Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Επίδραση του κόκκινου κρασιού στη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου

Διδακτορική Διατριβή

Κ. Ν. Καράτζη

Αθήνα, 2007

Αφιερωμένη στο γιο μου και στο σύζυγό μου

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Α. Ζαμπέλα, για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Φ. Σκοπούλη και τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Ι. Λεκάκη για την υποστήριξή τους, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους στη συγγραφή της διατριβής αυτής. Ακόμη, θερμές ευχαριστίες στον καθηγητή κύριο Β. Σταυρινό, στον καθηγητή κύριο Ν. Ανδρικόπουλο, στον καθηγητή κύριο Μ. Κωμαϊτη και στον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Λ. Συντώση που δέχθηκαν να μετέχουν στην επταμελή επιτροπή εξέτασης της διατριβής αυτής.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Χ. Παπαμιχαήλ, επιμελητή Α, του Π.Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», για τη φιλοξενία του στο αγγειολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου, για την άψογη συνεργασία του, τη διαρκή υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθειά του.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τους πολύτιμους συνεργάτες μου στο αγγειολογικό εργαστήριο του Π.Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα» κύριο Ε. Καράτζη, Θ. Παπαϊωάννου, Π. Βοϊδονικόλα, Π. Κατσίχτη, Κ. Σταματελόπουλο και Γ. Βαμβακού για την αμέριστη βοήθειά τους στις μετρήσεις των αγγείων και την άψογη συνεργασία τους.

Ακόμη, θερμά ευχαριστώ τους λέκτορες κύριο Γ. Μπόσκου και κυρία Τ. Χίου, για την καθοδήγησή τους στη χημική ανάλυση και επεξεργασία των κρασιών, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους για την άρτια εκτέλεση των αναλύσεων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της οικογένειάς μου και ιδιαίτερα του γονείς μου που ανέχθηκαν τις αυξημένες υποχρεώσεις μου και με στήριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ 0

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **8**

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **10**

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **12**

1.2. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 155

1.3. ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ 17

1.3.1. ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ 17

1.3.1.1.ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΤΟΝΟΥ 18

◘Αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες 19

◘Αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες 21

1.3.1.2.ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ 22

1.3.1.3.ΠΗΞΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ 24

1.3.1.4.ΦΛΕΓΜΟΝΗ 25

1.3.2. ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ 27

1.4. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ 30

1.5. ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΣΚΛΗΡΙΑ 32

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΣΚΛΗΡΙΑΣ 34

◘Αγγειοδιαστολή μέσω ροής (Flow – Mediated – Dilatation, FMD) 34

◘Τονομετρία 38

1.7. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ 41

1.8. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΣΚΛΗΡΙΑ 46

1.9. ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ 49

◘Σύσταση του κρασιού 50

◘Επιδημιολογικά δεδομένα 53

1.9.1. ΑΛΚΟΟΛ 57

1.9.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ 62

1.10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ 70

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **72**

2.1. Το κοκκινο κρασι, σε οξεια φαση, προκαλει ευεργετικες δρασεις στα ανακλωμενα κυματα και τις κεντρικες πιεσεις σε ασθενεις με στεφανιαια νοσο.....73
2.2. Οι αντιοξειδωτικες ουσιες του κοκκινου κρασιου αναστελλουν την ενδοθηλιακη δυσλειτουργια που προκαλει το οξυ καπνισμα σε υγιεις μη καπνιστες.....88
2.3. Το οξυ καπνισμα προκαλει ενδοθηλιακη δυσλειτουργια σε υγιεις καπνιστες. Ειναι το φαινομενο αυτο αναστρεψιμο απο τα αντιοξειδωτικα συστατικα του κοκκινου κρασιου; 99
2.4. Συνδυασμενες οξειες επιδρασεις της καταναλωσης κοκκινου κρασιου και του καπνισματος ενος τσιγαρου στις αιμοδυναμικες παραμετρους υγιων καπνιστων 110
2.5. Μεταγευματικη βελτιωση της ενδοθηλιακης λειτουργιας απο τις αντιοξειδωτικες ουσιες του κοκκινου κρασιου και του ελαιολαδου. Μια συνεργιστικη δραση των συστατικων της Μεσογειακης Διαιτας. 124
2.6. Οξειες ευεργετικες επιδρασεις συστατικων της Μεσογειακης Διαιτας στην αρτηριακη πιεση και τα ανακλωμενα κυματα 135

3. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....147

4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 150

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ...…….……192

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κόκκινο κρασί έχει μελετηθεί αρκετά τις τελευταίες δεκαετίες και τα αποτελέσματα από την πληθώρα των επιδημιολογικών κυρίως μελετών έδειξαν ότι πρόκειται για ένα ποτό το οποίο σε μέτρια ημερήσια κατανάλωση ασκεί προστατευτική δράση ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Νεότερες έρευνες έδειξαν ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού είχε ευεργετική δράση και στην ενδοθηλιακή λειτουργία και την αρτηριακή σκληρία, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, αφού θεωρούνται πλέον ως καθρέφτης της έναρξης και εξέλιξης της αθηρωματικής διαδικασίας. Μάλιστα, η ευεργετική αυτή δράση του κόκκινου κρασιού αποδόθηκε τόσο στο αλκοόλ που περιέχει, όσο και στις πολλές και ιδιαίτερα ισχυρές αντιοξειδωτικές του ουσίες.

Πάρα όμως τα πολλά και ιδιαίτερα ενδιαφέροντα συμπεράσματα σχετικά με τη μακροχρόνια κατανάλωση του κόκκινου κρασιού, έχει μελετηθεί σαφέστατα σε μικρότερο βαθμό η οξεία επίδρασή του, δηλαδή τα πιθανά αποτελέσματα στη λειτουργικότητα των αγγείων αμέσως μετά από την κατανάλωσή του.

Στην παρούσα ερευνητική διατριβή διερευνάται η οξεία δράση του κόκκινου κρασιού στα ανακλώμενα κύματα και τις κεντρικές πιέσεις ασθενών με στεφανιαία νόσο και αναζητείται απάντηση στο ερώτημα αν το αλκοόλ ή οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχει είναι υπεύθυνες για τη δράση του αυτή. Επίσης διερευνάται περαιτέρω η οξεία επίδραση του κόκκινου κρασιού και των συστατικών του και οι μηχανισμοί που τη διέπουν, μέσω του συνδυασμού της κατανάλωσης του κόκκινου κρασιού με κάποιους γνωστούς επιβαρυντικούς για την ενδοθηλιακή λειτουργία παράγοντες, όπως είναι το κάπνισμα και η μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται η οξεία συνδυασμένη επίδραση του κόκκινου κρασιού και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού με το κάπνισμα ενός τσιγάρου, στην ενδοθηλιακή λειτουργία και τη σκληρία των αγγείων καπνιστών και μη καπνιστών και τέλος διερευνάται η οξεία συνδυασμένη δράση του κόκκινου ή του λευκού κρασιού με το ελαιόλαδο, σε πληθυσμό υγιών εθελοντών.

Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι τόσο το κανονικό, όσο και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί προκάλεσαν σημαντική μείωση στα κύματα ανάκλασης (ρ= 0,001 και ρ= 0,011 αντίστοιχα), ενώ ταυτόχρονα οι κεντρικές συστολικές πιέσεις μειώθηκαν μετά την

κατανάλωση κανονικού (-7,4 ± 2,4 mmHg, ρ=0,05) και απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (- 5,4 ± 2,7 mmHg, ρ=0,019) σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Επίσης, το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε μείωση της αγγειοδιαστολής μέσω ροής (FMD), ($p < 0,001$) σε υγιείς καπνιστές και μη καπνιστές, ενώ η ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού (κανονικού ή απαλκοολωμένου) με το κάπνισμα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή του FMD. Ακόμη, το κάπνισμα αύξησε την περιφερική συστολική πίεση υγιών καπνιστών ($p<0,005$) 30 λεπτά μετά το τέλος του, αλλά η ταυτόχρονη κατανάλωση ενός από τους δύο τύπους κρασιού ανέστρεψε τη βλαβερή αυτή επίδραση. Τέλος, η συνδυασμένη κατανάλωση κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου (πλούσια και τα δύο σε αντιοξειδωτικά) βελτίωσε το FMD μεταγευματικά ($p=0,002$), για 1 ώρα ($p=0,002$) και 2 ώρες (ρ= 0,037) μετά το τέλος του γεύματος συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στη φάση της νηστείας, ενώ ταυτόχρονα μείωσε τα ανακλώμενα κύματα σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την αντίστοιχη μείωση μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και ελαιολάδου ($p=0,001$), λευκού κρασιού και αγουρελαίου ($p=0,021$) και λευκού κρασιού και ελαιολάδου ($p=0,023$). Τέλος, η κεντρική και περιφερική διαστολική και η κεντρική συστολική πίεση μειώθηκαν μεταγευματικά μετά από την κατανάλωση κρασιού και ελαιολάδου ($p<0,05$).

Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι το κόκκινο κρασί στο οξύ μεταγευματικό στάδιο προκαλεί ευεργετικές δράσεις στην ενδοθηλιακή λειτουργία και τους δείκτες σκληρίας των αγγείων τόσο σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, όσο και σε υγιείς εθελοντές. Η δράση του αυτή μπορεί να αποδοθεί τόσο στο αλκοόλ που περιέχει, όσο και στις ισχυρές του αντιοξειδωτικές ουσίες, καθώς μπορούν να αναστρέψουν τις βλαβερές οξείες επιδράσεις του καπνίσματος, αλλά και αυτές της μεταγευματικής υπερτριγλυκεριδαιμίας. Σε γενικές γραμμές η παρούσα διδακτορική διατριβή δίνει το ερέθισμα για την περαιτέρω διερεύνηση της οξείας επίδρασης του κόκκινου κρασιού στα αγγεία, αλλά κυρίως για τη μελέτη των πολύ ισχυρών, όπως αποδεικνύεται, αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχει, προκειμένου να αναζητηθεί ένας φυσικός τρόπος βελτίωσης της αγγειακής λειτουργίας.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει τα τελευταία χρόνια, ότι η κατανάλωση 20-30γραμμαρίων αλκοόλ τη μέρα, συνδέεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς και της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα [Flesch 2001, deLorimier 2000]. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί αρκετοί μηχανισμοί δράσης του αλκοόλ και κατά συνέπεια των περισσότερων αλκοολούχων ποτών, όπως η αύξηση της HDL, η μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και η αύξηση της ινωδόλυσης [Salovainen 1995]. Παρόλ' αυτά είναι αρκετοί οι ερευνητές που θεωρούν ότι μεταξύ των αλκοολούχων ποτών ευεργετική δράση ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα έχει το κόκκινο κρασί και όχι κάποιο άλλο ποτό [Foppa 2001]. Η επίδραση αυτή, είναι πιθανό να οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών στο κόκκινο κρασί σε σύγκριση με τα άλλα είδη κρασιού και τα άλλα αλκοολούχα ποτά [Hertog 1995].

Πράγματι, τα διάφορα αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στο κόκκινο κρασί, έχουν συσχετισθεί με μείωση του κινδύνου εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου [Knekt 1996, Rimm 1996, Hertog 1997] με διάφορους μηχανισμούς όπως η μείωση της επιδεκτικότητας της LDL σε οξειδώσεις, ή μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων [Russo 2001], αλλά και η βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου [Giugliano 2000]. Η τελευταία αυτή δράση των συστατικών του κόκκινου κρασιού έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς τα τελευταία χρόνια θεωρείται ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου έχει προγνωστική αξία καθώς σχετίζεται με την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων [Wilansky 2003, Quyyumi 2003].

Μέχρι σήμερα έχουν γίνει διάφορες μελέτες in vitro που εξετάζουν την επίδραση του κρασιού, ή συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών ουσιών αυτού σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα [Katsuya 2000, Pendurthi 1999, Diebolt 2001, Freedman 2001] και ελάχιστες in vivo μελέτες [Stein 1999, Djousse 1999]. Στις έρευνες αυτές διαφαίνεται ότι τόσο το κόκκινο κρασί συνολικά, όσο και μεμονωμένα οι διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες του, επηρεάζουν θετικά την ενδοθηλιακή λειτουργία. Εύλογα λοιπόν, δημιουργείται το ερώτημα σχετικά με το ποια είναι η οξεία επίδραση του κόκκινου κρασιού ή των συστατικών του στην αγγειακή λειτουργία in vivo, και με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται αυτή.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες μελέτες σχετικά με την οξεία χορήγηση κόκκινου κρασιού και τη δράση του στα αγγεία. Πιο αναλυτικά έχουν γίνει δύο εργασίες σε υγιείς εθελοντές [Agewall 2000, Hashimoto 2001] στις οποίες φαίνεται ότι το κόκκινο κρασί δε βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία (FMD, αγγειοδιαστολή μέσω ροής) 30 έως και 120 λεπτά μετά τη λήψη του, ενώ το κόκκινο κρασί από το οποίο έχει αφαιρεθεί το αλκοόλ τη βελτιώνει. Αυτό υποδεικνύει ότι τα αντιοξειδωτικά του κρασιού έχουν ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση, αλλά το αλκοόλ δε φαίνεται να βελτιώνει τη λειτουργία των αγγείων στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο. Από την άλλη πλευρά μια άλλη πρόσφατη έρευνα [Whelan 2004] που μελέτησε τη οξεία δράση του κόκκινου και του λευκού κρασιού σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, κατέληξε ότι και οι δύο τύποι κρασιού βελτίωσαν την ενδοθηλιακή λειτουργία (FMD) 60 λεπτά μετά τη λήψη του υποδεικνύοντας ότι το αλκοόλ έχει ευεργετική δράση σε οξεία κατανάλωσή του. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίθετα μεταξύ τους, ενώ ίσως και να διαφέρει η οξεία από τη μακροχρόνια επίδραση του αλκοόλ στα αγγεία, ή η επίδρασή του σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Χρειάζεται λοιπόν μεγάλος αριθμός ερευνών προκειμένου να καταλήξουμε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη δράση του αλκοόλ στην αγγειοκινητική λειτουργία, κυρίως στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτεί κανείς ότι η κατανάλωση αλκοόλ είναι μια διαδεδομένη συνήθεια, αλλά και μια συνήθης συμβουλή γιατρών και διαιτολόγων ως προληπτικό μέσο ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Ιδιαίτερα σημαντικό όμως είναι και το γεγονός ότι πρέπει να αναζητηθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους επιδρά το κόκκινο κρασί και τα επιμέρους συστατικά του (αλκοόλ και αντιοξειδωτικές ουσίες) στην αγγειακή λειτουργία. Αυτό μπορεί να γίνει με το σχεδιασμό μελέτης σχετικά με τη δράση των συστατικών του κόκκινου κρασιού στην αγγειακή λειτουργία στεφανιαίων ασθενών οι οποίοι ελάχιστα έχουν μελετηθεί. Ακόμη στην αναζήτηση των μηχανισμών δράσης του κόκκινου κρασιού μπορεί να συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό και η μελέτη της συνδυασμένης δράσης του με παράγοντες που είναι γνωστό ότι σε οξεία φάση επιδεινώνουν την αγγειακή λειτουργία, όπως για παράδειγμα το κάπνισμα ενός τσιγάρου και η κατανάλωση λιπαρού γεύματος το οποίο προκαλεί μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία.

Η σημασία της σειράς αυτής των μελετών είναι μεγάλη, καθώς προσφέρουν για πρώτη φορά πολύτιμα στοιχεία σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους δρα το κόκκινο κρασί και τα επιμέρους συστατικά του στη λειτουργικότητα των αγγείων στο στάδιο αμέσως μετά την κατανάλωσή του. Επίσης προκύπτουν σημαντικά δεδομένα σχετικά με το αν το αλκοόλ ή οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού είναι αυτές που κυρίως δρουν αγγειοπροστατευτικά, ενώ για πρώτη φορά γίνεται μελέτη σχετικά με το πόσο ισχυρή είναι η δράση του αλκοόλ ή των πολυφαινολών, καθώς αυτά συνδυάζονται με επιβαρυντικούς παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα, αλλά και με ένα άλλο σημαντικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής, το ελαιόλαδο, το οποίο όμως σε μεταγευματικό στάδιο επιδεινώνει την αγγειακή λειτουργία λόγω της υπερτριγλυκεριδαιμίας που προκαλεί.

1.2. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν σήμερα μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου σε όλο τον κόσμο, αφού σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας 16,6 εκατομμύρια ή το ένα τρίτο των θανάτων παγκοσμίως αποδίδονται στις διάφορες μορφές καρδιαγγειακών νοσημάτων [WHO 2003]. Επιπλέον, 20 εκατομμύρια άνθρωποι επιβιώνουν από εμφράγματα και εγκεφαλικά επεισόδια κάθε χρόνο, πολλοί από τους οποίους χρειάζονται ιατρική φροντίδα, ενώ μέχρι το έτος 2010, τα καρδιαγγειακά νοσήματα θα είναι η κύρια αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες [WHO 2003].

Η εκτενής μελέτη των νοσημάτων της καρδιάς και των αγγείων έχει οδηγήσει εδώ και πολλά χρόνια στην εύρεση των λεγόμενων παραγόντων κινδύνου. Υπάρχουν οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι ισχύουν εδώ και αρκετά χρόνια, ενώ πρόσφατα αναπτύχθηκαν και αρκετοί νέοι οι οποίοι είναι πιο εξειδικευμένοι, αλλά εξίσου σημαντικοί. Οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία, το φύλο, το οικογενειακό ιστορικό, η υπερλιπιδαιμία και τα χαμηλά επίπεδα της χοληστερόλης υψηλής πυκνότητας (HDL), η υπέρταση, το κάπνισμα, η ινσουλινοαντίσταση και ο διαβήτης, η παχυσαρκία και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας [Braunwald, 2001]. Επίσης, υπάρχει ένας ακόμη διαχωρισμός των παραγόντων κινδύνου, σε μη μεταβλητούς όπως είναι η ηλικία και το φύλο και σε μεταβλητούς όπως είναι τα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα και η παχυσαρκία.

Από αυτούς τους παράγοντες ο πιο σημαντικός μεταβλητός παράγοντας είναι το κάπνισμα το οποίο ανάλογα με τη χρήση του πολλαπλασιάζει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Άτομα που καπνίζουν 20 ή περισσότερα τσιγάρα ανά ημέρα έχουν διπλάσιο ή τριπλάσιο συνολικό καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ ο κίνδυνος αυξάνεται ακόμη και με ημερήσια κατανάλωση ενός έως τεσσάρων τσιγάρων [Willett, 1987, Howard, 1998]. Το κάπνισμα επηρεάζει την αθηρωματική νόσο με διάφορους μηχανισμούς όπως είναι η αύξηση της οξείδωσης της LDL λιποπρωτεΐνης που αποτελεί το έναυσμα για τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών, η μείωση των επιπέδων της HDL λιποπρωτεΐνης [Frei 1991], η μείωση της ικανότητας των αγγείων να διαστέλλονται [Zeiher,1995], η αύξηση της πηκτικότητας του αίματος και του ινωδογόνου ευοδώνοντας την παραγωγή θρόμβων

[Meade, 1987], η αύξηση διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων όπως είναι η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) [Tracy, 1997] και η αύξηση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων [Fusegawa, 1999]. Είναι λοιπόν φανερό ότι το κάπνισμα επηρεάζει αρνητικά σχεδόν τα περισσότερα στάδια της αθηρωματικής διαδικασίας, γεγονός που δικαιολογεί απόλυτα και την τεράστια αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου που προκαλεί.

Σήμερα, έχουν προκύψει από επιδημιολογικές μελέτες νέοι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι φαίνονται αρκετά αξιόπιστοι και χρήσιμοι στην κλινική πράξη. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα διαστολής των αγγείων [Welch, 1998], τα υψηλά επίπεδα ινωδογόνου τα οποία μειώνουν τη ρευστότητα του αίματος αυξάνοντας τον κίνδυνο θρομβώσεων [Koenig 1998], ενώ ταυτόχρονα αποτελούν και ένα δείκτη συστηματικής φλεγμονής, η λιποπρωτεΐνη α (Lp a) η οποία λόγο ομοιότητας του μορίου της με το πλασμινογόνο εμποδίζει την ινωδόλυση [Loscalzo 1990]. Ακόμη, μερικοί από τους νεότερους παράγοντες κινδύνου είναι διάφοροι δείκτες της ινωδολυτικής διαδικασίας όπως είναι ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) και ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (t-PA) [Braunwald 2001] και τέλος κάποιοι δείκτες φλεγμονής με σημαντικότερη τη CRP και σε δεύτερο βαθμό διάφορες κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL 6) και μόρια προσκόλλησης όπως το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης (ICAM-1)[Ross 1999]. Ακόμη αρκετή συζήτηση γίνεται σήμερα και για επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου όπως είναι ο φαινότυπος της LDL , καθώς οι μικρές και πυκνές σε χοληστερόλη LDL είναι οι πιο διεισδυτικές στα αγγεία και οι περισσότερο αθηρογόνες, καθώς και νέοι δείκτες φλεγμονής όπως ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF-a).

Όπως είναι φανερό η επιστήμη σήμερα έχει αναγνωρίσει μια πληθώρα από τους παράγοντες εκείνους που συμμετέχουν στην αθηρωματική διαδικασία και τείνει στο να καταλήξει σε διαγνωστικούς ελέγχους οι οποίοι να πιστοποιούν την ύπαρξη της αγγειακής βλάβης κατά την έναρξή της και κυρίως προτού εμφανιστούν συμπτώματα στον ασθενή. Η προσπάθεια αυτή για την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων οδηγεί στην αναγνώριση αρκετών παραγόντων στο αίμα οι οποίοι καταχωρούνται πλέον ως παράγοντες κινδύνου, αλλά και στην ανάπτυξη αρκετών διαγνωστικών τεχνικών και μεθόδων οι οποίες μπορούν σε πρώιμα στάδια να ανιχνεύσουν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ή σκληρία των

αγγείων τα οποία θεωρούνται πρώιμα στάδια αθηρωμάτωσης και αγγειακής βλάβης. Εξάλλου η εξέταση της ενδοθηλιακής λειτουργία θεωρείται ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της εξέλιξης της αθηρωματικής διαδικασίας [Behrendt 2002], ενώ και η αρτηριακή σκληρία πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας των καρδιαγγειακών νοσημάτων [Weber 2004], γεγονός που αποδεικνύει τη μεγάλη σημασία τους στην πρόγνωση και στην πρόληψη των νοσημάτων αυτών.

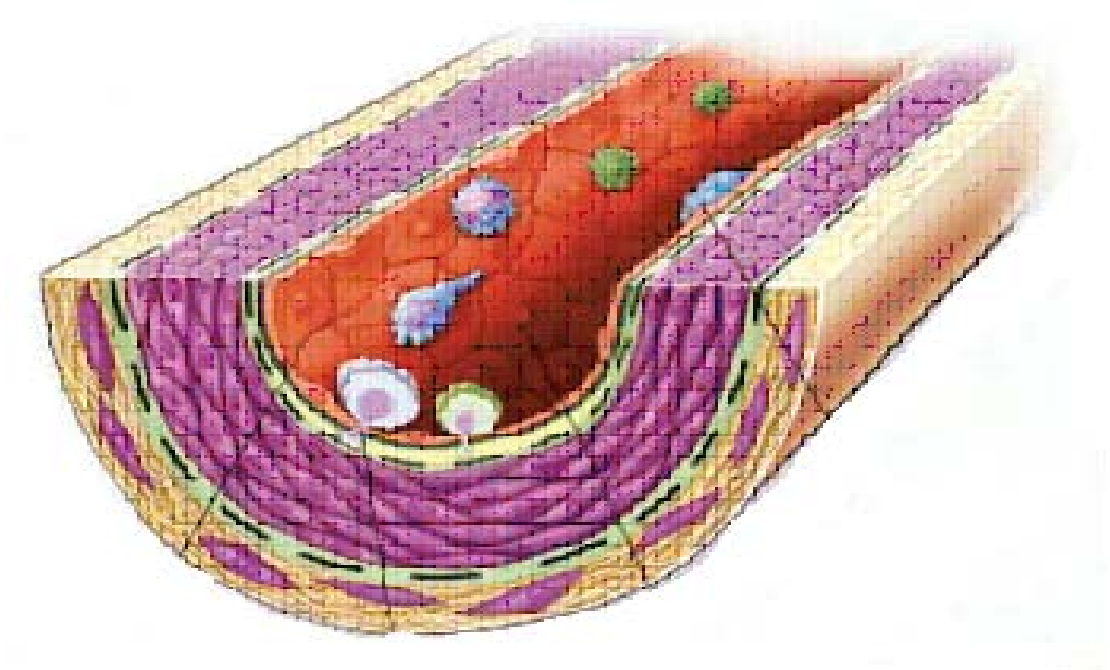
1.3. ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

1.3.1. ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Η φυσιολογική αρτηρία αποτελείται από τρεις χιτώνες: τον έσω που έρχεται σε επαφή με το αρτηριακό αίμα, το μέσο και τον έξω χιτώνα. Ο έσω χιτώνας που αποτελεί φυσικό φραγμό στην είσοδο ουσιών και κυττάρων στο τοίχωμα της αρτηρίας, διαθέτει ένα λεπτό στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία επικάθονται σε στρώμα συνδετικού ιστού. Ανάμεσα στον έσω και στο μέσο χιτώνα υπάρχει ελαστική μεμβράνη, όπως επίσης και ανάμεσα στο μέσο και στον έξω. Ο μέσος χιτώνας έχει πολλαπλά στρώματα λείων μυϊκών ινών, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους με ίνες κολλαγόνου, ελαστικές ίνες και πρωτεογλυκάνες τις οποίες συνθέτει [Junqueira, 1991].

Η αντίληψη που επικρατούσε για αρκετές δεκαετίες ήταν ότι το ενδοθήλιο δεν είχε κάποιο συγκεκριμένο ρόλο και απλά επρόκειτο για μια ημιδιαπερατή μεμβράνη χωρίς ενεργό ρόλο, ανάμεσα στο αίμα και στους υποκείμενους ιστούς. Αντίθετα σήμερα το ενδοθήλιο θεωρείται ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς έχει επιφάνεια 350m^2, βάρος 1,5kg και καλύπτει όλα τα αγγεία [Michiels 2003] και ο οποίος βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση αφού προσαρμόζεται ανάλογα στις διάφορες συνθήκες, εκκρίνοντας μεγάλο αριθμό ουσιών. Μέσω των ουσιών αυτών το ενδοθήλιο είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου με την παραγωγή και έκκριση αγγειοσυσπαστικών και αγγειοδιασταλτικών ουσιών, για τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση (remodeling) του αγγειακού τοιχώματος και που είναι γνωστή και ως

αγγειογένεση, για την πήξη και την ινωδόλυση αλλά και για πληθώρα φλεγμονωδών αντιδράσεων με την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων [Celermajer 1997].



Σχήμα 1. Δομή του τοιχώματος των αγγείων. Με το πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται ο έσω χιτώνας, με το ροζ ο μέσος και με το κίτρινο ο έξω χιτώνας.

1.3.1.1. ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΤΟΝΟΥ

Όπως ήδη προαναφέρθηκε το αγγειακό τοίχωμα διαθέτει μια στοιβάδα από λείες μυϊκές ίνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συστολή ή τη διαστολή στην οποία βρίσκονται κάθε φορά τα αγγεία, δηλαδή για τον αγγειακό τόνο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλουν στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου με την έκκριση διαφόρων ουσιών οι οποίες διαχέονται στις υποκείμενες λείες μυϊκές ίνες και προκαλούν είτε διαστολή (χάλαση), είτε συστολή [Drexler 1997]. Η έκκριση των ουσιών αυτών από το ενδοθήλιο προκύπτει μετά από συγκεκριμένα φυσιολογικά (διατμητική τάση, κατεχολαμίνες, ακετυλοχολίνη, βραδυκινίνη, οιστρογόνα) ή φαρμακολογικά ερεθίσματα (L-NMMA, L-αργινίνη, ανταγωνιστής βραδυκινίνης). Η ιδιότητα αυτή καθιστά το ενδοθήλιο ως ένα βασικό παράγοντα για τη

διατήρηση της φυσιολογικής αρτηριακής πίεσης και των περιφερικών αντιστάσεων στον άνθρωπο (Celermajer 1997, Drexler 1997).

- **Αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες**

Οι σημαντικότεροι αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η προστακυκλίνη (PGI_2) και ο ενδοθηλιακός υπερπολωτικός παράγοντας (Endothelial Derived Hyperpolarising Factor, EDHF).

I. Μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το NO αποτελεί τη βασικότερη αγγειοδιασταλτική ουσία που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παράγεται από την L-αργινίνη με τη βοήθεια της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (endothelial Nitric Oxide Synthase, e NOS) [Behrendt 2002]. Στη συνέχεια ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση του c GMP [Russo 2002] και με διαδοχικές αντιδράσεις προκαλείται μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca [Horn 2002], οπότε ελαττώνεται ο σχηματισμός συμπλόκου Ca-καλμοδουλίνης-μυοσίνης και εμποδίζεται η αγγειοσυστολή [Gewaltig 2002].

Το υπεύθυνο ένζυμο eNOS παραμένει σε ανενεργή μορφή και η ενεργοποίηση του εξαρτάται από την επίδραση ουσιών όπως η θρομβίνη και η ισταμίνη [Anderson 2003]. Η δραστικότητα του ενζύμου ρυθμίζεται ακόμη και σε μεταγραφικό επίπεδο από ουσίες όπως η ινσουλίνη, ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelium Growth Factor, VEGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor, b FGF) που αυξάνουν την έκφραση του και κατά συνέπεια την παραγωγή NO, ενώ υποξία και οξειδωμένη LDL τη μειώνουν [Govers 2001]. Εκτός όμως από τα διάφορα ερεθίσματα, υπάρχει και μια συνεχής παραγωγή NO σε χαμηλά επίπεδα η οποία αυξάνεται σε αλλαγή συγκέντρωσης οξυγόνου, σε απόκριση ακετυλοχολίνης, βραδυκινίνης και σεροτονίνης [Russo 2002]. Το NO έχει χρόνο ημίσειας ζωής λίγα δευτερόλεπτα και γι' αυτό το λόγο η μέτρησή του στο αίμα είναι αρκετά δύσκολη. Τέλος, το NO εκτός από την ισχυρή αγγειοδιασταλτική του δράση παρουσιάζει και άλλες πολύ σημαντικές δράσεις όπως στην αγγειογένεση, την αιμόσταση και τη φλεγμονή.

Πίνακας 1. Δράσεις NO [Russo 2002]

ΔΡΑΣΕΙΣ NO & ΚΥΤΤΑΡΑ – ΣΤΟΧΟΙ	
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ρυθμίζει τη διαπερατότητα Εμποδίζει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων Προάγει τον πολλ/μο
Λεία μυϊκά κύτταρα	Ευνοεί την αγγειοδιαστολή Εμποδίζει τον πολλ/μο
Αιμοπετάλια	Εμποδίζει την ενεργοποίηση Μειώνει τη συσσώρευση
Λευκοκύτταρα	Εμποδίζει την προσκόλληση στο ενδοθήλιο

II. Προστακυκλίνη (PGI_2)

Η προστακυκλίνη δημιουργείται από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος με τη βοήθεια της κυκλοοξυγενάσης [Russo 2002]. Ανήκει στα εικοσανοειδή και παράγεται με ερέθισμα τη διατμητική τάση και την επίδραση της βραδυκινίνης. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής μερικά λεπτά και προκαλεί αγγειοδιαστολή μέσω ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης, σχηματισμού c AMP και τελικά υπερπόλωσης της μεμβράνης των λείων μυϊκών ινών [Urakami-Harasawa 1997]. Η αγγειοδιασταλτική της δράση είναι πολύ σημαντική και σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμεύει σε ένδεια NO, όμως η δράση της είναι σαφέστατα ασθενέστερη από αυτό. Τέλος, εκτός από την αγγειοδιαστολή η προστακυκλίνη εμφανίζει επίσης αντιθρομβωτική και αντιαιμοπεταλιακή δράση [Russo 2002].

III. Ενδοθηλιακός υπερπολωτικός παράγοντας (EDHF).

Ο EDHF είναι ένας επίσης σημαντικός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας ο οποίος εκκρίνεται ως απόκριση σε ισταμίνη, βραδυκινίνη και ακετυλοχολίνη [Amoroso 2001]. Η δράση του EDHF είναι σημαντικότερη για τις μικρές αρτηρίες σε σχέση με τις μεγάλες [Urakami-Harasawa 1997]. Η αγγειοδιαστολή που προκαλείται από τον EDHF δε σχετίζεται με αύξηση των ενδοκυττάριων κυκλικών νουκλεοτιδίων (cGMP, cAMP) [Cohen 1995], αλλά με ενεργοποίηση καναλιών καλίου των λείων μυϊκών κυττάρων, προκαλώντας έξοδο καλίου,

υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, αναστολή εισόδου ασβεστίου στο κύτταρο και τελικά αγγειοδιαστολή [Zygmunt 1997].

- **Αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες**

Οι σημαντικότεροι αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες είναι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης και η ενδοθηλίνη, ενώ αγγειοσυστολή προκαλούν και διάφοροι ενδοθηλιακοί αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες εξαρτώμενοι από την κυκλοξυγενάση, όπως η ακετυλοχολίνη, η προσταγλανδίνη Η2, η θρομβίνη, η νικοτίνη, το αραχιδονικό οξύ και η θρομβοξάνη Α2.

I. **Σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης**

Μία από τις σημαντικότερες δράσεις του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης είναι η μετατροπή του αγγειοτενσινογόνου σε αγγειοτενσίνη Ι από ένα ειδικό ένζυμο του ήπατος τη ρενίνη και στη συνέχεια της αγγειοτασίνης Ι στην αγγειοτασίνη ΙΙ μέσω του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (ΜΕΑ) το οποίο βρίσκεται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων [Schiffrin 2002]. Η αγγειοτασίνη ΙΙ προκαλεί αγγειοσύσπαση είτε άμεσα μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων αγγειοτασίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα είτε μέσω διέγερσης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος [Vanhoutte 1998]. Εκτός από την άμεση αγγειοσυσταλτική δράση της στις λείες μυϊκές ίνες δρα και έμμεσα προκαλώντας έκκριση ενδοθηλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος εξίσου σημαντική δράση του ΜΕΑ είναι και η ιδιότητά του να απενεργοποιεί την βραδυκινίνη [Cody 1997, Vanhoutte 1998], η οποία όπως αναφέρθηκε συμμετέχει στην αγγειοδιαστολή.

ΙΙ. Ενδοθηλίνη

Η κυριότερη αγγειοσυσταλτική ουσία είναι η ενδοθηλίνη-1 (ΕΤ-1) και η δράση της είναι πιο παρατεταμένη και 100 φορές ισχυρότερη από αυτή της αγγειοτασίνης ΙΙ [Masaki 1995]. Η παραγωγή της προκαλείται από την διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων από διάφορους παράγοντες-αγωνιστές, όπως θρομβίνη, μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας (transforming growth factor β, TGF-β), ιντερλευκίνη-1, επινεφρίνη, αγγειοτασίνη ΙΙ, αντιδιουριτική ορμόνη (ADH), ιόντα ασβεστίου, ινσουλίνη καθώς και από φυσικά ερεθίσματα όπως είναι η υποξία [Michiels 2003]. Η έκκριση της ενισχύεται κατά τη

συσσώρευση αιμοπεταλίων και μειώνεται με την επίδραση NO το οποίο εμπλέκεται σε ένα αμφίδρομο μηχανισμό ρύθμισης κατά τον οποίο η αύξηση της παραγωγής του αναστέλλει την παραγωγή της ET-1 ενώ η μείωσή του αυξάνει την παραγωγή της (μέσω δράσης της θρομβίνης και της αγγειοτασίνης), η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την παραγωγή NO [Iketa 1997]. Με την επίδραση της ενδοθηλίνης τα αγγεία συστέλλονται βραδέως αλλά η συστολή τους είναι παρατεταμένη [Russo 2002]. Τα πεπτίδια της ενδοθηλίνης είναι τριών ειδών ET-1, ET-2, ET-3. Στα αγγεία υπάρχουν δύο ειδών υποδοχείς, οι ET_A των λείων μυϊκών κυττάρων που έχουν υψηλή συγγένεια για ET-1, ET-2 αλλά όχι για ET-3 και οι υποδοχείς ET_B , οι οποίοι βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και έχουν τον ίδιο βαθμό συγγένειας και για τους 3 τύπους ενδοθηλίνης. Πρόσδεση στους ET_B υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση NO/PGI_2 που αντιτίθεται στην αγγειοσυσταλτική ιδιότητα της ET-1. Αυτό εξηγεί την παροδική αγγειοδιαστολή που προηγείται της συστολής των αγγείων [Michiels 2003]. Τέλος, ο χρόνος ημιζωής της ET-1 είναι μικρός και εκκρίνεται συνεχώς από τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε μικρές ποσότητες, δρώντας περισσότερο τοπικά στο αγγειακό τοίχωμα (κυρίως των αρτηριών αντιστάσεων) παρά συστηματικά, συμμετέχοντας στην διατήρηση του αγγειακού τόνου [Haynes 1996].

Όπως είναι φανερό υπάρχει μεγάλη αλληλεπίδραση μεταξύ των αγγειοδραστικών ουσιών [Lavallee 2001]. Για παράδειγμα παράγοντες που προκαλούν την απελευθέρωση ET-1 όπως π.χ. θρομβίνη ενισχύουν επίσης την έκκριση αγγειοδιασταλτικών ουσιών (PGI_2, NO) που αντιτίθεται στην αγγειοσυσταλτική δράση της ενδοθηλίνης. Από την άλλη το ενδοθήλιο εκκρίνει NO και PGI_2 που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, εκκρίνει όμως και ET-1, η οποία έχει ακριβώς αντίθετη δράση δηλ. επάγει τον πολλαπλασιασμό τους. Με άλλα λόγια η τελική αγγειακή απάντηση θα είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης των ουσιών που ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο, το οποίο μπορεί να μεταβληθεί σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις [Michiels 2003].

1.3.1.2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Μία σημαντική ιδιότητα του αγγειακού τοιχώματος είναι να αντιλαμβάνεται τις διάφορες μεταβολές που συντελούνται στο περιβάλλον του (πίεσης, διατμητικής τάσης) και να προσαρμόζεται σε αυτές σε μια προσπάθεια να διατηρήσει σταθερό το περιβάλλον του σε

θέματα ροής και πιέσεως. Η προσαρμογή αυτή γίνεται με αλλαγές στη μορφολογία του, δηλαδή με αλλαγές στη σχέση αυλού και τοιχώματος του αγγείου. Η αγγειακή αυτή αναδιαμόρφωση είναι πολύ σημαντική για την παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων και προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η αναδιαμόρφωση το αγγείο διαθέτει τους εξής μηχανισμούς: κυτταρική αύξηση (αγγειογένεση), προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) και κυτταρική μετανάστευση. Η ισορροπία ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς, ανάλογα και με τα εξωτερικά ερεθίσματα είναι αυτή που θα καθορίσει την τελική μορφολογία του αγγείου [Michiels 2003].

Οι διάφορες μεταβολές της διατμητικής τάση, ή της εκτατικής ισχύος, αλλά και κάποιες ορμόνες ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία εκκρίνουν διάφορες ουσίες οι οποίες επηρεάζουν την αγγειογένεση. Συνήθως οι αγγειοδιασταλτικές ουσίες αναστέλλουν την κυτταρική αύξηση, ενώ οι αγγειοσυσπαστικές την αυξάνουν [Gibbons 1997 και 1997a]. Η αύξηση της διατμητικής τάσης ενεργοποιεί την έκκριση NO, PDGF και TGF-β από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η αύξηση της εκτατικής ισχύος προκαλεί έκκριση αγγειοσυσπαστικών παραγόντων [Gibbons 1994]. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ουσίες που αναστέλλουν την κυτταρική αύξηση επικρατούν έναντι αυτών που την ενισχύουν και αυτή η ισορροπία διαταράζεται μόνο σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η υπέρταση και η αθηροσκλήρωση.

Οι κυριότεροι αυξητικοί παράγοντες είναι η αγγειοτασίνη I, PDGF (αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας) και ο TGF-β (ιστικός αυξητικός παράγοντας), η ενδοθηλίνη και η θρομβίνη, οι οποίοι ενεργοποιούν τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα που προσομοιάζει την ινσουλίνη-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)(υποδοχέας, IGF-1R) και ο οποίος στη συνέχεια ευνοεί την αγγειακή αύξηση. Από την άλλη πλευρά αναστολείς της αγγειακής αύξησης είναι το NO, αλλά και οι PDGF και TGF-β οι οποίοι έχουν διπλό ρόλο ευνοώντας ή αναστέλλοντας την κυτταρική αύξηση [Gibbons 1994]. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση των αυξητικών παραγόντων και των αναστολέων τους είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και η τελική αύξηση ή απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων το αποτέλεσμα σειράς αλληλεπιδράσεων, αφού φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοθηλιακών παραγόντων, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι και ορισμένες κυτοκίνες (IL-1, TNF-α, INF-γ) επηρεάζουν τη δράση τους [Delafontaine 1998].

1.3.1.3. ΠΗΞΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Το ενδοθήλιο αποτελεί μια αντιθρομβωτική επιφάνεια η οποία είτε παράγει ουσίες είτε ενεργοποιεί επιφανειακά μόρια τα οποία εμποδίζουν την παραγωγή θρόμβων και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η δράση του ενδοθηλίου εκτείνεται σε τρία επίπεδα, καθώς επηρεάζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την πήξη και τέλος την ινωδόλυση με κατάλληλους μηχανισμούς [Russo 2002].

- Συσσώρευση αιμοπεταλίων

Οι κυριότερες ουσίες που εκκρίνονται από το ενδοθήλιο και συμμετέχουν στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι η προστακυκλίνη και το NO, τα οποία όπως είναι φανερό εκτός από τη δράση τους στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, έχουν και αντιπηκτική δράση [Trepakova 1999]. Δρουν συνεργιστικά, καθώς το NO αυξάνει την συγκέντρωση της c GMP, ενώ η PGI_2 αυξάνει την c AMP οδηγώντας σταδιακά σε μείωση του ενδοκυττάριου Ca και με διαδοχικά βήματα τελικά στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αλλά και της μεταξύ τους προσκόλλησης [Gewaltig 2002].

- Πήξη

Η αντιπηκτική ικανότητα του ενδοθηλίου σχετίζεται πρωτίστως με την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C (Protein C) [Selwyn 2003]. Πιο συγκεκριμένα όταν η θρομβίνη συνδεθεί με τον ενδοθηλιακό πρωτεϊνικό υποδοχέα της τη θρομβομοδουλίνη, μετατρέπεται σε ισχυρό ενεργοποιητή της πρωτεΐνης C, η οποία αδρανοποιεί παρουσία ιόντων ασβεστίου και της πρωτεΐνης S δύο βασικούς παράγοντες της πήξης: τον VIIα και τον Vα (μονοπάτι πρωτεΐνης C-S). Επομένως τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του υποδοχέα τους (θρομβομοδουλίνη) έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την πήξη [Selwyn 2003].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν επίσης τον αναστολέα του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI). Ο παράγοντας αυτός φυσιολογικά εκκρίνεται στην αρχική φάση της θρόμβωσης και δεσμεύεται στα συμπλέγματα ιστικού παράγοντα και παράγοντα VIIα, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την ικανότητα των συμπλεγμάτων αυτών να δημιουργούν τον παράγοντα X_α [Golino 2003]. Κατ' επέκταση με την απελευθέρωση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του TFPI παράγονται μικρές μόνο ποσότητες θρομβίνης, οπότε εμποδίζεται η περαιτέρω πήξη του αίματος.

Ένας ακόμη αντιπηκτικός μηχανισμός του ενδοθηλίου όμως, είναι και η ενεργοποίηση της αντιθρομβίνης ΙΙΙ . Πρόκειται για μία πρωτεΐνη του πλάσματος που συντίθεται στο ήπαρ και αδρανοποιεί τη θρομβίνη και διάφορους παράγοντες πήξης (IX_{α}, X_{α}, XI_{α}, XII_{α}) [Hirsh 2001]. Το ενδοθήλιο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της αντιθρομβίνης ΙΙΙ μέσω της ηπαρίνης η οποία βρίσκεται στις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενισχύει τη δράση της. Έτσι το ενδοθήλιο εμποδίζει έμμεσα την πήξη, ενεργοποιώντας την αντιθρομβίνη ΙΙΙ και προάγοντας την αδρανοποίηση της θρομβίνης [Minamiya 2004].

- Ινωδόλυση

Η ινωδολυτική ικανότητα του ενδοθηλίου φαίνεται από τη ρύθμιση της έκφρασης του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator, tPA) και του αναστολέα του (Plasminogen Activator Inhibitor, PAI-1) [Michiels 2003]. Ο tPA, παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της μικροκυκλοφορίας [Levin 1997] και τα ερεθίσματα για την απελευθέρωσή του είναι η διατμητική τάση, η φλεβική στάση, η θρομβίνη, η βραδυκινίνη, οι κυτοκίνες και η βασοπρεσσίνη [Dzau 1993]. Ο tPA μετατρέπει το πλασμινογόνο σε πλασμίνη, η οποία στη συνέχεια αποσυνθέτει το ινώδες του θρόμβου σε διαλυτά θραύσματα ινώδους [Sazonava 2004]. Από τη στιγμή που θα διαλυθεί το ινώδες προκαλείται λύση του θρόμβου και απομάκρυνση του. Ο PAI-1 αντίθετα, συνδέεται άμεσα με τους ενεργοποιητές της ινωδόλυσης και σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο [Selwyn, 2003]. Αυτό οδηγεί σε απώλεια σύνδεσης της πλασμίνης με τον tPA και αναστολή της ινωδόλυσης. Φυσιολογικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν t-PA, αλλά η ύπαρξη της αγγειοτασίνης ΙΙ αυξάνει την παραγωγή PAI-1 και ταυτόχρονα μειώνει την παραγωγή του t-PA μέσω αύξησης του καταβολισμού της βραδυκινίνης [Levin 1997].

1.3.1.4. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

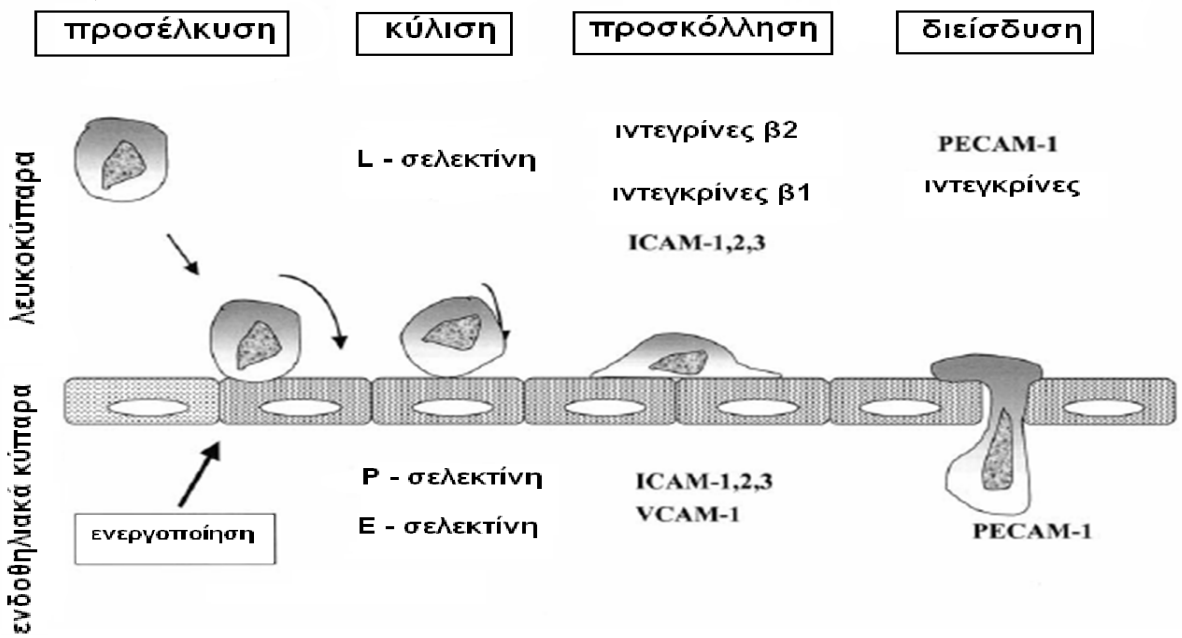
Το αγγειακό ενδοθήλιο παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απάντηση και γι' αυτό το λόγο φαίνεται ότι επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αθηρωμάτωση. Σε περιοχές φλεγμονής το ενδοθήλιο ευνοεί τη μεταφορά λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό χώρο. Η παρουσία ενδοτοξινών, ή κυττοκινών στο σημείο της φλεγμονής π.χ. ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) από διάφορους τύπους κυττάρων όπως π.χ. λεμφοκύτταρα ή μακροφάγα, ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ώστε να εκφράσουν υποδοχείς που θα διευκολύνουν την κίνηση των

λευκοκυττάρων [Russo 2002, Behrent 2002]. Πιο συγκεκριμένα επάγουν τη σύνθεση μορίων προσκόλλησης (ανοσογλοβίνες) (cellular adhesion molecules-CAMs) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα μόρια είναι το ενδοθηλιακό μόριο σύνδεσης λευκοκυττάρων τύπου 1 (Endothelium Leukocyte Adhesion Molecule-1, ELAM-1), το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης -1 (Intracellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1) [Ridker 1998] και το αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1) [Anderson 2004]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση των μορίων προσκόλλησης ελέγχονται από τον πυρηνικό παράγοντα NF-κβ [Behrent 2002].

Περιληπτικά, η είσοδος των λευκοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής περιλαμβάνει 3 στάδια: προσέλκυση, προσκόλληση και διείσδυση των λευκοκυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο. Η αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων με το ενδοθήλιο γίνεται με τις σελεκτίνες οι οποίες είναι τριών ειδών (Kunkel 1998). Τα λευκοκύτταρα διαθέτουν L-σελεκτίνη, τα ενδοθηλιακά Ε-σελεκτίνη ενώ η Ρ-σελεκτίνη βρίσκεται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια γίνεται η προσκόλληση με τη βοήθεια χημειοκινών (πρόκειται για κυτοκίνες με ισχυρή χημειοτακτική ιδιότητα) και των ιντεγκρινών οι οποίες είναι διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί υποδοχείς που εκτός από τη μεταγωγή μηνυμάτων συμμετέχουν και στη σύνδεση των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ορισμένες από τις ιντεγκρίνες που συμμετέχουν είναι η LFA-1 (lymphocyte function associated antigen) για τη σύνδεση με το μόριο ICAM-1 και η VLA4 (very late antigen) για τη σύνδεση με το VCAM-1 [Russo 2002]. Τέλος η διείσδυση των λευκοκυττάρων από τον αγγειακό στον υπενδοθηλιακό χώρο επιτυγχάνεται με τη δράση του μορίου προσκόλλησης αιμοπεταλίων/ενδοθηλίου (platelet/endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1). Εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, των μονοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των ενδοθηλιακών κυττάρων [Fukuda 2004]. Ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ ενδοθηλιακού PECAM-1 και λευκοκυτταρικού PECAM-1 διευκολύνουν και ολοκληρώνουν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής [Michiels 2003].

Βασικός παράγοντας της φλεγμονώδους διεργασίας είναι ο παράγοντας NF-κβ ο οποίος είναι όπως προαναφέρθηκε ο ρυθμιστής της παραγωγής μορίων προσκόλλησης και κατά συνέπεια της προσέλκυσης λευκοκυττάρων. Το βασικότερο ερέθισμα για την ενεργοποίηση του είναι το ενδοαγγειακό οξειδωτικό στρες [Au-Yeung 2004], ενώ

ανασταλτικό ρόλο στη έκφρασή του παίζει το NO. Επομένως, εκτός των άλλων ιδιοτήτων του, το NO μειώνει εμμέσως και την προσέλκυση των λευκοκυττάρων και κατά συνέπεια τη φλεγμονή.



Σχήμα 2. Αλληλεπίδραση λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. [Blankenberg 2003]. ICAM (Intracellular Adhesion Molecule): διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule): αγγειακό μόριο προσκόλλησης, PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule): μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίων/ενδοθηλίου.

1.3.2. ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηρίζεται από την απώλεια ενός ή περισσότερων λειτουργιών των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι λειτουργίες αυτές σχετίζονται με τη φλεγμονή, την πήξη, τη μετανάστευση και αύξηση κυττάρων και την ικανότητα των αγγείων να μεταβάλλουν τη διάμετρό τους ρυθμίζοντας τη ροή του αίματος και την πίεση. Επομένως, είναι φανερό ότι η οποιαδήποτε διαταραχή σε μια από αυτές τις λειτουργίες είναι ιδιαιτέρως σοβαρή και επηρεάζει σε μέγιστο βαθμό την καρδιαγγειακή λειτουργία. Για αυτό το λόγο η αξιολόγηση της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου έχει προγνωστική αξία καθώς σχετίζεται με την πιθανότητα εμφάνισης καρδιοαγγειακών νοσημάτων [Wilansky 2003, Quyyumi 2003].

Εδώ και αρκετές δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ότι η ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης η οποία είναι ένα είδος ενδοθηλιακής βλάβης συνδέεται τόσο με διαταραχές στη δομή και οργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, όσο και στην λειτουργία τους [Cohen 1995]. Επίσης είναι δυνατό να παρουσιάζεται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε πολύ πρώιμα στάδια αθηροσκλήρυνσης, προτού εκδηλωθούν κλινικά σημεία της νόσου και προτού εμφανιστούν αγγειακές αλλοιώσεις υπερηχογραφικά, εφόσον υπάρχει οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου ή σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [Balletshofer 2000, Clakson 1997]. Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία παρατηρείται και σε συνδυασμό με τους κυριότερους προδιαθεσικούς παράγοντες καρδιαγγειακής νόσου, όπως η υπερχοληστεριναιμία, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η γήρανση, το κάπνισμα, η έλλειψη οιστρογόνων, καθώς και με γενετικές διαταραχές, όπως η υπερομοκυστεϊναιμία και η οικογενής υπερχοληστεριναιμία [Celermajer 1994 και 1994a, Gilligan 1994, Johnstone 1993, McVeigh 1996, Panza 1993, Sorensen 1998, Willians 1996, Woo 1997].

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία όμως, μπορεί να προκληθεί και σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, μετά από βραχυπρόθεσμη επίδραση επιβαρυντικών παραγόντων, όπως είναι το κάπνισμα [Lekakis 1997]. Μάλιστα το κάπνισμα εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς έχει πάρει μεγάλες διαστάσεις σήμερα, ενώ η παρατηρούμενη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μετά το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκαλεί αυξημένο κίνδυνο στους βαρείς καπνιστές. Εκτός αυτού, η μείωση της FMD (Flow – Mediated – Dilatation) που είναι δείκτης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας έχει παρατηρηθεί και σε υγιείς μη καπνιστές όταν κάπνισαν ένα τσιγάρο [Lekakis 1997, 1998] και η δυσλειτουργία αυτή διατηρήθηκε μέχρι και 60 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος. Η μείωση αυτή της FMD έχει παρατηρηθεί όχι μόνο στους χρόνιους [Celermajer 1993], αλλά και στους παθητικούς καπνιστές [Celermajer 1996]. Καταλαβαίνει λοιπόν κανείς ότι ένας καπνιστής ο οποίος καπνίζει ένα τσιγάρο 15 ή 30 λεπτά μετά το τέλος του προηγούμενου, βρίσκεται σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχεδόν όλο το διάστημα της ημέρας. Άλλωστε υπάρχουν αρκετές έρευνες in vitro που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω αύξησης της ενδοθηλίνης - 1 [Haak 1994], και μέσω οξειδωτικής καταστροφής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) [Murohara 1994] από ένα μεγάλο αριθμό ελευθέρων ριζών οι οποίες υπάρχουν στον καπνό [Church 1985]. Υπάρχει όμως ακόμη μια ένδεια γνώσεων σχετικά με το μηχανισμό με τον οποίο το οξύ κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ενώ η διαπίστωση ότι η χρήση συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών ουσιών σε χρόνιους καπνιστές οδήγησε σε βελτίωση της

FMD [Reilly 1996, Heitzer 1996, Raitakari 2000] δημιουργεί ερευνητικά ερωτήματα και σκέψεις για πιθανή αναστροφή της ενδοθηλιακής λειτουργίας μέσα από στοιχεία της διατροφής.

Σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης, ενώ τόσο η αθηρογένεση, όσο και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προκαλούνται από πολλούς παράγοντες, που όλοι όμως αφορούν στη μεγαλύτερη πλειοψηφία τους τη διαταραχή του μεταβολισμού του NO [Cohen 1995, Quyyumi 1998]. Πιο συγκεκριμένα η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, φαίνεται ότι σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή και δραστηριότητα του NO, ή με αυξημένη καταστροφή του μέσω κάποιων συγκεκριμένων διεργασιών [Cohen 1995, Quyyumi 1998]. Οι διεργασίες αυτές είναι οι εξής:

1. ***Αυξημένο οξειδωτικό stress***. Η αυξημένη παραγωγή ή η μειωμένη απομάκρυνση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (και κυρίως ριζών υπεροξειδίου), προκαλεί καταβολισμό και αδρανοποίηση του NO σε περοξυνιτρίτη (ισχυρή οξειδωτική ουσία), αλλά και υποβάθμιση της δραστηριότητας της eNOΣ οπότε περαιτέρω μείωση της παραγωγής NO.

2. ***Αυξημένη παραγωγή αγγειοσυσταλτικών ουσιών*** (εικοσανοειδή, ενδοθηλίνη, αγγειοτασίνη ΙΙ) που ασκούν αντίθετη βιολογική δράση από το NO και μειώνουν την αποτελεσματικότητά του στα κύτταρα στόχους

3. ***Μείωση της διαθεσιμότητας συμπαραγόντων της eNOΣ,*** όπως της τετραϋδροβιοπτερίνης που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της παραγωγής NO.

4. ***Διαταραχή της οδού μετάδοσης του ερεθίσματος ενεργοποίησης της eNOΣ,*** που σχετίζεται με G-πρωτεΐνες, από αγωνιστές όπως η βραδυκινίνη και η ακετυλοχολίνη.

5. ***Διέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης C***, που εμποδίζει την ενδοκυττάρια αύξηση του ασβεστίου μετά από διέγερση ενδοθηλιακών υποδοχέων και αναστέλλει άμεσα τη NOΣ.

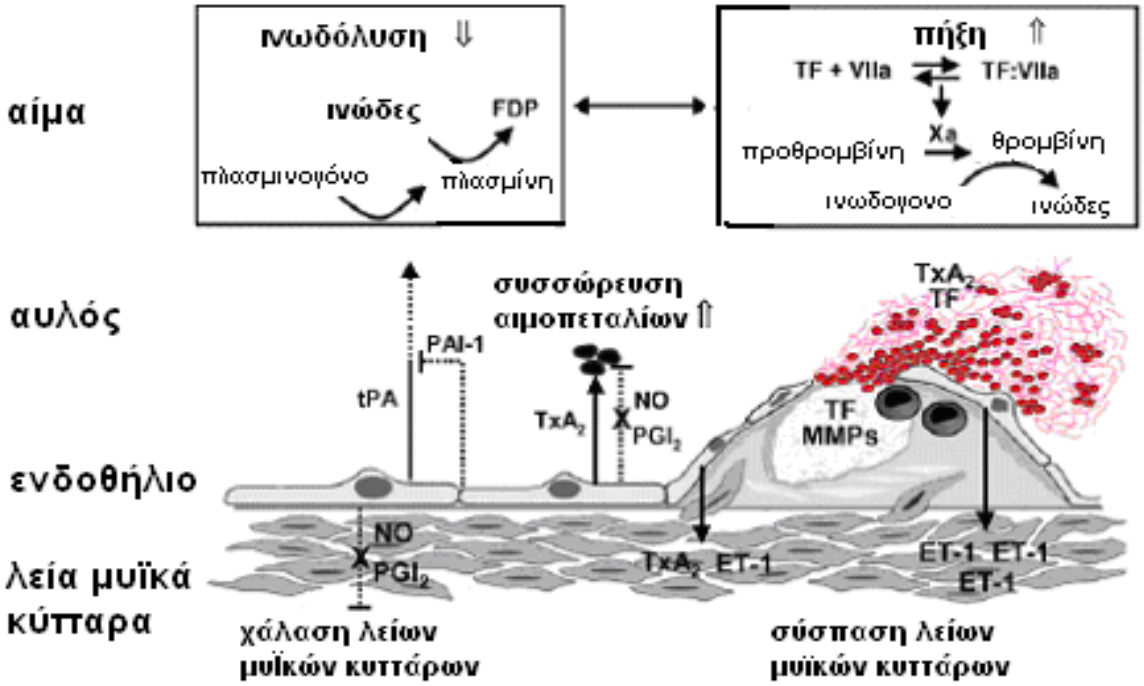
Σε γενικές γραμμές είναι φανερό πως ένας μεγάλος αριθμός ανεξάρτητων παραγόντων μπορεί να επηρεάσει την ομαλή ενδοθηλιακή λειτουργία με σοβαρές συνέπειες. Η ομαλή ενδοθηλιακή λειτουργία, διατηρώντας την ομοιοστασία των αγγείων σε θέματα ελαστικότητας και ρύθμισης της πίεσης και της αιματικής κυκλοφορίας, αναστολής της φλεγμονώδους διαδικασίας, των θρομβώσεων και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων,

είναι ένας πολύτιμος σύμμαχος ενάντια στη αθηρωσκλήρυνση και τις συνέπειές της. Η απώλεια της ακεραιότητας της ενδοθηλιακής λειτουργίας φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο σε όλα τα στάδια της αθηρωματικής διαδικασίας από το σχηματισμό των λιπωδών ραβδώσεων έως τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας [Behrent 2002].

1.4. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Η αθηροσκλήρυνση μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ειδικός τύπος χρόνιας φλεγμονής [Huo 2001]. Η αρχή της δημιουργίας αθηρωματικών αλλοιώσεων περιλαμβάνει τη φλεγμονώδη απόκριση σε τροποποιημένα λιπίδια τα οποία εισήλθαν στον υπενδοθηλιακό χώρο. Συγκεκριμένα τα μόρια της LDL λιποπρωτεΐνης (ιδιαίτερα τα μικρά, πυκνά σε χοληστερόλη και ιδιαίτερα διεισδυτικά) διαπερνούν την ενδοθηλιακή στοιβάδα και εισέρχονται στο τοίχωμα του αγγείου. Εκεί τροποποιούνται σε μόρια προφλεγμονώδη τα οποία δίνουν το έναυσμα για την περαιτέρω φλεγμονώδη αντίδραση. Ουσιαστικά τα μόρια της LDL υφίσταται οξείδωση και η οξειδωμένη πλέον LDL οδηγεί στη τοπική έκκριση κυτοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων όπως MCP-1 και MCSF (διεγερτικοί παράγοντες των αποικιών μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων) καθώς και οι PDGF και IL-8. Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν στην έκφραση και σύνθεση των μορίων συγκολλήσεως των λευκοκυττάρων (PECAM-1, L-σελεκτίνες, ιντεγκρίνες) και του ενδοθηλίου (E- και P-σελεκτίνες, ICAM-1, VCAM1), τα οποία ευνοούν την περιστροφή και προσκόλληση των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου [Ross 1999] και στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο. Τα αθροιζόμενα λευκοκύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα προκαλούν πλήρη οξείδωση των LDL-λιποπρωτεϊνών, ενώ στη συνέχεια τα μονοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν τα οξειδωμένα μόρια της LDL και μετατρέπονται σε μακροφάγα και σε αφρώδη κύτταρα. Προϋπόθεση γι' αυτή την μετατροπή των μονοκυττάρων είναι η ύπαρξη στην επιφάνεια τους ενός εξειδικευμένου τύπου υποδοχέα γνωστό ως υποδοχέας-καθαριστής (scavenger-receptor) [Tamura 2004]. Τα τελευταία μαζί με ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα σχηματίζουν τις λιπώδεις ραβδώσεις [Ross 1999, Diaz 1997]. Η βλάβη που έχει ήδη δημιουργηθεί στο ενδοθήλιο οδηγεί στη έκκριση κυτταροκινών (TNFa, IL-1) από τα αφρώδη μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα, αλλά και από τα αιμοπετάλια τα οποία έχουν προσελκύσει τα μόρια προσκόλλησης και τελικά την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων (b-FGF, PDGF) με άμεση συνέπεια τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [Davies 2001]. Τα λεία αυτά μυϊκά

κύτταρα μαζί με τα αφρώδη κύτταρα οδηγούνται από τον λείο προς τον υπενδοθηλιακό χιτώνα του αγγείου, όπου συσσωρεύονται και σταδιακά σχηματίζουν στην επιφάνειά τους ινώδη κάψα δημιουργώντας την αθηρωματική πλάκα. Στη συνέχεια με την αύξηση της συσσώρευσης των κυττάρων και την αύξηση της αθηρωματικής πλάκας σταδιακά μειώνεται ο αυλός του αγγείου και είτε αποφράζεται πλήρως, είτε διαρρηγνύεται προκαλώντας θρόμβωση σε κάποιο αγγείο [Braun 1999].



Σχήμα 3. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία κατά την αθηρωμάτωση. [Vilez – Gonzalez 2004]. FDP: προϊόν αποδόμησης του ινώδους, TF: ιστικός παράγοντας, tPA: ενεργοποιητής πλασμινογόνου των ιστών, PAI – 1: αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, TxA2: θρομβοξάνη A2, NO: μονοξείδιο του αζώτου, PGL2: προσταγλανδίνη 2, MMPs: μεταλοπρωτεϊνάσες, ET – 1: ενδοθηλίνη 1.

Είναι κατανοητό ότι κομβικά σημεία στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης είναι τα αυξημένα επίπεδα LDL λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα των μικρών και πυκνών υποκλασμάτων τους, αλλά και το αυξημένο οξειδωτικό στρες στον ενδοαγγειακό χώρο [Laroia 2003]. Επηρεάζοντας τους παράγοντες αυτούς, αλλά και τους άλλους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης: υπέρταση, υπερομοκυστεϊναιμία, διαβήτη, χαμηλή HDL,

κάπνισμα κ.α., είτε με φάρμακα, αλλά κυρίως με αλλαγή του τρόπου ζωής και μάλιστα του τρόπου διατροφής, είναι δυνατό να επιβραδυνθεί ή και να αναχαιτιστεί η αθηρωματική διαδικασία και οι δυσάρεστες επιπλοκές της.

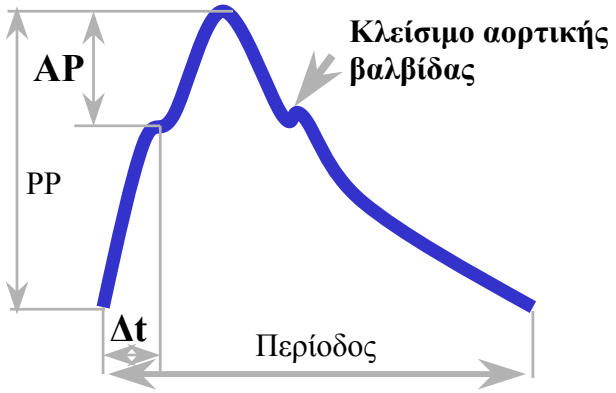
1.5. ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΣΚΛΗΡΙΑ

Για να γίνει κατανοητή η έννοια της αρτηριακής σκληρίας θα πρέπει πρώτα να κατανοηθεί η έννοια της κυκλοφορίας του αίματος και των μηχανισμών που την απαρτίζουν. Η κυκλοφορία του αίματος στον οργανισμό θεωρείται ως μια ελαστική δεξαμενή (μεγάλες αρτηρίες), μέσα στην οποία η καρδιά χτυπάει και από την οποία το αίμα ταξιδεύει στους ιστούς μέσα από σχετικά μη ελαστικούς αγωγούς (περιφερικές αρτηρίες). Η εκτόξευση του αίματος από την αριστερή κοιλία κατά τη συστολή της καρδιάς ξεκινάει ένα αρτηριακό κύμα πίεσης το οποίο ταξιδεύει προς την περιφέρεια. Σε σημεία όπου υπάρχει αντίσταση, κυρίως στα αρτηριόλια εμφανίζονται κύματα ανάκλασης [Oliver 2003]. Ως αποτέλεσμα των ανακλώμενων κυμάτων και των αλλοιωμένων ελαστικών ιδιοτήτων των αγγείων η κυματομορφή του κύματος της καρδιάς αλλοιώνεται. Από την κυματομορφή αυτή είναι δυνατό να μετρήσουμε διάφορους δείκτες όπως είναι η ταχύτητα με την οποία ταξιδεύουν τα κύματα παλμού (pulse wave velocity – PWV), ο δείκτης ενίσχυσης των κυμάτων αυτών (augmentation index – AIx), ο χρόνος με τον οποίο ταξιδεύει το κύμα μέχρι την περιφέρεια (Δt) τα οποία είναι ενδεικτικά της αρτηριακής σκληρίας [Safar 2003].

Η ελαστικότητα των κεντρικών μεγάλων αρτηριών είναι το αποτέλεσμα του υψηλού λόγου ελαστίνης προς κολλαγόνο στα τοιχώματά τους, ο οποίος σταδιακά μειώνεται προχωρώντας προς την περιφέρεια. Η μείωση της ελαστικότητας ή η αύξηση της σκληρίας η οποία εμφανίζεται με την αύξηση της ηλικίας είναι σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα της εκφύλισης των ελαστικών ινών [Oliver 2003]. Εκτός όμως από την περίπτωση της αυξημένης ηλικίας, η σκληρία ενός συγκεκριμένου αρτηριακού τμήματος δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από τη διαστολική πίεση, η οποία σε μεγάλο βαθμό προσδιορίζεται από τη μέση αρτηριακή πίεση [Safar 2003]. Για το λόγο αυτό κατά την εκτίμηση της αρτηριακής σκληρίας με εργαστηριακές μετρήσεις, γίνεται και προσδιορισμός της μέσης αρτηριακής πίεσης, ώστε τα αποτελέσματα της σκληρίας που μετρώνται να οφείλονται σε αλλοιώσεις της δομής του αγγείου και όχι σε διαφοροποιήσεις της πίεσης. Πέρα από τις ίνες κολλαγόνου

και ελαστίνης και την πίεση, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει η ενδοθηλιακή λειτουργία [Kinlay 2001, Wilkinson 2002] και ο όγκος του στρώματος των λείων μυϊκών κυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο [Bank 1996 και 1999], το οποίο με κάποιου βαθμού ενδοθηλιακό έλεγχο επηρεάζει την αγγειακή ελαστικότητα.

$$AIx = \frac{AP}{PP} \times 100$$



AP (mmHg): η ενίσχυση της κεντρικής πίεσης οφειλόμενη σε ανακλάσεις κυμάτων πίεσης

Δt (msec): εκφράζει το χρόνο που παρατηρείται η επιστροφή του ανακλώμενου κύματος (εξαρτάται από την ταχύτητα αγωγής)

Σχήμα 4. Κυματομορφή σφυγμικού κύματος

Η σχέση που συνδέει την αρτηριακή σκληρία και την ενδοθηλιακή λειτουργία έχει μελετηθεί από διάφορες έρευνες. Έχει βρεθεί ότι η αναστολή της έκκρισης NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνει την ταχύτητα των κυμάτων παλμού (PWV) σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους [Wilkinson 2002], αυξάνει το δείκτη ενίσχυσης των κυμάτων (AIx) [Wilkinson 2002a] και την αρτηριακή σκληρία γενικότερα [Kinlay 2001]. Αντίθετα, η ακετυλοχολίνη που είναι γνωστός αγγειοδιαστολέας μειώνει την αρτηριακή σκληρία [Wilkinson 2002]. Από την άλλη πλευρά έχει δειχθεί ότι διάφορες παρεμβάσεις με τις οποίες μειώνεται η αρτηριακή σκληρία (πχ αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου και στατίνες) βελτιώνουν ταυτόχρονα και την ενδοθηλιακή λειτουργία [Higashi 2001, Uehata 2001].

Έτσι σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι όσο δυσλειτουργεί το ενδοθήλιο, τόσο αυξάνεται η σκληρία των αγγείων, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτεί κανείς ότι τα τελευταία χρόνια θεωρείται ότι η ενδοθηλιακή λειτουργία έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία [Perticone 2001, Halcox 2002] για την εκτίμηση του κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η αξία και της αρτηριακής σκληρίας ως βαρύνουσας σημασίας για την καρδιαγγειακή παθοφυσιολογία. Η αορτική ταχύτητα των κυμάτων παλμού (PWV) και ο δείκτης ενίσχυσης των κυμάτων που είναι δείκτης της έντασης των κυμάτων ανάκλασης στη συστηματική κυκλοφορία (Aix), θεωρούνται πλέον ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου και προγνωστικοί δείκτες καρδιαγγειακών συμβαμάτων συμπεριλαμβανομένου και της θνητότητας [Safar 2003, Boutouyrie 2002, Webber 2004].

Κατανοεί λοιπόν κανείς ότι η εκτίμηση της αρτηριακής σκληρίας και η προσπάθεια για την αναστολή της είναι ιδιαιτέρως χρήσιμα για την ομαλή καρδιαγγειακή λειτουργία και τη μείωση του κινδύνου από αντίστοιχα νοσήματα.

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΣΚΛΗΡΙΑΣ

◘ **Αγγειοδιαστολή μέσω ροής (Flow – Mediated – Dilatation, FMD)**

Η μέθοδος FMD είναι μια αναίμακτη μέθοδος για τη μελέτη της ενδοθηλιακής λειτουργίας σε ανθρώπους, η οποία ξεκίνησε να εφαρμόζεται από τις αρχές της δεκαετίας του 90’ [Laurent 1990, Anderson 1989, Celermajer 1992, Sorensen 1995]. Πρόκειται για σχετικά εύκολη μέθοδο τόσο για το χειριστή όσο και για τον εξεταζόμενο και εφαρμόζεται στη βραχιόνιο αρτηρία, όπου ένα ερέθισμα προκαλεί στο ενδοθήλιο την έκκριση μονοξειδίου του αζώτου NO, προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Με υπερηχοτομογραφία στη βραχιόνιο αρτηρία είναι δυνατή η απεικόνιση της παραπάνω μεταβολής της διαμέτρου του αγγείου και στη συνέχεια η ποσοτική και ποιοτική εκτίμησή της, η οποία αποτελεί σημαντικό δείκτη της ενδοθηλιακής λειτουργίας του εξεταζόμενου.

Το ερέθισμα στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι η αύξηση της διατμητικής τάσης (shear stress) που ασκείται στα τοιχώματα του αγγείου και η FMD αποτελεί την ποσοστιαία αύξηση της αγγειακής διαμέτρου σαν αποτέλεσμα της αντίδρασης στην αύξηση του shear stress. Με άλλα λόγια η μέθοδος αυτή μπορεί να εκτιμήσει την ικανότητα του αγγείου να εκκρίνει NO το οποίο με τη σειρά του είναι ένα σημαντικό δείγμα της σωστής ενδοθηλιακής λειτουργίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι η εφαρμογή της μεθόδου με ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέα της συνθετάσης του NO οδηγεί σε ελάττωση έως εξαφάνιση της FMD [Pohl 1985, Joannides 1995].

Σύμφωνα με τις επίσημες οδηγίες για την πρακτική εφαρμογή της μεθόδου [Correti 2002], είναι απαραίτητος υπερηχοτομογράφος με αγγειολογικό πρόγραμα για απεικόνιση δύο διαστάσεων (2D) και έγχρωμο, φασματικό Doppler με κεφαλή γραμμικής απεικόνισης συχνότητας από 7 έως 12 MHz για ικανοποιητικές απεικονίσεις επιφανειακών αγγείων. Επίσης είναι απαραίτητη η παράλληλη παρακολούθηση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος με αντίστοιχα ηλεκτρόδια, αφού οι μετρήσεις της διαμέτρου του αγγείου γίνονται σε συγκεκριμένη στιγμή του καρδιακού κύκλου που είναι η τελοδιαστολική φάση (το έπαρμα R του ηλεκτροκαρδιογραφήματος).

Σε όλη τη διάρκεια της εξέτασης (περίπου 15 λεπτά), ο ασθενής βρίσκεται ξαπλωμένος σε άνετη θέση. Με τη βοήθεια του υπερηχοτομογράφου προσδιορίζεται ένα αγγειακό τμήμα της βραχιονίου αρτηρίας το οποίο μεγεθύνεται κατάλληλα έτσι ώστε να είναι ορατή η διαβάθμιση των αγγειακών τοιχωμάτων. Μετά την αρχική μέτρηση της διαμέτρου ηρεμίας η οποία μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την απόσταση των δύο γραμμών που διαχωρίζουν το μέσο χιτώνα από τον έξω ή ορογόνο χιτώνα ηρεμίας, προσαρμόζεται αποφρακτική περιχειρίδα σφυγμομανομέτρου 8cm κοντά στον καρπό η οποία με πίεση 250-300mmHg και πάντοτε 50mmHg πάνω από τη συστολική πίεση, προσωρινά διακόπτει την αρτηριακή κυκλοφορία στην περιφέρεια για 4,5 λεπτά [Lesson 1997]. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα διακόπτεται η απόφραξη αυξάνοντας έτσι την αρτηριακή κυκλοφορία (αντιδραστική υπεραιμία). Γίνεται καταγραφή της αρτηριακής ροής πριν και μετά την άρση της περίδεσης, όπου παρατηρείται μια κατακόρυφη άνοδος σε επίπεδα περίπου 5πλάσια ή και περισσότερο σε σχέση με τη βασική ροή ηρεμίας. Η εικόνα του αγγείου επίσης καταγράφεται σε όλο το διάστημα ξεκινώντας 30 δευτερόλεπτα πριν την άρση της περίδεσης έως και 2 λεπτά μετά,

ενώ έχει βρεθεί ότι η μεγαλύτερη αύξηση της διαμέτρου της βραχιονίου παρατηρείται περίπου 60 έως 90 δευτερόλεπτα μετά την άρση του ισχαιμικού ερεθίσματος [Uehata 1997,Vogel 2000]. Το FMD είναι ουσιαστικά η ποσοστιαία επί της εκατό μεταβολή της αρτηριακής διαμέτρου μετά την άρση της περίδεσης. Στη συνέχεια και αφού περιμένουμε τουλάχιστον για 10 λεπτά μετά την τελευταία αντιδραστική υπεραιμία, πραγματοποιείται νέα μέτρηση ηρεμίας και ακολούθως χορηγούνται 0.4mg τρινιτρικής γλυκερίνης υπογλώσσια. Εφαρμόζεται ξανά η μέθοδος και γίνεται μια τελευταία μέτρηση έτσι ώστε να υπολογιστεί η μη ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (Nitrate – Mediated – Dilatation, NMD). Με τη μέθοδο αυτή και γνωρίζοντας ότι η τρινιτρική γλυκερίνη λειτουργεί ως δότης NO επιτυγχάνουμε τον έλεγχο της λειτουργίας των λείων μυϊκών ινών εφόσον υπάρχει επαρκής ποσότητα NO μέσα από μια δοκιμασία που στην ουσία παρακάμπτει την ενδοθηλιακή παραγωγή του NO και προκαλεί μη ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή [Ducharme 1999]. Με άλλα λόγια με την τελευταία αυτή μέτρηση ελέγχουμε εάν το αγγείο διατηρεί τη λειτουργικότητά του και έχει την ικανότητα αγγειοδιαστολής εφόσον υπάρχει αγγειοδιασταλτική ουσία (NO). Έτσι με την FMD, όσο και με την NMD ελέγχουμε τόσο την ικανότητα του αγγείου να εκκρίνει NO μετά από κατάλληλα ερεθίσματα, όσο και την ικανότητά του να διαστέλλεται όταν υπάρχουν αγγειοδιασταλτικές ουσίες, λειτουργίες οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για την ακέραια ή μη ενδοθηλιακή λειτουργία.

Κλινική σημασία FMD

Η ικανότητα της μεθόδου σχετικά με την πρόβλεψη του κινδύνου από καρδιαγγειακά επεισόδια έχει απασχολήσει έντονα τον επιστημονικό κόσμο. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι σε αρκετές περιπτώσεις η FMD έχει προβλεπτική ικανότητα για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αφού πρόκειται για μια απλή και κυρίως αναίμακτη μέθοδο [Correti 2002]. Θεωρείται ότι η FMD μπορεί να προβλέψει μελλοντικά συμβάματα σε υγιείς οι οποίοι εμφανίζουν προκάρδιο άλγος και υποβάλλονται σε στεφανιογραφία [Neunteufl 2000], ενώ ταυτόχρονα καθορίστηκε ότι FMD<10% σχετίζεται με αυξημένα καρδιαγγειακά συμβάματα. Επίσης θεωρείται ότι έχει προγνωστικές ιδιότητες και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [Heitzer 2001], ενώ έχει αποδειχθεί ότι η FMD αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα πρόγνωσης μελλοντικών συμβαμάτων σε στεφανιαίους ασθενείς συγκριτικά με τη δοκιμασία κόπωσης και βιοχημικούς παράγοντες [Correti 2002]. Παρομοίως η ικανότητα της FMD ως προγνωστικού παράγοντα έχει αποδειχθεί σε ασθενείς

με υπέρταση [Perticone 2001], αλλά και σε ασθενείς με περιφερική αγγειοπάθεια [Gokce 2002, 2003].

Εξάλλου είναι σημαντικό το γεγονός ότι το ενδοθήλιο θεωρείται ότι είναι ένας σημαντικός δείκτης της συνολικής αγγειακής υγείας που εκφράζει την συνισταμένη της αλληλεπίδρασης όλων των παραγόντων κινδύνου σε συνδυασμό με τους αμυντικούς μηχανισμούς [Vita 2002]. Επίσης, έχει τεκμηριωθεί το γεγονός ότι υπάρχει στενή συσχέτιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας της βραχιόνιας αρτηρίας όπως εκφράζεται από την FMD με την αντίστοιχη στεφανιαία ενδοθηλιακή λειτουργία [Anderson 1995]. Με άλλα λόγια, εφαρμόζοντας μια απλή και αναίμακτη μέθοδο είναι δυνατό να απεικονίσουμε τη συνολική ενδοθηλιακή λειτουργία του σώματος και ιδιαίτερα τη στεφανιαία ενδοθηλιακή λειτουργία η οποία είναι και η πλέον σημαντική. Είναι όμως απαραίτητο η προγνωστική αυτή ικανότητα της μεθόδου να τεκμηριωθεί σε μεγαλύτερους πληθυσμούς υψηλού ή ακόμη και χαμηλότερου καρδιαγγειακού κινδύνου όπου δεν υπάρχουν ακόμη ερευνητικά αποτελέσματα [Quyyumi 2003].

Περιορισμοί της μεθόδου

Ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς της μεθόδου είναι τα πιθανά σφάλματα που μπορεί εύκολα να προκύψουν από έλλειψη τη μεταβλητότητα των μετρήσεων μέσα στο χρόνο και ανάμεσα σε διαφορετικούς χειριστές. Σύμφωνα με τις πρόσφατες συστάσεις για την εφαρμογή της FMD η διακύμανση μέσα στο χρόνο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 2-3%, ενώ η διακύμανση-μεταβλητότητα μεταξύ χειριστών ή και στον ίδιο χειριστή σε επανειλημμένες μετρήσεις θα πρέπει να διατηρείται σε ποσοστά κάτω από 5% [Correti 2002]. Με βάση τους περιορισμούς αυτούς θεωρείται ότι η FMD θα πρέπει να μεταβάλλεται στις μελέτες τουλάχιστον κατά 2%, προκειμένου να μπορούμε να αποφανθούμε για σημαντικό κλινικό όφελος από κάποια θεραπεία [Sorensen 1995]. Φαίνεται λοιπόν ότι η μετρήσεις είναι επηρεαζόμενες σε μεγάλο βαθμό από τον χειριστή-παρατηρητή και για μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις έχει προταθεί η χρησιμοποίηση ειδικών προγραμμάτων σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές (Edge-detection softwares) τα οποία κάνουν αυτόματα τη μέτρηση της διαμέτρου και ελαττώνουν τη μεταβλητότητα που οφείλεται σε διαφορετικούς παρατηρητές [Faux 2003, Woodman 2001].

Εκτός όμως από το θέμα της μεγάλης προσοχής των χειριστών ως προς τις μετρήσεις, ένας μεγάλος αριθμός άλλων παραγόντων φαίνεται ότι επηρεάζει τις σωστές και ακριβείς μετρήσεις της FMD, οι οποίοι θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψιν κατά το σχεδιασμό ερευνητικών πρωτοκόλλων. Σ'αυτούς τους παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η θερμοκρασία, η φαρμακευτική αγωγή με αγγειοδραστικά φάρμακα, η λήψη τροφής, η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος κ.α. Έτσι θα πρέπει στους ασθενείς που θα εφαρμοστεί η μέθοδος να φροντίζεται να είναι νηστικοί και πιο συγκεκριμένα να μην έχουν λάβει γεύμα με υψηλά λιπαρά, βιταμίνη C καθώς και άλλα αντιοξειδωτικά για τουλάχιστον 8 έως 12 ώρες πριν τη μελέτη, να μην λάβουν ροφήματα με καφεΐνη και να μην έχουν καπνίσει τις τελευταίες 4 με 6 ώρες. Οι μετρήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ήσυχο χώρο (αφού ο ασθενείς έχει εγκλιματιστεί σε αυτόν για 30 περίπου λεπτά), με ελεγχόμενη και ίδια πάντοτε θερμοκρασία που είναι καλά ανεκτή και που κυμαίνεται μεταξύ 20 και 25^0C περίπου. Η φάση του καταμήνιου κύκλου φαίνεται επίσης να έχει σημασία για την FMD [Hashimoto 1995] και γι' αυτό οι ασθενείς γυναικείου φύλλου που συμμετέχουν σε ερευνητικές μελέτες με μετρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα, θα πρέπει να βρίσκονται πάντα στην ίδια φάση του κύκλου τους. Επίσης, η φαρμακευτική αγωγή αυτή θα πρέπει να διακοπεί τουλάχιστον για τέσσερις χρόνους ημίσειας ζωής πριν την εφαρμογή της μέτρησης [Celermajer 1994]. Τέλος έχει αναφερθεί ημερήσια διακύμανση της FMD με μεγαλύτερες τιμές τις απογευματινές ώρες και πλέον χαμηλές τις πρώτες πρωινές γεγονός που θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπόψιν [Kawano 2002].

Σε γενικές γραμμές η FMD παραμένει μέχρι σήμερα η καλύτερη αναίμακτη μέθοδος εκτίμησης ενδοθηλιακής λειτουργίας. Το γεγονός όμως ότι υπάρχουν ακόμη αρκετοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένες μετρήσεις δεν επιτρέπουν στη μέθοδο αυτή να καθιερωθεί σαν screening test σε πληθυσμούς με παράγοντες κινδύνου και γι' αυτό τείνει σήμερα να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλους δείκτες φλεγμονής ή οξειδωτικού stress κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο [Faux 2003].

- **<u>Τονομετρία</u>**

Η τονομετρία είναι μια αναίμακτη και σχετικά νέα μέθοδος με την οποία εκτιμάται η αρτηριακή σκληρία μέσω της ανάλυσης των κυματομορφών παλμού [Kelly 1989, Karamanoglou 1993]. Η κύρια αρχή της μεθόδου είναι αφενός ο σχηματισμός της

κυματομορφής της αορτικής πίεσης από την αντίστοιχη κυματομορφή της περιφερικής πίεσης με τις κατάλληλες μαθηματικές μετατροπές και αφετέρου ο προσδιορισμός της ενίσχυσης της κεντρικής αορτικής πίεσης εξαιτίας των ανακλώμενων κυμάτων πίεσης [Oliver 2003]. Οι μετρήσεις αυτές γίνονται με τη βοήθεια του τονομέτρου το οποίο είναι ένας αισθητήρας με τη μορφή στυλό και τη χρήση αντίστοιχου λογισμικού εγκατεστημένου σε ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος επίσης συνδέεται με τον αισθητήρα. Ουσιαστικά με τη μέθοδο αυτή αναλύεται η μορφή του σφυγμικού κύματος που καταγράφει ο αισθητήρας από την κερκιδική αρτηρία, ανάγεται σε σφυγμικό κύμα της αορτής και από τα χαρακτηριστικά της κυματομορφής προκύπτουν συμπεράσματα σχετικά με την πίεση (κεντρική και περιφερική), την αρτηριακή σκληρία και τις περιφερικές αντιστάσεις.

Η εφαρμογή της μεθόδου γίνεται πολύ απλά και σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Ο ασθενής προσέρχεται στο χώρο όπου γίνονται οι μετρήσεις και κάθεται σε άνετο και ήσυχο περιβάλλον για 15 – 30 λεπτά ώστε να εγκλιματιστεί και να σταθεροποιηθεί η πίεσή του. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της αρτηριακής του πίεσης με τη βοήθεια σφυγμομανομέτρου και ξεκινάει η τονομετρία. Η μέτρηση γίνεται στην κερκιδική αρτηρία και ο εξεταζόμενος θα πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης να κάθεται ακίνητος με το χέρι του τοποθετημένο σε ειδική θέση κοντά στον εξεταστή. Ο εξεταστής ακουμπάει ελαφρά το τονόμετρο στην κερκιδική αρτηρία, αφού προηγουμένως την έχει ψηλαφήσει και καταγράφει μια σειρά από ομοιόφορφες κυματομορφές σε διάστημα 1-2 λεπτών. Στη συνέχεια το λογισμικό αναλαμβάνει να αναλύσει με αντίστοιχους μαθηματικούς τύπους την καταγεγραμμένη κυματομορφή και να δώσει αποτελέσματα για την κεντρική αορτική πίεση (συστολική και διαστολική), την ταχύτητα των κυμάτων παλμού (PWV), το δείκτης ενίσχυσης των κυμάτων αυτών (AIx) και το χρόνο με τον οποίο ταξιδεύει το κύμα μέχρι την περιφέρεια (Δt).

Κλινική σημασία της τονομετρίας

Η σημασία της μεθόδου έχει πρόσφατα αναγνωριστεί, καθώς πρόκειται για μια αναίμακτη μέθοδο, ιδιαίτερα απλή και σύντομη, η οποία φαίνεται ότι έχει μεγάλη αξία για την πρόγνωση των μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η αορτική ταχύτητα των κυμάτων παλμού (PWV) και ο δείκτης ενίσχυσης των κυμάτων που είναι δείκτης της έντασης των κυμάτων ανάκλασης στη συστηματική κυκλοφορία (Aix), θεωρούνται πλέον ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου και προγνωστικοί

δείκτες καρδιαγγειακών συμβαμάτων συμπεριλαμβανομένου και της θνητότητας [Safar 2003, Boutouyrie 2002, Webber 2004].

Περιορισμοί της μεθόδου

Τέλος θα πρέπει να τονιστεί ότι η τονομετρία έχει κάποιους σημαντικούς περιορισμούς οι οποίοι παίζουν πολύ μεγάλο ρόλο για την ορθότητα των μετρήσεων. Εξαρτάται από το ύψος, το βάρος, την ηλικία και το φύλλο του ασθενούς και για το λόγο αυτό, πριν από κάθε μέτρηση, οι παράμετροι αυτοί θα πρέπει να προσδιορίζονται και να καταγράφονται με ακρίβεια. Πολύ σημαντικό ρόλο παίζει όμως και η θερμοκρασία του χώρου στον οποίο γίνονται οι μετρήσεις (θα πρέπει να είναι σταθερή μεταξύ 20 – 25^{0}C), αλλά και ο καλός εγκλιματισμός του ασθενούς σε αυτό. Τόσο η θερμοκρασία, όσο και το στρες της εξέτασης μπορεί να επηρεάζουν την αρτηριακή πίεση του εξεταζόμενου και αυτή με τη σειρά της τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Κυρίως όμως θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο να καθίσει ο ασθενής στην καρέκλα που θα εξεταστεί και να ηρεμήσει για 15 – 30 λεπτά, έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί η πίεσή του (η οποία θα επηρεάσει την εξέταση) και να συνηθίσει το περιβάλλον παραμένοντας ήρεμος [Oliver 2003].

Ακόμη η λήψη τροφής και το κάπνισμα φαίνεται ότι παίζουν μεγάλο ρόλο καθώς επηρεάζουν τις μετρήσεις. Σχετικά με τη διατροφή, έχει βρεθεί ότι τροφές όπως είναι ο καφές, το κόκκινο κρασί, ή τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες είναι δυνατό να επηρεάσουν τη σκληρία των αγγείων μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα ή και αμέσως μετά τη λήψη τους [Tanaka 2005] και για το λόγο αυτό ο εξεταζόμενος θα πρέπει να προσέρχεται νηστικός προκειμένου να πραγματοποιήσει τη μέτρηση. Από την άλλη πλευρά το κάπνισμα έχει βρεθεί ότι επιδρά αρνητικά στη σκληρία των αγγείων αφού βρέθηκε ότι οι καπνιστές έχουν αυξημένη αρτηριακή σκληρία συγκριτικά με μη καπνιστές [Mahmud 2003]. Ακόμη έχει βρεθεί ότι το κάπνισμα από ένα τσιγάρο μπορεί να αυξήσει την αρτηριακή σκληρία (μέσω αύξησης της ταχύτητας των κυμάτων παλμού) μέχρι και 2 ώρες μετά το τέλος του καπνίσματος [Vlachopoulos 2004], ενώ παρόμοια αποτελέσματα φαίνεται ότι παρουσιάζονται και κατά το παθητικό κάπνισμα [Barnoya 2005]. Βέβαια δεν έχει βρεθεί κάποιος μηχανισμός με τον οποίο να εξηγείται η επίδραση αυτή του καπνίσματος στην αρτηριακή σκληρία, γεγονός ιδιαίτερα ενδιαφέρον προς διερεύνηση.

Συμπερασματικά, αυτό που μπορεί να ισχυριστεί κάποιος για την τονομετρία είναι ότι πρόκειται για μια ιδιαίτερα απλή και εύκολη μέθοδο με σημαντικές μετρήσεις ως προς τη λειτουργικότητα των αγγείων. Είναι όμως απαραίτητες αρκετές έρευνες οι οποίες να διερευνούν περισσότερο την προγνωστική αξία της μεθόδου σε μεγαλύτερο φάσμα ασθενών, αλλά και υγιών ατόμων.

1.7. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ

Τα τελευταία χρόνια έχει κινήσει το ενδιαφέρον μεγάλης μερίδας ερευνητών η πιθανή σχέση της διατροφής με τη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου και αυτό γιατί απ' τη μία πλευρά η ενδοθηλιακή λειτουργία φαίνεται ότι έχει μείζονα ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη των καρδιαγγειακών νοσημάτων και απ' την άλλη έχει παρατηρηθεί ότι ολοένα και περισσότερα θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν τη λειτουργία των αγγείων, κυρίως μέσω της έκκρισης μονοξειδίου του αζώτου (NO), αλλά και με άλλους εξίσου σημαντικούς μηχανισμούς [Cuevas 2004, Wu 2002].

Η ρύθμιση της παραγωγής NO από τα διάφορα συστατικά της τροφής έχει πολύ μεγάλη σημασία, καθώς η ουσία αυτή πέρα από το γεγονός ότι αποτελεί την κυριότερη αγγειοδιασταλτική ουσία του ενδοθηλίου, είναι παράλληλα υπεύθυνη και για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του. Έτσι, η παραγωγή NO οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και ρύθμιση του αγγειακού τόνου, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει τη συγκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, μειώνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [Behrent 2002]. Με άλλα λόγια η έκκριση NO αποτελεί κομβικό σημείο ελέγχου των φλεγμονωδών διεργασιών των αγγείων, των θρομβώσεων και των αγγειακών τραυματισμών που αναμφίβολα αποτελούν κύρια σημεία της αθηρωματικής διαδικασίας που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Σήμερα, μετά από πληθώρα ερευνών σχετικά με τη διατροφή και την ενδοθηλιακή λειτουργία, έχει βρεθεί μεγάλος αριθμός θρεπτικών συστατικών τα οποία αποδεδειγμένα επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αγγείων. Καλύτερα μελετημένη και ίσως και η σημαντικότερη είναι η επίδραση του λίπους της διατροφής και των επιμέρους λιπαρών

οξέων στο αγγειακό δίκτυο [DeCaterina 2000]. Εκτός όμως από αυτά και άλλα θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες των τροφίμων, η αιθανόλη, η καφεΐνη, τα λεγόμενα φυτοοιστρογόνα και αρκετά άλλα στοιχεία της διατροφής παίζουν το καθένα ξεχωριστό ρόλο στη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου [Wu 2002].

Όσον αφορά τους υδατάνθρακες, είναι δύσκολο να προταθεί ευθέως ότι έχουν ευεργετική δράση στα αγγεία, καθώς ο ρόλος τους είναι αρκετά πολύπλοκος. Σε γενικές γραμμές είναι γνωστό ότι ο καταβολισμός της γλυκόζης είναι μια κύρια πηγή παραγωγής NADPH, το οποίο με τη σειρά του αποτελεί βασική ουσία η οποία συμμετέχει στην παραγωγή NO [Wu 2001]. Άρα η καθημερινή πρόσληψη υδατανθράκων από τη διατροφή μπορεί να θεωρηθεί ότι εξασφαλίζει στον οργανισμό το απαραίτητο υπόστρωμα για την παραγωγή NO, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο δυνατή την ομαλή αγγειακή λειτουργία. Από την άλλη πλευρά όμως άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι η υπεργλυκαιμία που προκαλείται στον οργανισμό στη μεταγευματική φάση, οδηγεί σε οξεία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία η οποία σχετίζεται με αναστολή της έκκρισης NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [Chakravarthy 1998]. Τέλος, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η αυξημένη πρόσληψη φρουκτόζης από τη διατροφή εμποδίζει την αγγειακή χάλαση, γεγονός που υποδεικνύει αφενός την πολυπλοκότητα της σχέσης υδατανθράκων και ενδοθηλίου και αφετέρου την ελλιπή γνώση των επιμέρους μηχανισμών με τους οποίους επιδρούν οι υδατάνθρακες στη λειτουργικότητα των αγγείων [Wu 2002].

Αρκετά πιο πολύπλοκη είναι η σχέση των πρωτεϊνών και ιδιαίτερα των διαφόρων αμινοξέων, με την ενδοθηλιακή λειτουργία. Σε γενικές γραμμές, έρευνες σε πειραματόζωα κυρίως, έχουν δείξει ότι δίαιτα με πολύ μειωμένη πρόσληψη πρωτεϊνών (~5-6% της συνολικής ενέργειας) οδήγησε σε δυσλειτουργία των αγγείων συγκριτικά με δίαιτα πολύ υψηλή σε πρωτεΐνη (50% της ενέργειας). Θεωρείται ότι η επαρκής πρόσληψη πρωτεϊνών από τη δίαιτα εξασφαλίζει φυσιολογικές συγκεντρώσεις αργινίνης, η οποία είναι και βασικό υπόστρωμα για τη σύνθεση NO [Wu 2000]. Από την άλλη πλευρά η αυξημένη πρόσληψη ενός άλλου αμινοξέος της γλουταμίνης φαίνεται ότι οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ενώ ένα τρίτο αμινοξύ, η λυσίνη, ανταγωνίζεται την αργινίνη για την είσοδό τους στον ενδοκυττάριο χώρο με αποτέλεσμα η αυξημένη πρόσληψή της σε συνδυασμό με μειωμένη

πρόσληψη αργινίνης να οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα των αγγείων για διαστολή [Wu 2002]. Αν σε όλα αυτά προσθέσουμε και το στοιχείο ότι αυξημένη πρόσληψη μεθειονίνης και κατά συνέπεια η αυξημένη σύνθεση ομοκυστεϊνης προκαλεί μείωση της σύνθεσης NO, ενώ η αυξημένη πρόσληψη κιτρουλλίνης οδηγεί σε αύξηση του NO, καταλαβαίνει κανείς ότι δεν είναι δυνατό μόνο από το ολικό ποσό πρωτεϊνικής πρόσληψης να καταλήξει κανείς για την ευεργετική ή μη επίδρασή της στα αγγεία και ότι είναι απαραίτητο να υπάρχει προσδιορισμός της συγκέντρωσης των επιμέρους αμινοξέων [Wu 2000].

Για να κατανοήσει κανείς τη σχέση του λίπους της διατροφής με το ενδοθήλιο θα πρέπει να ασχοληθεί με τα επιμέρους λιπαρά οξέα, καθώς φαίνεται ότι η δράση τους στα αγγεία είναι αρκετά διαφορετική. Ιδιαίτερα ευεργετικά για την ενδοθηλιακή λειτουργία φαίνεται ότι είναι τα ω-3 λιπαρά οξέα, αφού φαίνεται ότι μειώνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο και ταυτόχρονα περιορίζουν τις αλληλεπιδράσεις των λευκοκυττάρων με αυτό, οπότε επιβραδύνουν την αθηρωματική διαδικασία η οποία σιγά-σιγά μειώνει τη λειτουργικότητα των αγγείων. Ακόμη, τα ω-3 λιπαρά οξέα και ιδιαίτερα το δοκοσαεξανοϊκό οξύ φαίνεται ότι αυξάνει την παραγωγή NO και συμβάλλει στη χάλαση των αγγείων [DeCaterina 2000]. Αντίθετα η επίδραση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στο ενδοθήλιο δεν είναι το ίδιο ευεργετική. Έχει δειχθεί ότι το ελαϊκό οξύ αναστέλλει την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με άμεσες συνέπειες στην ικανότητα των αγγείων να διαστέλλονται. Τέλος μεγάλη σημασία θα πρέπει να δοθεί και στην επίδραση της πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων. Είναι γνωστό ότι μια δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ολικής και LDL χοληστερόλης. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια την ενδοκυτταρική μετατόπιση και αδρανοποίηση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO και την αποσύνθεση του συστήματος Golgi των ενδοθηλιακών κυττάρων που οδηγεί σε μείωση της ενδογενούς σύνθεσης NO και κατά συνέπεια την ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Δεν θα πρέπει όμως να παραβλεφθεί και το γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα της LDL λιποπρωτεΐνης και η παρατεταμένη κυκλοφορία τους στο αίμα δημιουργούν τα λεγόμενα μικρά και πυκνά μόριά της, τα οποία είναι ιδιαίτερα διεισδυτικά στα τοιχώματα του αγγείου δίνοντας έτσι το έναυσμα για την αθηρωματική διαδικασία και σταδιακά την απώλεια όλων των φυσιολογικών λειτουργιών των αγγείων [Wu 2002, Brown 2001].

Αυτό που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η επίδραση του ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία, καθώς αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό της μεσογειακής διατροφής. Υπάρχουν όπως ήδη αναφέρθηκε κάποια στοιχεία σχετικά με τη δράση του ελαϊκού οξέος [DeCaterina 2000], όπως και για τη δράση της μεσογειακής διατροφής γενικότερα [Esposito 2004], όμως είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διερευνηθεί η δράση του ελαιολάδου στη λειτουργικότητα των αγγείων, καθώς τα στοιχεία γύρω από αυτό το θέμα είναι περιορισμένα. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι και το θέμα της οξείας μεταγευματικής επίδρασης του ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Από μελέτες οι οποίες ήδη έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται ότι η κατανάλωση ελαιολάδου προκαλεί δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και μείωση της FMD πιθανότατα λόγω της μεταγευματικής υπερτριγλυκεριδαιμίας που εμφανίζεται [Vogel 2000, Jagla 2001]. Παρατηρείται λοιπόν ότι το ελαιόλαδο το οποίο σύμφωνα με όλα τα δεδομένα αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευεργετικό τρόφιμο, αμέσως μετά την κατανάλωσή του προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στη λειτουργία των αγγείων. Οι μηχανισμοί που διέπουν το φαινόμενο αυτό δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι και για το λόγο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η περαιτέρω διερεύνησή τους.

Ως προς τις βιταμίνες αυτό που είναι γνωστό είναι ότι αρκετές βιταμίνες έχουν μελετηθεί ως ένα βαθμό και θεωρείται ότι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, το φυλλικό οξύ και η βιταμίνη A πιθανότατα αυξάνουν την ενδογενή σύνθεση του NO, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και βελτιώνοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία. Από την άλλη πλευρά είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι ίδιες βιταμίνες είναι δυνατό να μειώνουν την έκφραση του γονιδίων που κωδικοποιούν το NO οδηγώντας σε δυσλειτουργία των αγγείων σε επιμέρους ιστούς (π.χ. ήπαρ, νεφροί) ή και σε ολόκληρα συστήματα όπως το νευρικό σύστημα [Brown 2001].

Η συσχέτιση των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων της διατροφής με την ενδοθηλιακή λειτουργία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο, ενώ έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί ξεχωριστά για κάθε ένα απ' αυτά. Πιο αναλυτικά, η ύπαρξη Ca σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις θεωρείται ότι αυξάνει τη λειτουργικότητα των γονιδίων που εκφράζουν τη σύνθεση του NO και κατά συνέπεια την αγγειακή χάλαση. Επίσης η καλή βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου ρυθμίζει τη σύνθεση NO

και τα μειωμένα επίπεδα σιδήρου οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα αγγειοδιαστολής, ενώ ο αντίθετα ψευδάργυρος και ο χαλκός σε υψηλές συγκεντρώσεις μειώνουν την παραγωγή NO. Τέλος το μαγνήσιο σε υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι ενισχύει την ικανότητα διαστολής των αγγείων γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για τη ρύθμιση της πίεσης κυρίως [Alderton 2001].

Ένα μεγάλο και ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι της σχέσης διατροφής και ενδοθηλίου καλύπτουν οι διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται άφθονες στα τρόφιμα και ιδιαίτερα στα φρέσκα φρούτα και λαχανικά, αλλά και στο κόκκινο κρασί. Ο πολύ σημαντικός ρόλος τους έγκειται στο γεγονός ότι ουσιαστικά προστατεύουν το πολύ ευαίσθητο μόριο του NO από την καταστροφή [Andriambeloson 1997]. Είναι γνωστό το γεγονός ότι η ουσία αυτή αν και πολύ δραστική και εξαιρετικά σημαντική για τα αγγεία, είναι πολύ ευαίσθητη στη δράση των ελευθέρων ριζών και τελικά καταστρέφεται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα από την έκκρισή της στο αίμα. Οι διάφορες λοιπόν αντιοξειδωτικές ουσίες προστατεύουν το μόριο αυτό από τις ελεύθερες ρίζες και παρατείνουν τη διάρκεια παραμονής του στο αίμα. Επίσης, κάποιες από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού φαίνεται, από πειράματα *in vitro* κυρίως, ότι οδηγούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε παραγωγή NO [DeCaterina 2000, Andriambeloson 1997].

Τέλος, έχουν βρεθεί σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην αγγειακή λειτουργία και διάφορες άλλες ουσίες όπως είναι η καφεΐνη, η αιθανόλη και τα φυτοοιστρογόνα. Ξεκινώντας από τα τελευταία έχει φανεί πως η ομοιότητα της δομής των ουσιών αυτών με τις αντίστοιχες ορμόνες του σώματος επιφέρει και παρόμοια με αυτές αποτελέσματα στο ενδοθήλιο, δηλαδή καλή ενδοθηλιακή λειτουργία [Lissin 2000]. Αντίθετα, η καφεΐνη θεωρείται από την πλειοψηφία των μελετών ως αγγειοσυσπαστική ουσία, με αποτέλεσμα να διατυπώνεται αυτή τη στιγμή η υπόθεση ότι η αυξημένη κατανάλωση καφέ ίσως να οδηγεί μακροπρόθεσμα σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου [Nurminem 1999]. Τέλος, η επίδραση του αλκοόλ στα αγγεία παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον, καθώς η μικρή και παρατεταμένη πρόσληψη αιθανόλης θεωρείται ότι αυξάνει τη σύνθεση NO και οδηγεί σε αγγειοδιαστολή. Αντίθετα, μεγάλες δόσεις αιθανόλης είναι δυνατό να προκαλέσουν δυσλειτουργία των αγγείων, αφού θα πρέπει να σημειωθεί ότι το αλκοόλ είναι προοξειδωτική ουσία και σε

αυξημένες συγκεντρώσεις στο αίμα είναι δυνατό να προκαλέσει καταστροφή του NO και μείωση της αγγειοδιασταλτικής ικανότητας των αγγείων [Buemann 2002].

Ύστερα από όλα αυτά, είναι εύκολο να συμπεράνει κανείς ότι μέσα από τη διατροφή είναι δυνατό να τροποποιηθεί με διάφορους τρόπους και μηχανισμούς η ενδοθηλιακή λειτουργία. Κυρίως όμως, αυτό που ενδιαφέρει σε μεγαλύτερο βαθμό, είναι η διαπίστωση ότι ίσως μέσα από τη διατροφή να μπορέσουμε στο άμεσο μέλλον να βρούμε τρόπους ρύθμισης της λειτουργίας των αγγείων, ιδιαίτερα σε άτομα με ήδη βεβαρημένη ενδοθηλιακή λειτουργία όπως καπνιστές, διαβητικούς και ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

1.8. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΣΚΛΗΡΙΑ

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί από πληθώρα μελετών ότι οι διατροφικοί παράγοντες επηρεάζουν τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ τα τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι και η αρτηριακή σκληρία επηρεάζεται από τους παράγοντες αυτούς [Tanaka 2005].

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί διάφορα τρόφιμα και επιμέρους συστατικά της διατροφής τα οποία συσχετίζονται με μεταβολές στην αρτηριακή σκληρία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σκληρία των αγγείων φαίνεται να επηρεάζεται από στοιχεία της διατροφής όπως είναι το νάτριο, οι διάφορες αντιοξειδωτικές βιταμίνες και τα ω-3 λιπαρά οξέα.

Είναι γνωστό ότι το αυξημένο νάτριο στη διατροφή αυξάνει την αρτηριακή πίεση, γεγονός που αναμένεται να επηρεάζει αρνητικά και την αρτηριακή σκληρία. Μετά όμως από έρευνες σε άτομα με ευαισθησία και σε άτομα ανθεκτικά στο νάτριο, τα οποία κατανάλωναν δίαιτα πλούσια σε αυτό, φάνηκε ότι το νάτριο αυξάνει τα PWV και κατά συνέπεια την αρτηριακή σκληρία ανεξάρτητα από την πιθανή αύξηση της αρτηριακής πίεσης [Draaijer 1993].

Από την άλλη πλευρά μετά από μελέτες σχετικά με τις διατροφικές συνήθειες και την αρτηριακή σκληρία σε πληθυσμούς από χωριά ψαράδων ή κτηνοτρόφων στην Ιαπωνία και στην Αυστραλία, βρέθηκε ότι όσοι κατανάλωναν ψάρι είχαν χαμηλότερη αρτηριακή σκληρία [Hamazaki 1988, Wahlqvist 1989]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν αργότερα από πειράματα σε παχύσαρκους και διαβητικούς ασθενείς, όπου βρέθηκε ότι η πρόσληψη συμπληρωμάτων ω-3 λιπαρών οξέων σε ημερήσια βάση οδήγησε σε μείωση της σκληρίας των αγγείων των ασθενών αυτών [Nestel 1997].

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι παρόλο που η επίδραση του ελαιολάδου σε μακροχρόνια, αλλά και σε οξεία κατανάλωσή του έχει διερευνηθεί και έχει συσχετισθεί με τη λειτουργικότητα των αγγείων και την ενδοθηλιακή λειτουργία ειδικότερα [Cuevas 2004], δυστυχώς παρατηρεί κανείς ότι δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορές σχετικά με την πιθανή επίδρασή τους στην αρτηριακή σκληρία. Έτσι, δεν γνωρίζουμε καθόλου την πιθανή επίδραση της χρήσης ελαιολάδου στην καθημερινή μας διατροφή στη σκληρία των αγγείων και κυρίως δε γνωρίζουμε την αντίστοιχη πιθανή μεταγευματική επίδραση του ελαιολάδου στη σκληρία, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αφού το ελαιόλαδο προκαλεί μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία η οποία επιδεινώνει την αγγειακή λειτουργία [Vogel 2000]. Είναι λοιπόν σημαντικό να γίνουν αρκετές έρευνες σχετικά με δράση του ελαιολάδου στην αρτηριακή σκληρία, τόσο σε μακροχρόνια κατανάλωσή του, αλλά κυρίως στο οξύ μεταγευματικό στάδιο.

Σε ότι αφορά τις αντιοξειδωτικές βιταμίνες υπάρχουν στοιχεία κυρίως για τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E. από μελέτες για τη βιταμίνη C έχει φανεί ότι ακόμη και 6 ώρες μετά τη χορήγησή της σε υγιείς εθελοντές οδηγεί σε μείωση του AIx [Wilkinson 1999], ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μετά από 4 εβδομάδες χορήγησής της σε διαβητικούς ασθενείς [Mullan 2002]. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξε και μια άλλη έρευνα που έγινε με χορήγηση βιταμίνης E για 8 εβδομάδες σε υγιείς άνδρες και γυναίκες, όπου υπολογίσθηκε μείωση στην αρτηριακή σκληρία κατά 44% [Mottram 1999]. Παρόλ' αυτά δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά δεδομένα για να υποστηρίξει κάποιος ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων των βιταμινών αυτών είναι δυνατό να δράσει προληπτικά στη μείωση της σκληρίας και γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητος ακόμη μεγάλος αριθμός ερευνών.

θα πρέπει επίσης να σημειωθεί το γεγονός ότι η αρτηριακή σκληρία συνδέεται συνολικά με τη διατροφή και με ένα άλλο τρόπο και αυτός είναι το σωματικό βάρος. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται από μικρό δυστυχώς αριθμό μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί για διάστημα 4 – 16 εβδομάδων μόνο ότι μείωση της παχυσαρκίας συνδέεται με μείωση της σκληρίας των αγγείων και κατά προέκταση μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου [Toto – Moukoto 1986, Yamashita 1998, Balkestein 1999]. Φυσικά δεν μπορούν να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα από τόσο μικρό αριθμό μελετών και ιδιαίτερα από τόσο μικρό διάστημα παρέμβασης, όμως σίγουρα αποτελεί ένα ενδιαφέρον στοιχείο για μελλοντική διερεύνηση. Ακόμη υπάρχουν στοιχεία τα οποία φανερώνουν ότι η καθημερινή κατανάλωση φυτοοιστρογόνων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ίσως οδηγεί σε μείωση της αρτηριακής σκληρίας, αλλά αυτό είναι ένα θέμα το οποίο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση van der Schou 2002, Teede 2003].

Εκτός όμως από τα διάφορα στοιχεία της διατροφής και τον τρόπο διατροφής γενικότερα, έχουν βρεθεί κάποια συγκεκριμένα τρόφιμα τα οποία επηρεάζουν τη σκληρία.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση καφεΐνης στη μορφή χαπιού ή ροφήματος οδηγεί σε αύξηση του AIx 30 έως και 120 λεπτά μετά τη λήψη του τόσο σε υγιείς όσο και σε υπερτασικούς ασθενείς [Papaioannou 2004]. Οι αλλαγές αυτές δεν ήταν εμφανείς με τη χρήση καφέ χωρίς καφεΐνη, γεγονός που δείχνει πόσο σημαντικές επιδράσεις έχουν σε δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως είναι η αρτηριακή σκληρία, ροφήματα που αποτελούν την καθημερινή ρουτίνα του σύγχρονου ανθρώπου.

Ιδιαίτερη σημασία όμως παρουσιάζει και η δράση του κόκκινου κρασιού στην αρτηριακή σκληρία. Το κόκκινο κρασί φαίνεται ότι προκαλεί σημαντική μείωση στην αρτηριακή πίεση, στο PWV και στο AIx 30 έως 90 λεπτά μετά από την κατανάλωσή του, γεγονός που δεν παρατηρείται όταν καταναλώνεται κόκκινο κρασί χωρίς αλκοόλ, υποδεικνύοντας ότι το αλκοόλ είναι υπεύθυνο για αυτή τη δράση [Mahmud 2002]. Αντίθετα, όταν μελετάμε τη δράση του αλκοόλ σε μακροχρόνια κατανάλωσή του παρατηρούμε ότι κατανάλωση μεγαλύτερη από 210 γρ ανά εβδομάδα (~ 30 γρ ανά ημέρα) οδηγεί σε αύξηση της αρτηριακής συστολικής πίεσης συγκριτικά με όσους καταναλώνουν μικρότερες ποσότητες [Mahmud 2002]. Ακόμη έχει βρεθεί σε πληθυσμό μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ότι το PWV συσχετίζεται με την κατανάλωση αλκοόλ με μια καμπύλη σχήματος J,

γεγονός που δείχνει ότι όσο αυξάνεται η καθημερινή χρήση αλκοόλ πέρα από την ημερήσια πρόσληψη (~20 γρ ανά ημέρα) αυξάνεται η αρτηριακή σκληρία και ο κίνδυνος καρδιαγγειακών νοσημάτων [Sierksma 2004]. Δυστυχώς, αν και φαίνεται ότι το κόκκινο κρασί έχει σημαντική επίδραση στη σκληρία των αγγείων τόσο μετά από μακροχρόνια κατανάλωσή του, όσο και στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο, υπάρχει μόνο μία μελέτη γύρω από την οξεία επίδρασή του και τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης του [Mahmud 2002]. Είναι λοιπόν απαραίτητο, προκειμένου να βγάλουμε κάποια χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση που μπορεί να έχει η κατανάλωση ενός ποτηριού κόκκινου κρασιού στην αρτηριακή σκληρία και στις κεντρικές και περιφερικές πιέσεις ενός ατόμου, να πραγματοποιηθούν αρκετές σχετικές έρευνες. Με αυτό τον τρόπο θα διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης του κρασιού στη σκληρία σε οξύ μεταγευματικό στάδιο, θα γίνει η σύγκριση ανάμεσα στην οξεία και τη μακροχρόνια δράση του κρασιού που ενδεχομένως διαφέρουν και θα προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με το αν το αλκοόλ ή οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνα για τη δράση αυτή, ερωτήματα που μέχρι σήμερα παραμένουν αναπάντητα από τη διεθνή βιβλιογραφία.

1.9. ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει τα τελευταία χρόνια, ότι η κατανάλωση 20-30 γραμμαρίων αλκοόλ τη μέρα, συνδέεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθώς και της θνησιμότητας που συνοδεύει τις ασθένειες αυτές [Flesch 2001, deLorimier 2000]. Αν και έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί οι οποίοι ενδεχομένως εμπλέκονται ή υπεισέρχονται στον τρόπο δράσης του οινοπνεύματος, όπως η αύξηση της HDL, η μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και η αύξηση της ινωδόλυσης [Salovainen 1995], αρκετοί ερευνητές αποδίδουν αυτή την ευεργετική δράση στο κρασί και όχι στα άλλα αλκοολούχα ποτά [Foppa 2001]. Μάλιστα, η πειραματική σύγκριση της επίδρασης διαφόρων τύπων κρασιού στη λειτουργία του ενδοθηλίου, κατέδειξε ότι το κόκκινο κρασί που ωριμάζει σε ξύλινα βαρέλια και όχι τα άλλα είδη κρασιού είναι αυτό που παρουσιάζει ευεργετική δράση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων [Flesch 1998]. Αν και μέχρι σήμερα δεν υπάρχει σαφές συμπέρασμα σχετικά με το ποιο αλκοολούχο ποτό ασκεί μεγαλύτερη προστατευτική δράση, το κόκκινο κρασί φαίνεται να υπερέχει από τα άλλα είδη ποτών, αλλά και από τα άλλα είδη κρασιών,

πιθανότατα εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών που διαθέτει [Hertog 1995].

Οι διάφορες πολυφαινόλες που βρίσκονται στο κόκκινο κρασί, έχουν συσχετισθεί με μείωση του κινδύνου εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου [Knekt 1996, Rimm 1996, Herog 1997] με διάφορους μηχανισμούς όπως η μείωση της επιδεκτικότητας της LDL σε οξειδώσεις, ή μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων [Russo 2001], αλλά και η βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου [Giugliano 2000], η οποία όπως ήδη αναφέρθηκε παίζει μείζονα ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της αθηρωματικής διαδικασίας και της στεφανιαίας νόσου γενικότερα.

Επομένως φαίνεται ότι το κόκκινο κρασί έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει σε πολλά επίπεδα τη λειτουργία των αγγείων, τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης και τη στεφανιαία νόσο, γεγονός που αναπτύσσει το ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους δρα στα αγγεία.

- **Σύσταση του κρασιού**

Μέχρι σήμερα από την ανάλυση του κρασιού με τις πιο σύγχρονες τεχνικές χρωματογραφίας έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 500 συστατικά. Τα συστατικά αυτά είναι κατά κύριο λόγο νερό και ακολουθούν η αιθανόλη, οι διάφορες φαινόλες, σάκχαρα, διάφορα οξέα, αμινοξέα και αρκετές άλλες ουσίες σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (σχήμα 1), [Soleas 1997]. Φυσικά η ακριβής σύσταση και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών του κρασιού διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται, το χρόνο ωρίμανσης, τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, την περιοχή στην οποία αναπτύσσονται και από πολλούς άλλους παράγοντες [McDonald 1998]. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι κάθε κρασί που εξετάζεται έχει δική του σύσταση και η όποια ανάλυση των επιμέρους συστατικών του αφορά την πλειοψηφία των κρασιών ή το μέσο όρο των συγκεντρώσεων των συστατικών του. Αναλυτικότερα τα κυριότερα συστατικά του κρασιού είναι:

Νερό

Το νερό είναι το κυρίαρχο συστατικό τόσο των σταφυλιών όσο και του κρασιού και είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά που θα αποκτήσει. Η περιεκτικότητα του κρασιού σε νερό κυμαίνεται από 75 – 87% ανάλογα με την επεξεργασία που επιδέχεται κάθε φορά. Είναι απαραίτητο συστατικό σε πολλές από τις χημικές αντιδράσεις που συμμετέχουν στην ωρίμανση των σταφυλιών και του κρασιού, ενώ όσες ουσίες δεν είναι διαλυτές στο νερό σπάνια παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στο κρασί [Soleas 1997].

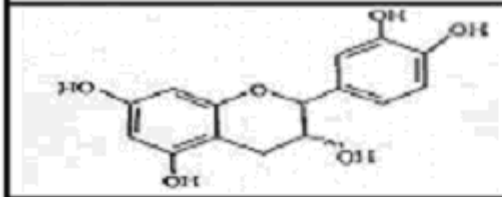
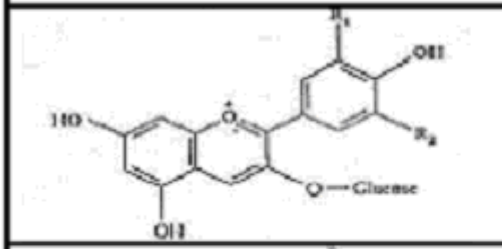
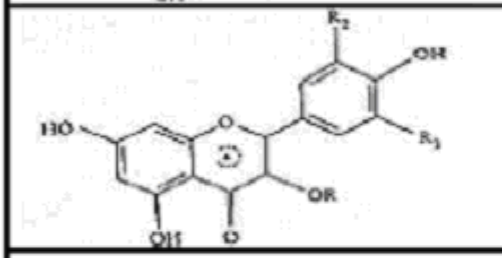
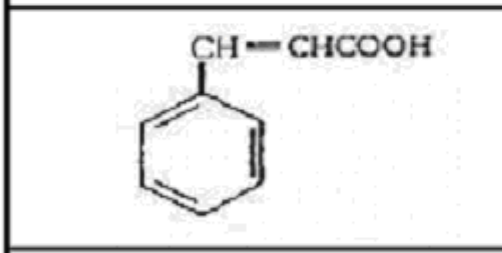
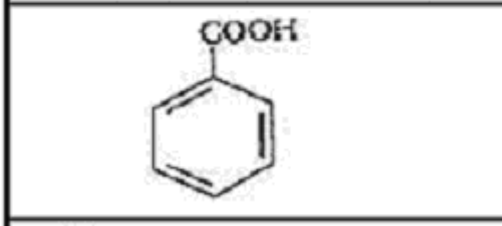
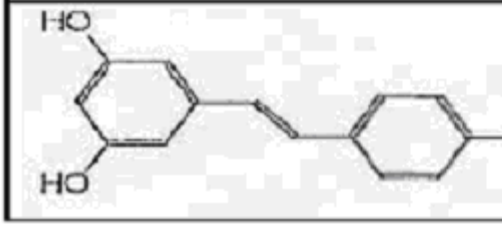
Αιθανόλη

Κάτω από κανονικές συνθήκες ωρίμανσης το αλκοόλ αποτελεί στο κρασί το 14 – 15% των συστατικών του, αλλά γενικά στα περισσότερα κρασιά η συγκέντρωση αιθανόλης φτάνει το 10 – 13%. Οι κυριότεροι παράγοντες που ελέγχουν την παραγωγή αιθανόλης είναι τα σάκχαρα, η θερμοκρασία και τα μικρόβια της ζύμωσης του μούστου. Η αιθανόλη στο κρασί, είναι μεν ένα φυσικό παράγωγο της ζύμωσης που γίνεται, αλλά έχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο και αυτός είναι ότι διατηρεί τη σταθερότητα των χαρακτηριστικών του κρασιού κατά την ωρίμανσή του, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του, μειώνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και η ζύμωση που αυτοί προκαλούν [Soleas 1997].

Φαινόλες

Οι φαινόλες είναι συστατικά του κρασιού πολύ μεγάλης σημασίας για την ποιότητά του, καθώς είναι αυτά που καθορίζουν τη γεύση, το άρωμα, την αίσθηση του κρασιού στο στόμα και τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Προέρχονται από το φλούδι και το κουκούτσι του σταφυλιού και παράγονται από τη μικροβιακή ζύμωση. Η συγκέντρωσή τους στο κόκκινο κρασί είναι περίπου στο 0,1 – 0.2%, ενώ στο λευκό κρασί βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, 0,01% περίπου [Cheynier 2005]. Οι φαινόλες, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τα μη φλαβονοειδή και τα φλαβονοειδή τα οποία με τη σειρά του χωρίζονται σε φλαβονόλες, σε κατεχίνες και σε ανθοκυανίνες (οι οποίες δίνουν και το κόκκινο χρώμα στο κρασί) [Scalbert 2005].

Το μεγάλο πλεονέκτημα του κρασιού έναντι των άλλων τροφίμων που περιέχουν φαινόλες είναι ότι είναι υδατοδιαλυτές και έχουν μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα, συγκριτικά π.χ. με τα λαχανικά τα οποία περιέχουν φαινόλες σε αδιάλυτη και ισχυρά δεσμευμένη μορφή, γεγονός που κάνει την απορρόφησή τους από τον οργανισμό ιδιαίτερα χαμηλή [Lesschaeve 2005].

ΔΟΜΗ	Γενικός τύπος
	Φλαβονοειδή
	Φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, τανίνες, προκυανιδίνες)
	Φλαβονόλες (κερκετίνη, μυρισετίνη)
	Ανθοκυανίνες (κυανιδίνη, πεονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη)
	Μη φλαβονοειδή
	Υδροξυκυναμικά οξέα (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, χλορογενικό οξύ, κουμαρικό οξύ, καφταρικό οξύ)
	Βενζοϊκά οξέα (γαλλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, υδρολυόμενες ταννίνες)
	Στιλβένια (ρεσβερατρόλη)

Πίνακας 2. Δομή των πολυφαινολών. [Gordova 2005]

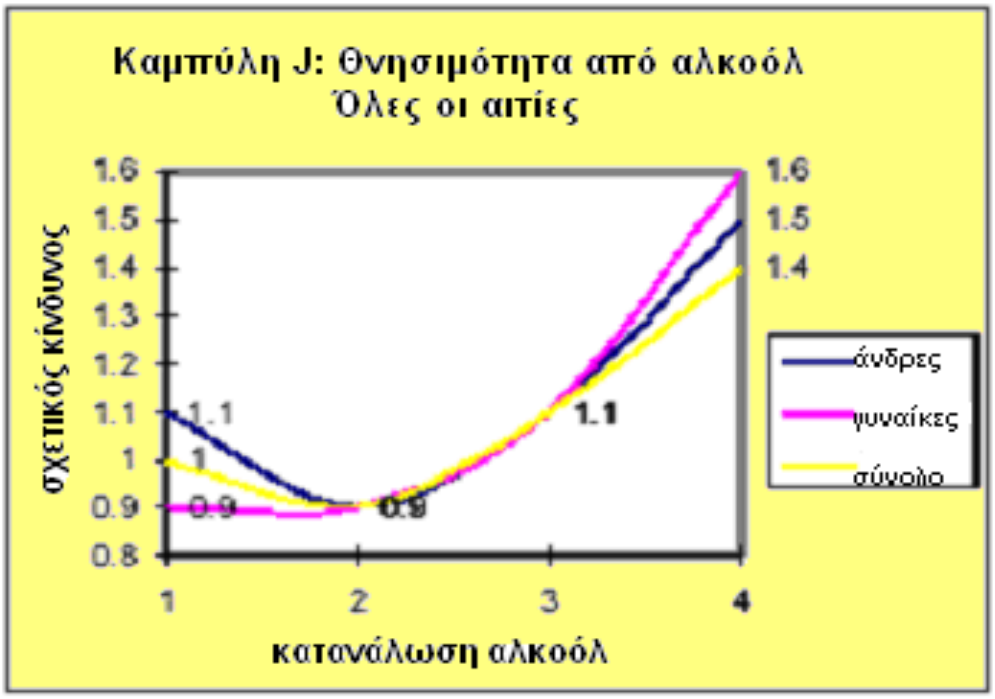
- **Επιδημιολογικά δεδομένα**

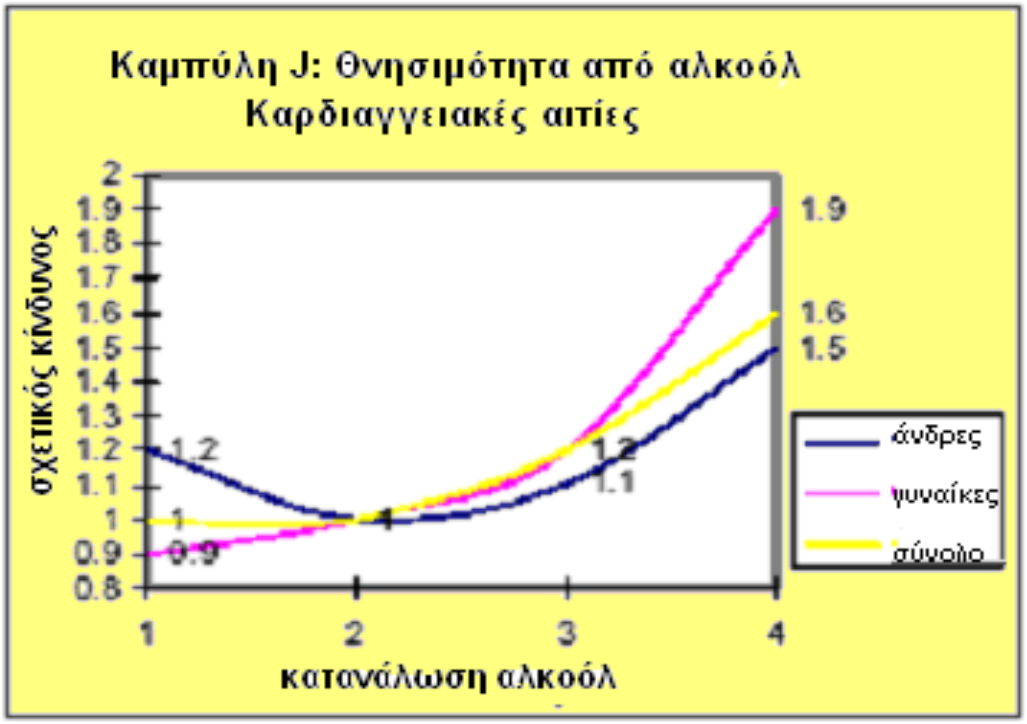
Εδώ και αρκετά χρόνια, οι επιστήμονες έχουν συμπεράνει ότι η κατανάλωση αλκοόλ και ο κίνδυνος θανάτου από διάφορα αίτια έχει σχήμα U (U – shaped curve), καθώς η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με τη μέτρια κατανάλωση (περίπου 20-30γραμμάρια αιθανόλης/ ημέρα), ενώ τα άτομα με μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, έχουν μικρότερη θνησιμότητα συγκριτικά με αυτούς που απέχουν πλήρως από τη χρήση αλκοόλ [deLorimier 2000, daLuz 2004].

Η εξήγηση του φαινομένου αυτού αποδίδεται στο γεγονός ότι μέτρια κατανάλωση αλκοόλ έχει συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακά νοσήματα[Marmot 1991], καθώς θεωρείται ότι άτομα με κατανάλωση 1-2 ποτών καθημερινά, έχουν αποκτήσει ένα είδος προστασίας έναντι της στεφανιαίας νόσου.

Το φαινόμενο αυτό διερευνήθηκε αρχικά εξαιτίας του λεγόμενου «γαλλικού παράδοξου», σύμφωνα με το οποίο οι Γάλλοι αν και η διατροφή τους είναι 3 φορές περίπου πιο πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά και υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης και αρτηριακής πίεσης, παρουσιάζουν 2,5 φορές μειωμένο κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο [Criqui 1994]. Γύρω από το ενδιαφέρον αυτό ζήτημα, έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες προκειμένου να εξηγηθεί το φαινόμενο αυτό [Criqui 1994]. Αν και χρειάζονται ακόμη αρκετές έρευνες πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο, δεν είναι λίγες οι μελέτες που δείχνουν ότι το «γαλλικό αυτό παράδοξο», μπορεί να συσχετισθεί με την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ στη Γαλλία και μάλιστα κρασιού [Criqui 1994, Renaud 1992].

Μετά από τη διατύπωση του «γαλλικού παράδοξου» ακολούθησαν δεκάδες έρευνες σχετικά με την πιθανή συσχέτιση της κατανάλωσης αλκοόλ και του καρδιαγγειακού κινδύνου, οι οποίες προσπάθησαν σε μεγάλο βαθμό να απαντήσουν σε ένα δίλημμα το οποίο ήταν εάν όλα τα αλκοολούχα ποτά ή μόνο το κόκκινο κρασί είχε ευεργετική δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα [Fuchs 2005].





Σχήμα 5. Κίνδυνος θανάτου από όλα τα αίτια και από καρδιαγγειακά νοσήματα σε σχέση με την κατανάλωση αλκοόλ. 1: < 1 ποτό το μήνα, 2: 1 – 2 ποτά ανά ημέρα, 3: 3 – 5 ποτά ανά ημέρα, 4: ≥ 6 ποτά ανά ημέρα. [Gordova 2005]

Μια τέτοια μεγάλη μελέτη ήταν και αυτή του Gronbaek το 1995 στην οποία μελέτησε 7234 γυναίκες και 6051 άνδρες για 10 – 12 χρόνια. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε το

συμπέρασμα ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (22 γρ/ ημέρα, περίπου 2 ποτήρια κρασί) και τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση μπύρας ή άλλων οινοπνευματωδών ποτών και στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου, αφού η αρνητική συσχέτιση προέκυψε από την κατανάλωση κρασιού [Gronbaek 1995].

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και μια ακόμη μεγάλη μελέτη που διεξήχθη στην Ανατολική Γαλλία και περιελάμβανε περίπου 34000 άνδρες. Μετά από την ανάλογη προσαρμογή ως προς τους συγχυτικούς παράγοντες η έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, περίπου 22 γρ ανά ημέρα κυρίως με τη μορφή κρασιού και όχι άλλων ποτών, ασκούσε προστατευτική δράση ως προς το θάνατο από καρδιαγγειακά νοσήματα [Renaud 1999].

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν και με έρευνα των Klatsky et al. που έγινε στη Β. Καλιφόρνια και αφορούσε την παρακολούθηση 128934 ατόμων για 20 χρόνια [Klatsky 2003]. Στην έρευνα αυτή επίσης βρέθηκε ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται με ελάττωση της θνησιμότητας, η οποία οφείλεται κατά κύριο λόγο σε ελάττωση της εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η μείωση αυτή παρατηρήθηκε με μέτρια πρόσληψη αλκοόλ γενικότερα, αλλά η συσχέτιση ήταν πιο ισχυρή για το κρασί (κόκκινο ή λευκό) και λιγότερο ισχυρή για το λικέρ. Αυτό ενισχύεται και από προηγούμενη έρευνα των ίδιων, όπου είχε βρεθεί αντίστροφη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [Klatsky 1997] και η σχέση αυτή και πάλι ήταν πιο ισχυρή για το κρασί σε σχέση με άλλα αλκοολούχα ποτά.

Υπάρχουν όμως και άλλες εξίσου σημαντικές μελέτες, οι οποίες καταλήγουν σε αντίθετα συμπεράσματα όσον αφορά το κρασί. Πιο αναλυτικά, στην Physicians Health Study στην οποία παρακολουθούνταν 21537 γιατροί από τις Η.Π.Α. για 12 χρόνια προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι άνδρες που είχαν μέτρια κατανάλωση 2 έως 6 ποτών εβδομαδιαία στη μορφή είτε κρασιού, είτε μπύρας, είτε κάποιου λικέρ είχαν σημαντικά μειωμένο κίνδυνο συγκριτικά με εκείνους που δεν κατανάλωναν καθόλου ή κατανάλωναν σπάνια αλκοόλ [Albert 1999]. Ακόμη, στη Nurse's Health Study όπου 87562 γυναίκες παρακολουθήθηκαν προοπτικά για 4 χρόνια, υπήρχε σημαντική μείωση στα καρδιαγγειακά νοσήματα και στο

ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ανάμεσα σε άτομα που κατανάλωναν 10 – 15 γρ. αλκοόλ την ημέρα [Stampfer 1998]. Υποδεικνύεται λοιπόν από αυτές τις μελέτες ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση ανάμεσα στα αλκοολούχα ποτά, αλλά ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ γενικότερα και όχι μόνο κόκκινου κρασιού, είναι αυτή που ασκεί προστατευτική δράση έναντι στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια πρόσφατη μεταανάλυση [Di Castelnuovo 2002] όπου μελετήθηκαν 26 έρευνες σχετικές με την κατανάλωση κρασιού και μπύρας και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Σε 13 έρευνες που αφορούσαν άτομα που κατανάλωναν κρασί, ο σχετικό κίνδυνος για καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν 0,68 συγκριτικά με όσους δεν έπιναν καθόλου. Ακόμη, ο σχετικός κίνδυνος των ατόμων που κατανάλωναν μπύρα ήταν 0,78, αλλά δε βρέθηκε ποσοτική σχέση ανάμεσα στην ποσότητα της ημερήσιας κατανάλωσης μπύρας και του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Παρόλα αυτά, δεν είναι εύκολο να καταλήξει κανείς στο εάν το αλκοόλ ή ειδικά το κρασί είναι αυτό που έχει ευεργετική δράση ενάντια στον κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς είναι πιθανό τα αποτελέσματα που παρατηρούνται στις διάφορες έρευνες να έχουν επηρεαστεί από διάφορους συγχυτικούς παράγοντες. Είναι πιθανό δηλαδή η μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων με τη μέτρια πρόσληψη κρασιού να οφείλεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των ατόμων που προτιμούν το κρασί έναντι άλλων αλκοολούχων ποτών. Στις περισσότερες έρευνες η ομάδα αυτή (wine-drinkers) περιλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό μη καπνιστών, γυναικών, απόφοιτων ανώτερων σχολών, ατόμων με χαμηλό ΔΜΣ και γενικά πιο υγιεινό τρόπο ζωής [Gronbaek 2000, Klatsky 2003]. Στις ΗΠΑ για παράδειγμα η κατανάλωση κρασιού γίνεται κυρίως από τα ανώτερα κοινωνικά στρώματα, τα οποία έχουν καλύτερη πρόσβαση στο σύστημα υγείας [Rimm 1996]. Επομένως, πιθανώς η συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης κρασιού και της μείωσης της θνησιμότητας να είναι πλασματική. Έρευνα που έγινε στη Δανία έδειξε ότι η κατανάλωση κρασιού σχετίζεται με υψηλότερη πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, ψαριού και μεγαλύτερη χρήση ελαιολάδου στο μαγείρεμα [Tjonneland 1999]. Δεδομένου ότι η δίαιτα σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την εκδήλωση στεφανιαίας νόσου [Ness 1997], πιθανώς η μείωση των καρδιαγγειακών να οφείλεται στις υγιεινές διαιτητικές συνήθειες των ατόμων που καταναλώνουν κρασί και όχι στο κρασί αυτό καθ' εαυτό. Επίσης, ιδιαίτερο ρόλο παίζει

ο τρόπος με τον οποίο καταναλώνεται το αλκοόλ (drinking pattern). Το κρασί προτιμάται κατά τη διάρκεια των γευμάτων, σε αντίθεση με την μπύρα και τα άλλα οινοπνευματώδη που συνήθως καταναλώνονται άστατα κατά τη διάρκεια της ημέρας (binge drinking) [Gronbaek 2000, Truelsen 1998]. Αυτό επιτρέπει καλύτερη απορρόφηση της αιθανόλης και καθυστερεί τις μεταγευματικές μεταβολές παραγόντων πήξης, φλεγμονής και ενδοθηλιακών παραγόντων που επηρεάζουν αρνητικά την ενδοθηλιακή λειτουργία [Locher 1998, Burdge 2005]. Αποδεικνύεται με αυτό τον τρόπο ωφελιμότερη η μέτρια και τακτική πρόσληψη αλκοόλ κατά τη διάρκεια των γευμάτων, που συναντάται συχνότερα σε όσους καταναλώνουν κρασί και όχι άλλα ποτά. Επιπλέον συχνά διατυπώνεται η άποψη ότι είναι λανθασμένη η επιλογή των ατόμων που δεν καταναλώνουν καθόλου αλκοόλ (abstainers) ως ομάδα ελέγχου, διότι συχνά η αποχή από το αλκοόλ μπορεί να οφείλεται σε κάποια ασθένεια ή σε πρωτύτερη υπερβολική πρόσληψη αλκοόλ, οπότε και η συσχέτιση αυτών των ατόμων με τον κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακά νοσήματα να μην οδηγεί σε σωστά συμπεράσματα [Mumakal 1997].

Δυστυχώς παρά την πληθώρα των ερευνών το ερώτημα σχετικά με το αν το κρασί ή τα άλλα αλκοολούχα ποτά ασκούν προστατευτική δράση ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα δεν έχει διασαφηνιστεί και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι υπάρχουν αρκετές επιδημιολογικές έρευνες σχετικά με το θέμα αυτό, αλλά πολύ λίγες, καλά σχεδιασμένες πειραματικές μελέτες σε ανθρώπους. Παρόλ' αυτά το σκεπτικό ότι το κόκκινο κρασί εκτός από αλκοόλ περιέχει και εκατοντάδες άλλες ουσίες (φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, πολυφαινόλες), με ισχυρή αντιοξειδωτική και όχι μόνο δράση το καθιστά ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον για μελέτη ποτό, καθώς φαίνεται ότι τόσο το αλκοόλ, όσο και οι αντιοξειδωτικές του ουσίες ασκούν με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς καρδιοπροστατευτική δράση.

1.9.1. ΑΛΚΟΟΛ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε μεγάλο αριθμό ερευνών το αλκοόλ εμφανίζεται να έχει αρνητική συσχέτιση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αυτό ερμηνεύεται με την προσεκτική μελέτη της επίδρασης της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ σε διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου.

- Επίδραση στα λιπίδια και στις λιποπρωτεΐνες

Το αλκοόλ φαίνεται ότι επιδρά τόσο σε λιπίδια όσο και σε λιποπρωτεΐνες επηρεάζοντας κομβικά σημεία της αθηρωματικής διαδικασίας. Πιο αναλυτικά η μέτρια καθημερινή κατανάλωση αιθανόλης οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της HDL λιποπρωτεΐνης και μάλιστα αυτή η αύξηση ερμηνεύει και το 50% της ευεργετικής δράσης του αλκοόλ στο καρδιαγγειακό σύστημα [Frohlich 1996]. Η επίδραση αυτή της αιθανόλης γίνεται μέσω τροποποιήσεων στην παραγωγή ή την κάθαρση της λιποπρωτεΐνης ή μέσω της επίδρασης σε ένζυμα που επηρεάζουν το μεταβολισμό της HDL όπως η ηπατικά λιπάση (HL) και η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) [Nishiwaki 1999]. Είναι σαφές ότι η δράση αυτή του αλκοόλ είναι ιδιαίτερα ευεργετική, αφού η HDL παίζει σημαντικό ρόλο μέσω της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης στη μείωση της εισόδου της στα αγγεία η οποία αποτελεί το έναυσμα για την αθηρωμάτωση. Εκτός όμως από την HDL η αιθανόλη έχει μια ακόμη ευεργετική δράση στις λιποπρωτεΐνες μέσω της μείωσης της Lp (a) που ως γνωστό είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο [Agarwal 2002]. Ο μηχανισμός δράσης του αλκοόλ σε αυτή τη λιποπρωτεϊνη δεν είναι γνωστός, παρόλ' αυτά βρέθηκε ότι άτομα με μέτρια ημερήσια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών είχαν μείωση στα επίπεδα Lp (a), η οποία αυξήθηκε μόλις μειώθηκε η χρήση του αλκοόλ [Kervinen 1993].

Εκτός όμως από θετική το αλκοόλ έχει και αρνητική επίδραση στις λιποπρωτεΐνες και στα λιπίδια. Πιο συγκεκριμένα η κατανάλωση αλκοόλ και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο αίμα, τα οποία είναι επίσης παράγοντας κινδύνου [Frohlich 1996]. Η αιθανόλη αποτελεί υπόστρωμα στο ήπαρ για την παραγωγή τριγλυκεριδίων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδογενής παραγωγή τους. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι το αλκοόλ δρα ως προοξειδωτική ουσία, με αποτέλεσμα να αυξάνει την οξείδωση της LDL λιποπρωτεΐνης [vanGolde 1999]. Ο καταβολισμός του αλκοόλ μέσω δεϋδρογενάσης οδηγεί στη παραγωγή ελευθέρων ριζών, ενώ το αλκοόλ μειώνει και τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών βιταμινών στο αίμα. Όπως είναι γνωστό η οξείδωση της LDL αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για την αθηρωμάτωση, γεγονός που δείχνει πόσο σοβαρό μειονέκτημα είναι η οξείδωση της LDL για τις ιδιότητες και τις δράσεις του αλκοόλ στον οργανισμό [Agarwal 2002].

- Επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Ένας ιδιαίτερα σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο θεωρείται ότι το αλκοόλ μειώνει τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι η μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μάλιστα, η επίδραση αυτή της δράσης της αιθανόλης ήταν ήδη γνωστή από τότε που πρωτοδιατυπώθηκε η θεωρία του «γαλλικού παράδοξου», καθώς χρησιμοποιήθηκε από το Renaud για να τεκμηριώσει τη θεωρία αυτή [Renaud 1992].

Σε γενικές γραμμές είναι γνωστό τόσο από έρευνες σχετικά με την οξεία μεταγευματική δράση του αλκοόλ, όσο και σχετικά με τη δράση του μετά από μακροχρόνια κατανάλωση, ότι όταν καταναλώνεται σε μέτρια ποσότητα προκαλεί τη μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αν ανατρέξει κανείς στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης και στο σχηματισμό της πλάκας [Renaud 1996, Buemann 2002]. Η επίδραση αυτή της αιθανόλης στα αιμοπετάλια γίνεται με αρκετούς μηχανισμούς. Ο πιο σημαντικός ίσως είναι η δράση της στη θρομβοξάνη και στην προσταγλανδίνη, καθώς έχει βρεθεί ότι μέτρια καθημερινή κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της προσταγλανδίνης και ταυτόχρονα σε μείωση των επιπέδων της θρομβοξάνης [Ruf 1999]. Άμεση συνέπεια και από τις δύο επιδράσεις είναι η μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ακόμη έχει βρεθεί ότι το αλκοόλ μειώνει του υποδοχείς της θρομβίνης, ή ακόμη μεταβάλλει τη συγγένειά τους με τα αιμοπετάλια με άμεση συνέπεια τη μειωμένη συσσώρευση των τελευταίων [Mikhailidis 1990]. Τέλος το αλκοόλ αναστέλλει τη δράση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PDGF) γεγονός που επίσης συμβάλλει στη μειωμένη συσσώρευσή τους [Buemann 2002].

Αυτό που θα πρέπει να τονιστεί και είναι πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι μετά την κατανάλωση αλκοόλ μειώνεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων για την επόμενη ώρα, αλλά αμέσως μετά αρχίζει ένα φαινόμενο ανάκαμψης των αιμοπεταλίων (platelet rebound effect) στο οποίο σταδιακά αυξάνεται η συσσώρευσή τους [Ruf 1995]. Μάλιστα, 6-7 ώρες μετά τη λήψη του αλκοόλ η τάση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι περισσότερο αυξημένη συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα πριν τη λήψη του. Το φαινόμενο αυτό είναι πολύ έντονο σε ανθρώπους με ακατάστατη πρόσληψη αλκοόλ (binge drinkers), ενώ φαίνεται να μειώνεται μόνο με την κατανάλωση κόκκινου κρασιού, καθώς και οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχει ασκούν παρόμοια δράση μείωσης των αιμοπεταλίων [Renaud 1996].

- Επίδραση στους ινωδολυτικούς μηχανισμούς

Μια ακόμη σημαντική δράση του αλκοόλ στον οργανισμό σε σχέση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα αφορά τη διαδικασία της ινωδόλυσης. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι η μέτρια κατανάλωση αιθανόλης ημερησίως συμβάλλει στην ενίσχυση του ινωδολυτικού μηχανισμού, αν και ακόμη απομένουν κάποια σημεία προς διερεύνηση [Agarwal 2002]. Από μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται ότι η μέτρια ημερήσια πρόσληψη αλκοόλ έχει θετική συσχέτιση με τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA) ενισχύοντας την ινωδόλυση [Ridker 1994]. Ακόμη, φαίνεται από διάφορες μελέτες και από τη μελέτη Framingham ότι η πρόσληψη αλκοόλ και η ινωδολυτική ικανότητα του οργανισμού ακολουθούν τη γνωστή καμπύλη σχήματος U, καθώς κατανάλωση 1-3 ποτών ανά ημέρα οδηγούν σε αύξηση της ινωδόλυσης, ενώ μεγαλύτερη ημερήσια πρόσληψη την αναστέλλει [Pikaar 1987, van de Wiel 2001, Mukamal 2001]. Η αιθανόλη επιδρά στο σύστημα της ινωδόλυσης μέσω δύο κύριων μηχανισμών, του συμπλέγματος του ενεργοποιητή και του αναστολέα του πλασμινογόνου και του ινωδογόνου [Buemann 2002].

Ως προς το ινωδογόνο έχει βρεθεί ότι μέτρια κατανάλωση αιθανόλης μειώνει τα επίπεδά του γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, αφού ως γνωστό συγκαταλέγεται πλέον στους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Μάλιστα η σχέση ινωδογόνου και κατανάλωσης αλκοόλ ακολουθεί την καμπύλη U, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τη συνολική επίδραση του αλκοόλ στην ινωδόλυση [Rimm 1999]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η επίδραση του αλκοόλ στο ινωδογόνο μειώνει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά κατά 4,3% [Rimm 1999].

Από την άλλη πλευρά η μέτρια ημερήσια κατανάλωση αιθανόλης (~30 γρ) φαίνεται να αυξάνει τη συγκέντρωση του t-PA και να μειώνει τα επίπεδα του αναστολέα του πλασμινογόνου (PAI-1) [Agarwal 2002]. Μεγαλύτερες δόσεις (~40 γρ) φαίνεται να έχουν εντελώς αντίθετα αποτελέσματα (αύξηση του PAI-1 και μείωση του t-PA), ενώ μικρότερες δόσεις (~20 γρ) δεν έχουν κανένα αποτέλεσμα στην ινωδόλυση [van de Wiel 2001]. Ακόμη ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε οξεία κατανάλωση του αλκοόλ παρατηρούνται απότομες αυξομειώσεις των παραγόντων αυτών καθώς κατανάλωση 40 γρ αλκοόλ με το βραδινό γεύμα μειώνει σε οξεία φάση την ινωδόλυση αυξάνοντας τον PAI-1 και η αύξηση

αυτή διαρκεί μέχρι και 5 ώρες μεταγευματικά, για να επιστρέψει μετά στα επίπεδα πριν τη λήψη του αλκοόλ [Hendricks 1994]. Με αυτό το φαινόμενο ίσως μπορούν να εξηγηθούν τα διάφορα επεισόδια οξέων στεφανιαίων συνδρόμων νωρίς το πρωί μετά από έντονη κατανάλωση ποτού το προηγούμενο βράδυ.

- Επίδραση στην αγγειοκινητική λειτουργία του ενδοθηλίου

Η δράση του αλκοόλ στην αγγειοσύσπαση και στην αγγειοδιαστολή είναι ένα ζήτημα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται ότι ίσως υπάρχει μια διάσταση ανάμεσα στα αποτελέσματα της μακροχρόνιας κατανάλωσής του και στα αποτελέσματα της οξείας λήψης του. Πιο συγκεκριμένα έχει φανεί από πειράματα in vitro ότι το αλκοόλ προωθεί την πρωτεϊνική έκφραση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (e NOS) και ενεργοποιεί την παραγωγή NO [Buemann 2002]. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει μέσω έκφρασης του mRNA και των κατάλληλων πρωτεϊνών, αλλά με μηχανισμό ο οποίος ακόμη παραμένει άγνωστος [Venkov 1999]. Έτσι φαίνεται ότι το αλκοόλ είναι μια ουσία η οποία προωθεί την αγγειοδιαστολή. Βέβαια αυτό δε συμβαίνει με μεγάλες ποσότητες αλκοόλ, καθώς είναι γνωστό ότι πρόκειται για προοξειδωτική ουσία η οποία σε μεγάλες συγκεντρώσεις αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες απενεργοποιούν το NO και αναστέλλουν την αγγειοδιασταλτική του δράση [Sun 2001]. Επιπρόσθετα, το αλκοόλ σε μεγάλες ποσότητες επάγει την παραγωγή αγγειοσυσταλτικών ουσιών όπως είναι η ενδοθηλίνη-1 [Slomiany 1999] ευνοώντας την αγγειοσυστολή.

Ένα σημαντικό κομμάτι της έρευνας γύρω από το κρασί και τη δράση του στα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι και η επίδραση που έχει στην αγγειακή λειτουργία σε χρόνια κατανάλωσή του. Από επιδημιολογία στοιχεία φαίνεται ότι η μέτρια ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ από ασθενείς με στεφανιαία νόσο οδηγεί σε βελτίωση της FMD που είναι σημαντικός δείκτης ενδοθηλιακής λειτουργίας [Teragawa 2002]. Αν και έχουν γίνει αμέτρητες έρευνες in vitro σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και εκατοντάδες επιδημιολογικές έρευνες σχετικά με το θέμα αυτό, δεν υπάρχουν προοπτικές πειραματικές μελέτες που να εξετάζουν τη δράση του αλκοόλ σε παράγοντες της αγγειακής και όχι μόνο λειτουργίας. Έτσι τα στοιχεία που έχουμε από μία έρευνα στην οποία δόθηκε για ένα μήνα σε υγιείς εθελοντές δίαιτα υψηλή σε λίπος ή δίαιτα υψηλή σε λίπος μαζί με καθημερινή πρόσληψη μέτριας ποσότητας κόκκινου κρασιού προέκυψε το συμπέρασμα ότι η δίαιτα υψηλή σε λίπος επιδείνωσε την FMD, ενώ όταν σε αυτή προστέθηκε το κρασί ανεστάλη

πλήρως αυτή η δυσλειτουργία [Cuevas 2000]. Με άλλα λόγια φαίνεται ότι σε μακροχρόνια χρήση του, το κρασί βελτίωσε την παραγωγή NO και κατά συνέπεια την αγγειακή λειτουργία, αλλά δυστυχώς από το σχεδιασμό της έρευνας δεν γνωρίζουμε αν αυτή η βελτίωση οφείλεται στο αλκοόλ ή στα άλλα συστατικά του κόκκινου κρασιού.

Από την άλλη πλευρά έχουν πραγματοποιηθεί κάποιες μελέτες σχετικά με την οξεία χορήγηση αλκοόλ και τη δράση του στα αγγεία. Πιο αναλυτικά έχουν γίνει δύο εργασίες σε υγιείς εθελοντές [Agewall 2000, Hashimoto 2001] και μία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [Karatzi 2004] στις οποίες φαίνεται ότι το κόκκινο κρασί δε βελτιώνει την FMD 30 έως και 120 λεπτά μετά τη λήψη του, ενώ το κόκκινο κρασί που δεν έχει αλκοόλ τη βελτιώνει. Αυτό υποδεικνύει ότι τα αντιοξειδωτικά του κρασιού έχουν ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση, αλλά το αλκοόλ δε φαίνεται να βελτιώνει τη λειτουργία των αγγείων στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο. Από την άλλη πλευρά μια άλλη πρόσφατη έρευνα [Whelan 2004] που μελέτησε τη οξεία δράση του κόκκινου και του λευκού κρασιού σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, κατέληξε ότι και οι δύο τύποι κρασιού βελτίωσαν την FMD 60 λεπτά μετά τη λήψη του υποδεικνύοντας ότι το αλκοόλ έχει ευεργετική δράση σε οξεία κατανάλωσή του. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίθετα μεταξύ τους, ενώ ίσως και να διαφέρει η οξεία από τη μακροχρόνια επίδραση του αλκοόλ στα αγγεία. Χρειάζεται λοιπόν μεγάλος αριθμός ερευνών προκειμένου να καταλήξουμε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη δράση του αλκοόλ στην αγγειοκινητική λειτουργία, κυρίως στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτεί κανείς ότι η κατανάλωση αλκοόλ είναι μια διαδεδομένη συνήθεια, αλλά και μια συνήθης συμβουλή γιατρών και διαιτολόγων ως προληπτικό μέσο ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

1.9.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Εκτός από το αλκοόλ, οι πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο κόκκινο κρασί, φαίνεται να παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην προστασία από τα καρδιαγγειακά νοσήματα, καθώς επιδρούν με διάφορους μηχανισμούς και σε διάφορα επίπεδα, ασκώντας μια ανεξάρτητη από το αλκοόλ ευεργετική δράση.

- Επίδραση στην οξείδωση

Η διαδικασία της οξείδωσης στον οργανισμό και ιδιαίτερα στη λειτουργία των αγγείων είναι μια διαδικασία βαρύνουσας σημασίας, αφού θεωρείται ότι η οξείδωση της LDL αποτελεί το εναρκτήριο ερέθισμα για την αθηρωματική διαδικασία. Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού ως ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες φαίνεται ότι μειώνουν την επιδεκτικότητα της LDL σε οξείδωση [Gordova 2005] προσφέροντας πολύτιμη συμβολή στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους [Fuhrman 1995, Stein 1999] έχει αποδειχθεί η προστατευτική δράση των πολυφαινολών στην οξείδωση της LDL. Πιο αναλυτικά, δόθηκαν σε υγιείς εθελοντές 375 ml κόκκινου κρασιού τη μέρα για 2 εβδομάδες και μετά από το διάστημα αυτό προσδιορίστηκαν η LDL και η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο αίμα [Fuhrman 1995]. Βρέθηκε λοιπόν ότι μειώθηκαν οι δείκτες οξείδωσης (υπεροξείδια των λιπιδίων κατά 40%, TBARS κατά 44%), ενώ η φάση καθυστέρησης της οξείδωσης της LDL αυξήθηκε κατά 380%. Επιπρόσθετα, η αντιοξειδωτική αυτή δράση συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο πλάσμα και όχι με τα επίπεδα της βιταμίνης Ε και του β-καροτένιου. Από την άλλη πλευρά η χορήγηση χυμού από σταφύλια (πολυφαινόλες χωρίς αλκοόλ) για 2 εβδομάδες σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο οδήγησε επίσης σε μείωση της οξείδωσης της LDL, γεγονός το οποίο είχε και άμεσα αποτελέσματα στη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας [Stein 1999]. Επίσης σε επιβεβαίωση των προαναφερθέντων έρχεται και η διαπίστωση ότι σκόνη από κόκκινο κρασί χωρίς αλκοόλ στην οποία έχει διατηρηθεί το μεγαλύτερο μέρος των αντιοξειδωτικών παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο στο πλάσμα, όσο και στην LDL [NIgdigar 1998].

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί κανείς να εξηγήσει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Ο πρώτος και κυριότερος μηχανισμός είναι ότι δρουν ως ανιχνευτές των ελευθέρων ριζών απομακρύνοντάς τις από το πλάσμα και προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τα μόρια που θα οξειδώνονταν από τη δράση τους. Ένας δεύτερος μηχανισμός είναι ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων με τα ιόντα των μετάλλων, οπότε μειώνεται η ικανότητα των μετάλλων αυτών να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες. Ένας τρίτος μηχανισμός είναι η διατήρηση και προστασία των επιπέδων α – τοκοφερόλης και

καροτενοειδών στο μόριο της LDL, καθώς και αναγέννηση της α – τοκοφερόλης με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του μορίου [Wollin 2001]. Τέλος οι πολυφαινόλες μπορούν να μειώσουν την οξείδωση της LDL μέσω της ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων όπως είναι το σύστημα της γλουταθειόνης [Fuhrman 2001].

Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους, έχει διαπιστωθεί ότι οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού απορροφώνται επαρκώς και συνδέονται στα μόρια της LDL [Fuhrman 2001, Nigdigar 1998, Fuhrman 1995]. Επίσης σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι το καφεϊκό οξύ φάνηκε ότι ήταν το πιο ισχυρό ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, με κύριο μηχανισμό του τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών και κατά προέκταση την προστασία της α – τοκοφερόλης από την οξείδωση [Abu – Amsha 1996].

- Επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι οι διάφορες πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού αναστέλλουν της συσσώρευση των αιμοπεταλίων, γεγονός το οποίο αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση [Vita 2005, Dell'Agli 2004]. Μάλιστα από πειράματα in vitro έχει φανεί ότι κύρια δράση στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έχουν η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη οι οποίες είναί δύο από τις πιο ισχυρές πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού [Gordova 2005]].

Οι μηχανισμοί με τους οποίους φαίνεται ότι δρουν οι πολυφαινόλες περιλαμβάνουν την αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω ADP και θρομβίνης [Pace – Asiak 1995] και την αναστολή της θρομβοξάνης [Pace – Asiak 1996]. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τα ένζυμα που ελέγχουν την παραγωγή κυκλοοξυγενάσης και λιποοξυγενάσης, άρα και την έκκριση προστακυκλίνης και θρομβοξάνης, με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται το κλάσμα προστακυκλίνης προς θρομβοξάνη και τελικά να επικρατεί η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [Pace – Asiak 1996, Puddey 1999].

Από πειράματα που έχουν γίνει σε ανθρώπους φάνηκε ότι η κατανάλωση 375 ml κόκκινου κρασιού για διάστημα 2 έως 4 εβδομάδων μείωσε τη συσσώρευση των

αιμοπεταλίων [Seigneur 1990], αλλά και τα επίπεδα της θρομβοξάνης κατά 59,4% [38]. Ακόμη είναι πολύ σημαντική μια μελέτη που έγινε σε πειραματόζωα σε ένα μοντέλο από αρτηρία σκύλού στην οποία έχει προκληθεί τεχνητά θρόμβωση και διάρρηξη της πλάκας [Demrow 1995]. Βρέθηκε ότι η εισαγωγή στο στομάχι είτε κόκκινου κρασιού, είτε χυμού από σταφύλια (περιέχει πολυφαινόλες χωρίς αλκοόλ) σε δόσεις 1,6 και 4 ml/ κιλό βάρους σώματος, οδήγησε στην μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων για τον επανασχηματισμό θρόμβου. Αντίθετα, το λευκό κρασί δεν είχε ανάλογα αποτελέσματα, γεγονός που φανερώνει ότι η μείωση αυτή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων οφειλόταν στις πολυφαινόλες.

- Επίδραση στην πήξη

Η δράση των διαφόρων πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού στο σύστημα πήξης και ινωδόλυσης εντοπίζεται κυρίως στη ρύθμιση της έκφρασης του ιστικού παράγοντα [van de WIel 2001] ο οποίος είναι ο εναρκτήριος παράγοντας στον καταρράκτη της πήξης και κατά προέκταση στα επίπεδα ινωδογόνου το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί πλέον παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα [Semerano 1997]. Οι πολυφαινόλες που κυρίως εμπλέκονται στην παραγωγή ιστικού παράγοντα είναι η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη.

Είναι γνωστό ότι η έκφραση του ιστικού παράγοντα δε γίνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες παρά μόνο μετά από επίδραση ουσιών όπως ο TNF-a και η IL-1β [Semerano 1997], ενώ η έκφραση των γονιδίων του ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια NF-κβ [Oeth 1997]. Βρέθηκε λοιπόν ότι η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη εμπόδισαν τη δράση του ιστικού παράγοντα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα [Disanto 2003]. Επίσης οι δύο πολυφαινόλες επέδρασαν και στην έκφραση του mRNA του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF), αναστέλλοντας την παραγωγή του. Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από μία ακόμη έρευνα [Pendurthi 1999] στην οποία η δραστικότητα του TF μετρήθηκε ως η ικανότητα του να ενεργοποιήσει τον παράγοντα πήξης X, παρουσία του παράγοντα VIIa. Και σε αυτή την έρευνα η ρεσβερατρόλη μείωσε και πάλι την παραγωγή του ιστικού παράγοντα μέσω της ανασταλτικής δράσης που άσκησε στην έκφραση του mRNA του. Στη μελέτη αυτή, σε αντίθεση με τη ρεσβερατρόλη, η αιθανόλη δεν επηρέασε καθόλου τα επίπεδα του ιστικού παράγοντα.

Κατά συνέπεια γίνεται φανερό ότι οι διάφορες πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού, επηρεάζουν την πήξη του αίματος, αναστέλλοντάς την συμβάλλοντας δυναμικά στη μείωση των φαινομένων σχηματισμού θρόμβου κατά την αθηρωματική διαδικασία και συνεπώς δρα ανασταλτικά στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

- Επίδραση στην αγγειοκινητική λειτουργία και στην αθηρωμάτωση

Οι διάφορες πολυφαινόλες που περιέχει το κόκκινο κρασί φαίνεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας μια και όπως φαίνεται επιδρούν στη ρύθμιση της έκκρισης NO, αλλά και άλλων παραγόντων όπως ο EDHF και η προστακυκλίνη [Dell' Agli 2004].

Η ρύθμιση του NO γίνεται με δύο κυρίως τρόπους και είναι η αύξηση της παραγωγής του μέσω ρύθμισης της συνθετάσης του NO (e – NOS), αλλά και η προστασία του από την οξειδωτική καταστροφή του με άμεσο επακόλουθο την αγγειοδιαστολή [Fitzpatrick 1993 1995, 2000, Zenebe 2003]. Είναι κατανοητό ότι η προστασία που προσφέρουν οι πολυφαινόλες στο NO, αλλά και η αυξημένη παραγωγή του, δημιουργούν αρκετές θετικές επιδράσεις στην ενδοθηλιακή λειτουργία, μια και ως γνωστό το NO δεν παίζει ρόλο μόνο στην αγγειοδιαστολή ως η κυριότερη αγγειοδιασταλτατική ουσία, αλλά δρα ευεργετικά και σε άλλες διαδικασίες όπως είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η φλεγμονή και η αύξηση των λείων μυϊκών κυττάρων [Russo 2002].

Εκτός όμως από το NO οι πολυφαινόλες δρουν και σε άλλους αγγειοδραστικούς παράγοντες όπως ο EDHF [Ndiaye 2003] και η προστακυκλίνη [Derek 1997], αυξάνοντας με άγνωστο μηχανισμό την παραγωγή τους και προωθώντας την αγγειοδιαστολή. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι το κόκκινο κρασί και όχι το λευκό μείωσε τη σύνθεση της κυριότερης αγγειοσυσπαστικής ουσίας, της ενδοθηλίνης 1, σε αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα από βόδι, γεγονός που αποδόθηκε στις πολυφαινόλες και όχι στο αλκοόλ [Corder 2001].

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τις ελάχιστες in vivo μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί. Φαίνεται ότι 2 και 8 εβδομάδες αντίστοιχα χορήγηση χυμού από σταφύλια σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο οδήγησε σε βελτίωση της FMD, η οποία είναι ένας πολύ σημαντικός δείκτης της ενδοθηλιακής λειτουργίας, εξαρτώμενος από την

παραγωγή NO [Stein 1999, Chou 2001]. Ακόμη ευεργετικά αποτελέσματα είχε στην FMD η οξεία χορήγηση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού 30 – 60 λεπτά μετά τη χορήγησή του τόσο σε υγιείς [Agewall 2000, Hashimoto 2001], όσο και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [Karatzi 2004]. Επιβεβαιώνεται με αυτό τον τρόπο ότι οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού τόσο σε μακροχρόνια κατανάλωσή τους, όσο και αμέσως μετά από τη λήψη τους έχουν τη δυνατότητα να βελτιώνουν την ικανότητα των αγγείων να διαστέλλονται με κύριο σημείο δράσης τους το NO. Βέβαια η δράση των πολυφαινολών in vivo τόσο σε μακροχρόνια κατανάλωσή τους, αλλά κυρίως στο οξύ μεταγευματικό στάδιο χρειάζεται μεγάλη διερεύνηση, αφού στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά συμπεράσματα για τους μηχανισμούς δράσης τους στα αγγεία in vitro, αλλά είναι ελάχιστες οι μελέτες εκείνες που ασχολούνται με το αν οι μηχανισμοί αυτοί ισχύουν και in vivo.

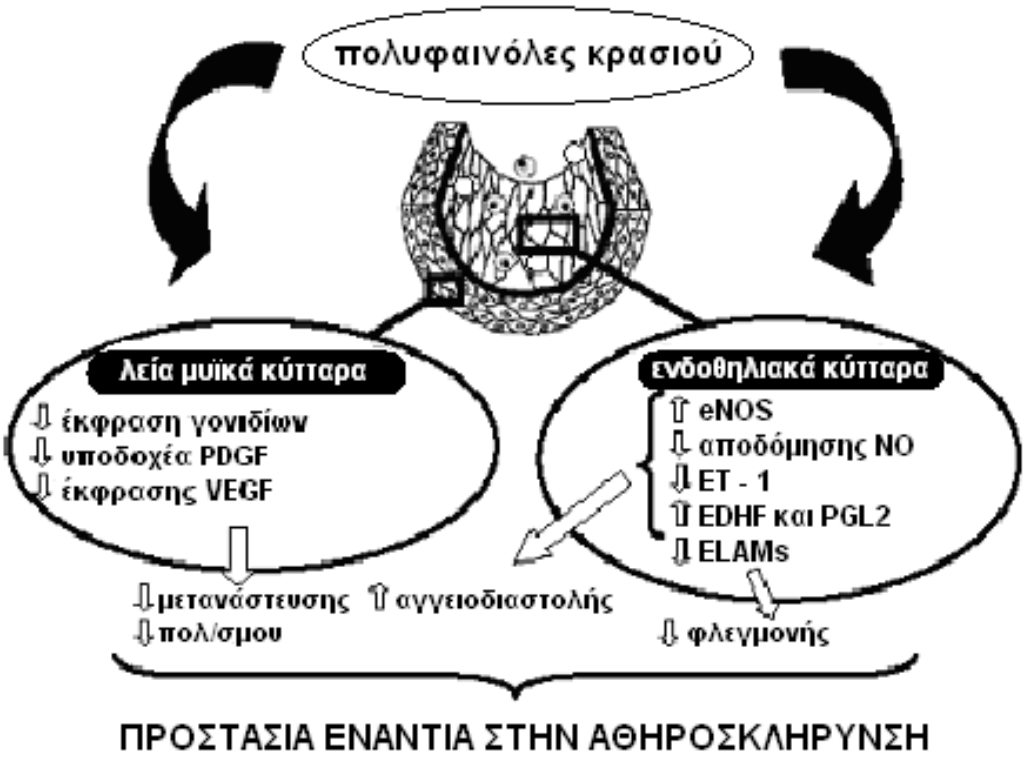
Εκτός όμως από τη συμβολή των πολυφαινολών στην αγγειοκινητική δραστηριότητα, επιδρά θετικά στην ενδοθηλιακή λειτουργία και με τη δράση του στη μείωση της φλεγμονώδους διαδικασίας των αγγείων και στη μείωση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων.

Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες των σταφυλιών αναστέλλουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM 1 που ενεργοποιούνται από τον TNFa σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που οδηγεί στη μειωμένη προσκόλληση των λευκοκυττάρων και των Τ – κυττάρων [Sen 2001, Bagchi 2002]. Κάτι παρόμοιο βρέθηκε και σε μία μελέτη σε ανθρώπους με στεφανιαία νόσο των οποίων οι τιμές VCAM 1, ICAM 1 και Ε – σελεκτίνης είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες των υγιών ανθρώπων. Βρέθηκε λοιπόν ότι η καθημερινή λήψη 100 mg πολυφαινολών των σταφυλιών για ένα μήνα μείωσε την έκφραση των μορίων αυτών [Kalin 2002]. Δρουν δηλαδή οι πολυφαινόλες σε ένα ιδιαίτερα σημαντικό αρχικό στάδιο της αθηρωματικής διαδικασίας αναστέλλοντας ουσιαστικά την προσέλκυση λευκοκυττάρων και την περαιτέρω είσοδό τους στον υπενδοθηλιακό χώρο.

Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες δρουν ανασταλτικά στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, ένα ακόμη σημαντικό στάδιο της αθηρωματικής διαδικασίας. Έχει βρεθεί ότι σε καλλιεργημένα λεία μυϊκά κύτταρα από αρουραίους οι πολυφαινόλες σε συγκέντρωση 1 – 100 μg/ml ανέστειλαν τον

πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση του DNA των κυττάρων [Iijima 2002]. Ακόμη φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού συμμετέχουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω δύο άλλων πολύ σημαντικών ουσιών και αυτές είναι ο PDGF και ο VEGF. Από πειράματα in vitro προκύπτει ότι οι πολυφαινόλες έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τον PDGF, ο οποίος ως γνωστό εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και από τα ίδια τα λεία μυϊκά κύτταρα και ενισχύει την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των τελευταίων [Rozenkranz 2002]. Επίσης βρέθηκε ότι η έκθεση καλλιεργημένων λείων μυϊκών κυττάρων σε πολυφαινόλες κόκκινου κρασιού, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του VEGF ο οποίος ενεργοποιείται από τον PDGF και από άλλους αυξητικούς παράγοντες [Oak 2003].

Συνολικά λοιπόν φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού δρουν ανασταλτικά στη φλεγμονώδη διαδικασία κατά την έναρξη της αθηρωμάτωσης, αφού αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων. Επίσης, αυξάνουν την αγγειοδιαστολή μέσω αύξησης του NO και άλλων αγγειοδιασταλτικών παραγόντων, ενώ έμμεσα, με τη βοήθεια του NO, δρουν ανασταλτικά και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Είναι λοιπόν ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα συστατικά ενός πολύ διαδεδομένου ποτού δρουν σε πολλά σημεία της αθηρωματικής διαδικασίας και της αγγειακής λειτουργίας γενικότερα, ασκώντας πολύτιμη ευεργετική δράση.



Σχήμα 6. Προστατευτικές δράσεις των πολυφαινολών του κρασιού στο αρτηριακό τοίχωμα. [Dell' Agli 2004]. PDGF: αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, VEGF: αγγειακός, ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, eNOS: ενδοθηλιακή συνθετάση του NO, NO: μονοξείδιο του αζώτου, EDHF: ενδοθηλιακός υπερπολωτικός παράγοντας, PGL2: προστακυκλίνη 2, ELAM: ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης των λευκοκυττάρων.

1.10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το κόκκινο κρασί έχει αποδεδειγμένες ευεργετικές δράσεις στην αγγειακή λειτουργία, τόσο εξαιτίας του αλκοόλ που περιέχει, όσο και των ισχυρών αντιοξειδωτικών ουσιών που διαθέτει. Οι δράσεις αυτές του κόκκινου κρασιού και των επιμέρους συστατικών του έχουν μελετηθεί σε βάθος από επιδημιολογικές μελέτες, αλλά και πολλές μελέτες in vitro οι οποίες όμως δεν έχουν επιβεβαιωθεί στο σύνολό τους εάν ισχύουν και σε in vivo συνθήκες. Επίσης, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονιστεί το γεγονός ότι η δράση του κόκκινου κρασιού έχει μελετηθεί περισσότερο κατά τη μακροχρόνια κατανάλωσή του, ενώ η οξεία μεταγευματική δράση του περιορίζεται στα αποτελέσματα ελάχιστων μελετών, κυρίως σε υγιείς πληθυσμούς.

Παραμένει λοιπόν αδιευκρίνιστη η επίδραση που έχει στην αγγειακή λειτουργία η κατανάλωση ενός ποτηριού κόκκινου κρασιού στο άμεσο στάδιο μετά τη λήψη του, ιδιαίτερα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο στους οποίους και συνίσταται κυρίως η καθημερινή λήψη κόκκινου κρασιού και φυσικά είναι αδιερεύνητοι οι μηχανισμοί που διέπουν τη δράση αυτή. Ακόμη, ένα σημαντικό ερώτημα που παραμένει αναπάντητο είναι εάν η παρατηρούμενη δράση του κόκκινου κρασιού οφείλεται στο αλκοόλ που περιέχει ή στις πολλές αντιοξειδωτικές του ουσίες.

Η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του κόκκινου κρασιού και των συστατικών του στην αγγειακή λειτουργία και η μελέτη γύρω από το εάν το αλκοόλ ή οι πολυφαινόλες ευθύνονται για τη επίδραση που έχει στα αγγεία, είναι δυνατό στη συνέχεια να δώσει το ερέθισμα για νέες μελέτες της οξείας μεταγευματικής του δράσης του. Αυτό μπορεί να γίνει με το συνδυασμό της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού με γνωστούς επιβαρυντικούς για τα αγγεία παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα, ή με άλλα εξίσου σημαντικά συστατικά της μεσογειακής διατροφής όπως το ελαιόλαδο, το οποίο όμως σε μεταγευματικό στάδιο ασκεί επιβαρυντική για τα αγγεία επίδραση, λόγω της μεταγευματικής υπερτριγλυκεριδαιμίας που προκαλεί.

Είναι λοιπόν εύλογα κάποια ερωτήματα στα οποία η διεθνής βιβλιογραφία δεν έχει δώσει ακόμη απάντηση.

I. Ποια είναι η οξεία επίδραση του κόκκινου κρασιού στην αγγειακή λειτουργία ασθενών με στεφανιαία νόσο;

II. Με ποιους μηχανισμούς επιδρά το κόκκινο κρασί στα αγγεία των στεφανιαίων ασθενών στο οξύ μεταγευματικό στάδιο;

III. Η οξεία επίδραση του κόκκινου κρασιού στα αγγεία είναι αποτέλεσμα της δράσης του αλκοόλ που περιέχει, ή των αντιοξειδωτικών του;

IV. Ποια είναι η επίδραση του κόκκινου κρασιού στην αγγειακή λειτουργία όταν συνδυάζεται με γνωστούς επιβαρυντικούς γι' αυτή παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα;

V. Είναι δυνατό το κόκκινο κρασί να αντισταθμίσει τις βλαβερές δράσεις που προκαλεί άμεσα στα αγγεία το κάπνισμα ενός τσιγάρου;

VI. ποια είναι η επίδραση του κόκκινου κρασιού στην αγγειακή λειτουργία όταν συνδυάζεται με ένα εξίσου σημαντικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής, το ελαιόλαδο σε μεταγευματικό στάδιο;

VII. Είναι δυνατό το κόκκινο κρασί να αντισταθμίσει την αγγειακή δυσλειτουργία που προκαλεί η κατανάλωση γεύματος με ελαιόλαδο λόγω της μεταγευματικής υπερτριγλυκεριδαιμίας;

Ύστερα από όλα αυτά τα ερωτήματα, είναι φανερό ότι είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός μιας σειράς ερευνητικών μελετών οι οποίες να διερευνήσουν σε πρώτη φάση την οξεία μεταγευματική επίδραση του κόκκινου κρασιού στην αγγειακή λειτουργία και τους μηχανισμούς που τη διέπουν. Στη συνέχεια και με βάση τους μηχανισμούς που βρέθηκαν να μελετήσουν τη συνδυασμένη δράση του κόκκινου κρασιού στην αγγειακή λειτουργία, με γνωστούς επιβαρυντικούς για τα αγγεία παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα ενός τσιγάρου και η μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία που προκαλεί ένα γεύμα πλούσιο σε ελαιόλαδο.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Red Wine Acutely Induces Favorable Effects on Wave Reflections and Central Pressures in Coronary Artery Disease Patients. Kalliopi N. Karatzi, Christos M. Papamichael, Emmanouil N. Karatzis, Theodoros G. Papaioannou, Konstantinos A. Aznaouridis, Paraskevi P. Katsichti, Kimon S. Stamatelopoulos, Antonis Zampelas, John P. Lekakis, and Myron E. Mavrikakis. **AJH 2005; 18:1161–1167.**

2.2. Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Kalliopi Karatzi, Konstantinos Aznaouridis, Theodoros Papaioannou, Athanassios Protogerou, Kimon Stamatelopoulos, Antonis Zampelas, John Lekakis, Myron Mavrikakis. **Am Heart J 2004; 147:e5**

2.3. Acute smoking induces endothelial dysfunction in healthy smokers. Is this reversible by red wine's antioxidant constituents? Kalliopi Karatzi, Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Voidonikola, John Lekakis, Antonis Zampelas. **J Am Coll Nutr (in press).**

2.4. Combined acute effects of red wine consumption and cigarette smoking on hemodynamics of young smokers. Christos Papamichael, Kalliopi Karatzi, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Katsichti, Antonis Zampelas , John Lekakis. **J Hypertens, 2006; 24: 1287 – 1292.**

2.5.Postprandial improvement of endothelial function by red wine and olive oil antioxidants: A synergistic effect of components of the Mediterranean Diet. Kalliopi Karatzi, Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Th. Voidonikola, Giorgia D. Vamvakou, John Lekakis, Antonis Zampelas.

2.6. Acute beneficial effects of components of the Mediterranean diet on blood pressure and arterial wave reflections. Christos Papamichael, Kalliopi Karatzi, Theodore G. Papaioannou, Emmanouil Karatzis, Paraskevi Katsichti, Vasilis Sideris, Nikolaos Zakopoulos, Antonis Zampelas , John Lekakis.

2.1. Το κόκκινο κρασί, σε οξεία φάση, προκαλεί ευεργετικές δράσεις στα ανακλώμενα κύματα και τις κεντρικές πιέσεις σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο

Η εργασία αυτή είναι δημοσιευμένη στο περιοδικό American Journal of Hypertension ως:

Red Wine Acutely Induces Favorable Effects on Wave Reflections and Central Pressures in Coronary Artery Disease Patients

Kalliopi N. Karatzi, Christos M. Papamichael, Emmanouil N. Karatzis, Theodoros G. Papaioannou, Konstantinos A. Aznaouridis, Paraskevi P. Katsichti, Kimon S. Stamatelopoulos, Antonis Zampelas, John P. Lekakis, and Myron E. Mavrikakis. **AJH 2005; 18:1161–1167.**

Περίληψη

Σκοπός: Η διερεύνηση των οξέων δράσεων του κόκκινου κρασιού στις αορτικές πιέσεις και την αρτηριακή σκληρία ασθενών με στεφανιαία νόσο.

Μέθοδοι: Δεκαπέντε ασθενείς με στεφανιαία νόσο συμμετείχαν σε μια διπλά τυφλή, διασταυρούμενη μελέτη η οποία αποτελούνταν από 2 εργαστηριακές ημέρες. Κάθε εθελοντής κατανάλωνε είτε 250 ml κανονικού, είτε 250 ml απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Τα ανακλώμενα κύματα, εκφραζόμενα ως δείκτης ενίσχυσης (AIχ), καθώς και οι κεντρικές και περιφερικές πιέσεις (BP) εκτιμήθηκαν στη νηστεία και στα 30, 60 και 90 λεπτά μεταγευματικά.

Αποτελέσματα: Τόσο το κανονικό, όσο και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί προκάλεσαν σημαντική μείωση στο AIχ κατά 10,5% ± 1,4% (ρ= 0,001) και κατά 6,1% ± 1,4% (ρ= 0,011) αντίστοιχα, ενώ καμιά σημαντική αλλαγή δε σημειώθηκε στη μέση αρτηριακή πίεση και στο χρόνο των ανακλώμενων κυμάτων τα οποία εκφράζουν την ταχύτητα των κυμάτων παλμού. Οι περιφερικές συστολικές πιέσεις δεν μεταβλήθηκαν με τα δύο είδη κρασιού, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις περιφερικές και κεντρικές διαστολικές πιέσεις μετά από την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (ρ= 0,03 και ρ= 0,035 αντίστοιχα). Οι κεντρικές συστολικές πιέσεις μειώθηκαν μετά την κατανάλωση κανονικού (-7,4 ± 2,4 mmHg, ρ=0,05) και απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (- 5,4 ± 2,7 mmHg, ρ=0,019).

Συμπεράσματα: Οι δύο τύποι κόκκινου κρασιού προκάλεσαν ευεργετικά αποτελέσματα σε οξεία φάση, στα ανακλώμενα κύματα και τις κεντρικές συστολικές πιέσεις, ενώ καμία τέτοια δράση δεν ήταν εμφανής στη βραχιόνια αρτηρία. Επομένως, τα ευρήματα αυτά μπορούν να αποδοθούν κυρίως στις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού, γεγονός που τις αναγάγει σε ένα πιθανό μέσο τουλάχιστον οξείας μείωσης των αυξημένων κυμάτων ανάκλασης, της αρτηριακής σκληρίας και των κεντρικών πιέσεων σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.

Εισαγωγή

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, ειδικά στη μορφή του κόκκινου κρασιού, έχει εμφανή καρδιοπροστατευτική δράση. Φαίνεται ότι τόσο το αλκοόλ, όσο και οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού αυξάνουν την HDL χοληστερόλη, μειώνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ενισχύουν την ινωδόλυση και την αγγειοδιαστολή [1].

Παρόλο που υπάρχουν αποδείξεις που υποδεικνύουν ότι το κόκκινο κρασί και τα συστατικά του βελτιώνόυν την ενδοθηλιακή λειτουργία, τόσο σε οξεία [2, 3], όσο και σε χρόνια χρήση του [4], υπάρχει ελλιπής γνώση σχετικά με τις πιθανές δράσεις του στις ιδιότητες των μεγάλων αρτηριών. Μέχρι στιγμής έχει υποστηριχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην ενδοθηλιακή λειτουργία που σχετίζεται με την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) και στην αρτηριακή σκληρία [5]. Επίσης η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ στους άνδρες σχετίζεται με την ταχύτητα των κυμάτων παλμού με μια καμπύλη σχήματος J, υποδεικνύοντας ότι η μέτρια ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ (2 με 3 ποτά την ημέρα) συσχετίζεται με χαμηλότερη ταχύτητα κυμάτων παλμού συγκριτικά με υψηλότερη ημερήσια κατανάλωση ή με πλήρη αποχή από το αλκοόλ [6]. Αντίθετα, το αλκοόλ μειώνει την αρτηριακή σκληρία σε υγιή άτομα στο οξύ μεταγευματικό στάδιο [7]. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ίσως υπάρχει διαφορά ανάμεσα στην οξεία και τη χρόνια δράση του αλκοόλ στην αρτηριακή σκληρία. Επιπρόσθετα, έχουν καταγραφεί αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τις οξείες και τις χρόνιες δράσεις του αλκοόλ στις κεντρικές και τις περιφερικές πιέσεις [8]. Τα δεδομένα δε που αφορούν στην επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών του κόκκινου κρασιού στην αρτηριακή σκληρία και τις αιμοδυναμικές παραμέτρους είναι ελλιπή. Επίσης η επίδραση του κόκκινου κρασιού (με ή χωρίς αλκοόλ) στους προαναφερθέντες παράγοντες σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο

παραμένει αδιερεύνητη. Επομένως, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμήσει την οξεία μεταγευματική επίδραση του κόκκινου κρασιού (με ή χωρίς αλκοόλ) στα ανακλώμενα κύματα, την αρτηριακή σκληρία και τις κεντρικές πιέσεις.

Μέθοδοι

Πληθυσμός της μελέτης

Ο πληθυσμός της μελέτης επιλέχθηκε ανάμεσα σε άρρενες ασθενείς με αγγειογραφικά αποδεδειγμένη στεφανιαία νόσο, οι οποίοι παρακολουθούνταν από την Θεραπευτική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» για προγραμματισμένο έλεγχο. Ο δείκτης ενίσχυσης των κυμάτων θεωρήθηκε ως η κύρια μεταβλητή που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη και το μέγεθος του δείγματος αρχικά υπολογίστηκε βασισμένο στην επιδιωκόμενη μεταβολή του ΑΙχ μετά από την κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Δεδομένης της μεταβλητότητας των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του ΑΙχ [9], η μικρότερη στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ΑΙχ που μπορούσε να ανιχνευτεί μετά από κάποια παρέμβαση θα έπρεπε να ήταν μεγαλύτερη από 5%. Επομένως, ο αριθμός των 15 ατόμων ως δείγμα της μελέτης θεωρήθηκε ως αρκετός (80% δύναμη της μελέτης) ώστε να παρουσιάσει μία μεταβολή του ΑΙχ της τάξης του 6% (α=0,05 και β=0,20).

Δεκαπέντε άνδρες συμμετείχαν στην μελέτη (μέση ηλικία 52,4 ± 9,7 έτη, δείκτης μάζας σώματος [ΔΜΣ] 28,3 ± 1,8 kg/ m^2) (Πίνακας 1). Η στεφανιαία αγγειογραφία είχε πραγματοποιηθεί μέσα στους προηγούμενους 6 μήνες και καμία διαδικασία επαναιμάτωσης δεν διεξήχθη του προηγούμενους 3 μήνες. Η ύπαρξη διαβήτη, παχυσαρκίας, οποιασδήποτε νόσου του ήπατος ή των νεφρών, καθώς και ενδοκρινολογικές παθήσεις, και η χορήγηση αντιοξειδωτικών φαρμάκων ήταν κριτήρια εξαίρεσης των εθελοντών. Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν νιτρώδη, β - αναστολείς και αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Εννέα από αυτούς (60%) λάμβαναν αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης και 2 (13,3%) αναστολείς των διαύλων ασβεστίου. Επιπρόσθετα, οι εθελοντές ήταν πρώην καπνιστές και η ημερήσια κατανάλωσή τους σε αλκοόλ ήταν σε συμφωνία με τις συστάσεις (20 – 30 γρ. αλκοόλ την ημέρα). Όλοι οι ασθενείς έδωσαν γραπτή συμφωνία πριν ξεκινήσει η συμμετοχή τους στη μελέτη και το πρωτόκολλο και η διαδικασία απόκτησης της γραπτής συμφωνίας των εθελοντών εγκρίθηκαν από την αρμόδια επιστημονική επιτροπή.

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης (n=15)

	ΜΕΣΟΣ (τυπική απόκλιση)
Ηλικία (έτη)	52.4±9.7
ΔΜΣ (kg/m^2)	28.3±1.8
	ΑΡΙΘΜΟΣ (ποσοστό)
Υπέρταση	7 (46.7 %)
Υπερλιπιδαιμία	8 (53.3 %)
Οικογενειακό ιστορικό	5 (33.3 %)
Έμφραγμα μυοκαρδίου	12 (80 %)
Ασταθής στηθάγχη	13 (86.7 %)

Πειραματικό πρωτόκολλο

Οι εθελοντές τυχαιοποιήθηκαν έτσι ώστε να καταναλώσουν είτε ένα ποτήρι 250 ml κόκκινου, είτε 250 ml απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Η μελέτη ήταν διπλά τυφλή, διασταυρούμενη και αποτελούνταν από 2 εργαστηριακές ημέρες. Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα ζητήθηκε από τους ασθενείς να προσέλθουν στο αγγειολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», μετά από δωδεκάωρη νηστεία και αποχή από το κάπνισμα, ενώ όλα τα αγγειοδραστικά φάρμακα δεν ελήφθησαν ολόκληρο το 24ωρο που προηγούνταν κάθε εργαστηριακής ημέρας. Όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν πρωινές ώρες και μετά από δεκαπέντε λεπτά ανάπαυση σε ηρεμία και σε θερμοκρασία 22 -25 βαθμούς Κελσίου. Η αρτηριακή πίεση και η αρτηριακή σκληρία μετρήθηκαν τόσο στη φάση της νηστείας, όσο και 30, 60 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωση κρασιού. Όλοι οι ασθενείς ολοκλήρωσαν τη μελέτη χωρίς ενοχλήσεις ή προβλήματα προερχόμενα από το αλκοόλ.

Προετοιμασία κρασιού

Το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί (<1% αιθανόλη) παρασκευάστηκε με λυοφιλίωση του κανονικού κόκκινου κρασιού (12% αιθανόλη, Grand Reserve 1996, Μπουτάρη, Ελλάδα) στους -50ºC και σε 1 mb πίεση για 6 ώρες, χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Cryodos 45 (Telstar, Ισπανία). Το συμπυκνωμένο κόκκινο κρασί (±50%) που προέκυπτε από τη λυοφιλίωση στη συνέχεια διαλυόταν με εμφιαλωμένο νερό μέχρι που έφτανε τον αρχικό του όγκο. Η διαδικασία Folin – Ciocalteau [10] χρησιμοποιήθηκε ώστε να εκτιμηθεί η ολική συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στα δύο κρασιά που χρησιμοποιήθηκαν

στο πρωτόκολλο. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο UVIKON 931 της Kontron Instruments (Μιλάνο, Ιταλία) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μικρογραμμάρια καφεϊκού οξέος ανά 100ml. Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεση (HPLC) [11] και για την αέρια χρωματογραφία (GC/MSD) χρησιμοποιήθηκαν το μοντέλο 1050 UV-DAD/FLD της Hewlett Packard με αυτόματο δειγματολήπτη (Palo Alto, CA) και το μοντέλο 6890 της Hewlett Packard με ανιχνευτή και αυτόματο δειγματολήπτη αντίστοιχα, για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών του κόκκινου κρασιού με ή χωρίς αλκοόλ. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν duo – trio δοκιμασίες και ηδονική κλίμακα προκειμένου να εκτιμηθεί εάν το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί είναι καλά αποδεκτό από τους εθελοντές που θα το καταναλώσουν και εάν είναι δυνατό να αναγνωριστεί η έλλειψη αλκοόλ στη γεύση του.

Αρτηριακή σκληρία, ανακλώμενα κύματα και κεντρικές πιέσεις

Η αρτηριακή σκληρία και τα ανακλώμενα κύματα εκτιμήθηκαν αναίμακτα με τη χρήση της τονομετρίας της κερκιδικής αρτηρίας και της ανάλύσης των κυμάτων παλμού [12, 13]. Η κύρια αρχή της μεθόδου βασίζεται σε: 1) τη διαμόρφωση της κυματομορφής της κεντρικής αορτικής πίεσης από την κυματομορφή της περιφερική πίεσης, χρησιμοποιώντας κατάλληλες μαθηματικές εξισώσεις και 2) τον προσδιορισμό της ενίσχυσης της κεντρικής αορτικής πίεσης εξαιτίας των ανακλώμενων κυμάτων πίεσης. Η τονομετρία της κερκιδικής αρτηρίας πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας έναν υψηλής πιστότητας μετατροπέα τοποθετημένο στην άκρη ενός τονόμετρου με τη μορφή στυλό (Millar Instruments, Inc, Houston, TX). Η ανάλυση των παραγόμενων κυματομορφών της αορτικής πίεσης πραγματοποιείται με το σύστημα Sphygmocor (ATCOR, Medical, Σύδνεϋ, Αυστραλία). Η μέτρηση των καταγραφών των περιφερικών πιέσεων γίνεται διαμέσου της μέτρησης της βραχιόνιας συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης με ένα σφυγμομανόμετρο. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και υπολογίζεται η μέση τιμή της συστολικής και της διαστολικής πίεσης.

Ο δείκτης ενίσχυσης χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τα ανακλώμενα κύματα και υπολογίζεται από το λόγω της ενίσχυσης της κεντρικής πίεσης οφειλόμενης σε ανακλάσεις κυμάτων πίεσης προς την αορτική πίεση παλμού. Το μέγεθος και ο χρόνος των αρτηριακών ανακλώμενων κυμάτων εξαρτώνται από τις ελαστικές ιδιότητες των αρτηριακών τοιχωμάτων [14]. Η τονομετρία και η ανάλυση των κυμάτων παλμού έχουν περιγραφεί λεπτομερώς από προηγούμενες μελέτες [15]. Όσο πιο σκληρό είναι το αρτηριακό

δένδρο, τόσο μεγαλύτερη είναι η ενίσχυση των κεντρικών αορτικών πιέσεων (αυξημένο AIχ) και οφείλεται στην ταχύτερη επιστροφή των ανακλώμενων κυμάτων κατά τη συστολή.

Επειδή το AIχ επηρεάζεται από τον καρδιακό ρυθμό [16], ο οποίος είναι αρκετά διαφορετικός σε κάθε ασθενή και ίσως μεταβάλλεται από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού, χρησιμοποιήθηκε ένας δείκτης ομαλοποίησης του καρδιακού ρυθμού στους 75 χτύπους ανά λεπτό (AI 75) σύμφωνα με ανάλογες δημοσιεύσεις σχετικά με αυτό το ζήτημα [16].

Η ταχύτητα των κυμάτων παλμού η οποία χαρακτηρίζει την αρτηριακή σκληρία εκτιμήθηκε έμμεσα από το χρόνο άφιξης (Δt, msec) των ανακλώμενων κυμάτων στην αορτή. Το Δt αντιπροσωπεύει το χρόνο που χρειάζονται τα κύματα πίεσης να ταξιδέψουν από τις κεντρικές στις περιφερικές αρτηρίες και να επιστρέψουν πίσω στην αορτή εξαιτίας των κυμάτων ανάκλασης. Αυτός ο χρόνος υπολογίζεται εύκολα εντοπίζοντας το σημείο καμπής (εξαιτίας των κυμάτων ανάκλασης) στο συστολικό κομμάτι της κυματομορφής της αορτικής πίεσης. Ο χρόνος των κυμάτων ανάκλασης συχνά χρησιμοποιείται ως ένας έμμεσος τρόπος υπολογισμού της ταχύτητας των κυμάτων παλμού, ενώ θεωρείται ως αμεσότερος τρόπος υπολογισμού της αρτηριακής σκληρίας συγκριτικά με τον AIχ [16].

Το Δt εξαρτάται από το ύψος του ατόμου και επομένως δεν μπορεί να συγκριθεί απευθείας με το αντίστοιχο Δt άλλων ατόμων. Ως αποτέλεσμα αυτού, μία ανάλυση του Δt μεταξύ των ατόμων θα πρέπει πάντα να ελέγχει τις διαφορές ύψους των ατόμων αυτών. Στην παρούσα μελέτη προσαρμογή ως προς το ύψος δεν κρίθηκε απαραίτητη, αφού δεν έγιναν συγκρίσεις ανάμεσα σε διαφορετικά γκρουπ ή διαφορετικούς ανθρώπους. Η ανάλυση βασίστηκε σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου ατόμου έτσι ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση του κόκκινου κρασιού στο Δt. Σε ένα τέτοιο σχεδιασμό, οι παρατηρούμενες μεταβολές του Δt αποδίδονται σε παράγοντες άλλους πέρα από το ύψος.

Η μέση αρτηριακή πίεση υπολογίστηκε με ολοκλήρωση των κυματομορφών της κερκιδικής αρτηριακής πίεσης, αντί για τον τύπο «1/3»:

$$MAP = \frac{\sum_{i=to}^{td} P_i}{n}$$

όπου to, ο χρόνος κατά την έναρξη της συστολής, td, ο χρόνος κατά το τέλος της διαστολικής πίεσης και ο συνολικός αριθμός των τιμών πίεσης, όπως καταγράφηκαν από την τονομετρία.

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν για ομοιογένεια της διακύμανσης και για κανονική κατανομή. Οι παρακάτω αναλύσεις έγιναν σκοπεύοντας να εκτιμήσουν: 1) τη συνολική επίδραση των κρασιών καθ' όλη τη διάρκεια των 90 λεπτών και 2) τη μέγιστη επίδραση των δύο τύπων κόκκινου κρασιού. Οι μεταβλητές που μετρήθηκαν στη νηστεία, 30, 60 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωση κάθε τύπου κρασιού εκτιμήθηκαν με ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και με student t ελέγχους για πολλαπλές συγκρίσεις, διορθωμένους κατά Bonferroni. Επιπρόσθετα μια ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τα δύο ποτά σε τέσσερις χρονικές περιόδους (νηστεία, 30, 60 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωση κρασιού) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμήσει τις συγκριτικές επιδράσεις των δύο ποτών στις προς μέτρηση μεταβλητές. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε σχεδιασμό επαναλαμβανόμενων μετρήσεων η καμπύλη που ενώνει του μέσους (και η ανάλυση της διακύμανσης) ίσως να μην είναι ένας καλός τρόπος περιγραφής της τυπικής καμπύλης αντίδρασης του κάθε ατόμου. Όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως οι επιδράσεις που μελετώνται με την ανάλυση της διακύμανσης ίσως να υποεκτιμώνται και επομένως χωριστή ανάλυση για κάθε άτομο μπορεί να αποκαλύψει περισσότερες πληροφορίες [17]. Η μέγιστη μεταβολή για κάθε μεταβλητή η οποία προκαλείται μετά από την κατανάλωση κάποιου από τα δύο κρασιά, εκτιμάται ως η μέγιστη ή ελάχιστη τιμή που παρατηρείται μείον την αντίστοιχη τιμή στη νηστεία. Η σύγκριση της μέγιστης αντίδρασης των αιμοδυναμικών παραμέτρων έγινε με τη χρήση μη παραμετρικών Wilcoxon ελέγχων. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος ± τυπική απόκλιση (SD) εκτός και αν δηλώνετε κάτι διαφορετικό; η τιμή $p< 0,05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

Αποτελέσματα

Η ανάλυση τόσο του κανονικού, όσο και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού έδειξε ότι τα δύο ποτά είχαν παρόμοια ποιότητα και ολική συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών (658 μg/100ml καφεϊκού οξέος για το κανονικό κόκκινο κρασί και 650 μg/100ml καφεϊκού οξέος για το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί) και ότι σε γενικές γραμμές η μόνη διαφοροποίηση ανάμεσά τους ήταν η περιεκτικότητά τους σε αλκοόλ (12% με 1% αιθανόλη αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα από τους ελέγχους duo – trio και την ηδονική

κλίμακα έδειξαν ότι οι εθελοντές δεν μπορούσαν να διαχωρίσουν τους δύο τύπους κρασιού, αφού δεν μπορούσαν να αναγνωρίσουν την παρουσία ή απουσία του αλκοόλ.

Οξείες δράσεις του κόκκινου κρασιού στις περιφερικές και αορτικές αιμοδυναμικές παραμέτρους

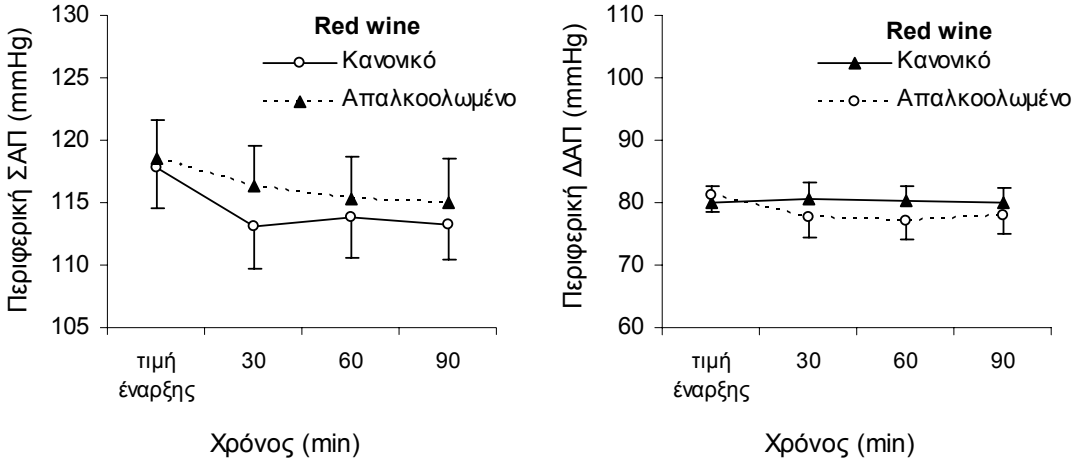
Συστολική πίεση Η περιφερική συστολική πίεση δεν επηρεάστηκε από τον τύπο του κρασιού (Σχήμα 1, Πίνακας 2). Αντίθετα η κεντρική συστολική πίεση μειώθηκε σημαντικά τόσο από το κανονικό, όσο και από το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί, συγκριτικά με τις τιμές νηστείας (Σχήμα 1Β). Η μέγιστη μεταβολή της κεντρικής συστολικής πίεσης διέφερε σημαντικά ανάμεσα στους δύο τύπους κρασιού (Πίνακας 2).

Διαστολική πίεση Το κανονικό κόκκινο κρασί δεν είχε καμία σημαντική επίδραση ούτε στην κεντρική, ούτε στην περιφερική διαστολική πίεση, όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Παρόλ' αυτά, το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί προκάλεσε σημαντική μείωση τόσο στην περιφερική, όσο και στην κεντρική διαστολική πίεση. Η μέγιστη αντίδραση της διαστολικής πίεσης έτεινε να είναι υψηλότερη μετά την κατανάλωση απαλκοολωμένου συγκριτικά με το κανονικό κόκκινο κρασί, αν και η τάση αυτή δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (Πίνακας 2).

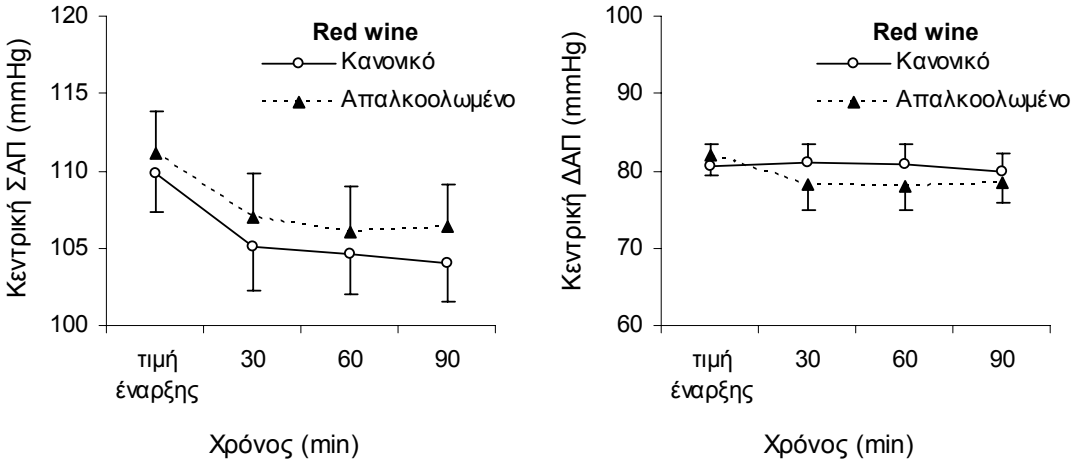
Πίεση παλμού Η περιφερική πίεση παλμού δεν μεταβλήθηκε σημαντικά με κανένα από τα δύο κρασιά. Από την άλλη πλευρά, το κανονικό κόκκινο κρασί προκάλεσε μείωση στην κεντρική πίεση παλμού. Η μέγιστη μεταβολή της περιφερικής και της κεντρικής πίεσης παλμού ανά άτομο ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν καταναλώθηκε κανονικό συγκριτικά με απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί (Πίνακας 2) (Σχήμα 2).

Μέση πίεση Κανένα κρασί δεν επηρέασε σημαντικά τη μέση πίεση κατά τη διάρκεια των 90 λεπτών της μελέτης.

Σχήμα 1 Οξεία επίδραση του κανονικού και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού σε α) περιφερική και β) κεντρική συστολική και διαστολική πίεση (ΣΑΠ, ΔΑΠ).



(a) Περιφερικές πιέσεις. Μια σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην περιφερική διαστολική πίεση μετά την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (ANOVA: p=0.03, F=3.99).



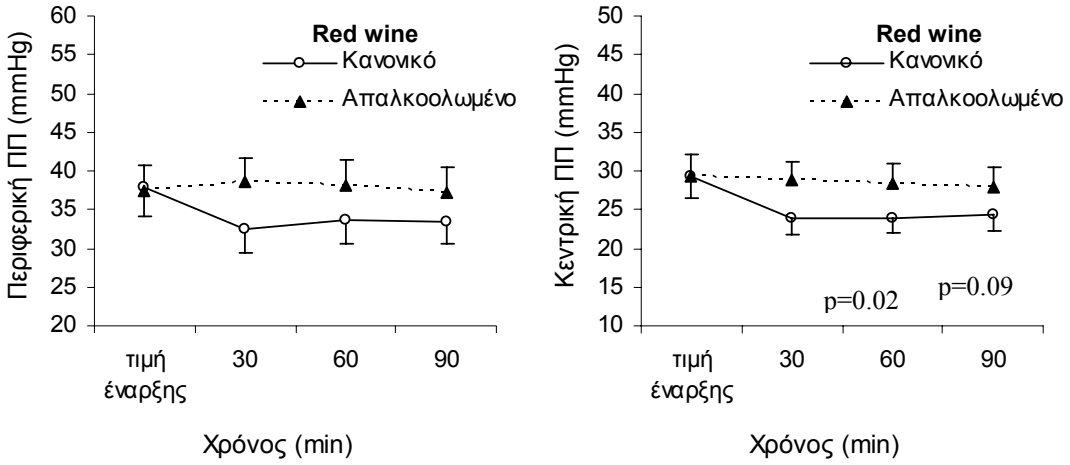
(b) Κεντρικές πιέσεις. Συνολική δράση του κανονικού και απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού στην κεντρική συστολική πίεση (ANOVA: p=0.019, F=3.67 και p=0.05, F=3.47, αντίστοιχα). Μια σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην κεντρική διαστολική μετά την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιο (ANOVA: p=0.035, F=3.97). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών.

Πίνακας 2 Τιμές νηστείας και μέγιστες αιμοδυναμικές μεταβολές μετά την κατανάλωση κανονικού και απαλκοολωμένου κρασιού (ανεξαρτήτως χρόνου)

Μεταβλητή		**Κανονικό κρασί**	**Απαλκοολωμένο κρασί**	**p**
AIx (%)	Νηστεία	26.5±2.6	27.6±2.3	0.404
	Μέγιστη μεταβολή	-11.8±5.6	-8.3±4.4	0.066
AI 75 (%)	Νηστεία	22.8±1.8	23.0±1.8	0.866
	Μέγιστη μεταβολή	-10.5±1.4	-6.1±1.4	0.036
Μέση πίεση (mmHg)	Νηστεία	92.7±2.3	94.0±2.3	0.508
	Μέγιστη μεταβολή	-2.7±2.3	-3.8±2.1	0.630
Περιφερική συστολική πίεση (mmHg)	Νηστεία	117.7±3.2	118.6±3.0	0.716
	Μέγιστη μεταβολή	-6.7±2.7	-2.7±2.4	0.412
Περιφερική διαστολική πίεση (mmHg)	Νηστεία	80.0±2.8	81.3±2.6	0.547
	Μέγιστη μεταβολή	-1.4±1.6	-3.9±2.2	0.339
Περιφερική πίεση παλμού (mmHg)	Νηστεία	37.8±3.7	37.3±3.3	0.789
	Μέγιστη μεταβολή	-6.9±2.5	0.2±1.8	0.012
Κεντρική συστολική πίεση (mmHg)	Νηστεία	109.8±2.4	111.0±2.7	0.573
	Μέγιστη μεταβολή	-7.4±2.4	-5.4±2.7	0.589
Κεντρική διαστολική πίεση (mmHg)	Νηστεία	80.7±2.8	81.9±2.6	0.557
	Μέγιστη μεταβολή	-1.3±1.5	-4.8±1.9	0.157
Κεντρική πίεση παλμού (mmHg)	Νηστεία	29.3±2.9	29.3±2.7	1.000
	Μέγιστη μεταβολή	-7.1±1.9	-2.3±1.6	0.023
Καρδιακός Ρυθμός(bpm)	Νηστεία	67.1±3.4	65.5±3.0	0.274
	Μέγιστη μεταβολή	3.1±1.5	4.1±0.9	0.102

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα. AI 75, δείκτης ενίσχυσης διορθωμένος για καρδιακό ρυθμό 75 παλμών. P-values αντιπροσωπεύει τη σύγκριση των τιμών νηστείας και των μέγιστων μεταβολών ανάμεσα στο κανονικό και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί

Σχήμα 2 Οξεία επίδραση του κανονικού και απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού στην κεντρική και περιφερική πίεση παλμού (ΠΠ).



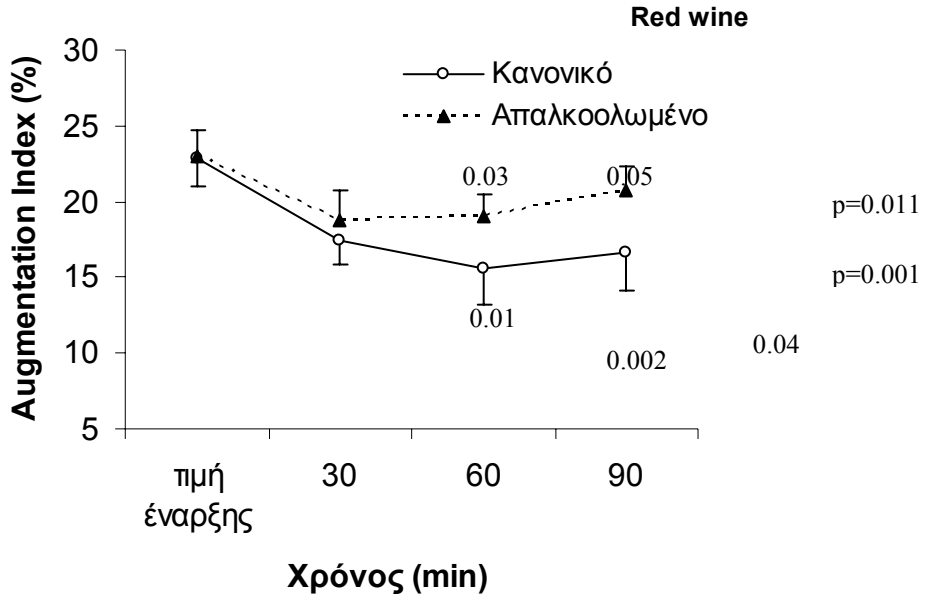
Μια σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο στην κεντρική πίεση παλμού μετά την κατανάλωση κανονικού κρασιού (ANOVA: p=0.006, F=6.16). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών.

Οξείες δράσεις του κόκκινου κρασιού στα ανακλώμενα κύματα και την αρτηριακή σκληρία

Η κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού προκάλεσε τη μέγιστη μείωση του AIχ (διορθωμένο για καρδιακό ρυθμό, AI 75) έως και 7%, η οποία παρέμεινε σημαντική 30, 60 και 90 λεπτά μετά την κατανάλωσή του (Σχήμα 3). Το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί επίσης προκάλεσε σημαντική μείωση στο AI 75 κατά σχεδόν 5%, 30 και 60 λεπτά μετά την κατανάλωσή του και στη συνέχεια επέστρεψε στις τιμές νηστείας στα 90 λεπτά (Σχήμα 3). Η μέση μέγιστη μεταβολή του AIχ του δείγματος (ανά άτομο) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη μετά την κατανάλωση κανονικού συγκριτικά με το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί μόνο όταν έγινε διόρθωση για τις μεταβολές του καρδιακού ρυθμού (Πίνακας 2). Μια σημαντική αύξηση στον καρδιακό ρυθμό παρατηρήθηκε μετά την κατανάλωση και των δύο τύπων

κρασιού κατά 2,5 – 5 χτύπους/ λεπτό, κάνοντας απαραίτητη τη διόρθωση του AIχ και τη χρήση του AI 75 αντί για αυτόν. Ο χρόνος άφιξης των ανακλώμενων κυμάτων στην κεντρική αορτή (Δt) παρέμεινε στατιστικά ανεπηρέαστος από την κατανάλωση των δύο κρασιών, υποδεικνύοντας ότι δεν συνέβη κάποια μεταβολή στην ταχύτητα των κυμάτων παλμού.

Σχήμα 3 Οξεία επίδραση του κανονικού και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού στο δείκτη ενίσχυσης (ομαλοποιημένο στου 75 παλμούς το λεπτό)



Συνολικές επιδράσεις του κανονικού (ANOVA: p=0.001, F=6.17) και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (ANOVA: P=0.011, F=4.2) στο δείκτη ενίσχυσης. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, η επίδραση της οξείας κατανάλωσης είτε του κανονικού, είτε του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού στις αιμοδυναμικές παραμέτρους των αρτηριών διερευνήθηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στα κύματα ανάκλασης και στην αρτηριακή σκληρία, όπως και μείωση στην κεντρική συστολική πίεση μετά την κατανάλωση και των δύο τύπων κρασιού. Από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην περιφερική συστολική πίεση. Τα ευρήματα αυτά προσφέρουν επιπρόσθετη πληροφόρηση σχετικά με τις οξείες επιδράσεις του κόκκινου κρασιού στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την αρτηριακή σκληρία, αφού οι

γνώσεις μας περιορίζονται μόνο σε υγιείς εθελοντές [7]. Τέτοια ευρήματα που προκύπτουν από μικρής διάρκειας κατανάλωση αλκοόλ και ειδικά κόκκινου κρασιού από ασθενείς με στεφανιαία νόσο είναι ιδιαίτερα χρήσιμα, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί οι ασθενείς συμβουλεύονται από το γιατρό να καταναλώνουν κρασί σε καθημερινή βάση.

Κύματα ανάκλασης και αρτηριακή σκληρία

Ο δείκτης ενίσχυσης μειώθηκε για 60 λεπτά μετά από την κατανάλωση και των δύο κρασιών. Παρόλ' αυτά το κόκκινο κρασί που περιείχε αλκοόλ επέκτεινε τη μείωση του AIχ έως τα 90 λεπτά μετά την κατανάλωσή του. Αυτά τα ευρήματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα [7] σε οχτώ υγιείς νορμοτασικούς εθελοντές. Από την άλλη πλευρά, τα δικά μας ευρήματα επίσης υποδεικνύουν μια σημαντική μείωση του AIχ με το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί για 60 λεπτά μεταγευματικά, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι τα συστατικά (κυρίως αντιοξειδωτικά) του κόκκινου κρασιού πέρα από το αλκοόλ, ίσως να έχουν μια ανεξάρτητη επιπρόσθετη δράση στο AIχ. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από μία άλλη μελέτη, η οποία βρήκε ότι ένα άλλο ισχυρό αντιοξειδωτικό, η βιταμίνη C, μειώνει την αρτηριακή σκληρία όπως αυτή εκτιμάται από το δείκτη AIχ, 6 ώρες μετά την πρόσληψή της, υποδεικνύοντας μια πιθανή ευεργετική οξεία επίδραση των αντιοξειδωτικών στην αρτηριακή σκληρία [18].

Αυτές οι επιδράσεις γίνονται ακόμη πιο σημαντικές όταν λαμβάνει κανείς υπόψιν του ότι τα ανακλώμενα κύματα, όπως εκτιμώνται από το AIχ συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο από στεφανιαία νόσο [19]. Ο δείκτης AIχ έχει προταθεί ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για πρώιμη στεφανιαία νόσο [20]. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί η άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στα κύματα ανάκλασης και στη λειτουργία της αριστερής κοιλίας [21].

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι το γεγονός ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση στην περιφερική συστολική πίεση από κανένα τύπο κρασιού. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές στο AIχ και από τα δύο κρασιά είναι ανεξάρτητες από τις πιθανές μεταβολές στις πιέσεις. Μπορεί να θεωρηθεί δηλαδή, ότι η μείωση του AIχ πιθανό να αποδίδεται σε βελτίωση της αρτηριακής σκληρίας, ή της αγγειοδιαστολής, ή και των δύο. In vitro μελέτες έχουν υποστηρίξει, ότι το αλκοόλ και οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν την παραγωγή NO [22] και να αναστέλλουν τη σύνθεση ενδοθηλίνης 1 [23], προκαλώντας

αγγειοδιαστολή, τα οποία εξηγούν ως ένα βαθμό τα ευρήματά μας. Επιπρόσθετα, υπάρχουν μελέτες in vivo οι οποίες δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική αγγειοδιαστολή και αυξημένη παραγωγή NO μετά την κατανάλωση κανονικού και απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού [1, 2, 24, 25]. Ακόμη, το NO, όπως και η ενδοθηλίνη 1 έχουν συσχετιστεί ευθέως όχι μόνο με την αγγειοδιαστολή, αλλά επίσης με τα κύματα ανάκλασης, την ταχύτητα των κυμάτων παλμού και την αρτηριακή σκληρία [26], αναδεικνύοντας το NO και τη σύνθεση της ενδοθηλίνης 1 σε κύριους μηχανισμούς οι οποίοι ενέχονται σε μεταβολές του ΑΙχ, όπως ακριβώς παρουσιάζονται και στην παρούσα μελέτη.

Παρόλ' αυτά, περαιτέρω έρευνα χρειάζεται προκειμένου να αποκτηθούν στοιχεία ικανά να διαλευκάνουν τους ακριβείς μηχανισμούς γύρω από τις παρούσες παρατηρήσεις, όπως η απευθείας μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού ή των ισοπροστανίων σε μεταγευματικό στάδιο. Επίσης, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα δεδομένα σχετικά με την οξεία δράση του κόκκινου κρασιού στην κοιλιακή εξώθηση του αίματος είναι ελλιπή, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε μια πιθανή συνεισφορά αυτής της επίδρασης στις κεντρικές αιμοδυναμικές παραμέτρους.

Κεντρικές και περιφερικές πιέσεις

Αν και δεν υπήρχε κάποια επίδραση των δύο κρασιών στην περιφερική πίεση, ήταν χαρακτηριστική η επίδρασή τους στις κεντρικές πιέσεις. Και οι δύο τύποι κρασιού μείωσαν σημαντικά την κεντρική συστολική πίεση. Το γεγονός ότι και τα δύο ποτά είχαν παρόμοια δράση στην κεντρική συστολική πίεση επισημαίνει ότι η επίδραση αυτή πιθανό να μπορεί να αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού ανεξάρτητα από το αλκοόλ που περιέχει. Ακόμη, η κεντρική αλλά όχι η βραχιόνια πίεση παλμού μειώθηκε σημαντικά από το κανονικό κόκκινο κρασί, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια ανάλογη επίδραση του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Το γεγονός ότι η κεντρική συστολική πίεση μειώθηκε και με τα δύο κρασιά, ενώ η διαστολική μειώθηκε μόνο μετά την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού πιθανό εξηγεί τη μείωση της κεντρικής πίεσης παλμού από το κανονικό κόκκινο κρασί. Οι αγγειοδραστικές ιδιότητες του αλκοόλ δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υποτιμώνται.

Διαφοροποιήσεις ανάμεσα στην αντίδραση των κεντρικών και των περιφερικών πιέσεων στις αγγειοδραστικές ουσίες έχουν διατυπωθεί και σε διάφορες άλλες μελέτες [27, 28]. Το γεγονός αυτό μας κάνει να προβληματιζόμαστε σχετικά με μια πιθανή υποεκτίμηση

της επίδρασης του κόκκινου κρασιού στις πιέσεις όταν μετρώνται μόνο οι περιφερικές και όχι οι κεντρικές πιέσεις. Το γεγονός ότι η έκκριση NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μειώνεται σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [29], ίσως να εξηγεί εν μέρει γιατί στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στις περιφερικές πιέσεις, αλλά μόνο στις κεντρικές, ενώ οι Mahmud και Feely παρατήρησαν μείωση στις περιφερικές πιέσεις σε ένα μάλλον μικρό (η=8) δείγμα υγιών εθελοντών. Η προκαλούμενη μεγαλύτερη μείωση στις κεντρικές συγκριτικά με τις περιφερικές πιέσεις από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού θα πρέπει να τονιστεί ειδικά σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αφού έχει δειχθεί ότι η κεντρική (καροτιδική) πίεση είναι καλύτερος προβλεπτικός δείκτης από την περιφερική πίεση σχετικά με τη σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου [30].

Συμπερασματικά, η αρτηριακή σκληρία, τα ανακλώμενα κύματα και η κεντρική πίεση ασθενών με στεφανιαία νόσο φαίνεται να βελτιώνονται σε μεταγευματικό στάδιο από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού. Οι επιδράσεις αυτές είναι πιθανό να συσχετίζονται όχι μόνο με το αλκοόλ, αλλά και με τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού. Οι δράσεις αυτές του κόκκινου κρασιού είναι περισσότερο εμφανείς στην αορτή, από ότι στη βραχιόνιο αρτηρία, κάνοντας με αυτό τον τρόπο αναγκαία την ταυτόχρονη εκτίμηση και των κεντρικών πιέσεων. Η αρτηριακή σκληρία και η ενδοθηλιακή λειτουργία μπορούν πιθανότατα να στηρίξουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αν και κάνουν αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση με μια πιο άμεση προσέγγιση. Το ερώτημα εάν η μακροχρόνια χρήση κόκκινου κρασιού με ή χωρίς αλκοόλ οδηγεί σε βελτίωση της αρτηριακής σκληρίας, των ανακλώμενων κυμάτων και της κεντρικής πίεσης, καθώς και σε μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, παραμένει αδιερεύνητο.

2.2. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού αναστέλλουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλεί το οξύ κάπνισμα σε υγιείς μη καπνιστές

Η εργασία αυτή είναι δημοσιευμένη στο περιοδικό American Heart Journal ως:

Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers

Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Kalliopi Karatzi, Konstantinos Aznaouridis, Theodoros Papaioannou, Athanassios Protogerou, Kimon Stamatelopoulos, Antonis Zampelas, John Lekakis, Myron Mavrikakis. **Am Heart J 2004; 147:e5**

Περίληψη

Σκοπός Είναι γνωστό ότι το χρόνιο κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες, ενώ το οξύ κάπνισμα αναστέλλει την αγγειοδιαστολή μέσω άγνωστου έως τώρα μηχανισμού. Από την άλλη, το κόκκινο κρασί φαίνεται ότι έχει ισχυρή αντιοξειδωτική και αγγειοδιασταλτική δράση τόσο μετά από μακροχρόνια όσο και οξεία κατανάλωσή του. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει εάν η κατανάλωση κόκκινου κρασιού, με ή χωρίς αλκοόλ, μπορεί να επηρεάσει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από το οξύ κάπνισμα.

Μέθοδοι Δεκαέξι υγιείς μη-καπνιστές εθελοντές (8 άνδρες και 8 γυναίκες) έλαβαν μέρος σε μια διπλή-τυφλή, διασταυρούμενη μελέτη 3 ημερών. Από κάθε εθελοντή ζητήθηκε να κάπνισει ένα τσιγάρο, ή να καπνίσει και να καταναλώσει 250 ml κανονικού κόκκινου κρασιού, ή να καπνίσει και να καταναλώσει 250 ml απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (flow-mediated dilatation) (FMD) κάθε εθελοντή μετρήθηκε μετά 12-ωρη νηστεία και στα 15, 30, 60 και 90 λεπτά μετά από κάθε παρέμβαση (κάπνισμα ή κάπνισμα και ταυτόχρονη κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού).

Αποτελέσματα Το οξύ κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε μείωση του FMD ($p < .001$), που ήταν στατιστικά σημαντική στα 15, 30 και 60 λεπτά μετά το κάπνισμα σε σύγκριση με το FMD προ του καπνίσματος ($p <0,001$, $p <0,001$, $p =0,043$, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού (κανονικού ή απαλκοολωμένου) με το κάπνισμα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή του FMD.

Συμπέρασμα *Το οξύ κάπνισμα προκάλεσε σημαντική μείωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Ταυτόχρονη κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού με το κάπνισμα μείωσε την βλαπτική αυτή δράση του καπνίσματος στο ενδοθήλιο.*

Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που μπορεί να προκληθεί από πληθώρα καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου, αποτελεί πρώιμη ένδειξη ανάπτυξης αθηρωματικής νόσου [1].

Το κάπνισμα, ένας βασικός παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης [2], σχετίζεται ισχυρά με στεφανιαία νόσο, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και περιφερική αγγειοπάθεια [3]. Μελέτες υποστηρίζουν ότι το κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μέσω αύξησης της ενδοθηλίνης-1 [4] και οξειδωτικής καταστροφής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) [5] λόγω παραγωγής πληθώρας ελευθέρων ριζών οξυγόνου [6]. Από την άλλη, η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών σε χρόνιους καπνιστές φαίνεται να βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία κάτι που ενισχύει την υπόθεση ότι το κάπνισμα αυξάνει το οξειδωτικό στρες [7-9].

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, πιθανός συνδετικός κρίκος μεταξύ καπνίσματος και ανάπτυξης αθηρωματικής νόσου, έχει παρατηρηθεί στην βραχιόνιο αρτηρία τόσο υγιών χρόνιων καπνιστών [10] όσο και υγιών παθητικών καπνιστών [11]. Επιπλέον ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει παρατηρηθεί και σε υγιείς μη-καπνιστές, μετά το οξύ κάπνισμα 1 τσιγάρου [12, 13], χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός αυτού του φαινομένου.

Από την άλλη, είναι πλέον γνωστές οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κόκκινου κρασιού καθώς και η αρνητική συσχέτισή του με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [14]. Μελέτες δείχνουν ότι η μέτρια, τακτική κατανάλωση κόκκινου κρασιού και των συστατικών του (τα οποία βρίσκονται επίσης και στο χυμό σταφυλιών) προκαλεί σημαντική βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας [15-17]. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες που εξέτασαν την οξεία δράση του κανονικού σε σύγκριση με το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί σε υγιείς εθελοντές, έδειξαν ότι πιθανόν οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού προκαλούν μεγαλύτερη βελτίωση του FMD από ότι το αλκοόλ μόνο του [18-19].

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν το κόκκινο κρασί, με ή χωρίς αλκοόλ, μπορεί να αναστρέψει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από το οξύ κάπνισμα ενός τσιγάρου.

Μέθοδοι

Πληθυσμός της μελέτης

Δεκαέξι υγιείς εθελοντές (8 άνδρες και 8 γυναίκες) έλαβαν μέρος στην μελέτη. Η μέση ηλικία τους ήταν 28,9 ± 6,5 έτη (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση) και ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) ήταν 23,4 ± 3,2 kg/m². Κριτήρια ένταξής τους στην μελέτη ήταν τα εξής: φυσιολογικές τιμές αρτηριακής πίεσης (<140/90 mmHg), ΔΜΣ μεταξύ 20 και 27 kg/m², απουσία ιστορικού ΣΔ, απουσία οικογενειακού ιστορικού στεφανιαίας νόσου, απουσία ηπατοπάθειας ή οποιασδήποτε ενδοκρινολογικής νόσου, επίπεδα χοληστερόλης αίματος <240 mg/dl. Όλοι οι εθελοντές ήταν μη-καπνιστές και όσοι από αυτούς λάμβαναν οποιαδήποτε αντιοξειδωτική ουσία, ή ακολουθούσαν κάποια ειδική δίαιτα κατά την διάρκεια της μελέτης αποκλείονταν από αυτή. Κανένας εθελοντής δεν ακολουθούσε κάποια φαρμακευτική αγωγή και οι γυναίκες εθελόντριες δε λάμβαναν αντισυλληπτικά σκευάσματα. Τέλος, η κατανάλωσή τους σε αλκοόλ δεν υπερέβαινε τη επιτρεπόμενη ποσότητα των 20-30 g την ημέρα. Όλοι οι εθελοντές έδωσαν την συγκατάθεσή τους προτού λάβουν μέρος στην μελέτη.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Πρόκειται για μια διπλή-τυφλή διασταυρούμενη μελέτη και περιλαμβάνει τρεις ξεχωριστές μέρες μετρήσεων για κάθε εθελοντή. Την πρώτη ημέρα τα άτομα προς μελέτη προσήλθαν στο Αγγειολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα μετά από 12-ωρη νηστεία. Μετά τις αρχικές υπερηχογραφικές μετρήσεις δόθηκε στους εθελοντές να καπνίσουν ένα συνηθισμένο τσιγάρο (Marlboro με 12 mg πίσσα και 0,9 mg νικοτίνη). Υπερηχογραφικές μετρήσεις επαναλήφθηκαν 15, 30, 60 και 90 λεπτά μετά την ολοκλήρωση του καπνίσματος. Την δεύτερη και την τρίτη ημέρα της μελέτης ζητήθηκε από τους εθελοντές να καταναλώσουν ένα ποτήρι 250 ml είτε κανονικού κόκκινου κρασιού είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού μαζί με μια φέτα λευκού ψωμιού (30 g) και 30 g τυρί τύπου cottage (4% λίπος). Στο τέλος του γεύματος και ταυτόχρονα με την κατανάλωση του κρασιού, τους δόθηκε να καπνίσουν ένα τσιγάρο (ίδιου τύπου με την πρώτη ημέρα). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην καλή εισπνοή του καπνού από τους εθελοντές. Η όλη

διαδικασία του γεύματος είχε μέση διάρκεια 15 λεπτά. Υπερηχογραφικές μετρήσεις έγιναν εκ νέου μετά 15, 30, 60 και 90 λεπτά. Όλοι οι εθελοντές παροτρύνθηκαν να μην αλλάξουν την δίαιτά τους κατά τη διάρκεια της μελέτης και η χρήση ανάκλησης 24- ώρου επιβεβαίωσε την πλήρη συμμόρφωσή τους με τις οδηγίες αυτές.

Παρασκευή του κρασιού

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε κανονικό κόκκινο κρασί με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 12% (Grand Reserve 1996, Μπουτάρης). Στον ίδιο τύπο κρασιού έγινε μερική λυοφιλλίωση στους - 50° C και πίεση 1 millibar για 6 ώρες με την Cryodos 45 (Telstar, Spain) και το συμπυκνωμένο κρασί (~50%) αραιώθηκε στη συνέχεια με εμφιαλωμένο νερό μέχρι να φτάσει τον αρχικό του όγκο, με αποτέλεσμα την παραγωγή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (1% αιθανόλη). Η ολική συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικές ουσίες του κρασιού υπολογίσθηκε με την μέθοδο Folin- Ciocalteau, και χρήση ενός UVIKON φασματοφωτομέτρου 931 (Kontron Instruments, Μιλάνο, Ιταλία) και τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν σε μικρογραμμάρια καφεικού οξέος ανά 100 ml. Ένα μοντέλο Hewlett-Packard 1050 UV-DAD/FLD με αυτόματο δειγματολήπτη, και ένα μοντέλο Hewlett-Packard 6890 με MS ανιχνευτή και αυτόματο δειγματολήπτη (Hewlett-Packard, Calif) χρησιμοποιήθηκαν για την υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) [20] και αέρια χρωματογραφία (GC/MSD) αντίστοιχα, για τον ποιοτικό έλεγχο των αντιοξειδωτικών ουσιών των δύο τύπων κόκκινου κρασιού (κανονικό και απαλκοολωμένο). Τόσο ποσοτικά (658 μg/100 ml vs 650 μg/100 ml καφεικού οξέος αντίστοιχα) όσο και ποιοτικά, η περιεκτικότητα σε φαινόλες ήταν παρόμοια στο κανονικό και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί, κάτι που συνιστά ότι η επεξεργασία παρασκευής του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού δεν επηρέασε την περιεκτικότητα των συστατικών του.

Τέλος, για να ελεγχθούν πιθανές διαφορές στις οργανοληπτικές ιδιότητες μεταξύ των δύο κρασιών, καθώς και η δυνατότητα των εθελοντών να τα ξεχωρίσουν, έγιναν duo-trio tests καθώς και χρήση ηδονικής κλίμακας.

FMD

Η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (flow-mediated dilatation) (FMD) μετρήθηκε στους εθελοντές με υπερηχογράφο υψηλής ευκρίνειας (Acuson 128xp, Calif). Η ακριβής μέθοδος έχει περιγραφεί στο παρελθόν [21, 22]. Ο κάθε εθελοντής οδηγήθηκε σε ένα ήρεμο δωμάτιο 20-25 ° C και αφέθηκε εκεί να ηρεμήσει σε ύπτια θέση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια έγιναν οι μετρήσεις στην δεξιά βραχιόνιο αρτηρία με την χρήση ενός γραμμικού

υπερηχομετατροπέα 7,0 MHz, από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές που δεν γνώριζαν την εξέλιξη της μελέτης. Αρχικά μετρήθηκε η διάμετρος της αρτηρίας σε συγκεκριμένη ανατομική θέση της (βασική διάμετρος), χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικές σημάνσεις (calipers) μεταξύ των δύο σημείων στο τέλος της διαστολής. Στην συνέχεια μια περιχειρίδα που είχε τοποθετηθεί 8 εκ. κάτω από το σημείο μέτρησης της βραχιονίου αρτηρίας και προς την μεριά του καρπού, φούσκωσε με πίεση στα 250-300 mmHg και παρέμεινε έτσι για 4 λεπτά, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την αιματική ροή στο άκρο. Μετά τα 4 λεπτά έγινε απότομη άρση της περίδεσης αυξάνοντας την αιματική ροή (υπεραιμία) και προκαλώντας αντιδραστική αγγειοδιαστολή στο μετρούμενο σημείο της βραχιονίου αρτηρίας. Μέχρι και 90 δευτερόλεπτα μετά υπήρχε συνεχής καταγραφή της διαμέτρου της αρτηρίας στο ίδιο ακριβώς σημείο με την βασική μέτρηση (διάμετρος κατά την αντιδραστική υπεραιμία). Η όλη διαδικασία μέτρησης του FMD έγινε σε κατάσταση 12-ωρης νηστείας των εθελοντών και 15, 30, 60 και 90 λεπτά μετά το κάπνισμα ή το κάπνισμα και την κατανάλωση κρασιού και των δύο τύπων (σύνολο 5 μετρήσεις επί 3 ημέρες μελέτης). Το FMD σε κάθε μετρούμενη χρονική στιγμή υπολογίσθηκε ως η αύξηση της διαμέτρου της αρτηρίας προς την αρχική (βασική) διάμετρο της, επί %.Οι διαφορές μεταξύ των παρατηρητών και οι διαφορές στον ίδιο παρατηρητή στις μετρήσεις του Εργαστηρίου μας είναι 0,1 ± 0,12 mm και 0,08 ± 0,19 mm αντίστοιχα, ενώ η διαφορά στην μέτρηση του FMD σε δυό διαδοχικές ημέρες είναι 1,1% ± 1%.

Στατιστική ανάλυση

Τα στοιχεία δίδονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθούν πιθανές αλλαγές μετά τις τρείς παρεμβάσεις. Τα ολικά και επιμέρους εμβαδά κάτω από τις καμπύλες (TAUC και IAUC) υπολογίσθηκαν για να συγκριθούν τα αποτελέσματα μετά από κάθε παρέμβαση. Το Student's t test χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν οι TAUC και IAUC. Η τιμή του $p < 0,05$ ορίστηκε ως στατιστικά σημαντική και όλες οι αναλύσεις έγιναν με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος αναλύσεων SPSS 10 for Windows.

Αποτελέσματα

Και οι 16 εθελοντές ολοκλήρωσαν την μελέτη σύμφωνα με το ερευνητικό πρωτόκολλο που είχε τεθεί εξ'αρχής.

Τόσο η ολική συγκέντρωση φαινολών (658 μg/100 ml vs 650 μg/100 ml καφεϊκού οξέος αντίστοιχα), όσο και ο τύπος των ουσιών αυτών ήταν παρόμοιες στα δύο είδη κρασιού, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η αφαίρεση του αλκοόλ από το κρασί δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των υπολοίπων συστατικών του.

Η βασική διάμετρος της βραχιονίου αρτηρίας, η αιματική ροή κατά την ηρεμία, η αύξηση της ροής λόγω υπεραιμίας και το FMD μετά την 12-ωρη νηστεία, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 3 ημερών της μελέτης (Πίνακας 1). Το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε μείωση του FMD ($p < 0,001$) σύμφωνα με ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική στα 15, 30 και 60 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος σε σύγκριση με τις μετρήσεις μετά την 12-ωρη νηστεία ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,043$ αντίστοιχα). Παρόλ' αυτά, ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού (κανονικού ή απαλκοολωμένου) με το κάπνισμα δεν οδήγησε σε αλλαγή του FMD (Πίνακας 1).

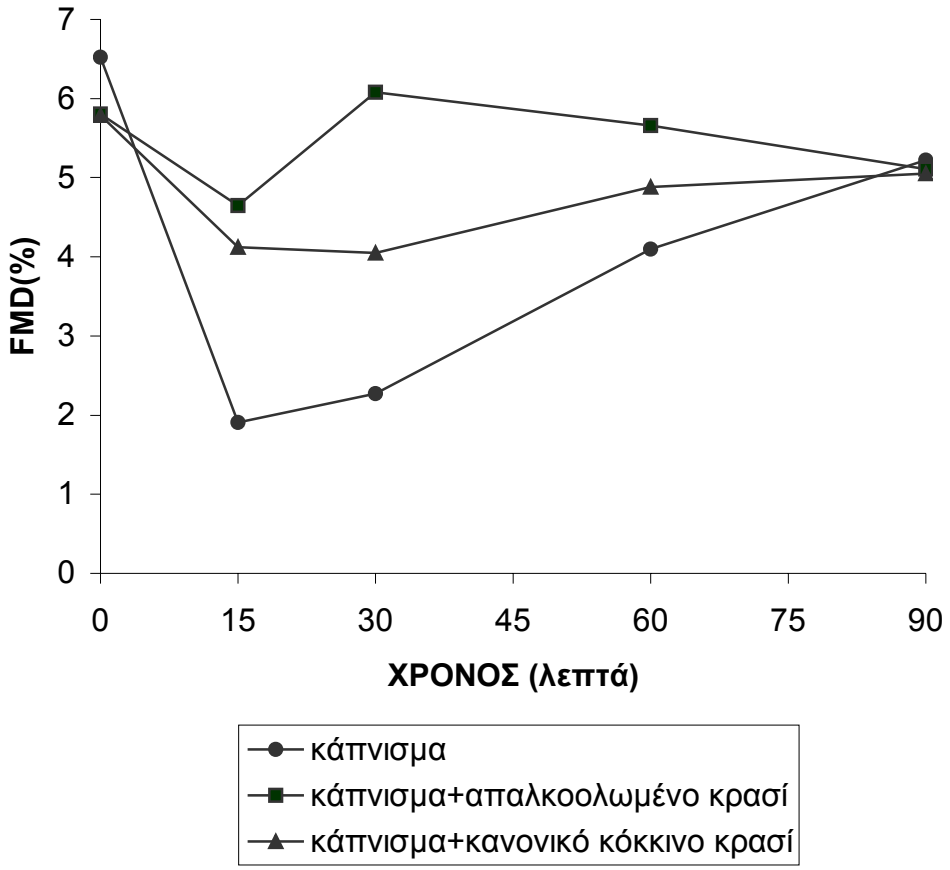
Πίνακας 1 Αιμοδυναμικές μετρήσεις, διάμετρος αγγείου και αιματική ροή πριν και μετά από κάθε παρέμβαση: κάπνισμα και κάπνισμα με ταυτόχρονη κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (n=16).

	Νηστεία	**15 min**	**30 min**	**60 min**	**90 min**
ΚΑΠΝΙΣΜΑ					
Διάμετρος αγγείου ((mm)	3.6±0.6	3.6±0.6	3.6±0.6	3.6±0.6	3.6±0.6
Ροή ηρεμίας ((ml/min)	79±52	83±39	91±72	76±82	70±65
Υπεραιμία (%)	183±152	153±122	255±365	252±264	430±536
FMD (%)	6.52±2.4	1.91±2.0*	2.27±2.0*	4.10±2.6†	5.22±2.5
ΚΑΠΝΙΣΜΑ + ΚΑΝΟΝΙΚΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΡΑΣΙ					
Διάμετρος αγγείου (mm)	3.6±0.5	3.7±0.6	3.9±0.6†	3.9±0.6	3.9±0.7†
Ροή ηρεμίας (ml/min)	60±45	62±26	101±71	95±47	74±39
Υπεραιμία (%)	221±139	218±106	77±83	84±88	346±239
FMD (%)	5.79±2.1	4.12±2.0	4.05±1.8	4.87±2.4	5.05±2.3
ΚΑΠΝΙΣΜΑ + ΑΠΑΛΚΟΟΛΩΜΕΝΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΡΑΣΙ					
Διάμετρος αγγείου (mm)	3.5±0.5	3.6±0.7	3.7±0.6	3.7±0.6	3.7±0.6
Ροή ηρεμίας (ml/min)	97±54	80±58	132±104	93±77	84±90
Υπεραιμία (%)	125±167	357±374	229±305	342±352	340±264
FMD (%)	5.8±2.1	4.65±3.6	6.08±3.6	5.66±2.5	5.11±1.3

*p<0,001 συγκριτικά με τις αρχικές μετρήσεις

†p<0,05 συγκριτικά με τις αρχικές μετρήσεις

Σχήμα 1 Η επίδραση του οξέος καπνίσματος και του ταυτόχρονου καπνίσματος με κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού στο FMD (n=16)



*p<0,001 συγκριτικά με τις αρχικές μετρήσεις,

†p<0,05 συγκριτικά με τις αρχικές μετρήσεις

Μετά το κάπνισμα και την κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού, παρατηρήθηκε αύξηση της βασικής διαμέτρου της βραχιονίου αρτηρίας. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική στα 30 λεπτά (p =0,047), υπήρχε τάση για αύξηση στα 60 λεπτά και ήταν ξανά στατιστικά σημαντική στα 90 λεπτά (p =0,015) συγκριτικά με την μέτρηση μετά την 12-ωρη νηστεία.

Οι τιμές του FMD βρέθηκαν να διαφέρουν μετά το κάπνισμα και το κάπνισμα και κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού (p =0,009), μετά από ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Διαφορές βρέθηκαν επίσης και στα εμβαδά κάτω από τις καμπύλες μετά το κάπνισμα και το κάπνισμα και κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου

κρασιού (p <0,001). Παρόλ'αυτά δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των FMD μετά το κάπνισμα και το κανονικό κόκκινο κρασί και μετά το κάπνισμα και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί (Σχήμα 1).

Επιμέρους εμβαδά κάτω από την καμπύλη κατέδειξαν διαφορά μεταξύ καπνίσματος και καπνίσματος και κατανάλωσης κανονικού κόκκινου κρασιού (p =0,016), καθώς και μεταξύ καπνίσματος και καπνίσματος και κατανάλωσης απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (p <0,001).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη το οξύ κάπνισμα επέφερε σημαντική επιδείνωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας σε υγιείς μη-καπνιστές, που διήρκεσε μέχρι και 60 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος, κάτι που έχει δειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες [12, 13]. Ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού, κανονικού ή απαλκοολωμένου, με το κάπνισμα μείωσε τις επιβλαβείς δράσεις του καπνίσματος στην ενδοθηλιακή λειτουργία κάτι που συνιστά οτι πιθανόν το κρασί αναστέλλει ως ένα βαθμό την βλαπτική δράση του καπνίσματος στο ενδοθήλιο.

Πολλές in vivo [2, 7, 8, 23] και in vitro [5, 6] μελέτες έχουν δείξει οτι το κάπνισμα βλάπτει την ενδοθηλιακή λειτουργία πιθανόν μέσω αύξησης της ενδοθηλίνης-1 και καταστροφής του NO λόγω παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου [5, 6]. Πρόσφατες μελέτες επίσης έδειξαν ότι η νικοτίνη προκαλεί οξεία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε καπνιστές [24]. Από την άλλη φαίνεται ότι η συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινών Ε και C [9, 23, 25, 26] σε χρόνιους καπνιστές αντισταθμίζει την βλαπτική επίδραση του καπνίσματος στην ενδοθηλιακή λειτουργία, κάτι που συνιστά ότι το κάπνισμα αυξάνει το οξειδωτικό στρες και στη συνέχεια οι αντιοξειδωτικές ουσίες αναστέλλουν την δράση του αυτή.

Από την άλλη, έχει δειχθεί σε in vitro μελέτες ότι η οξεία κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού προκαλεί αγγειοδιαστολή λόγω των αντιοξειδωτικών ουσιών που προκαλούν αυξημένη παραγωγή NO καθώς και αυξημένη προστασία του NO από την καταστροφική δράση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου [27-30]. Άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου το κόκκινο κρασί προκαλεί αγγειοδιαστολή είναι λόγω της περιεκτικότητάς του σε αλκοόλ: το αλκοόλ έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει την παραγωγή του NO και αυξάνει την έκκρισή

του [31]. Επιπλέον, in vivo μελέτες σε υγιείς εθελοντές έδειξαν ότι η κατανάλωση τόσο του κανονικού όσο και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού [18, 19] βελτιώνει το FMD, και αυτή η δράση πιθανώς να οφείλεται εν μέρει στις αντιοξειδωτικές ουσίες του κρασιού. Στις ίδιες μελέτες παρατηρήθηκε επίσης μια μεγάλη αύξηση της βασικής διαμέτρου της βραχιονίου αρτηρίας μετά την κατανάλωση του κανονικού κόκκκινου κρασιού κάτι που αποδόθηκε στην περιεχόμενη αιθανόλη, και που αναπόφευκτα επηρέασε και τις τιμές του FMD. Παρόμοια αύξηση της βασικής διαμέτρου της βραχιονίου αρτηρίας παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, η οποία όμως δεν ήταν ικανή να προκαλέσει σημαντική μείωση του FMD.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω αυξήσεως του οξειδωτικού στρες. Ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού αναστρέφει εν μέρει την βλαπτική αυτή επίδραση του καπνίσματος στο FMD. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί από την μιά στο αλκοόλ που αυξάνει την παραγωγή του NO, και από την άλλη στις αντιοξειδωτικές ουσίες που προάγουν την σύνθεση του NO και που το προστατεύουν από την οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών. Η υπόθεση αυτή συμφωνεί με παλιότερο εύρημα μελέτης που δείχνει οτι μερικά λεπτά μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού παρατηρείται αύξηση των φαινολικών παραγόντων στο πλάσμα [32]. Αναλύοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπεράνουμε ότι άλλα συστατικά του κρασιού, και όχι το αλκοόλ αυτό καθ'αυτό, είναι περισσότερο υπεύθυνα για την αναστολή της βλαπτικής επίδρασης του καπνίσματος στο FMD, και αυτό γιατί τόσο το κανονικό όσο και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί είχαν την ίδια ευεργετική επίδραση στο FMD. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες (πολυφαινόλες) λοιπόν που βρίσκονταν στην ίδια ποσοτική και ποιοτική περιεκτικότητα και στα δύο κρασιά, φαίνεται οτι ευθύνονται για την ευεργετική αυτή δράση.

Θα πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο οτι τα παρατηρούμενα αποτελέσματα αφορούν την ενδοθηλιακή λειτουργία οξέως μετά από κάθε παρέμβαση, καθώς επίσης και μετρήσεις ενός μόνο δείκτη ενδοθηλιακής λειτουργίας (FMD). Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε μακροχρόνια βάση και με μετρήσεις και άλλων δεικτών ενδοθηλιακής λειτουργίας. Επιπλέον θα πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αφορά υγιή πληθυσμό, για να οδηγήσει σε συμπεράσματα για τον πιθανό μηχανισμό με τον οποίο το κάπνισμα οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και για το ποιό από τα συστατικά του κόκκινου κρασιού (αλκοόλ ή πολυφαινόλες) ασκεί

ανασταλτική δράση στον μηχανισμό αυτό. Δεν μετρήθηκαν δείκτες ελευθέρων ριζών του οξυγόνου ή επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών ορού, ενώ το FMD χρησιμοποιήθηκε ως έμμεσος δείκτης παραγωγής NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [33]. Ως συνέχεια της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μεγαλύτερη μελέτη σε υγιή πληθυσμό καθώς επίσης και σε καπνιστές με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου ή προηγηθείσα καρδιαγγειακή νόσο. Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η ταυτόχρονη κατανάλωση καπνού και κόκκινου κρασιού μαζί με ένα συνηθισμένο γεύμα, κάτι που θα μιμηθεί μια προσφιλή συνήθεια των καπνιστών. Τέλος, ενδιαφέρουσα θα ήταν και η μελέτη της μακροχρόνιας επίδρασης του κόκκινου κρασιού στους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάματα σε ικανό δείγμα πληθυσμού.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι το οξύ κάπνισμα ενός τσιγάρου προκαλεί σημαντική επιδείνωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, αλλά η ταυτόχρονη κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού αναστέλλει την βλαπτική αυτή δράση στο ενδοθήλιο. Τα ευρήματά μας συνιστούν ότι η μείωση του FMD μετά το κάπνισμα πιθανότατα οφείλεται σε αύξηση του οξειδωτικού στρες, και επειδή και τα δύο είδη του κρασιού είχαν την ίδια δράση στο FMD, υποθέτουμε ότι άλλα συστατικά του κρασιού (αντιοξειδωτικές ουσίες) και όχι το αλκοόλ αυτό καθ'αυτό είναι περισσότερο υπεύθυνα για την ευεργετική αυτή δράση του κόκκινου κρασιού στο ενδοθήλιο.

2.3. Το οξύ κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε υγιείς καπνιστές. Είναι το φαινόμενο αυτό αναστρέψιμο από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κόκκινου κρασιού;

Η εργασία αυτή έχει γίνει δεκτή από το περιοδικό Journal of American College of Nutrition ως:

Acute smoking induces endothelial dysfunction in healthy smokers. Is this reversible by red wine's antioxidant constituents?

Kalliopi Karatzi, Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Voidonikola, John Lekakis, Antonis Zampelas.

Περίληψη

Σκοπός Το οξύ κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω μείωσης της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO), ή αύξησης του οξειδωτικού στρες, αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραμένει αδιευκρίνιστος. Σε υγιείς μη καπνιστές η οξεία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκάλεσε το κάπνισμα ενός τσιγάρου αντισταθμίστηκε από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει εάν τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού μπορούν να αντισταθμίσουν την οξεία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλεί το οξύ κάπνισμα και σε πληθυσμό υγιών καπνιστών.

Μέθοδοι Είκοσι υγιείς εθελοντές (12 άνδρες) συμμετείχαν σε μια διπλά τυφλή, διασταυρούμενη μελέτη αποτελούμενη από τρεις εργαστηριακές ημέρες. Όλοι οι εθελοντές είτε κάπνισαν ένα τσιγάρο, είτε κάπνισαν και κατανάλωσαν 250 ml κανονικού κόκκινου κρασιού, είτε κάπνισαν και κατανάλωσαν 250 ml απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού σε κάθε μία από τις εργαστηριακές ημέρες. Η αγγειοδιαστολή μέσω ροής (FMD) εκτιμήθηκε σε κατάσταση νηστείας και στα 30, 60 και 90 λεπτά μετά από την κάθε δοκιμασία.

Αποτελέσματα Το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε σημαντική μείωση στο FMD ($p<0,001$), η οποία παρέμεινε σημαντική 30 ($p<0,001$), και 60 ($p=0,003$) λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος. Το FMD παρέμεινε στατιστικά αμετάβλητο μετά την κατανάλωση των δύο τύπων κρασιού μαζί με το κάπνισμα.

Συμπεράσματα Η παρατηρούμενη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μετά το κάπνισμα ενός τσιγάρου αντισταθμίστηκε πλήρως από την κατανάλωση είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού σε υγιείς καπνιστές. Είναι πιθανό ότι η οξεία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλεί το κάπνισμα μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένο οξειδωτικό στρες, οπότε οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού αναστρέφουν αυτές τις οξείες βλαβερές επιδράσεις του καπνού στο ενδοθήλιο.

Εισαγωγή

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι μια αρκετά γνωστή, πρώιμη ένδειξη αθηρωμάτωσης και αγγειακής βλάβης [1]. Ο εντοπισμός και η τροποποίηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, ειδικά όταν αυτοί οι παράγοντες σχετίζονται με τον τρόπο ζωής.

Το κάπνισμα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την αθηροσκλήρυνση και τη στεφανιαία νόσο [2], και θεωρείται ότι προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία τόσο μετά από χρόνια χρήση του, όσο και σε οξεία φάση [3, 4]. Επιπρόσθετα, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει παρατηρηθεί σε υγιείς χρόνιους [5], αλλά και σε παθητικούς καπνιστές [6], καθώς και σε υγιείς μη καπνιστές όταν αυτοί κάπνισαν ένα τσιγάρο [7, 8].

Η μείωση της παραγωγής NO [9] και η αύξηση του οξειδωτικού στρες από ένα μεγάλο αριθμό ελευθέρων ριζών οι οποίες υπάρχουν στον καπνό [4], είναι μερικοί από τους πιθανούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την οξεία ενδοθηλιακή λειτουργία που παρατηρείται μετά το κάπνισμα ενός τσιγάρου. Σε αντίθεση η χορήγηση της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C σε υγιείς καπνιστές βελτίωσε οξέος την ενδοθηλιακή λειτουργία, υποδεικνύοντας ότι το οξειδωτικό στρες παίζει ένα κρίσιμο ρόλο στις οξείες επιδράσεις του καπνίσματος στο ενδοθήλιο [10]. Είναι γνωστό ότι το κόκκινο κρασί περιέχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες [11] οι οποίες φαίνεται να έχουν σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην ενδοθηλιακή λειτουργία όταν καταναλώνονται σε χρόνια βάση [12-14]. Ακόμη, υπάρχουν μερικές πρόσφατες μελέτες σχετικά με τις πιθανές οξείες επιδράσεις του κανονικού και του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [15-17]. Αυτές οι μελέτες κατέληξαν ότι πιθανότατα οι αντιοξειδωτικές ουσίες που βρίσκονται στο κόκκινο κρασί είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές δράσεις που παρατηρούνται στην ενδοθηλιακή λειτουργία και που εκφράζονται μέσω του (FMD).

Σε προηγούμενη μελέτη, περιγράφηκε ότι η ταυτόχρονη κατανάλωση είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού με το κάπνισμα ενός τσιγάρου, αντισταθμίζει τις οξείες βλαβερές επιδράσεις του καπνού στο FMD σε μια ομάδα υγιών μη καπνιστών [18].

Αφού δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τις πιθανές επιδράσεις του κρασιού και του καπνίσματος σε καπνιστές, οι οποίοι είναι ένας μεγάλος πληθυσμός υψηλού κινδύνου, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει εάν το κανονικό ή το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί μπορεί να αναστρέψει την ενδοθηλιακή λειτουργία που προκαλεί το οξύ κάπνισμα σε υγιείς καπνιστές.

Μέθοδοι

Εθελοντές

Είκοσι υγιείς καπνιστές (12 άνδρες) με μέση ηλικία 29.0±5.4 χρόνια (μέσος±τυπική απόκλιση) και δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) 23.7±4.6 kg/m^2, συμμετείχαν στη μελέτη. Όλοι οι εθελοντές είχαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση (<140/90 mmHg), δεν είχαν ιστορικό διαβήτη, ή οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου, παχυσαρκία, ηπατικές ή άλλες ενδοκρινολογικές νόσους και είχαν επίπεδα χοληστερόλης αίματος <240mg/dl. Το ποσό των τσιγάρων που κάπνιζε κάθε εθελοντής τη μέρα και η διάρκεια του καπνίσματος εκτιμήθηκαν σε πακέτα/ έτη (pack/years), και κυμαίνονταν από 1 έως 20 (10 από αυτούς είχαν <10 pack/ years και 10 είχαν >10 pack/ years). Κριτήρια για την απόρριψη εθελοντών ήταν η χρήση συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών βιταμινών, η χρήση οποιουδήποτε φαρμάκου, η χρήση αντισυλληπτικών από τις γυναίκες εθελόντριες, η κατανάλωση αλκοόλ σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις γενικές συστάσεις (20-30 γρ. αλκοό/ ημέρα), και τέλος η εφαρμογή κάποιας δίαιτας κατά τη διάρκεια της μελέτης. Όλοι οι εθελοντές έδωσαν τη συγκατάθεσή του πριν συμμετάσχουν στην έρευνα.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η έρευνα ήταν διπλά τυφλή και διασταυρούμενη. Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα, ζητήθηκε από τους εθελοντές να προσέλθουν στο αγγειολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου Αλεξάνδρα μετά από δωδεκάωρη νηστεία. Κατά την πρώτη ημέρα έγινε ένας αρχικός υπερηχοτομογραφικός έλεγχος σε κατάσταση νηστείας. Στη συνέχεια τους ζητήθηκε να καπνίσουν ένα κανονικό τσιγάρο (με 12 mg πίσσα και 0.9 mg νικοτίνη).

Υπερηχοτομογραφικές μετρήσεις επαναλήφθηκαν στα 30, 60 και 90 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος. Κατά τη δεύτερη και τρίτη εργαστηριακή ημέρα έγιναν ίδιες ακριβώς μετρήσεις, αλλά από τους εθελοντές ζητήθηκε να καπνίσουν τον ίδιο τύπο τσιγάρου και την ίδια στιγμή να καταναλώσουν 250 ml κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Μαζί με τις δοκιμασίες αυτές οι εθελοντές κατανάλωναν επίσης 1 φέτα λευκό ψωμί (30 γρ.) και 30 γρ τυρί τύπου cottage με 4% λίπος. Όλη η διαδικασία (κάπνισμα και κατανάλωση κρασιού και σνακ) διαρκούσε 15 λεπτά. Σε όλους τους εθελοντές δόθηκε η οδηγία να μην αλλάξουν τη διατροφή τους κατά τη διάρκεια της μελέτης και να καταναλώνουν ακριβώς τις ίδιες τροφές και στις ίδιες ποσότητες την ημέρα πριν από κάθε εργαστηριακή ημέρα. Επίσης συγκεντρώθηκαν ανακλήσεις 24ώρου προκειμένου να διασφαλιστεί η συμμόρφωσή τους στις διαιτολογικές οδηγίες.

Παρασκευή του κρασιού

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε κανονικό κόκκινο κρασί με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 12% (Ραψάνη, Τσάνταλη). Στον ίδιο τύπο κρασιού έγινε μερική λυοφιλλίωση στους - 50° C και πίεση 1 millibar για 6 ώρες με την Cryodos 45 (Telstar, Spain) και το συμπυκνωμένο κρασί (~50%) αραιώθηκε στη συνέχεια με εμφιαλωμένο νερό μέχρι να φτάσει τον αρχικό του όγκο, με αποτέλεσμα την παραγωγή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (1% αιθανόλη). Η ολική συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικές ουσίες του κρασιού υπολογίσθηκε με την μέθοδο Folin- Ciocalteau, και χρήση ενός UVIKON φασματοφωτομέτρου 931 (Kontron Instruments, Μιλάνο, Ιταλία) και τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν σε μικρογραμμάρια καφεικού οξέος ανά 100 ml. Ένα μοντέλο Hewlett-Packard 1050 UV-DAD/FLD με αυτόματο δειγματολήπτη, και ένα μοντέλο Hewlett-Packard 6890 με MS ανιχνευτή και αυτόματο δειγματολήπτη (Hewlett-Packard, Calif) χρησιμοποιήθηκαν για την υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) και αέρια χρωματογραφία (GC/MSD) αντίστοιχα, για τον ποιοτικό έλεγχο των αντιοξειδωτικών ουσιών των δύο τύπων κόκκινου κρασιού (κανονικό και απαλκοολωμένο). Τόσο ποσοτικά (658 μg/100 ml vs 650 μg/100 ml καφεικού οξέος αντίστοιχα) όσο και ποιοτικά, η περιεκτικότητα σε φαινόλες ήταν παρόμοια στο κανονικό και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί, κάτι που συνιστά ότι η επεξεργασία παρασκευής του απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού δεν επηρέασε την περιεκτικότητα των συστατικών του.

Τέλος, για να ελεγχθούν πιθανές διαφορές στις οργανοληπτικές ιδιότητες μεταξύ των δύο κρασιών, καθώς και η δυνατότητα των εθελοντών να τα ξεχωρίσουν, έγιναν duo-trio tests καθώς και χρήση ηδονικής κλίμακας.

FMD

Η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (flow-mediated dilatation) (FMD) μετρήθηκε στους εθελοντές με υπερηχογράφο υψηλής ευκρίνειας (Acuson 128xp, Calif). Η ακριβής μέθοδος έχει περιγραφεί στο παρελθόν [25]. Ο κάθε εθελοντής οδηγήθηκε σε ένα ήρεμο δωμάτιο 20-25 ° C και αφέθηκε εκεί να ηρεμήσει σε ύπτια θέση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια έγιναν οι μετρήσεις στην δεξιά βραχιόνιο αρτηρία με την χρήση ενός γραμμικού υπερηχομετατροπέα 7,0 MHz, από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές που δεν γνώριζαν την εξέλιξη της μελέτης. Αρχικά μετρήθηκε η διάμετρος της αρτηρίας σε συγκεκριμένη ανατομική θέση της (βασική διάμετρος), χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικές σημάνσεις (calipers) μεταξύ των δύο σημείων στο τέλος της διαστολής. Στην συνέχεια μια περιχειρίδα που είχε τοποθετηθεί 8 εκ. κάτω από το σημείο μέτρησης της βραχιονίου αρτηρίας και προς την μεριά του καρπού, φούσκωσε με πίεση στα 250-300 mmHg και παρέμεινε έτσι για 4 λεπτά, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την αιματική ροή στο άκρο. Μετά τα 4 λεπτά έγινε απότομη άρση της περίδεσης αυξάνοντας την αιματική ροή (υπεραιμία) και προκαλώντας αντιδραστική αγγειοδιαστολή στο μετρούμενο σημείο της βραχιονίου αρτηρίας. Μέχρι και 90 δευτερόλεπτα μετά υπήρχε συνεχής καταγραφή της διαμέτρου της αρτηρίας στο ίδιο ακριβώς σημείο με την βασική μέτρηση (διάμετρος κατά την αντιδραστική υπεραιμία). Η όλη διαδικασία μέτρησης του FMD έγινε σε κατάσταση 12-ωρης νηστείας των εθελοντών και 15, 30, 60 και 90 λεπτά μετά το κάπνισμα ή το κάπνισμα και την κατανάλωση κρασιού και των δύο τύπων (σύνολο 5 μετρήσεις επί 3 ημέρες μελέτης). Το FMD σε κάθε μετρούμενη χρονική στιγμή υπολογίσθηκε ως η αύξηση της διαμέτρου της αρτηρίας προς την αρχική (βασική) διάμετρο της, επί %.Οι διαφορές μεταξύ των παρατηρητών και οι διαφορές στον ίδιο παρατηρητή στις μετρήσεις του Εργαστηρίου μας είναι 0,1 ± 0,12 mm και 0,08 ± 0,19 mm αντίστοιχα, ενώ η διαφορά στην μέτρηση του FMD σε δυό διαδοχικές ημέρες είναι 1,1% ± 1%.

Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ANOVA) προκειμένου να εκτιμηθούν οι μεταβολές των μεταβλητών μετά από τις τρεις

παρεμβάσεις. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ANOVA με 2 παρεμβάσεις επί 4 χρονικές περιόδους (νηστεία, 30, 60 και 90 λεπτά μεταγευματικά) ώστε να εκτιμηθούν συγκριτικά οι επιδράσεις των παρεμβάσεων στις μετρούμενες μεταβλητές. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε Student's t δοκιμασία διορθωμένη για πολλαπλές συγκρίσεις κατά Bonferroni. Student t-test κατά ζεύγη, χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την εκτίμηση των διαφορών των τιμών νηστείας στις 3 εργαστηριακές ημέρες. Όλες οι μεταβλητές ελέγχθηκαν για ομοιογένεια της διακύμανσης και για κανονική κατανομή προτού γίνει οποιαδήποτε στατιστική ανάλυση. Όλα τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος ± τυπική απόκλιση, εκτός εάν δηλώνετε κάτι διαφορετικό και η τιμή $p<0,05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 11 για τα Windows.

Αποτελέσματα

Όλοι οι εθελοντές ολοκλήρωσαν τη μελέτη χωρίς δυσκολίες ή προβλήματα από την κατανάλωση αλκοόλ.

Η ανάλυση των δύο τύπων κόκκινου κρασιού (κανονικό και απαλκοολωμένο) έδειξε ότι δεν διαφέρουν σημαντικά στην ολική συγκέντρωση φαινολών και στον τύπο των αντιοξειδωτικών που περιέχουν. Επιπλέον, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο κρασιά σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμασιών duo – trio και της ηδονικής κλίμακας, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα δύο κρασιά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν παρόμοια σε γεύση, χρώμα, άρωμα και περιεχόμενο αντιοξειδωτικών και η μόνη τους διαφοροποίηση ήταν η περιεκτικότητά τους σε αλκοόλ (12% για το κανονικό συγκριτικά με 1% για το απαλκοολωμένο).

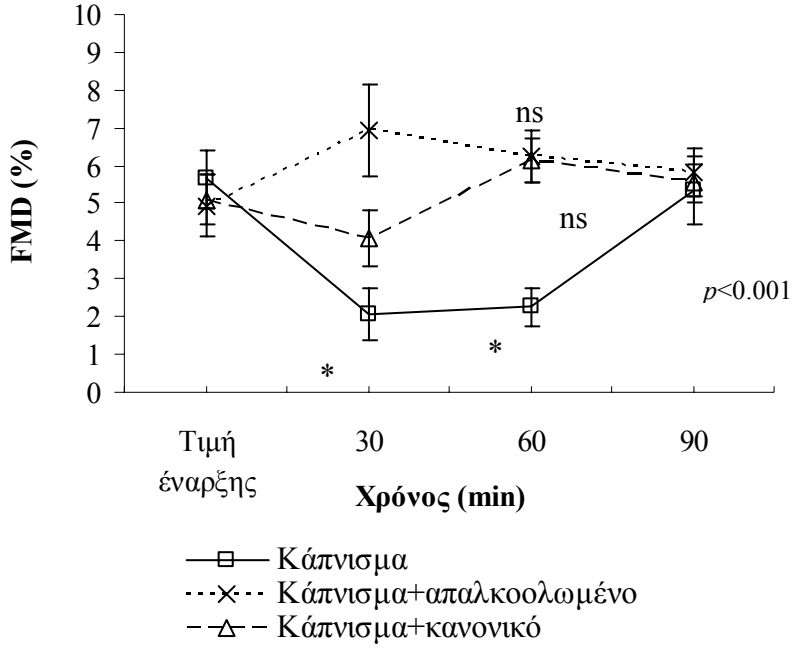
Η βασική διάμετρος, η αιματική ροή στην ηρεμία και στην υπεραιμία ο καρδιακός ρυθμός και το FMD δε διέφεραν στατιστικά σε κάθε μία από τις 3 εργαστηριακές ημέρες και σε κάθε συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Πίνακας 1).

Το FMD μειώθηκε σημαντικά μετά το κάπνισμα ενός τσιγάρου ($p<0,001$). Η μείωση αυτή του FMD ήταν στατιστικά σημαντική 30 και 60 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στη φάση της νηστείας ($p<0,001$ και $p=0,003$, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά η συνολική αντίδραση του FMD μετά από το κάπνισμα ήταν στατιστικά διαφορετική συγκριτικά με την αντίστοιχη αντίδραση του FMD μετά από το

κάπνισμα και την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού, ή το κάπνισμα και την κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού $p<0,001$ και $p=0,007$ αντίστοιχα. Η αντίδραση του FMD μετά από το κάπνισμα και το απαλκοολωμένο κρασί και μετά από το κάπνισμα και το κανονικό κρασί δεν διέφερε στατιστικά (Σχήμα 1).

Η βασική διάμετρος αυξήθηκε σημαντικά μετά το κάπνισμα και την κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού, 30 λεπτά μεταγευματικά και επέστρεψε στα επίπεδα της νηστείας στα 60 και 90 λεπτά μεταγευματικά (Πίνακας 1).

Σχήμα 1 Μεταβολές του FMD μετά το κάπνισμα, ή το κάπνισμα και την κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (n=20).



p υποδεικνύει συνολικές σημαντικές μεταβολές (ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, δύναμη 99%)

* υποδεικνύει σημαντική διαφορά ($p<0,01$) από τη νηστεία (Student t-test για πολλαπλές συγκρίσεις διορθωμένο κατά Bonferroni)

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών

Πίνακας 1 Διάμετρος αρτηρίας, ροή σε ηρεμία και υπεραιμία και FMD των τριών εργαστηριακών ημερών (κάπνισμα, κάπνισμα + απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί και κάπνισμα + κανονικό κόκκινο κρασί).

	Νηστεία	**30 λεπτά**	**60 λεπτά**	**90 λεπτά**
Κάπνισμα				
Διάμετρος αγγείου (mm)	3.6±0.1	3.6±0.2	3.7±0.1	3.6±0.2
Ροή σε ηρεμία (ml/ λεπτό)	99.9±16.6	134.2±47.6	130.3±38.8	98.3±18.1
Υπεραιμία (%)	186.7±61.2	201.2±61.5	151.0±49.1	131.7±42.3
Καρδ. ρυθμός (παλμοί/ λεπτό)	63.5±1.6	69.7±1.9*	66.1±1.7	64.8±1.9
FMD (%)	5.65±0.77	2.07±0.70*	2.25±0.52*	5.33±0.90
Κάπνισμα + απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί				
Διάμετρος αγγείου (mm)	3.6±0.1	3.7±0.2	3.7±0.1	3.7±0.1
Ροή σε ηρεμία (ml/ λεπτό)	91.1±16.7	150.5±39.1	133.1±27.8	152.4±34.1
Υπεραιμία (%)	174.2±64.0	109.5±62.9	143.8±69.9	118.9±63.4
Καρδ. ρυθμός (παλμοί/ λεπτό)	64.1±2.5	67.1±2.7	66.7±2.4	67.5±2.9
FMD (%)	4.94±0.8	6.93±1.2	6.24±0.7	5.81±0.6
Κάπνισμα + κανονικό κόκκινο κρασί				
Διάμετρος αγγείου (mm)	3.7±0.2	4.1±0.1*	3.8±0.2	3.9±0.2
Ροή σε ηρεμία (ml/ λεπτό)	104.0±15.4	118.0±14.9	107.4±18.4	136.1±24.1
Υπεραιμία (%)	177.7±41.2	199.6±49.1	179.0±56.1	180.7±95.8
Καρδ. ρυθμός (παλμοί/ λεπτό)	62.5±2.2	68.8±2.0	64.3±2.5	66.0±2.0
FMD (%)	5.11±0.67	4.09±0.75	6.14±0.58	5.53±0.49

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα

* υποδεικνύει σημαντική διαφορά από τις τιμές νηστείας

Οι τιμές νηστείας δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις τρεις εργαστηριακές ημέρες

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη η οποία χρησιμοποίησε μια ομάδα καπνιστών, αποδείχθηκε ότι το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκαλεί σημαντική μείωση του FMD, η οποία παραμένει σημαντική για 30 έως 60 λεπτά, αλλά η ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού με ή χωρίς αλκοόλ αναστρέφει τις βλαβερές αυτές δράσεις του καπνίσματος στην ενδοθηλιακή λειτουργία.

Οι παρατηρούμενες δράσεις του καπνίσματος στο FMD βρίσκονται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες [7, 8, 18], οι οποίες επίσης δείχνουν ότι το οξύ κάπνισμα προκαλεί σημαντική επιβάρυνση της ενδοθηλιακής λειτουργίας η οποία διαρκεί για 30 με 60 λεπτά μετά το τέλος του. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το κάπνισμα αυξάνει τα επίπεδα της ενδοθηλίνης – 1, μειώνει τα επίπεδα NO και αυξάνει το οξειδωτικό στρες, όπως φαίνεται από αρκετές in vitro και in vivo μελέτες [9, 19-21]. Αυτό που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι χρόνιοι καπνιστές, όπως οι εθελοντές στην παρούσα μελέτη συνήθως ανάβουν το επόμενο τσιγάρο σε χρόνο μικρότερο από 30 λεπτά μετά από το τέλος του προηγούμενου. Αυτό υποδεικνύει ότι οι καπνιστές ίσως έχουν παρατεταμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ημέρας.

Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινών, ειδικά βιταμίνης C και E, σε καπνιστές βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία, η οποία σε αυτούς τους ανθρώπους είναι ήδη επηρεασμένη αρνητικά [10, 22, 23]. Αυτή η ευεργετική δράση των αντιοξειδωτικών βιταμινών έχει παρατηρηθεί τόσο σε χρόνια, όσο και σε οξεία χορήγηση και υποδεικνύει ότι πιθανότατα το αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το κάπνισμα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Στην παρούσα μελέτη, τα συστατικά του κόκκινου κρασιού χρησίμευσαν ως ένα μέσο αναστροφής της οξείας βλαβερής επίδρασης του καπνού στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Αρκετές μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν με τις οξείες επιδράσεις του κόκκινου κρασιού στο ενδοθήλιο, κατέληξαν ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες που βρίσκονται στο κόκκινο κρασί είναι πολύ αποτελεσματικές στην αύξηση του FMD τόσο σε υγιείς εθελοντές, όσο και σε ασθενείς

με στεφανιαία νόσο μέσα σε 30 – 120 λεπτά μετά την κατανάλωσή του [15-17]. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού προκαλούν αγγειοδιαστολή μέσω αύξησης της παραγωγής NO, αλλά και μέσω αυξημένης προστασίας αυτού από την καταστροφή από ελεύθερες ρίζες [13, 24, 25]. Επιπλέον, αποτελέσματα από μια άλλη πρόσφατη μελέτη υποδεικνύουν ότι στην οξεία φάση το αλκοόλ και όχι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κρασιού είναι υπεύθυνο για τη μεταγευματική βελτίωση του FMD [26], γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που έδειξαν ότι το αλκοόλ είναι μια αγγειοδιασταλτική ουσία, αφού ρυθμίζει τη σύνθεση NO και προωθεί την έκκρισή του [27]. Η δράση αυτή του αλκοόλ επίσης παρατηρείται στην παρούσα μελέτη, αφού βρέθηκε ότι σε άτομα που κατανάλωσαν κόκκινο κρασί με αλκοόλ, παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στη βασική διάμετρο του αγγείου, 30 λεπτά αργότερα. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από τις αγγειοδιασταλτικές δράσεις του αλκοόλ, έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν και αναπόφευκτα μπορεί να επηρεάσει το FMD [16, 17]. Παρόλ' αυτά στην παρούσα μελέτη η παρατηρούμενη αύξηση στη διάμετρο του αγγείου από το αλκοόλ δεν οδήγησε σε σημαντική μείωση του FMD, όπως θα αναμενόταν και συνεπώς δεν επηρέασε καθόλου τα αποτελέσματα.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι έχουμε διερευνήσει στο παρελθόν την πιθανή αλληλεπίδραση του οξέος καπνίσματος και της ταυτόχρονης κατανάλωσης κόκκινου κρασιού με ή χωρίς αλκοόλ σε υγιείς μη καπνιστές και βρήκαμε ότι αν και το κάπνισμα ενός τσιγάρου επιδεινώνει το FMD, η κατανάλωση είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού αντισταθμίζει αυτές τις βλαβερές επιδράσεις του καπνού [18]. Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε για πρώτη φορά εάν η αλληλεπίδραση του καπνίσματος και του κρασιού μπορεί να προκαλέσει τα ίδια αποτελέσματα σε μια ομάδα υγιών καπνιστών οι οποίοι συνήθως πίνουν και καπνίζουν ταυτόχρονα. Τα πρόσφατα ευρήματά μας είναι σε πλήρη συμφωνία με τα παλαιότερα υποδεικνύοντας ότι η αντίδραση των καπνιστών στο κάπνισμα ενός τσιγάρου και στο κάπνισμα και την κατανάλωση κόκκινου κρασιού είναι η ίδια με του μη καπνιστές. Επιπρόσθετα, αφού τόσο το κανονικό, όσο και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί ανέστρεψαν τις βλαβερές επιδράσεις του καπνού στην ενδοθηλιακή λειτουργία, είναι πιθανό ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού και όχι το αλκοόλ, είναι υπεύθυνα για αυτές τις ευεργετικές δράσεις.

Το γεγονός ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα και το οξειδωτικό στρες δεν μετρήθηκαν μπορεί να θεωρηθεί ως το κύριο μειονέκτημα της μελέτης. Είναι πιθανό σε επόμενες

μελέτες, με μέτρηση της οξειδωτικής ικανότητας σε κάθε χρονικό σημείο, να επιβεβαιώσει τα ευρήματά μας και να διαλευκάνει τους μηχανισμούς που αυτή τη στιγμή απλώς υποθέτουμε ότι ισχύουν.

Συμπέρασμα

Το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε μείωση του FMD και η ταυτόχρονη κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού με το κάπνισμα ανέστρεψε τις επιδράσεις αυτές του καπνού σε μία ομάδα υγιών καπνιστών. Επομένως, θεωρείται ότι στους καπνιστές, όπως και στους μη καπνιστές, είναι πιθανό ότι ο καπνός αυξάνει το οξειδωτικό στρες και μειώνει τα επίπεδα NO και τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού αντισταθμίζουν αυτές τις επιδράσεις και αναστρέφουν τη βλαβερή επίδραση του καπνού στο FMD. Είναι πιθανό ότι το κάπνισμα και η κατανάλωση κόκκινου κρασιού λειτουργούν στην ενδοθηλιακή λειτουργία με τον ίδιο τρόπο σε καπνιστές και μη καπνιστές και ότι οι ευεργετικές δράσεις που παρατηρούνται με τη χρήση κόκκινου κρασιού ίσως μπορούν να αποδοθούν στις αντιοξειδωτικές ουσίες και όχι μόνο στο αλκοόλ που περιέχει.

2.4. Συνδυασμένες οξείες επιδράσεις της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και του καπνίσματος ενός τσιγάρου στις αιμοδυναμικές παραμέτρους υγιών καπνιστών

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευθεί στο περιοδικό Journal of Hypertension ως:

Combined acute effects of red wine consumption and cigarette smoking on hemodynamics of young smokers

Christos Papamichael, Kalliopi Karatzi, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Katsichti, Antonis Zampelas , John Lekakis. **J Hypertens, 2006; 24: 1287 – 1292.**

Περίληψη

Σκοπός Το κόκκινο κρασί φαίνεται ότι βελτιώνει τις αιμοδυναμικές παραμέτρους, ενώ αντίστοιχα το κάπνισμα επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα. Η επίδραση στις αιμοδυναμικές παραμέτρους της συνδυασμένης δράσης τους παραμένει άγνωστη. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει τις οξείες επιδράσεις του κόκκινου κρασιού και των συστατικών του στις αιμοδυναμικές παραμέτρους, όπως η αρτηριακή πίεση και τα κύματα ανάκλασης, ταυτόχρονα με το κάπνισμα ενός τσιγάρου σε μια ομάδα καπνιστών.

Μέθοδοι Είκοσι καπνιστές (12 άνδρες, 8 γυναίκες) συμμετείχαν σε μια διπλά τυφλή, διασταυρούμενη μελέτη που αποτελούνταν από 3 εργαστηριακές ημέρες. Όλοι οι εθελοντές είτε κάπνισαν ένα τσιγάρο, είτε κάπνισαν και κατανάλωσαν 250 ml κόκκινου κρασιού, ή 250 ml απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού (το οποίο περιέχει την ίδια συγκέντρωση και τον ίδιο τύπο αντιοξειδωτικών ουσιών). Χρησιμοποιήθηκε τονομετρία προκειμένου να εκτιμηθεί η κυματομορφή της αορτικής πίεσης σε κατάσταση νηστείας και 30, 60 και 90 λεπτά μετά από κάθε παρέμβαση. Ο δείκτης ενίσχύσης (AIχ) χρησιμοποιήθηκε για να εκφράσει τα ανακλώμενα κύματα.

Αποτελέσματα Το κάπνισμα αύξησε την περιφερική συστολική πίεση ($p<0,005$) 30 λεπτά μετά το τέλος του, αλλά η ταυτόχρονη κατανάλωση ενός από τους δύο τύπους κρασιού δεν προκάλεσε κανένα παρόμοιο αποτέλεσμα. Επίσης, το κάπνισμα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο AIχ, ενώ το κάπνισμα και η κατανάλωση είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού μείωσε το AIx, $p<0,001$. Η μείωση του AIx μετά την κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη μείωση που προκάλεσε το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί ($p=0,004$).

Συμπέρασμα Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού ανέστρεψαν τις βλαβερές δράσεις του καπνίσματος, όπως η αύξηση της περιφερικής συστολικής πίεσης. Τόσο το αλκοόλ, όσο και τα αντιοξειδωτικά το κόκκινου κρασιού μείωσαν τα ανακλώμενα κύματα σε ομάδα υγιών καπνιστών στο διάστημα αμέσως μετά την κατανάλωσή του, υποδεικνύοντας μια πρόσθετη ευεργετική επίδραση του κόκκινου κρασιού.

Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι η μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού έχει σημαντική καρδιοπροστατευτική δράση [1], ενώ το κάπνισμα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα [2]. Παρόλ' αυτά, οι οξείες επιδράσεις τους στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και ειδικά στην αρτηριακή πίεση και στα ανακλώμενα κύματα, τα οποία πρόσφατα αναγνωρίστηκαν ως σημαντικός παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου [3, 4], δεν έχουν διευκρινιστεί. Επιπλέον, η πιθανή συνδυασμένη επίδρασή τους στις αιμοδυναμικές παραμέτρους δεν έχει ακόμη διερευνηθεί.

Το αλκοόλ, μειώνει τόσο την περιφερική, όσο και την κεντρική συστολή και διαστολική αρτηριακή πίεση, καθώς και την αρτηριακή σκληρία σε υγιείς εθελοντές στην οξεία μεταγευματική φάση [5]. Ακόμη, έχουμε πρόσφατα αποδείξει ότι η κεντρική πίεση και τα ανακλώμενα κύματα μειώνονται μετά από την κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, υποδεικνύοντας μια ευνοϊκή οξεία επίδραση των αντιοξειδωτικών του κόκκινου κρασιού στις αιμοδυναμικέ παραμέτρους [6].

Από την άλλη πλευρά το κάπνισμα βρέθηκε ότι αυξάνει την αορτική και την περιφερική αρτηριακή πίεση στην οξεία φάση [7-10]. Επιπρόσθετα, το οξύ κάπνισμα αυξάνει την αρτηριακή σκληρία και τα ανακλώμενα κύματα αυξάνοντας είτε την ταχύτητα των κυμάτων παλμού (PWV), είτε τον δείκτη ενίσχυσης (AI). Αυτές οι δράσεις ξεκινούν 5 λεπτά μετά το κάπνισμα και διαρκούν ακόμη και 2 ώρες ανάλογα με τον αριθμό των τσιγάρων που καπνίζονται σε κάθε περίπτωση και το ποσό της νικοτίνης που περιέχουν αυτά [7-10].

Παρουσιάζει ενδιαφέρον επίσης το γεγονός ότι πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η από του στόματος χορήγηση αντιοξειδωτικής βιταμίνης C μειώνει την από τον καπνό αυξημένη συστολική και διαστολική πίεση, καθώς και την PWV [11]. Επίσης, έχουμε αποδείξει ότι τα

αντιοξειδωτικά του κόκκινού κρασιού αναστρέφουν την οξεία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλεί το οξύ κάπνισμα σε μη καπνιστές [12], το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτεί κανείς ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχετίζεται με αυξημένη αρτηριακή σκληρία [13].

Με βάση τη μέχρι τώρα γνώση μας, δεν υπάρχουν δεδομένα που να δείχνουν είτε τις πιθανές επιδράσεις της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και των συστατικών του στις αιμοδυναμικές παραμέτρους υγιών καπνιστών, είτε του συνδυασμού του με το κάπνισμα ενός τσιγάρου, το οποίο είναι μια πολύ συνηθισμένη συνήθεια σε αυτή την ομάδα του πληθυσμού. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με σκοπό να διερευνήσει της πιθανές επιδράσεις των συστατικών του κόκκινου κρασιού (αλκοόλ και αντιοξειδωτικά) ταυτόχρονα με το κάπνισμα, στην αρτηριακή πίεση και τα κύματα ανάκλασης, σε καπνιστές.

Μέθοδοι

Πληθυσμός της μελέτης

Είκοσι υγιείς καπνιστές (12 άνδρες) με μέση ηλικία 29.0±5.4 χρόνια (μέσος±τυπική απόκλιση) και δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) 23.7±4.6 kg/m^2, συμμετείχαν στη μελέτη. Όλοι οι εθελοντές είχαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση (<140/90 mmHg), δεν είχαν ιστορικό διαβήτη, ή οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου, παχυσαρκία, ηπατικές ή άλλες ενδοκρινολογικές νόσους και είχαν επίπεδα χοληστερόλης αίματος <240mg/dl. Το ποσό των τσιγάρων που κάπνιζε κάθε εθελοντής τη μέρα και η διάρκεια του καπνίσματος εκτιμήθηκαν σε πακέτα/ έτη (pack/years), και κυμαίνονταν από 1 έως 20 (10 από αυτούς είχαν <10 pack/ years και 10 είχαν >10 pack/ years). Κριτήρια για την απόρριψη εθελοντών ήταν η χρήση συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών βιταμινών, η χρήση οποιουδήποτε φαρμάκου, η χρήση αντισυλληπτικών από τις γυναίκες εθελόντριες, η κατανάλωση αλκοόλ σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις γενικές συστάσεις (20-30 γρ. αλκοόλ/ ημέρα), και τέλος η εφαρμογή κάποιας δίαιτας κατά τη διάρκεια της μελέτης. Όλοι οι εθελοντές έδωσαν τη συγκατάθεσή του πριν συμμετάσχουν στην έρευνα.

Το μέγεθος του δείγματος της μελέτης αρχικά υπολογίσθηκε βασισμένο στην αναμενόμενη μεταβολή του δείκτη ενίσχυσης μετά από την κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Αναλογιζόμενοι ότι α) η επαναληψιμότητα και η διακύμανση των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του ΑΙχ είναι έως και 6% [14, 15] και β) μια διαφορά περίπου 5-7% στο ΑΙχ έχει συσχετισθεί με καρδιαγγειακά νοσήματα και

κίνδυνο από αυτά [4, 16], το μέγεθος του δείγματος υπολογίσθηκε αρχικά, έτσι ώστε να ανιχνεύει ένα 6% μεταβολή στο ΑΙχ. Επομένως, το μέγεθος του δείγματος των 20 ατόμων υπολογίσθηκε ως ικανό να ανιχνεύσει μεταβολή στο ΑΙχ 7% (α=0,05 και β=0,20) όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως [17].

Πειραματικό πρωτόκολλο

Εφαρμόσθηκε μια διπλά τυφλή, διασταυρούμενη μελέτη η οποία αποτελείτο από 3 εργαστηριακές ημέρες. Σε κάθε μία ημέρα οι εθελοντές προσέρχονταν στο Αγγειολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» μετά από δωδεκάωρη νηστεία και αποχή από το κάπνισμα, το αλκοόλ και τα ροφήματα που περιέχουν καφεΐνη. Κατά την πρώτη ημέρα έγινε μια αρχική εκτίμηση των αιμοδυναμικών παραμέτρων σε κατάσταση νηστείας. Στη συνέχεια οι εθελοντές κάπνισαν ένα τσιγάρο (με 12 mg πίσσα και 0.9 mg νικοτίνη) και οι ίδιες μετρήσεις επαναλήφθηκαν 30, 60 και 90 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος. Κατά τη δεύτερη και την τρίτη ημέρα έγιναν ακριβώς οι ίδιες μετρήσεις, αλλά οι εθελοντές κάπνισαν τον ίδιο τύπο τσιγάρου και ταυτόχρονα κατανάλωσαν ένα ποτήρι 250 ml είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού. Πριν από το κάπνισμα ή το κάπνισμα και την κατανάλωση κάποιου από τους δύο τύπους κρασιών οι εθελοντές κατανάλωσαν επίσης μία φέτα λευκό ψωμί (30 γρ) και 30 γρ τυρί τύπου cottage (4% λιπαρά). Όλη αυτή η διαδικασία διήρκεσε 10 λεπτά (2-3 λεπτά η κατανάλωση του γεύματος και 7-8 λεπτά η κατανάλωση του κρασιού μαζί με το κάπνισμα). Πριν από κάθε μέτρηση οι εθελοντές παρέμεναν σε ηρεμία για περίπου 20 λεπτά με σκοπό να ομαλοποιήσουν τον καρδιακό τους ρυθμό και την αρτηριακή πίεση. Όλοι οι συμμετέχοντες συμβουλεύτηκαν να μην αλλάξουν τη διατροφή τους κατά τη διάρκεια της μελέτης, ενώ χρησιμοποιήθηκε ανάκληση 24ώρου προκειμένου να διασφαλιστεί η συμμόρφωση στις διαιτολογικές οδηγίες.

Προετοιμασία κρασιού

Το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί (<1% αιθανόληl) προετοιμάστηκε με λυοφιλίωση του κανονικού κόκκινού κρασιού (12% αιθανόλη, Ραψάνη, Τσάνταλης, Ελλάδα) και όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την προετοιμασία και οι ποιοτικοί έλεγχοι των δύο τύπων κόκκινου κρασιού έχουν περιγραφεί προηγουμένως [Karatzi 2005]. Οι διαδικασίες αυτές έδειξαν ότι οι δύο τύποι κρασιού που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν ίδιοι ως προς τον τύπο και τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών και η μόνη διαφοροποίησή τους

ήταν η περιεκτικότητά τους σε αλκοόλ (12% με <1%), η οποία δεν μπορούσε να αναγνωρισθεί από τους εθελοντές.

Αρτηριακή σκληρία – κύματα ανάκλασης – κεντρικές πιέσεις

Οι δείκτες των ανακλώμενων κυμάτων και της αρτηριακής σκληρίας προσδιορίστηκαν μη παρεμβατικά με τη χρήση της τονομετρίας και την ανάλυση των κυμάτων παλμού [18, 19]. Η μέθοδος περιγράφηκε προηγουμένως [3, 6]. Η κυματομορφή των περιφερικών πιέσεων μετατράπηκε με τη χρήση γενίκευσης των λειτουργιών μεταφοράς παρέχοντας την αντίστοιχη κυματομορφή της αορτικής πίεσης. Η ανάλυση της κυματομορφής αυτής που προέκυψε έγινε με το σύστημα Sphygmocor® (ATCOR Medical, Σύδνεϋ, Αυστραλία).

Ο δείκτης ενίσχυσης (AIx) χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηρίσει τα κύματα ανάκλασης. Ο AIχ υπολογίζεται από το λόγο της ενίσχυσης της πίεσης (AP) προς την πίεση παλμού. Η τονομετρία και η ανάλυση των κυμάτων παλμού έχουν περιγραφεί προηγουμένως [3, 20]. Εφόσον το AIx επηρεάζεται από τον καρδιακό ρυθμό [21], ο οποίος πιθανό να διαφέρει σε κάθε ασθενή και ίσως να μεταβάλλεται μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού, ένας δείκτης διορθωμένος για καρδιακό ρυθμό 75 bpm (AI@75) χρησιμοποιήθηκε όπως έχει προταθεί και στο παρελθόν [21].

Η ταχύτητα των κυμάτων παλμού η οποία χαρακτηρίζει την αρτηριακή σκληρία, εκτιμήθηκε έμμεσα από το χρόνο άφιξης των ανακλώμενων κυμάτων στην αορτή, η οποία αντιπροσωπεύει το χρόνο που χρειάζεται τα κύματα πίεσης να ταξιδέψουν από κεντρικές σε περιφερικές αρτηρίες και να επιστρέψουν πίσω στην αορτή ως αποτέλεσμα των ανακλώμενων κυμάτων. Ο συγχρονισμός των ανακλώμενων κυμάτων συσχετίζεται ανάλογα με την ταχύτητα των κυμάτων παλμού και έχει προταθεί ως ένας πιο άμεσος δείκτης της αρτηριακής σκληρίας από ότι ο AIχ [21].

Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ANOVA) ώστε να εκτιμηθούν οι μεταβολές που προκλήθηκαν μετά από τις τρεις παρεμβάσεις. Επίσης μία ακόμη ANOVA με 2 παρεμβάσεις x 4 χρονικές περιόδους (νηστεία, 30, 60, 90 λεπτά μεταγευματικά) εφαρμόσθηκε με σκοπό να εκτιμήσει τις

συγκριτικές επιδράσεις των παρεμβάσεων στις μετρούμενες μεταβλητές. Επίσης, πολλαπλές συγκρίσεις με t-test διορθωμένα κατά Bonferroni εφαρμόσθηκαν για την ανάλυση των διαφορών των τιμών νηστείας στις τρεις εργαστηριακές ημέρες. Όλες οι μεταβλητές εξετάστηκαν για ομοιογένεια της διακύμανσης και για κανονική κατανομή προτού εφαρμοσθεί οποιαδήποτε άλλη στατιστική ανάλυση. Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος ± τυπική απόκλιση εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά και η τιμή $p<0,05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 11.0 για τα Windows.

Αποτελέσματα

Όλοι οι εθελοντές ολοκλήρωσαν τη μελέτη χωρίς καμία δυσφορία και χωρίς οξέα προβλήματα εξαιτίας του αλκοόλ ή του καπνίσματος.

Οι μετρήσεις νηστείας για τον καρδιακό ρυθμό, το χρόνο ανάκλασης, το AIχ, την περιφερική και κεντρική (αορτική) συστολική και διαστολική πίεση και τις αντίστοιχες πιέσεις παλμού, δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις τρεις παρεμβάσεις της μελέτης (Πίνακας 1).

Το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στην περιφερική συστολική πίεση ($p=0,024$). Η μέγιστη αύξηση κατά σχεδόν 4.7 mmHg παρατηρήθηκε στα 30 λεπτά. Από την άλλη πλευρά το κάπνισμα και η κατανάλωση είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού δεν είχε καμία επίδραση στην αρτηριακή πίεση.

Το κάπνισμα ενός τσιγάρου δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο AIχ. Μία τάση μείωσης του χρόνου ανάκλασης μετά από το κάπνισμα ενός τσιγάρου παρατηρήθηκε, όμως χωρίς να αγγίξει τα όρια της στατιστική σημαντικότητας ($p=0,062$). Το κάπνισμα ενός τσιγάρου και η κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού μείωσαν σημαντικά το AIχ ($p<0,001$) και η μείωση αυτή ήταν σημαντική στα 30 λεπτά ($p=0,03$) και στα 60 λεπτά ($p=0,021$) συγκριτικά με τις τιμές νηστείας. Όμοια, το κάπνισμα και η κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού επίσης μείωσαν το AIχ ($p<0,001$). Σε αυτή την παρέμβαση το AIχ μειώθηκε σημαντικά στα 60 λεπτά ($p=0,002$) και στα 90 λεπτά ($p<0,001$) συγκριτικά με τις τιμές νηστείας.

Το ΑΙχ μειώθηκε σημαντικά μετά το κάπνισμα και την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού συγκριτικά με την αντίστοιχη αντίδραση μετά από το κάπνισμα χωρίς κατανάλωση κάποιου κρασιού (p=0,018). Ακόμη, το ΑΙχ μειώθηκε σημαντικά μετά από το κάπνισμα και την κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού συγκριτικά με το κάπνισμα χωρίς την κατανάλωση κάποιου κρασιού (p=0,002). Τέλος, η μείωση στο ΑΙχ μετά από την κατανάλωση κανονικού κόκκινου κρασιού ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη μείωση μετά από την κατανάλωση απαλκοολωμένου κόκκινου κραιού (p=0,004) (Σχήμα 1).

Πίνακας 1 Αιμοδυμανικά χαρακτηριστικά στη νηστεία και στα 30, 60 και 90 λεπτά μετά το κάπνισμα ή το κάπνισμα και την κατανάλωση ενός από τους δύο τύπους κόκκινου κρασιού

	νηστεία	**30 λεπτά**	**60 λεπτά**	**90 λεπτά**
Κάπνισμα				
Αορτικό AIx (%)	6.5±12.5	5.5±14.0	5.5±11.8	6.2±12.7
Χρόνος ανάκλασης (msec)	156.8±18.7	151.1±18.9	155.8±16.8	153.1±14.0
Περιφερική συστολική πίεση (mmHg)	106.5±13.2	111.2±14.4 *	107.1±13.8	107.3±13.8
Περιφερική διαστολική πίεση (mmHg)	73.2±13.4	71.9±13.0	68.9±11.7	71.3±11.4
Περιφερική πίεση παλμού (mmHg)	33.3±8.2	39.2±10.9	38.2±6.9	36.0±6.5
Κεντρική συστολική πίεση (mmHg)	95.9±13.1	97.9±13.9	94.3±12.9	95.5±13.5
Κεντρική διαστολική πίεση (mmHg)	73.7±13.3	72.7±13.2	69.8±11.7	72.2±11.6
Κεντρική πίεση παλμού (mmHg)	22.3±7.1	25.2±8.5	24.4±4.8	23.3±5.8
Καρδιακός ρυθμός (b.p.m)	68.2±8.7	72.8±7.9*	69.4±10.3	68.2±8.1
Κάπνισμα + απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί				
Αορτικό AIx (%)	10.4±11.6	0.5±10.5*	1.5±9.3†	5.5±9.8
Χρόνος ανάκλασης (msec)	157.3±18.9	154.4±15.9	152.4±16.4	150.6±12.9
Περιφερική συστολική πίεση (mmHg)	103.9±14.9	104.4±14.2	102.9±16.4	103.1±12.9
Περιφερική διαστολική πίεση (mmHg)	68.5±10.7	66.6±12.1	61.8±13.1	63.9±10.9
Περιφερική πίεση παλμού (mmHg)	35.4±8.4	37.8±9.3	41.2±8.2	39.2±6.9
Κεντρική συστολική	92.9±13.2	90.3±13.6	87.5±14.6	88.7±11.0

πίεση (mmHg)				
Κεντρική διαστολική πίεση (mmHg)	69.3±10.8	67.4±12.1	62.7±13.1	64.8±10.9
Κεντρική πίεση παλμού (mmHg)	23.6±5.4	22.9±5.7	24.8±4.1	23.9±3.4
Καρδιακός ρυθμός (b.p.m)	69.8±10.5	71.8±8.8	71.5±9.7	71.9±9.4
Κάπνισμα + κανονικό κόκκινο κρασί				
Αορτικό AIx (%)	6.5±11.8	1.8±12.3	-1.5±11.1*	-4.2±12.5*
Χρόνος ανάκλασης (msec)	156.7±16.4	156.7±17.6	157.8±20.4	159.1±19.2
Περιφερική συστολική πίεση (mmHg)	105.2±11.8	104.2±15.6	105.5±13.2	101.9±13.8
Περιφερική διαστολική πίεση (mmHg)	69.4±9.5	69.5±12.3	68.3±11.0	68.5±11.2
Περιφερική πίεση παλμού (mmHg)	35.7±6.6	34.6±10.7	37.2±7.0	33.4±7.4
Κεντρική συστολική πίεση (mmHg)	94.2±11.4	91.7±13.5	91.5±12.4	89.3±13.0
Κεντρική διαστολική πίεση (mmHg)	70.2±9.6	70.3±12.3	69.1±11.4	69.1±11.3
Κεντρική πίεση παλμού (mmHg)	23.9±6.1	21.5±6.7	22.4±5.3	20.2±5.0
Καρδιακός ρυθμός (b.p.m)	68.1±9.2	74.5±9.0	72.2±9.0	71.9±9.9

AIx: δείκτης ενίσχυσης προσαρμοσμένο σε καρδιακό ρυθμό 75 b.m.p.

* $p<0,005$, † $p<0,05$ επίπεδο σημαντικότητας για διαφορές από την τιμή νηστείας

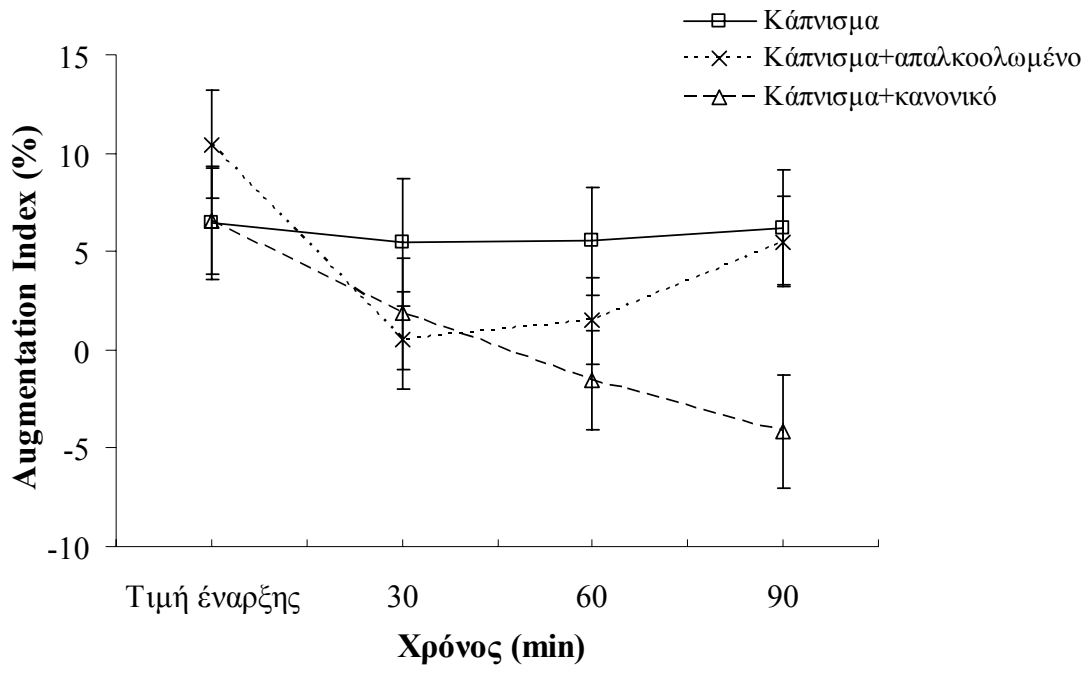
Σχήμα 1

Οξείες επιδράσεις του καπνίσματος και το καπνίσματος και της ταυτόχρονης κατανάλωσης κάποιου από τους δύο τύπους κόκκινου κρασιού στο AI (προσαρμοσμένο για καρδιακό ρυθμό 75 b.p.m.).

Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών.

* υποδεικνύουν σημαντική διαφορά ($p<0,05$) από το κάπνισμα χωρίς την κατανάλωση κάποιου τύπου κρασιού.

† υποδεικνύουν σημαντική διαφορά ($p<0,001$) ανάμεσα στους δύο τύπους κρασιού.



Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, μια σημαντική αύξηση στην περιφερική συστολική πίεση παρατηρήθηκε 30 λεπτά μετά από το κάπνισμα ενός τσιγάρου η οποία αντιστράφηκε τόσο από το κανονικό, όσο και από το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί. Επιπρόσθετα το κάπνισμα δεν είχε καμία επίδραση στα ανακλώμενα κύματα μετά από 30, 60 και 90 λεπτά, όμως τόσο το κανονικό, όσο και το απαλκοολωμένο κόκκινο κρασί προκάλεσαν σημαντική μείωση των ανακλώμενων κυμάτων, υποδεικνύοντας μια άμεση βελτίωση των λειτουργιών των αγγείων σε νεαρούς καπνιστές. Αυτά τα νέα ευρήματα υποδεικνύουν μια πιθανή ευεργετική δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών του κόκκινου κρασιού στις αιμοδυναμικές παραμέτρους των

εθελοντών, τα οποία είναι σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [6].

Το κάπνισμα ενός τσιγάρου προκάλεσε σημαντική αύξηση στην περιφερική συστολική πίεση, η οποία διήρκεσε 30 λεπτά μετά το τέλος του. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει μια ανεπιθύμητη οξεία επίδραση του καπνίσματος στην αρτηριακή πίεση, όπως έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως [7-9]. Στην παρούσα μελέτη το αποτέλεσμα που προκάλεσε το κάπνισμα στην αρτηριακή πίεση αντιστράφηκε από την κατανάλωση ενός από τους δύο τύπους κόκκινου κρασιού (με ή χωρίς αλκοόλ), αφού η ταυτόχρονη κατανάλωση ενός από τα δύο κρασιά με το κάπνισμα δεν προκάλεσε καμία σημαντική μεταβολή στις περιφερικές πιέσεις. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού έχουν μια σημαντική επίδραση στη μείωση της πίεσης και ότι είναι αρκετά δραστικές ώστε να εξαλείψουν τις βλαβερές επιδράσεις του καπνίσματος στην αρτηριακή πίεση σε νεαρούς καπνιστές. Μια πιθανή εξήγηση για αυτές τις παρατηρήσεις ίσως είναι η αγγειοδιαστολή, η οποία μπορεί να προκληθεί από τα συστατικά του κόκκινου κρασιού, με πιθανή μείωση στην περιφερική αντίσταση, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μείωση της ήδη αυξημένης συστολικής πίεσης εξαιτίας του καπνίσματος. Έχει ήδη δειχθεί από in-vitro μελέτες ότι το αλκοόλ και τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού μπορούν να ενισχύσουν την παραγωγή NO [22] και να εμποδίσουν τη σύνθεση ενδοθηλίνης 1 [23] προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Επιπλέον, in vivo μελέτες έχουν δείξει μια σημαντική αγγειοδιαστολή πιθανότατα μέσω την αύξησης της παραγωγής NO μετά από την κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού [12, 24, 25].

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το οξύ κάπνισμα προκαλεί σημαντική αύξηση στην αρτηριακή σκληρία και στα ανακλώμενα κύματα [7-10]. Αυτές οι αναφερόμενες ανεπιθύμητες επιδράσεις ξεκινούν 5 λεπτά μετά το κάπνισμα και διαρκούν ακόμη και 2 ώρες ανάλογα με το ποσό των τσιγάρων που καπνίζονται και το ποσό της νικοτίνης που περιέχετε στα τσιγάρα ή στα πούρα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά [9, 26, 27]. Σε αυτή τη μελέτη ο τύπος του τσιγάρου που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 0.9 mg νικοτίνης, ένα ποσό το οποίο είναι μικρότερο από αυτό που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενες μελέτες οι οποίες βρήκαν σημαντική μείωσε στο AIχ [7, 10]. Επιπλέον, η πρώτη μέτρηση στην παρούσα μελέτη έγινε στα 30 λεπτά μετά το τέλος του καπνίσματος. Είναι πιθανό ότι υπήρχε μία επίδραση του καπνίσματος στο AIχ και στην ταχύτητα των κυμάτων παλμού, η οποία διήρκεσε λιγότερο από 30 λεπτά όπως έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν [7, 10, 26, 27]. Επομένως, είναι

πιθανό ότι η επίδραση του καπνίσματος εξαφανίσθηκε 30 λεπτά μετά το τέλος του. Παρόλ' αυτά, ο πρωταρχικός μας στόχος ήταν να διερευνήσουμε την ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού με το κάπνισμα ενός τσιγάρου, προσπαθώντας με αυτό τον τρόπο να μιμηθούμε μια κοινή συνήθεια των καπνιστών (κάπνισμα μαζί με ποτό) ακριβώς όπως γίνεται στην πράξη.

Η οξεία κατανάλωση είτε κανονικού, είτε απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού μαζί με το κάπνισμα προκάλεσε σημαντική βελτίωση των ανακλώμενων κυμάτων, αφού και οι δύο τύποι κρασιού μείωσαν το ΑΙχ. Αν αναλογισθούμε ότι το οξύ κάπνισμα στις χρονικές στιγμές που μετρήθηκαν δεν είχε καμία επίδραση σε αυτή τη μεταβλητή, μπορεί να υποτεθεί ότι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά και μόνο στα ποτά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε παρέμβαση.

Παρατηρήσαμε ότι και τα δύο ποτά προκάλεσαν σημαντική μείωση στο ΑΙχ στους καπνιστές, γεγονός που αποκαλύπτει ότι τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο κόκκινο κρασί φαίνεται ότι έχουν ευεργετική επίδραση στα ανακλώμενα κύματα ανεξάρτητα από το περιεχόμενό τους σε αλκοόλ. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο όπου τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού βελτίωσαν το ΑΙχ στη μεταγευματική φάση [6]. Βέβαια, στην παρούσα μελέτη, το κανονικό κόκκινο κρασί, το οποίο περιέχει αλκοόλ μαζί με αντιοξειδωτικά, προσφέρει μια επιπρόσθετη σημαντική ευεργετική μείωση των ανακλώμενων κυμάτων. Επομένως, μπορεί να υποτεθεί ότι το αλκοόλ από μόνο του έχει ευεργετική επίδραση στα ανακλώμενα κύματα, το οποίο έχει ήδη περιγραφεί από τους Mahmud και Feely σε μια ομάδα υγιών μη καπνιστών [5]. Αυτές οι παρατηρήσεις σχετικά με τις οξείες επιδράσεις τόσο του αλκοόλ, όσο και των αντιοξειδωτικών μπορούν να εξηγηθούν με βάση την αύξηση της σύνθεσης ΝΟ και την αναστολή της παραγωγής ενδοθηλίνης 1 [12, 22-25]. Το ΝΟ, όπως και η ενδοθηλίνη 1 έχουν συσχετισθεί άμεσα όχι μόνο με την αγγειοδιαστολή, αλλά και με τα ανακλώμενα κύματα και την αρτηριακή σκληρία [28], κάνοντας το ΝΟ και τη σύνθεση της ενδοθηλίνης 1 τον κυριότερο μηχανισμό ο οποίος εμπλέκεται στις μεταβολές του ΑΙχ. Θεωρείται ότι τα συστατικά του κόκκινου κρασιού (δηλαδή το αλκοόλ και οι αντιοξειδωτικές ουσίες) σε οξεία φάση προκαλούν αγγειοδιαστολή, η οποία πιθανότατα μειώνει την περιφερική αντίσταση και συνεπώς μειώνει την ένταση των ανακλώμενων κυμάτων έχοντας ως αποτέλεσμα μια μείωση στο δείκτη ενίσχυσης.

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι να ανακλώμενα κύματα συσχετίζονται ανεξάρτητα με αυξημένο κίνδυνο για σοβαρά βραχυχρόνια και μακροχρόνια καρδιαγγειακά συμβάματα σε ασθενείς που υπόκεινται σε στεφανιαίες παρεμβάσεις [29], είναι επίσης ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες της καρδιαγγειακή θνητότητας από όλες τις αιτίες, καθώς και της καρδιαγγειακής θνησιμότητας σε ασθενείς που βρίσκονται στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου [30] και ακόμη ισχυροί ανεξάρτητοι δείκτες για πρώιμη στεφανιαία νόσο [4]. Συνεπώς οποιαδήποτε διατροφική παρέμβαση, όπως το κόκκινο κρασί και τα συστατικά του, με πιθανές επιδράσεις μείωσης των ανακλώμενων κυμάτων, κερδίζει μεγάλη προσοχή και αξίζει περαιτέρω διερεύνησης στοχεύοντας σε μια πιθανή μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Τέλος, θα πρέπει να μνημονευθεί το γεγονός ότι μεγαλύτερο δείγμα ίσως να αποδείκνυε στατιστικά σημαντική μεταβολή του AIχ μετά από το κάπνισμα ενός τσιγάρου. Επιπρόσθετα θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο στόχος μας να διερευνήσουμε το κάπνισμα και την κατανάλωση κόκκινου κρασιού μαζί έτσι ώστε να μιμηθούμε μια πολύ κοινή συνήθεια της πλειοψηφίας των καπνιστών, ίσως να απέκρυψε κάποιες από τις επιδράσεις τους. Αυτό συμβαίνει επειδή το κάπνισμα δρα στις αιμοδυναμικές παραμέτρους για περίπου 30 λεπτά, ενώ το κόκκινο κρασί ξεκινά να δρα σχεδόν 30 λεπτά μετά την κατανάλωσή του και διαρκεί για περισσότερο από 90 λεπτά. Παρόλ' αυτά, ο σχεδιασμός της μελέτης αντανακλά την πραγματικότητα, αφού οι περισσότεροι καπνιστές ανάβουν το πρώτο τσιγάρο στο ξεκίνημα ενός ποτού και συνήθως δεν περιμένουν μέχρι να πιουν όλο το ποτήρι από το κόκκινο κρασί πριν καπνίσουν ξανά. Για τον ίδιο λόγο ο σχεδιασμός της μελέτης διήρκεσε 90 λεπτά μεταγευματικά και δεν επεκτάθηκε περισσότερο χρονικά, έτσι ώστε να διερευνήσει αποκλειστικά τις επιδράσεις του κρασιού στις αιμοδυναμικές παραμέτρους.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν την πρώτη άμεση απόδειξη ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού αντιστρέφουν τις οξείες ανεπιθύμητες επιδράσεις του καπνίσματος στην περιφερική συστολική πίεση, υποδεικνύοντας ότι το κόκκινο κρασί περιέχει σημαντικές αγγειοδραστικές ουσίες, ικανές να εξαλείψουν τις καταστροφικές δράσεις του οξέος καπνίσματος. Επιπρόσθετα, το κόκκινο κρασί και τα συστατικά του, δηλαδή το αλκοόλ και τα αντιοξειδωτικά φαίνεται να έχουν οξεία ευεργετική δράση στα ανακλώμενα κύματα σε υγιείς καπνιστές. Παρόλ' αυτά, δεν έχει ακόμη διερευνηθεί προοπτικά, εάν η μακροχρόνια μέτρια κατανάλωση κρασιού έχει ευεργετικές επιδράσεις στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και στην αγγειακή λειτουργία,

γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για περαιτέρω έρευνα, καθώς η κατανάλωση κόκκινου κρασιού αποτελεί μια πολύ κοινή συνήθεια, ειδικά ανάμεσα σε καπνιστές. Επομένως περισσότερες αποδείξεις είναι απαραίτητες έτσι ώστε να συστήνονται συγκεκριμένες διατροφικές τροποποιήσεις σχετικά με το κόκκινο κρασί και τη χρήση αλκοόλ, ως ένα μέρος της θεραπευτικής και προληπτικής προσέγγισης, σκοπεύοντας στη μείωση της αρτηριακής σκληρίας και των ανακλώμενων κυμάτων.

2.5. Μεταγευματική βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου. Μια συνεργιστική δράση των συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας.

Η εργασία αυτή είναι υπό κρίση για δημοσίευση στο περιοδικό British Journal of Nutrition ως εξής:

Postprandial improvement of endothelial function by red wine and olive oil antioxidants: A synergistic effect of components of the Mediterranean Diet. Kalliopi Karatzi, Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Th. Voidonikola, Giorgia D. Vamvakou, John Lekakis, Antonis Zampelas.

Περίληψη

Σκοπός Η κατανάλωση ελαιολάδου μπορεί να προκαλέσει μεταγευματική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ενώ η οξεία κατανάλωση κόκκινου κρασιού φαίνεται ότι τη βελτιώνει. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει τη συνδυασμένη επίδραση δύο πολύ σημαντικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας, του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου, στη μεταγευματική ενδοθηλιακή λειτουργία.

Μέθοδοι Δεκαπέντε υγιείς εθελοντές συμμετείχαν στη μελέτη η οποία αποτελείτε από 4 εργαστηριακές ημέρες. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να καταναλώσουν ένα γεύμα σε κάθε εργαστηριακή ημέρα το οποίο περιείχε 50 γρ. ελαιόλαδο και 250 ml κόκκινο κρασί. Δύο τύποι κόκκινου κρασιού (κόκκινο και λευκό, πλούσιο και φτωχό σε αντιοξειδωτικά αντίστοιχα) και δύο τύποι ελαιολάδου (αγουρέλαιο και ραφινέ, πλούσιο και φτωχό σε αντιοξειδωτικά αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πειραματικό σχεδιασμό 2 επί 2. Η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή μέσω ροής (FMD) μετρήθηκε με υπερηχοτομογράφο στη νηστεία και 1, 2, και 3 ώρες μεταγευματικά. **Αποτελέσματα** Η συνδυασμένη κατανάλωση κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου (πλούσια και τα δύο σε αντιοξειδωτικά) βελτίωσε το FMD μεταγευματικά (p=0,002, ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις), και η βελτίωση αυτή παρέμεινε στατιστικά σημαντική για 1 ώρα (p=0,002) και 2 ώρες (ρ= 0,037) μετά το τέλος του γεύματος συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στη φάση της

νηστείας. Κανένας άλλος συνδυασμός κρασιού και ελαιολάδου δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στο FMD.

Συμπεράσματα Η οξεία ταυτόχρονη κατανάλωση κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου τα οποία είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά, οδήγησαν σε βελτίωση της μεταγευματικής ενδοθηλιακής λειτουργίας σε υγιείς εθελοντές. Αυτά τα ευρήματα παρέχουν μια επιπρόσθετη ευεργετική δράση των συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας και των αντιοξειδωτικών ουσιών της στην ενδοθηλιακή λειτουργία σε μεταγευματικό στάδιο.

Εισαγωγή

Το ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί είναι δύο σημαντικά συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας, η οποία έχει αναγνωριστεί ως η δίαιτα επιλογής για τη μείωση του κινδύνου από καρδιαγγειακά νοσήματα [1]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη Μεσογειακή Δίαιτα και στον καρδιαγγειακό κίνδυνο [2-6], αλλά μόνο ελάχιστες αναφέρουν κάποια ευεργετική μακροχρόνια επίδρασή της στην ενδοθηλιακή λειτουργία και μάλιστα σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία, ή μεταβολικό σύνδρομο [7, 8]. Εφόσον η ενδοθηλιακή λειτουργία είναι ένας πρώιμος δείκτης αθηρωμάτωσης και αγγειακής καταστροφής [9], η αλληλεπίδρασή της με συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Οι πιθανές επιδράσεις της μακροχρόνιας κατανάλωσης ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί [10]. Παρόλ' αυτά, υπάρχουν μερικές μελέτες οι οποίες διερεύνησαν την οξεία μεταγευματική επίδρασή του και έδειξαν ότι η κατανάλωση ελαιολάδου ως μέρος ενός γεύματος προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [11, 12]. Αυτή η επίδραση μπορεί να συσχετίζεται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες σε μεταγευματικό επίπεδο, ενώ έχει δειχθεί ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινών C και E μαζί με το ελαιόλαδο ανέτρεψαν αυτή την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [12].

Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα σχετικά με την κατανάλωση κόκκινου κρασιού είναι ξεκάθαρα, καθώς η μέτρια χρόνια κατανάλωσή του βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία τόσο σε υγιείς εθελοντές, όσο και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [13, 14]. Επιπρόσθετα, το κόκκινο κρασί βρέθηκε ότι βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία, εκφρασμένη ως FMD, καθώς και τις ιδιότητες το αγγειακού τοιχώματος στην οξεία φάση

μετά την κατανάλωσή του [15-17] σε υγιείς εθελοντές και ασθενείς με στεφανιαία νόσο, και οι επιδράσεις του αυτές μπορούν να αποδοθούν κυρίως στις αντιοξειδωτικές του ουσίες.

Το ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί, παρά τα αντίθετα μεταγευματικά τους αποτελέσματα, αποτελούν δύο από τα κυριότερα συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας και ο συνδυασμός τους σε ένα γεύμα είναι μια πολύ κοινή συνήθεια. Μέχρι σήμερα μόνο μία μελέτη έχει διερευνήσει το συνδυασμό τους στην ενδοθηλιακή ενεργοποίηση *in vitro* [18], συμπεραίνοντας ότι τα αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και στο κόκκινο κρασί προσφέρουν ευεργετικές αγγειακές επιδράσεις. Δεν υπάρχουν in-vivo δεδομένα σχετικά με τη συνδυασμένη επίδραση του ελαιολάδου και του κόκκινου κρασιού στο αγγειακό ενδοθήλιο. Επομένως, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει τη συνδυασμένη δράση ελαιολάδου και κόκκινου κρασιού στην ενδοθηλιακή λειτουργία υγιών εθελοντών.

Μέθοδοι

Πληθυσμός της μελέτης

Μελετήσαμε δεκαπέντε εθελοντές (7 άνδρες) με μέση ηλικία 29,5 ± 1,5 έτη (μέσος ± τυπικό σφάλμα) και δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) 23 ± 0,7 kg/m^2. Όλοι οι εθελοντές ήταν μη καπνιστές, είχαν φυσιολογικά επίπεδα αρτηριακής πίεσης (<140/90 mmHg), επίπεδα χοληστερόλης <240mg/dl, κανένα ιστορικό διαβήτη ή οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου και δεν εμφάνιζαν παχυσαρκία ή κάποια νόσο του ήπατος ή άλλη ενδοκρινολογική ασθένεια. Όσοι από αυτούς χρησιμοποιούσαν αντιοξειδωτικές βιταμίνες ή άλλο φάρμακο (συμπεριλαμβανομένων και αντισυλληπτικών χαπιών για τις γυναίκες εθελόντριες), καθώς και όσοι έκαναν κάποιου είδους δίαιτα κατά τη διάρκεια της μελέτης ή είχαν ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ μεγαλύτερη από την ενδεδειγμένη (20-30 γρ. αλκοόλ/ ημέρα), αποκλείονταν από τη μελέτη. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη έδωσαν τη συγκατάθεσή τους προτού αρχίσουν οι πειραματικές διαδικασίες.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η μελέτη ήταν διπλά τυφλή, σχεδιασμού 2 επί 2 και αποτελούνταν από 4 εργαστηριακές ημέρες. Σε κάθε ημέρα, οι εθελοντές καθοδηγήθηκαν ώστε να προσέρχονται στο Αγγειολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» μετά από δωδεκάωρη νηστεία και μετά από εικοσιτετράωρη αποχή από το αλκοόλ και τα ροφήματα που περιέχουν καφεΐνη και μια αρχική υπερηχογραφική εκτίμηση σε φάση νηστείας λάμβανε χώρα. Στη συνέχεια, ένα ελαφρύ γεύμα καταναλώνονταν από κάθε εθελοντή σε διάστημα όχι

μεγαλύτερο από 15 λεπτά. Υπερηχογραφίες μετρήσεις επαναλαμβάνονταν σε 1, 2 και 3 ώρες μετά το τέλος του γεύματος. Το γεύμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ήταν μια χορτόσουπα (η οποία περιείχε 50 γρ. ραφινέ ελαιόλαδο ή 50 γρ. αγουρέλαιο), 2 φέτες λευκού ψωμιού και 250 ml είτε κόκκινου, είτε λευκού κρασιού (καθένα από τα οποία περιείχε 12% αιθανόλη). Κατά τη διάρκεια των 4 ημερών, οι εθελοντές κατανάλωσαν τα γεύματα αυτά σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των δύο τύπων κρασιού και ελαιολάδου (κόκκινο κρασί και ραφινέ ελαιόλαδο, κόκκινο κρασί και αγουρέλαιο, λευκό κρασί και ραφινέ ελαιόλαδο, λευκό κρασί και αγουρέλαιο) σε τυχαία σειρά. Όλοι οι εθελοντές συμβουλεύτηκαν να σταματήσουν την άσκηση κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επιπρόσθετα, τους ζητήθηκε να καταναλώνουν τα ίδια τρόφιμα την ημέρα πριν από κάθε εργαστηριακή ημέρα. Επίσης, έγιναν ανακλήσεις εικοσιτετραώρου προκειμένου να ελεγχθεί η συμμόρφωσή τους στις διαιτολογικές οδηγίες.

Αναλύσεις κρασιού και ελαιολάδου

Η συγκέντρωση των ολικών αντιοξειδωτικών στα κρασιά του πειράματος και στους δύο τύπους ελαιολάδου υπολογίσθηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteau [19]. Αυτές οι αναλύσεις έδειξαν ότι το κόκκινο κρασί περιείχε 650 μg/ 100 ml ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος, ενώ το λευκό κρασί περιείχε 130 μg/ 100 ml ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος. Επιπρόσθετα, το αγουρέλαιο βρέθηκε να περιέχει 236 ppm και το ραφινέ ελαιόλαδο 20 ppm ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος.

FMD

Η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (flow-mediated dilatation) (FMD) μετρήθηκε στους εθελοντές με υπερηχογράφο υψηλής ευκρίνειας (Acuson 128xp, Calif). Η ακριβής μέθοδος έχει περιγραφεί στο παρελθόν [20]. Ο κάθε εθελοντής οδηγήθηκε σε ένα ήρεμο δωμάτιο 20-25 ° C και αφέθηκε εκεί να ηρεμήσει σε ύπτια θέση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια έγιναν οι μετρήσεις στην δεξιά βραχιόνιο αρτηρία με την χρήση ενός γραμμικού υπερηχομετατροπέα 7,0 MHz, από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές που δεν γνώριζαν την εξέλιξη της μελέτης. Αρχικά μετρήθηκε η διάμετρος της αρτηρίας σε συγκεκριμένη ανατομική θέση της (βασική διάμετρος), χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικές σημάνσεις (calipers) μεταξύ των δύο σημείων στο τέλος της διαστολής. Στην συνέχεια μια περιχειρίδα που είχε τοποθετηθεί 8 εκ. κάτω από το σημείο μέτρησης της βραχιονίου αρτηρίας και προς

την μεριά του καρπού, φούσκωσε με πίεση στα 250-300 mmHg και παρέμεινε έτσι για 4 λεπτά, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την αιματική ροή στο άκρο. Μετά τα 4 λεπτά έγινε απότομη άρση της περίδεσης αυξάνοντας την αιματική ροή (υπεραιμία) και προκαλώντας αντιδραστική αγγειοδιαστολή στο μετρούμενο σημείο της βραχιονίου αρτηρίας. Μέχρι και 90 δευτερόλεπτα μετά υπήρχε συνεχής καταγραφή της διαμέτρου της αρτηρίας στο ίδιο ακριβώς σημείο με την βασική μέτρηση (διάμετρος κατά την αντιδραστική υπεραιμία).

Η όλη διαδικασία μέτρησης του FMD έγινε σε κατάσταση 12-ωρης νηστείας των εθελοντών και 1, 2 και 3 ώρες μετά το τέλος κάθε γεύματος. Το FMD σε κάθε μετρούμενη χρονική στιγμή υπολογίσθηκε ως η αύξηση της διαμέτρου της αρτηρίας προς την αρχική (βασική) διάμετρο της, επί %.Οι διαφορές μεταξύ των παρατηρητών και οι διαφορές στον ίδιο παρατηρητή στις μετρήσεις του Εργαστηρίου μας είναι 0,1 ± 0,12 mm και 0,08 ± 0,19 mm αντίστοιχα, ενώ η διαφορά στην μέτρηση του FMD σε δυό διαδοχικές ημέρες είναι 1,1% ± 1%.

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν για κανονικότητα κατανομής με έλεγχο Kolmogorov-Smirnov και Q-Q plots. Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα οι μεταβλητές που μετρήθηκαν στη νηστεία, 1, 2 και 3 ώρες αξιολογήθηκαν με ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ANOVA) και με ελέγχους Student t-test για πολλαπλές συγκρίσεις διορθωμένους κατά Bonferroni. Μία ακόμη ANOVA με 2 ποτά επί 4 χρονικές στιγμές (νηστεία, 1, 2, 3 ώρες μεταγευματικά) εφαρμόστηκε προκειμένου να επιτύχουμε σύγκριση ανά ζεύγη (π.χ. η αντίδραση του FMD μετά από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και ραφινέ ελαιολάδου συγκριτικά με την αντίδραση του FMD μετά από την κατανάλωση λευκού κρασιού και ραφινέ ελαιολάδου). Οι συγκρίσεις των τιμών νηστείας ανάμεσα στις διάφορες εργαστηριακές ημέρες, έγιναν με μη παραμετρικούς ελέγχους Wilcoxon. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα (SE), εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά. Η τιμή p-value < 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.0 για τα Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Το μέγεθος του δείγματος των 15 ατόμων υπολογίσθηκε ότι ήταν κατάλληλο να ανιχνεύσει διαφορές στο FMD κατά 2% ανάμεσα σε ζεύγη δειγμάτων με πιθανότητα σφάλματος τύπου Ι ίση με 0,05 και δύναμη 80% [21].

Αποτελέσματα

Η τιμές νηστείας για το FMD, την αγγειακή διάμετρο, τον καρδιακό ρυθμό και τη ροή κατά την ηρεμία δεν διέφεραν ανάμεσα στις διάφορες εργαστηριακές ημέρες. Οι τιμές τους στη φάση της νηστείας και στη μεταγευματική περίοδο φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Διάμετρος αγγείου, ροή σε ηρεμία και υπεραιμία, καρδιακός ρυθμό και FMD των τεσσάρων εργαστηριακών ημερών στη νηστεία και 1, 2 και 3 ώρες μετά την κατανάλωση.

	Κόκκινο κρασί + Ραφινέ ελαιόλαδο	**Λευκό κρασί + Ραφινέ ελαιόλαδο**	**Κόκκινο κρασί + αγουρέλαιο**	**Λευκό κρασί + αγουρέλαιο**
Διάμετρος αγγείου (mm)				
νηστεία	3.5±0.1	3.5±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1
1 ώρα	3.8±0.1	3.9±0.1	3.7±0.1	3.7±0.1
2 ώρες	3.8±0.1	3.7±0.1	3.7±0.1	3.8±0.1
3 ώρες	3.8±0.1	3.7±0.1	3.8±0.2	3.6±0.1
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.005	0.004	<0.001	<0.001
Ροή σε ηρεμία (ml/ λεπτό)				
νηστεία	123.3±15.6	72.4±9.2	140.4±19.5	104.9±21.5
1 ώρα	135.5±21.1	95.8±21.7	140.4±18.6	131.8±28.2
2 ώρες	138.6±18.6	99.8±22.5	107.2±19.0	134.2±41.3
3 ώρες	123.4±21.7	94.9±16.6	124.3±16.0	86.9±20.8
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.815	0.602	0.425	0.281
Υπεραιμία (%)				
νηστεία	150.1±18.8	280.5±28.1	164.8±31.7	275.7±69.4
1 ώρα	263.2±97.9	234.3±184.9	136.6±19.5	168.0±31.1
2 ώρες	133.9±16.0	316.9±70.8	342.0±135.8	243.6±61.8
3 ώρες	198.8±45.8	250.8±51.7	178.3±23.1	259.6±69.0
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.306	0.186	0.213	0.576
Καρδιακός ρυθμός (χτύποι/ λεπτό)				
νηστεία	68.9±2.7	69.3±3.2	67.0±2.3	71.1±3.3
1 ώρα	69.4±2.1	70.7±3.0	71.4±2.1	69.5±2.8
2 ώρες	69.3±1.7	73.2±4.0	72.3±2.5	74.8±3.2
3 ώρες	70.7±2.2	71.6±3.7	71.9±2.6	71.3±3.1
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.846	0.646	0.302	0.217
FMD (%)				

νηστεία	6.6±0.8	7.2±0.7	5.9±0.6	7.5±1.1
1 ώρα	6.9±1.2	6.5±0.7	10.5±0.9	6.8±0.8
2 ώρες	7.8±0.8	7.3±0.6	9.0±0.8	6.9±0.7
3 ώρες	6.8±0.8	6.6±0.8	7.8±1.0	6.7±0.9
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.789	0.518	0.002	0.887

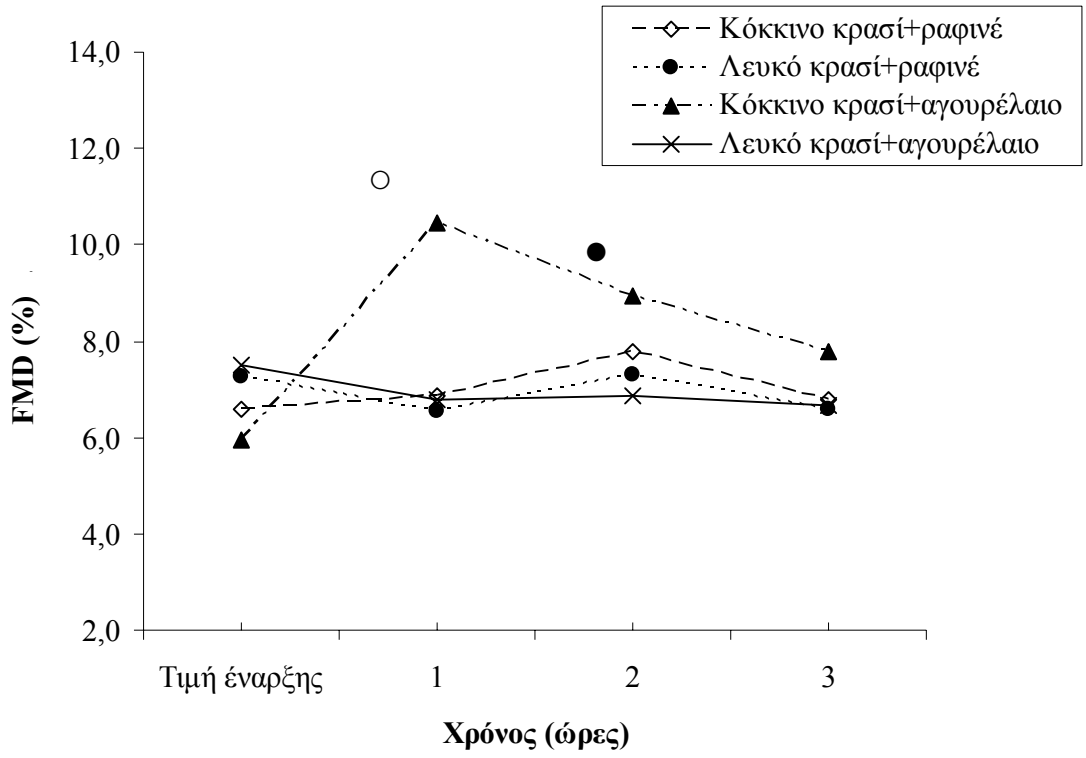
Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα (SE).

Το FMD αυξήθηκε σημαντικά μετά την κατανάλωση του κόκκινου κρασιού και του αγουρελαίου (και τα δύο είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά) (p=0,002, ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις), παρέμεινε αυξημένο σημαντικά για την πρώτη (p=0,002) και για τη δεύτερη ώρα (ρ=0,037) μεταγευματικά και επέστρεψε στις τιμές της νηστείας την τρίτη ώρα.

Δεν σημειώθηκε καμία μεταβολή στο FMD μετά από την κατανάλωση οποιουδήποτε άλλου συνδυασμού κρασιού και ελαιολάδου. Η αύξηση στο FMD μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από ότι μετά από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και ραφινέ ελαιολάδου (p=0,014), λευκού κρασιού και αγουρελαίου (p=0,004) και λευκού κρασιού και ραφινέ ελαιολάδου (p<0,001) (Σχήμα 1).

Η απόκριση του FMD δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις παρεμβάσεις κόκκινου κρασιού – ραφινέ ελαιολάδου, λευκού κρασιού – αγουρελαίου και λευκού κρασιού – ραφινέ ελαιολάδου.

Σχήμα 1 Απόκριση του FMD στη συνδυασμένη κατανάλωση των διαφορετικών τύπων κρασιού και ελαιολάδου.



○ και ● υποδεικνύουν σημαντική διαφορά του FMD, 1 και 2 ώρες αντίστοιχα μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου συγκριτικά με όλες τις άλλες τιμές του FMD στις ίδιες χρονικές στιγμές.

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε για πρώτη φορά τις μεταγευματικές επιδράσεις του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία υποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών τους ουσιών προκαλεί σημαντική βελτίωση στο FMD στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο. Μέχρι τώρα υπάρχουν πολλές έρευνες σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους τα συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας έχουν καρδιοπροστατευτική δράση [2, 3]. Δυστυχώς, τα δεδομένα σχετικά με τις μεταγευματικές επιδράσεις της δίαιτας αυτής στην ενδοθηλιακή λειτουργία, η οποία είναι ένας πρώιμος δείκτης αγγειακού τραυματισμού και καρδιαγγειακής νόσου, είναι περιορισμένα. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να διερευνηθούν οι πιθανές μεταγευματικές επιδράσεις δύο σημαντικών συστατικών της δίαιτας αυτής, του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου στο

ενδοθήλιο και να αποκαλυφθούν μερικές πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την καρδιοπροστατευτική τους δράση.

Οι τύποι του κρασιού και του ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν με προσοχή, έτσι ώστε να καταστεί δυνατό να διερευνηθούν οι επιδράσεις των αντιοξειδωτικών τους ουσιών, καθώς και των άλλων συστατικών τους. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες που βρίσκονται στο κόκκινο κρασί και στο αγουρέλαιο όταν καταναλώνονται μαζί προκαλούν σημαντική μεταγευματική αύξηση στο FMD. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κανένας άλλος συνδυασμός κρασιού και ελαιολάδου δεν αύξησε το FMD, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού και του αγουρελαίου όταν καταναλώνονται ξεχωριστά δεν είναι ικανά για αυτή την ευεργετική επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Επιπρόσθετα, δεν μπορεί να υποστηριχθεί η θεωρία ότι άλλα συστατικά του κρασιού και του ελαιολάδου (π.χ. αλκοόλ, ελαϊκό οξύ) έχουν συμμετοχή στην αύξηση του FMD, καθώς μόνο ο συνδυασμός κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου βρέθηκε να είναι αποτελεσματικός.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε (FMD) είναι μια μη αιματηρή, εύκολη στη χρήση μέθοδος εκτίμησης της ενδοθηλιακής λειτουργίας, συσχετίζεται στενά με τη στεφανιαία ενδοθηλιακή λειτουργία [22] και έχει συσχετιστεί με αρκετούς γνωστούς παράγοντες κινδύνου [23]. Λαμβάνοντας υπόψιν το χαρακτηριστικό ότι το FMD είναι μια μέθοδος εξαρτώμενη από το NO [24] μπορεί να υποτεθεί ότι η παρατηρούμενη αύξηση του FMD είναι η συνέπεια της αύξησης παραγωγής και βιοδιαθεσιμότητας του NO από τα αντιοξειδωτικά του κρασιού και του ελαιολάδου. Σε ότι αφορά τις επιδράσεις του κόκκινου κρασιού, υπάρχουν μελέτες in vitro που δείχνουν ότι στην οξεία φάση, οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού προκαλούν αγγειοδιαστολή μέσω της ενίσχυσης της παραγωγής NO, καθώς και της αυξημένης προστασίας του NO από την καταστροφή από ελεύθερες ρίζες [25-27]. Ακόμη, μελέτες in vivo σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο υποδεικνύουν ότι η πρόσληψη των αντιοξειδωτικών του κόκκινου κρασιού βελτιώνουν το FMD, πιθανότατα μέσω έκκρισης NO [15, 16, 28] και ότι είναι ικανές ακόμη και να αναστρέψουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλεί το οξύ κάπνισμα [29]. Επιπρόσθετα, τα αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο έχουν μελετηθεί σε έρευνες in-vitro σε δακτυλίου αορτής είτε ανθρώπου, είτε αρουραίου [30, 31]. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου, ενισχύουν την παραγωγή NO in-vitro,

γεγονός το οποίο είναι σε συμφωνία με την υπόθεσή μας ότι το κόκκινο κρασί και του αγουρέλαιο προκαλούν έκκριση NO, εξηγώντας με αυτό τον τρόπο την αύξηση στο FMD.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι όλοι οι άλλοι συνδυασμοί κρασιού (λευκού ή κόκκινου) και ελαιολάδου δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στο FMD μεταγευματικά. Τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης σχετικά με τις μεταγευματικές επιδράσεις του ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία έδειξαν ότι 50 γρ ελαιολάδου προκάλεσαν σημαντική μείωση του FMD, η οποία διήρκεσε 3 ώρες μετά την κατανάλωσή του, πιθανότατα μέσω αύξησης της υπερτριγλυκεριδαιμίας και αύξησης του οξειδωτικού στρες [12]. Το φαινόμενο αυτό αναστράφηκε πλήρως με την προσθήκη αντιοξειδωτικών βιταμινών (C και E) προερχόμενες από ξίδι βαλσάμικο και σαλάτα. Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι τα αντιοξειδωτικά στο κόκκινο κρασί και στο αγουρέλαιο όχι μόνο εμπόδισαν μια πιθανή επιδείνωση του FMD, αλλά προκάλεσαν και βελτίωση στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Επιπλέον, η ανάλυση των δύο παρεμβάσεων όπου χρησιμοποιήθηκε ραφινέ ελαιόλαδο μαζί με είτε κόκκινο, είτε λευκό κρασί απέδειξε ότι και οι δύο τύποι κρασιού ανέστρεψαν την αναμενόμενη μείωση του FMD. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήσαμε την ίδια ποσότητα ελαιολάδου με αυτή που χρησιμοποιήθηκε από τον Vogel και τους συνεργάτες του και τα ευρήματά μας αποκάλυψαν ότι πιθανότατα η αιθανόλη ήταν υπεύθυνη για το φαινόμενο αυτό. Έχει ήδη δειχθεί ότι η αιθανόλη δρα ως αγγειοδιασταλτική ουσία, αφού έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τη σύνθεση NO και προωθεί την έκκρισή του [32]. Επομένως, είναι πιθανό ότι το αλκοόλ που περιέχεται τόσο στο κόκκινο, όσο και στο λευκό κρασί (12%) προκαλεί αγγειοδιαστολή η οποία αντιστρέφει τη θεωρητική μείωση του FMD από την κατανάλωση ελαιολάδου.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν για πρώτη φορά οι συνδυασμένες μεταγευματικές επιδράσεις στην ενδοθηλιακή λειτουργία υγιών εθελοντών, δύο σημαντικών συστατικών της Μεσογειακή Δίαιτας. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου, όταν λαμβάνονται ταυτόχρονα, βελτιώνουν το FMD και αυτή τους η επίδραση διαρκεί ακόμη και 2 ώρες μεταγευματικά. Τα ευρήματα αυτά αποδίδουν μια πρόσθετη καρδιοπροστατευτική δράση στις αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται στη Μεσογειακή Δίαιτα, η οποία χαρακτηρίζεται από μέτρια ημερήσια κατανάλωση κόκκινου κρασιού και τακτική χρήση ελαιολάδου.

2.6. Οξείες ευεργετικές επιδράσεις συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στην αρτηριακή πίεση και τα ανακλώμενα κύματα

Η εργασία αυτή είναι υπό κρίση για δημοσίευση στο περιοδικό American Journal of Cardiology ως εξής:

Acute beneficial effects of components of the Mediterranean diet on blood pressure and arterial wave reflections. Christos Papamichael, Kalliopi Karatzi, Theodore G. Papaioannou, Emmanouil Karatzis, Paraskevi Katsichti, Vasilis Sideris, Nikolaos Zakopoulos, Antonis Zampelas , John Lekakis.

Περίληψη

Σκοπός Η οξεία κατανάλωση κόκκινου κρασιού θεωρείται ευεργετική για τις αιμοδυναμικές παραμέτρους, ενώ δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα σχετικά με το ελαιόλαδο. Ο σκοπός της μελέτης ήταν να προσδιορίσουμε τη συνδυασμένη μεταγευματική επίδραση του κρασιού και του ελαιολάδου, δύο σημαντικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στις αιμοδυναμικές παραμέτρους.

Μέθοδοι Δεκαπέντε υγιείς εθελοντές κατανάλωσαν 4 γεύματα σε διαφορετικές ημέρες, τα οποία περιείχαν 50 γρ ελαιόλαδο και 250 ml κρασί. Δύο τύποι κρασιού, κόκκινο (R) και λευκό (W) και δύο τύποι ελαιολάδου, αγουρέλαιο (G) και ραφινέ (O) (πλούσια και φτωχά σε αντιοξειδωτικά αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς (RO, RG, WO, WG). Χρησιμοποιήθηκε τονομετρία προκειμένου να εκτιμηθεί η κυματομορφή της αορτικής πίεσης στη νηστεία και 1, 2 και 3 ώρες μεταγευματικά, εκφρασμένη με τη βοήθεια του δείκτη ενίσχυσης (AIx; %).

Αποτελέσματα Όλα τα γεύματα μείωσαν τα ανακλώμενα κύματα, όπως εκφράζονται από μείωση του AIχ (RO και RG, $p<0,001$, WO, $p=0,007$ και WG, $p=0,039$). Η συνολική μείωση του AIx μετά από την κατανάλωση RG ήταν σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη αντίδραση μετά την κατανάλωση RO ($p=0,001$), WG ($p=0,021$) και WO ($p=0,023$). Μόνο ο συνδυασμός WO και WG μείωσε την περιφερική συστολική πίεση (WG, $p=0,002$, WO, $p=0,035$). Η κεντρική και περιφερική διαστολική και η κεντρική συστολική

πίεση μειώθηκαν μετά από την κατανάλωση και των τεσσάρων συνδυασμών κρασιού και ελαιολάδου ($p<0,05$).

Συμπεράσματα Το κρασί και το ελαιόλαδο παρέχουν ευεργετικές μεταγευματικές επιδράσεις στις αιμοδυναμικές παραμέτρους, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στις αντιοξειδωτικές τους ουσίες και σε άλλα συστατικά. Αυτά τα ευρήματα φανερώνουν μια επιπρόσθετη ευεργετική επίδραση των συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στις ελαστικές ιδιότητες των αρτηριών και στις αιμοδυναμικές παραμέτρους της αορτής σε μεταγευματικό στάδιο.

Εισαγωγή

Το κρασί και το ελαιόλαδο αποτελούν δύο από τα κυριότερα συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας με σημαντικές καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις [1]. Παρόλο που η αρτηριακή πίεση και πρόσφατα τα ανακλώμενα κύματα χαρακτηρίζονται ως σημαντικοί καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου [2, 3], υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τις πιθανές επιδράσεις τόσο του κρασιού, όσο και του ελαιολάδου στις ιδιότητες των αρτηριών και στις αιμοδυναμικές παραμέτρους.

Το ελαιόλαδο, το οποίο αποτελεί ένα μεγάλο κομμάτι της Μεσογειακής Δίαιτας, έχει βρεθεί ότι μειώνει την αρτηριακή πίεση μετά από μακροχρόνια, μέτρια, καθημερινή κατανάλωσή του [4-6], ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τις πιθανές μακροχρόνιες επιδράσεις του στην αρτηριακή σκληρία και στα ανακλώμενα κύματα. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχουν εργασίες σχετικά με τις πιθανές οξείες επιδράσεις του ελαιολάδου στις ελαστικές ιδιότητες των αρτηριών. Το γεγονός αυτό αποτελεί πολύ σημαντική έλλειψη της επιστημονικής έρευνας, καθώς είναι γνωστό ότι ένα λιπαρό γεύμα επιδρά στις αιμοδυναμικές παραμέτρους των αρτηριών σε μεταγευματικό στάδιο, επηρεάζοντας κατά προέκταση και τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας [7, 8]. Επομένως είναι πιθανό ότι το ελαιόλαδο, το οποίο συνήθως προτείνεται ως καρδιοπροστατευτικό τρόφιμο, επηρεάζει τα ανακλώμενα κύματα, την αρτηριακή σκληρία και την αρτηριακή πίεση μεταγευματικά, όμως αυτές οι επιδράσεις δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί.

Από την άλλη πλευρά, το κρασί και τα συστατικά του είναι ελαφρώς περισσότερο μελετημένα από ότι το ελαιόλαδο, σε ότι αφορά την αρτηριακή πίεση και τα ανακλώμενα κύματα. Είναι ήδη γνωστό ότι η μέτρια, καθημερινή κατανάλωση αλκοόλ (2-3 ποτά την ημέρα) συσχετίζεται με χαμηλότερη ταχύτητα κυμάτων παλμού συγκριτικά με υψηλότερη

ημερήσια πρόσληψη ή με πλήρη αποχή από το αλκοόλ [9, 10]. Αντίθετα, το αλκοόλ μειώνει την αρτηριακή σκληρία σε υγιείς εθελοντές στην οξεία μεταγευματική φάση [10], ενώ πρόσφατα, έγινε γνωστό ότι τα ανακλώμενα κύματα, όπως ακριβώς και η αρτηριακή πίεση μειώνονται σημαντικά από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού σε μεταγευματικό στάδιο, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [11].

Ο συνδυασμός του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου σε ένα γεύμα είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας και την ίδια στιγμή μια πολύ κοινή συνήθεια. Εφόσον δεν υπάρχουν μελέτες in vivo που να διερευνούν τη μεταγευματική επίδρασή τους στις ελαστικές ιδιότητες των αρτηριών και στις αιμοδυναμικές παραμέτρους, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παρέχει νέα στοιχεία στις πιθανές συνδυασμένες επιδράσεις του κρασιού και του ελαιολάδου και των συστατικών τους στα ανακλώμενα κύματα και την αρτηριακή πίεση υγιών εθελοντών σε μεταγευματικό στάδιο.

Μέθοδοι

Πληθυσμός της μελέτης

Μελετήσαμε δεκαπέντε εθελοντές (7 άνδρες) με μέση ηλικία 29,5 ± 1,5 έτη (μέσος ± τυπικό σφάλμα) και δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) 23 ± 0,7 kg/m^2. Όλοι οι εθελοντές ήταν μη καπνιστές, είχαν φυσιολογικά επίπεδα αρτηριακής πίεσης (<140/90 mmHg), επίπεδα χοληστερόλης <240mg/dl, κανένα ιστορικό διαβήτη ή οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου και δεν εμφάνιζαν παχυσαρκία ή κάποια νόσο του ήπατος ή άλλη ενδοκρινολογική ασθένεια. Όσοι από αυτούς χρησιμοποιούσαν αντιοξειδωτικές βιταμίνες ή άλλο φάρμακο (συμπεριλαμβανομένων και αντισυλληπτικών χαπιών για τις γυναίκες εθελόντριες), καθώς και όσοι έκαναν κάποιου είδους δίαιτα κατά τη διάρκεια της μελέτης ή είχαν ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ μεγαλύτερη από την ενδεδειγμένη (20-30 γρ. αλκοόλ/ ημέρα), αποκλείονταν από τη μελέτη. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη έδωσαν τη συγκατάθεσή τους προτού αρχίσουν οι πειραματικές διαδικασίες.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η μελέτη ήταν διπλά τυφλή, σχεδιασμού 2 επί 2 και αποτελούνταν από 4 εργαστηριακές ημέρες. Σε κάθε ημέρα, οι εθελοντές καθοδηγήθηκαν ώστε να προσέρχονται στο Αγγειολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» μετά από δωδεκάωρη νηστεία και μετά από εικοσιτετράωρη αποχή από το αλκοόλ και τα ροφήματα που περιέχουν καφεΐνη. Όλες οι μετρήσεις γίνονταν σε ένα ήσυχο, κλιματιζόμενο δωμάτιο (21 – 23 ^{o}C)

μεταξύ 9 το πρωί και 1 το μεσημέρι και αφού κάθε εθελοντής καθόταν σε ηρεμία για τουλάχιστον 15 λεπτά. Στη φάση της νηστείας γινόταν εκτίμηση της αρτηριακής πίεσης και των ανακλώμενων κυμάτων. Στη συνέχεια, ένα ελαφρύ γεύμα καταναλώνονταν από κάθε εθελοντή σε διάστημα όχι μεγαλύτερο από 15 λεπτά. Οι αιμοδυναμικές μετρήσεις επαναλαμβάνονταν σε 1, 2 και 3 ώρες μετά το τέλος του γεύματος. Το γεύμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ήταν μια χορτόσουπα (η οποία περιείχε 50 γρ. ραφινέ ελαιόλαδο ή 50 γρ. αγουρέλαιο), 2 φέτες λευκού ψωμιού και 250 ml είτε κόκκινου, είτε λευκού κρασιού (καθένα από τα οποία περιείχε 12% αιθανόλη). Κατά τη διάρκεια των 4 ημερών, οι εθελοντές κατανάλωσαν τα γεύματα αυτά σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των δύο τύπων κρασιού και ελαιολάδου (κόκκινο κρασί και ραφινέ ελαιόλαδο, κόκκινο κρασί και αγουρέλαιο, λευκό κρασί και ραφινέ ελαιόλαδο, λευκό κρασί και αγουρέλαιο) σε τυχαία σειρά. Όλοι οι εθελοντές συμβουλεύτηκαν να σταματήσουν την άσκηση κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επιπρόσθετα, τους ζητήθηκε να καταναλώνουν τα ίδια τρόφιμα την ημέρα πριν από κάθε εργαστηριακή ημέρα. Επίσης, έγιναν ανακλήσεις εικοσιτετραώρου προκειμένου να ελεγχθεί η συμμόρφωσή τους στις διαιτολογικές οδηγίες.

Αναλύσεις κρασιού και ελαιολάδου

Η συγκέντρωση των ολικών αντιοξειδωτικών στα κρασιά του πειράματος και στους δύο τύπους ελαιολάδου υπολογίσθηκαν με τη μέθοδο Folin – Ciocalteau [12]. Αυτές οι αναλύσεις έδειξαν ότι το κόκκινο κρασί περιείχε 650 μg/ 100 ml ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος, ενώ το λευκό κρασί περιείχε 130 μg/ 100 ml ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος. Επιπρόσθετα, το αγουρέλαιο βρέθηκε να περιέχει 236 ppm και το ραφινέ ελαιόλαδο 20 ppm ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος.

Αρτηριακή σκληρία – κύματα ανάκλασης – κεντρικές πιέσεις

Οι δείκτες των ανακλώμενων κυμάτων και της αρτηριακής σκληρίας προσδιορίστηκαν μη παρεμβατικά με τη χρήση της τονομετρίας και την ανάλυση των κυμάτων παλμού [13, 14]. Η μέθοδος περιγράφηκε προηγουμένως [11, 15]. Η κυματομορφή των περιφερικών πιέσεων μετατράπηκε με τη χρήση γενίκευσης των λειτουργιών μεταφοράς παρέχοντας την αντίστοιχη κυματομορφή της αορτικής πίεσης. Η ανάλυση της κυματομορφής αυτής που προέκυψε έγινε με το σύστημα Sphygmocor® (ATCOR Medical, Σύδνεϋ, Αυστραλία).

Ο δείκτης ενίσχυσης (AIx) χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηρίσει τα κύματα ανάκλασης. Ο AIχ υπολογίζεται από το λόγο της ενίσχυσης της πίεσης (AP) προς την πίεση παλμού. Η τονομετρία και η ανάλυση των κυμάτων παλμού έχουν περιγραφεί προηγουμένως [15, 16]. Εφόσον το AIx επηρεάζεται από τον καρδιακό ρυθμό [17], ο οποίος πιθανό να διαφέρει σε κάθε ασθενή και ίσως να μεταβάλλεται μετά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού, ένας δείκτης διορθωμένος για καρδιακό ρυθμό 75 bpm (AI@75) χρησιμοποιήθηκε όπως έχει προταθεί και στο παρελθόν [17].

Η ταχύτητα των κυμάτων παλμού η οποία χαρακτηρίζει την αρτηριακή σκληρία, εκτιμήθηκε έμμεσα από το χρόνο άφιξης των ανακλώμενων κυμάτων στην αορτή, η οποία αντιπροσωπεύει το χρόνο που χρειάζεται τα κύματα πίεσης να ταξιδέψουν από κεντρικές σε περιφερικές αρτηρίες και να επιστρέψουν πίσω στην αορτή ως αποτέλεσμα των ανακλώμενων κυμάτων.

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν για κανονικότητα κατανομής με έλεγχο Kolmogorov-Smirnov και Q-Q plots. Σε κάθε εργαστηριακή ημέρα οι μεταβλητές που μετρήθηκαν στη νηστεία, 1, 2 και 3 ώρες αξιολογήθηκαν με ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ANOVA) και με ελέγχους Student t-test για πολλαπλές συγκρίσεις διορθωμένους κατά Bonferroni. Μία ακόμη ANOVA με 2 ποτά επί 4 χρονικές στιγμές (νηστεία, 1, 2, 3 ώρες μεταγευματικά) εφαρμόστηκε προκειμένου να επιτύχουμε σύγκριση ανά ζεύγη (π.χ. η αντίδραση του FMD μετά από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και ραφινέ ελαιολάδου συγκριτικά με την αντίδραση του FMD μετά από την κατανάλωση λευκού κρασιού και ραφινέ ελαιολάδου). Οι συγκρίσεις των τιμών νηστείας ανάμεσα στις διάφορες εργαστηριακές ημέρες, έγιναν με μη παραμετρικούς ελέγχους Wilcoxon. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα (SE), εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά. Η τιμή p-value $< 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.0 για τα Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Αποτελέσματα

Οι τιμές νηστείας του δείκτη ενίσχυσης, του καρδιακού ρυθμού, της περιφερική και κεντρικής συστολική και διαστολικής πίεσης, δεν διέφεραν σημαντικά στις διάφορες εργαστηριακές ημέρες.

Το AIx μειώθηκε σημαντικά μετά την κατανάλωσή και των τεσσάρων συνδυασμών κρασιού και ελαιολάδου: RG ($p<0,001$), RO ($p<0,001$), WG ($p=0,039$) και WO ($p=0,007$) (Πίνακας 1) και η επίδραση αυτή ήταν σημαντική για 1 έως 3 ώρες μεταγευματικά ($p<0,05$) (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Το RG μείωσε τον AIx κατά περίπου 10.6%, το WG κατά 7.3%, το RO κατά 10.7% και το WO κατά 7.4%. Η συνολική μείωση του AIx μετά από την κατανάλωση του RG ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με την επίδραση στον AIχ μετά από την κατανάλωση RO ($p=0,001$), WG ($p=0,021$) και WO ($p=0,023$). Ο χρόνος ανάκλασης, ένας έμμεσος δείκτης υπολογισμού της αρτηριακή σκληρίας, παρέμεινε αμετάβλητος μεταγευματικά μετά την κατανάλωση όλων των συνδυασμών κρασιού και ελαιολάδου.

Η περιφερική συστολική πίεση μειώθηκε σημαντικά κατά περίπου 8.7mmHg μετά την κατανάλωση WG και κατά 9.4mmHg μετά την κατανάλωση WO (WG, $p=0,002$, WO, $p=0,035$) (Πίνακας 2). Η περιφερική διαστολική και η κεντρική συστολική και διαστολική πίεση μειώθηκαν σημαντικά μετά από την κατανάλωση όλων των συνδυασμών κρασιού και ελαιολάδου ($p<0,05$).

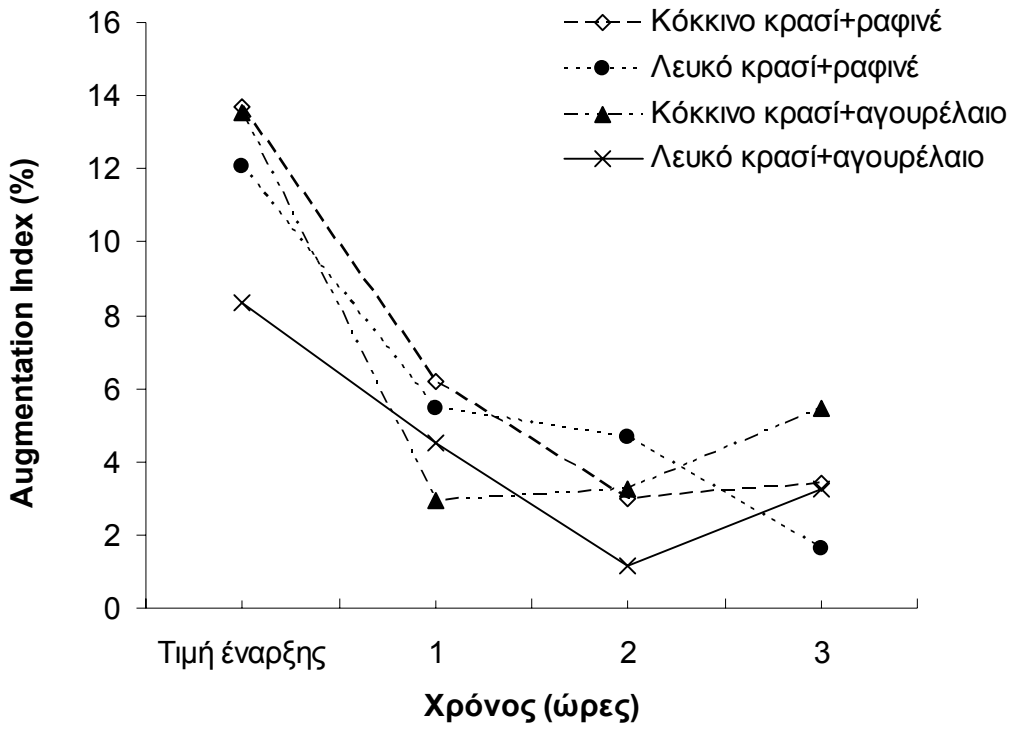
Πίνακας 1 Τιμές νηστείας και μεταγευματικές τιμες των δεικτών των κυμάτων ανακλασης και του καρδιακού ρυθμού.

	Κόκκινο κρασί + Ραφινέ ελαιόλαδο	**Λευκό κρασί + Ραφινέ ελαιόλαδο**	**Κόκκινο κρασί + αγουρέλαιο**	**Λευκό κρασί + αγουρέλαιο**
Δείκτης ενίσχυσης(%)				
νηστεία	13.7±2.3	12.1±3.3	13.5±2.5	11.3±4.1
1 ώρα	6.2±3.7 *	5.5±4.6	2.9±3.1 *	4.6±3.7
2 ώρες	3.0±3.8 *	4.7±3.6	3.3±3.2 *	1.3±4.2 *
3 ώρες	3.4±3.6 *	1.6±4.1 *	5.5±3.3	4±5.3
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	<0.001	0.007	<0.001	0.039
Χρόνος ανάκλασης (msec)				
νηστεία	153.1±2.7	155.5±5.4	153.6±4.5	144.0±5.6
1 ώρα	155.1±6.3	149.0±6.9	157.7±2.9	151.8±5.2
2 ώρες	150.9±5.5	154.8±6.1	158.4±5.2	152.7±5.5
3 ώρες	162.0±4.3	152.8±6.7	153.7±4.8	156.3±7.0
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.244	0.585	0.435	0.100
Καρδιακός ρυθμός (χτύποι/ λεπτό)				
νηστεία	72.7±2.3	73.8±3.3	73.1±2.2	78.1±3.5
1 ώρα	77.1±2.8	77.5±3.0	74.3±2.3	77.3±3.0
2 ώρες	74.0±2.7	74.9±2.7	75.1±2.5	77.4±2.9
3 ώρες	74.8±2.1	76.7±2.6	74.9±2.9	79.2±3.0
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.09	0.026	0.593	0.708

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα (SE)

* υποδεικνύει σημαντική ($p<0,05$) διαφορά από την αντίστοιχη τιμή της νηστείας

Σχήμα 1 Επίδραση της συνδυασμένης κατανάλωσης διαφορετικών τύπων κρασιού και ελαιολάδου στο δείκτη ενίσχυσης, διορθωμένο για καρδιακό ρυθμό 75 παλμών (AI@75).



Πίνακας 2 Τιμές νηστείας και μεταγευματικές τιμές των περιφερικών και αορτικών πιέσεων.

	Κόκκινο κρασί + Ραφινέ ελαιόλαδο	**Λευκό κρασί + Ραφινέ ελαιόλαδο**	**Κόκκινο κρασί + αγουρέλαιο**	**Λευκό κρασί + αγουρέλαιο**
Περιφερική συστολική πίεση (mmHg)				
νηστεία	105.7±4.2	103.5±3.1	103.7±2.8	104.9±3.3
1 ώρα	100.1±1.7	94.1±3.2	102.1±3.5	99.4±3.0
2 ώρες	102.5±2.6	97.4±3.2	99.6±3.0	96.2±3.6 *
3 ώρες	103.1±2.6	101.1±3.0	100.4±3.3	100.2±2.9
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.297	0.035	0.271	0.002
Περιφερική διαστολική πίεση (mmHg)				
νηστεία	69.9±2.1	68.1±2.0	68.1±2.2	67.8±2.0
1 ώρα	64.4±2.7	58.2±2.8 *	62.0±2.4	61.0±1.9
2 ώρες	63.9±2.3	60.8±1.8 *	61.8±2.1 *	59.3±1.9
3 ώρες	67.4±2.1	62.6±1.3	64.3±2.2	62.4±1.2
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.015	0.001	0.007	0.004
Κεντρική συστολική πίεση (mmHg)				
νηστεία	93.6±2.4	92.8±2.6	93.1±2.4	92.2±2.6
1 ώρα	87.8±1.7	81.2±2.4 *	87.5±2.7 *	85.6±2.6
2 ώρες	88.6±2.6	84.5±2.3	85.8±2.6 *	82.3±2.2
3 ώρες	90.6±2.6	86.8±2.2	87.9±2.8	86.6±1.9
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.050	<0.001	0.004	0.001
Κεντρική διαστολική πίεση (mmHg)				
νηστεία	71.1±2.2	69.2±1.9	69.0±2.2	68.7±2.1
1 ώρα	65.3±2.7	59.3±2.8 *	62.8±2.4 *	61.8±2.0
2 ώρες	64.8±2.3	62.0±1.7 *	62.9±2.1	60.4±1.9

3 ώρες	68.4±2.1	63.7±1.3	65.4±2.3	63.7±1.2
ANOVA μεταξύ των παρεμβάσεων, p-value	0.009	0.001	0.007	0.005

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος ± τυπικό σφάλμα (SE)

* υποδεικνύει σημαντική (p<0,05) διαφορά από την αντίστοιχη τιμή της νηστείας

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που παρέχει in-vivo αποδείξεις σχετικά με τις συνδυασμένες επιδράσεις δύο σημαντικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στα ανακλώμενα κύματα και στις αιμοδυναμικές παραμέτρους των αρτηριών, σε μεταγευματικό στάδιο. Τα ανακλώμενα κύματα και η αρτηριακή πίεση θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα [2, 3] και υπάρχουν αρκετά τρόφιμα και θρεπτικά συστατικά τα οποία φαίνεται να τους ρυθμίζουν μετά από μακροχρόνια χρήση τους, αλλά και στο οξύ μεταγευματικό στάδιο [18]. Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι στη μεταγευματική φάση και ειδικά κατά τη μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία, δεν υπάρχουν επιδράσεις [19], ή σημαντικές μεταβολές στην αρτηριακή πίεση και την αρτηριακή σκληρία [7, 8, 19, 20]. Συνεπώς οποιαδήποτε διατροφική παρέμβαση, όπως το κόκκινο κρασί και τα συστατικά του, με πιθανές επιδράσεις μείωσης των ανακλώμενων κυμάτων κερδίζει μεγάλης προσοχής και αξίζει περαιτέρω διερεύνησης στοχεύοντας σε μια πιθανή μη φαρμακευτική μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Από όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν μελέτες που να ερευνούν τις πιθανές μεταγευματικές επιδράσεις του ελαιολάδου στις αιμοδυναμικές παραμέτρους των αρτηριών. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι το κόκκινο κρασί έχει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες και συστήνεται να καταναλώνεται μαζί με τα γεύματα [21]. Παρόλ' αυτά πολλοί άνθρωποι συμβουλεύονται από τους ιατρούς και τους διατροφολόγους να καταναλώνουν ελαιόλαδο και κόκκινο κρασί στα γεύματά του ως μέρος μια υγιεινής διατροφής, όμως η συνδυασμένη δράση τους παραμένει άγνωστη.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι ο συνδυασμός του κρασιού και του ελαιολάδου μειώνει τα ανακλώμενα κύματα (εκφρασμένα από τον ΑΙχ) στο μεταγευματικό στάδιο, υποδεικνύοντας ότι περιέχουν αγγειοδραστικά συστατικά που παίζουν σημαντικό ευεργετικό ρόλο στην αγγειακή λειτουργία. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι όλοι οι συνδυασμοί ελαιολάδου (ραφινέ και αγουρέλαιο) και κρασιού (κόκκινου και λευκού) ήταν δραστικοί στη μείωση του ΑΙχ, γεγονός που αποκαλύπτει ότι αυτά τα τρόφιμα και τα συστατικά τους είναι

ικανά να τον βελτιώνουν, το οποίο είναι σε συμφωνία με ευρήματα από προηγούμενες μελέτες σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο που κατανάλωσαν κόκκινο κρασί [10, 11].

Μπορεί να θεωρηθεί ότι η παρατηρούμενη μείωση του AIx φανερώνει βελτίωση στην αρτηριακή σκληρία ή στην αγγειοδιαστολή, ή και στα δύο. Υπάρχουν μελέτες in-vitro που δείχνουν ότι το αλκοόλ και τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή NO, ή να εμποδίσουν τη σύνθεση ενδοθηλίνης 1 [22, 23] προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Επιπλέον, ένας αριθμός in vivo μελετών έχει δείξει ότι υπάρχει σημαντική αγγειοδιαστολή και αυξημένη παραγωγή NO μετά από την κατανάλωση κόκκινου κρασιού και των αντιοξειδωτικών ουσιών του [24-26]. Όμως, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα σχετικά με τις μεταγευματικές επιδράσεις του ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία, τα οποία δείχνουν ότι το ελαιόλαδο προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία πιθανότατα μέσω μείωσης της παραγωγής NO [27]. Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν ότι το κόκκινο κρασί ίσως αναστρέφει τις μεταγευματικές ανεπιθύμητες επιδράσεις του ελαιολάδου, όμως περισσότερη έρευνα χρειάζεται σε αυτό το πεδίο. Παρόλ' αυτά, το NO έχει ευθέως συσχετιστεί όχι μόνο με την αγγειοδιαστολή, αλλά και με τα ανακλώμενα κύματα, την ταχύτητα των κυμάτων παλμού και την αρτηριακή σκληρία [28] και είναι πιθανό ότι το NO αποτελεί ένα μηχανισμό που σχετίζεται με τις μεταβολές στο AIχ που παρατηρούνται σε αυτή τη μελέτη.

Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων μας δείχνουν ότι ο συνδυασμός κόκκινου κρασιού και αγουρελαίου ήταν ο πιο αποτελεσματικός συγκριτικά με όλους του υπόλοιπους. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης αυτής θα πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερα, καθώς ο αναφερόμενος συνδυασμός ήταν αυτός με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχονται στο κόκκινο κρασί και στο αγουρέλαιο. Επομένως, φαίνεται ότι πέρα από τα συστατικά που περιέχονται στο κρασί και στο ελαιόλαδο, οι αντιοξειδωτικές τους ουσίες προσφέρουν μια πρόσθετη ευεργετική δράση στη μείωση του AIχ. Αυτό σημαίνει ότι πιθανότατα αυτά τα αντιοξειδωτικά αυξάνουν την παραγωγή NO προκαλώντας αγγειοδιαστολή και μειώνουν τις περιφερικές αντιστάσεις των μικρών αγγείων, γεγονός που είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο οι οποίοι κατανάλωσαν μόνο τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού [11].

Αποτελέσματα από την επίδραση του ελαιολάδου και του κρασιού στην αρτηριακή πίεση δείχνουν ότι σε ότι αφορά την περιφερική συστολική πίεση το WO και το WG μόνο,

ήταν αποτελεσματικά στη μείωσή της μεταγευματικά. Αυτό υποδεικνύει ότι αυτοί οι συνδυασμοί περιέχουν συστατικά ικανά να επιδράσουν θετικά στην περιφερική συστολική πίεση. Περισσότερες συγκρίσεις των διαφορετικών γευμάτων εξυπηρετούν την αναζήτηση του συστατικού εκείνου του κρασιού και του ελαιολάδου που είναι πιο αποτελεσματικό. Συγκεκριμένα, η σύγκριση των επιδράσεων στην περιφερική συστολική πίεση του WO και RO και του WG και RG που περιέχουν τον ίδιο τύπο ελαιολάδου, αλλά διαφορετικό τύπο κρασιού, δείχνει ότι μόνο το λευκό κρασί είναι αποτελεσματικό. Αυτό πιθανότατα αποκαλύπτει ότι το αλκοόλ είναι υπεύθυνο για αυτή τη δράση στην περιφερική συστολική πίεση, γεγονός που έχει δειχθεί και στο παρελθόν [10]. Άλλες δύο συγκρίσεις ανάμεσα σε RG - RO και WG - WO, όπου περιέχεται ο ίδιος τύπος κρασιού, αλλά διαφορετικοί τύποι ελαιολάδου, αποκαλύπτει ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση στις συνολικές επιδράσεις στην περιφερική συστολική πίεση του ραφινέ ελαιολάδου και του αγουρελαίου. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη θεωρία ότι τα συστατικά του ελαιολάδου εκτός των αντιοξειδωτικών είναι υπεύθυνα για συγκεκριμένες επιδράσεις στην πίεση. Δυστυχώς αυτή η υπόθεση δεν είναι ακόμη δυνατό να επιβεβαιωθεί από παρόμοιες μελέτες.

Τέλος, τα αποτελέσματα σχετικά με την περιφερική διαστολική, κεντρική συστολική και κεντρική διαστολική πίεση έδειξαν ότι όλοι οι συνδυασμοί κρασιού και ελαιολάδου τις μείωσαν σημαντικά. Αυτή η επίδραση μπορεί να ερμηνευτεί ειδικά για την κεντρική συστολική πίεση, καθώς τα 4 γεύματα που χρησιμοποιήθηκαν ίσως μείωσαν της περιφερικές αντιστάσεις και συνεπώς τα ανακλώμενα κύματα και το μεταφορτίο της αριστερής κοιλίας, μειώνοντας την κεντρική συστολική πίεση [2]. Δυστυχώς, αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούν να αποκαλύψουν πιο συγκεκριμένο συστατικό του κρασιού και του ελαιολάδου μπορεί να είναι πιο δραστικό στη μείωση της πίεσης, το οποίο είναι άλλη μια ένδειξη ότι είναι απαραίτητος μεγάλος αριθμός μελετών στο άμεσο μέλλον προκειμένου να διευκρινιστεί αυτό το άγνωστο επιστημονικό πεδίο.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών του κρασιού και του ελαιολάδου μαζί και με άλλα συστατικά των δύο τροφίμων μειώνει τα ανακλώμενα κύματα και την αρτηριακή πίεση μεταγευματικά. Αυτές οι επιδράσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια πρόσθετη ευεργετική δράση των βασικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας και των αντιοξειδωτικών της ουσιών στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και στην αγγειακή λειτουργία μεταγευματικά, όμως είναι μεγάλη η ανάγκη για περαιτέρω έρευνες προκειμένου να επιβεβαιωθούν ή να διαψευστούν αυτά τα ευρήματα.

2. 7 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο τη διερεύνηση της οξείας επίδρασης του κόκκινου κρασιού και των συστατικών του στην ενδοθηλιακή λειτουργία, και τη σκληρία των αγγείων, η οποία έχει ελάχιστα μελετηθεί σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ενώ η σημασία της είναι πολύ μεγάλη αφού η κατανάλωση κόκκινου κρασιού αποτελεί μια πολύ κοινή συνήθεια.

Από τα αποτελέσματα των επιμέρους μελετών που πραγματοποιήθηκαν φάνηκε ότι σε οξύ μεταγευματικό στάδιο, το κόκκινο κρασί έχει ευεργετικές επιδράσεις τόσο στην ενδοθηλιακή λειτουργία, όσο και στα ανακλώμενα κύματα σε πληθυσμούς υγιών εθελοντών, αλλά και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Μάλιστα, οι ευεργετικές αυτές δράσεις του κόκκινου κρασιού είναι τόσο ισχυρές ώστε ανέτρεψαν πλήρως τις γνωστές βλαβερές επιδράσεις που έχει σε οξεία φάση το κάπνισμα ενός τσιγάρου, αλλά και η μεταγευματική λιπαιμία από ένα λιπαρό γεύμα.

Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στα κύματα ανάκλασης και στην αρτηριακή σκληρία, όπως και μείωση στην κεντρική συστολική πίεση αμέσως μετά την κατανάλωση και των δύο τύπων κρασιού, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην περιφερική συστολική πίεση. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η οξεία κατανάλωση του κόκκινου κρασιού και των συστατικών του έχει ευεργετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο. Ακόμη, φαίνεται ότι η ευεργετική αυτή δράση του κόκκινου κρασιού μπορεί να αποδοθεί κυρίως στις αντιοξειδωτικές του ουσίες, καθώς η ύπαρξη ή μη αλκοόλ δεν φάνηκε να επηρεάζει τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης. Τα ευρήματα αυτά προσφέρουν επιπρόσθετη πληροφόρηση σχετικά με τις οξείες επιδράσεις του κόκκινου κρασιού στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την αρτηριακή σκληρία, αφού οι γνώσεις μας περιορίζονται μόνο σε υγιείς εθελοντές και είναι η πρώτη φορά που μελετώνται ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Τέτοια ευρήματα που προκύπτουν από μικρής διάρκειας κατανάλωση αλκοόλ και ειδικά κόκκινου κρασιού από ασθενείς με στεφανιαία νόσο είναι ιδιαίτερα χρήσιμα, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί οι ασθενείς συμβουλεύονται από το γιατρό να καταναλώνουν κρασί σε καθημερινή βάση.

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι το οξύ κάπνισμα ενός τσιγάρου προκαλεί σημαντική επιδείνωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, αλλά η ταυτόχρονη κατανάλωση κανονικού ή απαλκοολωμένου κόκκινου κρασιού αναστέλλει την βλαπτική αυτή δράση στο ενδοθήλιο υγιών καπνιστών και μη καπνιστών. Επομένως, θεωρείται ότι στους καπνιστές, όπως και στους μη καπνιστές, είναι πιθανό ο καπνός να αυξάνει το οξειδωτικό στρες και να μειώνει τα επίπεδα NO, ενώ παράλληλα τα αντιοξειδωτικά του κόκκινου κρασιού αντισταθμίζουν αυτές τις επιδράσεις και αναστρέφουν τη βλαβερή επίδραση του καπνού στο FMD. Είναι πιθανό ότι το κάπνισμα και η κατανάλωση κόκκινου κρασιού λειτουργούν στην ενδοθηλιακή λειτουργία με τον ίδιο τρόπο σε καπνιστές και μη καπνιστές και ότι οι ευεργετικές δράσεις που παρατηρούνται με τη χρήση κόκκινου κρασιού ίσως μπορούν να αποδοθούν στις αντιοξειδωτικές ουσίες και όχι μόνο στο αλκοόλ που περιέχει.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα των μελετών αυτής της διατριβής αποτέλεσαν την πρώτη άμεση απόδειξη ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού αντιστρέφουν τις οξείες ανεπιθύμητες επιδράσεις του καπνίσματος στην περιφερική συστολική πίεση, υποδεικνύοντας ότι το κόκκινο κρασί περιέχει σημαντικές αγγειοδραστικές ουσίες, ικανές να εξαλείψουν τις καταστροφικές δράσεις του οξέος καπνίσματος. Επίσης, το κόκκινο κρασί και τα συστατικά του, δηλαδή το αλκοόλ και τα αντιοξειδωτικά φαίνεται να έχουν οξεία ευεργετική δράση στα ανακλώμενα κύματα σε υγιείς καπνιστές. Παρόλ' αυτά, δεν έχει ακόμη διερευνηθεί προοπτικά, εάν η μακροχρόνια μέτρια κατανάλωση κρασιού έχει ευεργετικές επιδράσεις στις αιμοδυναμικές παραμέτρους και στην αγγειακή λειτουργία των καπνιστών, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για περαιτέρω έρευνα, καθώς η κατανάλωση κόκκινου κρασιού μαζί με το κάπνισμα αποτελεί μια πολύ κοινή συνήθεια, ανάμεσα σε καπνιστές.

Τέλος, στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν για πρώτη φορά οι συνδυασμένες μεταγευματικές επιδράσεις στην ενδοθηλιακή λειτουργία, τα ανακλώμενα κύματα και τις κεντρικές πιέσεις υγιών εθελοντών, δύο σημαντικών συστατικών της Μεσογειακή Δίαιτας, του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού και του ελαιολάδου, όταν λαμβάνονται ταυτόχρονα, βελτιώνουν το FMD και αυτή τους η επίδραση διαρκεί ακόμη και 2 ώρες μεταγευματικά. Επίσης, ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών του κρασιού και του ελαιολάδου μαζί και με άλλα συστατικά των δύο τροφίμων μειώνει τα ανακλώμενα κύματα και την αρτηριακή πίεση μεταγευματικά. Τα ευρήματα αυτά αποδίδουν μια πρόσθετη καρδιοπροστατευτική δράση στις αντιοξειδωτικές

ουσίες που περιέχονται στα συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας, η οποία χαρακτηρίζεται από μέτρια ημερήσια κατανάλωση κόκκινου κρασιού και τακτική χρήση ελαιολάδου.

Ο σχεδιασμός που επιλέχθηκε για τις διάφορες μελέτες οδήγησε σε σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τα συστατικά εκείνα του κόκκινου κρασιού τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα για τις ευεργετικές του δράσεις. Φαίνεται λοιπόν ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων τα ευεργετικά αποτελέσματα στη λειτουργικότητα των αγγείων μπορούν να αποδοθούν στις αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού, παρόλο που και το αλκοόλ που περιέχεται στο κόκκινο κρασί είχε επίσης κάποιες θετικές επιδράσεις στα αγγεία.

Αν και δεν είναι δυνατό από τις μετρήσεις που έλαβαν χώρα και μόνο, να καταλήξει κανείς σε πιθανούς μηχανισμούς δράσης του κόκκινου κρασιού και των επιμέρους συστατικών του (αντιοξειδωτικά, αλκοόλ), η σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι σημαντική, καθώς φάνηκε ότι η πολύ κοινή συνήθεια της κατανάλωσης ενός ή δύο ποτηριών κόκκινου κρασιού επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα στο άμεσο μεταγευματικό στάδιο.

Κυρίως όμως τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι σημαντικά για δύο άλλους λόγους. Πρώτον, γιατί δόθηκε το ερέθισμα για την έναρξη άλλων παρόμοιων μελετών οι οποίες να ασχολούνται με τις οξείες επιδράσεις της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και των επιμέρους συστατικών του, ώστε να δοθεί φως σε ένα τομέα της επιστημονικής γνώσης που παραμένει ακόμη θολό και σχετικά αδιερεύνητο. Δεύτερον, γιατί τα θετικά αποτελέσματα που διαφάνηκε να έχουν οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κόκκινου κρασιού, ίσως οδηγήσουν σε παραπέρα μελέτη των επιμέρους αντιοξειδωτικών ουσιών οι οποίες μπορεί να είναι υπεύθυνες για αυτές τις δράσεις. Άλλωστε στις μέρες μας η επιστημονική έρευνα έχει στρέψει την προσοχή της στην αναζήτηση ουσιών που βρίσκονται στη φύση και ιδιαίτερα στις τροφές και οι οποίες είναι ικανές να βελτιώσουν νοσηρές καταστάσεις όπως είναι η δυσλειτουργία των αγγείων.

Επομένως, η παρούσα διδακτορική διατριβή ίσως αποτελέσει το ερέθισμα για περαιτέρω διερεύνηση των οξέων δράσεων της πολύ κοινής συνήθειας της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού στα αγγεία, αλλά και της αναζήτησης των συστατικών του εκείνων που ίσως να αποτελούν την απάντηση στην προσπάθεια βελτίωσης της αγγειακής υγείας διαμέσου συστατικών της διατροφής.

4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Red Wine Acutely Induces Favorable Effects on Wave Reflections and Central Pressures in Coronary Artery Disease Patients

Kalliopi N. Karatzi, Christos M. Papamichael, Emmanouil N. Karatzis, Theodoros G. Papaioannou, Konstantinos A. Aznaouridis, Paraskevi P. Katsichti, Kimon S. Stamatelopoulos, Antonis Zampelas, John P. Lekakis, and Myron E. Mavrikakis

Background: To investigate red wine's acute effects on aortic pressures and arterial stiffness in patients with coronary artery disease (CAD).

Methods: Fifteen patients with CAD were recruited in a double-blind, cross-over study, which was comprised of 2 study days. Each volunteer consumed either 250 mL of regular or 250 mL of dealcoholized red wine. Wave reflections, expressed as augmentation index (AIx), as well as central and peripheral blood pressures (BP) were assessed at fast and 30, 60, and 90 min postprandially.

Results: Both regular and dealcoholized red wine caused a significant decrease in AIx by 10.5% ± 1.4% (P = .001) and 6.1% ± 1.4% (P = .011), respectively, whereas no significant change was induced in mean BP and timing of wave reflections expressing pulse wave velocity. Peripheral systolic BPs remained unaltered in both beverages, whereas a significant decrease in peripheral and central diastolic BPs was observed after the dealcoholized red wine consumption (P = .03 and P = .035, respectively). Central systolic BP was decreased after the consumption of regular (−7.4 ± 2.4 mm Hg, P = .05) and dealcoholized red wine (−5.4 ± 2.7 mm Hg, P = .019).

Conclusions: Both types of red wine provoked favorable acute effects on wave reflections and central systolic pressures, whereas no such effect was evident at the brachial artery. Therefore, these findings could be attributed mainly to red wine antioxidant substances, rendering it a possible means of at least acute attenuation of increased wave reflections, arterial stiffness, and central pressures in patients with coronary artery disease. Am J Hypertens 2005;18:1161–1167 © 2005 American Journal of Hypertension, Ltd.

Key Words: Red wine, arterial stiffness, coronary artery disease, central pressures, wave reflections.

There is considerable evidence that moderate alcohol consumption, especially in the form of red wine, has a pronounced cardioprotective effect. It seems that alcohol, as well as the antioxidant substances in red wine increase HDL cholesterol, decrease platelet aggregation, amplify fibrinolysis and vasodilation.[1]

Although there is accumulating evidence suggesting that red wine and its constituents improve endothelial performance, both acutely[2,3] and after a long-term use,[4] there is little knowledge regarding the possible effect of this beverage on large artery properties. At the moment a link between endothelial dysfunction, related to nitric oxide (NO) production, and arterial stiffness has been proposed.[5] Moreover, long-term alcohol consumption in men is associated with pulse wave velocity with a J-shaped curve, indicating that moderate daily consumption of alcohol (two to three drinks per day) is associated with lower pulse wave velocity compared with higher daily intake or with complete abstinence from alcohol.[6] On the contrary, alcohol decreases arterial stiffness in healthy individuals in the acute postprandial state.[7] These findings suggest that there might be a difference between the acute and the long-term effect of alcohol on arterial stiffness. In addition, the controversial findings regarding the acute and

Received January 24, 2005. First decision March 8, 2005. Accepted March 20, 2005.

From the Vascular Laboratory, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra University Hospital, Athens, Greece (CMP, ENK, TGP, KAA, PPK, KSS, JPL, MEM) and Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University (KNK, AZ), Athens, Greece.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Emmanouil Karatzis, 38 Sofokleous str, Glyfada, 166 74, Athens, Greece; e-mail: manoskaratzis@yahoo.com

© 2005 by the American Journal of Hypertension, Ltd.
Published by Elsevier Inc.

0895-7061/05/$30.00
doi:10.1016/j.amjhyper.2005.03.744

Table 1. Characteristics of study participants (n = 15)

Characteristics	
Age (y)	52.4 ± 9.7
BMI (kg/m^2)	28.3 ± 1.8
Hypertension	7 (46.7%)
Hyperlipidaemia	8 (53.3%)
Family history	5 (33.3%)
Myocardial infarction	12 (80%)
Unstable angina	13 (86.7%)

Age and BMI in mean (SD); other characteristics are number (percentage).

long-term effects of alcohol on central and peripheral blood pressures (BPs) have been reported.[8] Data concerning the impact of red wine's antioxidants on arterial stiffness and hemodynamics are lacking. Moreover the response of the aforementioned factors to red wine consumption (with and without alcohol) in patients with coronary artery disease (CAD) remains unexplored. Therefore, the purpose of the present study was to assess the acute postprandial effect of red wine (with or without alcohol) on wave reflections, arterial stiffness, and central BPs.

Methods

Study Population

Study population was selected among male patients with angiographically detected CAD, who attended the Department of Clinical Therapeutics, "Alexandra" University Hospital, Athens, Greece for routine check-up. Augmentation index (AIx) was considered as the principal variable examined in the present study and the sample size was initially estimated based on the expected change in AIx after regular or dealcoholized red wine consumption. Given the variability of repeated AIx measurements,[9] the minimal statistically significant change in AIx with intervention that can be detected should be greater than 5%. Thus, a sample size of 15 subjects was estimated as efficient (80% power) to demonstrate a change by 6% in AIx (α = 0.05 and β = 0.20; two-tailed test).

Fifteen (15) men were enrolled (mean age, 52.4 ± 9.7 years; body mass index [BMI] 28.3 ± 1.8 kg/m^2) (Table 1). The coronary angiography was performed within the past 6 months and no revascularization procedure was carried out the past 3 months. Presence of diabetes mellitus, obesity, any liver, kidney, or endocrine diseases, and administration of antioxidant vitamin supplementation were designated as exclusion criteria. All patients were receiving nitrates, β-blockers, antiplatelets. Nine of them (60%) were taking angiotensin-converting enzyme inhibitors and 2 (13.3%), calcium channel blockers. Furthermore, all participants were ex-smokers and their alcohol use was in accordance with the recommendations (20 to 30 g alcohol/d). All patients gave their informed consent before entering the study; the protocol and the process for obtaining informed consent were approved by the local Scientific Committee.

Experimental Protocol

Subjects were randomly allocated to drink either a glass of 250 mL of red wine or 250 mL of dealcoholized red wine. The study was comprised of 2 study days in a randomized, double-blinded, cross-over design. On each study day, patients were instructed to attend the Vascular Laboratory of Alexandra Hospital, after a 12-h fast and absence from smoking, and all vasoactive medications were withheld for 24 h before each study day. All patients were studied in the morning hours and after a 15-min rest period in a temperature controlled (22° to 25°C), quiet room. Blood pressure and arterial stiffness measurements were performed at fast and 30, 60, and 90 min after wine consumption. All subjects completed the study without any dissatisfaction or alcohol-related problems.

Wine Preparation

Dealcoholized red wine (<1% ethanol) was prepared with lyophilization of a regular red wine (12% ethanol, Grand Reserve 1996, Boutaris, Greece) at −50°C and at 1 mb pressure for 6 h, using Cryodos 45 (Telstar, Spain). The concentrated red wine (±50%) was then diluted with tap water until it reached the initial volume. The Folin–Ciocalteau procedure[10] was used to assess total antioxidants concentration in wines used in the protocol. A UVIKON, spectrophotometer 931, Kontron Instruments (Milan, Italy) was used and results were expressed as micrograms of caffeic acid per 100 mL. A Hewlett-Packard model 1050 UV-DAD/FLD with Autosampler (Palo Alto, CA) and a Hewlett-Packard model 6890 with MS detector and Autosampler was used for high pressure liquid chromatography (HPLC)[11] and gas chromatography (GC/MSD), respectively, for the quality determination of antioxidants in red wine with and without alcohol. Finally, duo–trio tests* and a hedonic scale were used to test whether dealcoholized red wine could be well accepted by the subjects who would consume it, and whether it could be recognized compared with regular red wine.

Arterial Stiffness, Wave Reflections, and Central Pressures

Arterial stiffness and wave reflections were evaluated noninvasively by using radial artery applanation tonometry and pulse wave analysis.[12,13] The main principle of the method is based on: 1) the derivation of the central aortic

*Duo-trio test is a well-established method in order to assess if one can distinguish two different types of wine. Its participant is given three glasses of red wine, two of which contain the same wine. The participant then tastes all three wines in a random order and indicates which two are the same.

pressure waveform from the peripheral pressure waveform, by using generalized transfer functions and 2) the determination of central aortic pressure augmentation (AP) due to the reflected pressure waves. Tonometry of the radial artery was obtained by using a high-fidelity strain gauge transducer placed on the tip of a pencil-type tonometer (Millar Instruments, Inc, Houston, TX). Analysis of the derived aortic pressure waveforms was realized by the Sphygmocor System (ATCOR Medical, Sydney, Australia). Calibration of peripheral pressure recordings was obtained by measuring brachial systolic and diastolic BPs with a mercury sphygmanometer. Three measurements were performed in each case and the mean value of systolic and diastolic BP were calculated.

Augmentation index was used to characterize wave reflections and calculated as the ratio of the AP to the aortic pulse pressure (PP). The magnitude and timing of the arterial wave reflection are dependent on the elastic properties of the arterial walls.[14] Applanation tonometry and pulse wave analysis have been described in detail and validated previously.[15] The stiffer the arterial system, the greater the augmentation of the central aortic pressure (increased AIx) is due to the earlier return of the reflected waves at systole.

Because AIx is influenced by heart rate,[16] which is likely different in each patient and might be altered after red wine consumption, an index normalized for heart rate of 75 beats/min (AI 75) was used in accordance with Wilkinson et al.[16]

Pulse wave velocity, which characterizes arterial stiffness, was assessed indirectly by the arrival time (Δt, msec) of reflected waves at the aorta. The Δt represents the time needed for pressure waves to travel from the central to the peripheral arterial sites and return back to the aorta due to wave reflections. This time is easily calculated by detecting the inflection point (due to wave reflections) at the systolic part of aortic pressure waveform. Time derivatives are used for the determination of the inflection point by the Sphygmocor software. Timing of wave reflections is often used as an indirect estimator of pulse wave velocity, whereas it has been proposed as a more direct estimator of arterial stiffness than Aix.[16]

The Δt is dependent on body height and thus it cannot be strictly compared across individual subjects. As a result a between-subjects analysis of Δt should always control for height differences. In the present study, adjustment for height was not necessary, as no comparisons were made between different groups or subjects. The analysis was based on repeated measurements on the same subject to assess the effect of red wine on Δt. In such a design, the observed Δt changes are attributed to factors other than height.

Mean arterial BP was calculated by integration of the continuous radial pressure waveforms instead of the "1/3" formula:

$$MAP = \frac{\sum_{i=to}^{td} P_i}{n}$$

where *to* the time at the onset of systole, *td* the time at the end of diastole pressure, and *n* the total pressure values recorded by tonometry.

Statistics

All continuous variables were assessed for homogeneity of variance and normal distribution. The following analyses were performed aiming to assess 1) the total (overall) effects during the 90-min period and 2) maximal effects induced by the two types of red wines. Variables measured at baseline, 30, 60, and 90 min after drinking of each type of wine were evaluated by analysis of variance for repeated measures and Bonferroni corrected Student *t* test for multiple comparisons. A further ANOVA design with the two beverages for four time periods (fast, 30, 60, and 90 min after consumption) was applied to assess the comparative effects of the two beverages on the measured variables. It should be highlighted that in a repeated measurement design the curve joining the means (and ANOVA) may not be a good descriptor of a typical curve (response) for each individual in a repeated measurement study. As previously described, effects evaluated by ANOVA may be underestimated and thus separated analysis per individual may reveal more information.[17] Maximal change of every variable, induced after each beverage consumption, was estimated per individual as the maximal or minimal value observed minus the baseline value. Comparisons of maximal response of hemodynamic parameters were made by using the nonparametric Wilcoxon test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) unless otherwise stated; a P value $< .05$ was considered statistically significant.

Results

Analysis of both regular and dealcoholized red wine showed that the two beverages had similar quality and concentration of antioxidant substances (658 μg/100 mL of caffeic acid for regular red wine *v* 650 μg/100 mL of caffeic acid of dealcoholized red wine) and that in general the only differentiation between them was their alcohol content (12% and <1% of ethanol, respectively). In addition, results from the duo–trio tests and the hedonic scale analysis showed that the subjects could n°t distinguish the two wines, as they could n°t correctly recognize the presence or absence of alcohol.

Acute Red Wine Effects on Peripheral and Aortic Hemodynamics

Systolic BP Peripheral systolic BP was not affected by the type of wine (Fig. 1A, Table 2). In contrast, central systolic BP was significantly reduced by both regular and

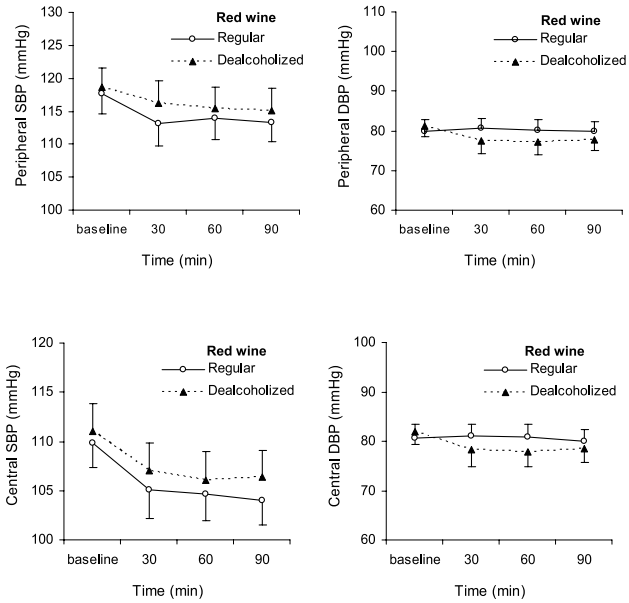


FIG. 1 Acute effect of regular and dealcoholized red wine on (**A**) peripheral and (**B**) central systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). (**A**) Peripheral pressures. An overall statistically significant decrease was observed in peripheral DBP after dealcoholized red wine consumption (ANOVA: P = .03, F = 3.99). (**B**) Central pressures. Overall effect of regular and dealcoholized red wine on central SBP (ANOVA: P = .019, F = 3.67 and P = .05, F = 3.47, respectively). An overall statistically significant decrease was observed in central DBP after dealcoholized red wine consumption (ANOVA: P = .035, F = 3.97). Bars represent standard error of mean values.

dealcoholized wines as compared with the baseline values (Fig. 1B). Maximal change of central systolic BP differed significantly between the two types of wine (Table 2).

Diastolic BP Regular wine had no significant effect on either central or peripheral diastolic BP, as shown in Fig. 1. However, dealcoholized red wine induced a significant reduction in both peripheral and central diastolic BPs. Maximal response of diastolic BP tended to be higher after consumption of dealcoholized compared to regular wine, although it did not reach statistically significant levels (Table 2).

Pulse Pressure Peripheral PP was not altered significantly after either dealcoholized or regular red wine consumption. On the other hand, regular red wine led to a reduction in central PP. The maximal change of peripheral and central PP per individual was significantly greater when regular wine was consumed compared to dealcoholized wine (Table 2) (Fig. 2).

Mean BP Neither regular nor dealcoholized red wine affected significantly mean BP during the 90-min period after consumption.

Acute Red Wine Effects on Wave Reflections and Arterial Stiffness

Regular red wine consumption resulted in a maximal decrease in AIx (heart rate corrected, AI 75) up to 7%, which remained significant 30, 60, and 90 min after drinking (Fig. 3). Dealcoholized red wine also induced a significant reduction in AI 75 by almost 5%, 30 and 60 min after drinking and returned to baseline values at 90 min (Fig. 3). The sample's mean AIx maximal change (per individual) was significantly greater after regular compared to dealcoholized red wine only when corrected for heart rate changes (Table 2). A significant increase in heart rate was observed after consumption of both types of wine by 2.5 – 5 beats/min, necessitating the correction of AIx and the use of AI 75 instead. The arrival time of reflected waves at the central aorta (Δt) remained statistically unaffected by the consumption of both beverages, implying no change in pulse wave velocity.

Discussion

In the present study, the effect of acute consumption of either regular or dealcoholized red wine on arterial hemodynamics was investigated for the first time in patients with CAD. A significant decrease in wave reflections and arterial stiffness as well as a reduction in central systolic BP was detected, after administration of both beverages. On the other hand, no effect was observed on peripheral systolic BP. These findings offer additional information regarding the acute effects of red wine on hemodynamics and stiffness, which to our knowledge are limited only to healthy subjects.[7] Findings arising from short-term consumption of alcohol, especially red wine, in patients with CAD are particularly valuable, because in most cases these patients are advised to consume an average daily amount.

Wave Reflections and Arterial Stiffness

Augmentation index diminished for 60 min after the consumption of both beverages. However, red wine containing alcohol, extended the AIx reduction up to 90 min postprandially. These findings are in accordance with previous results of Mahmud and Feely[7] in eight healthy normotensive subjects. On the other hand, our findings also indicate a significant decrease in AIx with dealcoholized red wine for 60 min postprandially, which implies that the constituents (mainly antioxidants) of red wine

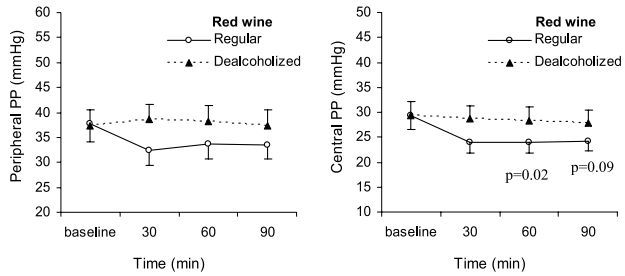


FIG. 2 Acute effect of regular and dealcoholized red wine on peripheral and central pulse pressure (PP). An overall statistically significant decrease was observed only in central pulse pressure after regular red wine consumption (ANOVA: P = .006, F = 6.16). Bars represent standard error of mean values.

Table 2. Baseline and maximal hemodynamic changes after consumption of regular and dealcoholized red wine (irrespective of time)

Variable	Regular wine	Dealcoholized wine	*P*
AIx (%)			
Baseline	26.5 ± 2.6	27.6 ± 2.3	.404
Maximal change	−11.8 ± 5.6	−8.3 ± 4.4	.066
AI 75 (%)			
Baseline	22.8 ± 1.8	23.0 ± 1.8	.866
Maximal change	−10.5 ± 1.4	−6.1 ± 1.4	.036
Mean blood pressure (mm Hg)			
Baseline	92.7 ± 2.3	94.0 ± 2.3	.508
Maximal change	−2.7 ± 2.3	−3.8 ± 2.1	.630
Peripheral SBP (mm Hg)			
Baseline	117.7 ± 3.2	118.6 ± 3.0	.716
Maximal change	−6.7 ± 2.7	−2.7 ± 2.4	.412
Peripheral DBP (mm Hg)			
Baseline	80.0 ± 2.8	81.3 ± 2.6	.547
Maximal change	−1.4 ± 1.6	−3.9 ± 2.2	.339
Peripheral PP (mm Hg)			
Baseline	37.8 ± 3.7	37.3 ± 3.3	.789
Maximal change	−6.9 ± 2.5	0.2 ± 1.8	.012
Central SBP (mm Hg)			
Baseline	109.8 ± 2.4	111.0 ± 2.7	.573
Maximal change	−7.4 ± 2.4	−5.4 ± 2.7	.589
Central DBP (mm Hg)			
Baseline	80.7 ± 2.8	81.9 ± 2.6	.557
Maximal change	−1.3 ± 1.5	−4.8 ± 1.9	.157
Central PP (mm Hg)			
Baseline	29.3 ± 2.9	29.3 ± 2.7	1.000
Maximal change	−7.1 ± 1.9	−2.3 ± 1.6	.023
Heart rate (beats/min)			
Baseline	67.1 ± 3.4	65.5 ± 3.0	.274
Maximal change	3.1 ± 1.5	4.1 ± 0.9	.102

other than alcohol might have an independent additional effect on AIx. This hypothesis is supported by another study, which found that another strong antioxidant, vitamin C, reduces arterial stiffness as measured by AIx, 6 h after its administration, indicating a possible favorable acute effect of antioxidants on arterial stiffness.[18]

These effects become even more prominent when taking into account that wave reflections assessed by the AIx are associated with an increased risk of CAD.[19] The AIx has been proposed as an independent risk marker for premature CAD.[20] The direct interaction between wave reflections and left ventricular function should also be stressed.[21]

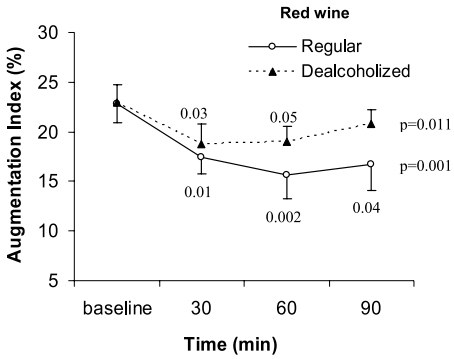


FIG. 3 Acute effect of regular and dealcoholized red wine on augmentation index (normalized for 75 beats/min). Overall effects of regular (ANOVA: $P = .001$, $F = 6.17$) and dealcoholized red wine (ANOVA: $P = .011$, $F = 4.2$) on augmentation index. Bars represent standard error of mean values.

Another interesting observation is the fact that there was no significant alteration in peripheral systolic BP by either type of wine. This finding implies that the observed changes in AIx by both wines are independent from their possible effects on BP. It is suggested that the reduction in AIx could be attributed to improvement of arterial stiffness, or vasodilatation, or both. In vitro studies have supported that alcohol and red wine's antioxidants may enhance NO production,[22] inhibit endothelin-1 synthesis[23] inducing vasodilation, which explains in part our finding. In addition, there are in vivo studies showing that there is a significant vasodilation and increased production of NO after regular or dealcoholized red wine consumption.[1,2,24,25] Furthermore, NO as well as endothelin-1 have been directly related not only to vasodilation but also to wave reflections, pulse wave velocity, and arterial stiffness,[26] rendering NO and endothelin-1 synthesis as major mechanisms involved in AIx changes as reported in this study.

Nevertheless, more research is needed to obtain elements capable to clarify the exact mechanisms underlying the present observations, such as direct measurement of total antioxidant capacity or isoprostanes in the postprandial state. Furthermore, because data regarding an acute effect of red wine on ventricular ejection are lacking, we cannot exclude a possible contribution of such an effect on central hemodynamics.

Central and Peripheral BPs

Although there was no effect of the two wines on peripheral BP, a significant effect on central BP was evident. Both types of wine markedly diminished central systolic BP. The fact that both beverages had similar effect on central systolic BP indicate that this effect could be attributed to the antioxidants of red wine regardless alcohol content. Moreover, central but not brachial PP was significantly reduced by regular red wine consumption, whereas no effect was observed by the dealcoholized red wine. The fact that central systolic BP was decreased in both cases, whereas the diastolic BP was reduced only after the consumption of dealcoholized red wine possibly explains the reduction in central PP by regular red wine. The vasoactive properties of alcohol should not be overlooked.

Discrepancies between central and peripheral BP response to vasoactive substances have also been documented in various reports.[27,28] This makes us skeptical about a possible underestimation of red wine's impact on BPs, when measuring only peripheral and not central BP, as it seems that central pressures are more sensitive and in some cases offer more information than peripheral BP. The fact that the secretion of NO by endothelial cells is diminished in a CAD population[29] may partly explain why in our study no effect was detected in peripheral pressures and only to central ones, whereas Mahmud and Feely[7] also noticed a reduction in peripheral BP in a rather small ($n = 8$) number of healthy individuals. The induced greater reduction of central compared to peripheral pressures by consumption of red wine should be highlighted especially in patients with CAD, as it has been shown that central (carotid) pressure is a better predictor than brachial pressure of the severity of coronary artery disease.[30]

In conclusion, arterial stiffness, wave reflections, and central BP of patients with CAD seem to be improved in the postprandial phase by the consumption of red wine. These effects are possibly related not only to alcohol but also to the red wine's antioxidants. Red wine pressor effects were more pronounce at the aorta than in the brachial artery, necessitating simultaneous estimation of central pressures. Arterial stiffness and endothelial function could possibly underlie the results of the present study and merits more extensive investigation by a more direct approach. Whether long-term use of red wine with or without alcohol leads to an improvement in arterial stiffness, wave reflections, and central pressure, and also to a decrease in cardiovascular risk in patients with CAD, remain unexplored.

References

1. Buemann B, Dyerberg J, Astrup A: Alcohol drinking and cardiac risk. Nutr Res Rev 2002;15:91–121.
2. Hashimoto M, Kim S, Eto M, Iijima K, Ako J, Yoshizumi M, Akishita M, Kondo K, Itakura H, Hosoda K, Toba K Ouchi Y: Effect of acute intake of red wine on flow mediated vasodilation of the brachial artery. Am J Cardiol 2001;88:1457–1459.
3. Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N: Does a glass of wine improve endothelial function? Eur Heart J 2000;21:74–78.
4. Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain A, Leighton F: A high fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. Lipids 2000;35:143–148.
5. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JF: Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. Circulation 2002;105:213–217.
6. Sierksma A, Muller M, van der Schouw YT, Grobbee DE, Hendriks HF, Bots ML: Alcohol consumption and arterial stiffness in men. J Hypertens 2004;22:357–362.
7. Mahmud A, Feely J: Divergent effect of acute and chronic alcohol on arterial stiffness. Am J Hypertens 2002;15:240–243.
8. Beilin LJ, Puddey IB, Burke V: Lifestyle and hypertension. Am J Hypertens 1999;12:934–945.
9. Siebenhofer A, Kemp CRW, Sutton AJ, Williams B: The reproducibility of central aortic blood pressure measurements in healthy subjects using applanation tonometry and sphygmocardiography. J Hum Hypertens 1999;13:625–629.
10. Singleton VL, Rossi JA Jr: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybic –phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965;16:144–158.
11. Andrikopoulos N, Brueschweiler H, Taeschler C: Analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. J Am Oil Chem Soc 1991;68:359–364.
12. Kelly R, Hayward C, Ganis J, Daley J, Avolio A, O'Rourke M: Noninvasive registration of the arterial pressure pulse waveform using high fidelity applanation tonometry. J Vasc Med Biol 1989; 1:142–149.
13. Karamanoglu M, O'Rourke MK, Avolio AP, Kelly RP: An analysis of the relationship between central aortic and peripheral upper limb pressure waves in man. Eur Heart J 1993;14:160–167.
14. McDonald DA: Wave-velocity and attenuation, in: Blood Flow in Arteries. Vienna, Edward Arnold, 1978, p.389–419.
15. Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND: Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. Hypertension 2001;38:932–937.
16. Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft J, Newby D, Webb D: The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. J Physiol 2000;525:263–270.
17. Mathews JNS, Altman D, Cambell MJ, Royston P: Analysis of serial measurements in medical research. Br Med J 1990;300:230–235.
18. Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum H, Sogo N, Cockcroft JR, Webb D: Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. J Cardiovasc Pharmacol 1999;34:690–693.
19. Hayashi T, Nakayama Y, Tsumura K, Yoshimaru K, Ueda H: Reflection in the arterial system and the risk of coronary heart disease. Am J Hypertens 2002;15:405–409.
20. Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Berent R, Eber B: Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. Circulation 2004;109:184–189.

21. O'Rourke M, Kelly R: Wave reflection in the systemic circulation and its implications in ventricular function. J Hypertens 1993;11: 327–337.
22. Leikert J, Rathel T, Wohlfart P: Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. Circulation 2002;106:1614–1617.
23. Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R: Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. Clin Sci 2002;103: 72S–75S.
24. Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A, Mavrikakis M: Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. CAD 2004;15:485–490.
25. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M: Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy non-smokers. Am Heart J 2004;147:e5.
26. McEniery C, Qasem A, Schmitt M, Avolio A, Cockcroft J, Wilkinson I: Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. J Am Coll Cardiol 2003;42:1975–1981.
27. Karatzis E, Papaioannou TG, Aznaouridis K, Karatzi K, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Papamichael C, Lekakis J, Mavrikakis M: Acute effects of caffeine on blood pressure and wave reflections in healthy subjects: should we consider monitoring central blood pressure? Int J Cardiol 2005;98:425–430.
28. Vlachopoulos C, Hirata K, O'Rourke M: Pressure-altering agents affect central aortic pressure more than is apparent from upper limp measurements in hypertensive patients. The role of arterial wave reflections. Hypertension 2001;38:1456–1460.
29. Lieberman E, Gerhard M, Uehata A, Selwyn A, Ganz P, Yeung A, Greager M: Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 of age with coronary artery disease. Am J Cardiol 1996;78:1210–1214.
30. Waddell TK, Dart AM, Medley TL, Cameron JD, Kingwell BA: Carotid pressure is a better predictor of coronary artery disease severity than brachial pressure. Hypertension 2001;38:927–931.

Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers

Christos Papamichael, MD,[a] Emmanouil Karatzis, MD,[a] Kalliopi Karatzi, MSc,[b] Konstantinos Aznaouridis, MD,[a] Theodoros Papaioannou, PhD,[a] Athanassios Protogerou, MD,[a] Kimon Stamatelopoulos, MD,[a] Antonis Zampelas, PhD,[b] John Lekakis, MD,[a] and Myron Mavrikakis, MD[a] ***Athens, Greece***

Background Long-term smoking is believed to cause endothelial dysfunction via increased oxidative stress, whereas short-term smoking impairs vasodilatation through an as yet undefined mechanism. However, red wine and its constituents have a powerful antioxidant effect both in long-term and acute consumption. The aim of the current study was to investigate whether red wine, with or without alcohol, influences endothelial dysfunction induced by acute cigarette smoking.

Methods Sixteen healthy volunteers (8 males and 8 females) were recruited for a double-blind, crossover study, comprising 3 study days. Each subject smoked 1 cigarette, or smoked and drank 250 mL of red wine, or smoked and drank 250 mL of dealcoholized red wine. Flow-mediated dilatation (FMD) was measured after fasting and 15, 30, 60, and 90 minutes after each trial (smoke or smoke and drink either beverage).

Results Acute smoking of 1 cigarette caused a reduction in FMD ($P < .001$), which was statistically significant 15, 30, and 60 minutes after the inhalation of smoke compared to baseline levels ($P < .001$, $P < .001$, $P = .043$, respectively). However, simultaneous ingestion of either red wine or dealcoholized red wine with smoking did not lead to a change in FMD.

Conclusions Acute smoking caused a significant impairment in endothelial function. Simultaneous consumption of red wine or dealcoholized red wine with smoking decreased smoke's harmful effect on endothelium. (Am Heart J 2004; 147:e5.)

It has been sufficiently demonstrated that endothelial dysfunction, caused by a number of risk factors, is an early phenomenon in atherogenesis.[1]

Cigarette smoking, one of the most potent risk factors for the development of atherosclerosis,[2] is proven to have a strong association with coronary, cerebral, and peripheral vascular disease.[3] Several studies support the hypothesis that smoking causes endothelial dysfunction through elevation of endothelin-1,[4] and oxidative damage of nitric oxide (NO)[5] by a large number of free radicals known to exist in smoke, both in gas and in tar phase.[6] In contrast, antioxidant supplementation in long-term smokers leads to improvement of endothelial function and supports the suggestion that smoking increases oxidative stress.[7–9]

Endothelial dysfunction, a possible link between smoking and atherogenesis, has been observed in brachial arteries not only in healthy long-term smokers[10] but also in passive[11] smokers. However, endothelial dysfunction has also been observed in healthy nonsmokers when they smoked 1 cigarette,[12,13] but there is little knowledge regarding the mechanism of this acute effect.

However, the antioxidant effect of red wine and its reverse correlation with cardiovascular mortality is now well known.[14] Several studies suggest that modest, regular consumption of red wine and its constituents (which are also present in purple grape juice) cause a significant improvement in endothelial function.[15–17] In addition, recent studies[18,19] testing the acute effect of red wine and dealcoholized red wine in healthy subjects suggested that the antioxidant substances found in red wine are probably more potent in improving endothelium dependent flow-mediated dilation (FMD) than alcohol itself.

From the [a]Department of Clinical Therapeutics, Alexandra University Hospital, Athens, and the [b]Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece.
Submitted February 19, 2003; accepted June 4, 2003.
Reprint requests: Christos Papamichael, MD, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra University Hospital, Xanthipou 3, Cholargos, 15561, Athens, Greece.
E-mail: popikaratzi@yahoo.com
0002-8703/$ - see front matter
© 2004, Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/S0002-8703(03)00468-X

Therefore, the aim of the current study was to investigate whether wine, with or without alcohol, improves endothelial dysfunction induced by the smoking of 1 cigarette.

Methods

Subjects

Sixteen healthy volunteers (8 males and 8 females) were recruited for the study. Their average age was 28.9 ± 6.5 years (mean ± SD) and their body mass index (BMI) was 23.4 ± 3.2kg/m^2. Inclusion criteria for recruitment of the volunteers were normal blood pressure (<140/90 mm Hg), no history of diabetes mellitus, BMI between 20 and 27 kg/m^2, no family history of coronary artery disease (CAD), absence of liver and endocrine diseases, and cholesterol levels <240 mg/dL. The subjects were all nonsmokers, and those who were on antioxidant vitamin supplementation or peculiar diets were excluded from the study. Subjects were not on any medication and the women were not taking contraceptives. Their alcohol consumption was in accordance with the recommendations (20–30 g alcohol per day). All patients gave their informed consent before entering the study.

Experimental protocol

The study protocol was a double-blind crossover comprising 3 study days. On the first day, subjects were instructed to attend the Vascular Laboratory of Alexandra Hospital, Athens, Greece, after a 12 hour fast. After the initial ultrasound measurement, subjects were asked to smoke a regular cigarette (Marlboro, with 12 mg tar and 0.9 mg nicotine). Ultrasound measurements were repeated 15, 30, 60, and 90 minutes after completion of smoking. On both the second and third study days, subjects were asked to drink either a glass of 250 mL of red wine or 250 mL of dealcoholized red wine and to consume 1 slice of white bread (30 g) and 30 g of cottage cheese (4% fat). At the end of their meal and simultaneously with the ingestion of each beverage they were asked to smoke the same type of regular cigarette that was used during the first day. Subjects were instructed to inhale the smoke. The entire procedure (wine ingestion and smoking) lasted 15 minutes. Ultrasound measurements were repeated 15, 30, 60, and 90 minutes after the end of the meal. All participants were encouraged not to change their diet during the study and 24-hour recalls were reviewed to assure dietary compliance.

Wine preparation

Red wine containing 12% ethanol (Grand Reserve 1996, Boutaris) was used in the current study. The same type of wine was partially lyophilized at −50°C and 1 millibar pressure for 6 hours using a Cryodos 45 (Telstar, Spain) and the concentrated red wine (~50%) was then diluted with distilled water until it reached the initial volume, in order to produce dealcoholized red wine (1% ethanol). The concentration of total antioxidants in the wine was estimated by the Folin-Ciocalteau procedure, using a UVIKON, spectrophotometer, 931 (Kontron Instruments, Milan, Italy), and the results were expressed as micrograms of caffeic acid per 100 milliliters. A Hewlett-Packard Model 1050 UV-DAD/FLD with Autosampler and a Hewlett-Packard Model 6890 with MS detector and Autosampler (Hewlett-Packard, Calif) were used for high pressure liquid chromatography (HPLC)[20] and gas chromatography (GC/MSD), respectively, for the quality control of specific antioxidants in both types of red wine (regular and dealcoholized). Finally, in order to test sensory characteristics of both red wines and the capacity of subjects to distinguish the 2 beverages, duo-trio tests and a hedonic scale were used.

FMD

FMD was assessed in all subjects by B-mode high-resolution ultrasound imaging (Acuson 128xp, Calif). The method to examine endothelial function has been described previously.[21,22] Each patient rested in a quiet room with a temperature controlled at 20–25°C. After resting in a supine position for 10 minutes, a 7.0 MHz linear array transducer was used to obtain measurements from the right brachial artery in a specific anatomic point. The diameter of the artery was measured at end diastole, manually, point-to-point, using electronic calipers, by 2 independent observers who were unaware of the study phase. After resting measure, a cuff fitted 8-centimters distal to the brachial artery and near the wrist was inflated at 250 to 300 mm Hg, altering arterial flow for 4 minutes. Then it was deflated, increasing arterial flow (reactive hyperemia).

The brachial artery was scanned continuously for 90 seconds after cuff deflation, and the vessel's maximum diameter at the same point with resting measurement was defined again (diameter during reactive hyperemia). The entire procedure was repeated 15, 30, 60, and 90 minutes (5 times including the measurement at the fasting state) after smoking, and simultaneous with smoking and ingestion of either dealcoholized or red wine containing alcohol in a random order on different days. FMD was defined as the percent change of artery's diameter (endothelial-dependent vasodilation), and hyperemia refers to the percent increase of flow from flow at rest (at each time point of the study). The inter- and intraobserver variability for brachial diameter measurements in our laboratory is 0.1 ± 0.12 mm and 0.08 ± 0.19 mm respectively, and FMD variability measured on 2 different days was 1.1% ± 1%.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. Analysis of variance for repeated measures was used to evaluate changes after the 3 interventions. Total and incremental areas under the response curves (TAUC and IAUC) were also calculated in order to compare responses after each intervention. The Student's paired t test was used to compare TAUC and IAUC. A value of $P < .05$ was regarded as statistically significant. All statistical analyses were performed using statistical software SPSS 10 for Windows.

Results

All 16 subjects completed the study protocol according to the schedule.

Table I. Hemodynamics, vessel size, and flow before and after each of the 3 trials; smoking alone, or simultaneous smoking with consumption of either red wine or dealcoholized red wine (n = 16)

	Baseline	15 Min	30 Min	60 Min	90 Min
Smoking					
Vessel size (mm)	3.6 ± 0.6	3.6 ± 0.6	3.6 ± 0.6	3.6 ± 0.6	3.6 ± 0.6
Flow at rest (mL/min)	79 ± 52	83 ± 39	91 ± 72	76 ± 82	70 ± 65
Hyperemia (%)	183 ± 152	153 ± 122	255 ± 365	252 ± 264	430 ± 536
FMD (%)	6.52 ± 2.4	1.91 ± 2.0*	2.27 ± 2.0*	4.10 ± 2.6†	5.22 ± 2.5
Smoking + regular red wine					
Vessel size (mm)	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.6	3.9 ± 0.6†	3.9 ± 0.6	3.9 ± 0.7†
Flow at rest (mL/min)	60 ± 45	62 ± 26	101 ± 71	95 ± 47	74 ± 39
Hyperemia (%)	221 ± 139	218 ± 106	77 ± 83	84 ± 88	346 ± 239
FMD (%)	5.79 ± 2.1	4.12 ± 2.0	4.05 ± 1.8	4.87 ± 2.4	5.05 ± 2.3
Smoking + dealcoholized red wine					
Vessel size (mm)	3.5 ± 0.5	3.6 ± 0.7	3.7 ± 0.6	3.7 ± 0.6	3.7 ± 0.6
Flow at rest (mL/min)	97 ± 54	80 ± 58	132 ± 104	93 ± 77	84 ± 90
Hyperemia (%)	125 ± 167	357 ± 374	229 ± 305	342 ± 352	340 ± 264
FMD (%)	5.8 ± 2.1	4.65 ± 3.6	6.08 ± 3.6	5.66 ± 2.5	5.11 ± 1.3

*$P < .001$ versus baseline levels.
†$P < .05$ versus baseline levels.

Both phenol content (658 μg/100 mL of caffeic acid vs 650 μg/100mL of caffeic acid, respectively) and the types of phenolic substances were similar in both beverages, which indicates that the dealcoholization process did not affect the concentration of the wine's constituents.

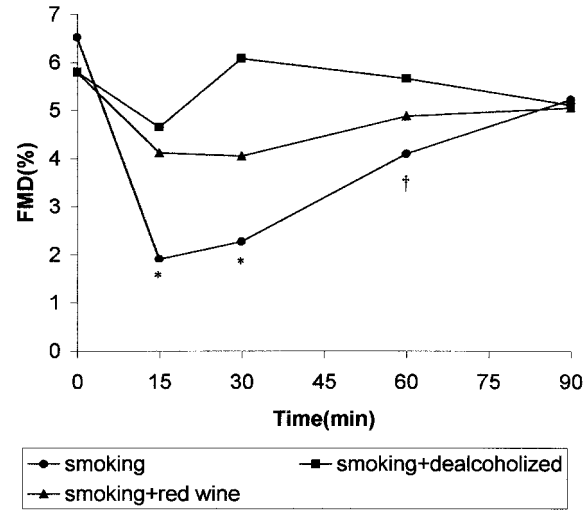
Baseline artery diameter, FMD, and flow at rest were not significantly different among the 3 study days (Table I). In addition, the increases in flow during reactive hyperemia were similar.

Smoking 1 cigarette caused a reduction in FMD ($P < .001$), according to analysis of variance for repeated measures, that was statistically significant 15, 30, and 60 minutes after the inhalation of smoke compared to baseline levels ($P < .001$, $P < .001$, $P = .043$, respectively). However, simultaneous ingestion of either red wine or dealcoholized red wine with smoking did not lead to a change in FMD (Table I).

After smoking and drinking regular red wine, an increase in basal artery diameter was observed. This increase was found to be significant 30 minutes after ingestion ($P = .047$), showed a trend towards an increase at 60 minutes, and was again significant at 90 minutes ($P = .015$) compared to baseline levels.

FMD responses were found to be different after smoking 1 cigarette and smoking and ingesting regular red wine ($P = .009$), after analysis of variance for repeated measures. Differences were also observed in the response curves after smoking and smoking with concurrent consumption of dealcoholized red wine ($P < .001$). However, the FMD responses after smoking and drinking regular red wine and smoking and drinking dealcoholized red wine were not statistically different (Figure 1).

Figure 1



Effects of smoking 1 cigarette and simultaneously smoking and drinking either red wine or dealcoholized red wine on FMD (n = 16). *$P < .001$ versus baseline levels. †$P < .05$ versus baseline levels.

Incremental areas under the curve revealed a difference between smoking and smoking with concurrent consumption of regular red wine ($P = .016$), as well as between smoking and smoking with concurrent ingestion of dealcoholized red wine ($P < .001$).

Discussion

In the current study, smoking a cigarette caused significant impairment of endothelial function in healthy nonsmokers, which continued for the following 60 minutes—a phenomenon already described in previous studies.[12,13] However, simultaneous consumption of regular or dealcoholized red wine with smoking decreased the smoke's harmful effect, at least partly through attenuation of the effect of smoking on FMD.

Several in vivo[2,7,8,23] as well as in vitro studies[5,6] suggested elevation of endothelin-1[4] and damage of NO by free radicals[5,6] as the potential mechanisms through which smoking impairs endothelial function. Recent studies also demonstrated that nicotine contributes to acute endothelial dysfunction in smokers.[24]

However, it has been noticed that supplementation with antioxidant vitamins E and C[9,23,25,26] in long-term smokers counteracts the impairment of endothelial function caused by smoking, suggesting that smoking increases oxidative stress and antioxidants attenuate its effects. In vitro studies indicated that in the acute phase, red wine's antioxidant substances cause vasorelaxation through an enhanced production of NO, as well as an increased protection of NO from damage by free radicals.[27–30] Another means by which red wine acts as a vasodilator is through its alcohol content: it has been indicated that alcohol modulates NO synthase and promotes NO secretion.[31] Moreover, in vivo studies in healthy individuals suggest that ingestion of either regular or dealcoholized red wine[18,19] improves FMD, and this effect could be partly attributed to the antioxidant constituents of red wine. In the same studies, a significant increase in basal artery diameter was observed after ingestion of regular red wine, which was attributed to ethanol, and inevitably influenced FMD. A similar increase in basal artery diameter was also noticed in the current study, but it did not induce a significant reduction of FMD.

From the results of the current study, it could be hypothesized that there is an increase in oxidative stress after smoking that leads to endothelial impairment. However, simultaneous consumption of red wine was found to decrease partly the harmful acute effect of smoking through its effect on FMD. This finding could be due to the fact that alcohol could increase the production of NO and that wine's powerful antioxidants could possibly stimulate NO production and protect it from oxidative damage as well. This hypothesis is in accordance with a previous finding indicating that a few minutes after red wine consumption, there is an increase in plasma phenolic substances.[32] Analyzing the results from the current study, we hypothesize that the ingredients in red wine other than alcohol could be more important in their effect on FMD, because both regular and dealcoholized red wine initiated the same decrease of smoke's effects on endothelial function. Results from red wine containing alcohol as well as polyphenols make us skeptical whether the beneficial effects observed can be attributed to alcohol or its antioxidant substances due to the fact that the results from dealcoholized red wine suggest that its polyphenols probably attenuated the effects of smoking. It is also important to notice that the observed results refer to the acute effect of smoking 1 cigarette and the simultaneous consumption of red wine on only 1 indicator of endothelial function. Therefore, further study is necessary to assess this effect on a long-term basis, and to assess other markers of endothelial function.

In addition, it should be mentioned that this was a preliminary study in healthy individuals, undertaken to elucidate the potential mechanism through which short-term smoking causes endothelial dysfunction and to investigate whether red wine's alcohol content and/or its other constituents could influence this effect. In this study, no markers of reactive oxygen species or levels of serum antioxidants were measured, and FMD, as an indirect means of detecting NO release by endothelial cells, was used.[33] Following these findings, further study in a larger group of healthy smokers, or smokers with cardiovascular risk factors or cardiovascular disease, is of great interest. Moreover, it would be helpful to investigate simultaneous use of smoke and red wine with a standard meal, as it would simulate a typical habit of a great number of smokers. The volunteers in the current study were all young adults and healthy, and therefore, the impact of wine with or without alcohol on cardiovascular risk factors could be the aim of another study.

In conclusion, smoking 1 cigarette caused a significant impairment in endothelial function, but simultaneous consumption of red wine or dealcoholized red wine with smoking decreased smoke's harmful effect on endothelium. Our findings suggest that impairment of FMD after smoking could be attributed to increased oxidative stress, and because both wines had similar effects, we hypothesize that the wine's major contributor to this effect was constituents other than alcohol, at least as far as FMD is concerned.

References

1. Celermayer D. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? J Am Coll Cardiol 1997;30:325–33.
2. Morrow J, Frei B, Longmire A, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2 -Isoprostanes) in smokers. N Eng J Med 332:1198–203.
3. Kannel W. Update on the role of cigarette smoking in coronary artery disease. Am Heart J 1981;101:319–28.
4. Haak P, Jungmann E, Raab C, et al. Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. Metabolism 1994;43:267–9.

5. Murohara T, Kugiyama K, Oghushi M, et al. Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. Am J Physiol 1994;273: H874–80.
6. Church D, Pryor W. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect 1985;64: 111–26.
7. Reilly M, Delanty N, Lawson J, et al. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic smokers. Circulation 1996;94:19–25.
8. Heitzer T, Hanjorg J, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. Circulation 1996;94: 6–9.
9. Raitakari O, Adams M, McCredie R, et al. Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, bur no sustained beneficial effect. J Am Coll Cardiol 2000;35:1616–21.
10. Celermajer D, Sorensen K, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium dependent dilation in healthy young adults. Circulation 1993;88:2149–55.
11. Celermajer D. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. N Eng J Med 1996;334:150–4.
12. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, et al. Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. Am J Cardiol 1997;79:529–31.
13. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, et al. Effects of acute cigarette smoking on endothelium dependent arterial dilatation in normal subjects. Am J Cardiol 1998;81:1225–8.
14. Buemann B, Dyerberg J, Astrup A. Alcohol drinking and cardiac risk. Nutr Res Rev 2002;15:91–121.
15. Cuevas A, Guasch V, Castillo O, et al. A high fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. Lipids 2000;35:143–8.
16. Stein J, Keevil J, Wiebe D, et al. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation 1999;100:1050–5.
17. Chou E, Keevil J, Aeschlimann S, et al. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. Am J Cardiol 2001;88:553–5.
18. Hashimoto M, Seungbum K, Masato E, et al. Effect of acute intake of red wine on flow mediated vasodilation of the brachial artery. Am J Cardiol 2001;88:1457–59.
19. Agewall S, Wright S, Doughty R, et al. Does a glass of wine improve endothelial function? Eur Heart J 2000;21:74–8.
20. Andrikopoulos N, Brueschweiler H, Taeschler C. Analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. J Am Oil Chem Soc 1991;68:359.
21. Celermajer D. Noninvasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 1992;340: 1111–5.
22. Corretti M. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-medeated vasodilation of the brachial artery. J Am Coll Cardiol 2002;39:257–65.
23. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, et al. Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C. Am J Physiol 1997;273:H1644–50.
24. Neunteufl T, Heher S, Kostner K, et al. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. J Am Coll Cardiol 2002;39:251–6.
25. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, et al. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. J Am Coll Cardiol 2000;35:277–83.
26. Zhang J, Ying X, Lu Q, et al. A single high dose of vitamin C counteracts the acute negative effect on microcirculation induced by smoking a cigarette. Microvasc Res 1999;58:305–11.
27. Freedman J, Parker C, Li L, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. Circulation 2001;103:2792–8.
28. Leikert J, Rathel T, Wohlfart P. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. Circulation 2002;106:1614–7.
29. Andriambeloson E, Kleschyov A, Muller B, et al. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. Br J Pharmacol 1997;120:1053–8.
30. Wollny T, Aiello L, di Tommaso D, et al. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. Br J Pharmacol 1999;127:747–55.
31. Venkov C, Myers P, Tanner M, et al. Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. Thromb Haemost 1999;81:638–42.
32. Caccetta R, Croft K, Beilin L, et al. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. Am J Clin Nutr 2000;71:67–74.
33. Joannides R, Haefeli WE. Nitric oxide is responsible for flow-mediated dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. Circulation 1995;91:1314–9.

Original Research

Acute Smoking Induces Endothelial Dysfunction in Healthy Smokers. Is This Reversible by Red Wine's Antioxidant Constituents?

Kalliopi Karatzi, MSc, Christos Papamichael, MD, Emmanouil Karatzis, MD, Theodore G. Papaioannou, PhD, Paraskevi Th. Voidonikola, MD, John Lekakis, MD, Antonis Zampelas, PhD

Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University (K.K., A.Z.), Vascular Laboratory, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra University Hospital (C.P., E.K., T.G.P., P.Th.V., J.L.), Athens, GREECE

Key words: red wine, smoking, endothelial function, antioxidants, FMD

Objective: Acute smoking causes endothelial dysfunction through impairment of nitric oxide (NO) production, or increased oxidative stress, but the exact mechanism still needs to be elucidated. In healthy non-smokers acute endothelial dysfunction caused by smoking one cigarette was counterbalanced by red wine's antioxidants. The aim of the present study is to investigate whether red wine's antioxidant substances could counteract the acute endothelial dysfunction induced by acute cigarette smoking in healthy smokers as well.

Methods: Twenty healthy volunteers (12 males) participated in a double-blind, cross-over study, comprised of three study days. All subjects either smoked one cigarette, or smoked and drank 250 ml of red wine, or smoked and drank 250 ml of dealcoholized red wine in each one of the study days. Flow mediated dilatation (FMD) was measured at fast and 30, 60 and 90 minutes after each trial.

Results: Smoking one cigarette induced a significant decrease in FMD ($p < 0.001$), which remained significant 30 ($p < 0.001$), and 60 ($p = 0.003$) minutes after the end of smoking. FMD remained statistically unchanged after consumption of either regular red wine, or dealcoholized red wine together with smoking.

Conclusions: The observed endothelial dysfunction following smoking of one cigarette was counterbalanced by consumption of either red wine or dealcoholized red wine in healthy smokers. It is possible that acute endothelial dysfunction caused by smoking could be attributed to increased oxidative stress and red wine's antioxidants counteract these acute effects of smoke on endothelium.

INTRODUCTION

Endothelial dysfunction is a well known premature indication of atherosclerosis and vessel damage [1]. Detection and modification of the factors that influence endothelial function is of great interest, especially when related with life style habits.

Cigarette smoking, a significant risk factor for atherosclerosis and coronary artery disease [2], is found to provoke endothelial dysfunction both in chronic use and in the acute phase [3,4]. In addition, endothelial dysfunction has been observed in healthy chronic [5], but also in passive smokers [6], as well as in healthy non-smokers when they smoked one cigarette [7,8].

Impairment of NO production [9] and increase in oxidative stress by a large number of free radicals known to exist in smoke [4], are some of the possible mechanisms responsible for acute endothelial dysfunction observed after smoking one cigarette. In contrast, supplementation of antioxidant vitamin C in healthy smokers acutely improves endothelial function suggesting that increased oxidative stress plays a crucial role in the effects of acute smoking on endothelium [10]. It is known that red wine contains powerful antioxidant substances [11] which

Address reprint requests to: Antonis Zampelas, PhD, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece, El. Venizelou 70, Athens, 17671, GREECE. E-mail: azampelas@hua.gr

Presented in part as a poster presentation at the 18th International Congress of Nutrition, 19-23/9/2005, Durban, South Africa. Abstract book number: 1.3.25.

Abbreviations: NO = nitric oxide, FMD = flow mediated dilatation, BMI = body mass index, CAD = coronary artery disease.

seem to have significant favorable effects on endothelial function when consumed chronically [12–14]. In addition, there are some recent studies concerning the possible acute effects of regular and dealcoholized red wine in healthy subjects and coronary artery disease patients [15–17]. These studies concluded that probably the antioxidant substances found in red wine are responsible for the favorable acute effects observed in endothelial function, expressed as endothelium dependent flow mediated dilation (FMD).

Previously it has been described that simultaneous consumption of either regular red wine or dealcoholized red wine with smoking one cigarette, counterbalances the acute deleterious effects of smoke on FMD in a group of healthy nonsmokers [18].

Since there are no data concerning the possible effects of wine and smoking on smokers, which is a high-risk and a very large population, the aim of the present study was to investigate whether regular red wine or dealcoholized red wine could counteract endothelial dysfunction induced by acute cigarette smoking in healthy smokers.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Twenty healthy smokers (12 males) with mean age 29.0 ± 5.4 years (mean ± SD) and body mass index (BMI) 23.7 ± 4.6 kg/m^2, were recruited for the study. All volunteers had normal blood pressure (<140/90 mmHg), no history of diabetes mellitus, obesity, no family history of coronary artery disease (CAD), absence of liver and endocrine diseases and cholesterol levels <240 mg/dl. The amount of cigarettes smoked per day by each individual and the duration of smoking were measured in pack/years, ranging from 1 to 20 (10 of them had <10 pack years and 10 had >10 pack years). Exclusion criteria were supplementation of antioxidant vitamins, dieting at the time of the study, supplementation of any medication, use of contraceptives by female volunteers and alcohol consumption more than the recommended (20–30 gr alcohol/day). The study was approved by the institutional committee on human research and all subjects gave their informed consent before entering the study.

Experimental Protocol

The study protocol was of a double-blind, cross-over design. At each study day, subjects were instructed to attend the Vascular Laboratory of Alexandra Hospital, Athens, Greece, after a 12 hour fast and 12 hour abstinence from smoking. On the first day, an initial ultrasound assessment took place at fasting. Afterwards, subjects were asked to smoke a regular cigarette (with 12 mg tar and 0.9 mg nicotine). Ultrasound measurements were repeated 30, 60 and 90 minutes following completion of smoking. On the second and on the third study day, an identical set of measurements took place, but the volunteers were asked to smoke the same type of cigarette and simultaneously drink either a glass of 250 ml of red wine, or 250 ml of dealcoholized red wine. Together with either smoking or smoking and drinking each of the two types of red wine, subjects were also consuming 1 slice of white bread (30 gr) and 30 gr of cottage-cheese (4% fat). All the procedure (wine ingestion, meal consumption and smoking) lasted 15 minutes. All participants were encouraged not to change their diet during the study and to consume the same menu the day before each study day. 24-hour recalls were reviewed to assure compliance to dietary instructions.

Wine Preparation

Red wine used in this study (Rapsani, Tsantalis, Greece), contained 12% of ethanol. The same type of red wine was also used for the preparation of dealcoholized red wine (containing 1% of ethanol) with partial lyophilization. Regular red wine was partially lyophilized at −50°C and at 1 mb pressure for 6 hours, using Cryodos 45 (Telstar, Spain) and the concentrated red wine (~50%) was then diluted with distilled water until it reached the initial volume, in order to produce dealcoholized red wine. Total antioxidant estimation in both types of red wine was performed by the Folin-Ciocalteau procedure [19], using a UVIKON, spectrophotometer, 931, Kontron Instruments (Milan, Italy) and expressing results as micrograms of caffeic acid per 100 milliliter. A Hewlett-Packard Model 1050 UV-DAD/FLD with Autosampler (California, USA), and a Hewlett-Packard Model 6890 with MS detector and Autosampler (California, USA), was used for High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) [20] and Gas Chromatography (GC/MSD) respectively, for the quality control of specific antioxidants in both types of experiment's red wine (regular and dealcoholized). Finally, sensory characteristics of both red wines and the capacity of subjects to distinguish the two beverages were examined through use of duo—trio tests and a hedonic scale.

Flow Mediated Dilatation Measurement

A B-Mode high-resolution ultrasound imaging (Acuson 128xp California, USA) was used for assessment of FMD. The method to assess endothelial function, has been previously described [21,22]. All measurements were performed in a quiet room with a temperature controlled at 20–25°C, at supine position and after a 10 minutes resting period. A 7.0 MHz linear array transducer was used to obtain measurements from the right brachial artery in a specific anatomic point. The measurement of the artery diameter was performed by two independent observers who were unaware of the study phase, at end-diastole, by using electronic calipers and all procedure was guided by electrocardiographic assessment. After the initial measurement at resting conditions, a cuff fitted 8 cm distal to the brachial artery and near the wrist was inflated at 250–300

mmHg, altering arterial flow for 4.5 minutes. Then it was deflated, increasing arterial flow (reactive hyperemia).

Afterwards, there was a continuous scan for 90 sec after cuff deflation, and vessel's maximal diameter at the same point with resting measurement, was defined again (diameter during reactive hyperemia). This procedure was repeated 30, 60 and 90 min after smoking and simultaneous smoking and ingestion of either dealcoholized, or regular red wine. FMD is defined as the percent change of artery's diameter (endothelial dependent vasodilation) and hyperemia refers to the percent increase of flow, from flow at rest (at each time point, of the study). The inter and intra observer variability for brachial diameter measurements in our laboratory is 0.1 ± 0.12 and 0.08 ± 0.19 mm respectively, while FMD variability measured on 2 different days was 1.1 ± 1%.

Statistical Analysis

Analysis of variance for repeated measures was used to evaluate changes, following all three interventions. A further ANOVA designs with 2 interventions × 4 time periods (fast, 30, 60, 90 minutes post-consumption) was applied to assess the comparative effects of the interventions on the measured variables. Multiple comparisons were performed by Bonferroni corrected Student's t-test, two-tailed, paired Student t-test was applied for the evaluation of differences of baseline conditions among the three study sessions. All variables were tested for homogeneity of variance and normal distribution, before any statistical analysis was applied. All data are expressed as mean ± SD unless otherwise stated and a value of $p < 0.05$ was regarded as statistically significant. All statistical analyses were performed using statistical software SPSS 11 for Windows.

RESULTS

All subjects completed the study without any dissatisfaction and no acute alcohol related problems.

Analysis of the two types of red wine (regular and dealcoholized) showed no significant difference either in their total phenol content, or the types of their antioxidants. The phenol content of the original red wine and red wine after alcohol extraction was similar (658 μg/100 ml of caffeic acid vs 650 μg/100 ml of caffeic acid respectively). In addition, the polyphenol profiles of the two beverages, according to HPLC and GC analysis, were very similar. Finally, from the duo-trio test evaluation 12 out of 15 panelists could not distinguish beverages. The hedonic scale evaluation, showed no significant difference of color, flavor and taste (sweet, bitter and sour) between the two wines. These results prove that the two wines used for the study were similar in taste, colour, flavour and antioxidant content and their only difference was their alcohol concentration (12% for regular vs 1% for dealcoholized).

Baseline artery diameter, blood flow at rest, heart rate and FMD were similar and the increase in blood flow after at the reactive hyperemia was not statistically different among the three study days and at every specific time-point (Table 1).

FMD after smoking one cigarette was significantly decreased ($p < 0.001$). The reduction in FMD was significant 30 and 60 minutes after the end of smoking, compared to baseline

Table 1. Artery Diameter, Flow at Rest, Flow in Hyperemia and FMD of the Three Study Days (Smoking, Smoking + Dealcoholized Red Wine and Smoking + Regular Red Wine).

	Baseline	30 min	60 min	90 min
		Smoke		
Vessel size (mm)	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2
Flow at rest (ml/min)	99.9 ± 16.6	134.2 ± 47.6	130.3 ± 38.8	98.3 ± 18.1
Hyperemia (%)	186.7 ± 61.2	201.2 ± 61.5	151.0 ± 49.1	131.7 ± 42.3
Heart rate (beats/min)	63.5 ± 1.6	69.7 ± 1.9*	66.1 ± 1.7	64.8 ± 1.9
FMD (%)	5.65 ± 0.77	2.07 ± 0.70*	2.25 ± 0.52*	5.33 ± 0.90
		Smoke + Dealcoholized red wine		
Vessel size (mm)	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1
Flow at rest (ml/min)	91.1 ± 16.7	150.5 ± 39.1	133.1 ± 27.8	152.4 ± 34.1
Hyperemia (%)	174.2 ± 64.0	109.5 ± 62.9	143.8 ± 69.9	118.9 ± 63.4
Heart rate (beats/min)	64.1 ± 2.5	67.1 ± 2.7	66.7 ± 2.4	67.5 ± 2.9
FMD (%)	4.94 ± 0.8	6.93 ± 1.2	6.24 ± 0.7	5.81 ± 0.6
		Smoke + regular red wine		
Vessel size (mm)	3.7 ± 0.2	4.1 ± 0.1*	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2
Flow at rest (ml/min)	104.0 ± 15.4	118.0 ± 14.9	107.4 ± 18.4	136.1 ± 24.1
Hyperemia (%)	177.7 ± 41.2	199.6 ± 49.1	179.0 ± 56.1	180.7 ± 95.8
Heart rate (beats/min)	62.5 ± 2.2	68.8 ± 2.0	64.3 ± 2.5	66.0 ± 2.0
FMD (%)	5.11 ± 0.67	4.09 ± 0.75	6.14 ± 0.58	5.53 ± 0.49

FMD, flow mediated dilatation, min, minutes.

Values are expressed as Mean ± SEM.

* Indicates significant difference from baseline values.

Baseline values did not differ significantly among the three study sessions.

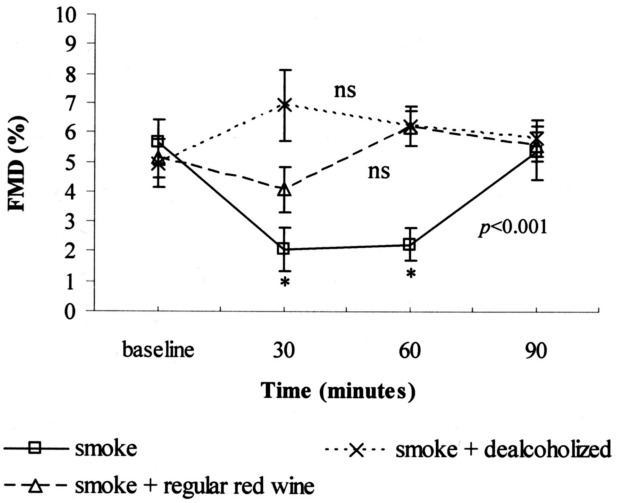


Fig. 1. FMD responses after smoking, or smoking and drinking either regular or dealcoholized red wine (n = 20). *p* indicates overall significant changes (ANOVA for repeated measures, observed power 99%). * indicates significant difference ($p < 0.01$) from baseline (Bonferroni corrected Student t-test for multiple comparisons). Bars represent standard error (SEM) of mean values.

FMD measurement ($p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). On the other hand, overall FMD response after smoking was significantly different compared to FMD response after smoking + dealcoholized and smoking + regular red wine, as estimated by the significance level of the interaction term of two separate 2 × 4 general linear models for repeated measures; $p < 0.001$ and $p = 0.007$ respectively. FMD response between smoke + dealcoholized and smoke + regular red wine sessions was not statistically different (Fig. 1).

Baseline artery diameter increased significantly after smoking and drinking regular red wine, 30 minutes post-ingestion and it returned to its fasting levels 60 and 90 minutes after the end of the meal (Table 1).

DISCUSSION

In the present study which was performed in a group of smokers, it was shown that smoking one cigarette induces a significant decrease in FMD, which is maintained for 30 to 60 minutes, but simultaneous consumption of red wine with or without alcohol, counterbalances this unfavourable effect on endothelial function.

The observed effects of smoking on FMD are in accordance with previous studies [7,8,18], which also found that acute smoking induces a significant deterioration of endothelial function, which lasts for 30 to 60 minutes after the end of smoking. This could be explained by the fact that smoking elevates levels of endothelin-1, reduces NO levels and increases oxidative stress as shown by several in vitro, as well as in vivo studies [9,23–25]. It is of great interest that a habitual heavy smoker, like the volunteers that participated in the present study, usually lights the next cigarette in less than 30 minutes after they have finished the previous one. This suggests that a habitual smoker might have a prolonged endothelial dysfunction, during almost all day.

On the other hand, it seems that supplementation of antioxidant vitamins, especially vitamin C and E in smokers improve endothelial function, which in this case is already impaired [10,26,27]. This favourable effect of antioxidant vitamins has been observed both in chronic and in short term use and it implies that possibly increased oxidative stress is the key mechanism for smoke's endothelial dysfunction.

In this study red wine's constituents were used as a way of reversing acute unfavourable effects of smoke on endothelial function. Several studies investigating red wine's acute endothelial effects have concluded that the antioxidant substances found in red wine are very effective in increasing FMD both in healthy subjects, as well as in patients with coronary artery disease (CAD), within 30–120 minutes following its ingestion [15–17]. This could be explained by the fact that red wine's antioxidants induce vasorelaxation through increased production of NO, as well as an increased protection of NO from damage by free radicals [13,28,29]. Unfortunately, it is not possible from the present study to come to a conclusion as to which antioxidant substance found in red wine is responsible for the observed effects. There are many red wine antioxidants that have beneficial effects on the cardiovascular system and in specific on endothelial function, as an increase in eNOS is observed in response to the effects of trans-resveratrol, cinnamic and hydroxycinnamic acids, cyanidin and some phenolic acids [30]. However, resveratrol is possibly the most capable vasoactive antioxidant substance in red wine, as it was found to provoke endothelium-dependent and nitric oxide-mediated vasodilation in human internal mammary artery [31], to protect blood vessels by oxidative damage by upregulating endogenous antioxidants and phase 2 enzymes [32] and to inhibit endothelin-1 expression [33].

On the other hand, results from another recent study suggest that in the acute phase alcohol and not antioxidant substances of wine is responsible for the improvement observed in FMD postprandially [34], which is in accordance with studies which concluded that alcohol is a vasodilator substance, as it modulates NO synthase and promotes NO secretion [35]. This effect of alcohol is also observed in the present study, as it was found that in subjects who consumed red wine containing alcohol, there was a significant increase in baseline vessel diameter 30 minutes later. This phenomenon is explained by alcohol's vasodilatory effects, it has been observed previously and inevitably it could influence FMD [16,17]. Nevertheless, in the present study the observed increase in baseline vessel diameter by alcohol, didn't lead to a significant reduction in FMD as expected and therefore it didn't influence the observed results.

It should be mentioned that we have investigated previously the possible interaction of acute smoking and simultaneous

ingestion of red wine with or without alcohol in healthy non-smokers and we found that although smoking one cigarette deteriorates FMD, ingestion of either regular or dealcoholized red wine counteracts these harmful effects of smoke [18]. In the present study we tried to investigate for the first time whether the same interaction of smoke and wine could provoke the same effects on a group of healthy smokers that usually drink and smoke at the same time. Our recent findings are in accordance with the previous ones suggesting that the response of smokers in smoking one cigarette and in smoking and drinking red wine is the same as in non-smokers. In addition, since both regular and dealcoholized red wine counterbalanced the harmful acute effects of smoke on endothelial function, it is possible that red wine's antioxidants and not only alcohol, are responsible for these favourable effects.

The fact that antioxidant capacity and oxidative stress were not measured, could be considered as the main study limitation. It is likely that future designs with additional study of oxidative status at every time-point will possibly confirm our findings and clarify the mechanisms implicated.

CONCLUSION

Smoking one cigarette induced a decrease in FMD, and simultaneous ingestion of regular or dealcoholized red wine with smoking reversed the effects of smoke in a group of healthy smokers. Therefore, it is suggested that in smokers as well as in non-smokers, it is possible that smoke increases oxidative stress or decreases NO levels and red wine's antioxidants counteract these effects and reverse the unfavourable influence of smoke on FMD. It is probable that smoking and consumption of red wine act on endothelial function in the same way in smokers and non-smokers and that the favourable effects observed through use of red wine could be attributed to its antioxidant substances and not solely to its alcohol content.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Tsantalis Ltd, Greece for the provision of red wine.

REFERENCES

1. Quyyumi A: Prognostic value of endothelial function. Am J Cardiol 91(Suppl):19H–24H, 2003.
2. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL: Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. JAMA 279:119–124, 1998.
3. Zeiher AM, Schachinger V, Minners J: Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. Circulation 92:1094–1100, 1995.
4. Ambrose J, Barua R: The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. An update. J Am Coll Cardiol 43: 1731–1737, 2004.
5. Celermajer D, Sorensen K, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield J: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium dependent dilation in healthy young adults. Circulation 88(Part 1):2149–2155, 1993.
6. Celermajer D: Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. N Eng J Med 334:150–154, 1996.
7. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Nanas J, Kontoyannis D: Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. Am J Cardiol 179: 529–531, 1997.
8. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Stamatelopoulos K, Voutsas A, Stamatelopoulos S: Effects of acute cigarette smoking on endothelium dependent arterial dilatation in normal subjects. Am J Cardiol 81:1225–1228, 1998.
9. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato E, Shindo M, Inoue M: Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. Circulation 105:1155–1157, 2002.
10. Teramoto K, Daimon M, Hasegawa R, Toyoda T, Sekine T, Kawata T, Yoshida K, Komuro I: Acute effect of oral vitamin C on coronary circulation in young healthy smokers. Am Heart J 148: 300–305, 2004.
11. Soleas G, Diamandis E, Goldberg D: Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. J Clin Lab Anal 11:287–313, 1997.
12. Cuevas A, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain A, Leighton F: A high fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. Lipids 35:143–148, 2000.
13. Stein J, Keevil J, Wiebe D, Aeschlimann S, Folts J: Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation 100:1050–1055, 1999.
14. Chou E, Keevil J, Aeschlimann S, Wiebe D, Folts J, Stein J: Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. Am J Cardiol 88:553–555, 2001.
15. Hashimoto M, Seungbum K, Masato E, Katsuya L, Junya A, Masao Y, Masahiro A, Kazuo K, Hiroshige I, Kazyaki H, Kanji T, Yasuyoshi O: Effect of acute intake of red wine on Flow Mediated Vasodilation of the brachial artery. Am J Cardiol 88:1457–1459, 2001.
16. Agewall S, Wright S, Doughty R, Whalley G, Duxbury M, Sharpe N: Does a glass of wine improve endothelial function? Eur Heart J 21:74–78, 2000.
17. Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A, Mavrikakis M: Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with CAD. Coron Artery Dis 15:485–490, 2004.
18. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J,

Mavrikakis M: Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. Am Heart J 147:E5, 2004.
19. Singleton VL, Rossi JA: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16:144–158, 1965.
20. Andrikopoulos N, Brueschweiler H, Taeschler C: Analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. J Am Oil Chem Soc 68:359–364, 1991.
21. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 340:1111–1115, 1992.
22. Karatzis E, Lekakis J, Papamichael C, Andreadou I, Cimponeriu A, Aznaouridis K, Papaioannou TG, Protogerou A, Mavrikakis M: Rapid effect of pravastatin on endothelial function and lipid peroxidation in unstable angina. Int J Cardiol 101:65–70, 2005.
23. Haak P, Jungmann E, Raab C: Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. Metabolism 43:267–269, 1994.
24. Murohara T, Kugiyama K, Oghushi M, Sugiyama S, Yasue H: Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. Am J Physiol 266:H874–H880, 1994.
25. Church D, Pryor W: Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect 64:111–126, 1985.
26. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Soregi L, Lehr S, Huber K, Maurer G, Weidinger F, Kostner K: Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. J Am Coll Cardiol 35:277–283, 2000.
27. Raitakari O, Adams M, McCredie R, Griffiths K, Stocker D, Celermajer D: Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, but no sustained beneficial effect. J Am Coll Cardiol 35:1616–1621, 2000.
28. Leikert J, Rathel T, Wohlfart P: Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. Circulation 106:1614–1617, 2002.
29. Andriambeloson E, Kleschyov A, Muller B, Beretz A, Stocklet J, Adriantsitohaina R: Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. Br J Pharmacol 120:1053–1058, 1997.
30. Wallerath T, Li H, Godtel-Ambrust U, Schwarz PM, Forstermann U: A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. Nitric Oxide 12:97–104, 2005.
31. Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F: Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. Int J Cardiol 105: 209–215, 2005.
32. Li Y, Cao Z, Zhu H: Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. Pharmacol Res 53:6–15, 2006.
33. Chao HH, Juan SH, Liu JC, Yang HY, Yang E, Cheng TH, Shyu KG: Resveratrol inhibits angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Eur J Pharmacol 515:1–9, 2005.
34. Whelan A, Sutherland W, McCormick M, Yeoman D, Jong S, Williams M: Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. Int Med J 34:224–228, 2004.
35. Venkov C, Myers P, Tanner M, Su M, Vaughan D: Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. Thromb Haemost 81:638–642, 1999.

Received November 3, 2005; revision accepted April 13, 2006.

Combined acute effects of red wine consumption and cigarette smoking on haemodynamics of young smokers

Christos Papamichael[a], Kalliopi Karatzi[b], Emmanouil Karatzis[a], Theodore G. Papaioannou[a], Paraskevi Katsichti[a], Antonis Zampelas[b] and John Lekakis[a]

Objective **Red wine seems to improve haemodynamic variables, while smoking provokes adverse effects. The haemodynamic effects of their combined use is unknown. The purpose of the present study was to examine the acute effects of red wine and its constituents, in combination with the smoking of one cigarette, on haemodynamic parameters, such as blood pressure and wave reflections, in a group of smokers.**

Methods **Twenty smokers (12 males, eight females) participated in a double-blind, crossover study comprised of 3 study days. All subjects either smoked one cigarette, or smoked and drank 250 ml of red wine, or 250 ml of de-alcoholized red wine (containing the same type and similar concentration of antioxidants). Applanation tonometry and generalized transfer functions were used to estimate aortic pressure waveforms at baseline and 30, 60 and 90 min after each trial. The augmentation index (AIx) was used to express wave reflections.**

Results **Smoking increased peripheral systolic blood pressure ($P < 0.005$) 30 min later, but simultaneous consumption of either type of red wine caused no such effect. Additionally, smoking caused no overall effect on AIx, while smoking and drinking either regular or de-alcoholized red wine reduced AIx ($P < 0.001$). The reduction of AIx after red wine consumption was significantly greater than the respective reduction after de-alcoholized red wine ($P = 0.004$).**

Conclusion **Antioxidant substances in red wine counteracted the smoking–induced increase in peripheral systolic blood pressure. Both alcohol and antioxidants in red wine decrease wave reflections in uncomplicated habitual smokers postprandially, indicating an additional favourable effect of red wine. *J Hypertens* 24:1287–1292 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.**

Journal of Hypertension 2006, **24**:1287–1292

Keywords: augmentation index, blood pressure, haemodynamics, red wine, smoking

[a]Vascular Laboratory, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens and [b]Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece

Correspondence and requests for reprints to Kalliopi Karatzi MSc, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, 10 Delfon str., Glyfada, 16561, Athens, Greece
Tel: +30 210 9627184; fax: +30 210 9627184; e-mail: popikaratzi@yahoo.com

These data were accepted as a poster presentation at the 75th European Atherosclerosis Society Congress, Prague, 23–26 April 2005.

Received 17 November 2005 **Revised** 27 February 2006
Accepted 2 March 2006

Introduction

Moderate red wine consumption is well known to have significant cardioprotective effects [1], while smoking is an important risk factor for cardiovascular disease [2]. Nevertheless, their acute effects on haemodymamics, and especially blood pressure and wave reflections, which have recently been recognized as an important cardiovascular risk factor [3,4], have not been elucidated. Additionally, their possible combined haemodynamic effects have not yet been investigated.

Alcohol decreases both peripheral and central systolic and diastolic blood pressures, as well as arterial stiffness in healthy individuals in the acute postprandial state [5]. In addition, we have found previously that central blood pressure and wave reflections decrease both after consumption of regular and de-alcoholized red wine in patients with coronary artery disease (CAD), denoting a favourable acute effect of the antioxidants of red wine on haemodynamics [6].

On the other hand, smoking has been found to increase aortic and radial blood pressures in the acute phase [7–10]. Additionally, acute smoking increases arterial stiffness and wave reflections by increasing either pulse wave velocity (PWV), or augmentation index (AIx); these effects begin 5 min after smoking and last for up to 2 h, depending on the amount of cigarettes smoked or the amount of nicotine used [7–10].

Interestingly, it was shown recently that orally administrated antioxidant vitamin C reduced the smoking-induced increase in systolic and diastolic blood pressure, as well as PWV [11]. We have also shown that the antioxidants in red wine counteract acute endothelial dysfunction caused by acute cigarette smoking in

0263-6352 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

non-smokers [12], which is important considering the fact that endothelial dysfunction is related to increased arterial stiffness [13].

To our knowledge there are no data indicating either any possible effects of red wine consumption and its constituents on haemodynamics of uncomplicated habitual smokers, or in combination with cigarette smoking, which is a very frequent habit among this group of volunteers. This study was undertaken in order to investigate the possible effects of red wine's constituents (alcohol and antioxidants) simultaneously with smoking on blood pressure and wave reflections in smokers.

Methods

Study population

The study was comprised of 20 uncomplicated habitual smokers (12 males, eight females) with mean age 29.0 ± 5.4 years (mean $\pm$ SD) and body mass index (BMI) 23.7 ± 4.6 kg/m^2. None of the subjects had a family history of diabetes mellitus or CAD and their blood pressure (BP) and blood cholesterol levels were within normal ranges (BP $< 140/90$ mmHg and blood cholesterol < 240 mg/dl). The amount of cigarettes smoked per day by each individual and the duration of smoking were measured in pack-years, ranging from 1 to 20 (10 of them had < 10 pack-years and 10 had > 10 pack-years). Subjects on any antioxidant vitamin or medication supplementation (including contraceptives for the female subjects) and those consuming more alcohol than the recommended (20–30 g alcohol/day), were excluded from the study. All subjects gave their informed consent before entering the study, which was approved by the local scientific committee.

The sample size of the present study was initially estimated based on the expected change in augmentation index after regular or de-alcoholized red wine consumption. Considering that reproducibility (variability of repeated measurements of AIx) is up to 6% [14,15] and that approximately a 5–7% difference in AIx has been found to be associated with cardiovascular disease and risk [4,16], the sample size was initially estimated in order to detect a 7% change in AIx. Thus, a sample size of 20 subjects was estimated as efficient to demonstrate a 7% change in AIx (alpha = 0.05 and beta = 0.20; two-tailed test) as described previously [17].

Experimental protocol

We applied a double-blind, crossover study design, consisting of 3 study days. On each study day, subjects were instructed to attend the Vascular Laboratory of Alexandra Hospital, Athens, Greece, after a 12-h fast and abstinence from smoking and drinking alcohol or beverages containing caffeine. On the first day, an initial, baseline assessment of vessel haemodynamics took place. Afterwards, subjects were asked to smoke a regular cigarette (with 12 mg tar and 0.9 mg nicotine) and the same measurements were repeated 30, 60 and 90 min following completion of smoking. On the second and on the third study days, an identical set of measurements took place, but the volunteers were asked to smoke the same type of cigarette and simultaneously to drink either a 250 ml glass of red wine, or a 250 ml glass of de-alcoholized red wine. Before either smoking or smoking and drinking each of the two types of red wine, subjects also consumed one slice of white bread (30 g) and 30 g of cottage cheese (4% fat). This procedure lasted 10 min (2–3 min meal consumption and 7–8 min wine ingestion and smoking). Before each measurement subjects remained at rest for about 20 min, in order to normalize their heart rate and blood pressure. All participants were encouraged not to change their diet during the study and 24-h recalls were reviewed to assure dietary compliance.

Wine preparation

De-alcoholized red wine ($< 1\%$ ethanol) was prepared by lyophilization of a regular red wine (12% ethanol, Rapsani, Tsantalis, Greece) and all methods used for the preparation of de-alcoholized red wine and quality control of both types of red wine have been described previously [6]. These procedures showed that the two types of wine used for the experiment were identical in their type and content of antioxidants and their only difference was their alcohol content (12% versus $< 1\%$), which could not be recognized by the volunteers.

Arterial stiffness, wave reflections and central pressures

Indices of wave reflections and arterial stiffness were determined non-invasively using radial artery applanation tonometry and pulse wave analysis [18,19]. The method has been described in detail previously [3,6]. In brief, tonometry of the radial artery was obtained by using a high-fidelity strain-gauge transducer placed on the tip of a pencil-type tonometer (Millar Instruments Inc., Houston, Texas, USA). Peripheral pressure waveforms were transformed by using generalized transfer functions providing the respective aortic pressure waveforms. Analysis of the derived aortic pressure waveforms was realized by the Sphygmocor System (ATCOR Medical, Sydney, Australia).

The augmentation index (AIx) was used to characterize wave reflections. AIx is calculated as the ratio of the augmentation pressure (induced by the reflected waves) to the aortic pulse pressure. Applanation tonometry and pulse wave analysis have been described in detail and validated previously [3,20]. Since AIx is influenced by heart rate [21], which is likely to differ in each patient and might be altered after consumption of red wine, an index normalized for a heart rate of 75 bpm (AI@75) was also used, as proposed previously [21].

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Pulse wave velocity, which characterizes arterial stiffness, was assessed indirectly by the arrival time of reflected waves at the aorta, which represents the time needed for pressure waves to travel from the central to peripheral arterial sites and return back to the aorta due to wave reflections. Timing of wave reflections is directly related to pulse wave velocity and it has been proposed as a more direct indicator of arterial stiffness than AIx [21].

Statistics

Analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to evaluate changes, following all three interventions. A further ANOVA design with 2 interventions × 4 time periods (baseline, 30, 60, 90 min post-consumption) was applied to assess the comparative effects of the interventions on the measured variables. Multiple comparisons were performed by Bonferroni-corrected Student's *t*-test. A two-tailed, paired *t*-test was applied for the evaluation of differences of baseline conditions among the three study sessions. All variables were tested for homogeneity of variance and normal distribution, before any statistical analysis was applied. All data are expressed as mean ± SD unless otherwise stated, and a value of $P < 0.05$ was regarded as statistically significant. All statistical analyses were performed using statistical software SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

All subjects completed the study without any dissatisfaction and no acute alcohol or smoking-related problems.

Baseline measurements of heart rate, reflection time, AIx, peripheral and central (aortic) systolic, diastolic and pulse pressure were not statistically different among the three sessions of the study (Table 1).

Smoking one cigarette caused a significant overall increase in peripheral systolic blood pressure ($P = 0.024$). A maximal increase by approximately 4.7 mmHg was observed at 30 min. On the other hand, smoking and drinking either regular or de-alcoholized red wine had no significant effect on blood pressure.

Smoking one cigarette caused no overall effect on AIx. A trend to decrease reflection time after smoking one cigarette was observed, without reaching statistical significance ($P = 0.062$). Smoking one cigarette and drinking de-alcoholized red wine significantly reduced AIx ($P < 0.001$), and this reduction was significant at 30 min ($P = 0.03$) and 60 min ($P = 0.021$) compared to baseline values. Similarly, smoking and drinking regular red wine also reduced AIx ($P < 0.001$). In this session AIx was significantly decreased at 60 min ($P = 0.002$) and 90 min ($P < 0.001$) compared to baseline values.

Table 1 Haemodynamic characteristics at baseline and at 30, 60 and 90 min after smoking, or smoking and drinking either type of red wine

	Baseline	30 min	60 min	90 min
Smoking				
Aortic AIx (%)	6.5 ± 12.5	5.5 ± 14.0	5.5 ± 11.8	6.2 ± 12.7
Reflection time (ms)	156.8 ± 18.7	151.1 ± 18.9	155.8 ± 16.8	153.1 ± 14.0
Peripheral SBP (mmHg)	106.5 ± 13.2	111.2 ± 14.4*	107.1 ± 13.8	107.3 ± 13.8
Peripheral DBP (mmHg)	73.2 ± 13.4	71.9 ± 13.0	68.9 ± 11.7	71.3 ± 11.4
Peripheral PP (mmHg)	33.3 ± 8.2	39.2 ± 10.9	38.2 ± 6.9	36.0 ± 6.5
Central SBP (mmHg)	95.9 ± 13.1	97.9 ± 13.9	94.3 ± 12.9	95.5 ± 13.5
Central DBP (mmHg)	73.7 ± 13.3	72.7 ± 13.2	69.8 ± 11.7	72.2 ± 11.6
Central PP (mmHg)	22.3 ± 7.1	25.2 ± 8.5	24.4 ± 4.8	23.3 ± 5.8
Heart rate (bpm)	68.2 ± 8.7	72.8 ± 7.9*	69.4 ± 10.3	68.2 ± 8.1
Smoking + de-alcoholized red wine				
Aortic AIx (%)	10.4 ± 11.6	0.5 ± 10.5*	1.5 ± 9.3†	5.5 ± 9.8
Reflection time (ms)	157.3 ± 18.9	154.4 ± 15.9	152.4 ± 16.4	150.6 ± 12.9
Peripheral SBP (mmHg)	103.9 ± 14.9	104.4 ± 14.2	102.9 ± 16.4	103.1 ± 12.9
Peripheral DBP (mmHg)	68.5 ± 10.7	66.6 ± 12.1	61.8 ± 13.1	63.9 ± 10.9
Peripheral PP (mmHg)	35.4 ± 8.4	37.8 ± 9.3	41.2 ± 8.2	39.2 ± 6.9
Central SBP (mmHg)	92.9 ± 13.2	90.3 ± 13.6	87.5 ± 14.6	88.7 ± 11.0
Central DBP (mmHg)	69.3 ± 10.8	67.4 ± 12.1	62.7 ± 13.1	64.8 ± 10.9
Central PP (mmHg)	23.6 ± 5.4	22.9 ± 5.7	24.8 ± 4.1	23.9 ± 3.4
Heart rate (bpm)	69.8 ± 10.5	71.8 ± 8.8	71.5 ± 9.7	71.9 ± 9.4
Smoking + regular red wine				
Aortic AIx (%)	6.5 ± 11.8	1.8 ± 12.3	−1.5 ± 11.1*	−4.2 ± 12.5*
Reflection time (ms)	156.7 ± 16.4	156.7 ± 17.6	157.8 ± 20.4	159.1 ± 19.2
Peripheral SBP (mmHg)	105.2 ± 11.8	104.2 ± 15.6	105.5 ± 13.2	101.9 ± 13.8
Peripheral DBP (mmHg)	69.4 ± 9.5	69.5 ± 12.3	68.3 ± 11.0	68.5 ± 11.2
Peripheral PP (mmHg)	35.7 ± 6.6	34.6 ± 10.7	37.2 ± 7.0	33.4 ± 7.4
Central SBP (mmHg)	94.2 ± 11.4	91.7 ± 13.5	91.5 ± 12.4	89.3 ± 13.0
Central DBP (mmHg)	70.2 ± 9.6	70.3 ± 12.3	69.1 ± 11.4	69.1 ± 11.3
Central PP (mmHg)	23.9 ± 6.1	21.5 ± 6.7	22.4 ± 5.3	20.2 ± 5.0
Heart rate (bpm)	68.1 ± 9.2	74.5 ± 9.0	72.2 ± 9.0	71.9 ± 9.9

AIx, augmentation index adjusted to heart rate 75 bmp; SBP, DBP, PP, systolic, diastolic and pulse pressure, respectively. *$P < 0.005$, †$P < 0.05$ significance level of difference from baseline.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

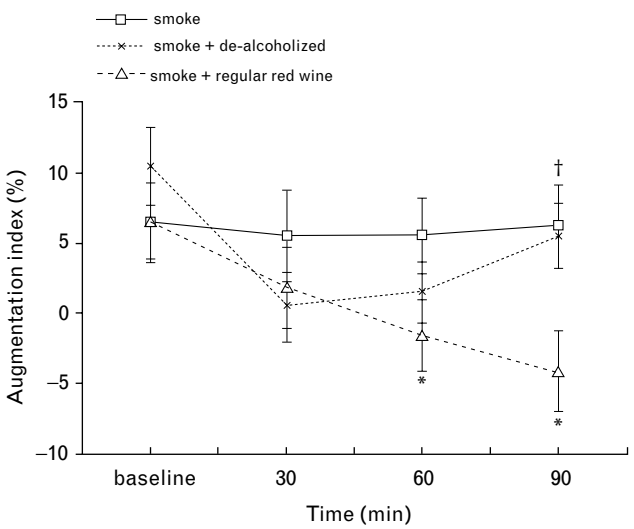
AIx was significantly reduced after smoking and de-alcoholized red wine consumption compared to the respective response after smoking alone ($P = 0.018$). Also, AIx was significantly decreased after smoking and regular red wine consumption compared to single smoking ($P = 0.002$). Finally, the reduction of AIx after red wine consumption was significantly greater than the respective reduction after de-alcoholized red wine ($P = 0.004$) (Fig. 1).

Discussion

In this study, a significant increase in peripheral systolic blood pressure was observed 30 min after smoking one cigarette, which was completely counterbalanced by both regular and de-alcoholized red wine. In addition, there was no effect of smoking on wave reflections after a period of 30, 60 or 90 min, but both regular and de-alcoholized red wine caused a significant decrease in wave reflections, denoting an immediate improvement in vessel function in young smokers. These novel findings indicate a possible favourable effect of the antioxidants in red wine on haemodynamics in these subjects, which is in accordance with previous findings in patients with CAD [6].

Smoking one cigarette caused a significant increase in peripheral systolic blood pressure, which lasted at least 30 min after smoking. This finding indicates an unfavourable acute effect of smoking on blood pressure, which has already been described [7–9]. In the present study the smoking-induced effect on blood pressure was counterbalanced by the consumption of either type of red wine (with or without alcohol), as simultaneous smoking and drinking either type of red wine caused no significant alteration in peripheral pressures. This observation denotes that the antioxidant substances in red wine have a remarkable beneficial depressor effect and that they are effective enough to diminish the acute harmful effects of smoking on blood pressure in young smokers. A possible explanation for these observations might be the vasodilation that can be induced by red wine's constituents, with a possible reduction in peripheral resistance, resulting in a reduction of the already increased systolic blood pressure due to smoking. It has already been shown by in-vitro studies that alcohol and the antioxidants in red wine may enhance nitric oxide (NO) production [22] and inhibit endothelin-1 synthesis [23], inducing vasodilation. In addition, in-vivo studies have indicated a significant vasodilation, possibly through increased production of NO after regular or de-alcoholized red wine consumption [12,24,25].

Fig. 1



Acute effect of smoking or smoking and drinking either type of red wine on augmentation index (normalized for a heart rate of 75 bpm). Bars represent standard error of mean values. * Indicates significant difference ($P < 0.05$) from the 'smoking' session; † indicates significant difference ($P < 0.001$) between the two types of wine.

Previous studies have shown that acute smoking causes significant increases in both arterial stiffness and wave reflections [7–10]. These reported unfavourable effects begin 5 min after smoking and last for up to 2 h, depending on the amount of cigarettes smoked and the amount of nicotine contained in the cigarettes or cigars used [9,26,27]. In this study the type of cigarette used contained 0.9 mg of nicotine, a lower amount than that used in previous studies reporting a significant increase in AIx [7,10]. Furthermore, the first measurement in our study was performed 30 min after the end of smoking. It is possible that there was an effect of smoking on AIx and PWV, which lasted less than 30 min, as previously reported [7,10,26,27]. Thus, it is likely that the effect of smoking was abolished 30 min later. Nevertheless, our initial aim was to investigate the simultaneous consumption of red wine and smoking one cigarette, trying to simulate a common habit of smokers (drinking and smoking at the same time).

Acute ingestion of either regular or de-alcoholized red wine, together with smoking, caused a significant reduction in wave reflections, as both types of wine decreased AIx. Taking into account that acute smoking, at the measured time points, had no effect on this variable, it could be hypothesized that the observed results can be attributed solely to the beverages used during each session.

We observed that both beverages caused a significant reduction in AIx in smokers, which reveals that antioxidants contained in red wine seem to have a beneficial effect on wave reflection, regardless of alcohol content. This observation is in accordance with previous findings in patients with CAD, where the antioxidant substances in red wine improved AIx in the postprandial phase [6].

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

However, in the present study, regular red wine, which contains alcohol together with antioxidants, offers an additional significant beneficial reduction in wave reflections. Therefore, it could be suggested that alcohol itself has a favourable effect on wave reflections, which has already been described by Mahmud and Feely [5] in a group of healthy non-smokers. These observations concerning the acute effects of both alcohol and antioxidants could be explained by induction of NO synthesis and inhibition of endothelin-1 production [12,22–25]. NO, as well as endothelin-1, has been related directly not only to vasodilation but also to wave reflections and arterial stiffness [28], rendering NO and endothelin-1 synthesis as major mechanisms involved in AIx changes. It is suggested that the constituents of red wine (namely alcohol and antioxidant substances) acutely induce vasodilation, which probably reduces peripheral resistance and subsequently reduces the intensity of reflected waves, resulting in a decrease in augmentation index.

Increasing evidence suggests that wave reflections are related independently to increased risk for severe short and long-term cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary interventions [29]; they are independent predictors of all-cause and cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease [30] and also strong, independent risk markers for premature coronary artery disease [4]. Consequently, any nutritional 'intervention', such as red wine and its constituents, with potential lowering effects on wave reflections receives great attention and deserves further investigation aiming at a possible reduction in cardiovascular risk.

Finally, it should be acknowledged that a larger sample size might render the change of AIx after cigarette smoking statistically significant. Additionally, it should be mentioned that our aim to investigate smoking and drinking red wine at the same time in order to simulate a very common habit of the majority of smokers might obscure some of their effects. This is because smoking acts on haemodynamics for about 30 min, while red wine begins to act almost 30 min post-consumption and lasts for more than 90 min. However, the design of the study reflects real life, as most smokers light up their first cigarette at the beginning of a drink and they usually do not wait until they drink a whole glass of red wine before they smoke. For the same reason, the study design lasted 90 min postprandially, and it was not extended for longer in order to investigate solely the effects of wine on haemodynamics.

In conclusion, the results of the present study provide the first direct evidence that antioxidants in red wine counterbalanced acute, smoke-induced, unfavourable effects on peripheral systolic blood pressure, denoting that red wine contains important vasoactive substances, powerful enough to diminish the detrimental effects of acute smoking. In addition, red wine and its constituents, namely alcohol and antioxidants, seem to have an acute beneficial effect on wave reflections in uncomplicated habitual smokers. However, it has not yet been explored prospectively whether long-term moderate wine consumption has a beneficial effect of haemodynamics and vessel function, which is a very important matter for further investigation, as red wine consumption is a very usual habit, especially among smokers. Thus, more evidence is needed before recommending specific nutritional modifications regarding red wine and alcohol use as part of a first-line therapeutic and preventive approach aiming at lowering arterial stiffness and wave reflections.

Acknowledgements

We would like to thank Tsantalis Ltd, Greece for the provision of red wine.

References

1 Buemann B, Dyerberg J, Astrup A. Alcohol drinking and cardiac risk. *Nutr Res Rev* 2002; **15**:91–121.
2 Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *JAMA* 1998; **279**:119–124.
3 O'Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ. Pulse wave analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2001; **51**:507–522.
4 Weber T, Auer J, O'Rourke MF. Arterial stiffness, wave reflections and the risk of coronary artery disease. *Circulation* 2004; **109**:184–189.
5 Mahmud A, Feely J. Divergent effect of acute and chronic alcohol on arterial stiffness. *Am J Hypertens* 2002; **15**:240–243.
6 Karatzi K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG, Aznaouridis K, Katsichti P, *et al.* Red wine acutely induces favourable effects on wave reflections and central pressures in coronary artery disease patients. *Am J Hypertens* 2005; **18**:1161–1167.
7 Faila M, Grappiolo A, Carugo S, Calchera I, Giannattasio C, Mancia G. Effects of cigarette smoking on carotid and radial artery distensibility. *J Hypertens* 1997; **15**:1659–1664.
8 Mahmud A, Feely J. Effects of passive smoking on blood pressure and aortic pressure waveform in healthy young adults – influence of gender. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **57**:37–43.
9 Vlachopoulos C, Alexopoulos N, Panagiotakos D, O'Rourke M, Stefanadis C. Cigar smoking has an acute detrimental effect on arterial stiffness. *Am J Hypertens* 2004; **17**:299–303.
10 Mahmud A, Feely J. Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. *Hypertension* 2003; **41**:183–187.
11 Katayama Y, Shige H, Yamamoto A, Hirata F, Yasuda H. Oral vitamin C ameliorates smoking-induced arterial wall stiffness in healthy volunteers. *J Atheroscler Thromb* 2004; **11**:354–357.
12 Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, *et al.* Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy non-smokers. *Am Heart J* 2004; **147**:e5.
13 Wilkinson I, Qasem A, McEniery C, Webb D, Avolio A, Cockecroft J. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 2002; **105**:213–217.
14 Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR, *et al.* Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens* 1998; **16**:2079–2084.
15 Siebenhofer A, Kemp C, Sutton A, Williams B. The reproducibility of central aortic blood pressure measurements in healthy subjects using applanation tonometry and sphygmocardiography. *J Hum Hypertens* 1999; **13**:625–629.
16 Covic A, Haydar AA, Bhamra-Ariza P, Gusbeth-Tatomir P, Goldsmith DJ. Aortic pulse wave velocity and arterial wave reflections predict the extent and severity of coronary artery disease in chronic kidney disease patients. *J Nephrol* 2005; **18**:388–396.
17 Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations: A review and computer program. *Control Clin Trials* 1990; **11**:116–128.
18 Kelly R, Hayward C, Ganis J, Daley J, Avolio A, O'Rourke M. Noninvasive registration of the arterial pressure pulse waveform using high fidelity applanation tonometry. *J Vasc Med Biol* 1989; **1**:142–149.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

19 Karamanoglu M, O'Rourke MK, Avolio AP, Kelly RP. An analysis of the relationship between central aortic and peripheral upper limb pressure waves in man. *Eur Heart J* 1993; **14**:160–167.
20 Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension* 2001; **38**:932–937.
21 Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft J, Newby D, Webb D. The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. *J Physiol* 2000; **525**:263–270.
22 Leikert J, Rathel T, Wohlfart P. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002; **106**:1614–1617.
23 Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci* 2002; **103**:72S–75S.
24 Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, *et al.* Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2004; **15**:485–490.
25 Hashimoto M, Kim S, Eto M, Iijima K, Ako J, Yoshizumi M, *et al.* Effect of acute intake of red wine on flow mediated vasodilation of the brachial artery. *Am J Cardiol* 2001; **88**:1457–1459.
26 Giannattasio C, Mangoni A, Stella M, Carugo S, Grassi G, Mancia G. Acute effects of smoking on radial artery compliance in humans. *J Hypertens* 1994; **12**:691–696.
27 Kim J, Park C, Hong S, Park S, Rha S, Seo H, *et al.* Acute and chronic effects of cigarette smoking on arterial stiffness. *Blood Press* 2005; **14**:80–85.
28 McEniery C, Qasem A, Schmitt M, Avolio A, Cockcroft J, Wilkinson I. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**:1975–1981.
29 Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Lamm G, *et al.* Increased arterial wave reflections predict severe cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 2005 [medline, ahead of print].
30 London GM, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME. Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension* 2001; **38**:434–438.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Postprandial improvement of endothelial function by red wine and olive oil antioxidants: A synergistic effect of components of the Mediterranean Diet.

Kalliopi Karatzi*, Christos Papamichael, Emmanouil Karatzis, Theodore G. Papaioannou, Paraskevi Th. Voidonikola, Giorgia D. Vamvakou, John Lekakis, Antonis Zampelas[†].

*Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece.

Vascular Laboratory, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra University Hospital, Athens, Greece.

†Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens

Corresponding and request of reprints author:

Antonis Zampelas, PhD

Associate Professor in Human Nutrition

Department of Food Science and Technology

Agricultural University of Athens

Vironos 33, Athens

15122, Greece

Tel: + 30 210 6148066

Fax: + 30 210 9627184

E-mail: azampelas@hua.gr

Short title: Red wine and olive oil effects on FMD

Key words: olive oil, wine, Mediterranean Diet, FMD

Abstract

Consumption of olive oil may cause postprandial impairment of endothelial function, while acute ingestion of red wine seems to improve it. The purpose of the present study was to investigate the combined postprandial effects of two essential components of the Mediterranean diet, red wine and olive oil, on endothelial function. Fifteen healthy subjects were enrolled in the study which was comprised of 4 study days. Subjects were asked to consume a standard meal at each study day containing 50gr of olive oil and 250 ml of wine. Two types of wine (red and white; rich and poor in antioxidants respectively) and two types of olive oil (green and refined; rich and poor in antioxidants respectively) were used in a 2*2 design. Endothelium dependent, flow mediated dilatation (FMD) was measured with a B-Mode ultrasound device at fast and 1, 2 and 3 hours postprandially. Combined consumption of red wine and green olive oil (both rich in antioxidants) improved FMD postprandially (p=0.002, ANOVA for repeated measures), which remained significant 1 hour (p=0.002) and 2 hours (0.037) following the meal compared to fasting levels. No other combination of wine and olive oil caused any significant alteration on FMD. Acute consumption of both red wine and green olive oil, rich in antioxidants, led to an improvement in the postprandial endothelial function in healthy subjects. These findings provide an additional favorable effect of components of the Mediterranean diet and of their antioxidant substances on endothelial function, at the postprandial state.

Introduction

Olive oil and red wine are two essential components of the Mediterranean diet, which has been recognized as a recommended diet for the reduction of the risk of cardiovascular diseases [Kok et al, 2004]. Several studies have shown an inverse relation between the Mediterranean diet and cardiovascular risk [de Longeril et al 1996 and 1999, Trichopoulou et al 2003 and 2005, Burr et al 1989] but only a few reported a beneficial long term effect on endothelial function in patients with hypercholesterolemia or metabolic syndrome [Fuentes et al 2001, Esposito et al 2004]. Since endothelial function is an early indication of atherosclerosis and vessel damage [Quyyumi et al 2003], its interaction with components of the Mediterranean diet is of interest.

The possible effects of long – term consumption of olive oil on endothelial function are not yet fully elucidated [Cuevas et al 2004]. However, there are some studies which looked at its acute postprandial effects and showed that consumption of olive oil as part of a meal causes endothelial dysfunction [Ong et al 1999, Vogel et al 2000]. This effect could be associated with increased oxidative stress in the postprandial state, but it was also indicated that administration of antioxidant vitamins C and E together with olive oil reversed this endothelial dysfunction [Vogel et al, 2000].

On the other hand, data concerning consumption of red wine are unequivocal, as its moderate long – term consumption and its constituents improves endothelial function both in healthy subjects and patients with coronary artery disease (CAD) [Cuevas et al 2000, Stein et al 1999]. Additionally, red wine is found to improve endothelial function expressed as FMD (flow mediated dilatation) and vascular wall properties in the acute phase following its ingestion [Agewall et al 2000, Karatzi et al

2004 and 2005] in healthy and CAD patients and this effect could be attributed mainly to its antioxidant substances.

Olive oil and red wine, despite their opposite postprandial effects, are two major constituents of the Mediterranean diet and their combination in one meal is a very usual habit. To our knowledge, only one study has investigated this combination on endothelial activation *in vitro* [Carluccio et al 2003], concluding that the antioxidants found in olive oil and red wine offer beneficial vascular effects. There are no in-vivo data regarding the combined effect of olive oil and red wine on vascular endothelium. Hence, the purpose of the present study was to investigate the combined effects of olive oil and red wine consumption on endothelial function in healthy subjects.

Methods

Subjects

We studied fifteen healthy volunteers (7 males, 8 females) with mean age 29.5 ± 1.5 years (mean ± SE) and body mass index (BMI) 23 ± 0.7 kg/m^2. All subjects were non – smokers, they had normal blood pressure (<140/90 mmHg), cholesterol levels <240mg/dl, no history of diabetes mellitus, no family history of coronary artery disease (CAD) and absence of obesity and liver or endocrine diseases. Volunteers using antioxidant vitamins or any other medication (including contraceptives by female volunteers), dieting at the time of the study and having daily alcohol consumption more than the recommended (20-30 gr alcohol/day), were excluded from the study. The study was approved by the local scientific committee and all subjects gave their written informed consent before entering the study.

Experimental protocol

The study protocol was of a double – blind, 2*2 design, which was comprised of 4 study days. At each study day, subjects were instructed to attend the Vascular Laboratory of Alexandra Hospital, Athens, Greece, after a 12 hour fast and after 24 hours absence of alcohol and caffeinated beverages and an initial ultrasound assessment took place at fasting. Afterwards, a light meal was consumed by each subject for no more than 15 minutes. Thereafter, ultrasound measurements were repeated 1, 2 and 3 hours following completion of the meal. The meal used for the study was a vegetable soup (containing either 50 gr of refined olive oil, or 50 gr of green olive oil), 2 slices of white bread and 250 ml of either red or white wine (each one containing 12% ethanol). During the 4 study days, volunteers consumed the standard meals in all possible combinations of the two types or wine and the two types of olive oil (red wine and olive oil, red wine and green olive oil, white wine and olive oil, white wine and green olive oil) in a random order. All participants were encouraged to refrain from exercise and not to change their diet during the study. Additionally, they were asked to consume the same menu the day before each study day. Twenty four hour recalls were reviewed to assure compliance to dietary instructions.

Wine and olive oil analysis

The concentration of total antioxidants in experiment's wines and the two types of olive oil was estimated by the Folin – Ciocalteau procedure [Singleton et al 1965]. These analyses revealed that red wine contained 650 μg/ 100 ml of caffeic acid equivalents, while white wine contained 130 μg/ 100 ml of caffeic acid equivalents.

Additionally, green olive oil was found to contain 236 ppm of caffeic acid and refined olive oil 20 ppm of caffeic acid equivalents.

Flow mediated dilatation measurement

A B-Mode high-resolution ultrasound imaging (Acuson 128xp California, USA) was used for assessment of FMD, which is a previously described method to assess endothelial function [Corretti et al 2002]. All measurements were performed in a quiet room with controlled temperature at 20-25^{0}C, at supine position and after a 10 minutes resting period. A 7.0 MHz linear array transducer was used to obtain measurements from the right brachial artery in a specific anatomic point. The measurement of the artery diameter was performed by two independent observers who were unaware of the study phase, at end-diastole, by using electronic calipers and this procedure was guided by electrocardiographic assessment. After the initial measurement at resting conditions, a cuff fitted 8 cm distal to the brachial artery and near the wrist was inflated at 250-300 mmHg, altering arterial flow for 4.5 minutes. Then it was deflated, increasing arterial flow (reactive hyperemia).

Afterwards, there was a continuous scan for 90 sec after cuff deflation, and vessel's maximal diameter at the same point with resting measurement, was defined again (diameter during reactive hyperemia). This procedure was repeated 1, 2 and 3 hours after each standard meal. FMD is defined as the percent change of artery's diameter (endothelial dependent vasodilation) and hyperemia refers to the percent increase of flow, from flow at rest (at each time point, of the study). The inter and intra observer variability for brachial diameter measurements in our laboratory is 0.1 ± 0.12 and 0.08 ± 0.19 mm respectively, while FMD variability measured on 2 different days was 1.1 ± 1%.

Statistics

All continuous variables were tested for normal distribution by one-sample Kolmogorov-Smirnov test and normal probability (Q-Q) plots. At each study session, variables measured at baseline, 1, 2 and 3 hours were evaluated by analysis of variance for repeated measures (ANOVA) and Bonferroni corrected Student t-test for multiple comparisons. A further ANOVA design with 2 beverages x 4 time periods (fast, 1, 2, 3 hours post-consumption) was applied in order to perform pair-wise comparisons (e.g. FMD response after red wine and olive oil vs FMD response after white wine and olive oil consumption). Comparisons of baseline values between sessions were performed by non-parametric Wilcoxon test. Data are expressed as mean ± standard error (SE), unless otherwise stated. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were made by using SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

A total sample size of approximately 15 subjects was estimated to be appropriate to detect a difference in FMD by 2% between paired samples, with a Type I error probability for two sided test equal to 0.05 and a power of 80% [Dupont et al 1999].

Results

Baseline values of FMD, vessel diameter, heart rate and flow at rest did not differ between sessions. Their values at fast and during the postprandial period are shown in Table 1.

FMD increased significantly after consumption or red wine and green olive oil (both rich in antioxidants) ($p=0.002$, ANOVA for repeated measures), it remained

significant for the first (p=0.002) and the second hour (0.037) postprandially and it returned to baseline levels at the third hour (p=n.s.).

There was no alteration in FMD following consumption of any other combination of wine and olive oil. The increase in FMD after red wine and green olive oil consumption was significantly greater than the respective response after red wine and olive oil (p=0.014), white wine and green olive oil (p=0.004) and white wine and olive oil (p<0.001) consumption respectively (Figure 1).

FMD response did not differ significantly between the red wine - olive oil, white wine - olive oil and white wine - green olive oil sessions.

Discussion

The present study investigated for the first time the postprandial effects of red wine and olive oil on endothelial function demonstrating that combination of their antioxidants causes a significant improvement on FMD in the immediate postprandial state. Until now there are numerous studies investigating the mechanisms through which components of the Mediterranean diet have cardioprotective effects [deLongeril 1996 and 1999]. Unfortunately, data about the postprandial effects of this diet on endothelial function, which is an early indicator of vessel damage and cardiovascular disease, are limited. Therefore, it was very important to investigate the possible postprandial effects of two essential components of this diet, red wine and olive oil on endothelium and give some additional information on their cardioprotective effects.

The types of wine and olive oil we used in the present study where carefully collected in order to enable the investigation of the effects of their antioxidants' and other constituents' effects. Our results showed that antioxidant substances found in

223 red wine and green olive oil when consumed together cause a significant postprandial
224 increase in FMD. It is noteworthy that no other combination of wine and olive oil
225 increased FMD, which indicates that antioxidants of red wine and green olive oil
226 when used separately are not capable of this beneficial effect on endothelial function.
227 Additionally it couldn't be supported that other constituents of wine or olive oil (i.e
228 alcohol, oleic acid) have a beneficial contribution to the increase in FMD, as only the
229 combination of red wine and green olive oil was found to be effective.

230 The method we used (FMD) is a non – invasive, easy to perform method to
231 assess endothelial function, it is closely related to coronary endothelial function
232 [Celermajer et al 1994] and it has been related with several established risk factors
233 [Anderson et al 1995]. Taken into account the characteristic that FMD is an NO –
234 mediated method [Joannides et al 1995] it could be assumed that the observed
235 increase in FMD is a consequence of induced NO production and bioavailability by
236 wine and oil's antioxidants. As far as red wine effects are concerned, there are in vitro
237 studies indicating that in the acute phase, red wine's antioxidant substances cause
238 vasorelaxation through an enhanced production of NO, as well as an increased
239 protection of NO from damage by free radicals [Freedman et al 2001, Leikert et al
240 2002, Andriambeloson et al 1997]. Moreover, in vivo studies in healthy individuals
241 and patients with CAD suggest that ingestion of red wine's antioxidants improve
242 FMD, possibly through NO secretion [Agewall et al 2000, Karatzi et al 2004,
243 Hashimoto et al 2001] and they are capable of even counteracting smoking – induced
244 acute endothelial dysfunction [Papamichael et al 2004]. Additionally, antioxidants
245 found in olive oil have been tested in in-vitro studies in both human and rat aortic
246 rings [Benkhalti et al 2003, Rodriguez – Rodriguez et al 2004]. These studies showed
247 that olive oil's antioxidant compounds induce NO production in-vitro, which is in

248 accordance to our hypothesis that red wine and green olive oil could provoke NO
249 secretion explaining the observed increase in FMD.
250 It is noteworthy that all combinations of wine (red or white) with olive oil
251 caused no alteration on FMD postprandially. Investigation of the postprandial effect
252 of olive oil on endothelial function from a previous study, showed that 50 gr of olive
253 oil caused a significant decrease on FMD, which lasted for 3 hours post –
254 consumption, possibly through induced hypertriglyceridemia and increased oxidative
255 stress [Vogel et al 2000]. This phenomenon was reversed by addition of antioxidant
256 vitamins (C and E) from balsamic vinegar and salad. In our study, it was shown that
257 antioxidants in red wine and green olive oil not only prevented the possible
258 deterioration of FMD, but they induced an improvement of endothelial function.
259 Moreover, analysis of the two sessions using regular olive oil with either red or white
260 wine (red wine – olive oil, white wine – olive oil), proved that both types of wine
261 counterbalanced the expected decrease on FMD. In this study we used the same
262 amount of olive oil with the one used by Vogel and colleagues and our findings
263 revealed that possibly ethanol was responsible for this phenomenon. It is already
264 shown that ethanol acts as a vasodilator, since it has been indicated that it modulates
265 NO synthase and promotes NO secretion [Venkov et al 1999]. Therefore, it is possible
266 that alcohol contained in both red and white wine (12%) induced vasorelaxation,
267 which reversed the hypothesized decrease in FMD from olive oil consumption.
268 In conclusion, the combined postprandial effects of two components of the
269 Mediterranean diet were investigated for the first time, on endothelial function of
270 healthy individuals. Red wine and olive oil antioxidants, when consumed together,
271 improve FMD and this effect lasts even 2 hours postprandially. These findings render
272 an additional cardioprotective effect of the antioxidants contained in the

Mediterranean diet, which is characterized by moderate daily consumption of red wine and regular use of olive oil.

Acknowledgements

We would like to thank Tsantalis Ltd, Greece for the provision of red and white wine and Unilever Greece for the provision of regular and green olive oil.

References

1. Kok FJ, Kromhout D (2004). Atherosclerosis-epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. Eur J Clin Nutr 43 (Suppl 1): I – 5.
2. de Longeril M, Salen P, Martin J-L (1996). Effect of a Mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. Insights into the cardioprotective effect of certain nutrients. J Am Coll Cardiol 28: 1103 – 1108.
3. de Longeril M, Salem P, Martin J-L, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final report of the Lyon Heart Study. Circulation 99: 779 – 785.
4. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. N Engl J Med 348: 2599-608.
5. Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D (2005). Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. Arch Intern Med 165: 929-35.
6. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF (1989). Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction. Diet and Reinfarction Trial (DART). Lancet 334; 757 – 761.
7. Fuentes F, Lopez – Miranda J, Sanchez E et al (2001). Mediterranean and low – fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. Ann Intern Med 134: 1115 – 1119.
8. Esposito K, Marfella R, Giotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D (2004). Effect of a Mediterranean –

344 style diet on endothelial function and markers of vascular inflammation in the
345 metabolic syndrome: a randomized trial. JAMA 292: 1490 – 1492.
346 9. Quyyumi A (2003). Prognostic value of endothelial function. Am J Cardiol 91
347 (suppl): 19H – 24H.
348 10. Cuevas AM, Germain AM (2004). Diet and Endothelial Function. Biol Res 37:
349 225-230.
350 11. Ong PJL, Dean TS, Hayward CS, Della Monica PL, Sanders T, Collins P (1999).
351 Effect of fat and carbohydrate consumption on endothelial function. Lancet 354:
352 2134 – 2138.
353 12. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD (2000). The postprandial effect of
354 components of the Mediterranean diet on endothelial function. J Am Coll Cardiol
355 36: 1455 – 60.
356 13. Cuevas A, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P,
357 Perez D, Germain A, Leighton F (2000). A high fat diet induces and red wine
358 counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. Lipids 35: 143-148.
359 14. Stein J, Keevil J, Wiebe D, Aeschlimann S, Folts J (1999). Purple grape juice
360 improves endothelial function and reduces the succeptibility of LDL cholesterol to
361 oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation 100: 1050-1055.
362 15. Agewall S, Wright S, Doughty R, Whalley G, Duxbury M, Sharpe N (2000). Does
363 a glass of wine improve endothelial function? Eur Heart J 21: 74-78.
364 16. Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K et al (2004). Constituents of red wine
365 other than alcohol improve endothelial function in patients with CAD. Coron
366 Artery Dis 15: 485 – 490.
367 17. Karatzi K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG., Aznaouridis K,
368 Katsichti P, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M (2005).

369 Red wine acutely induces favourable effects on wave reflections and central
370 pressures in coronary artery disease patients. Am J Hypertens 18 (9): 1161 –
371 1167.
372 18. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA (2003). Olive oil and red wine antioxidant
373 polyphenols inhibit endothelial activation – Antiatherogenic properties of
374 Mediterranean diet phytochemicals. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 622 – 629.
375 19. Singleton V. L. Rossi J. A. Jr (1965). Colorimetry of total phenolics with
376 phosphomolybic – phosphotungstic acid reagents. Am J. Enol. Vitic 16: 144 –
377 158.
378 20. Corretti M (2002). Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-
379 dependent flow-medeated vasodilation of the brachial artery. J Am Coll Cardiol
380 39: 257 – 65.
381 21. Dupont WD, Plummer WD (1990). Power and Sample Size Calculations: A
382 Review and Computer Program. Controlled Clinical Trials 11:116-28.
383 22. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE (1994).
384 Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects
385 relates to coronary risk factors and their interaction. J Am Coll Cardiol 24:1468 –
386 74.
387 23. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD (1995). Close relation of endothelial
388 function in the human coronary and peripheral circulations. J Am Coll Cardiol
389 26:1235-41.
390 24. Joannides R, Haefeli WE (1995). Nitric oxide is responsible for flow-mediated
391 dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. Circulation 91; 1314-19.

392 25. Freedman J, Parker C, Li L, Perlman J, Frei B, Ivanov V, Deak L, Iafrati M, Folts
393 J (2001). Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet
394 function and enhance nitric oxide release. Circulation 103: 2792-2798.
395 26. Leikert J, Rathel T, Wohlfart P (2002). Red wine polyphenols enhance endothelial
396 nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from
397 endothelial cells. Circulation 106: 1614 – 1617.
398 27. Andriambeloson E, Kleschyov A, Muller B, Beretz A, Stoclet J, Andriantsitohaina
399 R (1997). Nitric oxide production and endothelium – dependent vasorelaxation
400 induced by wine polyphenols in rat aorta. Br J Pharmacol 120: 1053 – 1058.
401 28. Hashimoto M, Seungbum K, Masato E et al (2001). Effect of acute intake of red
402 wine on Flow Mediated Vasodilation of the brachial artery. Am J Cardiol 88:
403 1457 – 59.
404 29. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou
405 A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M (2004). Red wine's
406 antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking
407 in healthy non-smokers. Am Heart J 147:e5.
408 30. Benkhalti F, Leggssyer A, Gomez P, Paz E, Lopez – Miranda J, Perez – Jimenez
409 F, Boustani E (2003). Effects of virgin olive oil phenolic compounds on LDL
410 oxidation and vasorelaxarion activity. Therapie 58: 133 – 137.
411 31. Rodriguez – Rodriguez R, Herrera M, Perona J, Ruiz – Gutierrez V (2004).
412 Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids
413 contained in "orujo" oil, on rat aorta. Br J Nutr 92: 635 – 642.
414 32. Venkov C, Myers P, Tanner M, Su M, Vaughan D (1999). Ethanol increases
415 endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase
416 expression. Thromb Haemost 81: 638 – 642.

Table 1. Artery diameter, flow at rest, flow in hyperemia, heart rate and FMD of the four study days at baseline and 1, 2, and 3 hrs post consumption.

	Red wine + Olive oil	**White wine + Olive oil**	**Red wine + Green Olive oil**	**White wine + Green Olive Oil**
Vessel diameter (mm)				
baseline	3.5±0.1	3.5±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1
1 hour	3.8±0.1	3.9±0.1	3.7±0.1	3.7±0.1
2 hours	3.8±0.1	3.7±0.1	3.7±0.1	3.8±0.1
3 hours	3.8±0.1	3.7±0.1	3.8±0.2	3.6±0.1
Within session ANOVA, p-value	0.005	0.004	<0.001	<0.001
Flow at rest (ml/min)				
baseline	123.3±15.6	72.4±9.2	140.4±19.5	104.9±21.5
1 hour	135.5±21.1	95.8±21.7	140.4±18.6	131.8±28.2
2 hours	138.6±18.6	99.8±22.5	107.2±19.0	134.2±41.3
3 hours	123.4±21.7	94.9±16.6	124.3±16.0	86.9±20.8
Within session ANOVA, p-value	0.815	0.602	0.425	0.281
Hyperemia (%)				
baseline	150.1±18.8	280.5±28.1	164.8±31.7	275.7±69.4
1 hour	263.2±97.9	234.3±184.9	136.6±19.5	168.0±31.1
2 hours	133.9±16.0	316.9±70.8	342.0±135.8	243.6±61.8
3 hours	198.8±45.8	250.8±51.7	178.3±23.1	259.6±69.0
Within session ANOVA, p-value	0.306	0.186	0.213	0.576

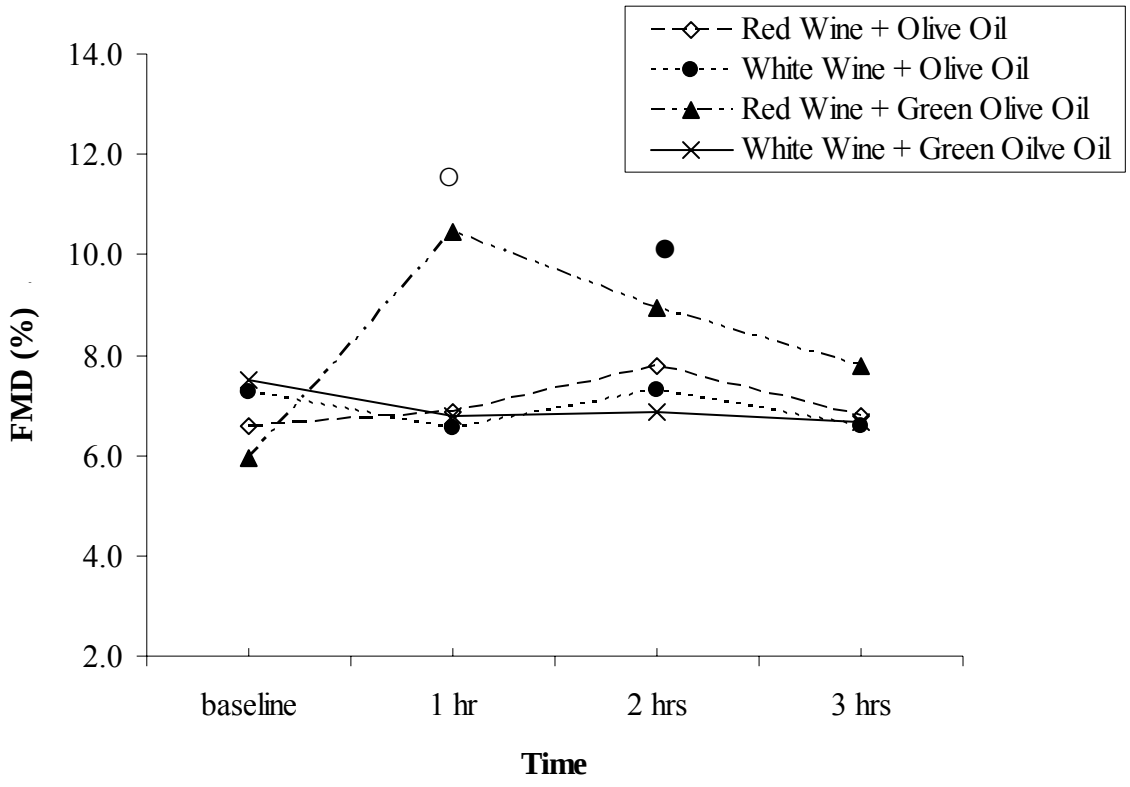
Heart rate (beats/min)				
baseline	68.9±2.7	69.3±3.2	67.0±2.3	71.1±3.3
1 hour	69.4±2.1	70.7±3.0	71.4±2.1	69.5±2.8
2 hours	69.3±1.7	73.2±4.0	72.3±2.5	74.8±3.2
3 hours	70.7±2.2	71.6±3.7	71.9±2.6	71.3±3.1
Within session ANOVA, p-value	0.846	0.646	0.302	0.217
FMD (%)				
baseline	6.6±0.8	7.2±0.7	5.9±0.6	7.5±1.1
1 hour	6.9±1.2	6.5±0.7	10.5±0.9	6.8±0.8
2 hours	7.8±0.8	7.3±0.6	9.0±0.8	6.9±0.7
3 hours	6.8±0.8	6.6±0.8	7.8±1.0	6.7±0.9
Within session ANOVA, p-value	0.789	0.518	0.002	0.887

Values are expressed as mean ± standard error (SE).

Figure legends

Figure 1. Response of flow mediated dilatation (FMD) to the combined consumption of different types of wine and olive oil.

Figure 1



○ and ● indicates significant difference of FMD, 1 and 2 hours respectively after red wine and green olive oil consumption from all the other FMD values at the same times.

Acute beneficial effects of components of the Mediterranean diet on haemodynamics

Christos Papamichael MD[a], Kalliopi Karatzi MSc[b], Theodore G. Papaioannou PhD[a], Emmanouil Karatzis MD[a], Paraskevi Katsichti MD[a], Vasilis Sideris MD[a], Nikolaos Zakopoulos MD[a], Antonis Zampelas PhD[b, c], John Lekakis MD[a].

[a]Vascular Laboratory, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra University Hospital, Athens, Greece.

[b]Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece.

[c]Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens

Corresponding and request of reprints author:

Kalliopi Karatzi MSc

Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece.

10 Delfon str., Glyfada, 16561, Athens, Greece.

Tel: + 30 210 9627184

Fax: + 30 210 9627184

E-mail: popikaratzi@yahoo.com

Running head: Wine and olive oil effects on haemodynamics

Acknowledgements: We would like to thank Tsantalis Ltd, Greece for the provision of red and white wine and Unilever Greece for the provision of regular and green olive oil.

Word count: 2381 words

Abstract

Background Acute consumption of red wine was reported as beneficial for haemodynamics, but there are no data concerning olive oil. We sought to determine the combined postprandial effects of wine and olive oil, two essential components of the Mediterranean diet, on haemodynamics.

Design Fifteen healthy subjects consumed 4 standard meals at different days, containing 50gr of olive oil and 250 ml of wine. Two types of wine; red (R) and white (W) and two types of olive oil; green (G) and refined (O) (rich and poor in antioxidants respectively) were used in all possible combinations (RO, RG, WO, WG). Applanation tonometry and generalized transfer functions were used to estimate aortic pressure waveforms at fast and 1, 2 and 3 hours postprandially, assessed by augmentation index (AIx; %).

Results All meals decreased wave reflections, expressed by a reduction in AIx (RO and RG, $p<0.001$, WO, $p=0.007$ and WG, $p=0.039$). The overall decrease of AIx after RG consumption was significantly greater than the respective response after RO ($p=0.001$), WG ($p=0.021$) and WO consumption ($p=0.023$). Only WO and WG reduced peripheral systolic pressure (WG, $p=0.002$, WO, $p=0.035$). Central and peripheral diastolic and central systolic pressures were diminished after all four combinations of wine and olive oil ($p<0.05$).

Conclusions Wine and olive oil provide beneficial postprandial effects on haemodynamics, which could be attributed to their antioxidant substances and other constituents. These findings reveal an additional beneficial effect of components of the Mediterranean diet on arterial elastic properties and aortic hemodynamics in the postprandial state.

Keywords: Mediterranean diet, wave reflections, arterial stiffness, olive oil, red wine

Introduction

Wine and olive oil are recognized as two very important components of the Mediterranean diet with significant cardioprotective effects [1]. Although blood pressure and recently wave reflections are characterized as important cardiovascular risk factors [2, 3], there is limited knowledge concerning the possible effects of both wine and olive oil on arterial properties and haemodynamics.

Olive oil, as a major part of the Mediterranean diet is found to reduce arterial blood pressure after long term moderate daily consumption [4 – 6], however there are no data about its possible long term effects on arterial stiffness and wave reflections. Additionally, to the best of our knowledge, there are no studies investigating the possible acute effects of olive oil on arterial elastic properties, which is very important lack of scientific research, because a high-fat meal is possible that might affect vessel haemodynamics on the postprandial state, influencing left ventricular function [7, 8]. Therefore, it is possible that olive oil, which is usually recommended as a cardioprotective food, influences wave reflections, arterial stiffness and blood pressure postprandially, but these effects are not yet investigated.

On the other hand, wine and its constituents are slightly more investigated than olive oil, as far as blood pressure and wave reflections are concerned. It is already shown that moderate daily consumption of alcohol (2-3 drinks per day) is associated with lower pulse wave velocity compared with higher daily intake or with complete absence from alcohol [9, 10]. On the contrary, alcohol decreases arterial stiffness in healthy individuals in the acute postprandial state [10]. Recently, it was reported that wave reflections, as well as blood pressure is significantly decreased by antioxidant substances contained in red wine postprandially, in patients with coronary artery disease (CAD) [11].

Combination of red wine and olive oil in a meal is one of the characteristics of the Mediterranean diet and at the same time a very usual habit. Since there are no in vivo studies looking at their postprandial impact on arterial elastic properties and hemodynamics, the aim of the present study was to provide new data on the possible combined effects of wine and olive oil and their constituents on wave reflections and blood pressure of healthy subjects in the postprandial state.

Methods

Subjects

Fifteen (15) healthy volunteers (7 males, 8 females) with mean age 29.5 ± 1.5 years (mean ± SE) and body mass index (BMI) 23 ± 0.7 kg/m^2 were enrolled in the study. All subjects had normal blood pressure (<140/90 mmHg), cholesterol levels <240mg/dl, no family history of coronary artery disease (CAD), no history of diabetes mellitus, they were non – smokers and they had absence of obesity and liver or endocrine diseases. Exclusion criteria were antioxidant vitamins or any other medication supplementation (including contraceptives by female volunteers), dieting at the time of the study and daily alcohol consumption more than the recommended (20-30 gr alcohol/day). The study was approved by the local scientific committee, all study procedures were in accordance with institutional guidelines and all subjects gave their informed consent before entering the study.

Study design

The study protocol was a 4 day – double – blind, cross - over design. At each study day, subjects were instructed to attend the Vascular Laboratory of Alexandra Hospital, Athens, Greece, after 12 hours fast and after 24 hours absence of alcohol

and caffeinated beverages. All measurements were performed in a quiet, air-conditioned room (21-23 ^{o}C), during 9 a.m. to 1 p.m., after each subject rested for at least 15-min. At fist, baseline assessment of blood pressures and wave reflection indices took place at fast. Afterwards, a light meal was consumed by each subject within 15 minutes. Thereafter, hemodynamic measurements were repeated 1, 2 and 3 hours following completion of the meal. The meal used for the study was a vegetable soup (containing either 50 gr of refined olive oil, or 50 gr of green olive oil), 2 slices of white bread and 250 ml of either red or white wine (each one containing 12% ethanol). During the 4 study days, volunteers consumed the standard meals in all possible combinations of the two types or wine and the two types of olive oil (red wine and olive oil, red wine and green olive oil, white wine and olive oil, white wine and green olive oil) in a random order. All participants were encouraged to refrain from exercise and not to change their diet during the study. Additionally, they were asked to consume the same menu the day before each study day. 24-hour recalls were reviewed to assure compliance to dietary instructions.

Wine and olive oil analysis

The concentration of total antioxidants in experiment's wines and the two types of olive oil was estimated by the Folin – Ciocalteau procedure [12]. These analyses revealed that red wine contained 650 μg/ 100 ml of caffeic acid equivalents, while white wine contained 130 μg/ 100 ml of caffeic acid equivalents. Additionally, green olive oil was found to contain 236 ppm of caffeic acid and refined olive oil 20 ppm of caffeic acid equivalents.

Arterial stiffness – wave reflections – central pressures

Wave reflections and arterial stiffness were determined non-invasively by radial artery applanation tonometry and pulse wave analysis [13, 14], which is a method already described in detail previously [11, 15]. In brief, tonometry of the radial artery was performed by using a high-fidelity strain-gauge transducer placed on the tip of a pencil-type tonometer (Millar Instruments, Houston, Texas, USA). Peripheral pressure waveforms were transformed by using generalized transfer functions providing the respective aortic pressure waveforms. Analysis of the derived aortic pressure waveforms was realized by the Sphygmocor® System (ATCOR Medical, Sydney, Australia).

Augmentation Index (AIx) was used to characterize wave reflections. Aortic AIx is defined as the change of aortic systolic pressure (which is generated by the return of reflected waves at central aorta), expressed as a percentage of pulse pressure. Applanation tonometry and pulse wave analysis have been described in detail and validated previously [15, 16]. Since AIx is influenced by heart rate [17], which is likely different in each patient and might be altered after red wine consumption, an index adjusted for heart rate 75 b.p.m. (AI@75) was also used as previously suggested. [17].

Pulse wave velocity, which is an indicator of arterial stiffness, was assessed indirectly by the arrival time (t_r, msec) of reflected waves at the aorta, which represents the time needed for pressure waves to travel from the central to peripheral arterial sites and return back to the aorta due to wave reflections.

Statistics

One-sample Kolmogorov-Smirnov test and normal probability (Q-Q) plots were applied to test for distribution normality of continuous variables. Variation of the measured variables at baseline, 1, 2 and 3 hours was evaluated by analysis of variance (ANOVA) for repeated measures at each study session separately. Student t-test with Bonferroni correction for multiple comparisons was performed to detect significant changes within each session. A further ANOVA design with 2 beverages x 4 time periods (fast, 1, 2, 3 hours post-consumption) was applied in order to assess the comparative differences between sessions. Comparisons of baseline values between sessions were performed by non-parametric Wilcoxon test. Data are expressed as mean ± standard error (SE) and a p-value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were made by using SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Experimental results

Baseline values of augmentation index, heart rate, peripheral and central systolic/diastolic pressures did not differ significantly between sessions.

AIx decreased significantly after all four combinations of wine and olive oil; RG ($p<0.001$), RO ($p<0.001$), WG ($p=0.039$) and after WO ($p=0.007$) (Table 1) and this effect was significant for 1 to 3 hours postprandially ($p<0.05$) (Table 1, Figure 1). RG reduced AIx by approximately 10.6%, WG by 7.3%, RO by 10.7% and WO by 7.4%. The overall decrease of AIx after RG consumption was significantly greater than the respective response after RO ($p=0.001$), WG ($p=0.021$) and WO consumption ($p=0.023$). Reflection time, an indirect estimator of arterials stiffness, remained unaltered postprandially, after all combinations of wine and olive oil.

Peripheral systolic blood pressure was significantly reduced by almost 8.7mmHg after the WG and by 9.4mmHg after the WO session (WG, $p=0.002$, WO, $p=0.035$) (Table 2). Peripheral diastolic and central systolic and diastolic blood pressures were significantly diminished after all four combinations of wine and olive oil ($p<0.05$).

Discussion

The present study is the first that provide in-vivo evidence concerning the possible combined effects of two essential components of the Mediterranean diet on wave reflections and arterial hemodynamics in the postprandial state. Wave reflections and blood pressure are recognized as important risk factors for cardiovascular diseases [2, 3] and there are several nutrients that seem to regulate them either after long – term use or in the acute postprandial state [18]. Additionally, previous studies have shown that in the postprandial state and especially through postprandial hypertriglyceridaemia there are either no effects [19], or significant, mostly unfavorable, alterations in blood pressure and arterial stiffness [7, 8, 19, 20]. Consequently any nutritional "intervention", such as red wine, olive oil and their constituents, with potential lowering effects on wave reflections gains a great attention and deserves further investigation aiming at a possible non – pharmaceutical reduction in cardiovascular risk. To the best of our knowledge there are no studies investigating the possible postprandial effects of olive oil on arterial properties and haemodynamics, which is an essential component of the Mediterranean diet. Additionally, it is well known that red wine has cardioprotective effects and it is recommended to be ingested together with meals [21]. However, lots of people are

advised by their physicians and dieticians to consume olive oil and red wine in their meals as a part of a healthy diet, but their combined effects are unknown.

This study showed that combination of wine and olive oil reduces wave reflections (expressed by AIx) in the postprandial state, denoting that they contain vasoactive components that play an important favorable role in vessel function. It is noteworthy that all combinations of olive oil (regular and green) and wine (red and white) were effective in reducing AIx, which reveals that these foods and their components are capable of improving it, which is in accordance with previous findings in healthy subjects and patients with CAD who consumed red wine [10, 11].

It could be suggested that the observed reduction in AIx revealed an improvement of arterial stiffness, or vasodilatation, or both. There are in-vitro studies indicating that alcohol and red wine's antioxidants may enhance nitric oxide (NO) production, or inhibit endothelin – 1 synthesis [22, 23] inducing vasodilation. Furthermore, a number of in vivo studies showing that there is a significant vasodilation and increased production of NO after consumption of red wine and its antioxidant constituents [24-26]. However, there is limited data concerning the postprandial effect of olive oil on endothelial function, which revealed that olive oil caused endothelial dysfunction probably through impairment of NO production [27]. These data show that red wine might reverse olive oil's postprandial unfavorable effects but more research needs to be done on this field. Nevertheless, NO has been directly related not only to vasodilation but also to wave reflections, pulse wave velocity and arterial stiffness [28] and it is possible that NO is an important underlying mechanism involved in AIx changes reported in this study.

Further analysis of our results proved that combination of red wine and green olive oil was even more effective than the others. The outcome of this analysis should

be highlighted since the mentioned combination was the one with higher concentrations of antioxidant substances contained in both red wine and green olive oil. Therefore, it seems that additionally to constituents contained in wine and olive oil, their antioxidant components offer an additional favorable effect in reducing AIx. This means that probably these antioxidants increase NO production inducing vasodilation and reduce peripheral resistance in small vessels, which is in accordance with previous study in patients with CAD, solely with red wine antioxidants [11].

Results from the effect of olive oil and wine on blood pressure indicated that as far as peripheral systolic pressure is concerned WO and WG were effective in reducing it postprandially. This reveals that these combinations contain components capable enough to favorably affect peripheral systolic pressure. Further comparison of the different meal sessions supports a hypothesis as to which component of wine and olive oil is more effective. In specific, comparisons of the overall effects on peripheral systolic pressure of WO and RO and WG and RG that each one contain the same type of olive oil, but different types of wine, shows that only sessions containing white wine were effective (WO and WG). This probably renders alcohol as a responsible factor for this effect on peripheral systolic pressure, which is already shown previously [10]. Another two comparisons between RG - RO and WG - WO, that each one has the same type of wine but different types of olive oil (regular and green), reveal that there is no differentiation in the overall effects on peripheral systolic pressure of either regular or green olive oil. This finding supports the theory that components of olive oil other than antioxidants are responsible for this specific effect on pressure. Unfortunately, this is a hypothesis that is not yet possible to be confirmed by any similar previous study.

Finally, the outcome about peripheral diastolic, central systolic and central diastolic pressure showed that all combinations of wine and olive oil decreased them significantly. This effect could be well explained especially for central systolic pressure, as the four meals used might have decreased peripheral resistance and consequently they decreased wave reflections and left ventricular afterload, decreasing central systolic pressure [2]. Unfortunately, these results cannot reveal which specific component of wine and olive oil might be more effective in reducing blood pressure, which is another piece of evidence that there must be a number of studies in the near future to elucidate this unknown scientific field.

In conclusion, combination of wine and olive oil antioxidants together with other components of wine and olive oil reduce wave reflections and blood pressure postprandially. These effects might be characterized as an additional beneficial effect of basic components of the Mediterranean diet and its antioxidants on haemodynamics and vessel function postprandially, but there is a great need for further research in order to confirm or reverse these findings.

References

1. de Longeril M, Salen P, Martin J-L. Effect of a Mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. Insights into the cardioprotective effect of certain nutrients. J Am Coll Cardiol, 1996; 28: 1103 – 1108
2. O' Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ. Pulse wave analysis. Br J Clin Pharmacol, 2001; 51: 507 – 522.
3. Weber T, Auer J, O' Rourke MF. Arterial stiffness, wave reflections and the risk of coronary artery disease. Circulation, 2004; 109: 184 – 189.
4. Consensus Report, Jaen (Spain). International conference on the health effect of virgin olive oil. Eur J Clin Invest, 2005; 35: 421 – 424.
5. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Meditarranean diet and arterial blood pressure : the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. Am J Clin Nutr, 2004; 80: 1012 – 1018.
6. Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti j, Alcantara M, Pujadas – Bastardes M, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. Atherosclerosis, 2005; 181: 149 – 158.
7. Blendea MC, Bard M, Sowers JR, Winer N. High – fat meal impairs vascular compliance in a subgroup of young healthy subjects. Metabolism, 2005; 54 (10): 1337 – 1344.
8. Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML. Mechanisms mediating postprandial blood pressure reduction in young and elderly subjects. Am J Hypertens, 1996; 9 (6): 536 – 544.

9. Sierksma A, Muller M, van der Schouw YT, Grobbee DE, Hendriks HF, Bots ML. Alcohol consumption and arterial stiffness in men. J Hypertens. 2004; 22(2):357-62.
10. Mahmud A, Feely J. Divergent effect of acute and chronic alcohol on arterial stiffness. Am J Hypertens. 2002; 15:240-243.
11. Karatzi K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG., Aznaouridis K, Katsichti P, et al. Red wine acutely induces favourable effects on wave reflections and central pressures in coronary artery disease patients. Am J Hypertens, 2005; 18: 1161-1167.
12. Singleton V. L. Rossi J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybic – phosphotungstic acid reagents. Am J. Enol. Vitic, 1965; 16: 144 – 158.
13. Kelly R, Hayward C, Ganis J, Daley J, Avolio A, O'Rourke M. Noninvasive registration of the arterial pressure pulse waveform using high fidelity applanation tonometry. J Vasc Med Biol, 1989;1:142-149.
14. Karamanoglu M, O'Rourke MK, Avolio AP, Kelly RP. An analysis of the relationship between central aortic and peripheral upper limb pressure waves in man. Eur Heart J, 1993; 14: 160-167.
15. O' Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ. Pulse wave analysis. Br J Clin Pharmacol, 2001; 51: 507 – 522.
16. Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. Hypertension, 2001; 38: 932-937.

17. Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft J, Newby D, Webb D. The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. J Physiol, 2000; 525: 263 – 270.

18. Tanaka H, Safar M. Influence of lifestyle modification on arterial stiffness and wave reflections. Am J Hypertension, 2005; 18:137-144.

19. van Dirk R, Bakker S, Scheffer P, Heine R, Stehouwer C. Associations of metabolic variables with arterial stiffness in type 2 diabetes mellitus: focus on insulin sensitivity and postprandial triglyceridaemia. Eur J Clin Invest, 2003; 33 (4): 307 – 315.

20. Nestel P, Shige H, Pomeroy S, Cehun M, Chin – Dusting J. Post – prandial remnant lipids impair arterial compliance. J Am Coll Cardiol, 2001; 37 (7): 1929 – 1935.

21. Lucas D, Brown R, Wassef M, Giles T. Alcohol and the cardiovascular system. Research challenges and opportunities. J Am Coll Cardiol, 2005; 45: 1916-1924.

22. Leikert J, Rathel T, Wohlfart P. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 2002;106:1614-1617.

23. Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci.*2002; 103: 72S-75S.

24. Lekakis J, Rallidis L, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, et al. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2005; 12: 596 – 600.

25. Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, et al. Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. Coron Artery Dis, 2004; 15(8):485-90.

26. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, et al. Red wine's antioxidants counteract acute eothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy non-smokers. Am Heart J. 2004;147:e5.

27. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. J Am Coll Cardiol, 2000; 36: 1455 – 60.

28. McEniery C, Qasem A, Schmitt M, Avolio A, Cockcroft J, Wilkinson I. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1975-81.

Table 1. Baseline and postprandial values of wave reflection indices and heart rate.

	Red wine + Olive oil	**White wine + Olive oil**	**Red wine + Green olive oil**	**White wine + Green olive Oil**
Augmentation Index (%)				
baseline	13.7±2.3	12.1±3.3	13.5±2.5	11.3±4.1
1 hour	6.2±3.7 *	5.5±4.6	2.9±3.1 *	4.6±3.7
2 hours	3.0±3.8 *	4.7±3.6	3.3±3.2 *	1.3±4.2 *
3 hours	3.4±3.6 *	1.6±4.1 *	5.5±3.3	4±5.3
Within session ANOVA	<0.001	0.007	<0.001	0.039
Reflection Time (msec)				
baseline	153.1±2.7	155.5±5.4	153.6±4.5	144.0±5.6
1 hour	155.1±6.3	149.0±6.9	157.7±2.9	151.8±5.2
2 hours	150.9±5.5	154.8±6.1	158.4±5.2	152.7±5.5
3 hours	162.0±4.3	152.8±6.7	153.7±4.8	156.3±7.0
Within session ANOVA	0.244	0.585	0.435	0.100
Heart rate (beats/min)				
baseline	72.7±2.3	73.8±3.3	73.1±2.2	78.1±3.5
1 hour	77.1±2.8	77.5±3.0	74.3±2.3	77.3±3.0
2 hours	74.0±2.7	74.9±2.7	75.1±2.5	77.4±2.9
3 hours	74.8±2.1	76.7±2.6	74.9±2.9	79.2±3.0
Within session ANOVA	0.09	0.026	0.593	0.708

Values are expressed as mean ± standard error (SE)

* indicates significant ($p<0.05$) difference from the respective baseline value

Table 2. Baseline and postprandial values of peripheral and aortic blood pressures.

	Red wine + Olive oil	**White wine + Olive oil**	**Red wine + Green olive oil**	**White wine + Green olive Oil**
Peripheral Systolic Pressure (mmHg)				
baseline	105.7±4.2	103.5±3.1	103.7±2.8	104.9±3.3
1 hour	100.1±1.7	94.1±3.2	102.1±3.5	99.4±3.0
2 hours	102.5±2.6	97.4±3.2	99.6±3.0	96.2±3.6 *
3 hours	103.1±2.6	101.1±3.0	100.4±3.3	100.2±2.9
Within session ANOVA	0.297	0.035	0.271	0.002
Peripheral Diastolic Pressure (mmHg)				
baseline	69.9±2.1	68.1±2.0	68.1±2.2	67.8±2.0
1 hour	64.4±2.7	58.2±2.8 *	62.0±2.4	61.0±1.9
2 hours	63.9±2.3	60.8±1.8 *	61.8±2.1 *	59.3±1.9
3 hours	67.4±2.1	62.6±1.3	64.3±2.2	62.4±1.2
Within session ANOVA	0.015	0.001	0.007	0.004
Central Systolic Pressure (mmHg)				
baseline	93.6±2.4	92.8±2.6	93.1±2.4	92.2±2.6
1 hour	87.8±1.7	81.2±2.4 *	87.5±2.7 *	85.6±2.6
2 hours	88.6±2.6	84.5±2.3	85.8±2.6 *	82.3±2.2
3 hours	90.6±2.6	86.8±2.2	87.9±2.8	86.6±1.9
Within session ANOVA	0.050	<0.001	0.004	0.001
Central Diastolic Pressure (mmHg)				
baseline	71.1±2.2	69.2±1.9	69.0±2.2	68.7±2.1
1 hour	65.3±2.7	59.3±2.8 *	62.8±2.4 *	61.8±2.0
2 hours	64.8±2.3	62.0±1.7 *	62.9±2.1	60.4±1.9

3 hours	68.4±2.1	63.7±1.3	65.4±2.3	63.7±1.2
Within session ANOVA	0.009	0.001	0.007	0.005

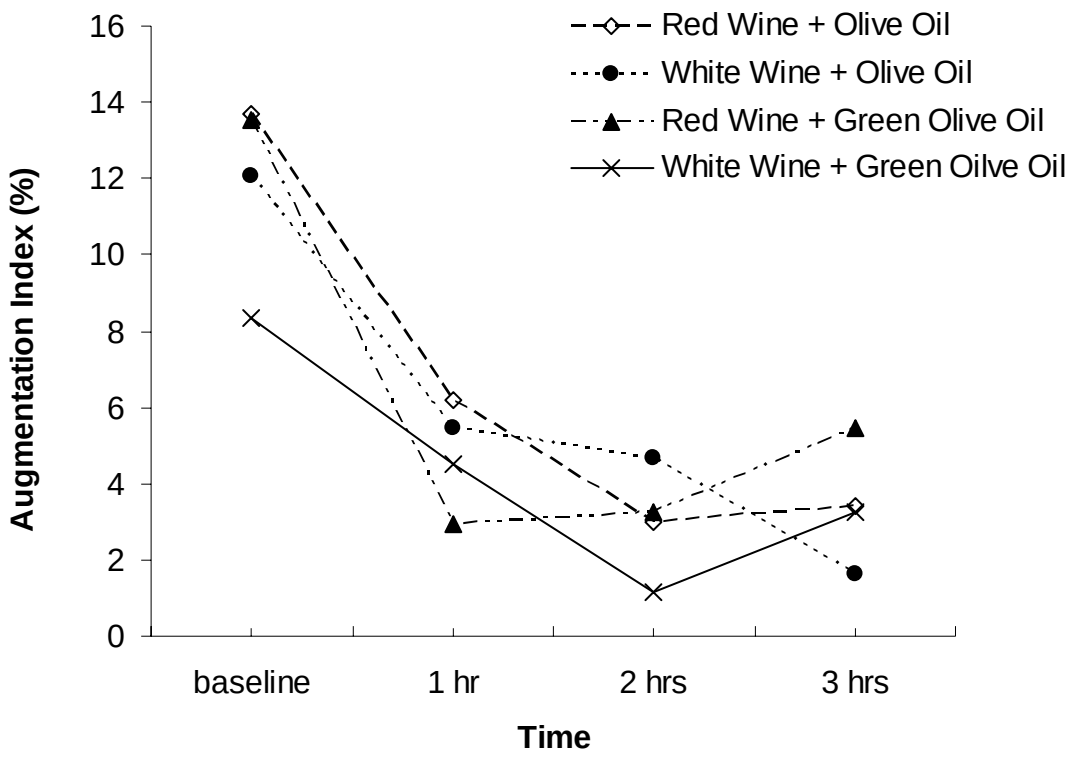
Values are expressed as mean ± standard error (SE)

* indicates significant ($p<0.05$) difference from the respective baseline value.

Figure legends

Figure 1. Effect of the combined consumption of different types of wine and olive oil on heart rate corrected augmentation index (AI@75).

Figure 1


Red Wine + Olive Oil
White Wine + Olive Oil
Red Wine + Green Olive Oil
White Wine + Green Oilve Oil
Augmentation Index (%)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
baseline
1 hr
2 hrs
3 hrs
Time

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu – Amsha R, Croft K, Puddey I. Phenolic content of various beverages determines the extend of inhibition of human serum low – density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. Clin Sci (Lond), 1996; 91: 449 – 458.
- Agarwal D. Cardioprotective effects of light – moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanisms. Alcohol and Alcoholism, 2002; 37 (5): 409 – 415.
- Agewall S., Wright S., Doughty R., Whalley G., Duxbury M., Sharpe N. Does a glass of wine improve endothelial function? Eur Heart J, 2000; 21: 74-78.
- Albert C, Manson J, Cook N, Ajani U, Gaziano j, Hennekens C. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. Circulation, 1999; 10: 944 – 950.
- Alderton W, Cooper C, Knowles R. Nitric-oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J, 2001; 357: 593 – 615.
- Ambrose J, Barua R. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. An update. J Am Coll Cardiol, 2004; 43: 1731 - 1737.
- Amoroso G., Van Veldhuisen D.J., Rene A.T., Mariani M. Pathophysiology of vascular endothelium and circulating platelets: implications for coronary revascularization and treatment. Int J Cardiol, 2001; 79: 265 – 275.
- Anderson EA, Mark AL. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. Circulation, 1989; 79: 93 - 100.
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. J Am Coll Cardiol, 1995; 26:1235-41.
- Anderson T. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. Heart Failure Reviews, 2003; 8: 71 – 86.
- Anderson R., Dart AM., Starr J., Shaw J., Chin-Dusting JP. Plasma C-reactive protein, but not protein S, VCAM-1 von Willebrand factor or P-selectin, is associated with endothelium dysfunction in coronary artery disease. Atherosclerosis, 2004; 172 (2): 345 – 51.
- Andriambeloson E, Kleschyov A, Muller B, Beretz A, Stoclet J, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium – dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta.Br J Pharmacol, 1997; 120: 1053 – 1058.

- Andrikopoulos N, Brueschweiler H, Taeschler C. Analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *J Am Oil Chem Soc.* 1991; 68: 359-364.
- Au-Yeung KK, Woo CW., Sung FL., Yip JG., Siow YL. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappa B in endothelial cells via oxidative stress. Circ Res, 2004; 94 (1): 28 – 36.
- Bagchi D, Bagchi M, Sihos S, Ray S, Sen C, Preuss H. Celular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. Ann N Y Acad Sci, 2002;' 957: 260 – 270.
- Balkestein E, van Aggel – Leijssen D, van Baak M, Struuijker – Boudier H, van Bortel L. The effect of weight loss with or without exercise training on large artery compliance in healthy obese men. J Hypertens, 1999; 17: 1831 – 1835.
- Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. Circulation, 2000; 101: 1780 – 4.
- Bank A, Kaiser D, Rajala S, Cheng A. In vivo human brachial artery elastic mechanics: effects of smooth muscle relaxation. Circulation, 1999; 100: 41 – 47.
- Bank A, Wang H, Holte J, Mullen K, Shammas R, Kubo S. Contribution of collagen, elastin, and smooth muscle to in vivo human brachial artery wall stress and elastic modulus. Circulation, 1996; 94: 3263 – 3270.
- Barnoya J, Glantz S. Cardiovascular effects of secondhand smoke: nearly as large as smoking. Circulation, 2005; 111 (20): 2684 – 2698.
- Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vacular biology to clinical application. Am J Cardiol, 2002; 90 (suppl): 40L – 48L.
- Beilin LJ, Puddey IB, Burke V. Lifestyle and hypertension. *Am J Hypertens.* 1999; 12: 934-945.
- Benkhalti F, Leggssyer A, Gomez P, Paz E, Lopez – Miranda J, Perez – Jimenez F, Boustani E. Effects of virgin olive oil phenolic compounds on LDL oxidation and vasorelaxarion activity. Therapie, 2003; 58: 133 – 137.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis, 2003; 170: 191–203.
- Blendea MC, Bard M, Sowers JR, Winer N. High – fat meal impairs vascular compliance in a subgroup of young healthy subjects. Metabolism, 2005; 54 (10): 1337 – 1344.

- Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, Laurent S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. Hypertension, 2002; 39: 10 – 15.
- Braun M, Pietsch P, Schror K, Baumann G, Felix S. Cellular adhension molecules on vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res, 1999; 41: 395 – 401.
- Braunwald E, Zipes D, Libby P. Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine 6th edition. W.B. Saunders company, Harcourt International Edition, 2001.
- Brown A, Hu F. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. Am J Clin Nutr, 2001; 73: 673 – 686.
- Buemann B, Dyerberg J, Astrup A. Alcohol drinking and cardiac risk. Nutr Res Rev, 2002; 15: 91 – 121.
- Burdge G, Calder G. Plasma cytokine response during the posprandial period: a potential causal process in vascular disease? Br J Nutr, 2005; 93: 3 – 9.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF. Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction. Diet and Reinfarction Trial (DART). Lancet, 1989; 334; 757 – 761.
- Caccetta R, Croft K, Beilin L. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. Am J Clin Nutr, 2000; 71: 67 – 74.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation – Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 622-629.
- Celermajer D, Sorensen K, Georgakopoulos D. Cigarette smoking is associated with dose-related and potensially reversible impairment of endothelium dependent dilation in healthy young adults. Circulation, 1993; 88(part 1): 2149-2155.
- Celermajer D. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. N Eng J Med, 1996; 334: 150-154.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. J Am Coll Cardiol, 1994; 24: 1468 – 74.

- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 1992;340:1111-1115
- Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robbinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age related decline in women. J Am Coll Cardiol, 1994a; 24: 471 – 6.
- Celermajer DS. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it Reversible? J Am Coll Cardiol, 1997; 30: 325 – 33.
- Chakravarthy U, Hayes R, Stitt A, McAuley E, Archer D. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycatioin end products. Diabetes, 1998; 47: 945 – 952.
- Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought, Am J Clin Nutr, 2005; 81(suppl): 223S – 229S.
- Chou E, Keevil J, Aeschlimann S, Wiebe D, Folts J, Stein J. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. Am J Cardiol, 2001; 88(1): 553-555.
- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation in healthy adults. J Am Coll Cardiol 2004; 44(1): 152-8.
- Church D, Pryor W. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect, 1985; 64:111-26.
- Clakson P. Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM. Endothelial-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. Circulation, 1997; 96: 3378 – 83.
- Cody RJ. The integrated effects of angiotensin II. Am J Cardiol, 1997; 79: 9 – 11.
- Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium dependent Hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. Circulation, 1995; 92: 3337 – 3349.
- Cohen RA. The Role of Nitric Oxide and Other Endothelium-derived Vasoactive Substances in Vascular Disease. Progr Cardiovasc Dis, 1995; 38: 105 – 128.
- Consensus Report, Jaen (Spain). International conference on the health effect of virgin olive oil. Eur J Clin Invest, 2005; 35: 421 – 424.
- Corder R, Douthwaite J, Lees D. Endothelin 1 synthesis reduced by red wine. Nature, 2001; 414 (6866): 863 – 864.

- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. JACC, 2002; 39: 257 - 65.
- Covic A, Haydar AA, Bhamra-Ariza P, Gusbeth-Tatomir P, Goldsmith DJ. Aortic pulse wave velocity and arterial wave reflections predict the extent and severity of coronary artery disease in chronic kidney disease patients. J Nephrol, 2005; 18:388-96.
- Criqui M, Ringel B. Does diet of alcohol explain the French paradox? Lancet, 1994; 344: 1719 – 23.
- Cuevas A, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain A, Leighton F. A high fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. Lipids, 2000; 35: 143-148.
- Cuevas AM, Germain AM. Diet and Endothelial Function. Biol Res 2004; 37: 225-230.
- daLuz p, Coimbra S. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. Braz J Med Bio Sci, 2004; 37: 1275 – 1293.
- Davies M. Going from immutable to mutable atherosclerotic plaques. Am J Cardiol, 2001; 88(suppl): 2F – 9F.
- de Longeril M, Salen P, Martin J-L. Effect of a Mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. Insights into the cardioprotective effect of certain nutrients. J Am Coll Cardiol, 1996; 28: 1103 – 1108.
- de Longeril M, Salem P, Martin J-L, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final report of the Lyon Heart Study. Circulation, 1999; 99: 779 – 785.
- de Lorimier A. Alcohol, wine and health. Am J Surg, 2000; 180: 357 – 361.
- DeCaterina R, Liao J, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. Am J Clin Nutr, 2000; 71 (suppl): 213S – 223S.
- Delafontaine P. Growth factors and vascular smooth muscle cell growth responses. Eur Heart J, 1998; 19: G18 – 22.
- Dell' Agli M, Busciala A, Bosisio E. Cardiovasc Res, 2004; 63: 593 – 602.

- Demrow H, Slane P, Folts j. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. Circulation, 1995; 91: 1182 – 1188.
- Derek D, Pearson D, German J. Endothelial cell basal PGL2 release is stimulated by wine in vitro: one mechanism that may mediate the vasoprotective effects of wine. J Nutr Biochem, 1997; 8: 647 – 651.
- Di Castelnuovo A., Rotondo S., Iacoviello L., Donati M., de Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. Circulation, 2002; 105: 2836 – 2844.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney Jr JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. Edited by Epstein FH. N Engl J Med, 1997; 337: 408 – 16.
- Diebolt M., Bucher B., Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improves vasodilation and induce gene expression. Hypertension, 2001; 38(2): 159-65.
- Disanto A., Mezzetti A., Napoleone E., Di Tommaso R., Donati M., De Gaetano G., Lorenzet R. Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. J Thromb Haemost, 2003; 1: 1089 – 1095.
- Djousse L., Ellison C., Mclennan C., Cupples L., Lipinska I., Tofler G., Gokce N., Vita J. Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects. Am J Cardiol, 1999; 84: 660-665.
- Draaijer P, Kool M, Maessen J, van Bortel L, de Leeuw P, van Hooff J, Leunissen K. Vascular distensibility and compliance in salt – sensitive and salt – resistant borderline hypertension. J Hypertens, 1993; 11: 1199 – 1207.
- Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. Progr Cardiovasc Dis, 1997; 39: 287 – 324.
- Ducharme A, Dupuis J, McNicoll S, Harel F, Tardif JC. Comparison of nitroglycerin lingual spray and sublingual tablet on time of onset and duration of brachial artery vasodilation in normal subjects. Am J Cardiol, 1999; 84: 952 – 4.
- Dupont WD, Plummer WD. Power and sample size calculations: A review and computer program. Control Clin Trials, 1990; 11:116-28.
- Dzau VJ, Gibbons GH, Cooke JP, Omigui N. Vascular biology and medicine in the 1990s: Scope, Concepts, Potentials, and Perspectives. Circulation, 1993; 87: 705 – 710.

- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a Mediterranean – style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. JAMA, 2004; 292 (12): 1490 – 1492.
- Faila M, Grappiolo A, Carugo S, Calchera I, Giannattasio C, Mancia G. Effects of cigarette smoking on carotid and radial artery distensibility. J Hypertens, 1997; 15: 1659-64.
- Faulx M, Wright A, Hoit B. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. Am Heart J, 2003; 145: 943 - 51.
- Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti j, Alcantara M, Pujadas – Bastardes M. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. Atherosclerosis, 2005; 181: 149 – 158.
- Fitzpatrick D, Fleming R, Bing B, Maggi D, O'Malley R. Isolation and characterization of endothelium – dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. J Agric Food Chem, 2000; 48(12): 6384 – 6390.
- Fitzpatrick D, Hirschfield S, Goffey R. Endothelium – dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. Am J Physiol, 1993; 265 (34): H1774 – H1778.
- Fitzpatrick D, Hirschfield S, Ricci T, Jantzen P, Goffey R. Endothelium – dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. J Cardiovasc Pharmacol, 1995; 26(1): 90 – 95.
- Flesch M., Rosenkranz S., Erdmann E., Böhm M. Alcohol and the risk of myocardial infarction. Basic Res Cardiol, 2001; 96: 128-135.
- Flesch M., Schwarz A., Böhm M. Effects of red wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. Am J Physiol, 1998; 275(44): H1183-H1190.
- Foppa M., Fuchs F., Duncan B. Alcohol and Atherosclerosis. Arq Bras Cardiol, 2001; 76(2): 171-6.
- Freedman J., Parker C., Li L., Perlman J., Frei B., Ivanov V., Deak L., Iafrati M., Folts J. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. Circulation, 2001; 103: 2792-2798.

- Frei B, Forte TM, Ames BN. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein propertiew in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. Biochem J, 1991; 277: 133 – 138.
- Frohlich j. Effects of alcohol on plasma lipoprotein metabolism. Clin Chim Acta, 1996; 246: 39 – 49.
- Fuchs F. Vascular effects of alcoholic beverages. Is it only alcohol that matters? Hypertension, 2005; 45: 851 – 852.
- Fuentes F, Lopez – Miranda J, Sanchez E. Mediterranean and low – fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. Ann Intern Med, 2001; 134: 1115 – 1119.
- Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. Curr Opin Lipidol, 2001; 12: 41 – 48.
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine in meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid proxidation. Am J Clin Nutr, 1995; 61: 549 – 554.
- Fukuda Y., Aoyama Y., Wada A., Igarashi Y. Identification of PECAM-1 association with sphingosine kinase 1 and its regulation by agonist-induced phosphorylation. Biochim Biophys Acta, 2004; 1636 (1): 12 – 21.
- Fusegawa Y, Goto S, Handa S. Platelet spontaneous aggregation in platelet – rich plasma is increased in habitual smokers. Thromb Res, 1999; 93: 271 – 278.
- Gewaltig M., Kojda G. Vasoprotection by NO: mechanisms and therapeutic potential. Cardiovasc Res, 2002; 55: 250 – 260.
- Giannattasio C, Mangoni A, Stella M, Carugo S, Grassi G, Mancia G. Acute effects of smoking on radial artery compliance in humans. J Hypertens, 1994; 12: 691-6.
- Gibbons GH (a). Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. Am J Cardiol, 1997; 79: 3 – 8.
- Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. N Engl J Med, 1994; 330: 1431 – 8.
- Gibbons GH. Vasculoprotective and cardioprotective mechanisms of angiotensin converting enzyme inhibition: the homeostatic balance between angiotensin II and nitric oxide. Clin Cardiol, 1997; 20 (suppl): II18 – 25.
- Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, Garcia CE, Quyyumi AA. Selective Loss of Microvascular Endothelial Function in Human Hypercholesterolemia. Circulation, 1994; 90: 35 – 41.

- Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2000; 10(1): 38-44.
- Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a postoperative study. Circulation, 2002; 105: 1567 - 1572.
- Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. JACC, 2003; 41: 1769 - 1775.
- Golino P., Ravera A., Ragni M., Cirillo P., Piro O. Involvment of tissue factor pathway inhibitor in the circulation of patients with acute coronary syndromes. Circulation, 2003;108 (23): 2864 – 9.
- Gordova A, Jackson L, Berke – Schlessel D, Sumpio B. The cardiovascular protective effect of red wine. Am Coll Surg, 2005; 200(3): 428 – 439.
- Govers R., Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol, 2001; 280: F193 - F206.
- Gronbaek M., Deis A., Sorensen T., Becker U., Schnohr P., Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. BMJ, 1995; 310: 1165 – 1169.
- Gronbaek M., Johansen D., Sorensen T., Becker U., Schnohr P., Jensen G., Hein H. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary herat disease and cancer. Ann Intern Med, 2000; 133: 411 – 419.
- Haak P, Jungmann E, Raab C. Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. Metabolism, 1994; 43:267-9.
- Halcox j, Schenke W, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw M, Nour K, Quyumi A. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. Circulation, 2002; 106: 653 – 658.
- Hamazaki T, Urakase M, Sawasaki S, Yamazaki K, Taki H, Yano S. Comparison of pulse wave velocity of the aorta between inhabitants of fishing and farming villages in Japan. Atherosclerosis, 1988; 73: 157 – 160.
- Hashimoto M, Akishita M, Eto M. Modulation of endothelium-dependent flow mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. Circulation, 1995; 92: 3431 - 5.
- Hashimoto M, Seungbum K, Masato E, Katsuya L, Junya A, Masao Y, Masahiro A, Kazuo K, Hiroshige I, Kazyaki H, Kanji T, Yasuyoshi O. Effect of acute intake of red

wine on Flow Mediated Vasodilation of the brachial artery. Am J Cardiol, 2001; 88: 1457 – 59.

- Hayashi T, Nakayama Y, Tsumura K, Yoshimaru K, Ueda H. Reflection in the arterial system and the risk of coronary heart disease. *Am J Hypertens.* 2002; 15: 405-409.
- Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KPJ, Somerville D, Lomax CC et al (). Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. Circulation, 1996; 93: 1860 – 70.
- Heitzer T, Hanjorg J, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. Circulation, 1996; 94:6-9.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn M, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation, 2001; 104: 2673 -2678.
- Hendricks H, Veenstra J, Wierik E, Shaafsma G, Kluft C. Effect of moderate dose of alcohol with evening meal on fibrinolytic factors. BMJ, 1994; 308: 1003 – 1006.
- Hertog M, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Finanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens E, Hollman CH, Katan MB. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. Arch Intern Med, 1995; 155: 381-386.
- Hertog M., Feskens E., Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. Lancet, 1997; 349-369.
- Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Effect of the angiotensin – converting enzyme inhibitor imidaprili on reactive hyperemia in patients with essential hypertension: relationship between treatment periods and resistance artery endothelial function. J Am Coll Cardiol, 2001; 37: 863 – 870.
- Hirsh J., Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Guide to anticoagulant therapy. Heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation, 2001; 103: 2994 – 3018.
- Horn TF., Wolf G., Duffy S., Weiss S., Keilhoff G. Nitric oxide promotes intracellular calcium release from mitochondria in striatal neurons. FASEB, 2002; 16 (12): 1611 – 22.

- Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. JAMA, 1998; 279: 119 – 124.
- Huo y, Ley K. Adhension molecules and athrogenesis. Acta Physiol Scand, 2001; 179: 35 – 43.
- Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. Circulation, 2002; 105: 2404 – 2410.
- Iketa U, Yamamoto K, Maeda Y, Shimpto M, Kanbe T. Endothelin-1 inhibits nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. Hypertension, 1997; 29: 65 – 9.
- Jagla A, Schrezenmeir J. Postprandial triglycerides and endothelial function. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001; 109 (4): S533 – 547.
- Joannides R, Haefeli WE, Linder. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. Circulation, 1995; 91: 1314 - 9.
- Johnstone MT. Impaired Endothelium-dependent vasodilation in patients with Insulin-dependent diabetes mellitus. Circulation, 1993; 88: 2510 – 6.
- Junqueira L.C, Carneiro J, O.Kelley R. Βασική Ιστολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης,1991: 291 – 294.
- Kalin R, Righi A, Del Rosso A. Activin, a grape seed derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhension molecules (ICAM 1, VCAM 1 and E-selectin) in systemic sclerosis. Free Radic Res, 2002; 36(8): 819 – 825.
- Kannel W. Update on the role of cigarette smoking in coranary artery disease. Am Heart J, 1981; 101: 319-328.
- Karamanoglu M, O'Rourke MK, Avolio AP, Kelly RP. An analysis of the relationship between central aortic and peripheral upper limb pressure waves in man. *Eur Heart J.* 1993;14:160-167.
- Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A, Mavrikakis M. Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with CAD. Coron Art Dis, 2004; 15: 485 – 490.
- Karatzi K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG., Aznaouridis K, Katsichti P, Zampelas A, Lekakis J. Red wine acutely induces favourable effects on wave

reflections and central pressures in coronary artery disease patients. Am J Hypertens, 2005; 18:1161-7.

- Karatzis E, Papaioannou TG, Aznaouridis K, Karatzi K, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Papamichael C, Lekakis J, Mavrikakis M. Acute effects of caffeine on blood pressure and wave reflections in healthy subjects: Should we consider monitoring central blood pressure? *Int J Cardiol.* 2005; 98:425-430.
- Katayama Y, Shige H, Yamamoto A, Hirata F, Yasuda H. Oral vitamin C ameliorates smoking – induced arterial wall stiffness in healthy volunteers. J Atheroscl Thromb, 2004; 11:354-7.
- Katsuya I., Masao Y., Masayoshi H., Seungbun K., Masato E., Junya A., Yi-Qiang L., Noriko S., Kazuaki H., Koichi N., Kenji T., Yasuyoshi Q. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. Circulation, 2000; 101: 805-811.
- Kawano HK, Motoyama T, Yasue H. Endothelial function fluctuates with diurnal varation in the frequency of ischemic episodes in patients with variant angina. JACC, 2002; 40: 266 - 70.
- Kelly R, Hayward C, Ganis J, Daley J, Avolio A, O'Rourke M. Noninvasive registration of the arterial pressure pulse waveform using high fidelity applanation tonometry. *J Vasc Med Biol.* 1989;1:142-149.
- Kervinen K, Savolainen M, Kesaniemi Y. Lp(a) levels increase after ethanol withdrawal. Alcohol Clin Exp Res, 1993; 17: 926 – 929.
- Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci,* 2002; 103: 72S-75S.
- Kim J, Park C, Hong S, Park S, Rha S, Seo H. Acute and chronic effects of cigarette smoking on arterial stiffness. Blood Press, 2005; 14: 80-85.
- Kinlay S, Creager M, Fukumoto M, Hikita H, Fang J, Selwyn A, Ganz P. Endothelium – derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo. Hypertension, 2001; 38: 1049 – 1053.
- Klatsky A., Friedmann G., Armstrong M. Red wine, white wine, liquor, beer and risk for coronary artery disease hospitalisation. Am J Cardiol, 1997; 80: 416 – 420.
- Klatsky A., Friedmann G., Armstrong M., Kipp H. Wine, liquor, beer and mortality. Am J Epidemiol, 2003; 158: 585 – 595.

- Knekt P., Järvisen R., Reunanen A., Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. BMJ, 1996; 312: 478-481.
- Koenig W, Sund M, Filipiak B. Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease: Results from the MONICA – Augsburg Cohort Study, 1984 – 1992. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999; 19: 1368 – 1377.
- Kok FJ, Kromhout D. Atherosclerosis-epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. Eur J Clin Nutr, 2004; 43 (Suppl 1): I – 5.
- Kunkel EJ, Chomas JE, Ley K. Role of primary and secondary capture for leukocyte accumulation in vivo. Circ Res, 1998; 82: 30 – 8.
- Laroia S., Ganti A.K., Laroia A., Tenduliar K. Endothelium and the lipid metabolism :the current understanding. Int J Cardiol, 2003; 88: 1 – 9.
- Laurent S, Lacolley P, Brunel P, Laloux B, Pannier B, Safar M. Flow-dependent vasodilation of brachialartery in essential hypertension. Am J Physiol, 1990; 258: H1004 - 11.
- Lavallee M., Takamura M., Parent R., Thorin E. Cross – talk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. Heart Fail Rev 2001; 6: 265 – 276.
- Leikert J, Rathel T, Wohlfart P. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 2002; 106: 1614-1617.
- Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Nanas J, Kontoyannis D. Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. Am J Cardiol, 1997; 79: 529 – 31.
- Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C. Effects of acute cigarette smoking on endothelium dependent arterial dilatation in normal subjects. Am J Cardiol, 1998; 81: 1225-1228.
- Lesschaeve I, Noble A. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. Am J Clin Nutr, 2005; 81(suppl): 330S – 335S.
- Lesson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. Heart, 1997; 78: 22 - 27.

- Levin EG, Osborn KG. The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: A function defined by vessel size and anatomic location. J Cell Sci, 1997; 11: 139.
- Lieberman E, Gerhard M, Uehata A, Selwyn A, Ganz P, Yeung A, Greager M. Flow – induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 of age with coronary artery disease. Am J Cardiol, 1996; 78: 1210 – 1214.
- Lissin L, Cooke J. Phytoestrogen and cardiovascular health. J Am Coll Cardiol, 2000; 35: 1403 – 1410.
- Locher R., Suter PM., Vetter W. Ethanol supresses smooth muscle cell proliferation in the postprandial state: a new antiatherosclerotic mechanism of ethanol? Am J Clin Nutr, 1998; 67: 338 – 341.
- London GM, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Safar ME. Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. Hypertension 2001; 38:434-8.
- Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM. Lipoprotein (a), fibrin binding and plasminogen activation. Atherosclerosis, 1990; 10: 240 – 245.
- Lucas D, Brown R, Wassef M, Giles T. Alcohol and the cardiovascular system. Research challenges and opportunities. J Am Coll Cardiol, 2005; 45: 1916-1924.
- Mahmud A, Feely J. Divergent effect of acute and chronic alcohol on arterial stiffness. Am J Hypertension, 2002; 15: 240 – 243.
- Mahmud A, Feely J. Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. Hypertension, 2003; 41 (1): 183 – 187.
- Mahmud A, Feely J. Effects of passive smoking on blood pressure and aortic pressure waveform in healthy young adults – influence of gender. Br J Clin Pharmacol, 2003; 57: 37-43.
- Marmot M, Brunner E. Alcohol and cardiovascular disease: the status of the U shaped curve. BMJ, 1991; 303: 565 – 568.
- Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995; 35: 235 – 55.
- Massaro M, De Caterina R. Vasculoprotective effects of oleic acid: Epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2002; 12: 42-51.
- Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML. Mechanisms mediating postprandial blood pressure reduction in young and elderly subjects. Am J Hypertens, 1996; 9 (6): 536 – 544.

- Mathews JNS, Altman D, Cambell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J.* 1990; 300:230-235.
- McDonald DA. "Wave-velocity and attenuation". In: Blood flow in arteries. Edward Arnold, Vienna 1978.
- McDonald M., Hughes M., Burns J., Lean M., Crozier A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. J Agric Food Chem 1998;46:368-375
- McEniery C, Qasem A, Schmitt M, Avolio A, Cockcroft J, Wilkinson I. Endothelin-1 regulates arterial pulse wave velocity in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1975-81.
- McVeigh GE, Lemay L, Morgan D, Cohn JN. Effects of long-term cigarette smoking on endothelium-dependent responses in humans. Am J Cardiol, 1996; 78: 668 – 672.
- Meade TW, Imeson J, Stirling Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. Lancet, 1987; 2: 986 – 988.
- Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol, 2003; 196:430 – 443.
- Mikhailidis D, Barrads M, Jeremy J. The effect of ethanol on platelet function and vascular prostanoids. Alcohol, 1990; 7: 171 – 180.
- Minamiya Y., Saito S., Kalina U., Saito H., Terada K. Antithrombin III diminishes production of oxygen radical in endotoxin-infused rat lung. Shock, 2004; 21(2):139 – 143.
- Morrow J, Frei B, Longmire A. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2 -Isoprostanes) in smokers. N Eng J Med 332:1198-203.
- Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K. Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C. Am J Physiol, 1997; 273: H1644-50.
- Mottram P, Shige H, Nestel P. Vitamin E improves arterial compliance in middle – aged men and women. Atherosclerosis, 1999; 145: 399 – 404.
- Mukamal K, Jadhav P, D'Agostino R, Massaro J, Mittleman M, Lipinska I, Sutherland P, Matheney T, Leby D, Wilson P, Ellison C, Silbershatz J, Muller J, Tofler G. Alcohol consumption and hemostatic factors. Analysis of the Framingham offspring cohort. Circulation, 2001; 104: 1367 – 1373.
- Mukamal K., Conigrave K., Mittleman M., Camargo C., Rimm E. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. N Engl J Med, 2003; 348: 109 – 18.

- Mullan B, Young I, Fee H, McCance D. Ascorbic acid reduces blood pressure and arterial stiffness in type 2 diabetes. Hypertension, 2002; 40: 804 – 809.
- Murohara T, Kugiyama K, Oghushi M, Sugiyama S, Yasue H. Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. Am J Physiol, 1994; 266: H874-H880.
- Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina J, Schini – kerth V. Red wine polyphenols cause endothelium – dependent EDHF mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox – sensitive mechanism. Biochem Biophys Res Commun, 2003; 310: 371 – 377.
- Ness AR, Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. Int J Epidemiol, 1997; 26: 1 – 13.
- Nestel P, pomeroy S, Sasahara T, Yamashida T, Liang Y, Dart A, Jennings G, Abbey M, Cameron J. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidation. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997; 17: 1163 – 1170.
- Nestel P, Shige H, Pomeroy S, Cehun M, Chin – Dusting J. Post – prandial remnant lipids impair arterial compliance. J Am Coll Cardiol, 2001; 37 (7): 1929 – 1935.
- Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. Am J Cardiol, 2000; 86: 207 - 10.
- Neunteufl T, Priglinger U, Heher S. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. JACC, 2000; 35(2): 277-83.
- Neunteufl T, Heher S, Kostner K. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long –term smokers. JACC, 2002; 39: 251-6.
- Nigdikar S. Williams N., Griffin B., Howard A. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. Am J Clin Nutr, 1998; 68: 258 – 65.
- Nishiwaki M, Ishikawa T, Ito T, Shige H, Tomiyasu K, Nakajima K, Kondo K, Hashimoto H, Saitoh K, Manabe M, Mayajima E, Nakamura H. Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase in high – density lipoprotein cholesterol elevation. Atherosclerosis, 1999; 111: 99 – 109.
- Nurminen ML, Niittynen L, Korpela R, Vapaatalo H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. Eur J Clin Nutr 1999; 53:831-839.

- O'Rourke M, Kelly R. Wave reflection in the systemic circulation and its implications in ventricular function. *J Hypertens.* 1993;11:327-337.
- O'Rourke MF, Pauca A, Jiang XJ. Pulse wave analysis. Br J Clin Pharmacol 2001; 51: 507-522.
- Oak M, Chataigneau M, Keravis T. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen – activated protein kinase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003; 23: 1001 – 1007.
- Oeth P., Parry GNC, Mackman N. Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-k B/Rel and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997; 17: 365 – 74.
- Oliver J, Webb D. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003; 23: 554 – 566.
- Ong PJL, Dean TS, Hayward CS, Della Monica PL, Sanders T, Collins P. Effect of fat and carbohydrate consumption on endothelial function. Lancet, 1999; 354: 2134 – 2138.
- Pace – Asiak C, Hahn S, Diamandis E. The red wine phenolics trans – resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. Clin Chim Acta, 1995; 236: 207 – 219.
- Pace – Asiak C, Rounova O, Hahn S. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. Clin Chim Acta, 1996; 246: 163 – 182.
- Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. J Am Coll Cardiol, 1993; 21: 1145 - 1151.
- Papaioannou TG, Karatzi K, Karatzis E, Papamichael C, Lekakis J. Caffeine acute effects on arterial stiffness, wave reflections and central aortic pressures. Am J Hypertens, 2005;18: 129 – 136.
- Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M. Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy non-smokers. *Am Heart J.* 2004;147:e5.

- Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension.* 2001;38:932-937.
- Pendurthi U., Williams T., Rao V. Resveratrol, a polyphenolic compround found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells. A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999; 19: 419 – 426.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Lacopino S, Scozzafava A. Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. Circulation, 2001; 104: 191 – 196.
- Pikaar N, Wedel M, van der Beek E, van Dokkum W, Kempen H, Kluft C, Ockhuizen T, Hermus R. Effects of moderate alcohol consumption on platelet aggregation, fibrinolysis and blood lipids. Metabolism, 1987; 36(6): 538 – 543.
- Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of the endothelium in the vasodilator response to flow in vivo. Hypertension, 1985; 8: 37 - 44.
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Meditarranean diet and arterial blood pressure : the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. Am J Clin Nutr, 2004; 80: 1012 – 1018.
- Puddey I, Croft K. Alcohol, stroke and coronary heart disease. Are there antioxidants and prooxidants in alcoholic beverages that might influence the development of atherosclerotic cardiovascular disease? Neuroepidemiology, 1999; 18: 292 – 302.
- Quyyumi A. Endothelial function in health and disease: New insights into the genesis of cardiovascular disease. Am J Med, 1998; 105: S32 – 9.
- Quyyumi A. Prognostic value of endothelial function. Am J Cardiol, 2003; 91 (suppl): 19H – 24H.
- Raitakari O, Adams M, McCredie R. Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, bur no sustained beneficial effect. JACC, 2000; 35(6): 1616-1621.
- Reilly M, Delanty N, Lawson J. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic smokers. Circulation, 1996; 94:19-25.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. Lancet, 1992; 339: 1523 – 26.

- Renaud S, Ruf J. Effects of alcohol on platelet functions. Clin Chim Acta, 1996; 246: 77 – 89.
- Renaud S., Gueguen R., Siest G. Wine beer and mortality in middle-aged men from eastern France. Arch Intern Med, 1999; 159: 1865 – 1870.
- Ridker P, Vaughan D, Stampfer M, Glynn R, Hennekens C. Association of moderate alcohol consumption and plasma concentrations of endogenous tissue – type plasminogen activator. JAMA, 1994; 272 (12): 929 – 933.
- Ridker P., Hennekens C., Stampfer M., Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. Lancet, 1998; 351: 88 – 92.
- Rimm E, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer M. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease, meta – analysis of effects on lipids and haemostatic factor. Br Med J, 1999; 319: 1523 – 1528.
- Rimm E., Klatsky A., Grobbee D., Stampfer M. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits? BMJ, 1996; 312: 731 – 736.
- Rimm EB., Katan MB., Ascherio A., Stampfer MJ., Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. Ann Intern Med, 1996; 125: 384-389.
- Rodriguez – Rodriguez R, Herrera M, Perona J, Ruiz – Gutierrez V. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in “orujo” oil, on rat aorta. Br J Nutr, 2004; 92: 635 – 642.
- Rosenkranz S, Knirel D, Dietrich H, Flesch M, Erdmann E, Bohm M. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the French Paradox. FASEB J, 2002; 16(14): 1958 – 1960.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999; 340: 115 – 126.
- Ruf J, Berger j, Renaud S. Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats. Relation to tannins and lipid peroxidation. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995; 1: 140 – 144.
- Ruf J. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. Drugs Exp Clin Res, 1999; 25: 125 – 131.
- Russo G., Leopold S., Lascalzo J. Vasoactive substances: NO and endothelial dysfunction in atherosclerosis. Vasc Pharmacol, 2002; 38: 259 – 269.

- Russo P., Tedesco I., Russo M., Venezia A., Cicala C. Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2001; 11(1): 25-9.
- Safar M, Levy B, Struijker – Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. Circulation, 2003; 107: 2864 – 2869.
- Salovainen MJ., Kesäniemi YA. Effects of alcohol on lipoproteins in relation to coronary heart disease. Curr Opin Lipidol, 1995; 6: 243-50.
- Sazonova IY., Robinson BR., Gladysheva IP., Castellino FJ. Alpha domain deletion converts streptokinase into a fibrin-dependent plasminogen activator through mechanisms akin to staphylikinase and tissue plasminogen activator. J Biol Chem 2004; 33: 245 – 248.
- Scalbert A, Johnson I, Saltmarsch M. Polyphenols: antioxidants and beyond. Am J Clin Nutr, 2005; 81(suppl): 215S – 217S.
- Schiffrin E. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. AJH, 2002; 15: 115 – 122.
- Seigneur M, Bonnet J, Dorian B. Effect of the consumption of alcohol, white wine and red wine on the platelet function and serum lipids. J Appl Cardiol, 1990; 5: 215 – 222.
- Selwyn A. Prothrombotic and antithrombotic pathways in acute coronary syndromes. Am J Cardiol, 2003; 91(suppl): 3 – 11.
- Semerano N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. Thromb Haemost, 1997; 78: 759 – 764.
- Sen C, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. Mol Cell Biochem, 2001; 216(1-2): 1 – 7.
- Siebenhofer A, Kemp CRW, Sutton AJ, Williams B, The reproducibility of central aortic blood pressure measurements in healthy subjects using applanation tonometry and sphygmocardiography. *J Hum Hypertens* 1999, 13: 625-629.
- Sierksma A, Lebrun C, van der Schouw Y, Grobbee D, Lamberts S, Hndricks H, Bots M. Alcohol consumption in relation to aortic stiffness and aortic wave reflections: a cross – sectional study in healthy postmenopausal women. Arterioscler, Thromb Vasc Biol, 2004; 24: 342 – 348.

- Sierksma A, Muller M, van der Schouw YT, Grobbee DE, Hendriks HF, Bots ML. Alcohol consumption and arterial stiffness in men. J Hypertens, 2004; 22(2):357-62.
- Singleton V. L. Rossi J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybic – phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16:144-158.
- Slomiany BL., Piotrowski J., Slomiany A. Role of endothelin-1 and interleukin-4 in buccal mucosal ulcer healing:effect of chronic alcohol ingestion. Biochem Biophys Res, 1999; 257 (2): 373 – 7.
- Soleas G., Diamandis E., Goldberg D. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. Journal of clinical laboratory analysis 1997; 11:287-313
- Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. Br Heart J, 1995; 74: 247 - 53.
- Sorensen KE, Dorup I, Hermann AP, Mosekilde L. Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function. Circulation, 1998; 97: 1234 – 8.
- Stampfer M, Corditz G, Willet W, Splizer F, Hennekens C. A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. N Engl J Med, 1988; 31: 267 – 273.
- Stein J., Keevil J., Wiebe D., Aeschlimann S., Folts J. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the succeptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation, 1999; 100: 1050-1055.
- Sun H., Mayan W. Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. Am J Physiol, 2001; 280: H992 - H1001.
- Tamura Y., Osuga JI., Adachi H., Tozawa RI., Ohashi K., Kadowaki T., Tsujimoto M., Arai H., Yamada N. Scavenger receptor expressed by endothelial cells-I mediates the uptake of acetylated LDL by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. J Biol Chem, 2004; 36: 452 – 456.
- Tanaka H, Safar M. Influence of lifestyle modification on arterial stiffness and wave reflections. Am J Hypertension, 2005; 18: 137 – 144.

- Teede H, McGrath B, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel P. Isoflavones reduce arterial stiffness. A placebo – controlled study in men and postmenopausal women. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003; 23: 1066 – 1071.
- Teragawa H, Fukuda Y, Matsuda K, Higashi Y, Yamagata T, Matsuura H, Chayama K. Atherosclerosis, 2002; 165: 145 – 152.
- Teramoto K, Daimon M, Hasegawa R, Toyoda T, Sekine T, Kawata T, Yoshida K, Komuro I. Acute effect of oral vitamin C on coronary circulation in young healthy smokers. Am Heart J, 2004; 148 (2): 300 – 305.
- Tjonneland A. Gronbaek M., Stripp C., Overvad K. Wine intake and diet in a random sample of 48763 Danish men and women. Am J Clin Nutr, 1999; 69: 49 – 54.
- Toto – moukouoto J, Achimastos A, Asmar R, Hugues C, Safar M. Pulse wave velocity in patients with obesity and hypertension. Am Heart J, 1986; 112: 136 – 140.
- Tracy RP, Psaty BM, Macy E. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. Arterioscler Tromb Vasc Biol, 1997; 17: 2167 – 2176.
- Trepakova S., Cohen RA, Bolotina VM. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca-ATPase-dependent refilling of Ca stores. Circ Res, 1999; 84: 201 – 209.
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. N Engl J Med, 2003; 348: 2599-608.
- Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. Arch Intern Med, 2005; 165: 929-35.
- Truelsen T., Gronbaek M., Schnohr P., Boysen G. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke. The Copenhagen City Heart Study. Stroke, 1998; 29: 2467 – 2472.
- Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato E, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. Circulation, 2002; 105: 1155 – 1157.
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. Journal of Nutritional Biochemistry 2002; 13: 636-644.
- Uehata A, Lieberman EH, Gerhard MD. Noninvaseve assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. Vasc Med, 1997; 2: 87 - 92.

- Uehata A, Takase B, Nishioka T, Kitamura K, Akima T, Kurita A, Isojiima K. Effect of quinapril versus nitrendipine on endothelial dysfunction in patients with systemic hypertension. Am J Cardiol, 2001; 87: 1414 – 1416.
- Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takewshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. J Clin Invest, 1997; 100: 2793 – 9.
- van de Wiel A, van Golde P, Hart H. Blessing of the grape. Eur J Int Med, 2001; 12: 484 – 489.
- van de Wiel A, van Golde P, Kraaijenhagen R, von dem Borne P, Bouma B, Hart H. Acure inhibitory effect of alcohol on fibrinolysis, Eur j Clin Invest, 2001; 31: 164 – 170.
- van der Schouw Y, PIjpe A, Lebrun C, Bots M, Peeters P, Staveren W, Lamberts W, Grobbee D. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002; 22: 1316 – 1322.
- van Dirk R, Bakker S, Scheffer P, Heine R, Stehouwer C. Associations of metabolic variables with arterial stiffness in type 2 diabetes mellitus: focus on insulin sensitivity and postprandial triglyceridaemia. Eur J Clin Invest, 2003; 33 (4): 307 – 315.
- vanGolde P, Sloots L, Vermeulen W, Wielders J, Hart H, Bouma B, van de Wiel A. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. Atherosclerosis, 1999; 147: 365 – 370.
- Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. Eur Heart J, 1998; 19(suppl J): J7 – 15.
- Venkov C, Myers P, Tanner M, Su M, Vaughan D. Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. Thromb Haemost, 1999; 81: 638 – 642.
- Viles-Gonzalez J, Fuster V, Badimon J. Atherothrombosis: A widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. European Heart Journal, 2004; 25: 1197 – 1207.
- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil. Medical Research Reviews 2002; 22 (1): 65-75.
- Vita j. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. Am J Clin Nutr, 2005; 81 (suppl): 292S – 297S.

- Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? Circulation, 2002; 106: 640 - 2.
- Vlachopoulos C, Hirata K, O'Rourke M. Pressure-altering agents affect central aortic pressure more than is apparent from upper limp measurements in hypertensive patients. The role of arterial wave reflections. *Hypertension.* 2001; 38: 1456-1460.
- Vlachopoulos C, Alexopoulos N, Panagiotakos D, O'Rourke M, Stefanadis C. Cigar smoking has an acute detrimental effect on arterial stiffness. Am J Hypertens, 2004; 17 (4): 299 – 303.
- Vogel RA, Correti MC, Plotnick GD. A comparison of the assessment of flow-mediated brachial artery vasodilation using upper versus lower arm arterial occlusion in subjects with and without coronary risk factors. Clin Cardiol, 2000; 23: 571 - 5.
- Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. JACC, 2000; 36(5): 1455-60.
- Waddell TK, Dart AM, Medley TL, Cameron JD, Kingwell BA. Carotid pressure is a better predictor of coronary artery disease severity than brachial pressure. *Hypertension*. 2001;38:927-931.
- Wahlqvist M, Lo C, Myers K. Fish intake and arterial wall characteristics in healthy people and diabetic patients. Lancet, 1989; 2: 944 – 946.
- wan de Wiel A, van Golde P, Kraaijenhagen R, von dem Borne P, Bouma B, Hart H. Acute inhibitory effect of alcohol on fibrinolysis. Eur J Clin Invest, 2001; 31(2): 164-170.
- Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Berent R, Eber B. Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. Circulation, 2004; 109: 184 – 189.
- Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Lamm G. Increased arterial wave reflections predict severe cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary interventions. Eur Heart J, 2005; (medline, ahead of print).
- Welch GN, Loscalzo J. Homocycteine and atherothrombosis. N Engl J Med, 1998; 338: 1042 – 1050.
- Whelan A, Sutherland W, McCormick M, Yeoman D, Jong S, Williams M. Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. Int Med J, 2004; 34: 224 – 228.
- Wilansky M., Gokce N., Keaney J., Vita J. The clinical implications of endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2003; 42: 1149 – 1160.

- Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. J Hypertens, 1998; 16(12 Pt 2):2079-84.
- Wilkinson I, Megson I, MacCallum H, Sogo N, Cockecroft J, Webb D. Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. J Cardiovasc Pharmacol, 1999; 34: 690 – 693.
- Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft J, Newby D, Webb D. The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. *J Physiol.* 2000; 525: 263-270.
- Wilkinson I, MacCallum H, Cockeroft J, Webb D. Inhibition of basal nitric oxide syntesis increases aortic augmentation index and pulse wave velocity in vivo. Br J Clin Pharmacol, 2002a; 53: 189 – 192.
- Wilkinson I, Qasem A, McEniery C, Webb D, Avolio A, Cockecroft J. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. Circulation, 2002b; 105: 213 – 217.
- Willett WC, Green A, Stampfer MJ. Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes. N Engl J Med, 1987; 317: 1303 – 1309.
- Williams SB. Impaired Nitric Oxide-mediated vasodilation in patients with Non-insulin dependent Diabetes Mellitus. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 567 – 74.
- Wollin S, Jones P. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. J Nutr, 2001; 131: 1401 – 1404.
- Wollny T, Aiello L, di Tommaso D. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. Br J Pharmacol, 1999; 127: 747 – 755.
- Woo KS. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. Circulation, 1997; 96: 2542 – 4.
- Woodman RJ, Playford DA, Watts GF. Improved analysis of brachial artery ultrasound using a novel edge-detection software system. J Appl Physiol, 2001; 91: 929 - 37.
- World Health Organization, 2003. Global strategy on diet, physical activity and health. Cardiovascular disease (CVD).

- Wu G, Haynes T, Yan W, Meinenger C. Glutamine metabolism ot glycosamine is necessary gor glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis, Biochem J, 2001; 353: 245 – 252.
- Wu G, Meinenger C. Arginine, nutrition and cardiovascular function. J Nutr, 2000; 130: 2626 – 2629.
- Wu G, Meininger C. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. Annu Rev Nutr, 2002; 22: 61 – 86.
- Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Collier G, Nestel P. Arterial compliance, blood pressure, plasma leptin and plasma lipids in women are improved with weight reduction equally with a meat – based diet and a plant – based diet. Metabolism, 1998; 47: 1308 – 1314.
- Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long – term cigarette smoking impairs endothelium – dependent coronary arterial vasodilator function. Circulation, 1995; 92: 1094 – 1100.
- Zenebe W, Pechaoova O, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. Physiol Res, 2003; 52: 425 – 432.
- Zhang J, Ying X, Lu Q. A single high dose of vitamin C counteracts the acute negative effect on microcirculation induced by smoking a cigarette. Microvasc Res, 1999; 58 (3): 305-11
- Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, Larsson B, Hogestaatt ED. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. Br J Pharmacol, 1997; 121: 141 – 149.