

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ:

«ΠΡΩΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ 14 ΗΜΕΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ
ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΚΡΑΣΙΟΥ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ
ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΜΥΩΝ: ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ»

ΜΑΡΑΒΕΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Χαριτίμη Νέπκα, Κυτταροπαθολόγος

ΛΑΡΙΣΑ 2021

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Χαρίτινη Νέπκα

Χριστίνα Τσιτσιμπίκου

Δημήτριος Κουρέτας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο προσωπικό του εργαστηρίου φυσιολογίας της κτηνιατρικής σχολής του ΑΠΘ για την προμήθεια και τη φροντίδα των πειραματόζων και την παροχή διευκολύνσεων κατά την εκτέλεση του πειράματος. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου προπαιδευτικής της κτηνιατρικής σχολής του ΑΠΘ για τον χειρισμό και την ανάλυση των δειγμάτων αίματος, το προσωπικό του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του ΕΚΠΑ για την προετοιμασία του εκχυλίσματος, το προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του ΠΘ για την προετοιμασία των δόσεων, το προσωπικό του Γ΄ Κτηνιατρικού Νοσοκομείου για τη διευκόλυνση στη χρήση του μικροσκοπίου. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αρχικτηνίατρο Καραβάνη Εμμανουήλ, ειδικό ιστολόγο, για την πολύτιμη βοήθειά του στην εκτίμηση των ιστολογικών τομών.

Τέλος, τις ευχαριστίες μου ήθελα να εκφράσω στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Χαριτίνη Νέπκα, κυτταροπαθολόγο, για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές τόσο κατά το σχεδιασμό και εκτέλεση του πειραματισμού, όσο και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<u>Σελίδες</u>
1. <u>Εισαγωγή</u>	1-2
2. <u>Υλικά και μέθοδοι</u>	
2.1 Χημική ουσία και προετοιμασία δόσης	2
2.2 Ζώα και συνθήκες διαβίωσης	3
2.3 Χορήγηση ουσίας	3
2.4 Έλεγχος υγείας και ανάπτυξης	3-4
2.5 Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι	4
2.6 Νεκροτομή	4-5
2.7 Ιστοπαθολογία	5
2.8 Στατιστική	5
3. <u>Αποτελέσματα</u>	
3.1 Σωματικό Βάρος και Ανάπτυξη	6
3.2 Κλινική εικόνα	6
3.3 Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι	6-7
3.4 Νεκροτομή	7-8
3.5 Ιστοπαθολογική εκτίμηση	8-10
4. <u>Συζήτηση</u>	11-14
5. <u>Συμπεράσματα</u>	14
6. <u>Βιβλιογραφία</u>	15-19
7. <u>Παραρτήματα</u>	
I. Δελτίο κλινικής εξέτασης	20
II. Δελτίο νευρολογικής εξέτασης	21
III. Δελτίο νεκροτομής	22-23
IV. Δελτίο ιστολογικής εξέτασης	24-26
V. Φωτογραφικό υλικό από την ιστολογική εξέταση των οργάνων	27

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν αντιοξειδωτικά μόρια τα οποία περιέχονται σε μεγάλο αριθμό τροφίμων και ποτών. Πλήθος μελετών υποστηρίζουν την ευεργετική επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ένταξή τους στη ανθρώπινη τροφική αλυσίδα, είτε σαν συμπληρώματα διατροφής, είτε μέσω της κατανάλωσης τροφίμων, που τις εμπεριέχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εκτός των ευεργετικών επιδράσεων θα πρέπει να αποδειχθεί η ασφάλειά τους από τοξικολογικής πλευράς. Το κόκκινο κρασί αποτελεί ένα τέτοιο τρόφιμο και στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια να εξαχθούν πρώιμα συμπεράσματα για την ασφάλεια της χορήγησης από το στόμα εκχυλίσματος πλούσιου σε πολυφαινόλες από κόκκινο κρασί ποικιλίας ξινόμαυρο. Για το σκοπό χορηγήθηκε από το στόμα σε επίμυες φυλής Wistar για διάστημα 14 ημερών εκχύλισμα από κρασί πλούσιου σε πολυφαινόλες στη δόση των 25mg πολυφαινολών ανά kg ΣΒ και ελέγχθηκε η επίδρασή του στο βάρος, στην ανάπτυξη, στην κλινική, αιματολογική, βιοχημική, νεκροτομική και ιστοπαθολογική εικόνα μεταξύ της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα και της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Συμπερασματικά, η χορήγηση από το στόμα εκχυλίσματος κρασιού πλούσιου σε πολυφαινόλες κρίνεται ασφαλής για τη δόση και την οδό χορήγησης για το διάστημα που χορηγήθηκε και κρίνεται σκόπιμη η διεξαγωγή εκτενέστερων τοξικολογικών μελετών, ώστε να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα.

ABSTRACT

Polyphenols are antioxidant molecules found in many foods and drinks. Numerous studies support their beneficial effect on human health. As a result, a great deal of interest in inclusion of polyphenols in the human food chain, either as food supplements or as diet modification aiming in increased consumption of natural foods with high concentration of polyphenols, is anticipated. However, in addition to the beneficial effects, their toxicological safety should be demonstrated. Red wine is a good representative of this food category, and the aim of this study is to draw early conclusions about the safety of an oral extract rich in polyphenols from red wine of the sour black variety. For this purpose, Wistar-bred rats were administered orally for a period of 14 days a wine extract, rich in polyphenols, at a dose of 25mg polyphenols per kg of BW. The effects of the extract on weight and development as well as on clinical, hematological, biochemical, pathological and histological examinations were analyzed between the group receiving the extract and the control group. The results of the above analyses showed that there is no statistical difference between the two groups. In conclusion, oral administration of polyphenol-rich wine extract is considered safe for the dose and route of administration for the period administered, while it is appropriate to be followed by more extensive toxicological studies in order to arrive in a more complete toxicological assessment.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιοξειδωτικών μορίων, τα οποία περιέχονται σε πολλά τρόφιμα μεταξύ των οποίων το πράσινο τσάι, η σοκολάτα, τα σταφύλια και το κρασί. Μελέτες, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, έχουν αποδείξει ότι δρουν προστατευτικά απέναντι σε καρδιοπάθειες, αρθροπάθειες, νευροπάθειες, στην αρτηριοσκλήρυνση και στον σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, εκτός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων έχουν αγγειοδιασταλτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαλλεργικές ιδιότητες, συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών, και αποτελούν αναστολείς συσσώρευσης αιμοπεταλίων (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49). Επίσης, αναφέρεται ότι έχουν προστατευτικό ρόλο στην εμφάνιση και ανάπτυξη καρκινικών όγκων (2,14,17), ενώ παράλληλα, μελέτες αποδεικνύουν ότι οι πολυφαινόλες δρουν προστατευτικά έναντι του ηλιακού εγκαύματος και της φωτογήρανσης, λόγω της μείωσης των επιπτώσεων της ακτινοβολίας UVA και UVB στο δέρμα (1, 3, 4,10).

Εξαιτίας των παραπάνω ιδιοτήτων, οι πολυφαινόλες έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, είτε ως συμπληρώματα διατροφής, είτε μέσω εμπλουτισμού της καθημερινής διατροφής με τροφές που τις περιέχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εκτός από την επιβεβαιωμένη ευεργετική δράση τους στον ανθρώπινο οργανισμό, πρέπει να εξεταστεί η ασφάλειά τους από τοξικολογικής πλευράς και να καθοριστούν οι ασφαλείς δόσεις χορήγησης ή κατανάλωσής τους.

Το κρασί, ως προϊόν ζύμωσης των σταφυλιών περιέχει πολυφαινόλες από ολόκληρο το σταφύλι και ειδικά το κόκκινο κρασί, εξαιτίας της μεθόδου οινοποίησης, περιέχει περισσότερες πολυφαινόλες συγκριτικά με το λευκό. Το κρασί περιέχει μεγάλη ποικιλία από υδατοδιαλυτές πολυφαινόλες, οι οποίες ανήκουν σε δύο κατηγορίες. Τα φλαβονοειδή (φλαβανόλη, φλαβονόλη και ανθοκυανίνες) και τα μη φλαβονοειδή (φθενολικά οξέα, ταννίνες και σπιλβένια) (16,17). Το 60-70% των πολυφαινολών περιέχονται στους σπόρους των σταφυλιών. Στο φλοιό των σταφυλιών κυριαρχεί ένας τύπος πολυφαινολών, που ονομάζεται ανθοκυανίνες και ανέρχονται στο 30% των συνολικών πολυφαινολών των σταφυλιών, ενώ μόλις το 4% των πολυφαινολών τους ανευρίσκονται στη σάρκα (18,19).

Ο κύριος σκοπός της μελέτης είναι να εκτιμηθούν πιθανές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σε επίμυες κατά την χορήγηση από το στόμα, για διάστημα 14 ημερών, εκχυλίσματος κρασιού ποικιλίας ξινόμαυρου πλούσιου σε πολυφαινόλες. Επίσης, θα εκτιμηθεί η ανάπτυξη, η κλινική, αιματολογική και βασική βιοχημική εικόνα κατά την χορήγηση από το στόμα του εκχυλίσματος για το παραπάνω διάστημα, σε δόση 25mg πολυφαινολών ανά κιλό σωματικού βάρους, δόση που αντιστοιχεί στην ημερήσια κατανάλωση 18ml /kg κόκκινου κρασιού ποικιλίας ξινόμαυρου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

2.1. Χημική ουσία και προετοιμασία δόσης

Το εκχύλισμα κρασιού παρασκευάστηκε από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του ΕΚΠΑ. Χρησιμοποιήθηκε κρασί ποικιλίας ξινόμαυρου. Το κρασί συμπυκνώθηκε σε Rotavapor μέχρι μείωσης του μισού όγκου του, ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης, η οποία περιέχεται φυσικά στο κρασί και η παρουσία της παρεμποδίζει την κατακράτηση των πολυφαινολών από την ρητίνη. Στη συνέχεια, ακολούθησε κατεργασία με ρητίνες προσρόφησης. Η προσρόφηση των πολυφαινολών έγινε με τη χρήση πολυμερικής ρητίνης και η ανάκτηση αυτών με τη χρήση οργανικού διαλύτη. Τέλος, ακολούθησε ξήρανση του δείγματος σε Rotavapor και λυοφιλιοποίησή του με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των διαλυτών και τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους. Από την ανάλυση προέκυψε ότι μια φιάλη κρασί (750 ml) ποικιλίας ξινόμαυρου περιέχει 3.88 gr φαινολικού φορτίου που αντιστοιχεί σε 0.51% απόδοση φαινολών (ανά 100 ml οίνου).

Η δόση καθορίστηκε στα 25mg πολυφαινολών ανά kg ΣΒ. Εφόσον το εκχύλισμα είναι 26.7% πολυφαινολικό απαιτούνται 34.5mg εκχυλίσματος αν επίμυ την ημέρα (93.2mg εκχυλίσματος /kg/d). Για τον υπολογισμό των δόσεων χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή του σωματικού βάρους των επίμυων κατά την έναρξη του πειραματισμού. Ακολούθησε παρασκευή των δόσεων με διάλυση 34.5mg εκχυλίσματος σε 1.5ml απεσταγμένου νερού, το οποίο χορηγούνταν καθημερινά στο πόσιμο νερό που

καταναλώνονταν από τους επίμυες. Για την ομάδα ελέγχου παρασκευάστηκαν αντίστοιχα δόσεις με 1.5 ml απεσταγμένου νερού.

2.2. Ζώα και συνθήκες διαβίωσης

Χρησιμοποιήθηκαν 12 αρσενικοί επίμυες φυλής Wistar, ηλικίας 20 εβδομάδων προερχόμενοι από το Εργαστήριο Φυσιολογίας της Κτηνιατρικής σχολής του ΑΠΘ. Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες των 6 ατόμων. Στεγάστηκαν σε κλουβιά, ομαδικά (3/κλουβί), σε θερμοκρασία $22 \pm 2^\circ\text{C}$, με σχετική υγρασία 40-70% και τεχνητό φωτισμό με 12ωρη φωτοπερίοδο ημέρας/νύκτας. Ακολούθησε περίοδος προσαρμογής μιας εβδομάδας με σκοπό να εγκλιματιστούν με τα άτομα της κάθε ομάδας. Κατά την διάρκεια του πειραματισμού παρέχονταν νερό και ξηρά τροφή υπό μορφή πέλλετ προοριζόμενη για ζώα εργαστηρίου, καθημερινά και κατά βούληση. Κάθε ζώο σημάνθηκε με οικολογικό χρώμα στο τρίχωμα, ώστε να αναγνωρίζεται.

2.3. Χορήγηση ουσίας

Στα άτομα της μιας ομάδας χορηγήθηκε με το πόσιμο νερό 1.5 ml απεσταγμένου νερού και χαρακτηρίστηκαν ως ομάδα ελέγχου (control) ενώ στα άτομα της άλλης ομάδας χορηγήθηκε 1.5 ml διαλύματος απεσταγμένου νερού και εκχυλίσματος και χαρακτηρίστηκαν ως ομάδα πολυφαινολών (test). Το εκχύλισμα χορηγούνταν καθημερινά την ίδια ώρα με το πόσιμο νερό για 14 ημέρες.

2.4. Έλεγχος υγείας και ανάπτυξης

Το σωματικό βάρος ελέγχθηκε την 1^η ημέρα της χορήγησης, την 7^η ημέρα και την ημέρα της ευθανασίας. Η κατανάλωση τροφής και νερού καταγράφονταν καθημερινά. Ο ρυθμός ανάπτυξης υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ του τελικού βάρους και του αρχικού βάρους διαιρούμενο με τις ημέρες χορήγησης.

Κατά τη διάρκεια της χορήγησης πραγματοποιούνταν καθημερινά έλεγχος της συμπεριφοράς τους εντός και εκτός κλωβού και κλινικός έλεγχος για την εμφάνιση συμπτωμάτων από το δέρμα, τους οφθαλμούς, το αναπνευστικό, το ουρογεννητικό, το πεπτικό, το νευρικό, το καρδιαγγειακό και το μυοσκελετικό. 12 ώρες μετά την χορήγηση ελέγχονταν για θνησιμότητα ή θνητότητα. Οι παρατηρήσεις καταγράφονταν σε πίνακες, υπόδειγμα του οποίου περιλαμβάνεται στο Παράρτημα Ι. Την 1^η ημέρα, την 7^η και την 14^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νευρολογική εξέταση, τα αποτελέσματα τις οποίες

καταγράφηκαν σε αντίστοιχα δελτία, υπόδειγμα των οποίων παρατίθενται στο Παράρτημα II.

Σε περίπτωση έντονης διαταραχής της ευζωίας, η οποία δεν αναμένεται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, θα διενεργούνταν ευθανασία και νεκροτομή. Ο χειρισμός και η ευθανασία των πειραματόζων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες για την φροντίδα και διαχείριση των ζώων εργαστηρίου της ΕΕ. Όλοι οι χειρισμοί γινόταν την ίδια ώρα κάθε πρωινό.

2.5. Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι.

Στο τέλος της μελέτης, οι επίμυες στερήθηκαν τροφή για μια νύκτα και αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο. Κριτήριο για το βάθος της αναισθησίας ήταν η μύση της κόρης του οφθαλμού και επικουρικά ο έλεγχος του αντανακλαστικού του βλεφάρου και του αντανακλαστικού της απόσυρσης του άκρου ποδός μετά από νύξη. Στη συνέχεια ακολούθησε διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας και συλλογή αίματος με καρδιακή παρακέντηση από την δεξιά κοιλία (1 mL σε φιαλίδιο αιμοληψίας με EDTA για αιματολογική εξέταση και 2 mL σε φιαλίδιο με ηπαρίνη για βιοχημικές). Το αίμα φυγοκεντρήθηκε στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά, και ο ορός απομακρύνθηκε αμέσως. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία εντός 4-6 ωρών στο εργαστήριο προπαιδευτικής της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ.

Προσδιορίστηκαν οι ακόλουθες αιματολογικές παράμετροι με έναν αιματολογικό αναλυτή ADVIA120, (Siemens Healthineers): αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνη, αιματοκρίτης, μέσος όγκος ερυθρών, μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης, μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός αιμοπεταλίων και μέσος όγκο αιμοπεταλίων. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι βιοχημικές παράμετροι: αλανίνο-αμινοτρανσφεράση (ALT), αλκαλική φωσφατάση (ALP), ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, κρεατινίνη, ουρία, γ-GT, με αναλυτή VitalabFlexorE, VitalScientificN.V.,(TheNetherlands).

2.6. Νεκροτομή

Μετά την αιμοληψία, υπό την επίβλεψη του ισοφλουρανίου, ακολούθησε απεξάρθρωση του πρώτου αυχενικού σπονδύλου προκειμένου να επέλθει ο θάνατος. Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής νεκροψία, συμπεριλαμβανομένης της προσεκτικής

εξέτασης του σώματος (δέρμα, τρίχωμα, βλεννογόνοι), της στοματικής και ρινικής κοιλότητας, του πρωκτού, των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, της κρανιακής, της θωρακικής και της κοιλιακής κοιλότητας και των εσωτερικών οργάνων. Οι πνεύμονες, ο σπλήνας, η καρδιά, το ήπαρ, οι νεφροί, ο στόμαχος, ολόκληρος ο εντερικός σωλήνας (12δακτυλο, νήστιδα, ειλεός, παχύ έντερο), το πάγκρεας και οι όρχεις συλλέχθηκαν και καθαρίστηκαν από τους προσκολλημένους ιστούς (συνδετικό ιστό, λίπος). Αξιολογήθηκαν ως προς το μέγεθος, το χρώμα, την υφή, τη σύσταση και οι αλλοιώσεις περιγράφονταν αναλυτικά. Τα κοίλα όργανα και οι κοιλότητες αξιολογήθηκαν και ως προς το περιεχόμενο. Τα αποτελέσματα της νεκροτομικής εξέτασης καταγράφηκαν σε πίνακες, υπόδειγμα του οποίου περιλαμβάνεται στο Παράρτημα III.

2.7. Ιστοπαθολογία.

Τα όργανα σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης ουδέτερου pH, συγκέντρωσης 10%. Στη συνέχεια, οι ιστοί υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αλκοόλη, ενσωματώθηκαν σε παραφίνη, τεμαχίστηκαν σε φέτες πάχους 5μm και έγινε χρώση των τομών με αιματοξυλίνη/ ηωσίνη. Τα ιστοτεμάχια εξετάστηκαν κάτω από το φως μικροσκοπίου NIKON Eclipse E400 και αξιολογήθηκαν ως προς την αρχιτεκτονική, την κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση, τη φλεγμονώδη διήθηση, τις αιμοδυναμικές βλάβες και τις διαταραχές κυτταρικής αύξησης. Η ένταση των ευρημάτων χαρακτηρίστηκε ως ελάχιστη, ήπια, μέτρια, σημαντική και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε πίνακες, όμοιους με το υπόδειγμα του Παραρτήματος IV.

2.8. Στατιστική.

Για τα ποσοτικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε το Kolmogorov-Smirnov test, για να ελεγχθεί αν οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή και το Levene Median test, για τον έλεγχο της διασποράς. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής, τότε τα δεδομένα αναλύονταν με το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ANOVA. Για τις ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το Chi-Square (χ^2 test) και το Fisher's exact test, καθώς οι συχνότητες εμφάνισης ήταν <5 . Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS(IBM) έκδοση:26.0. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε μικρότερο από 0.05 ($p < 0,05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανάπτυξη.

Η καθημερινή από του στόματος χορήγηση πολυφαινολών από εκχυλίσμα κρασιού στη δόση των 25mg /kg ΣΒ δεν προκάλεσε ανεπιθύμητες ενέργειες ή θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

Το σωματικό βάρος της ομάδας των πολυφαινολών αυξήθηκε από 369.17 ± 22.96 gr. την 1^η ημέρα στα 396.33 ± 23.21 gr. την 14^η ημέρα. Στην ομάδα ελέγχου, το σωματικό βάρος αυξήθηκε από 370.17 ± 13.53 gr. την 1^η ημέρα στα 397.17 ± 13.66 gr. την 14^η. Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν 1.94 ± 0.12 gr /ημέρα στην ομάδα του εκχυλίσματος και 1.93 ± 0.05 gr /ημέρα στην ομάδα ελέγχου. Τόσο η αύξηση του σωματικού βάρους, όσο και ο ρυθμός ανάπτυξης δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Επιπλέον, οι ομάδες δεν διέφεραν ως προς την κατανάλωση τροφής και νερού.

3.2. Κλινική εικόνα

Κατά τη διάρκεια της χορήγησης πραγματοποιούνταν καθημερινά κλινική εξέταση των επίμυων και έλεγχος για την εμφάνιση συμπτωμάτων από το δέρμα, τους οφθαλμούς, το αναπνευστικό, το ουρογεννητικό, το πεπτικό, το νευρικό, το καρδιαγγειακό, το μυοσκελετικό κατά την οποία, δεν παρατηρήθηκαν παρεκκλίσεις από την φυσιολογική εικόνα, τόσο μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας, όσο και μεταξύ των ομάδων. Επίσης, κατά τον νευρολογικό έλεγχο την 1^η-7^η και 14^η ημέρα δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα σε κανένα ζώο και των δύο ομάδων.

3.3. Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι

Τα αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων που πραγματοποιήθηκαν στο τέλος της μελέτης κυμάνθηκαν εντός των φυσιολογικών ορίων που περιγράφονται στη βιβλιογραφία για την φυλή, το φύλο και την ηλικία των επίμυων. Παράλληλα, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η αιματολογική εικόνα αναλύεται στον Πίνακα 1. Επιπλέον, η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν επηρέασε τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν και στις δύο ομάδες. και οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ αυτών που περιγράφονται βιβλιογραφικά. Η βιοχημική εικόνα και των δύο ομάδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα αιματολογικών αναλύσεων.

Αιματολογικές παράμετροι (μονάδα μέτρησης)	Ομάδα ελέγχου n=6	Ομάδα εκχυλίσματος n=6
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων RBC(M/μl)	8.63 ± 0.45	8.42±0.21
Αιμοσφαιρίνη HGB (gr/dL)	15.97 ±0.75	15.46±0.58
Μέσος όγκος ερυθρών MCV(fl)	50.63±0.79	50.64±1.51
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης MCH(ρg)	16.58±0.15	16.42±0.83
Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης MCHC(gr/dL)	32.78±0.60	32.40±0.72
Αιματοκρίτης HCT (%)	44.78±2.94	45.68±1.19
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων WBC(K/μl)	5.78±0.92	5.34±2.34
Ουδετερόφιλα NEUT (K/μl %)	19.77±2.74	26.24±9.82
Λεμφοκύτταρα LYM (K/μl %)	75.67±2.52	70.10±9.99
Μονοκύτταρα MONO (K/μl %)	2.37±0.23	2.08±0.34
Ηωσινόφιλα EOS (K/μl %)	1.37±0.60	0.86±0.38
Βασεόφιλα BASO (K/μl %)	0.70±0.15	0.62±0.08
Αιμοπετάλια PLT (K/μl)	656.33±65.48	645.80±102.47
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων MPV (fl)	7.62±0.56	8.34±0.56

*Οι τιμές αναφέρονται σε μέσους όρους(Mean) ± την τυπική απόκλιση (SD)

Πίνακας 2. Αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων

Βιοχημικές παράμετροι	Ομάδα ελέγχου n=6	Ομάδα εκχυλίσματος n=6
Ολικές πρωτεΐνες (gr/dL)	6.7±0.21	6.68±0.23
Αλβουμίνη (g/ml)	4.32±0.12	4.3±0.10
Ουρία (mg/ml)	15.17±4.96	14.33±5.86
Κρεατινίνη(mg/ml)	0.6±0	0.47±0.06
ALT (U/lit)	200.33±11.5	250.67±53.45
ALP (U/lit)	53.17±5.27	51±1.41
γ-GT (U/lit)	0	0

*Οι τιμές αναφέρονται σε μέσους όρους (Mean) ± την τυπική απόκλιση (SD)

3.4. Νεκροτομή

Στο τέλος της μελέτης, οι επίμυες υποβλήθηκαν σε λεπτομερή μεταθανάτια εξέταση των εσωτερικών οργάνων, η οποία δεν έδειξε μακροσκοπικές διαφορές ως προς το μέγεθος, το χρώμα, την υφή και την σύσταση των οργάνων. Το περιεχόμενο των κοίλων οργάνων ήταν φυσιολογικό σε όλα τα ζώα και των δύο ομάδων. Επιπρόσθετα, οι

σωματικές κοιλότητες ήταν φυσιολογικές, χωρίς παθολογική συγκέντρωση υγρών και δεν έφεραν παθολογικές αλλοιώσεις στα τοιχώματα τους. Το τρίχωμα, το δέρμα, οι βλεννογόνοι, οι οφθαλμοί και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα δεν έφεραν αλλοιώσεις.

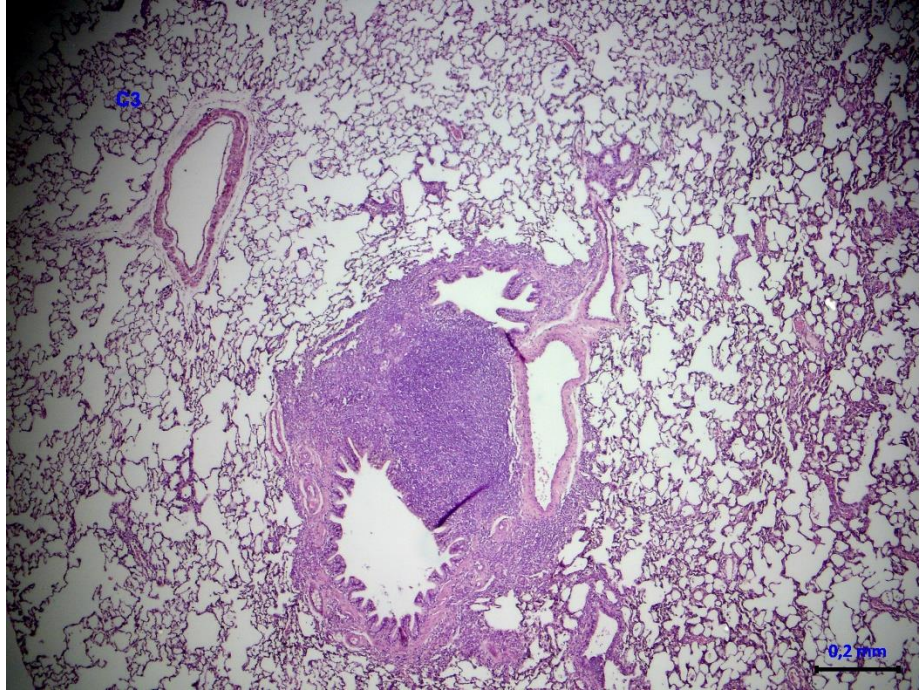
3.5. Ιστοπαθολογική εκτίμηση.

Κατά την ιστοπαθολογική εκτίμηση των οργάνων που συλλέχθηκαν δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις που να σχετίζονται με τη χορήγηση του εκχυλίσματος. Ωστόσο, διαπιστώθηκε η παρουσία αλλοιώσεων στους πνεύμονες, τόσο στα ζώα ελέγχου, όσο και στα ζώα που έλαβαν το εκχύλισμα. Οι αλλοιώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από αύξηση των μονοπύρηνων κυττάρων (κυρίως λεμφοκυττάρων) περιαγγειακά, εντοπισμένα γύρω από τις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σε όλους τους λοβούς των πνευμόνων και μερικές φορές επεκτείνονταν περιβρογχικά. Επιπλέον, ανευρέθηκαν εστιακές διηθήσεις μικτών φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και περιστασιακά ουδετερόφιλα) στο διάμεσο χώρο και στις κυψελίδες. Κατά την ιστολογική εξέταση δεν ανευρέθηκαν ενδείξεις μολυσματικών παραγόντων.

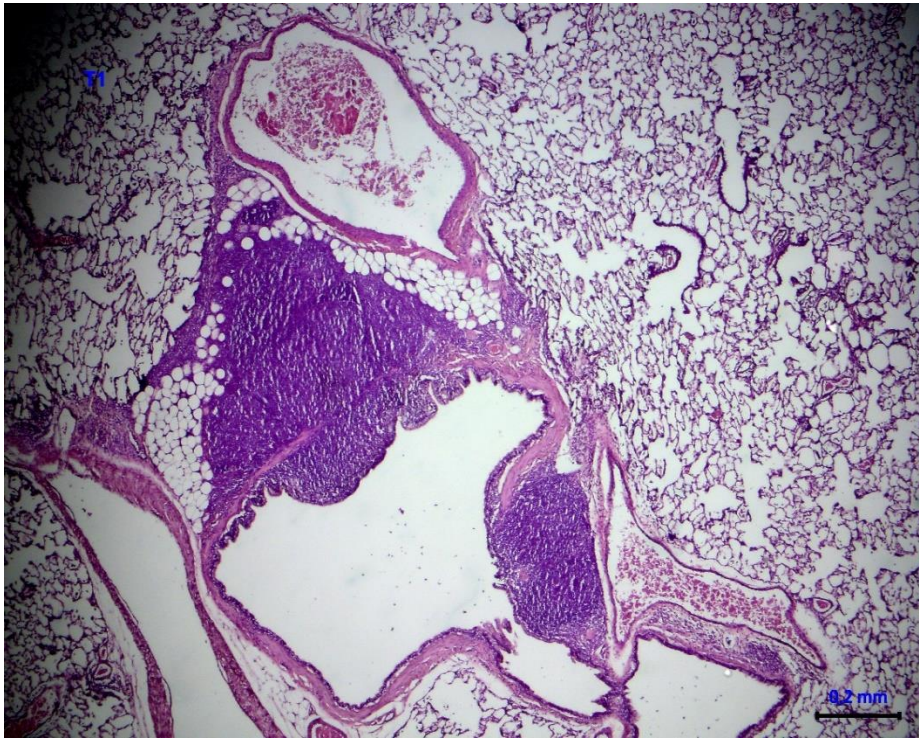
Ενδεικτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την παρουσία, την ένταση και το είδος των αλλοιώσεων, παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την παρουσία αλλοιώσεων για το σύνολο των πειραματόζων απεικονίζονται στον Πίνακα 4, ενώ τα αποτελέσματα ως προς την ένταση των αλλοιώσεων για το σύνολο των πειραματόζων με αλλοιώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων από την εξέταση των πνευμόνων δεν έδειξε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο ως προς την παρουσία, όσο και ως προς την ένταση των αλλοιώσεων.

Τυπικές αλλοιώσεις των πνευμόνων που ανευρέθηκαν σε ζώα ελέγχου απεικονίζονται στην εικόνα 1, ενώ στην εικόνα 2 απεικονίζονται αντίστοιχες αλλοιώσεις της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα.

Ενδεικτικές φωτογραφίες της ιστολογικής εξέτασης των οργάνων παρατίθενται στο Παράρτημα V.



Εικόνα 1. Πνεύμονας επίμυος. Ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 2. Πνεύμονας επίμυος. Ομάδα εκχυλίσματος.

Πίνακας 3. Καταγραφή αποτελεσμάτων της ιστολογικής εξέτασης των οργάνων (πνεύμονας), σύμφωνα με το δελτίο ιστολογικής εξέτασης του παραρτήματος IV.

Ομάδα ελέγχου	Ύπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Πνεύμονας Νο 1			
Αρχιτεκτονική	-	-	
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση	-	-	
Φλεγμονώδης διήθηση	+	1 (ήπια)	Παρουσία λεμφοκυττάρων περιαγγειακά, εντοπισμένα γύρω από τις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σε όλους τους λοβούς των πνευμόνων. Εστιακές διηθήσεις λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στο διάμεσο χώρο.
Αιμοδυναμικές βλάβες	-	-	
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης	-	-	

Πίνακας 4. Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την ύπαρξη αλλοιώσεων.

<u>Πνεύμονας</u> Παρουσία αλλοιώσεων	Ομάδα ελέγχου n=6	Ομάδα εκχυλίσματος n=6
Αρχιτεκτονική	- ¹	-
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση	-	-
Φλεγμονώδης διήθηση	4 ²	4
Αιμοδυναμικές βλάβες	-	-
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης	-	-

¹ : Απουσία αλλοιώσεων

²:Αριθμός ζώων με αλλοιώσεις συνολικά

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την ένταση των αλλοιώσεων.

<u>Πνεύμονας</u> Ένταση αλλοιώσεων	Ομάδα ελέγχου n=4	Ομάδα εκχυλίσματος n=4
Ελάχιστη	-	-
Ήπια	3 ¹	2
Μέτρια	1 ²	2
Σοβαρή	-	-

¹αριθμός ζώων με ένταση αλλοιώσεων ήπια

² αριθμός ζώων με ένταση αλλοιώσεων μέτρια

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, έχουν αποδοθεί στην κατανάλωση πολυφαινόλων. Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιοξειδωτικών μορίων που περιέχονται σε τρόφιμα με το κόκκινο κρασί να περιέχει μεγάλη ποικιλία πολυφαινόλων για τις οποίες η ασφάλεια της πρόσληψής τους στο σύνολό τους, ως συστατικό του κρασιού, δεν έχει μελετηθεί. Σε μία τοξικολογική μελέτη 28ημερών σε αρουραίους στην οποία δοκιμάστηκε η καθημερινή χορήγηση από το στόμα τρανς-ρεσβερατρόλης (η οποία εμπεριέχεται στο κρασί) στη δόση των 20mg/kg, δεν παρουσιάστηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες (27). Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι, αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη οξείας τοξικότητας χορηγώντας την τρανς-ρεσβερατρόλη στη δόση των 2gr/kg χωρίς να παρουσιαστούν δυσμενείς επιδράσεις στους αρουραίους. Σε μελέτη οξείας τοξικότητας από του στόματος χορήγησης εκχυλισμάτων από σπόρους και φλοιούς σταφυλιών η LD₅₀ ήταν μεγαλύτερη από 5000mg/kg, ενώ *in vitro* τεστ μεταλλαξιγένεσης (bacterial reverse mutation test) έδειξε ότι το παραπάνω εκχύλισμα ήταν ελαφρά μεταλλαξιγόνο (35). Υποχρόνιες μελέτες με εκχύλισμα από τον φλοιό ή/και τους σπόρους των σταφυλιών παρουσιάζουν μεγάλη ασφάλεια στην χορήγηση τους(29, 32, 33) με τη δόση NOAEL σε μία από αυτές να υπολογίζεται στα 600mg/kg/d για τους αρσενικούς αρουραίους (29).

Αν και η ημερήσια πρόσληψη πολυφαινόλων μέσω του κρασιού είναι συνήθως χαμηλή λόγω της περιεχόμενης σε αυτό αλκοόλης, εν τούτοις η σημαντική επίδραση στην υγεία θα μπορούσε να ωθήσει την παρασκευή συμπληρωμάτων από κρασί ή σταφύλια με υψηλές συγκεντρώσεις των περιεχομένων σε αυτό/ά πολυφαινόλων. Στις περιπτώσεις όπου μια ουσία ή ομάδα ουσιών εμφανίζει αρχικά επιβεβαιωμένα ευεργετικά αποτελέσματα *in vitro* και στη συνέχεια και *in vivo*, απαιτούνται αρχικές μελέτες τοξικότητας. Εάν βρεθούν ανεπιθύμητες ενέργειες, απαιτούνται επιπλέον πλήρεις τοξικολογικές μελέτες για να καθορίσουν την ασφαλή δόση χορήγησής τους. Για αυτόν τον λόγο, αξιολογήσαμε τις επιδράσεις του εκχυλίσματος κρασιού πλούσιου σε πολυφαινόλες μετά από επαναλαμβανόμενη από του στόματος χορήγηση για 14 ημέρες στη δόση των 25 mg πολυφαινόλων /kg ΣΒ σε επίμους. Αυτή η δοσολογία επιλέχθηκε καθώς αντιστοιχεί σε ημερήσια κατανάλωση κόκκινου κρασιού της ποικιλίας ξινόμαυρου 18ml/kg σωματικού βάρους, η οποία ισοδυναμεί με κατανάλωση σχεδόν δύο

φιαλών των 750ml την ημέρα, ποσότητα τουλάχιστο έξι φορές πάνω από τη μέση ημερήσια κατανάλωση. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η ποικιλία ξινόμαυρου καθώς παρατηρήθηκε να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικού φορτίου σε σχέση με άλλες ποικιλίες κόκκινου και λευκού κρασιού. Η διάρκεια της έκθεσης ήταν 14 ημέρες, με σκοπό να εξαχθούν πρώιμα συμπεράσματα για την ασφάλεια της ουσίας, ώστε στην συνέχεια, να διεξαχθούν εκτενέστερες μελέτες, μεγαλύτερης διάρκειας, σύμφωνα με τις οδηγίες του ΟΟΣΑ.

Η από του στόματος χορήγηση πολυφαινολών για διάρκεια 14 ημερών στη δόση των 25mg / kg ΣΒ δεν επηρέασε το τελικό σωματικό βάρος ή τον μέσο ρυθμό ανάπτυξης. Μελέτες στις οποίες χορηγήθηκε η τρανς-ρεσβερατρόλη (ως συστατικό του κρασιού) από το στόμα αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στο σωματικό βάρος ή το μέσο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου(27, 36, 37). Οι Wilson et al. (38) ανέφεραν ότι δεν υπήρξε διαφορά στο σωματικό βάρος και την κατανάλωση τροφής μεταξύ των κουνελιών που έλαβαν μια υπερχοληστερολαιμική δίαιτα η οποία περιείχε trans-ρεσβερατρόλη και των μαρτύρων. Ομοίως σε υποχρόνιες μελέτες με εκχυλίσματα από τους σπόρους και τον φλοιό σταφυλιών δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη των αρουραίων (29, 30). Σε μια μόνο υποχρόνια μελέτη με χορήγηση ρεσβερατρόλης από το στόμα, εξαιτίας της στατιστικά σημαντικής διαφοράς στην μείωση του σωματικού βάρους σχετιζόμενης με τη δόση και την αύξηση της χολερυθρίνης η δόση NOAEL καθορίστηκε στα 200mg/kg /d για τους αρουραίους και 600mg/kg/d για τους σκύλους (34). Αυτά τα αποτελέσματα, έρχονται να ενισχύσουν το εύρημα ότι το εκχύλισμα πολυφαινολών από κόκκινο κρασί δεν παρουσιάζει μεταβολές στην ανάπτυξη και είναι καλά ανεκτό από τα ζώα στη δόση και την οδό χορήγησης που δοκιμάστηκε.

Κατά τη διάρκεια της χορήγησης και την καθημερινή κλινική παρατήρηση δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά ευρήματα από τα βιολογικά συστήματα σε συμφωνία με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για μεγαλύτερα διαστήματα με εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν από μεμονωμένα μέρη των καρπών των σταφυλιών (28-30, 32- 33, 35).

Οι αιματολογικές παράμετροι δεν εμφάνισαν διαφορές μεταξύ των ομάδων και ήταν εντός των τιμών αναφοράς που προτείνονται για τη φυλή, το φύλο και την ηλικία των ζώων που εξετάστηκαν (5). Τα επίπεδα ALT και ALP, τα οποία υποδηλώνουν ηπατική

βλάβη, δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων. Οι τιμές των παραμέτρων που καθορίζουν τη νεφρική λειτουργία (ουρία και κρεατινίνη) δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα και της ομάδας των μαρτύρων και ήταν εντός των τιμών αναφοράς. Τα παραπάνω ευρήματα είναι ανάλογα των ευρημάτων μελετών στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μία συγκριμένη πολυφαινόλη ή εκχυλίσματα από μεμονωμένα μέρη του σταφυλιού (27- 30, 32-33, 35).

Η εξέταση των ζωτικών οργάνων που πραγματοποιήθηκε κατά την νεκροτομή δεν αποκάλυψε μεταβολές μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Κατά την ιστολογική εξέταση παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις σε ιστοτεμάχια που λήφθησαν από τους πνεύμονες και στις δύο ομάδες των πειραματόζων. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την νεκροτομική εξέταση δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς αλλοιώσεις ως προς το μέγεθος, το χρώμα, την υφή και τη σύσταση των πνευμόνων. Οι αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από αύξηση των μονοπύρηνων κυττάρων (κυρίως λεμφοκυττάρων) περιαγγειακά, εντοπισμένα γύρω από τις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σε όλους τους λοβούς των πνευμόνων και μερικές φορές επεκτείνονταν περιβρογχικά. Επιπλέον, ανευρέθηκαν εστιακές διηθήσεις μικτών φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και περιστασιακά ουδετερόφιλα) στο διάμεσο χώρο και στις κυψελίδες. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε διαφορά στις δύο εξεταζόμενες ομάδες τόσο ως προς την παρουσία όσο και ως προς την ένταση των αλλοιώσεων. Η κυρίαρχη παρουσία λεμφοκυττάρων παραπέμπει σε παρουσία χρόνιας φλεγμονής. Τα παραπάνω δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για φλεγμονή η οποία προϋπήρχε της έναρξης του πειραματισμού και δεν σχετίζεται με την λήψη του εκχυλίσματος. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι παραπάνω αλλοιώσεις στους πνεύμονες είναι συνήθεις σε ζώα εργαστηρίου, σε ποσοστό τουλάχιστον 50%, και μπορεί να οφείλονται σε πλήθος μολυσματικών παραγόντων (50, 51). Ακόμη, αναφέρεται ότι σε εκτροφές οι οποίες εγγυώνται την απουσία παθογόνων στα εκτρεφόμενα ζώα εργαστηρίου, κατά την δειγματοληπτική εξέταση πριν την έναρξη πειραματισμού αποκαλύπτονται ανάλογες αλλοιώσεις στους πνεύμονες, οι οποίες έχουν την τάση να αυτοπεριορίζονται καθώς οι επίμυες ωριμάζουν ηλικιακά (52, 53). Επίμυες ηλικίας ενός έτους είναι στην πλειοψηφία τους απαλλαγμένοι αλλοιώσεων. Η αυξημένη παρουσία των παραπάνω αλλοιώσεων κατά τις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους πιθανότατα οφείλεται στο ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα των επίμυων, το οποίο

καθώς ωριμάζει εξηγεί την τάση για προοδευτική μείωση των αλλοιώσεων. Μολυσματικοί παράγοντες, επίσης δεν έχουν ανευρεθεί κατά την ιστολογική εξέταση.

Σε μια μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας 13 εβδομάδων σε αρουραίους στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα από φλοιούς σταφυλιών παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στους παρωτιδικούς αδένες και στους νεφρούς υπολογίζοντας δόση NOAEL στα 600mg/kg για τα αρσενικά (29), ενώ σε άλλη υποχρόνια μελέτη σε αρουραίους με εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές και η δόση NOAEL καθορίστηκε στα 1410mg/kg /d για τους αρσενικούς αρουραίους (32). Σε υποχρόνια μελέτη 3 μηνών σε αρουραίους με χορήγηση εκχυλισμάτων από σπόρους και φλοιούς σταφυλιών από το στόμα η δόση NOAEL καθορίστηκε στα 1780mg/kg/d στα αρσενικά (33). Με βάση τα ιστοπαθολογικά δεδομένα των παραπάνω μελετών και τις δόσεις NOAEL για τα εκχυλίσματα από μέρη του καρπού του σταφυλιού, φαίνεται ότι η δόση των 25mg/kg/d πολυφαινολών από το εκχύλισμα κρασιού που χορηγήθηκε, είναι πολύ χαμηλή για να παρατηρηθούν αλλοιώσεις σε ζωτικά όργανα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η έλλειψη αρνητικών επιπτώσεων στην ανάπτυξη, η απουσία συμπτωμάτων, η φυσιολογική αιματολογική και βιοχημική εικόνα των δειγμάτων αίματος και η φυσιολογική εμφάνιση των ζωτικών οργάνων κατά την νεκροψία και η απουσία ιστοπαθολογικών ευρημάτων που να σχετίζονται με τη λήψη του εκχυλίσματος, υποδηλώνουν ότι η πρόσληψη εκχυλίσματος πολυφαινολών από κόκκινο κρασί (ποικιλίας ξινόμαυρου) είναι ασφαλής κάτω από τις συνθήκες όπου εξετάστηκε. Απαιτούνται ωστόσο, εκτενέστερες τοξικολογικές μελέτες, σύμφωνα με τις οδηγίες του ΟΟΣΑ, για να διαπιστωθεί, περαιτέρω, η ασφάλεια του εκχυλίσματος κόκκινου κρασιού και να καθοριστεί η δόση NOAEL.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Saric S, Sivamani RK., *Polyphenols and Sunburn*, Int J Mol Sci. 2016,17(9):1521.
2. Zhao J., Wang J., Chen Y., Agarwal R., *Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent*, Carcinogenesis. 1999, 20:1737–1745.
3. Katiyar S.K., Afaq F., Azizuddin K., Mukhtar H., *Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 2001,176:110–117.
4. Filip A., Daicoviciu D., Clichici S., Bolfa P., Catoi C., Baldea I., Bolojan L., Olteanu D., Muresan A., Postescu I. D., *The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B*, J. Photochem. Photobiol. B. 2011, 105:133–142.
5. Wilson J Filho, Caio Cezar Lima, Marcos Rodolfo Ramos Paunksnis, Ariana Aline Silva, Mauro Sérgio Perilhão, Marina Caldeira, Danilo Bocalini & Romeu Rodrigues de Souza, *Reference database of hematological parameters for growing and aging rats*, The Aging Male, 2018, 21:2: 145-148.
6. Giovannelli L., Testa G., De Filippo C. *et al.*, *Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo*, Eur J Nutr, 2000, 39: 207–212.
7. Maffei Facino R., Carini M., Aldini G., Berti F., Rosson G., Bombarde I. E., Morazzoni P., *Procyanidines from Vitis vinifera seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability*. Planta Med.,1996, 62: 495- 502.
8. Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Bagchi M., Tran M.X., Stohs S.J., *Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and E and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro*. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 1997, 95: 179- 189.
9. Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Bagchi M., Bagchi D.J., Balmoori J., Stohs S.J., *Protective effect of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation and peritoneal macrophage activation in mice*, Gen. Pharmacol., 1998, 30: 771- 776.
10. Bouhamidi R., Prevost V., Nouvelot A., *High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation*, C.R. Acad. Sci., 1998, 111: 3 (21): 31- 38.
11. Zafirov D., Bredy- Dobрева G., Litchev V., Papisova M., *Antiexudative and capillaritonic effects of proanthocyanines isolated from grape seeds (V. vinifera)*, Acta Physiol. Pharmacol. Bulg., 1990, 16: 50-54.

12. Halpern M.J., Dahlgren A.L., Laakso I., Seppanen-Laakso T., Dahlgren J., McAnulty P.A., *Red-wine polyphenols and inhibition of platelet aggregation: possible mechanisms and potential use in health promotion and disease prevention*, J. int. Med. Res., 1998, 26: 171- 180.
13. Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M., *Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention*, J. Clin. Lab. Ana l., 1997, 11: 287- 313.
14. Arai M., Miki M., Hosoyama R., Ariga H., Yamaji N., Kataoka S., *Chemopreventive effect of grape seed extract on intestinal carcinogenesis in the APCMin mouse*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1998, 39: 20.
15. Zhirong Wang, Yuanzhu Huang, Jianguang Zou, Kejiang Cao, Yinan Xu, Joseph M Wu, *Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro*, Int J Mol Med, 2002, 9(1):77-9.
16. Basli A, Soulet S, Chaher N, et al. *Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection*. Oxid Med Cell Longev. 2012.
17. Waterhouse AL. *Wine phenolics*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 957:21–36.
18. Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL., *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins*, Journal of Agricultural and Food Chemistry., 1995, 43(4):890–894.
19. Rice-Evans C. A, Miller N. J., *Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food*, Biochemical Society Transactions, 1996, 24(3):790–795.
20. Rice-Evans C. A, Miller N. J, Paganga G., *Antioxidant properties of phenolic compounds*, Trends in Plant Science, 1997;2(4):152–159.
21. Caimi G, Carollo C, Presti R.L., *Wine and endothelial function*, Drugs Exp. Clin. Res. 2003, 29(5-6):235-42.
22. Luigi Castaldo, Alfonso Narváez, Luana Izzo, Giulia Graziani, Anna Gaspari, Giovanni Di Minno, Alberto Ritieni, *Red Wine Consumption and Cardiovascular Health*, Molecules, 2019, 8;24(19):3626.
23. Zuriñe Rasines-Perea, Pierre-Louis Teissedre, *Grape Polyphenols; Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes*, Molecules, 2017, 1;22(1):68.
24. Sara Salucci, Sabrina Burattini, Francesco Maria Giordano, Simone Lucarini, Giuseppe Diamantini, Elisabetta Falcieri, *Further Highlighting on the Prevention of Oxidative Damage by Polyphenol-Rich Wine Extracts*, J Med Food, 2017, 20(4):410-419.

25. Paolo Gresele, Chiara Cerletti, Giuseppe Guglielmini, Pasquale Pignatelli, Giovanni de Gaetano, Francesco Violi, *Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update*, J Nutr Biochem, 2011,22(3):201-11.
26. Graziano Riccioni, Maria Alessandra Gammone, Guido Tettamanti, Sonia Bergante, Francesca Romana Pluchinotta & Nicolantonio D'Orazio (2015) Resveratrol and anti-atherogenic effects, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 66:6, 603-610
27. M Emília Juan, M Pilar Vinardell, Joana M Planas, *The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful*, J Nutr, 2002, 132(2):257-60.
28. Allison F Wren, Michael Cleary, Christopher Frantz, Shawn Melton, Leslie Norris, *90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats*, J Agric Food Chem, 2002, 27;50(7):2180-92.
29. Kaoru Inoue, Tomomi Morikawa, Miwa Takahashi, Midori Yoshida, Kumiko Ogawa, *A 13-week subchronic toxicity study of grape skin extract in F344 rats*, J Toxicol Sci 2013;38(4):559-70.
30. S Ray, D Bagchi, P M Lim, M Bagchi, S M Gross, S C Kothari, H G Preuss, S J Stohs, *Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract*, Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 2001, 109(3-4):165-97.
31. P Babál, V Kristová, A Cerná, P Janega, O Pechánová, L Danihel, R Andriantsitohaina, *Red wine polyphenols prevent endothelial damage induced by CCl4 administration*, Physiol Res, 2006, 55(3):245-51.
32. J Yamakoshi, M Saito, S Kataoka, M Kikuchi, *Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds*, Food Chem Toxicol, 2002, 40(5):599-607
33. S S Bentivegna, K M Whitney, *Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts*, Food Chem Toxicol, 2002, 40(12):1731-43.
34. W D Johnson, R L Morrissey, A L Usborne, I Kapetanovic, J A Crowell, M Muzzio, D L McCormick, *Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity*, Food Chem Toxicol., 2011, 49(12):3319-27.
35. Laura Lluís, Mònica Muñoz, M Rosa Nogués, Vanessa Sánchez-Martos, Marta Romeu, Montse Giralt, Josep Valls, Rosa Solà, *Toxicology evaluation of a procyanidin-rich extract from grape skins and seeds*, Food Chem Toxicol., 2011, 49(6):1450-4.
36. Turrens J. F., Lariccia J., Nair M. G., *Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats*, Free Radie. Res, 1997, 27: 557-562.

37. Carbo N., Costelli P., Baccino F.M., Lopez Soriano F.J., Argiles J.M., *Resveratrol a natural product present in wine, decreases tumor growth in a rat tumor model*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 254:739-743.
38. Wilson T., Knight T.J., Beitz D.C., Lewis D.S., Engen R.L., *Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*, Life Sci., 1996, 59: 15-21.
39. Fauconneau R., Waffo-Teguo P., Huguet F., Barrier L., Decendit A., Merillon J. M., *Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests*, Life Sci. 1997, 61: 2103-2110.
40. Bertelli A. A. E., Giovannini L., Giannessi D., Migliori M., Bernin W., Fregoni M., Bertelli A., *Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine*, Int. J. Tissue React., 1995, 17:1- 3.
41. Chen C. K., Pace-Asciak C. R., *Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta*, Gen. Pharmacol., 1996, 27:363-366.
42. Jang M., Cai L., Udean G., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C.W., Fong H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol; a natural product derived from grapes.*, Science, 1997, 275:218-220.
43. Turner R.T., Evans G.L., Zhang M., Maran A., Sibonga J.D., *Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats?*, Endocrinology, 1999, 140:50-54.
44. Carbo N., Costelli P., Baccino F.M., Lopez-Soriano F.J., Argiles J.M., *Resveratrol a natural product present in wine, decreases tumor growth in a rat tumor model*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 254:739-743.
45. Wilson T., Knight T.J., Beitz D.C., Lewis D.S., Engen R.L., *Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*, Life Sci., 1996, 59: 15-21.
46. Biasi F, Deiana M, Guina T, Gamba P, Leonarduzzi G, Poli G. *Wine consumption and intestinal redox homeostasis*, Redox Biol., 2014, 18;2:795-802.
47. Nunes C, Ferreira E, Freitas V, Almeida L, Barbosa RM, Laranjinha J., *Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells*, Food Funct, 2013, 26;4(3):373-83.
48. Dolara P, Luceri C, De Filippo C, Femia AP, Giovannelli L, Caderni G, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. *Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage, and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats.*

49. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L., *Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease*, Clin Chim Acta, 2011, 20;412(5-6):410-24.
50. Albers T.M., Simon M.A., Clifford C.B., *Histopathology of Naturally Transmitted "Rat Respiratory Virus":Progression of Lesions and Proposed Diagnostic Criteria*, Vet Pathol, 2009, 46:992–999.
51. Baker D.G., *Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research*, Clinical Microbiology Reviews- American Society for Microbiology, 1998, 11(2):231–266.
52. Slaoui M., Dreef H.C., Van Esch E., *Inflammatory Lesions in the Lungs of Wistar Rats*, Toxicol Pathol., 1998, 26: 712.
53. Elwell M. R., Mahler J. F., Rao G. N., *"Have you seen this?" Inflammatory lesions in the lungs of rats*, Toxicol Pathol, 1997;25(5):529-31.

Παράρτημα Ι

ΔΕΛΤΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: / /

ΗΜΕΡΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ:.....

ID Ζώου:

ΣΒ (gr)	
Δόση (mg/kg)	
Κατανάλωση τροφής (gr)	
Κατανάλωση νερού (ml)	
Περιγραφή συμπτωμάτων ¹	
Συμπεριφορά	
Όψη τριχώματος	
Δέρμα	
Στόμα	
Οφθαλμοί	
Ουρογεννητικό	
Πεπτικό	
Νευρικό	
Αναπνευστικό	
Καρδιαγγειακό	
Μυοσκελετικό	
Άλλες παρατηρήσεις	

¹ : απουσία συμπτωμάτων (-)

παρουσία συμπτωμάτων (+), περιγραφή

Παράρτημα II

Δελτίο Νευρολογικής εξέτασης

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: / /

ΗΜΕΡΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ:.....

ID Ζώου:

	Περιγραφή αντίδρασης
Συμπεριφορά ¹ (εντός και εκτός κλωβού)	
Αντίδραση στον ήχο ²	
Στάση σώματος	
Στάση κεφαλής	
Βάδιση	
Αντανακλαστικό απειλής ³	
Αντανακλαστικό επαφής ³	
Αντανακλαστικό κόρης ⁴	
Μετακίνηση στο ένα άκρο ⁵	
Μετακίνηση στα δύο πρόσθια πόδια ⁵	
Μετακίνηση στα δύο οπίσθια άκρα ⁵	
Μετακίνηση στα δύο πρόσθια άκρα ⁵	
Μετακίνηση στα δυο πλάγια άκρα ⁵	

¹ : φυσιολογική, κατάπτωση, λήθαργος, κώμα

² : φυσιολογική, υπεραισθησία, μειωμένη, απουσία

³ : φυσιολογικό, μειωμένο, απουσία

⁴ : φυσιολογικό (μύση), καθυστερημένο, απουσία (μυδρίαση)

⁵ : φυσιολογικό, μειωμένο, απουσία

Δελτίο νεκροτομής

ID ζώου:

ΟΡΓΑΝΟ	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	
		Περιγραφή αλλοιώσεων
Εξωτερική εικόνα	Τρίχωμα	
	Δέρμα	
	Οφθαλμοί	
	Βλεννογόνοι	
	Εξωτερικά γεννητικά όργανα	
	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Ρινική κοιλότητα:		
Στοματική κοιλότητα:		
Θωρακική κοιλότητα		
Κοιλιακή κοιλότητα		
Κρανιακή κοιλότητα		
Τραχεία και πνεύμονες	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Καρδιά	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Ήπαρ	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Νεφροί	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Σπλήνας	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		

Παράρτημα III

ΟΡΓΑΝΟ	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	
Στομάχι	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Περιεχόμενο		
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Πάγκρεας	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Περιεχόμενο		
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Λεπτό και παχύ έντερο	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Περιεχόμενο		
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Όρχεις	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Άλλες αλλοιώσεις	Περιγραφή αλλοιώσεων	

¹ : παρουσία αλλοιώσεων (+), απουσία αλλοιώσεων (-)

Παράρτημα IV

Δελτίο ιστολογικής εξέτασης

ID ζώου:

	Ύπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Πνεύμονας			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Καρδιά			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Ήπαρ			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Νεφροί			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Οισοφάγος			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			

Παράρτημα IV

	Ύπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Στόμαχος			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Λεπτό έντερο (12δάκτυλο)			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Λεπτό έντερο (νήστιδα)			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Λεπτό έντερο (ειλεός)			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Παχύ έντερο			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			

Παράρτημα IV

	Ύπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Πάγκρεας			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Όρχεις			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			

¹Ύπαρξη αλλοιώσεων : (+), Απουσία αλλοιώσεων: (-)

² Ένταση αλλοιώσεων: 1 (ελάχιστη), 2 (ήπια), 3 (μέτρια), 4 (σοβαρή))

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΠΟ ΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

