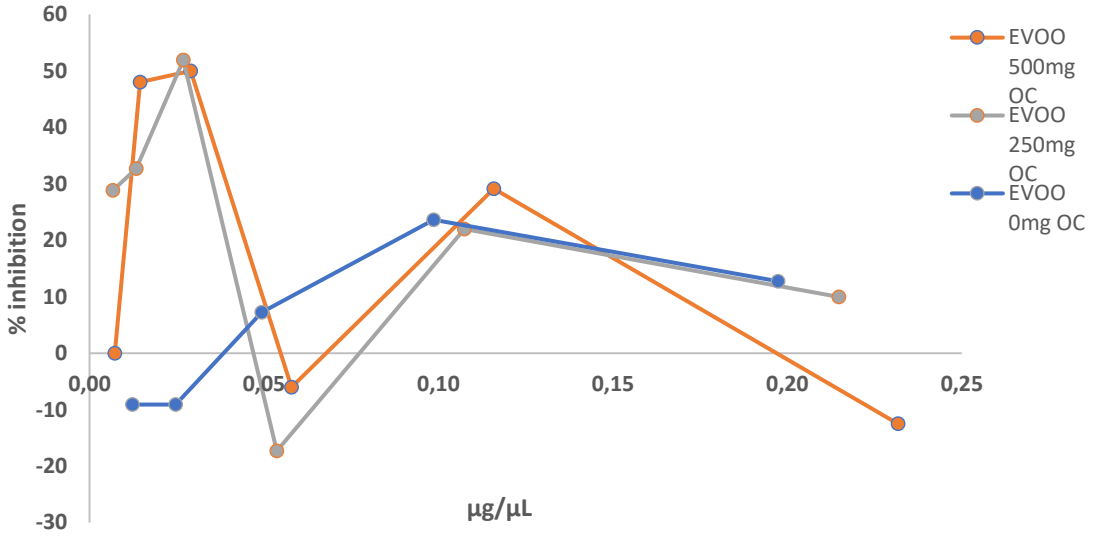
Όσον αφορά το εκχύλισμα βουτύρου, δεν καταφέραμε να βρούμε τη συγκέντρωση IC_{50}, καθώς η πυκνότερη συγκέντρωση του έως 0,3358 μg/μL, έδωσε μέγιστη αναστολή 23%.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά οι τιμές IC_{50} ανά πείραμα.

Πίνακας 4: Τιμές IC 50 ανά εκχύλισμα και ανά πείραμα

Εκχυλίσματα	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 4	Μέσες τιμές IC_{50}(μg/μL)
IC_{50} OO 0mg OC	0,039467	0,098667	0,098667	-	**0,078933**
IC_{50} EVOO 250mg OC	0,021061	0,02685	0,039113	-	**0,029008**
IC_{50} EVOO 500mg OC	0,046347	0,00935	0,021725	0,028967	**0,026597**

Στο διάγραμμα 27 απεικονίζεται η επί της % αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τα τρία εκχυλίσματα ελαιόλαδου.



Διάγραμμα 27: Διάγραμμα γραμμικής απεικόνισης της επί της % αναστολής συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, από τρεις ανασταλτικούς παράγοντες, το εκχύλισμα από ελαιόλαδο με περιεκτικότητα 500mg OC, το εκχύλισμα από ελαιόλαδο με περιεκτικότητα 250mg OC και το εκχύλισμα από ελαιόλαδο με περιεκτικότητα 0mg OC.

Από το διάγραμμα, μπορούμε να διακρίνουμε ότι στα εκχυλίσματα ελαιολάδου με συγκεντρώσεις 500mg και 250mg ελαιοκανθάλης φαίνεται να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις πιο αραιές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Έπειτα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιείται φαίνεται να αλλάζει η δράση των ανασταλτικών παραγόντων.

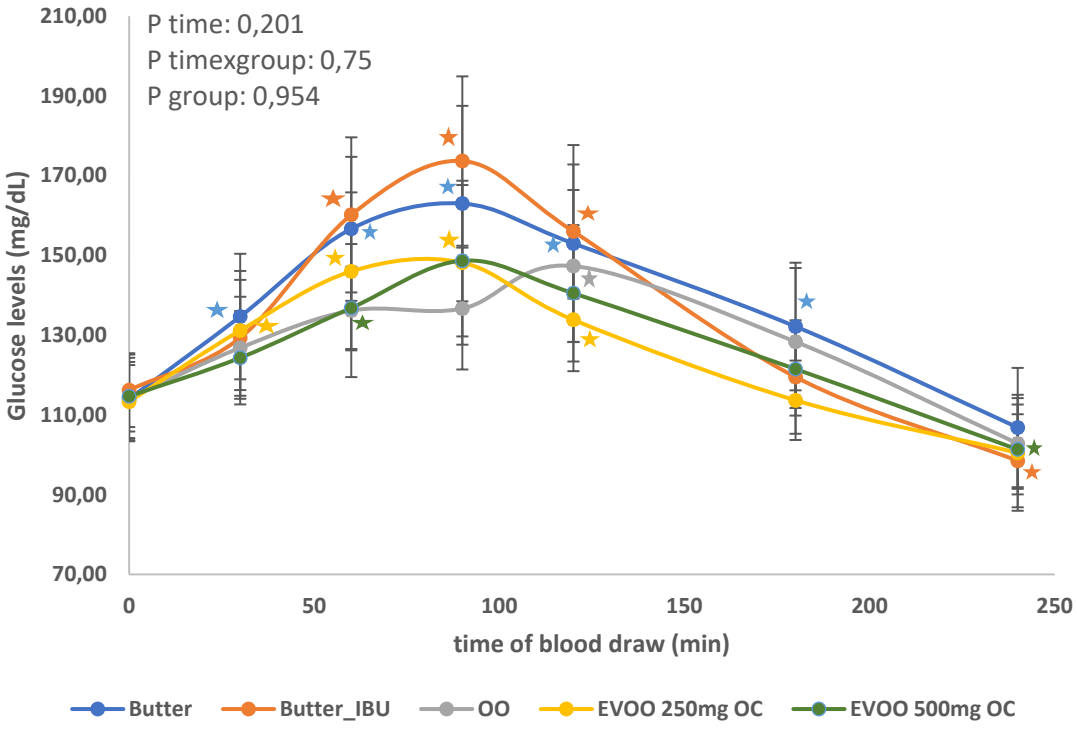
4.5 Οξεία επίδραση ελαιολάδων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης στα επίπεδα sP-selectin

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν 6 εθελοντές, 3 άντρες (50%) και 3 γυναίκες (50%), ηλικίας 51-59 ετών (55,8 ± 3,6). Τα βασικά ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών, τα οποία μετρήθηκαν πριν από κάθε παρέμβαση παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά των χαρακτηριστικών μεταξύ των παρεμβάσεων ($p > 0.05$).

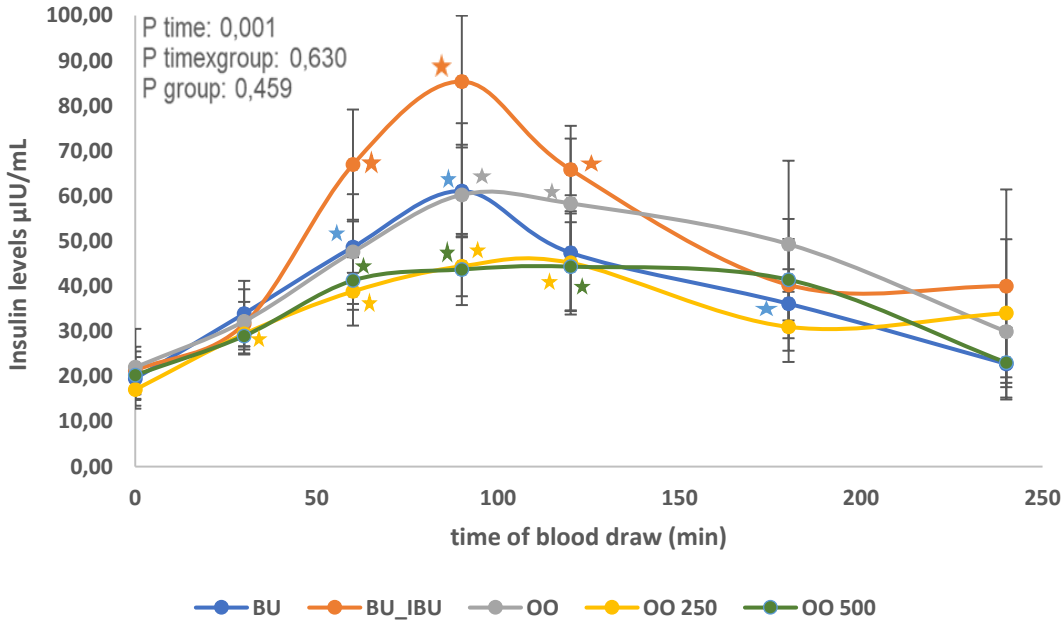
Πίνακας 5: Βασικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν από κάθε παρέμβαση (Ανθρωπομετρικά, Κλινικά & Βιοχημικά). Όπου Butter: Βούτυρο, Butter_IBU: Βούτυρο και Ιβουπροφαίνη, OO: ελαιόλαδο με 0 mg ελαιοκανθάλης, EVOO 250mg OC: έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 250 mg ελαιοκανθάλης, EVOO 500mg OC: έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 500 mg ελαιοκανθάλης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως : Μέσος Όρος ± Standard Error

	Butter	Butter_IBU	OO	EVOO 250mg OC	EVOO 500mg OC	P
Βάρος (Kg)	106,1 ± 18,5	105,3 ± 17,3	105,6 ± 19,4	105,9 ± 18,5	106,0 ± 19,6	1,000
BMI (Kg/m^2)	36,6 ± 7,1	36,3 ±7,0	36,4 ± 7,4	36,5 ± 7,0	36,5 ± 7,5	1,000
Περιφέρεια μέσης (cm)	117,2 ± 10,6	115,4 ± 8,9	116,4 ± 9,9	116,6 ± 9,7	117,3 ± 10,6	0,997
Περιφέρεια ισχίου (cm)	117,3 ± 8,3	116,1 ± 7,7	116,1 ± 8,5	116,8 ± 7,5	116,1 ± 7,5	0,999
Συστολική πίεση (mmHg)	125,8 ± 15,9	123,3 ± 14,0	130,0 ± 11,4	126,6 ± 20,4	129,5 ± 19,0	0,953
Διαστολική πίεση (mmHg)	75,0 ± 11,8	72,5 ± 8,8	75,8 ± 5,8	67,5 ± 15,1	71,1 ± 10,7	0,697
Γλυκόζη _Pre (mg/ dL)	114,0 ± 25,2	116,2 ± 22,6	114,1 ± 20,4	113,3 ± 24,3	114,6 ± 25,6	1,000
Ινσουλίνη_Pre (μIU/ mL)	19,5 ± 11,6	21,2 ± 12,9	22,0 ± 20,8	17,0 ± 10,3	20,2 ± 12,8	0,978
Τριγλυκερίδια (mg/ dL)	187,0 ± 106,6	155,0 ± 57,9	137,6 ± 60,4	136,8 ± 66,2	150,5 ± 69,7	0,776

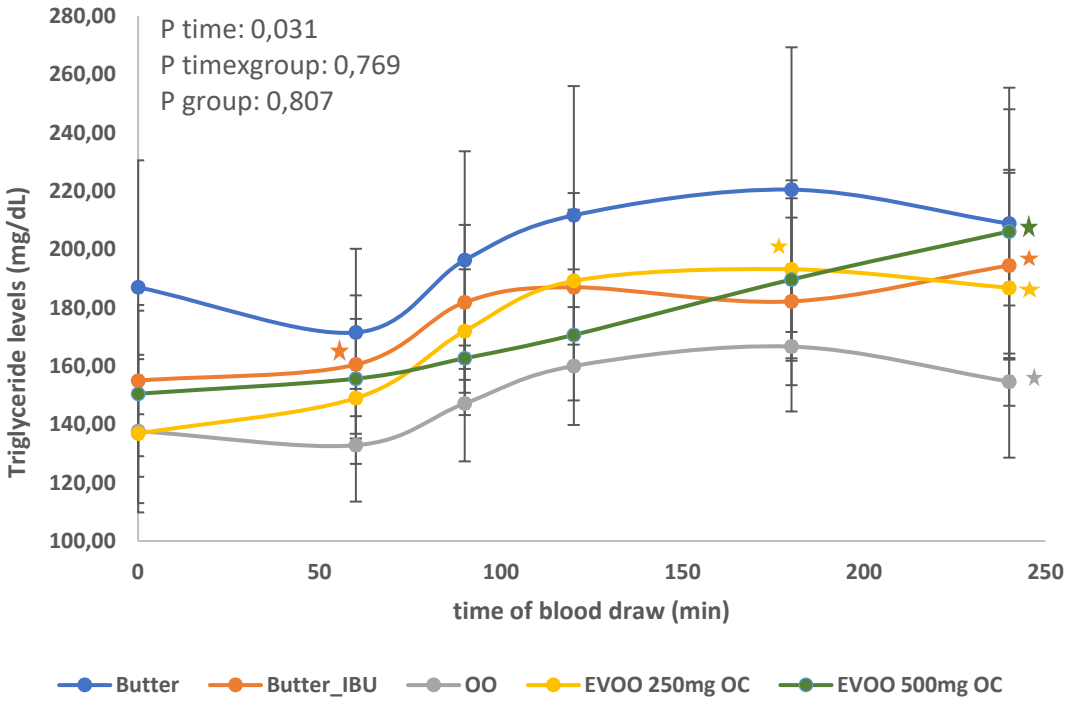
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης και τριγλυκεριδίων των 6 εθελοντών πριν την παρέμβαση αλλά και σε όλες τις χρονικές στιγμές αιμοληψίας μετά (30, 60, 90, 120, 180 & 240 λεπτά). Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται αναλυτικά στα διαγράμματα 28, 29 και 30.



Διάγραμμα 28: Γραμμική απεικόνιση των επιπέδων γλυκόζης των εθελοντών πριν την παρέμβαση αλλά και μετά σε 6 χρονικές στιγμές. ★: p<0,05 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στην χρονική στιγμή t=0min



Διάγραμμα 29: Γραμμική απεικόνιση των επιπέδων ινσουλίνης των εθελοντών πριν την παρέμβαση αλλά και μετά σε 6 χρονικές στιγμές. ★: p<0,05 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στην χρονική στιγμή t=0min



Διάγραμμα 30: Γραμμική απεικόνιση των επιπέδων τριγλυκεριδίων των εθελοντών πριν την παρέμβαση αλλά και μετά σε 6 χρονικές στιγμές. ★ : p<0,05 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στην χρονική στιγμή t=0min

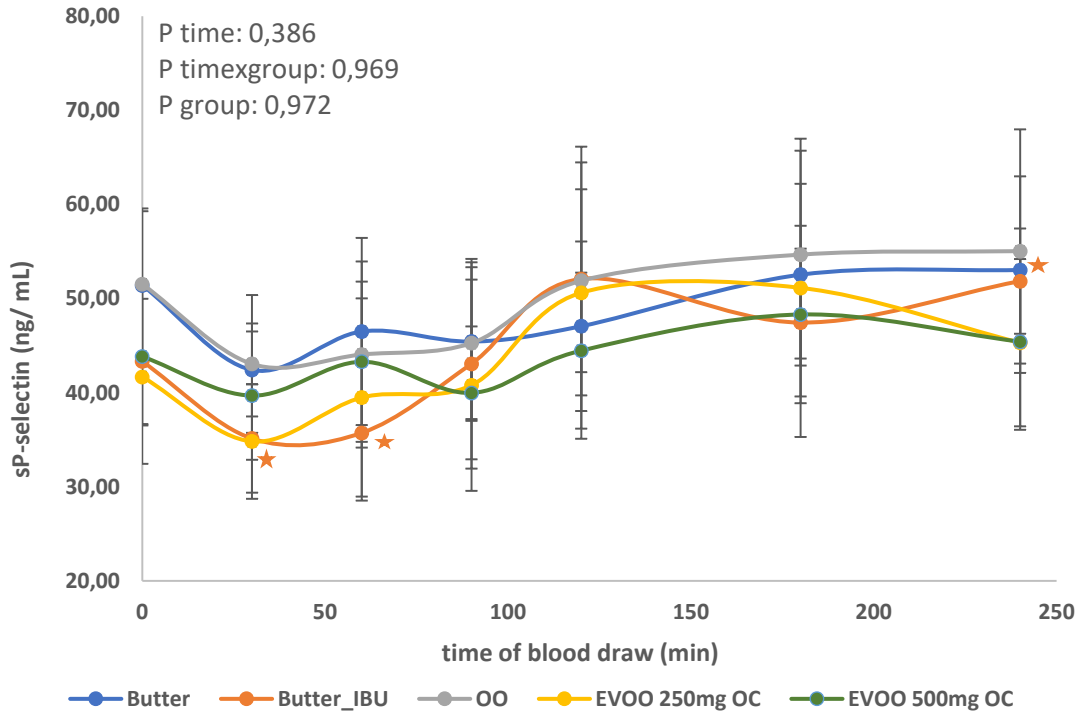
Από το διάγραμμα 28 σε όλες τις παρεμβάσεις παρατηρείται μία στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των επιπέδων γλυκόζης έως t=90min. Εξαίρεση αποτελεί η παρέμβαση με το ελαιόλαδο χωρίς ελαιοκανθάλη. Επίσης, φαίνεται ότι στην παρέμβαση με το βούτυρο μαζί με την ιβουπροφαίνη και στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 500mg ελαιοκανθάλης, υπάρχει μία στατιστικά σημαντική μειωμένη τιμή μεταγευματικής γλυκόζης τη χρονική στιγμή t=240 min, σε σχέση με την τιμή για t=0min. Επίσης, παρατηρείται ότι τα γεύματα με βούτυρο επάγουν μεγαλύτερες ανυψώσεις γλυκόζης σε σχέση με τα γεύματα με ελαιόλαδο, χωρίς να υπάρχει όμως στατιστική σημαντικότητα.

Από το διάγραμμα 29 φαίνεται μία στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της ινσουλίνης, στην παρέμβαση με το βούτυρο και με το βούτυρο μαζί με την ιβουπροφαίνη, για t= 90min, σε σχέση με t=0min. Επίσης, στην χορήγηση EVOO 250mg OC και EVOO 500mg OC, παρατηρείται ότι τις χρονικές στιγμές t=90min και t=120min οι απόλυτες τιμές των επιπέδων της ινσουλίνης εμφανίζουν μία μικρότερη αύξηση, σε σχέση με εκείνες της παρέμβασης με το ΟΟ για τις ίδιες χρονικές στιγμές. Ακόμα, παρατηρείται μία πιο απότομη αυξομείωση των επιπέδων ινσουλίνης με τη

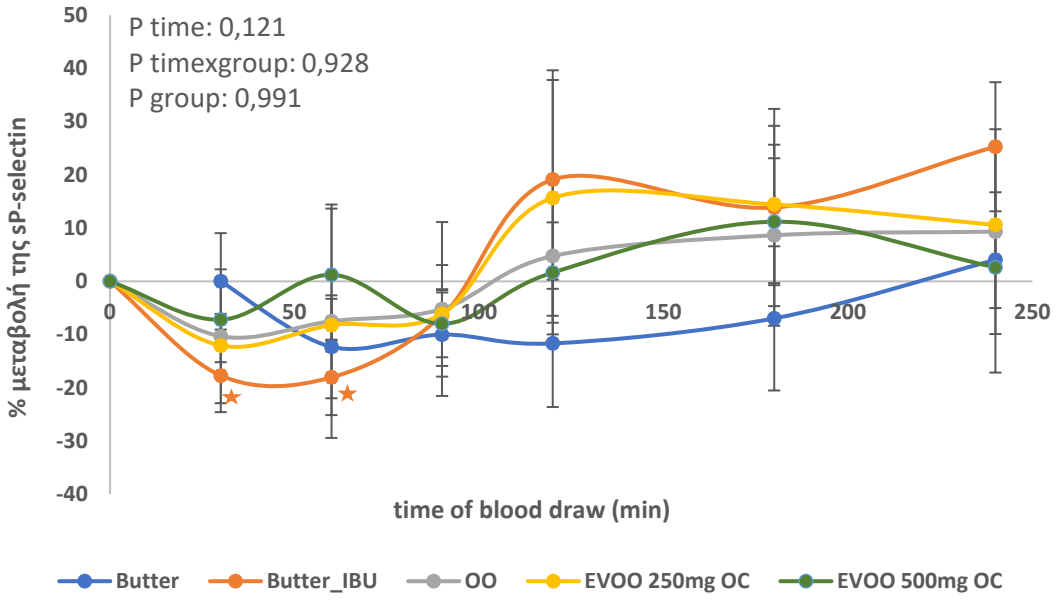
χορήγηση Butter και Butter _IBU ενώ η χορήγηση ΟΟ οδηγεί σε μια μικρότερη αλλά διατηρούμενη για μεγαλύτερο διάστημα μεταγευματική υπερινσουλιναιμία.

Από το διάγραμμα 30, παρατηρείται μία στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων τη χρονική στιγμή t=240min σε σχέση με τη χρονική στιγμή t=0min. Σε σύγκριση μεταξύ των τριών παρεμβάσεων με το ελαιόλαδο (ΟΟ, EVOO 250mg OC και EVOO 500mg OC), φαίνεται ότι, η παρέμβαση με το ελαιόλαδο χωρίς ελαιοκανθάλη αυξάνει λιγότερο τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων τη χρονική στιγμή t=240min.

Στα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από τους 6 εθελοντές που συμμετείχαν στη μεταγευματική μελέτη, έγινε μέτρηση των επιπέδων της sP σελεκτίνης σε επτά χρονικές στιγμές με αφετηρία πριν για t=0min και μετά την παρέμβαση σε έξι χρονικές στιγμές (30, 60, 90, 120, 180, 240 λεπτά).



Διάγραμμα 31: Γραμμική απεικόνιση της επίδρασης των διαφορετικών παρεμβάσεων στην μεταβολή της συγκέντρωσης της sP-σελεκτίνης σε 6 χρονικές στιγμές μετά την παρέμβαση αλλά και στη χρονική στιγμή t=0min. ★: p<0,05 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στην χρονική στιγμή t=0min



Διάγραμμα 32: Γραμμική απεικόνιση της επίδρασης των διαφορετικών παρεμβάσεων στο ποσοστό της μεταβολής της συγκέντρωσης της sP-σελεκτίνης σε 6 χρονικές στιγμές μετά την παρέμβαση αλλά και στη χρονική στιγμή t=0min. ★: p<0,05 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στην χρονική στιγμή t=0min

Από τα διαγράμματα 31 και 32, φαίνεται ότι τα επίπεδα των απόλυτων τιμών της sP-σελεκτίνης αλλά και ποσοστιαία μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά προς τα κάτω μετά την παρέμβαση με Butter_IBU στις χρονικές στιγμές για t=30min και t=60min, σε σχέση με την τιμή για t=0min. Ακόμα, στο διάγραμμα 31 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της sP-σελεκτίνης στη χρονική στιγμή για t=240min, σε σύγκριση πάντα με την τιμή για t=0min, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται η ίδια σημαντική μεταβολή και ποσοστιαία.

5. Συζήτηση

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια χρόνια υπεργλυκαιμική πάθηση που αποδίδεται σε ελαττωματική έκκριση ή δράση ινσουλίνης ή και στα δύο. Η επίπτωση και ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη αυξάνεται ραγδαία παγκοσμίως. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) χαρακτηρίζεται από προοδευτική ανεπάρκεια ινσουλίνης και διαταραχή της λειτουργίας των β-κυττάρων στο πάγκρεας, που προσθετικά οδηγούν στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Είναι μια πολυσυστηματική νόσος που σχετίζεται με μικροαγγειακές και με μακροαγγειακές επιπλοκές, οι δεύτερες εκδηλώνονται ως επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση. Η αθηροσκλήρωση έχει τεκμηριωθεί ότι είναι ο βασικός παράγοντας που οδηγεί σε αγγειακές επιπλοκές σε ασθενείς με ΣΔ2, οι οποίοι έχουν το διπλάσιο έως τετραπλάσιο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων αθηροθρομβωτικών επεισοδίων και αγγειακών επιπλοκών σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς ΣΔ (Kaur et al., 2018). Περίπου το 80% της διαβητικής θνησιμότητας αποδίδεται στα θρομβωτικά επεισόδια, από τα οποία το 75-80% των θανάτων προκαλούνται από καρδιαγγειακές επιπλοκές. Το μεταβολικό περιβάλλον του ΣΔ2, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης στην ινσουλίνη, της υπεργλυκαιμίας και της απελευθέρωσης περίσσειας ελεύθερων λιπαρών οξέων, μαζί με άλλες μεταβολικές ανωμαλίες επηρεάζει το αγγειακό τοίχωμα από μια σειρά συμβάντων όπως ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, υπερκινητικότητα αιμοπεταλίων, οξειδωτικό στρες και φλεγμονή χαμηλού βαθμού. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι το γεγονός που πυροδοτεί τους φλεγμονώδεις μηχανισμούς που σχετίζονται με αγγειακές επιπλοκές σε ασθενείς με ΣΔ2. Στην προθρομβωτική αυτή κατάσταση η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων διαδραματίζει κεντρικό ρόλο. Η εξασθενημένη ενδογενή αναστολή των αιμοπεταλίων καθιστά τα αιμοπετάλια πιο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση και το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο παρέχει περισσότερα μόρια προσκόλλησης και αγωνιστές αιμοπεταλίων.

Ο καρδιοπροστατευτικός ρόλος της Μεσογειακής Διατροφής (MD) έχει καθιερωθεί από καιρό κυρίως λόγω των αποτελεσμάτων μεγάλων επιδημιολογικών μελετών που δείχνουν ότι η υψηλή προσκόλληση σε αυτό το διατροφικό μοντέλο σχετίζεται αντιστρόφως με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (CVD), έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα

(Dinu et al., 2018; Guasch-Ferré and Willett, 2021). Αν και οι χώρες της Μεσογείου ακολουθούν ελαφρώς διαφορετικές παραλλαγές του Μεσογειακού μοντέλου διατροφής (Trichopoulou et al., 2014), η κατανάλωση ελαιολάδου (ΟΟ), ως κύρια διατροφική πηγή λίπους, είναι ένα κεντρικό, κοινό χαρακτηριστικό όλων των τύπων MD. Είναι λοιπόν προφανές ότι οι βιολογικές ιδιότητες του ΟΟ, κυρίως εκείνων που σχετίζονται με την προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα, έχει μελετηθεί εκτενώς μέχρι τώρα (Gaforio et al., 2019). Οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες του ΟΟ έχουν αρχικά αποδοθεί στην υψηλή του περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), ιδιαίτερα ελαϊκό οξύ. Ωστόσο, γνωρίζουμε πλέον ότι ένας μικρός αριθμός φυτοχημικών ουσιών του ΟΟ, ιδιαίτερα πολυφαινόλες, παρουσιάζουν μια πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων που φαίνεται να είναι υπεύθυνος για τα οφέλη για την υγεία του ΟΟ (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

Για όλους τους παραπάνω λόγους, καλούμαστε να ερευνήσουμε την επίδραση των βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου, αλλά και εκχυλισμάτων ελαιολάδου πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα στην φαινολική ένωση της ελαιοκανθάλης στη δράση των αιμοπεταλίων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της in vitro αντιαιμοπεταλιακής δράσης φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου, εκχυλισμάτων από έξτρα παρθένα ελαιόλαδα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα σε ελαιοκανθάλη και η διερεύνηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης in vivo έπειτα από κατανάλωση των πλούσιων σε φαινολικά ελαιολάδων από ασθενείς με διαβήτη τύπου ΙΙ. Η μελέτη αυτή έχει σαν στόχο τη διερεύνηση των ωφέλιμων συστατικών του ελαιολάδου με έμφαση στην αντιαιμοπεταλιακή τους δράση.

Η αντιαιμοπεταλιακή δράση εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας την ικανότητα των φαινολικών ενώσεων και των εκχυλισμάτων ελαιολάδου στο να αναστέλλουν τη συσσώρευση και προσκόλληση αιμοπεταλίων, επαγομένη από ADP, TRAP και PAF, σε πλάσμα-πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) υγειών εθελοντών και ασθενών με διαβήτη τύπου ΙΙ αλλά και με τη μέτρηση της sP-σελεκτίνης σε πλάσμα ασθενών με διαβήτη τύπου ΙΙ που είχαν καταναλώσει τα ελαιόλαδα που αναφέρθηκαν.

Αρχικά, έγινε μια προσπάθεια για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου εκτίμησης της προσκόλλησης αιμοπεταλίων μέσα από μια σειρά πειραμάτων ώστε να

εντοπίσουμε τις βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της προσκόλλησης αιμοπεταλίων σε μικροπλακίδια επιστρωμένα με πρωτεΐνες προσκόλλησης. Η πρώτη συνθήκη που εξετάσαμε ήταν η προσκόλληση σε πλακίδια υψηλής προσκόλλησης (High Binding plate) ή σε πλακίδια πολυστυρενίου (Polystyrene plate) σε συνδυασμό με δύο διαφορετικές πρωτεΐνες προσκόλλησης, το ινωδογόνο (fibrinogen) και το κολλαγόνο (collagen). Η πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο έχει μεγάλη επί της % μη ειδική προσκόλληση σε σύγκριση με το κολλαγόνο και στα δύο μικροπλακίδια, τόσο της ειδικής προσκόλλησης όσο και του πολυστυρενίου. Στη συνέχεια, δοκιμάσαμε τρεις διαφορετικούς ενεργοποιητικούς παράγοντες (ADP, TRAP, PAF) σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (plate HB με πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο, plate HB με πρωτεΐνη προσκόλλησης κολλαγόνο, plate PS με πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο, plate PS με πρωτεΐνη προσκόλλησης κολλαγόνο) σε μια συγκέντρωση PRP. Παρατηρήθηκε μια μη σημαντική διαφορά στην επί της % προσκόλληση μεταξύ των μικροπλακιδίων υψηλής προσκόλλησης και πολυστυρενίου, με μεγαλύτερη την προσκόλληση στο μικροπλακίδιο υψηλής προσκόλλησης ανεξαρτήτου της πρωτεΐνης προσκόλλησης. Επίσης, οι ενεργοποιητικοί παράγοντες ADP, TRAP και PAF φαίνεται να προκαλούν μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση στα μικροπλακίδια που έχουν ως πρωτεΐνη προσκόλλησης ινωδογόνο σε σύγκριση με το κολλαγόνο. Όσον αφορά τους ADP και PAF, φαίνεται να υπάρχει η ίδια τάση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών προσκόλλησης, η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη από τους ενεργοποιητικούς παράγοντες, ενώ για τον TRAP, φαίνεται να υπάρχει η ίδια τάση στα μικροπλακίδια που έχουν ως πρωτεΐνη προσκόλλησης το κολλαγόνο. Επειδή, τα αποτελέσματα ήταν σχετικά παρόμοια μεταξύ των δύο μικροπλακιδίων, επιλέξαμε να συνεχίσουμε με το μικροπλακίδιο πολυστυρενίου, λόγω χαμηλότερου κόστους.

Ακολούθησε ένα πείραμα για να δούμε την επίδραση του αριθμού των αιμοπεταλίων (μέσω αραίωσης του PRP) στην ευαισθησία της μεθόδου, όπου παρατηρήσαμε μια γραμμική σχέση μεταξύ της επί της % προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και της αραίωσης τους επί του αρχικού δείγματος PRP. Επιλέξαμε δύο αραιώσεις, την 1/5 και 1/10 και δοκιμάσαμε τους ενεργοποιητικούς παράγοντες ADP, TRAP και PAF σε επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αραίωση αιμοπεταλίων 1/10 επί του αρχικού δείγματος έχουν πολύ μικρή προσκόλληση στις περισσότερες συγκεντρώσεις και των τριών ενεργοποιητικών παραγόντων. Αντίθετα στην αραίωση αιμοπεταλίων 1/5 επί του αρχικού δείγματος,

υπάρχει μια περισσότερο δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων και των τριών ενεργοποιητικών παραγόντων. Ωστόσο όσον αφορά τον ενεργοποιητικό παράγοντα PAF, τα αποτελέσματα επί της % προσκόλλησης του διαλύτη του BSA (σχηματικά απεικονίζεται ως PAF 0μM), δείχνουν ότι υπάρχει μια προσκόλληση 0,95% με μέγιστη προσκόλληση στην υψηλότερη συγκέντρωση PAF 1,85%, δηλαδή δεν υπάρχει διαφορά μεγαλύτερη από 1% μεταξύ BSA και PAF. Μετά από τα παραπάνω δεδομένα συνεχίσαμε τα πειράματα με τους ενεργοποιητικούς παράγοντες ADP και TRAP.

Επόμενο βήμα ήταν να εξεταστεί η επίδραση του χρόνου επώασης στην επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τη χρήση δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, ADP και TRAP. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι στην επώαση των 60 λεπτών επιτυγχάνεται υψηλότερη προσκόλληση των αιμοπεταλίων συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενεργοποιητικού παράγοντα, τόσο του ADP όσο και του TRAP σε σύγκριση με της επωάσεις των 15 και 30 λεπτών. Έχοντας καθορίσει κάποιες βασικές συνθήκες, έγινε το πρώτο πείραμα με ανασταλτικό παράγοντα προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, που ήταν η ελαιοκανθάλη, παρουσία δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, των ADP και TRAP. Ακόμα, ήταν σκόπιμο να ελεγχθεί πως αντιδρά ο διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε συνδυασμό με της ενεργοποιητικούς παράγοντες, καθώς αποτελεί διαλύτη φαινολών και φαινολικών διαλυμάτων, και θέλαμε να γνωρίζουμε την επίδραση που ασκεί στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο διαλύτης DMSO είναι τοξικός για τα αιμοπετάλια, καθώς καταφέρνει να αναστείλει τελείως την ενεργοποίηση που προκαλεί ο ADP και ο TRAP και μάλιστα κάτω από τα επίπεδα προσκόλλησης που προκαλείται μη ειδικά παρουσία μόνο των αιμοπεταλίων στην αραίωση που δουλεύουμε. Όσον αφορά της συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης που δοκιμάσαμε, φαίνεται ότι είναι αρκετά υψηλές, καθώς η δράση της είναι της τοξική απέναντι στα αιμοπετάλια, τα οποία μάλλον καταστρέφονται. Φαίνεται ότι πρέπει να δουλέψουμε σε πιο αραιές συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης. Εφόσον παρατηρήσαμε ότι το DMSO σαν διαλύτης είναι τοξικός για τα αιμοπετάλια, συνεχίσαμε τα πειράματα όπου επαναδιαλύαμε της φαινολικές ενώσεις σε λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA). Ακολούθησε, ένα ακόμη πείραμα σε ελαιοκανθάλη σε έναν φυσιολογικό και έναν διαβητικό εθελοντή. Από τα αποτελέσματα του φυσιολογικού αλλά και του διαβητικού εθελοντή παρατηρούμε ότι υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ της αναστολής της επί της %

προσκόλλησης και της συγκέντρωσης της ελαιοκανθάλης παρουσία και των δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, παρουσία ADP και παρουσία TRAP η συγκέντρωση της ελαιοκανθάλης που προκαλεί τη βέλτιστη αναστολή προσκόλλησης είναι 500 μg/mL και 1000 μg/mL αντίστοιχα για τον φυσιολογικό εθελοντή ενώ είναι 1000 μg/mL και 1000 μg/mL αντίστοιχα για τον διαβητικό εθελοντή. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαιοκανθάλης φαίνεται ότι έχουν φτάσει σε πλατό και ίσως καταστρέφουν τα αιμοπετάλια καθώς τα επίπεδα προσκόλλησης είναι στο όριο ή χαμηλότερα από την μη ειδική προσκόλληση που δίνουν τα αιμοπετάλια των εθελοντών της.

Ακολούθησε ένα πείραμα με τη χρήση τεσσάρων φαινολικών ενώσεων, της υδροξυτυροσόλης (HT), της ελαιασίνης (OA), της ελευρωπαΐνης (OE) και της ελαιομισσιονάλης σε λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA), παρουσία δύο ενεργοποιητικών παραγόντων, του ADP και TRAP σε φυσιολογικό εθελοντή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις από μόνες της (διάγραμμα 18) σε της από της συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν πιθανώς έχουν ενεργοποιητική δράση στα αιμοπετάλια, καθώς παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ειδικά της πυκνές συγκεντρώσεις της ελαιασίνης και της ελαιομισσιονάλης. Παρουσία ADP και TRAP, φαίνεται να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση αναστολής της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των φαινολών της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης. Αντίθετα, οι φαινόλες της ελαιασίνης και της ελαιομισσιονάλης φαίνεται πως έχουν κάποια δράση της πιο αραιές συγκεντρώσεις, καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μεγαλύτερη επί της % προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ειδικά της δύο πυκνές συγκεντρώσεις της ελαιασίνης.

Στη συνέχεια, ακολούθησαν κάποιες αλλαγές των πειραματικών συνθηκών, προκειμένου να αντιμετωπίσουμε κάποια προβλήματα της μεθόδου. Η πρώτη αλλαγή ήταν ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έγινε εκτός πλακιδίων σε eppendorf σωλήνες. Η αλλαγή αυτή έγινε, καθώς παρατηρήσαμε μεγάλες απορροφήσεις που οφείλονταν μάλλον σε προσκόλληση φαινολικών ενώσεων στα πλακίδια και όχι στα αιμοπετάλια. Η δεύτερη αλλαγή ήταν, η διαφορετική αραίωση των αιμοπεταλίων, καθώς πλέον ήταν δυνατό να γνωρίζουμε την ακριβή ποσότητα αιμοπεταλίων στο δείγμα της, μέσω μέτρησης στον βιοχημικό αναλυτή. Δουλέψαμε σε συγκέντρωση 60.000 plt/μL. Στο πείραμα που ακολούθησε χρησιμοποιήσαμε την φαινολική ένωση

της τυροσόλης παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε φυσιολογικό εθελοντή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις της τυροσόλης είναι αρκετά μεγάλες καθώς προκαλούν σχεδόν πλήρη αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων.

Στα επόμενα πειράματα, καταγράψαμε τη σχέση ενεργοποίησης μεταξύ του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με διαφορετικούς εθελοντές. Τα αποτελέσματα επισημαίνουν τη διαφορετικότητα κάθε εθελοντή, δείχνοντας ότι η βέλτιστη συγκέντρωση του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP, μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο. Στο τελευταίο πείραμα, καταγράψαμε εκτός από την καμπύλη ενεργοποίησης ADP και τη δράση της φαινολικής ένωσης τυροσόλης (Tyr), παρουσία του ενεργοποιητικού παράγοντα ADP σε σταθερή συγκέντρωση σε φυσιολογικό εθελοντή. Όπου παρατηρήσαμε ότι υπάρχει μια σημαντική αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων από την τυροσόλη, χωρίς να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση, κάτι που δείχνει ότι σε αυτές της συγκεντρώσεις τυροσόλης έχουμε πιάσει πλατό και θα ήταν χρήσιμο να δούμε πως θα λειτουργούσε η αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε μικρότερες συγκεντρώσεις τυροσόλης.

Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι χρήζουν να γίνουν περισσότερες δοκιμές προκειμένου να δουλέψει άρτια το συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Πλεονεκτήματα της μεθόδου, είναι ότι μπορούν να γίνουν πολλά πειράματα μέσα στο ίδιο μικροπλακίδιο, με λίγη ποσότητα αιμοπεταλίων. Αντίθετα, η προεπιλογή συνθηκών αποτελεί μειονέκτημα. Θα πρέπει να επιλυθούν επίσης ορισμένα τεχνικά προβλήματα, όπως είναι ο διαλύτης των φαινολικών ενώσεων, αλλά και η ετερογένεια από άνθρωπο σε άνθρωπο (εύρος ενεργοποίησης για ADP & TRAP 5-20μM). Θα είχε ίσως νόημα να γίνει μια μελέτη για τη σχέση ενεργοποίησης μεταξύ ενεργοποιητικών παραγόντων, αλλά και για τη σχέση αναστολής μεταξύ ανασταλτικών παραγόντων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με αρκετούς εθελοντές, ώστε να αποσαφηνιστεί αν είναι τόσο σημαντικό να γνωρίζουμε τη συγκέντρωση ενεργοποιητικού παράγοντα που δουλεύει καλύτερα σε κάθε εθελοντή, καθώς στα δικά μας δεδομένα παρατηρήσαμε ότι σε συγκεντρώσεις ενεργοποιητικού παράγοντα που πετυχαίναμε χαμηλή ενεργοποίηση δεν δούλευε καλά και η αναστολή.

Ακολούθησε η εκχύλιση τριών ελαιόλαδων, ελαιόλαδο με 0mg ελαιοκανθάλη (ΟΟ), έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 250 mg ελαιοκανθάλη/Kg (EVOO 250mg OC) και έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 500 mg ελαιοκανθάλη/Kg (EVOO 500mg OC) και της βουτύρου γνωστής εταιρείας του εμπορίου. Οι τελικές ποσότητες που εκχυλίσαμε σε μάζα εκχυλίσματος, ήταν για το βούτυρο 0,2519g, για το ΟΟ 0,148g, για το EVOO 250mg OC 0,1611g και για το EVOO 500mg OC 0,1738g.

Ο προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα έγινε με τη μέθοδο της Folin-Ciocalteu με πρότυπο διάλυμα Τυροσόλης 1 mg/mL. Τα μmol Tyr/ mL ανά εκχύλισμα ήταν: για το βούτυρο 3,569 για το ΟΟ 5,732, για το EVOO 250mg OC 10,737 και για το EVOO 500mg OC 20,055. Η μεθοδολογία εκχύλισης που χρησιμοποιήσαμε έδωσε εκχυλίσματα με συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ανάλογων της περιεκτικότητας τους σε ελαιοκανθάλη.

Ακολούθησαν τα πειράματα αντιαιμοπεταλιακής δράσης φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο της συσσωρευματομετρίας οπτικής διαπερατότητας, τα οποία έγιναν με τη χρήση ως ανασταλτικών παραγόντων, των εκχυλισμάτων ελαιολάδου διαφορετικών συγκεντρώσεων ελαιοκανθάλης (0mg, 250mg & 500mg) και βουτύρου σε διαβητικούς εθελοντές. Από το σύνολο των πειραμάτων υπολογίστηκε η IC_{50}. Για το ΟΟ ήταν 0,078 μg/μL, για το ήταν EVOO 250mg OC 0,029 μg/μL και για το ήταν EVOO 500mg OC 0,026 μg/μL. Όσον αφορά το εκχύλισμα βουτύρου, δεν καταφέραμε να βρούμε τη συγκέντρωση IC_{50}, καθώς η πυκνότερη συγκέντρωση του έως 0,3358 μg/μL, έδωσε μέγιστη αναστολή 23%.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες εργασίες που δοκιμάστηκαν εκχυλίσματα ελαιολάδων και πολυφαινολών σε PRP υγιών εθελοντών καθώς και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη. Στις εργασίες αυτές μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην ικανότητα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε PRP. Οι Petroni et al. (1995) πρώτοι μελέτησαν την επίδραση εκχυλισμάτων υδροξυτυροσόλης, ελευρωπαΐνης, λουτεΐνης και απιγενίνης σε PRP υγιών εθελοντών. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η υδροξυτυροσόλη ανέστειλε σημαντικά την επαγόμενη από ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι υπόλοιπες πολυφαινόλες ανέστειλαν την επαγόμενη συσσώρευση από άλλους παράγοντες ενεργοποίησης (Petroni et al., 1995). Μετέπειτα τα πειράματα των Correa et al. (2009) επιβεβαίωσαν

το γεγονός ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να αναστείλει την ADP-επαγόμενη συσσώρευση των αιμοπεταλίων υγιών εθελοντών. Αντίθετα, στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι η οξική υδροξυτυροσόλη δεν είχε καμία επίδραση (Correa et al., 2009). Μια άλλη μελέτη σε PRP υγιών και σε ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη έδειξε σημαντική δράση της ελαιοκανθάλης στην επαγόμενη από θρομβίνη (THR) συσσώρευση αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ενώ παράλληλα στην ίδια μελέτη δεν φάνηκε κάποια επίδραση της υδροξυτυροσόλης (Zbidi et al., 2009). Αργότερα έγιναν αρκετές μελέτες που κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να μειώσει την επαγόμενη με διάφορους παράγοντες ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές (de Roos et al., 2011; Mizutani et al., 2020; Reyes et al., 2013). Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε την συνεργιστική δράση μιγμάτων υδροξυτυροσόλης και της οξικής υδροξυτυροσόλης στην αναστολή της προσκόλλησης αιμοπεταλίων υγιών εθελοντών (Rubio-Senent et al., 2015). Στην δική μας μελέτη φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα ελαιολάδου είχαν ανασταλτική δράση στην επαγόμενη ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων από ADP. Συγκεκριμένα το εκχύλισμα από απλό ελαιόλαδο χωρίς ελαιοκανθάλη παρουσίασε μια IC50 0,078 μg/μL προκαλώντας αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τα δύο εκχυλίσματα έξτρα παρθένου ελαιόλαδου με 250mg και 500mg ελαιοκανθάλης είχαν τις χαμηλότερες τιμές IC50, όπως και περιμέναμε, όπου ήταν 0,029 μg/μL και 0,026 μg/μL αντίστοιχα. Σε αραιές συγκεντρώσεις φαίνεται να υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη ισχυρή αναστολή των αιμοπεταλίων από τα δύο εκχυλίσματα EVOO με 250mg και 500mg OC. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η αναστολή αίρεται και επανέρχεται σε ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις. Φαίνεται να υπάρχει μια διπλή περιοχή συγκεντρώσεων που εμφανίζεται η αντιαιμοπεταλιακή δράση. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη αναστολή μεταξύ των εκχυλισμάτων EVOO με 250mg και 500mg OC.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ο προσδιορισμός της sP σελεκτίνης σε δείγματα ορού από τους διαβητικούς εθελοντές που συμμετείχαν στη μεταγευματική μελέτη. Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν 6 εθελοντές, 3 άντρες (50%) και 3 γυναίκες (50%), ηλικίας 51-59 ετών (55,8 ± 3,6). Τα βασικά ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών, τα οποία μετρήθηκαν πριν από κάθε παρέμβαση δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους μεταξύ των παρεμβάσεων ($p > 0.05$). Από τα αποτελέσματα των βιοχημικών παραμέτρων έγινε μια σύγκριση μεταξύ

των διαφορετικών παρεμβάσεων, των επιπέδων γλυκόζης, ινσουλίνης και τριγλυκεριδίων των 6 εθελοντών πριν την παρέμβαση αλλά και σε όλες τις χρονικές στιγμές αιμοληψίας μετά (30, 60, 90, 120, 180 & 240 λεπτά). Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις παρεμβάσεις υπήρχε μία στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των επιπέδων γλυκόζης έως τη χρονική στιγμή t=90min. Εξαίρεση αποτελεί η παρέμβαση με το ελαιόλαδο χωρίς ελαιοκανθάλη. Επίσης, φαίνεται ότι στην παρέμβαση με το βούτυρο μαζί με την ιβουπροφαίνη και στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με 500mg ελαιοκανθάλης, υπάρχει μία στατιστικά σημαντική μειωμένη τιμή μεταγευματικής γλυκόζης τη χρονική στιγμή t=240 min, σε σχέση με την τιμή για t=0min. Επίσης, παρατηρείται ότι τα γεύματα με βούτυρο, φαίνεται να έχουν μια τάση μεγαλύτερης μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, ενώ αντίθετα τα γεύματα με ελαιόλαδο φαίνεται πως οδηγούν σε χαμηλότερα επίπεδα υπεργλυκαιμίας.

Παράλληλα, οι καμπύλες της ινσουλίνης, φαίνεται ότι ακολουθούν την μορφή των καμπυλών της γλυκόζης για την κάθε παρέμβαση, κάτι που είναι λογικό καθώς όταν υπάρχουν για μεγάλο διάστημα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, θα προκληθεί μεγαλύτερη έκκριση ποσότητας ινσουλίνης. Στα επίπεδα της ινσουλίνης παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση, στην παρέμβαση με το βούτυρο και με το βούτυρο μαζί με την ιβουπροφαίνη, για τη χρονική στιγμή t= 90min, σε σχέση με t=0min. Επίσης, στην χορήγηση EVOO 250mg OC και EVOO 500mg OC, παρατηρείται ότι τις χρονικές στιγμές t=90min και t=120min οι απόλυτες τιμές των επιπέδων της ινσουλίνης εμφανίζουν μία μικρότερη αύξηση, σε σχέση με εκείνες της παρέμβασης με το OO για τις ίδιες χρονικές στιγμές. Ακόμα, παρατηρείται μία πιο απότομη αυξομείωση των επιπέδων ινσουλίνης με τη χορήγηση Butter και Butter _IBU ενώ η χορήγηση OO οδηγεί σε μια μικρότερη αλλά διατηρούμενη για μεγαλύτερο διάστημα μεταγευματική υπερινσουλιναιμία.

Στις καμπύλες των τριγλυκεριδίων, παρατηρείται ότι 2 ώρες μετά την κατανάλωση οποιουδήποτε γεύματος παρουσιάζεται μία αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων. Παρατηρείται μία στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων τη χρονική στιγμή t=240min σε σχέση με τη χρονική στιγμή t=0min. Σε σύγκριση μεταξύ των τριών παρεμβάσεων με το ελαιόλαδο (OO, EVOO 250mg OC και EVOO 500mg OC), φαίνεται ότι, η παρέμβαση με το ελαιόλαδο χωρίς ελαιοκανθάλη αυξάνει λιγότερο τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων τη χρονική στιγμή

t=240min. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν από την μεταπτυχιακή διατριβή της Ελένης Πιτού, καθώς θα ακολουθήσουν αναλύσεις σε δείγματα ορού των ίδιων εθελοντών.

Στα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από τους 6 εθελοντές που συμμετείχαν στη μεταγευματική μελέτη, έγινε μέτρηση των επιπέδων της sP σελεκτίνης σε επτά χρονικές στιγμές με αφετηρία πριν για t=0min και μετά την παρέμβαση σε έξι χρονικές στιγμές (30, 60, 90, 120, 180, 240 λεπτά).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) είναι ίσως η σημαντικότερη μη μεταδοτική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπερκινητικά και δυσλειτουργικά αιμοπετάλια. Το διαβητικό αιμοπετάλιο χαρακτηρίζεται από αυξημένο κύκλο εργασιών αιμοπεταλίων, αυξημένο ενδοκυτταρικό Ca2+, αυξημένη ρύθμιση της σηματοδότησης P2Y12 και από οξειδωτικό στρες, αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης και γλυκοπρωτεΐνης, μειωμένη ανταπόκριση σε NO και προστακυκλίνη, αντίσταση στην ασπιρίνη, μειωμένη ρευστότητα μεμβράνης (Kaur et al., 2018; Rollini et al., 2013). Η sP σελεκτίνη αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και συγκεκριμένα δείκτη της ικανότητας τους να εκκρίνουν κοκκία κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης.

Τα επίπεδα των απόλυτων τιμών της sP-σελεκτίνης αλλά και ποσοστιαία μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά προς τα κάτω μετά την παρέμβαση με Butter_IBU στις χρονικές στιγμές για t=30min και t=60min, σε σχέση με την τιμή για t=0min. Ακόμα, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της sP-σελεκτίνης στη χρονική στιγμή για t=240min, σε σύγκριση πάντα με την τιμή για t=0min, μετά την παρέμβαση με Butter_IBU χωρίς ωστόσο να παρατηρείται η ίδια σημαντική μεταβολή και ποσοστιαία. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των παρεμβάσεων με τα ελαιόλαδα πλούσια σε ελαιοκανθάλη και ελαιόλαδου δίχως ελαιοκανθάλη. Θα περιμέναμε ίσως να δούμε μια μείωση των τιμών της sP-σελεκτίνης μετά την παρέμβαση με τα ελαιόλαδα πλούσια σε ελαιοκανθάλη, ωστόσο αυτό δεν συνέβη. Αντ' αυτού μπορούμε να παρατηρήσουμε μια τάση μείωσης στις τιμές της sP-σελεκτίνης μετά την παρέμβαση με EVOO 250mg OC μόνο στην χρονική στιγμή t=30min, ενώ μετά την παρέμβαση με EVOO 500mg OC παρατηρούμε ότι έχουμε την καμπύλη με τις πιο ήπιες αυξομειώσεις, κάτι που ίσως δείχνει μια

προστατευτική δράση καθώς δεν αφήνει τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης να αυξηθούν ανεξέλεγκτα.

Μια πρόσφατη μελέτη ανασκόπησης έδειξε ότι οι παχύσαρκοι ασθενείς που ήταν συχνοί καταναλωτές ΟΟ (>4 φορές/εβδομάδα) παρουσίασαν χαμηλότερη επαγόμενη από THR έκφραση P-σελεκτίνης στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με λιγότερο συχνούς καταναλωτές (<1 φορά/εβδομάδα). Αυτή η μελέτη ξεκάθαρα έδειξε ότι η αυξημένη κατανάλωση ΟΟ συσχετίζεται με χαμηλότερη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, ωστόσο οι τύποι ΟΟ που καταναλώνονται από τους εθελοντές της μελέτης δεν ταυτοποιήθηκαν (Zhang et al., 2021). Μια άλλη εργασία όπου χρησιμοποιήθηκαν PRP υγιών εθελοντών έδειξε ότι ένα εκχύλισμα παραπροϊόντος της παραγωγής ελαιολάδου που περιείχε HT και διυδροξυφαινυλογλυκίνη **(**DHPG) ανέστειλε την επαγόμενη από ADP και TRAP έκφραση της sP σελεκτίνης (de Roos et al., 2011). Στη δική μας μελέτη τα επίπεδα της sP σελεκτίνης δεν επηρεάζονται από την λήψη ελαιολάδου από την διατροφή. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι η λήψη ελαιολάδου γινόταν μία μόνο φορά, την ημέρα του πειράματος. Ενδεχομένως, η συστηματική λήψη των συγκεκριμένων ελαιολάδων να επηρέαζε την έκφραση της sP σελεκτίνης.

Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η αντιαιμοπεταλιακή δράση του ελαιολάδου οφείλεται σε κάποιο βαθμό στην ελαιοκανθάλη, καθώς τα εκχυλίσματα ελαιολάδου που ήταν πλούσια σε ελαιοκανθάλη μείωσαν περισσότερο την συσσώρευση αιμοπεταλίων των ασθενών, σε σχέση με το ελαιόλαδο δίχως ελαιοκανθάλη. Όσον αφορά την in vivo μελέτη, παρατηρήθηκε ότι τα ελαιόλαδα με ελαιοκανθάλη δεν επηρέασαν τα επίπεδα της sP σελεκτίνης. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να μελετηθεί η αντιαιμοπεταλιακή δράση εκχυλισμάτων ελαιολάδου, ώστε η διεξαγωγή θετικών συμπερασμάτων να συμβάλλει στη χρήση του ελαιολάδου, που είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, σαν λειτουργικό τρόφιμο για μεταβολικές ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης.

Βιβλιογραφία

BANCUTA, O.R., Chilian, A., Bancuta, I., Ion, R.-M., Setnescu, R., Setnescu, T., Gheboianu, A., 2016. Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. Romanian J. Phys. 61, 000–000.

Batarseh, Y.S., Mohamed, L.A., Al Rihani, S.B., Mousa, Y.M., Siddique, A.B., El Sayed, K.A., Kaddoumi, A., 2017. Oleocanthal ameliorates amyloid-β oligomers' toxicity on astrocytes and neuronal cells: In vitro studies. Neuroscience 352, 204–215. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.059

Brewer, D.B., 2006. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. Br. J. Haematol. 133, 251–258. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x

Canobbio, I., Visconte, C., Oliviero, B., Guidetti, G., Zarà, M., Pula, G., Torti, M., 2016. Increased platelet adhesion and thrombus formation in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell. Signal. 28, 1863–1871. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.017

Chang, C.-Y., Huang, I.-T., Shih, H.-J., Chang, Y.-Y., Kao, M.-C., Shih, P.-C., Huang, C.-J., 2019. Cluster of differentiation 14 and toll-like receptor 4 are involved in the anti-inflammatory effects of tyrosol. J. Funct. Foods 53, 93–104. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.011

Correa, J.A.G., López-Villodres, J.A., Asensi, R., Espartero, J.L., Rodríguez-Gutiérez, G., De La Cruz, J.P., 2009. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. Br. J. Nutr. 101, 1157–1164. https://doi.org/10.1017/S0007114508061539

Cusimano, A., Balasus, D., Azzolina, A., Augello, G., Emma, M.R., Di Sano, C., Gramignoli, R., Strom, S.C., McCubrey, J.A., Montalto, G., Cervello, M., 2017. Oleocanthal exerts antitumor effects on human liver and colon cancer cells through ROS generation. Int. J. Oncol. 51, 533–544. https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4049

de Gaetano, G., 2001. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. Haematologica 86, 349–356.

de Roos, B., Zhang, X., Rodriguez Gutierrez, G., Wood, S., Rucklidge, G.J., Reid, M.D., Duncan, G.J., Cantlay, L.L., Duthie, G.G., O'Kennedy, N., 2011. Anti-platelet effects of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies. Eur. J. Nutr. 50, 553–562. https://doi.org/10.1007/s00394-010-0162-3

Dell'Agli, M., Maschi, O., Galli, G.V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., Bosisio, E., 2008. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. Br. J. Nutr. 99, 945–951. https://doi.org/10.1017/S0007114507837470

Deng, X.-L., Liu, Z., Wang, C., Li, Y., Cai, Z., 2017. Insulin resistance in ischemic stroke. Metab. Brain Dis. 32, 1323–1334. https://doi.org/10.1007/s11011-017-0050-0

Dinu, M., Pagliai, G., Casini, A., Sofi, F., 2018. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. Eur. J. Clin. Nutr. 72, 30–43.

https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.58
Eriksson, A.C., Whiss, P.A., 2005. Measurement of adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 52, 356–365. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2005.06.002
Foidl, B.M., Oberacher, H., Marksteiner, J., Humpel, C., 2020. Platelet and Plasma Phosphatidylcholines as Biomarkers to Diagnose Cerebral Amyloid Angiopathy. Front. Neurol. 11, 359. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00359
Fragopoulou, E., Detopoulou, P., Nomikos, T., Pliakis, E., Panagiotakos, D.B., Antonopoulou, S., 2012. Mediterranean wild plants reduce postprandial platelet aggregation in patients with metabolic syndrome. Metabolism 61, 325–334. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.07.006
Gachons, C.P. des, Uchida, K., Bryant, B., Shima, A., Sperry, J.B., Dankulich-Nagrudny, L., Tominaga, M., Smith, A.B., Beauchamp, G.K., Breslin, P.A.S., 2011. Unusual Pungency from Extra-Virgin Olive Oil Is Attributable to Restricted Spatial Expression of the Receptor of Oleocanthal. J. Neurosci. 31, 999–1009. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1374-10.2011
Gaforio, J.J., Visioli, F., Alarcón-de-la-Lastra, C., Castañer, O., Delgado-Rodríguez, M., Fitó, M., Hernández, A.F., Huertas, J.R., Martínez-González, M.A., Menendez, J.A., Osada, J. de la, Papadaki, A., Parrón, T., Pereira, J.E., Rosillo, M.A., Sánchez-Quesada, C., Schwingshackl, L., Toledo, E., Tsatsakis, A.M., 2019. Virgin Olive Oil and Health: Summary of the III International Conference on Virgin Olive Oil and Health Consensus Report, JAEN (Spain) 2018. Nutrients 11, E2039. https://doi.org/10.3390/nu11092039
Garraud, O., Chabert, A., Hamzeh-Cognasse, H., Laradi, S., Cognasse, F., 2017. Platelets and immunity: From physiology to pathology. Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang. 24, 83–86. https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.04.004
Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., Gorska-Ponikowska, M., 2018. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. Int. J. Mol. Sci. 19, 686. https://doi.org/10.3390/ijms19030686
Gresele, P., Lopez, J.A., Kleiman, N.S., Page, C.P., 2017. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Pathophysiology, pharmacology and therapeutics: An update. Springer International Publishing Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47462-5
Guasch-Ferré, M., Willett, W.C., 2021. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. J. Intern. Med. 290, 549–566. https://doi.org/10.1111/joim.13333
Holinstat, M., 2017. Normal platelet function. Cancer Metastasis Rev. 36, 195–198. https://doi.org/10.1007/s10555-017-9677-x
Huilcaman, R., Venturini, W., Fuenzalida, L., Cayo, A., Segovia, R., Valenzuela, C., Brown, N., Moore-Carrasco, R., 2022. Platelets, a Key Cell in Inflammation and Atherosclerosis Progression. Cells 11, 1014. https://doi.org/10.3390/cells11061014
Hydroxytyrosol, 2022. . Wikipedia.
Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J., 2020. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. Foods 9, 1014. https://doi.org/10.3390/foods9081014
Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., Jakobušić Brala, C., 2019.

Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. Molecules 24, 2001. https://doi.org/10.3390/molecules24102001
Katsa, M.E., Nomikos, T., 2022. Olive Oil Phenolics and Platelets—From Molecular Mechanisms to Human Studies. Rev. Cardiovasc. Med. 23, 255. https://doi.org/10.31083/j.rcm2308255
Kaur, R., Kaur, M., Singh, J., 2018. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. Cardiovasc. Diabetol. 17, 121. https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3
Kim, H., Conway, E.M., 2019. Platelets and Complement Cross-Talk in Early Atherogenesis. Front. Cardiovasc. Med. 6, 131. https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00131
Kniewallner, K.M., Wenzel, D., Humpel, C., 2016. Thiazine Red(+) platelet inclusions in Cerebral Blood Vessels are first signs in an Alzheimer's Disease mouse model. Sci. Rep. 6, 28447. https://doi.org/10.1038/srep28447
Koupenova, M., Clancy, L., Corkrey, H.A., Freedman, J.E., 2018. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. Circ. Res. 122, 337–351. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795
Lambert, M.P., 2016. Platelets in liver and renal disease. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2016, 251–255.
Lefrançais, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., Headley, M.B., David, T., Coughlin, S.R., Krummel, M.F., Leavitt, A.D., Passegué, E., Looney, M.R., 2017. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for hematopoietic progenitors. Nature 544, 105–109. https://doi.org/10.1038/nature21706
Li, X., Weber, N.C., Cohn, D.M., Hollmann, M.W., DeVries, J.H., Hermanides, J., Preckel, B., 2021. Effects of Hyperglycemia and Diabetes Mellitus on Coagulation and Hemostasis. J. Clin. Med. 10, 2419. https://doi.org/10.3390/jcm10112419
Machlus, K.R., Thon, J.N., Italiano, J.E., 2014. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. Br. J. Haematol. 165, 227–236. https://doi.org/10.1111/bjh.12758
Mizutani, D., Onuma, T., Tanabe, K., Kojima, A., Uematsu, K., Nakashima, D., Doi, T., Enomoto, Y., Matsushima-Nishiwaki, R., Tokuda, H., Ogura, S., Iida, H., Kozawa, O., Iwama, T., 2020. Olive polyphenol reduces the collagen-elicited release of phosphorylated HSP27 from human platelets. Biosci. Biotechnol. Biochem. 84, 536–543. https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1697196
Mohyeldin, M.M., Akl, M.R., Ebrahim, H.Y., Dragoi, A.M., Dykes, S., Cardelli, J.A., El Sayed, K.A., 2016. The oleocanthal-based homovanillyl sinapate as a novel c-Met inhibitor. Oncotarget 7, 32247–32273. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8681
Mukai, M., Oka, T., 2018. Mechanism and management of cancer-associated thrombosis. J. Cardiol. 72, 89–93. https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2018.02.011
Nording, H.M., Seizer, P., Langer, H.F., 2015. Platelets in Inflammation and Atherogenesis. Front. Immunol. 6, 98. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00098
Oberacher, H., Arnhard, K., Linhart, C., Diwo, A., Marksteiner, J., Humpel, C., 2017. Targeted Metabolomic Analysis of Soluble Lysates from Platelets of Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Compared to

Healthy Controls: Is PC aeC40:4 a Promising Diagnostic Tool? J. Alzheimers Dis. JAD 57, 493–504. https://doi.org/10.3233/JAD-160172
Oleocanthal, 2022. . Wikipedia.
Oleuropein, 2022. . Wikipedia.
Pang, K.-L., Chin, K.-Y., 2018. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. Nutrients 10, 570. https://doi.org/10.3390/nu10050570
Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G.F., Galli, C., 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. Thromb. Res. 78, 151–160. https://doi.org/10.1016/0049-3848(95)00043-7
PubChem, n.d. Oleacein [WWW Document]. URL https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/18684078 (accessed 9.18.22).
Qosa, H., Batarseh, Y.S., Mohyeldin, M.M., El Sayed, K.A., Keller, J.N., Kaddoumi, A., 2015. Oleocanthal enhances amyloid-β clearance from the brains of TgSwDI mice and in vitro across a human blood-brain barrier model. ACS Chem. Neurosci. 6, 1849–1859. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00190
Rawish, E., Nording, H., Münte, T., Langer, H.F., 2020. Platelets as Mediators of Neuroinflammation and Thrombosis. Front. Immunol. 11, 548631. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.548631
Reyes, J.J., De La Cruz, J.P., Muñoz-Marin, J., Guerrero, A., Lopez-Villodres, J.A., Madrona, A., Espartero, J.L., Gonzalez-Correa, J.A., 2013. Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. Eur. J. Nutr. 52, 591–599. https://doi.org/10.1007/s00394-012-0361-1
Rigacci, S., Stefani, M., 2016. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. Int. J. Mol. Sci. 17, E843. https://doi.org/10.3390/ijms17060843
Rollini, F., Franchi, F., Muñiz-Lozano, A., Angiolillo, D.J., 2013. Platelet function profiles in patients with diabetes mellitus. J Cardiovasc. Transl. Res. 6, 329–345. https://doi.org/10.1007/s12265-013-9449-0
Rubio-Senent, F., de Roos, B., Duthie, G., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., 2015. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. Eur. J. Nutr. 54, 1287–1295. https://doi.org/10.1007/s00394-014-0807-8
Samuel, S.M., Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S.V., Paul, D., Maulik, N., 2008. Akt/FOXO3a/SIRT1 Mediated Cardioprotection by n-Tyrosol against Ischemic Stress in Rat In vivo model of Myocardial Infarction:Switching Gears towards Survival and Longevity. J. Agric. Food Chem. 56, 9692–9698. https://doi.org/10.1021/jf802050h
Sánchez, M., Romero, M., Gómez-Guzmán, M., Tamargo, J., Pérez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2019. Cardiovascular Effects of Flavonoids. Curr. Med. Chem. 26, 6991–7034. https://doi.org/10.2174/0929867326666181220094721
Siddique, A.B., Ebrahim, H., Mohyeldin, M., Qusa, M., Batarseh, Y., Fayyad, A., Tajmim, A., Nazzal, S., Kaddoumi, A., El Sayed, K., 2019. Novel liquid-liquid extraction and self-emulsion methods for simplified isolation of extra-virgin olive oil phenolics with emphasis on (-)-oleocanthal and its oral anti-breast cancer activity. PloS One 14, e0214798. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214798
Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with

Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144–158.
Souza, P.A.L. de, Marcadenti, A., Portal, V.L., 2017. Effects of Olive Oil Phenolic Compounds on Inflammation in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. Nutrients 9, E1087. https://doi.org/10.3390/nu9101087
The principle and method of ELISA | MBL Life Science -JAPAN- [WWW Document], n.d. URL https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html (accessed 11.24.22).
Togna, G.I., Togna, A.R., Franconi, M., Marra, C., Guiso, M., 2003. Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity. J. Nutr. 133, 2532–2536. https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2532
Trichopoulou, A., Martínez-González, M.A., Tong, T.Y., Forouhi, N.G., Khandelwal, S., Prabhakaran, D., Mozaffarian, D., de Lorgeril, M., 2014. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. BMC Med. 12, 112. https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-112
Trombocit, 2021. . Wikipedija Prosta Enciklopedija.
Turner, R., Etienne, N., Alonso, M.G., de Pascual-Teresa, S., Minihane, A.M., Weinberg, P.D., Rimbach, G., 2005. Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernahrungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr. 75, 61–70. https://doi.org/10.1024/0300-9831.75.1.61
Tyrosol, 2022. . Wikipedia.
Vainchenker, W., Raslova, H., 2020. Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production. Platelets 31, 707–716. https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1667497
Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. Phenolic Compounds and their Effects on Human Health, in: Vermerris, W., Nicholson, R. (Eds.), Phenolic Compound Biochemistry. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 235–255. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_7
Wachowicz, B., Morel, A., Miller, E., Saluk, J., 2016. The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.) 76, 269–281. https://doi.org/10.21307/ane-2017-026
Watson, S.P., 2009. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. Curr. Pharm. Des. 15, 1358–1372. https://doi.org/10.2174/138161209787846702
Yun, S.-H., Sim, E.-H., Goh, R.-Y., Park, J.-I., Han, J.-Y., 2016. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. BioMed Res. Int. 2016, 9060143. https://doi.org/10.1155/2016/9060143
Zbidi, H., Salido, S., Altarejos, J., Perez-Bonilla, M., Bartegi, A., Rosado, J.A., Salido, G.M., 2009. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. Blood Cells. Mol. Dis. 42, 279–285. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.01.001
Zhang, R., Moscona, A., Myndzar, K., Luttrell-Williams, E., Vanegas, S., Jay, M.R., Calderon, K., Berger, J.S., Heffron, S.P., 2021. More frequent olive oil intake is associated with reduced platelet activation in obesity. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD 31, 3322–3325. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.08.038