

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ
 α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
ΣΕ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΥΓΙΩΝ
ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ**

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ : ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΑΛΕΞΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ : ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. ΖΑΜΠΕΛΑΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Φ. ΣΚΟΠΟΥΛΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Β. ΣΤΑΥΡΙΝΟΣ

ΠΤΥ
ΑΛΕ

ΑΘΗΝΑ 2000

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή έγινε στα πλαίσια της Πτυχιακής μου Διατριβής, κατά το ακαδημαϊκό έτος 1999 – 2000, υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Α. Ζαμπέλα. Το εργαστηριακό μέρος της εργασίας διεξήχθη στο Εργαστήριο της Παθολογικής Φυσιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Διευθυντής Καθ. Χ.Μ.Μουτσόπουλος).

Η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να γίνει χωρίς την εθελοντική συμμετοχή των συναδέλφων, τους οποίους και ευχαριστώ, οι οποίοι δέχθηκαν να λάβουν μέρος στην διεξαγωγή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επ. Καθ. Α. Ζαμπέλα, για την ανάθεση του θέματος και την επίβλεψη της εργασίας κατά την διεξαγωγή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω από την θέση αυτή την Καθ. Φ. Σκοπούλη, καθώς και τον Καθ. Β. Σταυρινό, για την συμμετοχή τους στην εξεταστική μου επιτροπή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Παθολογικής Φυσιολογίας, και κυρίως τον Δρ. Κώστα Πέτροβα του οποίου η βοήθεια έκανε την διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της πτυχιακής πιο ενδιαφέρουσα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην απλή τυφλή τυχαιοποιημένη αυτή μελέτη μετρήσαμε διάφορους δείκτες του ανοσοποιητικού συστήματος στο αίμα υγιών εθελοντών, πριν και μετά τη λήψη συμπληρώματος α-λινολενικού οξέος. Συγκεκριμένα, μετρήσαμε αντικαρδιολιπινικά αντισώματα, αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I, αντιτυρηνικά αντισώματα, κυτταροκίνες (TNFα, IL-6, IL-2R, IL-1β) και Δ-Διμερή.

Στην έρευνα συμμετείχαν έξι υγιείς εθελοντές οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Όσο οι εθελοντές τις μιας ομάδας λάμβαναν α-λινολενικό, (περίπου 43mg ημερησίως για ένα μήνα) οι υπόλοιποι αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου (δεν είχαν καμία διατροφική παρέμβαση), στη συνέχεια οι ρόλοι αντιστράφησαν. Κατά τη διάρκεια της έρευνας οι εθελοντές συμπλήρωσαν ημερολόγια κατανάλωσης τροφίμων ώστε να αποκλειστεί η περίπτωση ότι άλλοι διατροφικοί παράγοντες εκτός του α-λινολενικού επηρέασαν τα αποτελέσματα.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι η παρέμβαση με α-λινολενικό οξύ δεν είχε κάποια επίδραση στις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, δεν είχαμε την επαγωγή παραγωγής κάποιου από τα αντισώματα που ελένξαμε, ενώ ο οριακά θετικός τίτλος anti-β2GPI αντισωμάτων ενός εθελοντή δεν μεταβλήθηκε. Περαιτέρω ο θετικός τίτλος των αντιτυρηνικών αντισωμάτων, που βρέθηκε σε δύο εθελοντές δεν μεταβλήθηκε ούτε άλλαξε τύπο πρόσδεσης, με την λήψη του α-λινολενικού. Τέλος δεν φάνηκε να έχουμε επίδραση στο κυτταροκινικό προφίλ, καθώς και στα επίπεδα Δ-Διμερών, τα οποία σχετίζονται με ενεργοποίηση της ινωδολυτικής οδού.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η χορήγηση του α-λινολενικού, στο συγκεκριμένο σχήμα και πληθυσμό εθελοντών, δεν φάνηκε να προκαλεί κάποια υπολογίσιμη μεταβολή των ανοσολογικών παραμέτρων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	1
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	
	ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΟΞΥ	3
1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.2	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (α LA)	4
1.3	ΣΥΓΚΡΙΣΗ α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟΥ ΜΕ ΕΙΚΟΣΙΠΕΝΤΑΝΟΪΚΟ ΚΑΙ ΔΟΚΟΣΕΞΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ	5
1.4	α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	6
1.5	α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΣΗ (in vivo)	7
1.6	α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	7
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	
	ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ	8
2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2.2.	ΘΕΩΡΙΕΣ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΕΩΣ	9
2.3	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	12
2.4	ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΑ	14
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	
	ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ — ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	16
3.1	ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	16
3.1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
3.1.2	ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	17
3.1.3	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ	19
3.1.4	ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ – ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	19
3.1	ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	21
3.2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
3.2.2	ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ – ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	22
3.2.3	ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ - ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	23
3.2.4	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL (anti-oxLDL)	24
3.2.5	ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ (Heat Shock Proteins) – ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ.	25

	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°	
	ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	26
4.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	26
4.2	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ	30
4.3	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	34
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°	
	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	38
5.1	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	38
5.2	ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΙΧΑΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ	39
5.3	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	39
5.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ	40
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°	
	ΠΡΩΤΟΚΟΛΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ	42
6.1	Προσδιορισμός Αντικαρδιολιπινικών Αντισωμάτων (anticardiolipin antibodies – aCL)	42
6.2	Προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2GPI)	44
6.3	Προσδιορισμός Δ-Διμερών (D-Dimmers, DD)	46
6.4	Ανοσοφθορισμομετρική μελέτη των ορών	47
6.5	Προσδιορισμός κυτταροκινών	48
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°	
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ	50
7.1	Ανακλήσεις τριημέρων	50
7.2	Αντικαρδιολιπινικά Αντισώματα – Αντισώματα έναντι β2-γλυκοπρωτεΐνης I	51
7.3	Ανοσοφθορισμομετρική μελέτη ορών	58
7.4	Προσδιορισμός κυτταροκινών	61
7.5	Προσδιορισμός Δ-Διμερών	62
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8°	
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	78
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	81

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

αLA	: α-λινολενικό οξύ, (α-linolenic acid)
EPA	: εικοσιπεντανοϊκό οξύ, (eicosipentanoic acid)
DHA	: δοκοσεξανοϊκό οξύ, (docohexanoic acid)
PG	: προσταγλανδίνες, (prostaglandins)
TX	: θρομβοξάνες, (tromboxanes)
LT	: λευκοτριένια, (leukotrienes)
LA	: λινολεϊκό οξύ, (linoleic acid)
γLA	: γ-λινολενοκό οξύ, (γ-linolenic acid)
ETA	: εικοσιτριενοϊκό οξύ, (eicositrienoic acid)
AA	: αραχιδονικό οξύ, (arahidonic acid)
TNFα	: παράγοντας νέκρωσης όγκων α, (tumor necrosis factor)
NO	: μονοξείδιο του αζώτου,
PAF	: παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, (platelet activating factor)
Lyso-PAF	: τροποποιημένη μορφή PAF
IgE	: ανοσοσφαιρίνη E, (immunoglobulin E)
IgG	: ανοσοσφαιρίνη G, (immunoglobulin G)
IgA	: ανοσοσφαιρίνη A, (immunoglobulin A)
PUFA	: πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, (polyunsaturated fatty acid)
LDL	: λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, (low density lipoprotein)
HDL	: λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, (high density lipoprotein)
VLDL	: λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας, (very low density lipoprotein)
Hsp	: πρωτεΐνες οξείας φάσης, (heat shock protein)
LPS	: λιποπολυσακχαρίτης, (lipopolisaccharide)
ΙΣΒ	: ιδανικό σωματικό βάρος
HLA	: αντιγόνο ιστοσυμβατότητας,
IFNγ	: ιντερφερόνη γ, (interferon γ)
IL	: ιντερλευκίνη, (interleukin)
CD4, CD8	: δείκτες επιφανείας T λεμφοκυττάρων
ΣΕΛ	: Συστηματικός Ερυθρηματώδης Λύκος
APS	: Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων, (antiphospholipid syndrome)

Lp(a)	: λιποπρωτεΐνη α, (lipoprotein a)
WF	: παράγοντας von Willebrand
β2-GPI	: β2-γλυκοπρωτεΐνη I, (β2-glycoprotein I)
anti-ox-LDL	: αντισώματα έναντι οξειδωμένης LDL, (anti oxidized LDL)
MDA-LDL	: LDL τροποποιημένη με μαλονδυναλδεύδη
apoB	: απολιποπρωτεΐνη B, (apolipoprotein B)
Ag	: αντιγόνο (antigene)
Ab	: αντίσωμα, (antibody)
SDS-PAGE	: ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS
RIA	: (radioimmunoassays)
EIA	: (enzyme immunoassays)
FIA	: (fluorescence immunoassays)
LIA	: (luminescence immunoassays)
ELISA	: (enzyme linked immunosorbent assay)
ΔΜΣ	: δείκτης μάζας σώματος
IF	: έμμεσος ανοσοφθορισμός
ANA	: αντιπυρηνικά αντισώματα, (antinuclear antibodies)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν κεφάλαιο έχει ως σκοπό να παρουσιάσει τις βασικές αρχές και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των δεδομένων. Η ανάλυση των δεδομένων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την συλλογή, την επεξεργασία, την ανάλυση και την παρουσίαση των δεδομένων. Η ανάλυση των δεδομένων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την συλλογή, την επεξεργασία, την ανάλυση και την παρουσίαση των δεδομένων.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.5. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.6. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.8. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.9. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
- 1.1.1.10. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν κεφάλαιο έχει ως σκοπό να παρουσιάσει τις βασικές αρχές και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των δεδομένων. Η ανάλυση των δεδομένων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την συλλογή, την επεξεργασία, την ανάλυση και την παρουσίαση των δεδομένων. Η ανάλυση των δεδομένων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την συλλογή, την επεξεργασία, την ανάλυση και την παρουσίαση των δεδομένων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

α-ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΟΞΥ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως λιποειδή χαρακτηρίζονται ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων, ανομοιογενών μεταξύ τους, με μόνο κοινό χαρακτηριστικό όλων τη μη διαλυτότητά τους στο νερό και τη διαλυτότητά τους στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες (1). Οι ρόλοι που έχουν στους ζωντανούς οργανισμούς είναι διάφοροι και εξαρτώνται κάθε φορά από το είδος του λιπιδίου. Οι κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων είναι οι παρακάτω (1):

A. Απλά λιπίδια

- i. Λιπαρά οξέα. Είναι τα απλούστερα λιπίδια αποτελούμενα από μια ανθρακική αλυσίδα με μια καρβοξυλική ομάδα.
- ii. Τριγλυκερίδια. Εστέρες των λιπαρών οξέων με τη γλυκερόλη.
- iii. Κήροι. Εστέρες των ανώτερων λιπαρών οξέων με ανώτερες λιπαρές αλκοόλες ή στερόλες

B. Σύνθετα λιπίδια

- i. Φωσφολιπίδια. Σύνθετα λιπίδια τα οποία μπορεί να έχουν σκελετό γλυκερίνης (γλυκερινούχα) ή σφιγγοσίνης (σφιγγοσινούχα) και η πολικότητά τους οφείλεται στην ύπαρξη φωσφορικής ομάδας.
- ii. Γλυκολιπίδια. Σύνθετα λιπίδια που περιέχουν κάποιον υδατάνθρακα, στην πολική τους κεφαλή.
- iii. Λιποπρωτεΐνες. Λιπίδια ενωμένα με πρωτεΐνες, όπου όμως το κυρίαρχο μέρος του μοριακού συμπλέγματος είναι το λιποειδές.

Ειδικότερα όσον αφορά το λινολενικό οξύ, αυτό ανήκει στην κατηγορία των λιπαρών οξέων, συνήθως όμως συναντάται στις τροφές και τον οργανισμό, ως μέρος των τριγλυκεριδίων. Τα απλά λιπίδια χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό κυρίως ως πηγές ενέργειας, ενώ τα σύνθετα λιπίδια περισσότερο ως δομικά συστατικά. Ωστόσο το λινολενικό οξύ, επειδή είναι απαραίτητο λιπαρό οξύ, έχει μεγάλη σημασία όχι τόσο ως πηγή ενέργειας, αλλά όσο για την δομική και μεταβολική του αξία (2).

1.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (aLA)

Ο άνθρωπος όπως και τα υπόλοιπα θηλαστικά δεν διαθέτει τα κατάλληλα ένζυμα (τις Δ^{12} και Δ^{15} δεσатуράσες-desaturases) για να εισάγει το διπλό δεσμό, στις θέσεις 12 και 15 της ανθρακικής αλυσίδας. Ως συνέπεια το α -λινολενικό οξύ (18:3cis $\Delta^{9,12,15}$) είναι απαραίτητο λιπαρό οξύ και πρέπει να προσλαμβάνεται ως έχει από τις τροφές (1). Ωστόσο, ο ανθρώπινος οργανισμός έχει τα ένζυμα για να εισάγει διπλό δεσμό στις θέσεις πριν από τον ένατο άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας. Έτσι από το α -λινολενικό οξύ μπορεί να παράγει το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA 20:5 ω -3) και το δοκοσεξανοϊκό οξύ (DHA 22:6 ω -3) (3). Η δυνατότητα όμως μετατροπής του aLA σε EPA και DHA είναι περιορισμένη, περίπου το 6% μετατρέπεται σε EPA και μόλις το 3,8% του EPA μετατρέπεται σε DHA (4). Η σημαντικότητα του α -λινολενικού οξέος έγκειται στο ότι αυτό και τα παραγωγά του χρησιμοποιούνται ως συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και ως πρόδρομοι των προστανοειδών. Τα προστανοειδή είναι λιπαρά οξέα με 20 άτομα (λέγονται και εικοσανοειδή) και προκύπτουν από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα και τα παραγωγά τους μέσω οξυγόνωσης, με τη βοήθεια κατάλληλων ενζύμων, των οξυγονασών. Στα προστανοειδή συμπεριλαμβάνονται οι προσταγλανδίνες (PG), οι θρομβοξάνες (TX), και τα λευκοτριένια (LT). Συγκεκριμένα από το α -λινολενικό οξύ προκύπτουν οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξάνες τις σειρές 3 (π.χ. PGI_3 , TXA_3) και τα λευκοτριένια της σειράς 5 (π.χ. LTB_5) (5).

Υπάρχει ένα ακόμα απαραίτητο λιπαρό οξύ για τον ανθρώπινο οργανισμό, το λινελαϊκό οξύ (LA), το οποίο έχει παρόμοια δομή και μεταβολισμό με το λινολενικό. Από το λινελαϊκό οξύ παράγονται το γ -λινολενικό οξύ (γ LA, 18:3 ω -6), το εικοσανοτριενοϊκό οξύ (ETA 20:3 ω -6), και το αραχιδονικό οξύ (AA 20:4 ω -6) από τα οποία στη συνέχεια παράγονται προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες της σειράς 2 και λευκοτριένια της σειράς 4 (5). Εξαιτίας των ομοιοτήτων τους, τα δύο λιπαρά οξέα δρουν ανταγωνιστικά. Συγκεκριμένα ανταγωνίζονται για την Δ^6 δεσатуράση (το ένζυμο που χρησιμοποιούν για την προσθήκη διπλού δεσμού), με αποτέλεσμα μια δίαιτα πλούσια σε LA μπορεί να μειώσει κατά 40% με 50% την ήδη μικρή μετατροπή του aLA σε EPA και DHA. Οι σειρές προστανοειδών που θα παραχθούν στη συνέχεια εξαρτώνται από τα λιπαρά οξέα που είναι διαθέσιμα (5). Τα προστανοειδή εμπλέκονται στη μεταφορά μηνυμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα (χημειοταξία),

καθώς και στην αγγειοσυστολή και αγγειοδιαστολή. Ως αποτέλεσμα προκύπτει ότι το είδος των απαραίτητων λιπαρών οξέων που καταναλώνονται, έχει ύψιστη σημασία γι' αυτές τις λειτουργίες (6).

1.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ α -ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟΥ ΜΕ ΕΙΚΟΣΙΠΕΝΤΑΝΟΪΚΟ ΚΑΙ ΔΟΚΟΣΕΞΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ

Πολλές από τις μελέτες με σκοπό την διερεύνηση της σημασίας των ω -3 λιπαρών οξέων στην διατροφή και ιδιαίτερα την επίδρασή τους στα καρδιαγγειακά και ανοσολογικά νοσήματα, έγιναν με την χρήση EPA και DHA. Για το λόγο αυτό υπήρχε αμφισβήτηση σχετικά με το αν το α -LA είναι εξίσου αποτελεσματικό με τους μεταβολίτες του, στην επίδραση του στο ανοσοποιητικό σύστημα και το λιπιδαιμικό προφίλ, εξαιτίας της μειωμένης δράσης της Δ^6 δεσατουράσης και κατά συνέπεια της μειωμένης μετατροπής του σε EPA και DHA. Οι διάφορες έρευνες που έγιναν για να συγκρίνουν το α LA με τους μεταβολίτες του δεν απέδωσαν ομοιόμορφα αποτελέσματα. Έρευνα (7) που διεξήχθει σε ποντίκια με ενδοτοξαιμία, έδειξε ότι όταν αυτά σιτίζονταν με EPA και α LA, είχαν σημαντική μείωση των επιπέδων του αραχιδονικού και του LA στα φωσφολιπίδια των κυψελιδικών μακροφάγων, των κυττάρων kupfer του ήπατος και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με ανάλογες μειώσεις στο σχηματισμό προσταγλανδινών (in vitro). Αντίθετα οι δίαιτες οι οποίες περιείχαν α LA δεν ήταν τόσο αποτελεσματικές στη μείωση αυτών των δεικτών, αν και αυτή η αναποτελεσματικότητα λαμβάνει χώρα όταν τα ποντίκια είναι σε κατάσταση οξείας σήψης.

Σε άλλες έρευνες (8), όπου συγκρίθηκαν τα ω -3 μεταξύ τους, βρέθηκαν να είναι ισοδύναμα ως προς την ενσωμάτωση του DHA στα φωσφολιπίδια και την παραγωγή PGE_2 και LTB_4 , σε ποντίκια. Κατά συνέπεια μπορούν να αντικαταστήσουν το ένα το άλλο στην διατροφή, στις κατάλληλες ποσότητες. Ανάλογη έρευνα (9) στους ανθρώπους, έδειξε ότι μετά από δίαιτα εμπλουτισμένη σε α LA, το EPA, το DHA καθώς και η αναλογία ω -3/ ω -6 αυξήθηκε στα φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων, στα φωσφολιπίδια του πλάσματος και στα τριγλυκερίδια της κυκλοφορίας.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι σε αυξημένες ποσότητες το α LA μπορεί να αντικαταστήσει αποτελεσματικά το EPA και το DHA, στη διατροφή.

1.4 α-ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα ω-3 φαίνεται να επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, κυρίως μέσω αλλαγής της ισορροπίας των παραγόμενων εικοσανοειδών: μειώνουν την παραγωγή ορισμένων προφλεγμονοδών εικοσανοειδών της σειράς 2, π.χ. PGE₂, ενώ αυξάνουν την παραγωγή των εικοσανοειδών της σειράς 3. Έτσι η κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων μειώνει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, δρα ανασταλτικά στην T-κυτταροτοξικότητα και την κυτταροτοξικότητα μέσω μακροφάγων, μειώνει την χημειοτακτική ικανότητα των μονοκυττάρων – ουδετερόφιλων, την έκφραση μορίων προσκόλλησης καθώς τέλος και την παραγωγή προφλεγμονοδών κυτταροκινών, π.χ. TNFα (10,11,12,13). Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, η σίτιση πειραματοζώων με ιχθυέλαια, μειώνει τις οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις, βελτιώνει τα συμπτώματα των πειραματικά αναπαραχθέντων αυτοάνοσων νόσων και παρατείνει την επιβίωση των μεταμοσχευθέντων οργάνων (10). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε πειράματα, όπου στα ζώα χορηγήθηκε aLA (14).

Το aLA έχει βρεθεί ότι μειώνει την παραγωγή *in vitro* του NO, από μακροφάγα (15), καθώς επίσης και την παραγωγή του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), από πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, κάτι το οποίο συνδέθηκε με την μειωμένη διαθεσιμότητα του πρόδρομου μορίου lyso-PAF (16).

Ευρέως μελετημένη είναι και η αντιαλλεργική δράση των ω-3 και του aLA ειδικότερα. Η δράση αυτή του aLA φαίνεται να οφείλεται στην μείωση της παραγωγής ισταμίνης ή στην έκλυση άλλων χημικών διαμεσολαβητών, ως αποτέλεσμα αλλαγής στη σύσταση των λιπαρών οξέων (17). Δίαιτα πλούσια σε aLA οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή ανοσοσφαιρίνης IgE και την αποφυγή αναφυλακτικού σοκ, σε ποντίκια (18). Ως αποτέλεσμα των πειραματικών δεδομένων, έχει προταθεί ότι ο προσεκτικός χειρισμός των πολυακόρεστων της διατροφής ίσως παίζει ρόλο-κλειδί στην επιτυχή διαχείριση της φλεγμονής η οποία απαντάται σε ατοπικούς ασθενείς (19).

Αν και η επίδραση του aLA στο ανοσοποιητικό είναι σαφής, εντούτοις φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τόσο από την αναλογία ω-3/ω-6 όσο και από την συνολική ποσότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη δίαιτα.

1.5 α-ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΣΗ (in vivo)

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) αν και έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα της LDL του πλάσματος, παράλληλα μειώνουν και την αντίσταση αυτής στην οξείδωσή (20). Αυτό συμβαίνει διότι όσο περισσότερα πολυακόρεστα υπάρχουν στο μόριο της LDL, τόσο περισσότερο αυξάνεται η επιδεκτικότητά της για οξείδωση, λόγω των διπλών δεσμών που περιέχουν (21,22). Τα λιπαρά οξέα EPA, DHA και AA είναι πολύ πιο επιρρεπή στην οξείδωση από ότι τα aLA και LA, που έχουν λιγότερους διπλούς δεσμούς, ενώ την μικρότερη τάση για οξείδωση την έχει το ελαϊκό, που είναι μονοακόρεστο. Το aLA αν και έχει ελαφρώς μεγαλύτερη τάση οξείδωσης σε σχέση με το LA, παρουσιάζει την απρόσμενη ιδιότητα η οξειδωμένη μορφή του να είναι λιγότερο τοξική για τα ανθρώπινα μονοκύτταρα-μακροφάγα, σε σχέση με αυτή των άλλων πολυακόρεστων οξέων (23). Η ιδιότητα αυτή το καθιστά λιγότερο επικίνδυνο από τα υπόλοιπα PUFAs. Ωστόσο, λόγω της μετετροπής του σε EPA και DHA, εντός του οργανισμού, συνιστάται όταν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες να συνοδεύεται από επαρκείς ποσότητες αντιοξειδωτικών, δηλαδή βιταμίνης E (α-, β-, γ- τοκοφερόλη) και καροτενοειδή (24).

1.6. α-ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν σημαντική επίδραση στην μείωση των τιμών των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, κυρίως στους υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς (25). Είναι πιθανόν να απαιτούνται σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες aLA από ότι EPA ή DHA, για την επίτευξη των ίδιων αποτελεσμάτων, μείωση δηλαδή των τριγλυκεριδίων έως και 30% (26). Υπάρχει αναμφισβήτητη υπεροχή των ω-3 σε σχέση με τα ω-6, όσο αφορά την μείωση που αυτά προκαλούν στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (27). Σχετικά με την χοληστερόλη του πλάσματος, τόσο την ολική όσο και τα κλάσματά της, η επίδραση που έχει σε αυτή το aLA δεν είναι ξεκάθαρη. Οι περισσότερες έρευνες υποστηρίζουν ότι το aLA μειώνει μέτρια την ολική χοληστερόλη, όταν αντικαθιστά στην δίαιτα το LA (28), ενώ υπάρχουν και έρευνες που δεν έδειξαν κάποια επίδραση (29). Η διχογνωμία αυτή ενδεχομένως να οφείλεται σε λόγους όπως, τα αρχικά διαφορετικά επίπεδα χοληστερόλης ή την διαφορετική σύσταση της διαίτας όσο αφορά τα υπόλοιπα λιπίδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αθηροσκλήρυνση είναι μία πάθηση των αρτηριών που χαρακτηρίζεται από εστιακή πάχυνση του έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, την αθηροσκληρυντική πλάκα, προσβάλλει δε τις μεγάλου και μέσου μεγέθους αρτηρίες (αορτή, καρωτίδες, λαγόνιες, μηριαίες, στεφανιαίες, νεφρικές) (32). Η μεγάλη σημασία της αθηροσκληρώσεως των στεφανιαίων αρτηριών ειδικά, οφείλεται στο γεγονός ότι η βλάβη από μόνη της ή σε συνδιασμό με οξεία απόφραξη (θρόμβωση), είναι η συχνότερη αιτία της ισχαιμίας του μυοκαρδίου, η οποία είναι υπεύθυνη με την σειρά της για την στηθάγχη, τον αιφνίδιο θάνατο και το έμφραγμα του μυοκαρδίου (32).

Όσο αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αθηροσκληρώσεως, αυτή αρχίζει με μία πάχυνση του ενδοθηλίου των αρτηριών λόγω εναποθέσεως λιπιδίων (κυρίως χοληστερίνης και φωσφολιπιδίων). Στη συνέχεια παρουσιάζεται καταστροφή της ελαστικής στιβάδας, νέκρωση της εσωτερικής στιβάδας, φλεγμονώδεις αντιδράσεις με δημιουργία ινώδους ιστού, εναπόθεση αλάτων ασβεστίου των ελευθέρων λιπαρών οξέων και σχηματισμός θρόμβου πάνω στις αθηροσκληρυντικές βλάβες των τοιχωμάτων (33).

Σε σχέση με τις βλάβες που απαντώνται κατά την διάρκεια ανάπτυξης της νόσου, αυτές μπορούν να διακριθούν σε πρώιμες (αρχικού τύπου βλάβες και λιπώδεις ραβδώσεις), ενδιάμεσου τύπου βλάβες, ινώδεις πλάκες και τέλος οι σύνθετες βλάβες (34). Ειδικότερα :

- 1) Αρχικού/ενδιάμεσου τύπου βλάβες: είναι τοπικά εντοπισμένες, μικρές, δεν προκαλούν απόφραξη, αποτελούνται από συσσωρευμένα λιπίδια στα αφρώδη κύτταρα που προέρχονται από μακροφάγα και εντοπίζονται κυρίως στην παιδική ηλικία.

- 2) Λιπώδεις ραβδώσεις: είναι τοπικά εντοπισμένες, μη αποφρακτικές, περιέχουν μεγαλύτερη συσσώρευση λιπιδίων στα αφρώδη κύτταρα με προέλευση τόσο από μακροφάγα όσο και από λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και ινώδη ιστό αλλά σε τοπικό επίπεδο στον έσω χιτώνα του αγγειακού τοιχώματος.
- 3) Ινώδεις πλάκες: είναι χαρακτηριστική βλάβη προχωρημένης αθηρομάτωσης και αρχίζει να γίνεται ορατή κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής. Αποτελείται από ένα κεντρικό πυρήνα εξωκυττάριου λίπους (περιέχονται και κρύσταλλοι χοληστερόλης) και σπασίδια νεκρωμένων κυττάρων, κεκαλλυμένο από ένα ινωμυώδεις κάλυμμα αποτελούμενο από μεγάλο αριθμό λείων μυϊκών κυττάρων, μακροφάγων, λεμφοκυττάρων, κολλαγόνου και άλλων εξωκυττάριων στοιχείων. Η σύσταση της εστεροποιημένης χοληστερόλης στην ινώδη πλάκα διαφέρει από αυτή των λιποειδών ραβδώσεων, στο ότι στην πρώτη περίπτωση το εστεροποιημένο λιπαρό οξύ είναι λινολεϊκό και στην δεύτερη ολεϊκό.
- 4) Σύνθετου τύπου βλάβες: πρόκειται για ασβεστοποιημένες ινώδεις πλάκες με διάφορους βαθμούς νέκρωσης, θρόμβωσης και εξελκώσεις. Αυτές είναι οι βλάβες οι οποίες συχνότερα σχετίζονται με την εκδήλωση συμπτωμάτων. Στένωση των αρτηριών και ανεπαρκής λειτουργία των οργάνων οφείλονται στην σταδιακή απόφραξη καθώς οι πλάκες γίνονται παχύτερες και σχηματίζονται θρόμβοι.

2.2 ΘΕΩΡΙΕΣ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΕΩΣ

Ακόμα και σήμερα δεν είναι τελείως ξεκάθαρη η παθογένεια της νόσου και πεδίο ιδιαίτερης επιστημονικής αντιπαράθεσης αποτελεί το “εναρκτήριο” αίτιο αυτής. Μία γενικά αποδεκτή θεωρία είναι αυτή της “**απάντησης σε τραυματισμό**” (response to injury) (35). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, το ενδοθηλιακό τοίχωμα εκτείνεται σε συνεχείς οι επαναλαμβανόμενες αιτίες που επηρεάζουν την ακεραιότητά του και δεν του επιτρέπουν την φυσιολογική του λειτουργία. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι μεταβολικοί (χρόνια υπερχοληστεριναιμία, ομοκυστεϊναιμία), μηχανικοί (shear stress, υπέρταση), ανοσολογικοί (μεταμόσχευση καρδιάς ή νεφρών) κ.λ.π. Δυσλειτουργία του ενδοθηλιακού τοιχώματος μπορεί να συνεπάγεται την αποκάλυψη υποενδοθηλιακών στοιχείων και ιστού, κάτι το οποίο με την σειρά του να πυροδοτεί μία σειρά γεγονότων, όπως: προσκόλληση τοπικά μονοκυττάρων, αιμοπεταλίων,

μετανάστευση των μονοκυττάρων εντός του τοιχώματος και μετατροπή τους σε μακροφάγα. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από την άλλη δημιουργεί μικροθρόμβους καθώς και την απελευθέρωση από αυτά και τα μακροφάγα, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών.

Σε συνάφεια και με τη συνδρομή στοιχείων του πλάσματος (π.χ. λιποπρωτεΐνες, ινσουλίνη) έχουμε πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την εναπόθεση εξωκυττάριας ιστικής ουσίας, καθώς και την συσσώρευση λιπιδίων κυρίως από τα μακροφάγα, τα οποία έχουν την ικανότητα πρόσληψης τροποποιημένης μορφής (οξειδωμένη) LDL μέσω ειδικών υποδοχέων (scavenger receptors).

Εκτός από αυτή την θεωρία, έχουν διατυπωθεί και σειρά άλλων προς εξήγηση της παθογένειας της αθηροσκλήρυνσης. Τέτοιες θεωρίες είναι οι ακόλουθες:

Θεωρία τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών (altered lipoprotein theory) (36):

σύμφωνα με αυτή, η χημική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών είναι το αίτιο που ευοδώνει την ανάπτυξη της πρωϊμότερης ανατομικά βλάβης (λιπώδεις γραμμώσεις) στη διεργασία της αθηρομάτωσης.

Ανοσολογική υπόθεση (Immunological Hypothesis) (37): η θεωρία αυτή προτείνει

ως εναρκτήριο ερέθισμα για την αθηροματική διαδικασία, την ανοσολογική απάντηση έναντι των πρωτεϊνών του stress και κυρίως της hsp60. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να λειτουργεί συμπληρωματικά με τις δύο προηγούμενες και προϋποθέτει την διερεύνηση της αθηρομάτωσης ως μια φλεγμονώδη διαδικασία.

Λυσοσωμική υπόθεση (lysosomal hypothesis) (34): προτείνει ότι η αλλαγή στη

δράση ενζύμων των λυσοσωμάτων συμβάλλει στην αθηρογένεση. Κάτι τέτοιο φαίνεται να συνάδει με την εύρεση σχετικά μειωμένης δραστηριότητας της υδρολάσης των εστέρων της χοληστερόλης, στα λυσοσωμάτια των λείων μυϊκών κυττάρων της βλάβης.

2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Σήμερα η αθηροσκλήρυνση θεωρείται μία χρόνια νόσος, όπου πλήθος παραγόντων τόσο γενετικών όσο και επιγενετικών-περιβαλλοντικών, συμβάλλουν στην εξέλιξή της και την εκδήλωση επιπλοκών για τη ζωή. Με τον όρο «παράγοντες κινδύνου», αναφερόμαστε σε συνθήκες και συνήθειες, οι οποίες είναι πιο συχνές σε άτομα που αναπτύσσουν μια νόσο, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (34). Η πλειοψηφία των ατόμων με ηλικία >65 ετών και αθηροσκλήρυνση έχουν περισσότερους του ενός παράγοντες κινδύνου, εκτός της ηλικίας. Γενικά υπάρχει διαφορετική βαρύτητα ως προς την συμμετοχή στη νόσο και το δυναμικό αναστροφής με την κατάλληλη θεραπεία/πρόληψη, για τον κάθε παράγοντα κινδύνου.

Όσο αφορά την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης έχει βρεθεί τόσο με κλινικές μελέτες όσο και με πειράματα *in vitro*, ότι σχετίζονται πλήθος παραγόντων οι οποίοι μπορεί να είναι είτε διατροφικοί είτε μη διατροφικοί. Ειδικότερα θα μπορούσαμε να αναφερθούμε στους παρακάτω παράγοντες κινδύνου (34):

1) Υπερλιπιδαιμία: τόσο η υπερχοληστεριναιμία όσο και η υπερτριγλυκεριδαιμία είναι από τους σοβαρότερους παράγοντες ευόδωσης της αθηρομάτωσης. Αύξηση της χοληστερόλης συνήθως συνάδει με αντίστοιχη αύξηση της LDL, ενώ αύξηση των τριγλυκεριδίων με αυτή των VLDL (32). Σύγχρονες απόψεις περί του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, προτείνουν ότι η συσσώρευση χοληστερόλης στην κυκλοφορία είναι εν μέρει δευτερογενές φαινόμενο στην υπερπαραγωγή λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια (33). Διάφορα κλάσματα της LDL (small dense LDL και LDL τύπου B) έχουν επίσης θεωρηθεί σοβαροί παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση ισχαιμίας (34). Έχει προταθεί ότι η τύπου B LDL ίσως μεταδίδεται γενετικά, ενώ σχετίζεται με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και χαμηλά επίπεδα HDL. Η συσσώρευση λιπώδους ιστού ίσως παίζει ένα ρόλο κλειδί στην παρουσία αυξημένων επιπέδων τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης, η οποία παρατηρείται με την αύξηση της ηλικίας, καθώς και τα τρία αυτά φαινόμενα παρατηρούνται ταυτοχρόνως στον γενικό πληθυσμό (34).

2) HDL: χαρακτηρίζεται ως προστατευτικός παράγοντας έναντι της ανάπτυξης αθηρομάτωσης, ενώ μειωμένα επίπεδα αυξάνουν τον κίνδυνο για αυτή, με τρόπο

ανεξάρτητο από τους άλλους παράγοντες κινδύνου. Τα οιστρογόνα συμβάλλουν σε αύξηση των επιπέδων της HDL, στις γυναίκες, ενώ τα ανδρογόνα το αντίθετο, στους άνδρες. Η φυσική άσκηση και η καθημερινή μικρή λήψη αλκοόλ φαίνεται να συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων της (34).

3) Υπέρταση: η αυξημένη πίεση αίματος αποτελεί σημαντικότατο παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης, όπου μάλιστα ο κίνδυνος αυξάνεται προοδευτικά με την αύξηση της πίεσεως και ιδιαίτερος της διαστολικής πίεσεως (34).

4) Κάπνισμα: αποτελεί αναστρέψιμο παράγοντα κινδύνου αθηρομάτωσης και έχει υποστηριχθεί ότι δρα συνεργιστικά με την υπερλιπιδαιμία, υπέρταση και διαβήτη αυξάνοντας περαιτέρω τον κίνδυνο για αθηρομάτωση (34).

5) Διαβήτης/υπεργλυκαιμία: σε διαγνωσμένους διαβητικούς, ινσουλινοεξαρτώμενους ή μη, υπάρχει τουλάχιστο διπλάσια συχνότητα εμφάνισης εμφραγμάτων του μυοκαρδίου, σε σχέση με τους μη διαβητικούς. Η βαρύτητα του παράγοντα αυτού είναι μεγαλύτερη στους νέους διαβητικούς (34).

6) Αυτοάνοσοι μηχανισμοί: μία από τις θεωρίες για την αθηρογένεση βασίζεται στην ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι μελών της οικογενείας πρωτεϊνών του στρες (heat shock proteins) (38), ενώ σήμερα η αθηρομάτωση θεωρείται ως μια χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση, όπου πρωτείνες της οξείας φάσης όπως η C- αντιδρώσα πρωτεΐνη, φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο (39).

7) Λοιμογόνοι παράγοντες: διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί, μέσω των οποίων λοιμογόνοι παράγοντες (ιοί, π.χ. ιός του έρπυτα τύπου 1, βακτήρια, π.χ. λιποπολυσακχαρίτης-LPS), μπορούν να ευοδώσουν την αθηρογένεση καθώς και την σχετιζόμενη, με τα ύστερα στάδια αυτής, θρομβογένεση (40). Τέτοιοι παράγοντες έχουν την ικανότητα να δρουν σε κυτταρικό επίπεδο, τόσο στο αγγειακό τοίχωμα (ενδοθήλιο), όσο και στην κυκλοφορία (μονοκύτταρα) (41,42).

Ινωδογόνο: σήμερα θεωρείται ότι τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου αποτελούν ένα από τους σημαντικότερους και ανεξάρτητους παράγοντες αθηρομάτωσης (43), καθώς αποτελεί ένα από τα κεντρικότερα μόρια του συστήματος πήξης/ ινωδόλυσης (44), μπορεί να αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ ταυτοχρόνως αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσεως.

2.4 ΑΘΗΡΟΜΑΤΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΑ

Η σχέση της διαίτας με την αθηρομάτωση παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει, ότι πληθυσμοί των οποίων η συνηθισμένη διαίτα είναι χαμηλή σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη, παρουσιάζουν πολύ χαμηλά επίπεδα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (34). Τέτοιοι πληθυσμοί έχουν επίσης χαμηλά επίπεδα λιπιδίων στην κυκλοφορία τους. Στις ανεπτυγμένες χώρες παρουσιάζεται μία γενική αύξηση στα μέσα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης, η οποία είναι αποτέλεσμα του τρόπου ζωής και διατροφικών συνηθειών. Έχει παρατηρηθεί δε, ότι πληθυσμοί που μετανάστευσαν από πρωτόγονες κοινωνίες σε ανεπτυγμένες βιομηχανικά χώρες, συνήθως αλλάζουν τον τρόπο ζωής τους με συνέπεια την αύξηση της πρόσληψης θερμίδων, ζωικών λιπών κ.λ.π. με συνακόλουθη αύξηση της παχυσαρκίας, υπερλιπιδαιμιών, υπέρτασης και διαβήτη, δηλαδή παραγόντων που ευοδώνουν την ανάπτυξη αθηρομάτωσης (34). Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα επίπεδα χοληστερόλης και LDL, εξαρτώνται από την ποσότητα χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων της διαίτας. Το μέσο επίπεδο χοληστερόλης, στους περισσότερους πληθυσμούς, συνδέεται στενά με την ποσότητα ζωικών λιπών, ενώ αυξημένη κατανάλωση των τελευταίων σχετίζεται και με μεγαλύτερη αναλογία κορεσμένων λιπών, μειωμένη πρόσληψη σύνθετων υδατανθράκων και φυτικών ινών, που πάλι μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση της χοληστερόλης του πλάσματος. Από την άλλη, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων είναι πιο ευαίσθητα στην θερμιδική πρόσληψη και την λήψη αλκοόλ.

Φαίνεται να υπάρχουν γενετικές διαφορές όσον αφορά τη δυνατότητα της χοληστερόλης της διαίτας, να επηρεάζει τα επίπεδα αυτής στο πλάσμα, τόσο μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού, όσο και μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Η σχέση μεταξύ αναλογίας κορεσμένων/ακόρεστων λιπαρών οξέων και των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων είναι επιβεβαιωμένη, ενώ η σημασία των

απαραίτητων λιπαρών οξέων και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου (ιχθυέλαια) είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

Σε γενικές γραμμές οι οδηγίες που δίνονται, για τον γενικό πληθυσμό των αναπτυγμένων χωρών, είναι η διατήρηση του ιδανικού σωματικού βάρους (ΙΣΒ), η μείωση των θερμίδων που προέρχονται από λίπος σε 30-35% της συνολικής ενέργειας (με λιγότερο από 10% να προέρχεται από ζωικά λίπη) και μείωση της πρόσληψης χοληστερόλης σε λιγότερο από 300mg (34).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ — ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

3.1 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

3.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος ανοσία αναφέρεται στην ικανότητα του οργανισμού να αντιδρά με διάφορες ξένες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων μικροβίων και μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαριτών κ.λ.π., χωρίς αυτό να συνιστά υποχρεωτικά μία φυσιολογική ή παθολογική επεξεργασία. Τα κύτταρα και τα μόρια που είναι υπεύθυνα για την ανοσία απαρτίζουν το ανοσολογικό σύστημα, ενώ οι απαντήσεις του συστήματος αυτού στις ξένες ουσίες, αποτελούν την ανοσολογική απόκριση.

Γενικά μπορούμε να διακρίνουμε δύο τύπους ανοσίας (45,46,47,48):

- 1) **Μη ειδική ανοσία**, όπου οι ανοσολογικές αποκρίσεις δεν μπορούν να ξεχωρίσουν τους διαφορετικούς βλαπτικούς παράγοντες. Στοιχεία αυτού του τύπου ανοσίας αποτελούν το δέρμα, ο βλεννογόνος, η λυσοζύμη, τα κύτταρα «φυσικοί φονιάδες» (natural killer cells), τα φαγοκύτταρα κ.λ.π.
- 2) **Ειδική ή επίκτητη ανοσία**, όπου το ανοσολογικό σύστημα εξουδετερώνει τα ξένα μόρια (τα οποία ονομάζονται αντιγόνα) με ειδική αντίδραση έναντι αυτών. Η ειδική ανοσία μπορεί με την σειρά της να διακριθεί σε δύο τύπους:

α) Χυμική ανοσία, η οποία διαμεσολαβείται από την δράση ειδικών μορίων, τα οποία στρέφονται έναντι του αντιγόνου, και καλούνται αντισώματα.

β) Κυτταρική ανοσία, η οποία διαμεσολαβείται από την δράση ειδικών ευαισθητοποιημένων κυττάρων, των Τ-λεμφοκυττάρων.

Τα κύρια χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσίας είναι τα εξής:

α) Μνήμη: για κάθε εισβολή ξένου αντιγόνου, δημιουργείται μνήμη ώστε για κάθε μεταγενέστερη εισβολή του ίδιου αντιγόνου να υπάρχει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη ανοσολογική απόκριση.

β) Εξειδίκευση: η ειδική ανοσολογική απόκριση, έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου-εισβολέα, ενισχύει ταχύτερα και αποτελεσματικότερα τους προστατευτικούς μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας.

γ) Ανοχή: το ανοσολογικό σύστημα έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τα μοριακά στοιχεία του ίδιου του οργανισμού και να μην αντιδρά έναντι αυτών, κάτω από φυσιολογικές καταστάσεις.

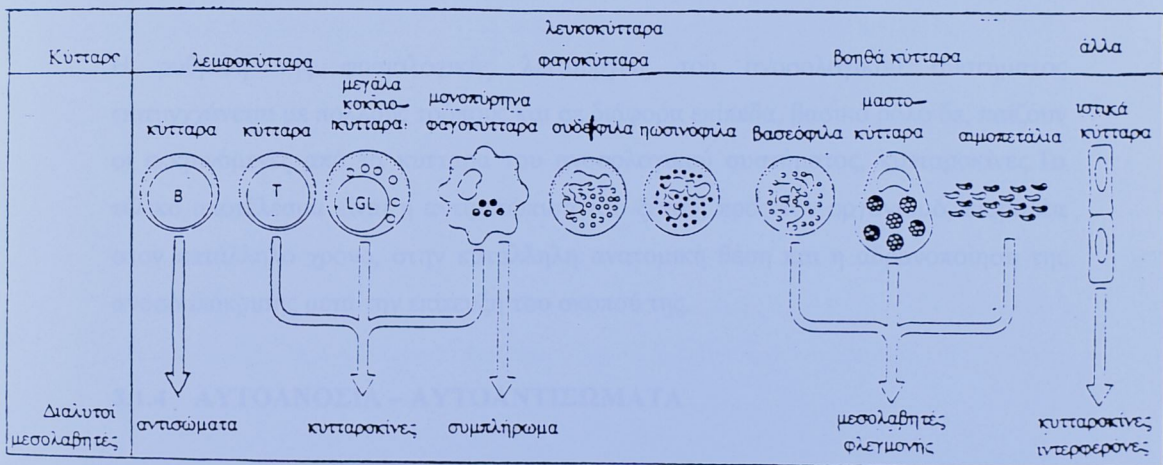
3.1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Τα κύρια κύτταρα (45,46) του ανοσολογικού συστήματος είναι τα μακροφάγα-μονοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα και τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από πολυδύναμα μητρικά κύτταρα του μυελού των οστών και είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης. Η λειτουργία των κυττάρων αυτών αφορά την αναγνώριση, επεξεργασία, παρουσίαση και απάντηση του οργανισμού στα αντιγόνα. Επιπρόσθετα, άλλου τύπου κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην μη ειδική ανοσία και την φλεγμονώδη διαδικασία που ακολουθεί την καταστροφή ενός αντιγόνου.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγονται στον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο θύμο αδένα όπου και ωριμάζουν-διαφοροποιούνται σε ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία υπάρχουν στον περιφερικό λεμφικό ιστό και κυκλοφορούν στο αίμα και στην λέμφο. Ένας υποπληθυσμός των ώριμων Τ-λεμφοκυττάρων μετατρέπονται σε Τ-κυτταροτοξικά, τα οποία είναι ικανά να καταστρέψουν ξένα ή μολυσμένα κύτταρα. Ένας άλλος υποπληθυσμός των Τ-λεμφοκυττάρων εκτελεί την κύρια λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων που είναι η ρύθμιση της λειτουργίας τόσο των Τ- και Β-λεμφοκυττάρων όσο και των μακροφάγων, είτε με την άμεση επαφή μαζί τους είτε με την μεσολάβηση διαλυτών παραγόντων που ονομάζονται κυτταροκίνες.

Τα B-λεμφοκύτταρα αποτελούν το 10-15% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και έχουν δύο φάσεις ωρίμανσης: την πρώτη φάση που είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του αντιγόνου και την δεύτερη που είναι αντιγονοεξαρτώμενη. Σημαντικότατο ρόλο στην ωρίμανση-διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων παίζουν οι κυτταροκίνες. Στην επιφάνεια των ώριμων B-λεμφοκυττάρων εκφράζονται μόρια ανοσοσφαιρίνης τάξης IgM μέσω των οποίων ένα B-λεμφοκύτταρο μπορεί να αναγνωρίσει και συνδεθεί με το αντιγόνο. Η δέσμευση αυτή εκκινεί μία διαδικασία που ως αποτέλεσμα έχει την ματετροπή των B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα, τα οποία και είναι τα κύτταρα που παράγουν τις ανοσοσφαιρίνες ή αλλιώς αντισώματα.

Τα μονοκύτταρα-μακροφάγα είναι τα κλασσικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσολογικού μας συστήματος, δηλαδή τα κύτταρα τα οποία θα προσλάβουν (με ενδοκύττωση) τα αντιγόνα, θα τα επεξεργαστούν στο εσωτερικό τους (πρωτεολυτική διάσπαση) και εν συνεχεία θα τα παρουσιάσουν, με την βοήθεια ειδικών μορίων που φέρουν στην επιφάνειά τους (μόρια ιστοσυμβατότητας-HLA), στα T-λεμφοκύτταρα.



Σχήμα 1. Βασικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος : κύτταρα – διαλυτοί διαμεσολαβητές (από Roitt).

3.1.3 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Η ειδική ανοσολογική απόκριση ξεκινά με την αναγνώριση του αντιγόνου και καταλήγει στην καταστροφή του. Γενικά οι φάσεις της ανοσολογικής απόκρισης είναι οι εξής (45):

- 1) αναγνώριση του αντιγόνου, η οποία μπορεί να επιτευχθεί είτε από τα Β-λεμφοκύτταρα είτε από άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά, μακροφάγα), τα οποία εν συνεχεία θα το «παρουσιάσουν» στα Τ-λεμφοκύτταρα,
- 2) ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος, κατά την οποία όλα τα λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται αφενός προς την δημιουργία ειδικών κυτταρικών κλώνων, αφετέρου διαφοροποιούνται ώστε να μετατραπούν σε κύτταρα με ικανότητα καταστροφής του αντιγόνου,
- 3) καταστροφή του αντιγόνου μέσω ειδικών ανοσοσφαιρινών ή κυττάρων. Η φάση αυτή επιτελείται τόσο από Τ-λεμφοκύτταρα και αντισώματα, όσο και από μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας (πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος και αναγνώριση-φαγοκυττάρωση του συμπλόκου, από ειδικούς υποδοχείς για το αντίσωμα, στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου).

Η ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος επιτυγχάνεται με πολλούς τρόπους και σε διάφορα επίπεδα, βασικό ρόλο δε, παίζουν οι εκκρινόμενες από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, κυτταροκίνες. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αντιμετώπιση του ξένου, προς τον οργανισμό, εισβολέα στον κατάλληλο χρόνο, στην κατάλληλη ανατομική θέση και η αδρανοποίηση της ανοσοαπόκρισης μετά την επίτευξη του σκοπού της.

3.1.4 ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ – ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι μία ομάδα νοσημάτων όπου χαρακτηριστικό τους είναι η ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος κατά ιδίων αντιγόνων (δηλαδή αυτόλογων στοιχείων του οργανισμού) υπό την μορφή αντισωμάτων, τα οποία τώρα καλούνται αυτοαντισώματα, ή και αυτοδραστικών κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων. Μόνη η παρουσία στον ορό αυτοαντισωμάτων ή αυτοδραστικών Τ-λεμφοκυττάρων, δεν σημαίνει απαραίτητα και νόσο (49). Αυτοαντισώματα ή και

αυτοδραστικά κύτταρα παρατηρούνται και σε υγιή άτομα, με αυξημένη συχνότητα στο γήρας, στις χρόνιες λοιμώξεις και μετά από εμβολιασμούς (50). Γενικά τα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν μία ποικιλόμορφη κλινική έκφραση. Μπορεί να έχουν μία πολύ ήπια κλινική συνδρομή, σχεδόν ασυμπτωματική, αλλά μπορεί και να εκδηλώνονται με βαριά προσβολή ζωτικών οργάνων (νεφρών, κεντρικού νευρικού συστήματος) (50).

Η δημιουργία αυτοαντισωμάτων μπορεί να προκληθεί εάν διαταραχθεί οποιοδήποτε κομμάτι της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί αυτοαντισώματα έναντι πολλών στοιχείων του οργανισμού, για λίγα όμως έχει δειχθεί και η παθογενετική τους δράση. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί είτε έμμεσα, με βάση επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες συσχετίζουν την παρουσία ενός αυτοαντισώματος με κάποια κλινικοπαθολογική οντότητα, είτε άμεσα με παθητική έγχυση του αυτοαντισώματος σε ένα πειραματικό ζώο (συνήθως ειδικά ποντίκια). Αν αυτό οδηγεί σε αναπαραγωγή, στο ζώο, κλινικών συμπτωμάτων που μιμούνται τη νόσο, είναι σημαντική ένδειξη για την παθογενετικότητα του αντισώματος (49).

Διάφορες θεωρίες έχουν διατυπωθεί για την δημιουργία των αυτοαντισωμάτων, ωστόσο η έναρξη της αυτοανοσίας αποτελεί ακόμα ένα αναπάντητο ερώτημα. Τέτοια θεωρία είναι αυτή της μοριακής μίμησης (ένα ξένο αντιγόνο μιμείται ένα αυτοαντιγόνο λόγω στερεοχημικής ομοιότητας) ή της τροποποίησης του αυτοαντιγόνου (από φάρμακα, ιούς κ.τ.λ.). Άλλη θεωρία είναι αυτή της αλλαγής της έκφρασης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (HLA τάξης II) και η παρουσία τους σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν υπάρχει (π.χ. αυτό έχει παρατηρηθεί στην θυρεοειδίτιδα Hashimoto, στα κύτταρα του θυροειδούς). Επίσης η παθολογική ανοσορύθμιση των T-λεμφοκυττάρων έχει προταθεί ως μηχανισμός παραγωγής αυτοαντισωμάτων (50).

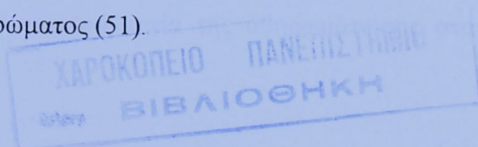
3.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

3.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μορφολογικές και ανοσολογικές μελέτες επί αθηρωματικών πλακών έχει αναδείξει ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι από τα σπουδαιότερα κυτταρικά στοιχεία της πλάκας. Έχουν επίσης αναδείξει την παρουσία μιας τοπικής ανοσολογικής ενεργοποίησης στο αρτηριακό τοίχωμα κατά την αθηροσκλήρυνση (51). Μελέτες *in vitro* με κυτταρικές καλλιέργειες, έχουν πιστοποιήσει μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ Τ-λεμφοκυττάρων και άλλων κυττάρων που ενέχονται στην διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Πολλά από τα στοιχεία αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και με πειραματικά μοντέλα αθηρωμάτωσης (51).

Η ανακάλυψη ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων, στην αθηρωματική πλάκα (52,53) μαζί με τη εύρεση μορίων αντιγονοπαρουσίασης τάξης HLA II (54) και την έκφραση-έκκριση κυτταροκινών (IFN γ , IL-2 - παραγωγή από ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, IL-1 α και IL-1 β - παραγωγή από μακροφάγα και TNF α -παραγωγή από λεία μυϊκά κύτταρα) (55,56) έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια σε ανοσολογικούς μηχανισμούς και διαδικασίες φλεγμονής, στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης. Αυτό ενισχύθηκε περαιτέρω από την ανακάλυψη αντισωμάτων έναντι στοιχείων της αθηρωματικής πλάκας π.χ. της οξειδωμένης μορφής της λιποπρωτεΐνης LDL (57).

Με βάση ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 10-20 % των συνολικών κυττάρων, που εντοπίζονται σε μία αθηρωματική πλάκα, είναι Τ-λεμφοκύτταρα, εκ των οποίων τα 2/3 είναι CD4-T (βοηθητικά Τ) και το 1/3 CD8-T (κυτταροτοξικά Τ) (53,58). Φαίνεται ότι τόσο κυτταροτοξικές (τουλάχιστο στα αρχικά στάδια της αθηρωμάτωσης) όσο και αντιδράσεις του σκέλους της ειδικής χυμικής ανοσίας λαμβάνουν μέρος. Οι μηχανισμοί της χυμικής ανοσίας μπορεί από την μία πλευρά να οδηγούν σε απόσυρση αντιγονικών στοιχείων της πλάκας, αλλά από την άλλη οδηγούν στην έναρξη μηχανισμών κυτταροτοξικότητας που διαμεσολαβούνται από την δράση τόσο των μακροφάγων όσο και του ενεργοποιημένου καταρράκτη του συμπληρώματος (51).



3.2.2 ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ – ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Δύο αυτοάνοσοι νόσοι έχουν προσφέρει σημαντική νέα πληροφορία στην προσπάθεια διερεύνησης των παθογενετικών μηχανισμών της αθηρωμάτωσης: ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) και το Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων (APS-antiphospholipid syndrome) (59,60). Έχει υποστηριχθεί (61) μάλιστα ότι το APS αποτελεί ένα σημείο ‘συνάντησης’ αυτοανοσίας-αθηρωμάτωσης. Πλήθος κλινικών μελετών έχουν αναδείξει την προκεχωρημένη αθηρωμάτωση, ως ένα από τους σημαντικότερους παράγοντες νοσηρότητας-θνησιμότητας σε ασθενείς με ΣΕΛ (62,63). Παράγοντες οι οποίοι έχουν συσχετισθεί με την πρόωπη αθηρωμάτωση στα πλαίσια του ΣΕΛ, είναι μεταξύ άλλων: τα εμμένοντα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης ιδίως στα 3 πρώτα έτη του ΣΕΛ (64), η λήψη στεροειδών, η οποία οδηγεί σε δυσλιπιδαιμίες (65), καθώς τέλος και η ίδια η αυτοάνοση νόσο (66).

Οι μηχανισμοί ανάπτυξης αθηρωμάτωσης στα πλαίσια του ΣΕΛ δεν είναι ξεκάθαροι, ενώ οι παραδοσιακοί μηχανισμοί που έχουν διατυπωθεί για την στεφανιαία νόσο, δεν φαίνεται να αρκούν για την πλήρη κατανόηση της παραπάνω παθοφυσιολογίας. Πιστεύεται ότι ο ΣΕΛ παρέχει το κατάλληλο υπόστρωμα φλεγμονής για την επιτάχυνση της αθηρωμάτωσης, δοθέντος και του ότι η τελευταία έχει θεωρηθεί μια φλεγμονώδης διαδικασία (37). Δεδομένης της χρόνιας φλεγμονώδους φύσης του ΣΕΛ, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών όπως το αμυλοειδές Α και η εκκρινόμενη φωσφολιπάση Α₂, οι οποίες με την σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο ενδοθήλιο, επιταχύνοντας έτσι την διαδικασία της θρόμβωσης (67).

Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης Lp(a), η οποία θεωρείται ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο, έχουν βρεθεί στον ΣΕΛ (68,69). Η αυξημένη αυτή παρουσία μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή της στα πλαίσια του ΣΕΛ είτε σε αντίδραση οξείας φάσης. Δυσλειτουργίες που σχετίζονται με την έκφραση ενός προπηκτικού φαινότυπου στον ΣΕΛ, π.χ. αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου (παράγοντας κινδύνου στεφανιαίας νόσου) αναμένεται να συμβάλουν στην προκεχωρημένη αθηρωμάτωση στα πλαίσια του ΣΕΛ (66). Τέλος η αυξημένη παρουσία αντισωμάτων έναντι της οξειδωμένης μορφής LDL στους ασθενείς με ΣΕΛ (70) φαίνεται να είναι μία πρόσθετη παθογενετική αιτία της αθηρωμάτωσης στα πλαίσια του ΣΕΛ.

3.2.3 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ - ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Έχει υποστηριχθεί ότι υπάρχει κοινό αιτιολογικό υπόβαθρο μεταξύ APS και αθηρωμάτωσης (71). Διάφορα πειραματικά ευρήματα συνηγορούν επί αυτού, όπως το αυξημένο οξειδωτικό status (oxidative stress) που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με APS (72), καθώς και η παρουσία αυξημένων επιπέδων δεικτών ενδοθηλιακής βλάβης π.χ. TNFα, παράγοντας WF (73).

Πρόσθετο στοιχείο αποτελεί η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ κάποιων αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και αντισωμάτων εναντίον της οξειδωμένης LDL (74,75). Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι μια πολύ ευρεία και ετερογενής ομάδα αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται έναντι φωσφολιπιδίων ή/και πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν με φωσφολιπίδια, με σημαντικότερο εκπρόσωπο την β2-γλυκοπρωτεΐνη I (β2GPI) (76). Η παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και ιδίως έναντι του αρνητικά φορτισμένου φωσφολιπιδίου καρδιολιπίνη, αποτελεί ένα από τα κριτήρια διάγνωσης του APS (77). Ο Hasunuma και συν. (78) έδειξαν ότι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα με την μεσολάβηση της β2GPI, μπορούν να επιταχύνουν την πρόσληψη της οξειδωμένης μορφής LDL από τα μακροφάγα, ενώ η γλυκοπρωτεΐνη από μόνη της φαίνεται να την παρεμποδίζει. Έτσι μπορεί να θεωρηθεί ότι η β2GPI έχει ένα διττό ρόλο: προστατευτικό έναντι της αθηρωματικής διαδικασίας όταν δεν υπάρχουν αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, ενώ ο ρόλος αυτός καθίσταται προαθηρωματικός παρουσία των αντισωμάτων (79). Πρόσθετη επιβεβαίωση για την συμμετοχή της β2GPI στην αθηρωγόνο διαδικασία, αποτελεί η εντόπιση μεγάλων ποσοτήτων αυτής σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες (80). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πειράματα και σε ζώα (ανοσοποίηση LDL-RD ποντικών με β2GPI καθώς και αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα) (81,82) με σκοπό την διελεύκανση της συμμετοχής των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και της β2GPI στην αθηρωμάτωση. Όλες οι πειραματικές ενδείξεις συνηγορούν υπέρ ενός ενεργού ρόλου τους στην αθηρωμάτωση.

3.2.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL (anti-oxLDL)

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντισώματα έναντι της οξειδωμένης LDL είναι προγνώστικός παράγοντας, για έμφραγμα του μυοκαρδίου και της αθηρωμάτωσης των καρωτίδων σε μη αυτοάνοσους ασθενείς (83). Η οξειδωμένη μορφή της LDL έχει δείχθει ότι προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα μέσω ειδικών υποδοχέων, που αναγνωρίζουν μόνο αυτή τη μορφή της LDL (84). Η παρουσία τροποποιημένων μορφών LDL (οξειδωμένη, MDA-LDL κ.α.), εκτός του να επάγει χημειοτακτικούς παράγοντες και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο (85), επάγει και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Τα anti-oxLDL θεωρούνται σήμερα, δείκτες παθογενετικών καθοριστών στην αθηρωμάτωση, όπως και η αυξημένη οξείδωση λιπιδίων και το προφλεγμονώδες υπόβαθρο (83). Τα αντισώματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν ως μία υποομάδα των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, δηλαδή έναντι συμπλέγματος φωσφολιπιδίων – πρωτεϊνών. Αυτό ενισχύεται από το εύρημα ότι η οξείδωση *in vitro* της LDL επάγει την δημιουργία επιτόπων επί του πρωτεϊνικού τους συστατικού, apoB (85). Επιπρόσθετα, αυξημένη διασταυρούμενη αντίδραση παρατηρείται μεταξύ των anti-oxLDL και των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (κυρίως αυτών έναντι του συμπλόκου καρδιολιπίνης-β2GPI) (83). Φαίνεται ότι τα anti-oxLDL αυξάνουν την συσσώρευση της οξειδωμένης LDL στο ενδοθηλιακό τοίχωμα, με κάποιο μηχανισμό πρόσθετο αυτού που διαμεσολαβείται από τον scavenger υποδοχέα των μακροφάγων (83).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία και την συσχέτιση με αθηρωμάτωση, αντισωμάτων έναντι και της λιποπρωτεΐνης Lp(a). Υψηλά επίπεδα του μορίου σε ασθενείς με ΣΕΛ και APS έχουν περιγραφεί, όπως και αυτοαντισωμάτων τα οποία αντιδρούν *in vitro* με μαλονδιαλδεύδο-οξειδωμένη Lp(a), στους παραπάνω ασθενείς (86). Αυτά τα ευρήματα, σε συνδιασμό με τις ενδείξεις αυξημένου οξειδωτικού status στους ασθενείς αυτούς, υποδεικνύουν ότι και στην περίπτωση της Lp(a), μπορεί να βρεί εφαρμογή η λεγόμενη «οξειδωτική υπόθεση της αθηρωμάτωσης».

3.2.5 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ (Heat Shock Proteins) – ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Πρόσφατα έχει υποστηριχθεί ότι ένα από τα πρωτογενή αίτια για την αθηρωμάτωση, μπορεί να είναι η αυτοάνοση απόκριση έναντι της πρωτεΐνης του στρες 65 (Hsp 65), το οποίο μπορεί να είναι το εναρκτήριο γεγονός, που θα πυροδοτήσει εν συνεχεία την φλεγμονώδη αντίδραση στο σημείο που αργότερα θα αναπτυχθεί η αθηρωματική πλάκα (87). Η θεώρηση αυτή («ανοσολογική υπόθεση») δεν έρχεται σε αντίθεση αλλά ενισχύει τις ήδη υπάρχουσες θεωρίες («απάντηση στη βλάβη», «οξειδωτική υπόθεση») που έχουν διατυπωθεί για την αθηρωμάτωση.

Άτομα με αθηρωματική βλάβη καρωτίδων, βρέθηκε να έχουν συγκριτικά υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι της Hsp65, σε σχέση με αυτούς χωρίς βλάβη (88). Τα αντισώματα αυτά ενδεχομένως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας νέος προγνωστικός και διαγνωστικός δείκτης για την αθηροσκλήρυνση, ανεξάρτητος από τους κλασσικούς (αρτηριακή πίεση, επίπεδα χοληστερόλης κ.λ.π.). Τα anti-Hsp65 μπορούν επιπλέον να δίνουν διασταυρούμενη αντίδραση με ένα άλλο μέλος των πρωτεΐνων του στρες, την Hsp60 (88). Σημαντικότερο στοιχείο είναι το πειραματικό εύρημα, ότι τα ανθρώπινα anti-Hsp65 έχουν την ικανότητα να προκαλούν λύση *in vitro*, ενδοθηλιακών κυττάρων υπό στρες αλλά όχι και αυτών χωρίς στρες. Αυτό οφείλεται μάλλον στην πρόσδεσή τους, επί της εκφραζόμενης στην κυτταρική επιφάνεια, Hsp60 και την επακόλουθη κυτταροτοξικότητα τους μέσω των αντισωμάτων αυτών (αντισωματικά μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα) (89). Αυτό το εύρημα συνηγορεί επί ενός παθογενετικού ρόλου των αντισωμάτων αυτών, εκτός της διαγνωστικής τους αξίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Χρονολογία σταθμός στην ιστορία των ανοσοαναλύσεων είναι το 1959, όταν οι Yalow και Berson εισήγαγαν μία ανταγωνιστική μέθοδο για την μέτρηση της ινσουλίνης βασισμένη στη χρήση του ραδιενεργού ^{125}I ως ιχνηθέτη (90). Στις δεκαετίες που ακολούθησαν παρατηρήθηκε έντονη προσπάθεια ανάπτυξης νέων τεχνικών καθώς και επέκτασης αυτών σε χώρους πέρα της κλινικής εφαρμογής, όπως στους τομείς των τροφίμων, του περιβάλλοντος, της γεωργίας κ.α. (91,92).

Η βάση κάθε ανοσοπροσδιορισμού είναι η ειδική αντίδραση αντισώματος (Ab) – αντιγόνου (Ag). Αν οι συγκεντρώσεις και των δύο αυτών στοιχείων της αντίδρασης είναι σε επίπεδο ικανοποιητικό και στην κατάλληλη αναλογία, η αντίδραση αυτή οδηγεί σε καθίζηση του σχηματιζόμενου ανοσοσυμπλέγματος, οπότε και η υπαρξή του γίνεται αντιληπτή με την χρήση ειδικών χρωστικών. Αν αυτό δεν συμβαίνει, τότε απαιτείται η εύρεση άλλων τρόπων ανίχνευσης αυτής της πρωτογενούς αντίδρασης, μέσω δευτερογενών αντιδράσεων (σήμανση αντιγόνου ή αντισώματος κ.α.) (93).

Μερικές χρήσιμες αναλυτικές έννοιες και ορισμοί, που πρέπει να έχει υπ' όψιν του αυτός που ασχολείται με τέτοιου είδους τεχνικές, είναι οι ακόλουθοι:

Ανάπτυξη – Προτυποποίηση Μεθόδου (development-standardization of method):

κατά την «εγκατάσταση» μίας νέας μεθόδου ακολουθούνται γενικά τα εξής στάδια: α) εύρεση των επιμέρους αναλυτικών παραμέτρων (χρόνοι, συγκεντρώσεις, όγκοι κ.α.) της μεθόδου, οι οποίοι δίνουν σε αυτή την μέγιστη δυνατή ευαισθησία και ειδικότητα, β) εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου μέσω της σύγκρισης της με μια μέθοδο αναφοράς, γ) διερεύνηση της επίδρασης του μικροπεριβάλλοντος του δείγματος (matrix effect) καθώς και ενδεχόμενοι τρόποι προπαρασκευής του δείγματος, δ) εφαρμογή σε διάφορες κλινικές καταστάσεις για διερεύνηση της χρησιμότητάς της (92).

Πρότυπα υλικά και μέθοδοι (prototype materials and methods): οι πρότυπες ουσίες χρησιμοποιούνται για την βαθμονόμηση των μετρήσεων, δηλαδή για την μετατροπή του αναλυτικού σήματος που λαμβάνουμε κατά την εφαρμογή της μεθόδου (απορρόφηση, φθορισμός κ.α.) σε συγκέντρωση. Υπάρχουν τα πρωτογενή πρότυπα στα οποία η προς προσδιορισμό ουσία (π.χ. κυτταροκίνη) βρίσκεται στην πιο καθαρή μορφή που μπορεί να υπάρχει και η σύσταση των διαλυμάτων της να είναι επακριβώς γνωστή και τα δευτερογενή πρότυπα όπου οι απαιτήσεις δεν είναι τόσο υψηλές, αλλά έχουν τιτλοποιηθεί με βάση ένα πρωτογενές πρότυπο. Αντίστοιχα για τις μεθόδους έχουμε : α) οριστική μέθοδος (definitive method): η πιο ακριβής μέθοδος με τα δεδομένα της σύγχρονης επιστήμης, δίνει τις «οριστικές» τιμές της προσδιοριζόμενης ουσίας, β) μέθοδος αναφοράς (reference method): μας δίνουν τις λεγόμενες τιμές αναφοράς, γ) επιλεγμένες μέθοδοι (recommended methods): εκτελούνται από μη εξειδικευμένα εργαστήρια, αλλά είναι αξιόπιστες και εφαρμόσιμες (94).

Σφάλματα (errors): γενικά, μπορούμε να τα διακρίνουμε σε δύο κατηγορίες:

α) Προαναλυτικά σφάλματα : είναι εξωεργαστηριακά σφάλματα και αφορούν τόσο τον ίδιο τον ασθενή όσο και το δείγμα, ασκούν μεγάλη επίδραση στον προσδιορισμό της ενδιαφερόμενης ουσίας, ενώ είναι ικανή η παρακολούθησή τους και ο περιορισμός-συνυπολογισμός τους στο τελικό αποτέλεσμα. Μερικές από τις αιτίες που τα προκαλούν είναι οι ατομικές συνήθειες (π.χ. κάπνισμα), η κατάσταση της υγείας του ατόμου, τυχόν λήψη φαρμάκων, καθώς και ο τρόπος συλλογής-διαχωρισμού-φύλαξης του δείγματος.

β) Αναλυτικά σφάλματα: είναι ενδοεργαστηριακά, αφορούν το δείγμα, έχουν μικρότερη επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα, συνήθως γίνεται ακριβής εκτίμησή τους και διόρθωση. Μπορούν να οφείλονται σε προβλήματα ακρίβειας-επαναληπτικότητας (π.χ. λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων του προς προσδιορισμό μορίου), σε αλληλεπιδράσεις με άλλα στοιχεία του δείγματος, καθώς και στα χρησιμοποιούμενα πρότυπα (95).

Αλληλεπιδράσεις – Παρεμβολές (interactions – intervention): το αποτέλεσμα τους μπορεί να είναι είτε θετικό είτε αρνητικό. Η ανίχνευσή τους μπορεί να γίνει :

α) Στο στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου, όπου και η αντουμετώπισή τους μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως η σύγκριση της δικής μας μεθόδου με άλλη ήδη εγκατεστημένη ή με κάποια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο (ανεύρεση δειγμάτων με μη «αναμενόμενα» αποτελέσματα), καθώς και με την βοήθεια κλινικής πληροφορίας (συλλογή δειγμάτων ύποπτων για την ύπαρξη παρεμποδιστών, που μας βοηθούν σε στοιχεία για τον προσδιορισμό αυτών). Θα πρέπει πάντα να έχουμε κατά νου ότι τυχόν παρεμβολέας μπορεί να υπάρχει και στη μέθοδο σύγκρισης είτε να παρεμβαίνει και στις δύο μεθόδους,

β) Στο στάδιο εφαρμογής της μεθόδου σε καθημερινή βάση (routine practice), όπου και ο μόνος τρόπος ανίχνευσή τους είναι η συχνή ανεύρεση δειγμάτων, των οποίων τα μετρούμενα επίπεδα των ενδιαφερόμενων ουσιών, δεν συμβαδίζουν με την αντίστοιχη κλινική εικόνα των ασθενών (92).

Αντίστοιχα βασικές έννοιες της ανοσολογίας (46,47) που μας βοηθούν στην κατανόηση των ανοσοχημικών τεχνικών, είναι οι εξής:

- 1) **Αντιγόνο (antigen):** ονομάζεται κάθε ουσία η οποία όταν ενεθεί στον οργανισμό, έχει την ικανότητα να αντιδράσει με ειδικά για αυτήν αντισώματα. Ισχυρά αντιγόνα είναι οι πρωτεΐνες, οι γλυκοπρωτεΐνες και λιγότερο οι πολυσακχαρίτες και ελάχιστα τα λιπίδια.
- 2) **Ανοσογόνο (immunogen):** κάθε μακρομοριακή ένωση η οποία όταν ενεθεί στον οργανισμό μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική απάντηση, είτε αυτή είναι η παραγωγή και αντίδραση με ειδικά αντισώματα, είτε η παραγωγή ευαισθητοποιημένων λεμφοκυττάρων.
- 3) **Απτίνη (hapten):** μικρό μόριο, χημικώς προσδιορισμένο, ικανό να προκαλέσει παραγωγή αντισωμάτων μόνο μετά την σύνδεσή του με κάποιο φορέα, πριν ενεθεί στον οργανισμό.
- 4) **Επίτοπος (epitope):** ονομάζεται η περιοχή του αντιγόνου στην οποία συνδέεται το αντίσωμα. Ένα αντιγόνο μπορεί να φέρει στην επιφάνειά του πολλούς ίδιους, επαναλαμβανόμενους ή και διαφορετικούς επιτόπους, αλλά

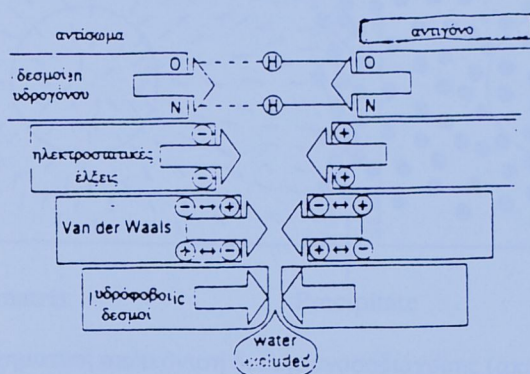
ένα ειδικό αντίσωμα συνδέεται με έναν μόνο από τους διαφορετικούς επιτόπους.

- 5) **Συγγένεια (affinity):** εκφράζεται από την σταθερά σχηματισμού του ανοσοσυμπλέγματος και αντιπροσωπεύει τη δύναμη σύνδεσης ενός αντισώματος με έναν επιτόπο επί του αντιγόνου.
- 6) **Συνάφεια (avidity):** εκφράζει την ολική σταθερότητα του ανοσοσυμπλέγματος και έχει να κάνει με τη γεωμετρία του συνόλου των δεσμών, που σχηματίζονται μεταξύ του ίδιου ή πολλαπλών επιτόπων του αντιγόνου και των πολλαπλών θέσεων σύνδεσης που διαθέτει ένα αντίσωμα.
- 7) **Ειδικότητα (specificity):** εκφράζει την συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ επιτόπου και αντισώματος.
- 8) **Αντιορός (antiserum):** ορός που περιλαμβάνει τα αντισώματα έναντι του μορίου που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση. Περιέχει ετερογενή πληθυσμό αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται έναντι του ίδιου αντιγόνου.
- 9) **Διασταυρούμενες αντιδράσεις (cross reaction):** εκφράζει το φαινόμενο κατά το οποίο, παρατηρείται σύνδεση του ειδικού αντισώματος με κάποιο αντιγόνο, το οποίο είναι διαφορετικό από αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του, λόγω ύπαρξης ίδιου ή/και παρόμοιου στην δομή επιτόπου. Όταν πρόκειται για μεγάλα μόρια, η διασταυρούμενη αντίδραση μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων παρόμοιων πρωτεϊνών, στην ύπαρξη ισομορφών του μορίου ή πρόδρομων μορφών αυτού (π.χ. προΐνσουλιν-ινσουλίνη) ή ακόμα και κυκλοφορούντων θραυσμάτων του μορίου. Μια ενδιαφέρουσα κατηγορία διασταυρούμενων αντιδράσεων προέρχεται από την παρουσία των λεγόμενων ετεροφιλικών αντισωμάτων, τα οποία είναι πολυειδικά αντισώματα, με πιο γνωστό από αυτά τον «ρευματοειδή παράγοντα» (92).
- 10) **Δεσμοί αντισώματος – αντιγόνου (antibody-antigen interaction):** οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ ενός αντισώματος και ενός αντιγόνου, είναι κυρίως οι εξής : α) δυνάμεις Coulomb (ηλεκτροστατικής φύσεως), β) δεσμοί υδρογόνου (ηλεκτροστατικής φύσεως), γ) υδρόφοβοι δεσμοί και δ) δυνάμεις Vander Walls.

Η αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος μπορεί να παρασταθεί από την εξίσωση

$$Ag + Ab \rightleftharpoons Ag - Ab \text{ με σταθερά σχηματισμού } K = \frac{[Ag - Ab]}{[Ag] \times [Ab]}$$

και ποσοτικά να προσεγγισθεί με το μαθηματικό μοντέλο κατά Scatchard, το οποίο εκφράζει τον νόμο δράσης των μαζών για κάθε επιμέρους θέση σύνδεσης και ορίζει τη σταθερά συγγενείας αυτής της σύνδεσης.



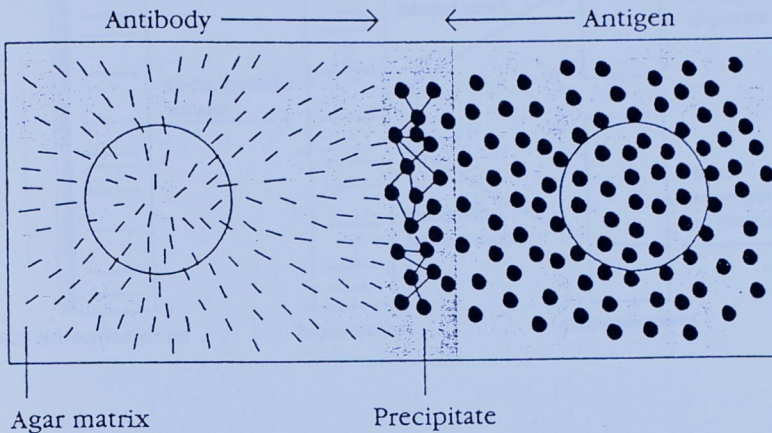
Σχήμα 2. Τύποι δυνάμεων που αναπτύσσονται ανάμεσα στο αντιγόνο και το αντίσωμα.

4.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Μία αρχική ταξινόμηση των ανοσοπροσδιορισμών είναι αυτή που τους διακρίνει σε ποιοτικές και ποσοτικές μεθόδους (93,96). Οι **ποιοτικές μέθοδοι** μπρεί να χρησιμοποιούν διαλυτά αντιγόνα (ή αντισώματα) ή αδιάλυτα/σωματιδιακά αντιγόνα (ή και αντισώματα). Με τη χρήση διαλυτών αντιγόνων, ο προσδιορισμός βασίζεται στην **ιζηματοαντίδραση** αντιγόνου-αντισώματος, η οποία μπορεί να λαμβάνει χώρα σε υγρή φάση ή σε στερεή φάση (πήκτες, gels). Ιζηματοαντίδραση σε υγρή φάση έχουμε στην δοκιμασία του δακτυλίου (ring test) ή απλή διάχυση σε τριχοειδή σωληνάρια, όπου σχηματίζεται δακτύλιος στο σωληνάριο στο σημείο επαφής του αντιπορού με τον ορό (δίσκος ανοσοϊζήματος).

Ιζηματοαντίδραση σε πήκτες έχουμε σε τεχνικές όπως :

Διπλής ανοσοδιάχυσης (Ouchterlony), όπου σε κεντρικό φρεάτιο της πήκτης τοποθετείται ο αντιορός (ή το αντιγόνο) και σε κυκλοτερή φρεάτια τα δείγματα (ή το αντίσωμα). Με παθητική διάχυση, το αντίσωμα και το αντιγόνο συναντώνται σε μία ενδιάμεση απόσταση σχηματίζοντας γραμμή ανοσοϊζήματος (σχήμα 3).

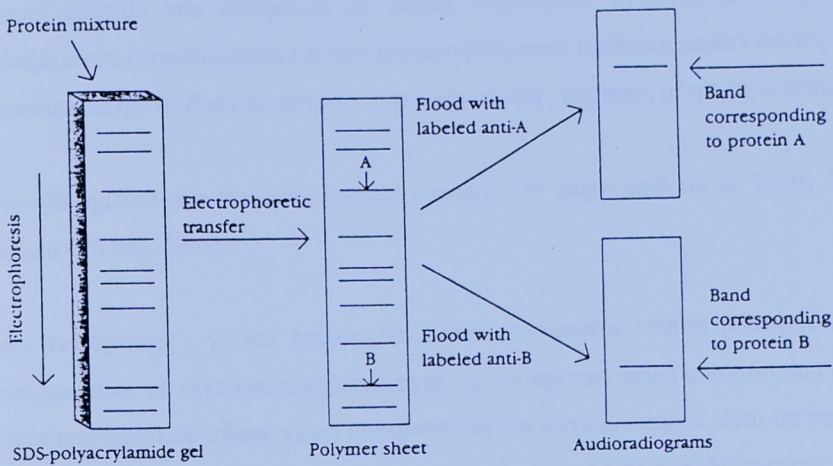


Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση διπλής ανοσοδιάχυσης (από Kuby).

Ηλεκτροσυναίρεση (counter current immunoelectrophoresis) : η μέθοδος βασίζεται στην ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση αντιγόνου και αντισώματος σε πήκτη με υψηλή ηλεκτροενδόσμωση.

Ανοσοηλεκτροφόρηση (immunoelectrophoresis) : αποτελεί συνδυασμό της ηλεκτροφόρησης και της εν συνεχεία διπλής ανοσοδιάχυσης σε πήκτη.

Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) : κατά την μέθοδο αυτή (σχήμα 4) έχουμε ένα αρχικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών του δείγματος, με την βοήθεια μιας SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου. Εν συνεχεία οι πρωτεΐνες μεταφέρονται υπό ηλεκτρικό πεδίο, από τη πήκτη σε ειδική εμβράνη νιτροκυταρίνης, όπου και αναπτύσσεται η ειδική ανοσοαντίδραση, με την χρήση σημειωμένου αντισώματος έναντι του αντιγόνου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε.



Σχήμα 4. Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης (από Roitt)

Ποιοτικές είναι και οι μέθοδοι με αδιάλυτα αντιγόνα (ανοσοσυγκόλληση, αιμοσυγκόλληση κ.α.) όταν γίνονται πάνω σε πλάκες ή σε σωληνάρια.

Οι ποσοτικές μέθοδοι μπορούν να διακριθούν σε μη ιχνηθετημένες και σε ιχνηθετημένες, οι οποίες τελευταίες έχουν και τις περισσότερες εφαρμογές (96,97).

Στις μη ιχνηθετημένες ποσοτικές τεχνικές ανήκουν οι :

Απλή ανοσοδιάχυση (Mancini) : χρήση πήκτης με ενσωματωμένο τον αντιγόρο (ή το αντιγόνο) και ο ορός (ή το αντίσωμα) τοποθετείται σε φρεάτιο μέσα στη πήκτη. Το αντιγόνο διαχέεται κυκλοτερώς, δίνοντας γραμμή ιζήματος σε απόσταση από το φρεάτιο ανάλογη με την συγκέντρωσή του.

Ηλεκτροανοσοδιάχυση (electroimmunodiffusion): ο εξεταζόμενος ορός μαζί με πρότυπους ορούς ηλεκτροφορείται πάνω σε πήκτη (η ένθεση των δειγμάτων γίνεται στην πλευρά της καθόδου) με ενσωματωμένο αντιγόρο. Σχηματίζονται κώνοι ανοσοκαθίζησης με ύψος ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου στον ορό.

Νεφελομετρία-Θολερομετρία (nephelometry – turbidimetry) : έχουμε την αλληλεπίδραση προσπίπτουσας φωτεινής ακτινοβολίας με το σχηματιζόμενο ανοσοσύμπλεγμα του αντιγόνου με ειδικά σημασμένο αντιγόνο. Η εκτίμηση του σκεδαζόμενου (νεφελομετρία) ή του απορροφούμενου (θολερομετρία) φωτός από τα ανοσοσυμπλέγματα δίνει το μέτρο της συγκέντρωσης της προς μέτρηση ουσίας.

Οι ιχνηθετημένοι ανοσοπροσδιορισμοί μπορούν να ταξινομηθούν με βάση διάφορα κριτήρια (96,98), όπως :

Τύπο αντίδρασης : γενικά έχουμε τους **ανταγωνιστικού τύπου (competitive)** (το αντίσωμα είναι σε περιορισμένη ποσότητα, έχουν σχετικά καλή ευαισθησία) και τους **μη ανταγωνιστικού τύπου (non competitive)** (τα αντιδραστήρια είναι σε περίσσεια, είναι κατάλληλοι μόνο για μεγάλου μοριακού βάρους μόρια) προσδιορισμούς.

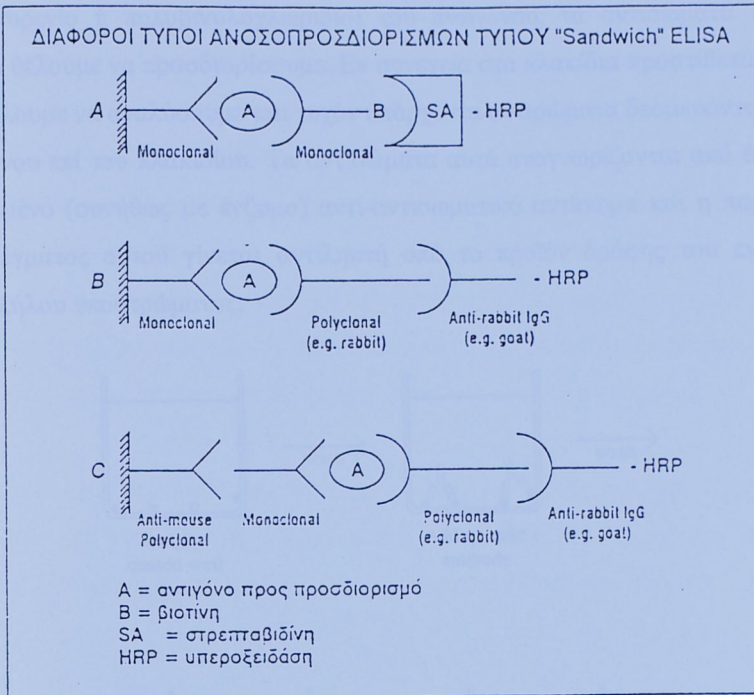
Την αναγκαιότητα διαχωρισμού (ετερογενούς τύπου-heterogenous) ή όχι (ομογενούς τύπου-homogenous), του ελεύθερου ιχνηθέτη από τον συνδεδεμένο, πριν την μέτρηση του σήματος.

Την τεχνική μέτρησης του σήματος, π.χ. πόλωση φθορισμού, μεταφορά ενέργειας φθορισμού κ.λ.π.

Τύπο ιχνηθέτη , όπου έχουμε και τους ακόλουθους τύπους τεχνικών:

- α) RIA (radioimmunoassays): ιχνηθέτης ραδιενεργός, π.χ. ^{125}I
- β) EIA (enzyme immunoassays): ιχνηθέτης ένζυμο, π.χ. αλκαλική φωσφατάση
- γ) FIA (fluorescence immunoassays): ιχνηθέτης φθορίζων μόριο, π.χ. φλουοροσκεΐνη
- δ) LIA (luminescence immunoassays): ιχνηθέτης μόριο με ικανότητα εκπομπής χημειοφωταύγειας, π.χ. λουμινόλη.

Μία ιδιαίτερη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική τύπου EIA είναι και αυτή του τύπου **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)** ή ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσης με σύνδεση ενζύμου. Εναλλακτικές μορφές αυτού του τύπου αναλύσεων φαίνονται στο παρακάτω σχήμα, όπου παρατηρούμε τον εγκλωβισμό του προς προσδιορισμό μορίου ανάμεσα σε δύο αντισώματα ειδικά για αυτό (**sandwich ELISA**).



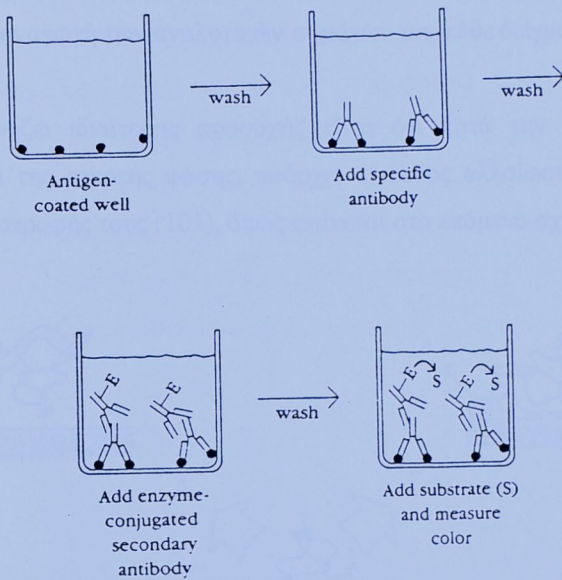
Σχήμα 5. Απεικόνιση εναλλακτικών μορφών προσδιορισμών τύπου ELISA (από Διαμαντής – Χριστόπουλος).

4.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η ανίχνευση και η μέτρηση των αντισωμάτων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά (92,96,99,100). Μερικοί από αυτούς έχουν ήδη αναφερθεί παραπάνω π.χ. διπλή ανοσοδιάχυση, απλή κυκλοτερής ανοσοδιάχυση, ανοσοαποτύπωση, μέθοδοι οι οποίες μας δίνουν μία ποιοτική ή ημιποσοτική πληροφορία για την παρουσία ενός αντισώματος. Το αντίσωμα επί της ουσίας αποτελεί και αυτό ένα είδος πρωτεϊνικού αντιγόνου και ως τέτοιο πρέπει να θεωρείται στους ανοσοπροσδιορισμούς.

Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού αντισωμάτων είναι ο ανοσοπροσδιορισμός τύπου «σύλληψης αντισώματος» (antibody capture assay), η οποία έχει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται διαγραμματικά τα στάδια αυτής της μεθόδου, όπου σε γενικές γραμμές έχουμε την αρχική ακινητοποίηση επί κατάλληλης στερεής φάσης (πλακίδια 96 φρεατίων από

πολυστυρενίο ή πολυβινυλοχλωρίδιο) του αντιγόνου, τα αντισώματα έναντι του οποίου θέλουμε να προσδιορίσουμε. Εν συνεχεία στα πλακίδια προστίθεται το δείγμα που θέλουμε να αναλύσουμε και τυχόν υπάρχοντα αντισώματα δεσμεύονται μέσω του αντιγόνου επί του πλακιδίου. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο σημασμένο (συνήθως με ένζυμο) αντί-αντισωματικό αντίσωμα και η παρουσία του συμπλέγματος αυτού γίνεται αντιληπτή από το προϊόν δράσης του ενζύμου, επί καταλλήλου υποστρώματος.

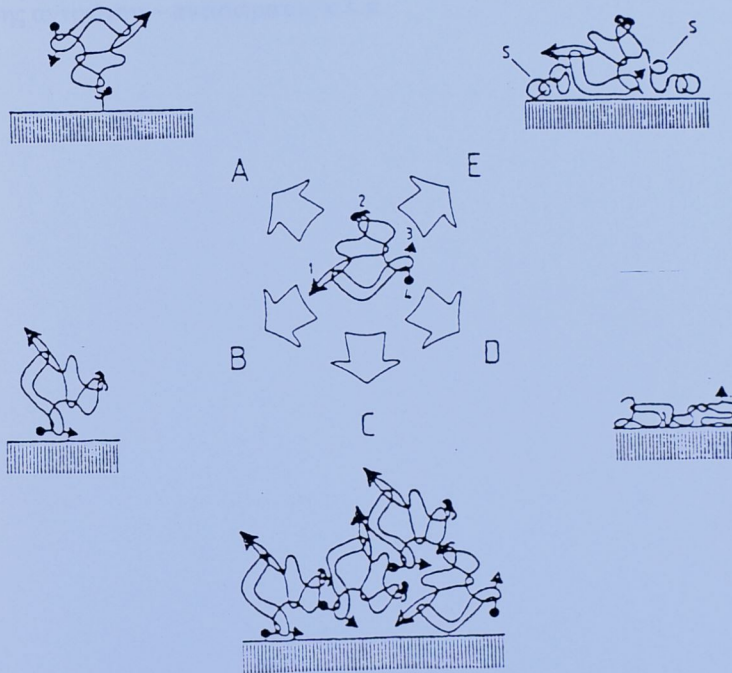


Σχήμα 6. Προσδιορισμός αντισωμάτων με την μέθοδο «σύλληψη αντισώματος».

Για προσδιορισμούς τέτοιου τύπου απαιτείται υψηλής καθαρότητας αντιγόνο, για την επίστρωση του πλακιδίου. Αν αυτό δεν είναι δυνατόν, τότε συμπληρωματικά απαιτείται ακριβής η εφαρμογή μιας δεύτερης μεθόδου για την επιβεβαίωση της παρουσίας ενός αντισώματος. Μερικά γενικά χαρακτηριστικά αυτού του τύπου αναλύσεων είναι: χαμηλό όριο ανίχνευσης ($\sim 0.01-0.1$ ng), γρήγορη και εύκολη εφαρμογή, δυνατότητα ποσοτικοποίησης, ενώ η ευαισθησία τους εξαρτάται από την ειδικότητα του αντιγόνου και την σύναφεια των αντισωμάτων. Δυσκολία παρουσιάζεται κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς στην περίπτωση των αντισωμάτων δεν είναι δυνατή η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων και η δημιουργία καμπύλης αναφοράς, όπως αυτό γίνεται με άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην διαφορετικού βαθμού ετερογένεια

αντισωματικών ειδικοτήτων που παρουσιάζουν ιδίως οι οροί από ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Συνήθως λαμβάνονται καμπύλες αραιώσεων όλων των προς μέτρηση δειγμάτων και σύγκριση των επιμέρους αραιώσεων για την οποία το αναλυτικό σήμα που λαμβάνουμε από την εφαρμογή της τεχνικής, μειώνεται στο μισό της αραιώσης εκκίνησης. Εναλλακτικά επιλέγεται κάποιος ορός, με υψηλό και σταθερό τίτλο αντισωμάτων, που μας ενδιαφέρουν (για κάποια αυτοαντισώματα τέτοιοι οροί παρέχονται από εξειδικευμένα εργαστήρια του εξωτερικού και θεωρούνται ως πρότυποι οροί) και κατασκευάζουμε καμπύλη αραιώσης αυτού, στην οποία γίνεται αναγωγή των αναλυτικών σημάτων του κάθε δείγματος.

Αυτό που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι ότι κατά την ακινητοποίηση ενός αντιγόνου επί της στερεής φάσης, υπάρχει κίνδυνος αλλοίωσης των επιτόπων επί αυτού ή καταστροφής τους (101), όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 7. Διαμορφωτικές αλλαγές επί των πρωτεϊνικών μορίων, κατά την προσρόφησή τους επί στερεής επιφάνειας (από Butler J).

Ορισμένες αναλύσεις αντισωμάτων βασίζονται στην κανότητα αυτών, να μεταβάλλουν την φυσική κατάσταση του αντιγόνου στο οποίο προσδένονται. Αυτή είναι η αρχή της μεθόδου της αιμοσυγκόλλησης, όπου όταν τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus, τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, συνδεθούν με το αντίστοιχο αντίσωμα, προκαλείται συγκόλληση των κυττάρων.

Πολλές φορές χρειάζεται ο καθαρισμός κάποιας συγκεκριμένης τάξης αντισωμάτων πριν τον προσδιορισμό τους, από το συνήθως ευρέως ετερογενές περιβάλλον ενός αντιορού. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με την χρήση τεχνικών χρωματογραφίας συγγενείας, όπου επί της στερεής φάσης, στην στήλη, έχουμε ακινητοποίηση μόρια τα οποία μπορούν να δεσμεύσουν ειδικά τα αντισώματα (π.χ. η πρωτεΐνη Protein A δεσμεύει ειδικά τα IgG τάξης αντισώματα). Τα κεκαθαρμένα αντισώματα μπορούν εκτός του προσδιορισμού τους να χρησιμοποιηθούν και σε άλλες μελέτες, όπως μελέτη αντιγόνων επί κυττάρων ή ιστών (ανοσοϊστοχημεία), προσδιορισμός σταθεράς σύνδεσης αντιγόνου – αντισώματος κ.λ.π.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΚΘΕΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μια πιλοτική μελέτη σχετικά με την επίδραση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων που σχετίζονται με την υγεία και την ποιότητα της ζωής. Το έργο έχει ως στόχο να διερευνήσει τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι παράγοντες επηρεάζουν την ποιότητα της ζωής των ασθενών. Η έρευνα αυτή είναι σημαντική για την κατανόηση της σχέσης μεταξύ της υγείας και της ποιότητας της ζωής, καθώς και για την ανάπτυξη νέων θεραπειών που μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα της ζωής των ασθενών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μια πιλοτική μελέτη η οποία ασχολείται με την επίδραση του α-λινολενικού οξέος σε δείκτες του ανοσοποιητικού συστήματος στο πλάσμα και τον ορό του αίματος υγιών εθελοντών. Σκοπό έχει να βοηθήσει στο σχεδιασμό και την οργάνωση μιας μεγαλύτερης έρευνας που θα ακολουθήσει, η οποία θα γίνει σε άτομα που πάσχουν από στεφανιαία νόσο και θα εξετάζει την πιθανή επίδραση της διαίτας πλούσιας σε α-λινολενικό οξύ στην εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου.

Όπως έγινε φανερό από την βιβλιογραφική ανασκόπηση, στην εξέλιξη της αθηρογένεσης και στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου σημαντικό ρόλο παίζουν οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις και κάποιες αυτοάνοσες καταστάσεις. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν μια σειρά από δείκτες του ανοσοποιητικού συστήματος για να εξετασθεί εάν στο δείγμα των υγιών εθελοντών η διαίτα πλούσια σε α-λινολενικό οξύ έχει κάποια επίδραση σ' αυτούς.

Συγκεκριμένα μετρήθηκαν : α) αντικαρδιολιπινικά αντισώματα της τάξεως IgG, IgM και IgA και β) αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I, και των τριών τάξεων, καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, τα αντισώματα αυτά έχουν ενοχοποιηθεί για συμμετοχή τους στην αθηροματική διαδικασία, γ) αντιτυρινικά αντισώματα, τα οποία αποτελούν ένα γενικό δείκτη αυτοανοσίας (ανευρίσκονται κυρίως στον ΣΕΛ), δ) κυτταροκίνες όπως TNFα, IL-6 (προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες) και IL1β, IL-2R οι οποίες είναι έμμεσος δείκτης ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων και ιδίως των T, κάτι το οποίο εκτός από αυτοάνοσες καταστάσεις παρατηρείται και σε περιπτώσεις λοιμώξεων κ.α. και τέλος στ) Δ-Διμερή, η παρουσία των οποίων στο πλάσμα ενός ατόμου υποδηλώνει την ενεργοποίηση της ινωδολυτικής οδού, άρα έμμεσα και αυτή της πήξης.

5.2 ΟΙ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΙΧΑΝ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ

Στην έρευνα συμμετείχαν 6 εθελοντές, όλοι άνδρες, ηλικίας από 22 έως 36 ετών με μέσο όρο ηλικίας 25. Κανένας από τους εθελοντές δεν αντιμετώπιζε προβλήματα υγείας (ανοσολογικά, καρδιαγγειακά ή οποιασδήποτε άλλης φύσης) και δεν έπαιρνε φάρμακα αλλά ούτε και συμπληρώματα διατροφής. Κανένας επίσης, δεν αντιμετώπιζε πρόβλημα παχυσαρκίας, ο ένας μάλιστα ήταν λιποβαρής με δείκτη μάζας σώματος $\Delta\text{ΜΣ}=18$, ενώ οι υπόλοιποι είχαν $\Delta\text{ΜΣ}$ από 23 έως 25.5 με μέσο όρο $\Delta\text{ΜΣ}=23.4$. Κανένας από τους εθελοντές δεν ήταν καπνιστής και δεν έκανε υπερβολική χρήση αλκοόλ. Οι παραπάνω ιδιότητες θεωρήθηκαν ως προϋποθέσεις για να συμμετάσχει κάποιος στην έρευνα.

5.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η έρευνα ήταν τυχαιοποιημένη, απλής τυφλής διασταυρούμενης (crossover) μορφής και είχε διάρκεια 63 ημέρες. Μετά την εύρεση των εθελοντών, αυτοί κλήθηκαν να συμπληρώσουν ένα τριήμερο ημερολόγιο κατανάλωσης τροφίμων (παράρτημα Ι) όπου περιέγραφαν τα τρόφιμα που κατανάλωσαν μια τυπική ημέρα διατροφής τους. Παρόμοια ημερολόγια συμπλήρωσαν και δύο ακόμα φορές κατά τη διάρκεια της έρευνας για να διπιστωθεί κατά πόσο διατηρούσαν σταθερές της διατροφικές τους συνήθειες και για να εξασφαλισθεί ότι δεν επηρέασαν άλλοι διατροφικοί παράγοντες πέρα από το α-λινολενικό τα αποτελέσματα των μετρήσεων μας.

Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες η μία λάμβανε το συμπλήρωμα αLA από τις 16/2 έως τις 17/3, το ίδιο διάστημα η άλλη ομάδα αποτελούσε την ομάδα ελέγχου. Ακολουθούσε ένα μεσοδιάστημα 10 ημερών (wash out period) και από τις 27/3 έως τις 22/4 η δεύτερη ομάδα λάμβανε το συμπλήρωμα αLA ενώ η πρώτη αποτελούσε την ομάδα ελέγχου. Αιμοληψίες γίνανε στις 16/2, 17/3, 27/3, 22/4 από όλους τους εθελοντές. Συνεπώς, η πρώτη ομάδα έπαιρνε το σκεύασμα για 30 ημέρες, ενώ η δεύτερη για 26 ημέρες.

Όσον αφορά τη μορφή του σκευάσματος πρόκειται για λινέλαιο ενσωματωμένο σε κάψουλες επικαλυμένες με χαρουπάλευρο, το οποίο κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία “Solgar”. Κάθε κάψουλα ζύγιζε 1250mg και περιείχε 713mg (~57%) λινολενικό οξύ, 225mg (~19%) ελαϊκό, 200mg (~16%) λινολεϊκό, 75mg (~5%) παλμιτικό, 38mg (~3%) στεατικό, και 2mg αραχιδονικό οξύ. Η δοσολογία ήταν 6 κάψουλες ημερισίως, 2 με κάθε κύριο γεύμα (πρωινό, μεσημεριανό, βραδινό), συνεπώς κάθε εθελοντής έπαιρνε ημερισίως 4278mg λινολενικού από τις κάψουλες. Δεν έγινε καμία άλλη διατροφική παρέμβαση στους εθελοντές.

Οι αιμολυψίες έγιναν στο Ευγενίδειο νοσοκομείο. Σε κάθε αιμοληψία συλλεγόταν από κάθε άτομο 20ml αίματος και μοιραζόταν ισόποσα σε δύο φυαλίδια, το ένα εκ των οποίων περιείχε EDTA (για την λήψη πλάσματος). Μια ώρα, περίπου, μετά την αιμοληψία ακολουθούσε φυγοκέντριση σε φυγόκεντρο HERMLE Z320 στις 4000 στροφές ανά λεπτό επί 10 λεπτά. Ο υπερκείμενος ορός συλλεγόταν με πιπέτα και μοιραζόταν σε σωληνάρια erpendorf, τα οποία στη συνέχεια, και μέχρι την πραγματοποίηση των πειραμάτων, τοποθετούνταν σε βαθιά κατάψυξη σε -80°C .

5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ

Κατά τη διάρκεια των 63 ημερών που διήρκησε η παρέμβαση, ζητήθηκε από τους εθελοντές να συμπληρώσουν τρεις φορές τριήμερα ημερολόγια κατανάλωσης τροφίμων. Συγκεκριμένα συμπλήρωσαν ένα ημερολόγιο την περίοδο που λάμβαναν το συμπλήρωμα α-λινολενικού οξέος, ένα το μεσοδιάστημα (wash out period) και ένα την περίοδο που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου.

Στα ημερολόγια αυτά, οι εθελοντές κατέγραφαν αναλυτικά και με ακρίβεια τα τρόφιμα τα οποία κατανάλωσαν, τις μάρκες τους και τις ποσότητες στις οποίες καταναλώθηκαν. Παράλληλα έγινε σαφές στους εθελοντές ότι έπρεπε να είναι ειλικρινείς όσον αφορά τα τρόφιμα που κατανάλωναν και ότι δεν υπήρχε κανένας λόγος να αλλάζουν τις διατροφικές τους συνήθειες εξαιτίας της παρέμβασης. Επεξεργασία των διαιτολογίων έγινε με το Diet Analysis Plus (Esha Co U.S.A.) και τους πίνακες συνθέσεως τροφίμων της Τριχοπούλου (102).

Ο έλεγχος αυτός έγινε για να επιβεβαιώσουμε ότι οι εθελοντές είχαν μεταξύ τους και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης παρόμοιες διατροφικές προσλήψεις, και για να μπορούσαμε συνεπώς να αποκλείσουμε ότι άλλοι διατροφικοί παράγοντες, διαφορετικοί από την αυξημένη πρόσληψη α-λινολενικού οξέος, μπορεί να έχουν επηρεάσει τα αποτελεσματά μας.

Τα χαρακτηριστικά της διατροφής που ελέγχουμε ήταν η ποσότητα των θερμίδων, τα ποσοστά των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων, των λιπών (ξεχωριστά κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων) και αλκοόλ καθώς και την ποσότητα της χοληστερόλης που καταναλώθηκε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

6.1. Προσδιορισμός Αντικαρδιολιπινικών Αντισωμάτων (anticardiolipin antibodies - aCL)

6.1.1. IgG αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (IgG - aCL)

1) Επίστρωση (coating step) των πλακιδίων μικροτιτλοδοτήσεως, με διάλυμα καρδιολιπίνης, αραιωμένης σε απόλυτη αιθανόλη:

Όγκος : 25 μ l / φρεάτιο

Συγκέντρωση καρδιολιπίνης : 50 μ g / ml

Χρόνος επώασης : ολονύχτια (overnight), 16-18 h

Θερμοκρασία επώασης : 4-6 °C (προσοχή, τα πλακίδια να μην καλύπτονται)

2) Έκπλυση των πλακιδίων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline - PBS) : επανάληψη εκπλύσεων 2 φορές (προσοχή, να αποφεύγεται η όποια χρήση απορρυπαντικών, π.χ. Tween 20)

3) Πλήρωση των κενών θέσεων (blocking step) επί της στερεής επιφάνειας του πλακιδίου, με χρήση βόειου ορού αραιωμένου με διάλυμα PBS (τελική συγκέντρωση ορού 10%-BS 10%) :

Όγκος : 100 μ l / φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 1h

Θερμοκρασία επώασης : θερμοκρασία δωματίου (room temperature-RT),

22-24 °C

4) Έκπλυση των πλακιδίων (PBS) επί 2 φορές

5) Προσθήκη δειγμάτων. Σε κάθε πλακίδιο ELISA περιέχονται τα εξής δείγματα: τυφλό (blank) (διάλυμα αραιώσεως των ορών), θετικός μάρτυρας (ορός ασθενή με υψηλό και σταθερό τίτλο aCL αντισωμάτων), αρνητικοί μάρτυρες (οροί από υγιείς δότες αίματος), τα προς εξέταση δείγματα.

Αραίωση δειγμάτων : 1/50 με BS 10%

Όγκος : 50 μ l / φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 1h

Θερμοκρασία επώασης : R.T.

(προσοχή, αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος έχει δειχθεί, ότι μειώνει την πρόσδεση των συγκεκριμένων αντισωμάτων στο αντιγόνο, επί του πλακιδίου)

6) Έκπλυση του πλακιδίου με PBS, επί 5 φορές. Κρίσιμο στάδιο έκπλυσης για την αποφυγή υψηλού σήματος υποβάθρου (background). Ανάμεσα στις εκπλύσεις, αφήνουμε το PBS 2-3 λεπτά, στο πλακίδιο.

7) Προσθήκη δευτέρου αντισώματος (secondary antibody): το αντίσωμα αυτό έχει παραχθεί σε αίγα (goat), κατόπιν ανοσοποίησης της με ανθρώπινη IgG ανοσοσφαιρίνη και στρέφεται έναντι των γ -αλυσίδων των IgG. Η σήμανση του είναι με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase-ALP).

Όγκος : 50 μ l / φρεάτιο

Αραίωση : 1/2500 σε BS 10%, από το stock διάλυμα της εταιρείας

Χρόνος επώασης : 1h

Θερμοκρασία επώασης : R.T.

8) Έκπλυση του πλακιδίου με PBS, επί 5 φορές.

Προσθήκη υποστρώματος (p-nitrophenylphosphate) της ALP :

Όγκος : 50 μ l / φρεάτιο

Συγκέντρωση : 1mg/ml (1 ταμπλέτα σε 5 ml διαλύματος διαιθανολαμίνης pH 9.6)

Χρόνος επώασης : 20-30 λεπτά

Θερμοκρασία επώασης : 35 °C (βέλτιστη περιοχή θερμοκρασίας, δράσης της ALP)

10) Μέτρηση απορρόφησης στα 410 nm, με την βοήθεια κατάλληλου φωτομέτρου (ELISA reader).

6.1.2 IgM αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (IgM – aCL)

Τα IgM αντικαρδιολιπινικά αντισώματα προσδιορίζονται όπως και τα IgG, με την διαφορά ότι το δεύτερο αντίσωμα αυτή τη φορά, είναι ειδικό για τις μ-αλυσίδες των IgM ανθρωπίνων αντισωμάτων. Επίσης ο θετικός μάρτυρας είναι ορός από ασθενή με υψηλό τίτλο των αντίστοιχων αντισωμάτων.

6.1.3 IgA αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (IgA – aCL)

Στην περίπτωση των IgA – aCL, το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι μη-σημασμένο, στρέφεται έναντι των α-αλυσίδων των IgA ανθρωπίνων ανοσοσφαιρινών και έχει παραχθεί σε κονίκλο. Ύστερα από την επώαση αυτού του αντισώματος (1h-R.T., 50 μl / φρεάτιο), ακολουθεί έκπλυση του πλακιδίου (5 φορές με PBS) και προστίθεται στο πλακίδιο ένα τρίτο αντίσωμα, το οποίο είναι σημασμένο με ALP. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει το προηγούμενο (κονίκλου) στις γ-αλυσίδες. Η αραίωση του (σε BS 10%) είναι 1/1000 και σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 50 μl, ενώ η επώαση είναι 30 λεπτά σε R.T. Τα υπόλοιπα στάδια είναι όπως στον προσδιορισμό των IgG – aCL.

6.2. Προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2GPI)

6.2.1 IgG αντισώματα έναντι β2-γλυκοπρωτεΐνης I (IgG – antiβ2GPI)

1) Επίστρωση των πλακιδίων με το αντιγόνο, κεκαθαρμένη ανθρώπινη β2 γλυκοπρωτεΐνη I.

Όγκος : 50 μl / φρεάτιο

Συγκέντρωση : 10 μg / ml, διαλυμένης πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών (carbonate) pH 9.6

Χρόνος : ολονύχτια σε 4-6 °C ή εναλλακτικά 1-2 h στους 37 °C.

2) Έκπλυση πλακιδίων (2 φορές) με διάλυμα PBS, στο οποίο έχει διαλυθεί απορρυπαντικό τύπου Tween-20 (0.05%). Η παρουσία του απορρυπαντικού

αντιστρατεύεται την ανάπτυξη ασθενών δεσμών μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος και κατά συνέπεια βοηθά στο να έχουμε χαμηλότερο background.

3) Επικάλυψη των κενών θέσεων επί του πλακιδίου, με πρωτεϊνικό διάλυμα ζελατίνης, από δέρμα αφρόψαρου, αραιωμένης (0.5%) σε PBS, το οποίο περιέχει και Tween-20 (PBS/gelatin/Tween - PGT). Η χρήση της ζελατίνης προτιμάται από αυτή της αλβουμίνης βοός (κοινό αντιδραστήριο για το blocking step), καθώς θέλουμε να αποφύγουμε την παρουσία βόειας β2GPI και λιπιδίων, τα οποία συνήθως συνυπάρχουν στα εμπορικά σκευάσματα αλβουμίνης.

Όγκος : 100 μ l / φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 1-2 h

Θερμοκρασία : R.T.

4) Έκπλυση του πλακιδίου, 2 φορές, με διάλυμα PBS-Tween 20

5) Προσθήκη δειγμάτων. Σε κάθε πλακίδιο περιέχονται τα ανάλογα δείγματα, όπως αναφέρθηκε ήδη στο προσδιορισμό των aCL-IgG. Ως θετικό μάρτυρα εδώ, χρησιμοποιούμε πολυκλωνικό αντιγόνο από κλώνικο ανοσοποιημένο με β2GPI.

Όγκος : 50 μ l / φρεάτιο

Αραίωση δειγμάτων : 1/50, σε διάλυμα PGT

Χρόνος επώασης : 1h, R.T.

6) Έκπλυση πλακιδίου, 5 φορές, με διάλυμα PBS-Twen 20

7) Προσθήκη δεύτερου αντισώματος, σημασμένου με ALP, όπως και στον προσδιορισμό των aCL-IgG, με την διαφορά ότι εδώ το αντιδραστήριο αυτό είναι αραιωμένο σε διάλυμα PGT.

Το υπόλοιπο της διαδικασίας είναι ίδιο με αυτή των aCL-IgG.

6.2.2 IgA, IgM αντισώματα έναντιον της β2GPI

Ο προσδιορισμός τους γίνεται με ανάλογο τρόπο, όπως και τα IgA, IgM aCL αντισώματα, χρησιμοποιώντας όμως τα διαλύματα αραιώσης που χρησιμοποιούνται για τα IgG anti-β2GPI.

6.3 Προσδιορισμός Δ-Διμερών (D-Dimers, DD)

Η μέτρηση των επιπέδων των Δ-Διμερών, στο πλάσμα των εθελοντών, έγινε με την χρήση ενός εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος (Kit) (STAGO-Diagnostica, France). Η αρχή της μεθόδου είναι αυτή μίας sandwich ELISA και η μέτρηση του αναλυτικού σήματος γίνεται χρωματομετρικά. Αναλυτικότερα η διαδικασία, σύμφωνα με το φυλλάδιο της εταιρείας, έχει ως εξής:

1) Προσθήκη δειγμάτων στο πλακίδιο, το οποίο έχει ήδη προεπιστρωθεί με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των D-D. Τα δείγματα πλασμάτων, των ατόμων που συμμετέχουν στην έρευνα καθώς και τα δείγματα ελέγχου (controls) που παρέχει το kit, αραιώνονται με αναλογία 1/21, στο αντίστοιχο διάλυμα του kit. Παράλληλα παρασκευάζονται, με σειριακή αραιώση, και τα δείγματα για την λήψη καμπύλης αναφοράς. Το δείγμα για την παρασκευή των standards, έχει αρχική συγκέντρωση 1000 ng/ml D-D.

Όγκος : 200 μl/φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 1h σε R.T.

2) Έκπλυση πλακιδίου, 5 φορές.

3) Προσθήκη δευτέρου αντισώματος από κλονικό, έναντιον του D-D, το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση.

Όγκος : 200 μl/φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 1h, R.T.

4) Έκπλυση πλακιδίου, 5 φορές.

5) Προσθήκη υποστρώματος υπεροξειδάσης (OPD / H_2O_2), 200 μ l/φρεάτιο. Επώαση του πλακιδίου για ακριβώς 5 λεπτά και εν συνεχεία σταμάτημα της ενζυμικής αντίδρασης με την προσθήκη 100 μ l/φρεάτιο διαλύματος HCL 1M. Μετά από 10 λεπτά, μετριέται η τιμή απορρόφησης στα 492 nm.

6.4. Ανοσοφθορισμομετρική μελέτη των ορών

Προς διερεύνηση της παρουσίας αντιτυφρηνικών αντισωμάτων ή/και αντισωμάτων έναντι στοιχείων του κυτταροπλάσματος, εφαρμόστηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού (indirect immunofluorescence – IF), με την χρήση ειδικών πλακιδίων επί των οποίων είναι μονιμοποιημένα (fixed) κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης (Hep2 cells) (προμηθευμένα από την εταιρεία INOVA). Τα κύτταρα αυτά λόγω του μεγάλου και ευκρινούς τους πυρήνα, είναι κατάλληλα για τον προσδιορισμό των αντιτυφρηνικών αντισωμάτων (ANA). Η διαδικασία της μεθόδου έχει ως εξής :

1) Επώαση των ορών επί των κυττάρων. Πριν την προσθήκη του ορού τα πλακίδια πρέπει να αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά, από τους 4 °C όπου φυλάσσονται. Σε όλα τα στάδια της μεθόδου αποφεύγεται το στέγνωμα του πλακιδίου, για το λόγο αυτό οι επωάσεις γίνονται εντός ειδικού κλειστού δοχείου, στο οποίο διατηρείται υψηλή υγρασία. Τα πλακίδια είναι 12 θέσεων και σε κάθε σειρά πειραμάτων τοποθετούνται 1 τυφλό δείγμα (PBS μόνο), 1 θετικός μάρτυρας, 1 αρνητικός μάρτυρας και οι οροί των εθελοντών.

Αραίωση δειγμάτων : 1/80, σε PBS. Ο θετικός μάρτυρας αραιώνεται 1/250.

Όγκος : 40 μ l / φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 1h, R.T.

2) Έκπλυση του πλακιδίου, με διάλυμα PBS, 5 φορές υπό συνεχή ανάδευση (το πλακίδιο τοποθετείται κάθετο σε ειδική προθήκη και αναδεύεται με την βοήθεια shaker). Η κάθε έκπλυση διαρκεί 5 λεπτά.

3) Τοποθέτηση δεύτερου αντισώματος. Το αντίσωμα αυτό, το οποίο αναγνωρίζει τις γ-αλυσίδες των ανθρωπίνων IgG ανοσοσφαιρινών, είναι σημασμένο με το φθορισμογόνο μόριο φλουροσκεΐνη (FITC)

Αραίωση αντισώματος : 1/50 σε PBS

Όγκος : 40 μ l/φρεάτιο

Χρόνος επώασης : 30 min, R.T., σε σκοτεινό μέρος.

4) Έκπλυση του πλακιδίου όπως προηγουμένως.

5) Απομάκρυνση διαλύματος έκπλυσης και εν συνεχεία προσθήκη επί του πλακιδίου ειδικού διαλύματος (mounting medium), το οποίο βοηθάει στην αποφυγή απόσβεσης του φθορισμού και στην μη δημιουργία κενού ανάμεσα στο πλακίδιο και την καλυπτρίδα, η οποία τοποθετείται σε επαφή με τα φρεάτια.

Αφού στεγνώσουμε το πλακίδιο στους 37 $^{\circ}$ C, για 15 λεπτά, στη συνέχεια παρατηρούμε τον φθορισμό σε ειδικό μικροσκόπιο και οι εικόνες καταγράφονται, με την βοήθεια ειδικού προγράμματος, στον υπολογιστή.

Η εκτίμηση του τύπου (pattern) ανοσοφθορισμού γίνεται σε σχέση με αυτούς που δίνονται από ειδικούς άτλαντες.

6.5 Προσδιορισμός κυτταροκινών

Ο προσδιορισμός των κυτταροκινών (TNF α , IL-6, IL1 β , IL2R) έγινε με αυτοματοποιημένη μέθοδο, στὸν αναλυτὴ DPC Immulite. Η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιεί ο συγκεκριμένος αναλυτής, είναι αυτή της sandwich μη ανταγωνιστικής μεθόδου. Ακίνητοποιημένα, επί ειδικών σφαιριδίων (Beads) σε κατάλληλα καψίδια, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των διαφόρων κυτταροκινών, χρησιμεύουν για την δέσμευση αυτών. Μετά την επώαση των δειγμάτων (30 λεπτά, 37 $^{\circ}$ C), ακολουθεί απομάκρυνση των στοιχείων του ορού που δεν δεσμεύονται στο καψίδιο, με φυγοκέντρηση. Ακολουθεί επώαση με δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με ALP (επώαση 30 λεπτά, 37 $^{\circ}$ C) και μετά από έπκλυση, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου (φωσφορικός εστέρας διοξάνης) και το αναλυτικό σήμα μετριέται με χημειοφωταύγεια.

Όσο αφορά τις επιμέρους κυτταροκίνες, ισχύουν τα εξής χαρακτηριστικά της μεθόδου προσδιορισμούς τους:

TNF α : όγκος δείγματος 100 μ l, αναλυτική περιοχή μέτρησης έως 1000 pg/ml

IL-6: όγκος δείγματος 100 µl, αναλυτική περιοχή μέτρησης έως 1000 pg/ml

IL-1β: όγκος δείγματος 75 µl, αναλυτική περιοχή μέτρησης έως 1000 pg/ml

IL-2R: όγκος δείγματος 50 µl, αναλυτική περιοχή μέτρησης έως 7200 U/ml.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

7.1 Ανακλήσεις τριημέρων

Τα ημερολόγια κατανάλωσης τροφίμων καταχωρήθηκαν και αναλύθηκαν στο Diet Analysis Plus. Στη συνέχεια έγινε μια σύντομη στατιστική ανάλυση με τη βοήθεια των στατιστικών προγραμμάτων Excel και Minitab. Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των διατροφικών παραμέτρων που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συνοπτικά στοιχεία τριήμερων ημερολογίων κατανάλωσης τροφίμων						
	Ομάδα έλεγχου		μεσοδιάστημα		Ομάδα λήψης	
	άτομα	Μεσος(±SD)	άτομα	Μεσος (±SD)	άτομα	Μεσος(±SD)
kcal	4	2273 ± 128	6	2226 ± 224	6	2275 ± 526
Πρωτεΐνες (%)	4	14.4 ± 2.6	6	13 ± 2.3	6	49.3 ± 7
Υδατάνθρακες (%)	4	42.4 ± 5.8	6	45 ± 4.7	6	37 ± 7.6
Λίπη (%)	4	42.1 ± 5.8	6	41 ± 3.3	6	12.2 ± 3
Κορεσμένα (%)	4	12.7 ± 1.6	6	12.4 ± 1	6	17 ± 6.2
Μονοακόρεστα (%)	4	20.4 ± 4.8	6	19.3 ± 3.8	6	4 ± 0.7
Πολυακόρεστα (%)	4	4.6 ± 0.7	6	5.5 ± 2.7	6	3.7 ± 2
Χοληστερόλη (mgr)	4	266 ± 40	6	198 ± 78	6	224 ± 71
Αλκοόλ (%)	4	1.2 ± 2.3	6	1 ± 2	6	0.7 ± 1

Στις τιμές που προέκυψαν απο τα ημερολογια κατανάλωσης τροφίμων έγινε έλεγχος κανονικότητας (Anderson-Darling) και διαπιστώθηκε ότι η κατανομή είναι κανονική. Στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις μέσες τιμές των τριών διαφορετικών χρονικών περιόδων (ανάλυση διακύμανσης-έλεγχος Απονα). Ο έλεγχος έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για κανένα διατροφικό στοιχείο από όσα εξετάστηκαν. Ως σημείο ελέγχου της σημαντικότητας αποτέλεσε η τιμή του p μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$).

Κατά τη διάρκεια της έρευνας γινόταν τακτικός έλεγχος του βάρους των εθελοντών, κανενας εκ των οποίων δεν είχε μεταβολή βάρους μεγαλύτερη του ενός κιλού.

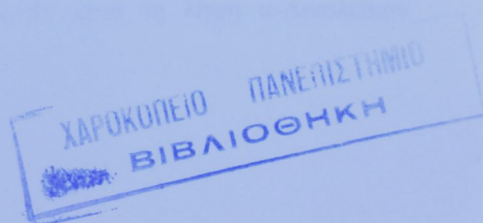
7.2 Αντικαρδιολιπινικά Αντισώματα – Αντισώματα έναντι β₂-γλυκοπρωτεΐνης I

Όπως έχουμε ήδη προαναφέρει στο θεωρητικό τμήμα, ένα από τα δυσκολότερα προβλήματα στον προσδιορισμό αντισωμάτων, είναι η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Ένας από τους βασικούς λόγους αντικρουόμενων αποτελεσμάτων, από εργαστήριο σε εργαστήριο, για τα αντισώματα αυτά, είναι η έλλειψη πρότυπων ορών με στόχο την όσο το δυνατόν ομοιόμορφη έκφραση των αποτελεσμάτων.

Στην περίπτωση των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων, το εργαστήριο του καθ. Harris (Antiphospholipid Antibodies Standardization Laboratory, University of Louisville, Atlanta, USA), είναι διαπιστευμένο για την προμήθεια «πρότυπων» ορών, για τους οποίους σε διεθνή συνέδρια έχει συμφωνηθεί ο τίτλος τους.

Απουσία τέτοιων πρότυπων αντιορών, για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία : υπολογίζεται, για κάθε τάξη και υποτάξη αντισωμάτων, το αντίστοιχο μέγεθος της μέσης τιμής των τιμών απορρόφησης των ορών που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες + 3 φορές η σταθερή απόκλισης των τιμών αυτών ($X + 3 SD$). Το άθροισμα αυτό ορίζεται ως 100 μονάδες και εν συνεχεία με απλή αναγωγή, η τιμή απορρόφησης του κάθε δείγματος υπολογίζεται σε σχέση με αυτό το όριο των 100 μονάδων, το οποίο αποτελεί και το ανώτερο φυσιολογικό όριο τιμών, για τα αντίστοιχα αντισώματα. Αυτή η αναγωγή επιτρέπει την σύγκριση των τιμών ενός ορού, μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων, με τρόπο αποδεκτό, λόγω των αναλυτικών διακυμάνσεων της μεθόδου, από πείραμα σε πείραμα.

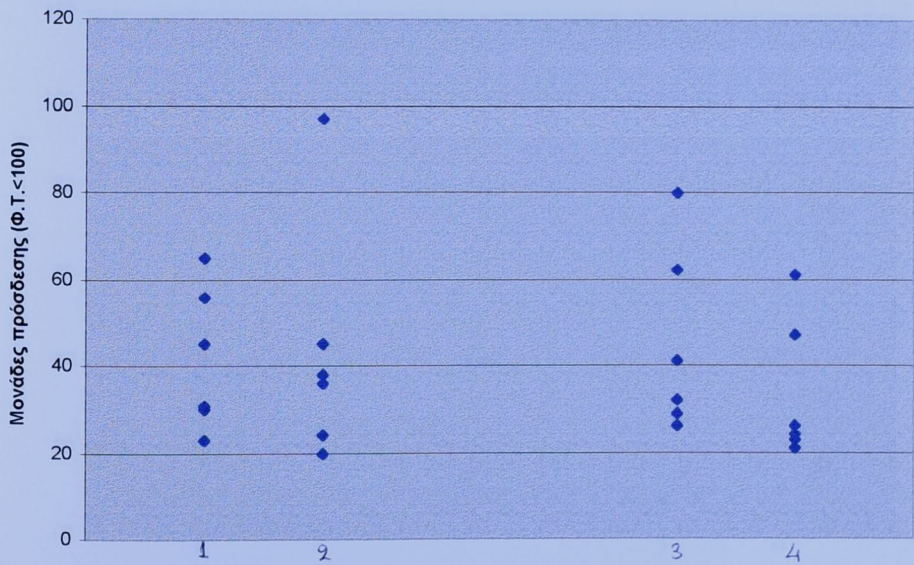
Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μονάδες για τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα και των τριών τάξεων, καθώς και τα αποτελέσματα υπό την μορφή γραφημάτων.



ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Αντικαρδιολιπινικά Αντισώματα (aCL – IgG), στον ορό των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα.

Ανώτατο φυσιολογικό όριο : 100 Μονάδες Αρνητικοί Μάρτυρες: $\bar{x} + 3 \text{ SD} = 180$				
ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1 ^{ος}	56	97	32	23
2 ^{ος}	45	45	62	47
3 ^{ος}	65	38	26	21
4 ^{ος}	30	36	80	61
5 ^{ος}	31	20	41	26
6 ^{ος}	23	24	29	24

aCL - IgG αντισώματα



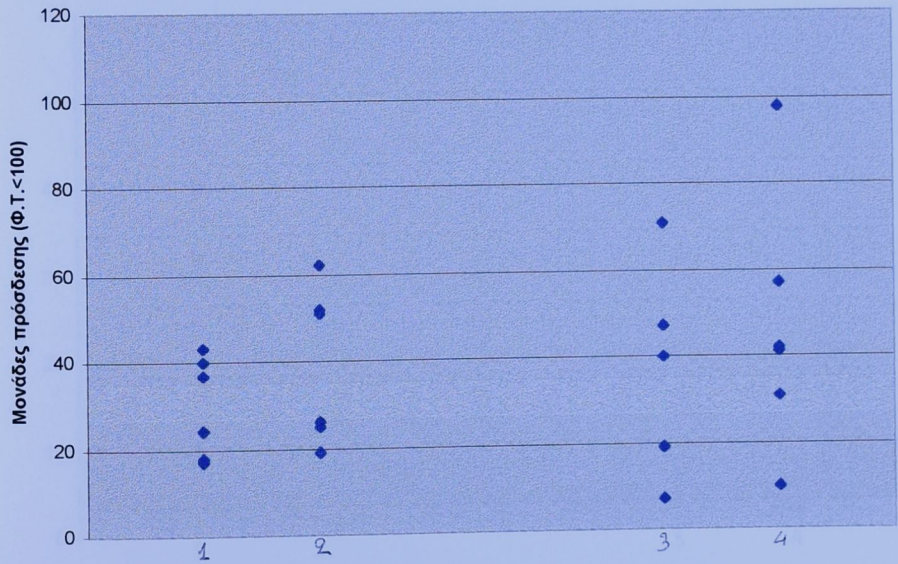
Διάγραμμα 1. Τίτλος (μονάδες πρόσδεσης) aCL-IgG αντισωμάτων, στον ορό των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Αντικαρδιολιπινικά Αντισώματα (aCL – IgM), στον ορό των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα.

Ανώτατο φυσιολογικό όριο : 100 Μονάδες Αρνητικοί Μάρτυρες: $\bar{x} + 3 \text{ SD} = 89$

ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1 ^{ος}	43	62	47	10
2 ^{ος}	24	19	7	42
3 ^{ος}	18	25	19	31
4 ^{ος}	37	52	71	57
5 ^{ος}	40	26	47	41
6 ^{ος}	17	51	40	98

aCL - IgM αντισώματα

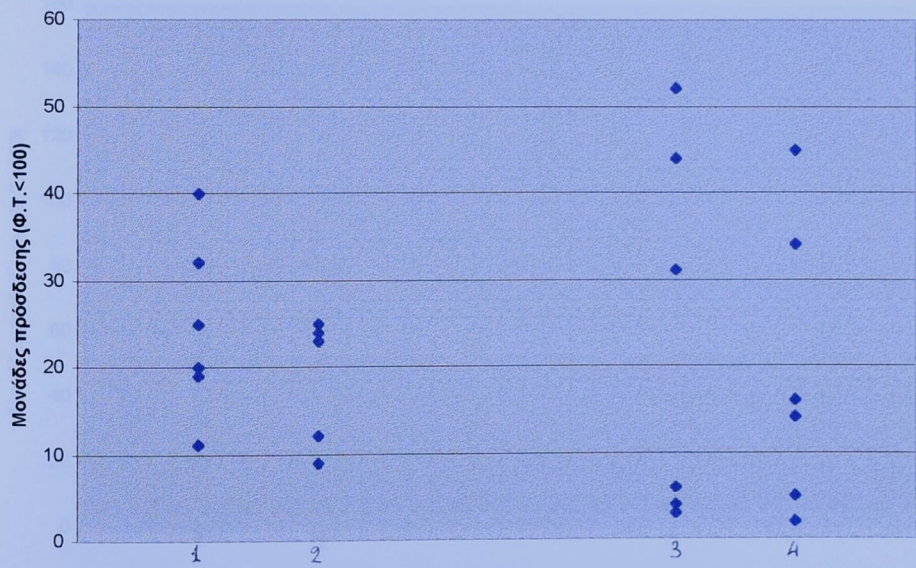


Διάγραμμα 2. Τίτλος (μονάδες πρόσδεσης) aCL-IgM αντισωμάτων, στον ορό των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Αντικαρδιολιπινικά Αντισώματα (aCL – IgA), στον ορό των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα.

Ανώτατο φυσιολογικό όριο : 100 Μονάδες Αρνητικοί Μάρτυρες: $x + 3 \text{ SD} = 86$				
ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1 ^{ος}	19	12	3	5
2 ^{ος}	11	12	4	2
3 ^{ος}	40	9	6	14
4 ^{ος}	25	23	31	16
5 ^{ος}	20	24	52	34
6 ^{ος}	32	25	44	45

aCL - IgA αντισώματα



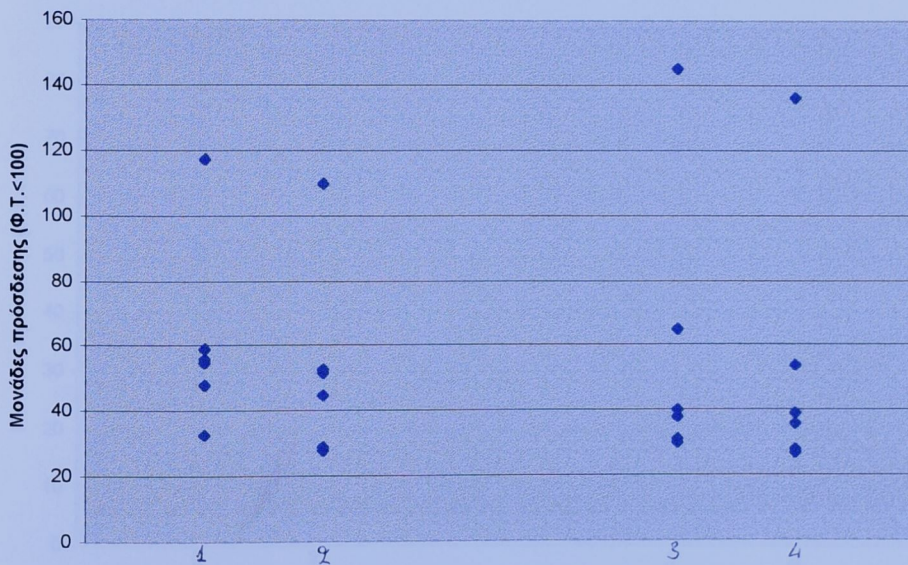
Διάγραμμα 3. Τίτλος (μονάδες πρόσδεσης) aCL-IgA αντισωμάτων, στον ορό των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Αντισώματα έναντι β_2 -γλυκοπρωτεΐνης I (IgG), στον ορό των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα.

Ανώτατο φυσιολογικό όριο : 100 Μονάδες Αρνητικοί Μάρτυρες: $\bar{x} + 3 \text{ SD} = 143$

ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1 ^{ος}	56	52	40	36
2 ^{ος}	117	110	145	136
3 ^{ος}	48	45	38	39
4 ^{ος}	59	29	31	28
5 ^{ος}	33	28	30	27
6 ^{ος}	55	53	65	54

anti- β_2 GPI (IgG) αντισώματα

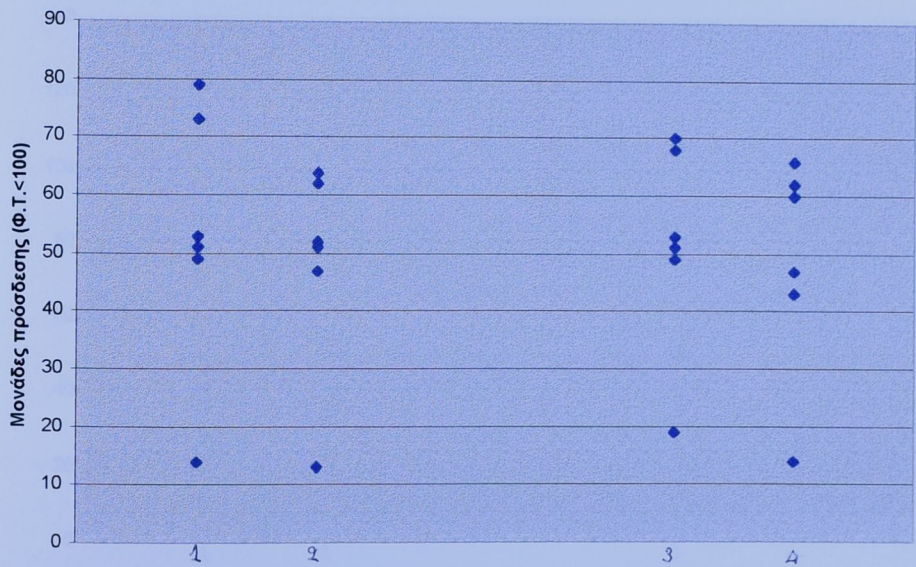


Διάγραμμα 4. Τίτλος (μονάδες πρόσδεσης) anti- β_2 GPI (IgG) αντισωμάτων, στον ορό των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α -Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α -Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α -Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α -Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Αντισώματα έναντι β₂-γλυκοπρωτεΐνης I (IgM), στον ορό των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα.

Ανώτατο φυσιολογικό όριο : 100 Μονάδες Αρνητικοί Μάρτυρες: x + 3 SD = 180				
ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1 ^{ος}	53	52	49	43
2 ^{ος}	51	51	68	62
3 ^{ος}	79	62	51	60
4 ^{ος}	49	47	53	47
5 ^{ος}	73	64	70	66
6 ^{ος}	14	13	19	14

anti-β2GPI (IgM) αντισώματα



Διάγραμμα 5. Τίτλος (μονάδες πρόσδεσης) anti-β2GPI (IgM) αντισωμάτων, στον

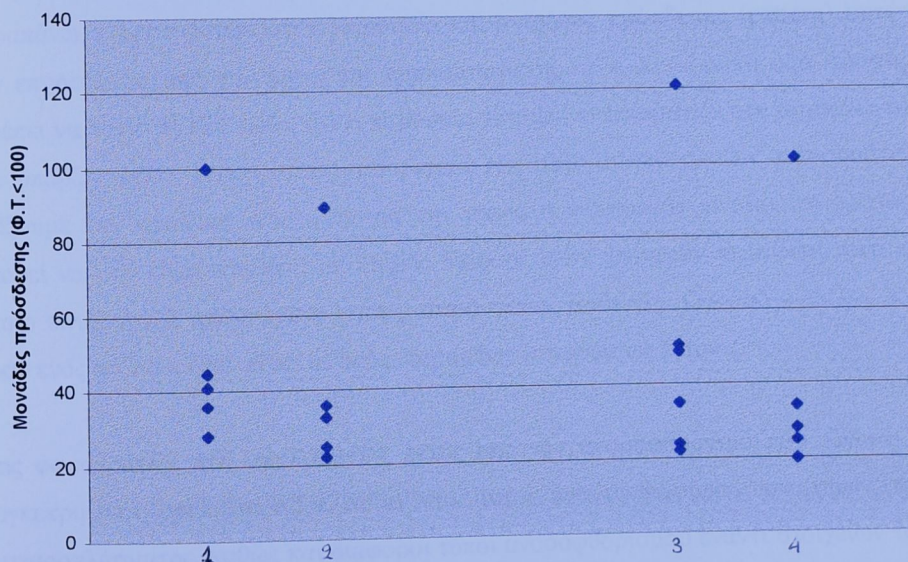
ορό των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Αντισώματα έναντι β_2 -γλυκοπρωτεΐνης I (IgA), στον ορό των εθελοντών που συμμετείχαν στην έρευνα.

Ανώτατο φυσιολογικό όριο : 100 Μονάδες Αρνητικοί Μάρτυρες: $\bar{x} + 3 \text{ SD} = 152$

ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1 ^{ος}	41	36	49	28
2 ^{ος}	100	89	121	101
3 ^{ος}	28	25	24	20
4 ^{ος}	28	22	22	20
5 ^{ος}	45	36	35	34
6 ^{ος}	36	33	51	25

anti- β_2 GPI (IgA) αντισώματα



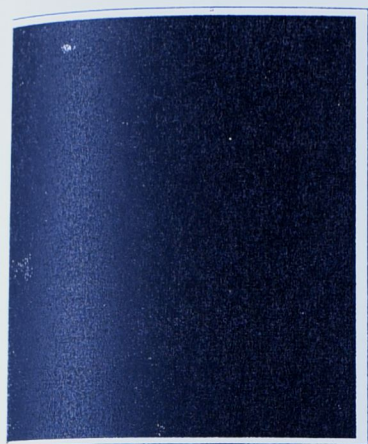
Διάγραμμα 6. Τίτλος (μονάδες πρόδεσης) anti- β_2 GPI (IgA) αντισωμάτων, στον ορό των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

7.3 Ανοσοφθορισμομετρική μελέτη ορών

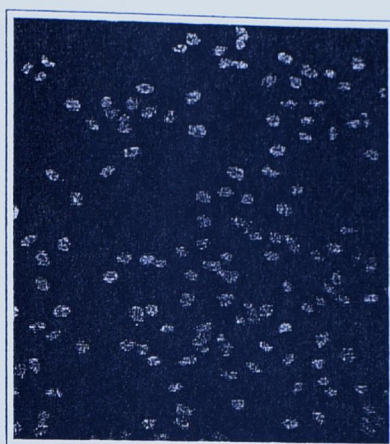
Η μελέτη πρόσδεσης αντισωμάτων επί κυτταρικού υποστρώματος Hep2, ανέδειξε την ύπαρξη αντιπυρηνικών αντισωμάτων, στον ορό 2 εθελοντών, οι οποίοι έλαβαν μέρος στην έρευνα. Όπως φαίνεται και στις φωτογραφίες, ο ανοσοφθορισμός είναι τύπου λεπτού στικτού (fine speckled). Αυτή η τεχνική αποτελεί ένα screening test, το οποίο δεν μπορεί να μας δώσει την ακριβή πληροφορία για το (τα) στοιχείο του πυρήνα, έναντι του (των) οποίου(ων) στρέφονται τα αντισώματα αυτά. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την χρήση τεχνικών στις οποίες χρησιμοποιούνται, κάθε φορά, ειδικά αντιγόνα, π.χ. dsDNA.

Όλες οι λήψεις, των αντίστοιχων εθελοντών ($1^{ος}$, $4^{ος}$), είναι θετικές στη συγκεκριμένη δοκιμασία, ενώ οι ίδιοι οροί ήταν αρνητικοί για τα αντισώματα που προσδιορίστηκαν παραπάνω. Παρατηρούμε ότι η παρουσία και ο τρόπος πρόσδεσης (pattern) αυτών δεν επηρεάζεται από την λήψη της εμπλουτισμένης σε α -Λινολενικό οξύ, τροφής. Πρέπει να τονιστεί εδώ πάλι, ότι η παρουσία τέτοιων αντισωμάτων δεν σημαίνει και την ύπαρξη νόσου, ενώ η ένταση φθορισμού (ως τίτλο αντιπυρηνικών αντισωμάτων ορίζουμε την αραιώση του ορού για την οποία ο φθορισμός γίνεται μη ορατός) μπορεί να μην είναι σταθερή σε λήψεις διαφορετικών χρονικών περιόδων, κάτι το οποίο είναι συχνά απαντώμενο στους αυτοάνοσους ασθενείς. Ωστόσο ο τίτλος του ορού ενός ατόμου, όταν είναι θετικός, παραμένει συνήθως ως τέτοιος.

Στις φωτογραφίες που ακολουθούν, εκτός από τον ανοσοφθορισμό που δίνουν οι συγκεκριμένοι οροί, παραβάλλονται και αυτοί έναντι διαφόρων στοιχείων του κυτταροπλάσματος, καθώς και διάφοροι τύποι ανοσοφθορισμού έναντι στοιχείων του πυρήνα, προς σύγκριση με τον τύπο ανοσοφθορισμού που δίνουν οι οροί που μας ενδιαφέρουν.



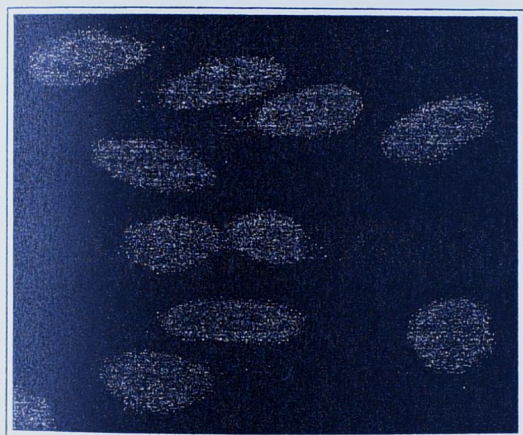
Σήμα υποβάθρου
(background)



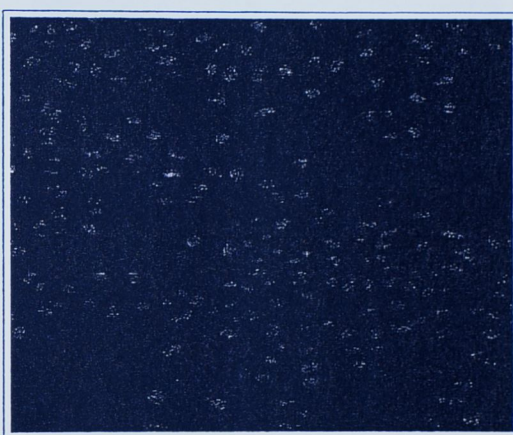
Θετικός μάρτυρας
(20X)



Αρνητικός μάρτυρας
(60X)



Εθελοντής Α
(60X)



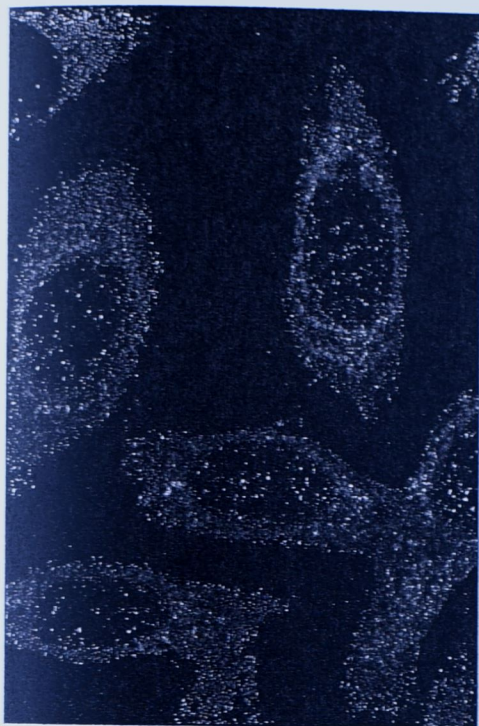
Εθελοντής Α
(20X)



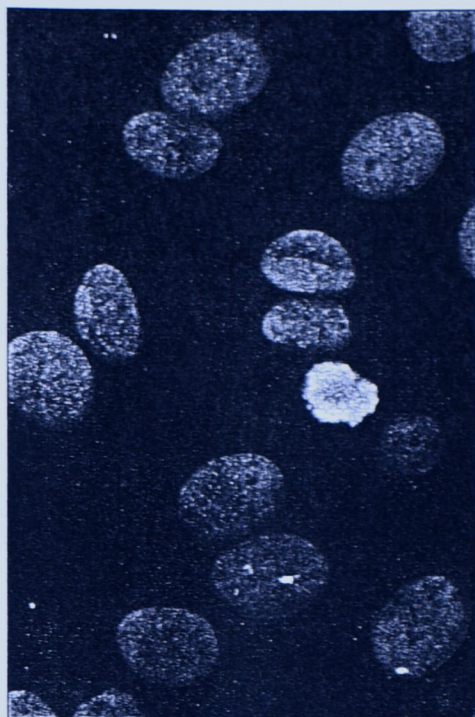
Εθελοντής Β (Λήψη 1η)
(20X - zoom)



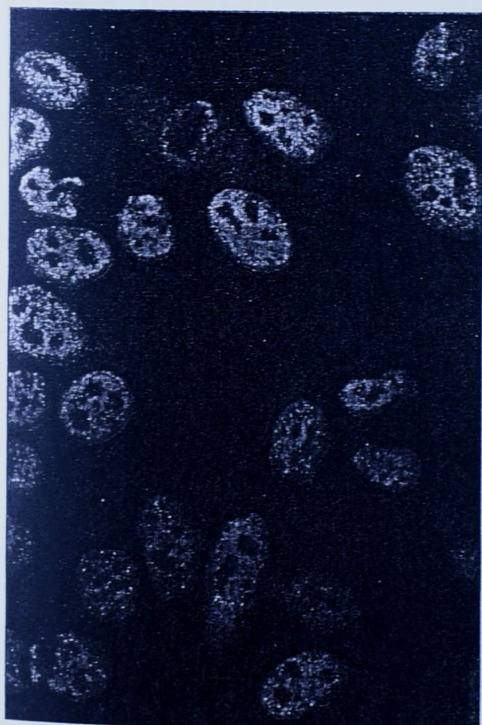
Εθελοντής Β (Λήψη 4η)
(20X - zoom)



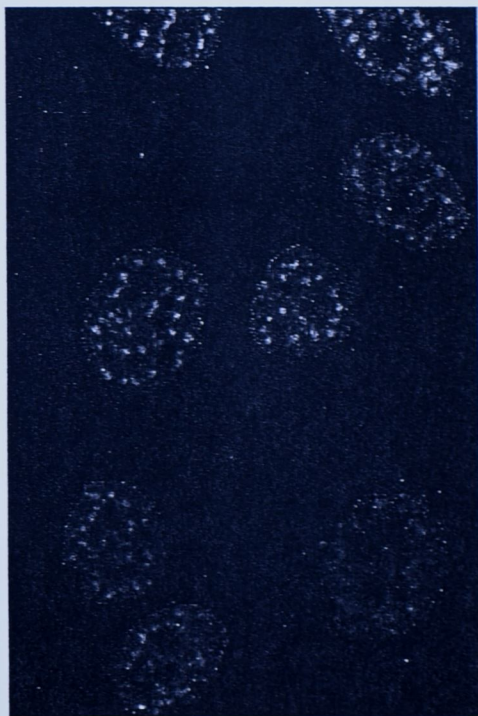
Λεπτός στικτός κυτταροπλασματικός (cytoplasmic fine speckled)



Ομογενής πυρηνικός (nuclear homogenous)



Λεπτός στικτός πυρηνικός (nuclear fine speckled)



Πυρηνικό στρώμα (nuclear matrix)

7.4 Προσδιορισμός κυτταροκινών

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα επίπεδα των διάφορων κυτταροκινών, στον ορό των εθελοντών. Για κάθε ένα από τους εθελοντές προσδιορίστηκαν τα επίπεδα, σε ένα δείγμα πριν την λήψη του α-Λινολενικού οξέος και σε ένα μετά τη λήψη του τελευταίου. Εντός των παρενθέσεων αναγράφονται οι ανώτερες φυσιολογικές τιμές, για κάθε κυτταροκίνη, σύμφωνα με το φυλλάδιο της εταιρείας.

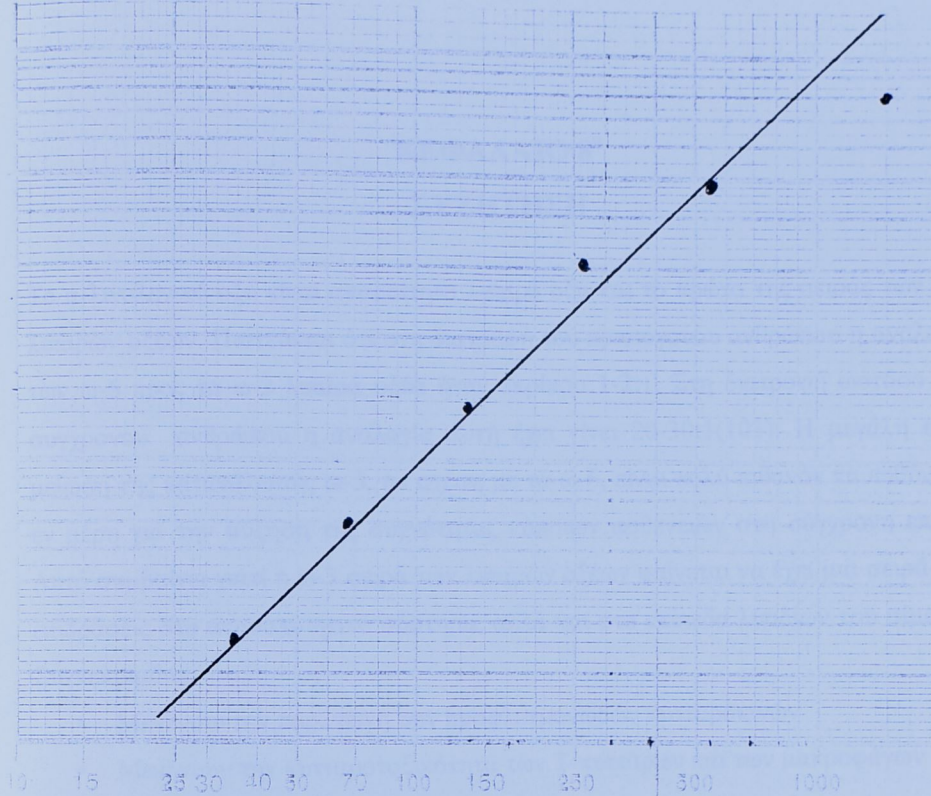
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Επίπεδα κυτταροκινών, στον ορό των εθελοντών που έλαβαν μέρος στην έρευνα.												
	1 ^{ος}		2 ^{ος}		3 ^{ος}		4 ^{ος}		5 ^{ος}		6 ^{ος}	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA	λήψη aLA
TNFα (< 8.1 pg/ml)	25.5	18.3	66.8	7.8	18.2	69.4	14	8.1	13.6	5.3	24	9.2
IL-6 (< 5 pg/ml)	9	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
IL-1β (< 5 pg/ml)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
IL- 2R (223-710 pg/ml)	708	619	658	494	503	520	828	814	253	343	2650	408

7.5 Προσδιορισμός Δ-Διμερών

Για τον υπολογισμό των επιπέδων (ng/ml) Δ-Διμερών, στον ορό των εθελοντών, αρχικά κατασκευάζουμε καμπύλη αναφοράς, με βάση το πρότυπο (calibrator) του σκευάσματος. Η συγκέντρωση του προτύπου, μετά την ανασύσταση και την αρχική αραιώση του, δίνεται από την εταιρεία, ίση με 1100 ng/ml. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με βάση τις τιμές 6 προτύπων, τα οποία παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται σε ειδικό (παρέχεται από το σκεύασμα) log-log χαρτί, ενώ οι τιμές του κάθε ορού υπολογίζονται με απλή παρεμβολή της απορρόφησης του, επί της καμπύλης. Η τιμή του δείγματος ελέγχου (control-παρέχεται από το σκεύασμα), βρέθηκε 700 ng/ml, η οποία βρίσκεται εντός της ενδεδειγμένης, από την εταιρεία, τιμής (680-920 ng/ml). Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα προσδιοριζόμενα επίπεδα Δ-Διμερών, στον ορό των εθελοντών. Όπως φαίνεται από αυτόν, όλα τα δείγματα βρίσκονται στην περιοχή των φυσιολογικών τιμών (σύμφωνα με το σκεύασμα), εκτός ενός, το οποίο κινείται σε οριακά θετική τιμή.

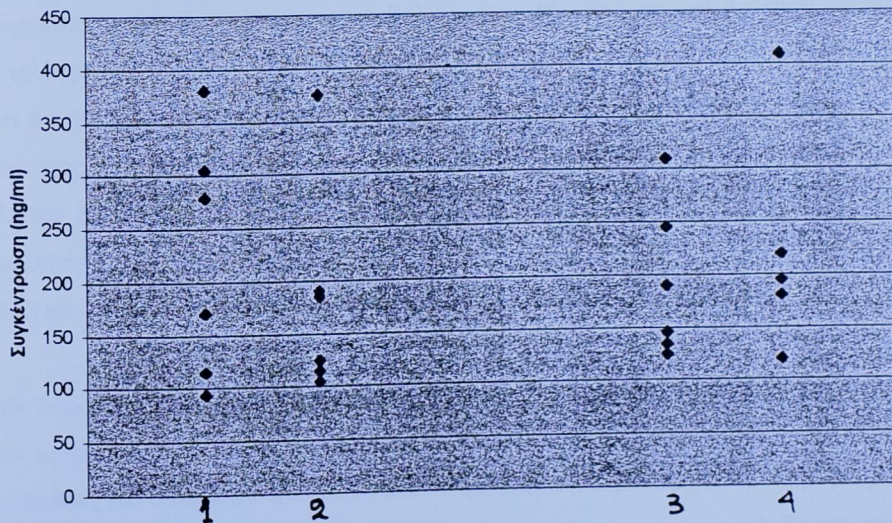
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Επίπεδα Δ-Διμερών, στον ορό των εθελοντών, οι οποίοι έλαβαν μέρος στην έρευνα.

Αναμενόμενες Φ.Τ. < 400 ng/ml		Όριο ανίχνευσης μεθόδου: 10 ng/ml		
ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΛΗΨΗΣ	
	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ
1^{ος}	170	116	245	195
2^{ος}	95	105	135	180
3^{ος}	115	125	125	120
4^{ος}	305	185	147	220
5^{ος}	280	190	190	410
6^{ος}	380	375	310	220



Διάγραμμα 7. Καμπύλη αναφοράς, σε log-log χαρτί, για τον υπολογισμό των επιπέδων Δ-Διμερών. Η καμπύλη χαράχθηκε με βάση τις τιμές των προτύπων διαλυμάτων, με βάση τις οδηγίες της εταιρείας.

Επίπεδα Δ-Διμερών στο πλάσμα



Διάγραμμα 8. Επίπεδα Δ-Διμερών στο πλάσμα των εθελοντών. 1= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 2= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ), 3= πριν τη λήψη α-Λινολεϊκού, 4= μετά τη λήψη α-Λινολεϊκού (ΟΜΑΔΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το α-λινολενικό οξύ είναι απαραίτητο λιπαρό οξύ και το πρώτο της σειράς των ω-3 λιπαρών οξέων. Πιστεύεται ότι στη διατροφή του πρωτόγονου ανθρώπου η αναλογία των ω-6 προς τα ω-3 λιπαρά οξέα ήταν περίπου 1-2:1. Στη διατροφή ωστόσο του σύγχρονου ανθρώπου η αναλογία αυτή έχει γίνει 20-30:1(103). Η μεγάλη αυτή μείωση της κατανάλωσης ω-3, σε σχέση με τα ω-6, είναι πολύ πιθανόν να ευθύνεται εν μέρη για την αύξηση της συχνότητας κάποιων ασθενειών στη σύγχρονη εποχή. Αυτό συμβαίνει γιατί η ω-3 σειρά των λιπαρών οξέων φαίνεται να έχει μια σειρά από επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά και στα επίπεδα λιπιδίων του αίματος. Συγκεκριμένα:

- Μειώνουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών
- Μειώνουν την κυτταροτοξικότητα των T-κυττάρων και των μακροφάγων
- Μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων
- Μειώνουν την χημειοτακτική ικανότητα των μονοκυττάρων-συδετερόφιλων
- Μειώνουν την παραγωγή NO από τα μακροφάγα
- Μειώνουν τα τριγλυκερίδια και την χοληστερόλη του πλάσματος

Υπάρχουν, ωστόσο, κάποιες αμφιβολίες για το εάν το αLA είναι εξίσου αποτελεσματικό με τους μεταβολίτες του, EPA και DHA. Αυτό που μάλλον ισχύει είναι ότι για να έχει τα ίδια αποτελέσματα πρέπει να δοθεί σε αρκετά μεγαλύτερες ποσότητες. Ωστόσο η χρήση του παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, γιατί οξειδώνεται πολύ πιο δύσκολα από τα EPA και DHA. Παράλληλα επειδή το αLA είναι φυτικής προέλευσης είναι πιο οικονομικό από τα ιχθυέλαια (τα οποία περιέχουν EPA και DHA) και μπορεί πιο εύκολα να ενταχθεί στην καθημερινή διατροφή.

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε να διερευνηθεί η επίδραση του α-λινολενικού, όταν αυτό λαμβάνεται ως μεταγευματικό συμπλήρωμα διατροφής σε ομάδα υγιών εθελοντών, επί διαφόρων ανοσολογικών παραμέτρων. Πριν αρχίσουμε την μέτρηση των παραμέτρων αυτών και κατά την διάρκεια της διατροφικής παρέμβασης στους εθελοντές, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι διατροφικές τους συνήθειές τους. Με βάση τα τριήμερα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων διαπιστώθηκε η σταθερότητα στις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών, γεγονός που μας επέτρεψε

να συμπεράνουμε ότι κανένας άλλος διατροφικός παράγοντας εκτός από την αυξημένη πρόσληψη α-λινολενικού οξέος δεν θα επηρέαζε τα αποτελέσματά μας. Η επιλογή, στη συνέχεια, των ανοσολογικών παραμέτρων έγινε στη βάση της συσχέτισής τους με την διαδικασία της αθηρωμάτωσης, καθώς επίσης και με την χρησιμότητά τους ως δείκτες ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος. Ο προσδιορισμός των Δ-Διμερών, μας δίνει επιπροσθέτως την ευκαιρία για την εκτίμηση ενεργοποίησης του συστήματος πήξης/ινωδόλυσης.

Όσο αφορά τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα, όπως ήδη αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος της εργασίας, έχουν σε ένα βαθμό συνδεθεί με την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, καθώς και με την διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Αν και ακόμα είναι άγνωστος ο τρόπος παραγωγής τους καθώς και οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί τους οποίους διαμεσολαβούν, είναι βέβαιο ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη-εκδήλωση θρομβωτικών επεισοδίων. Η συμμετοχή αυτή έχει καλά τεκμηριωθεί στην βιβλιογραφία, ιδίως για τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα και τα αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (104,105). Η τελευταία έχει χαρακτηριστεί ως απαραίτητος πρωτεϊνικός συμπαράγοντας, για την πρόσδεση των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων. Ακόμα και σήμερα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή η φύση του(ων) επιτόπου(ων) που αναγνωρίζουν τα τελευταία. Τα αντισώματα τα οποία ονομάζουμε anti-β2GPI, μπορούμε και τα ανιχνεύουμε *in vitro* απουσία του φωσfolιπιδίου (καρδιολιπίνης) και φαίνεται ότι αποτελούν ξεχωριστή ομάδα από τα αντικαρδιολιπινικά. Παρόλο αυτά, υπάρχει μια επιμέρους αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δύο αντισωματικών ειδικοτήτων (106).

Η αλληλεπίδραση και των δύο τύπων αντισωμάτων με το ενδοθηλιακό κύτταρο έχει καλά μελετηθεί μέσω της έκφρασης στην επιφάνεια αυτού μορίων προσκόλλησης (adhesion molecules, π.χ. ICAM 1, VCAM, E-Selectin), όσο και με την παραγωγή από αυτά κυτταροκινών (π.χ. IL-6) (107, 108). Επιπροσθέτως, ως ένας από τους μηχανισμούς πρόκλησης θρόμβωσης, παρουσία αυτών των αντισωμάτων, έχει θεωρηθεί η αλλαγή της αναλογίας Θρομβωξάνης (TXA₂) / Προστακυκλίνης (PGI₂) (109). Τέλος η συσχέτισή τους με την αθηρωμάτωση έχει υποστηριχθεί τόσο στην διασταυρούμενη αντίδρασή τους με τα anti-oxLDL, όσο και στην αναπαραγωγή ζωικών μοντέλων με στοιχεία αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η λήψη του α-λινολενικού δεν είχε καμία επίδραση ως προς τον τίτλο των αντισωμάτων αυτών. Πιο συγκεκριμένα οι οροί όλων των εθελοντών βρέθηκαν αρνητικοί για τα αντισώματα αυτά, τόσο πριν όσο και μετά την λήψη του α-λινολενικού. Ένας εθελοντής βρέθηκε να έχει ελαφρά θετικό τίτλο anti-β2GPI IgG αντισωμάτων ο οποίος δεν επηρεάζεται από την λήψη του α-λινολενικού. Η παρουσία των αντισωμάτων αυτών δεν δηλώνει υποκείμενη νόσο, ενώ θα πρέπει να λάβουμε σοβαρά υπ'όψιν ότι οι ανοσοχημικές τεχνικές, λόγω της φύσης τους (πολλά στάδια, υψηλή ετερογένεια αντισωμάτων κ.λ.π.), επιτρέπουν μεγαλύτερο εύρος διακύμανσης των τιμών ενός ατόμου, σε σχέση με τεχνικές προσδιορισμού άλλων βιολογικών παραγόντων. Άλλωστε είναι γνωστό ότι αντισώματα απαντώνται ακόμα και στον γενικό πληθυσμό, (αν και σε χαμηλό ποσοστό 2-5%), ιδίως όσο αυξάνει η ηλικία των ατόμων. Το ότι ο αντίστοιχος εθελοντής ήταν αρνητικός για aCL – IgG αντισώματα ενδεχομένως να υποδεικνύει μία ειδικότητα για τα anti-β2GPI IgG αντισώματα που ανιχνεύονται.

Όσο αφορά τα αντιπυρηνικά αντισώματα, αυτά αποτελούν ένα γενικό, μη ειδικό δείκτη αυτοάνοσων νοσημάτων, όπου τόσο ο τίτλος όσο και το συγκεκριμένο pattern φθορισμού έχει την δική του σημασία. Ωστόσο δεν μας δίνουν συγκεκριμένη πληροφορία για το ιδιαίτερο αντιγόνο που αυτά αναγνωρίζουν στον πυρήνα, ενώ σε ένα βαθμό απαντώνται και στον υγιή πληθυσμό. Η ένταση φθορισμού που παρατηρήθηκε στους ορούς δύο εθελοντών της μελέτης, δεν φάνηκε να αλλάζει σημαντικά κατά τις διάφορες λήψεις, όπως το ίδιο παρατηρήθηκε και με το pattern του ανοσοφθορισμού. Αυτό υποδεικνύει ότι, ούτε σε αυτή την παράμετρο φαίνεται να επιδρά το α-λινολενικό.

Η μη επίδραση του α-λινολενικού στις παραπάνω παραμέτρους, για το συγκεκριμένο σχήμα που ακολουθήθηκε και στον συγκεκριμένο πληθυσμό, θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορες αιτίες. Αν και το α-λινολενικό έχει σχετισθεί με την βιολογία των Τ-λεμφοκυττάρων, καθώς και την παραγωγή IgE ανοσοσφαιρίνης, ωστόσο δεν υπάρχουν μελέτες που να το έχουν συνδέσει με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και ειδικότερα των αντιφωσφολιπιδικών, εκτός σποραδικών μελετών που διερευνούν γενικότερα την επίδραση απαραίτητων λιπαρών οξέων στην έκφραση αυτοάνοσων νόσων (110,111). Είναι γνωστό άλλωστε ότι τα λιπίδια καθ'αυτά αποτελούν τα

λιγότερο ανοσογόνα μόρια. Ενδεχομένως και ο χρόνος λήψης του δεν ήταν αρκετός για να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα προς την κατεύθυνση που εμείς διερευνήσαμε. Ο αριθμός των εθελοντών ακόμα, ήταν τέτοιος που δεν επιτρέπει την εξαγωγή γενικών και ασφαλών συμπερασμάτων. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε ο προσδιορισμός άλλων λιπιδικών μορίων, όπως προσταγλανδίνες (π.χ. PGE₂), τα οποία έχει βρεθεί να επηρεάζουν την εξέλιξη μιας ανοσολογικής απόκρισης (112), σε σχέση με το α-λινολενικό οξύ.

Οι κυτταροκίνες που προσδιορίστηκαν, δεν παρουσίασαν κάποια αλλαγή σε σχέση με το α-λινολενικό. Οι κυτταροκίνες αυτές σχετίζονται άμεσα με την λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος. Ειδικότερα, ο TNFα δείχνει τοπική ενεργοποίηση ενδοθηλίου, ενώ εκτός από προφλεγμονώδης κυτταροκίνη είναι και ανοσορρυθμιστική, η IL-6 σχετίζεται με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T και B λεμφοκυττάρων, η IL-1β με την ενεργοποίηση των μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων, όπως και η IL-2R (47). Αν και για κάποιες από αυτές βρέθηκαν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα, σε σχέση με αυτά που δίνει η εταιρεία ως φυσιολογικά όρια, αυτό δεν μπορεί να είναι δείκτης συμμετοχής του ανοσολογικού συστήματος, καθώς είναι γνωστό ότι σε τέτοιες καταστάσεις τα αντίστοιχα επίπεδα είναι κατά πολύ αυξημένα. Εξαίρεση ίσως αποτελεί η τιμή της IL-2R, πριν και μετά την λήψη του α-λινολενικού, για τον 6^ο εθελοντή, αν και αυτό δεν συνδιάζεται με κάποιο θετικό αποτέλεσμα σε όλους τους άλλους προσδιορισμούς. Αυτό μπορεί να σημαίνει αύξηση της λόγω κάποιου άλλου μη σχετικού παράγοντα, π.χ. λοίμωξη.

Τέλος, ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα, όσο αφορά τον προσδιορισμό των Δ-Διμερών. Τα Δ-Διμερή αποτελούν ένα από τα τελικά προϊόντα της δράσης της πλασμίνης επί της ινικής. Άρα προϋποθέτει την ενεργοποίηση ου μηχανισμού της πήξης. Φαίνεται λοιπόν ότι κάτι τέτοιο δεν έλαβε χώρα κατά την διάρκεια της μελέτης.

Συμπερασματικά λοιπόν, μπορούμε να πούμε ότι από την συγκεκριμένη πιλοτική μελέτη, δεν φάνηκε να επηρεάζεται η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, σε σχέση με τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν. Αυτό, όσο αφορά τα αντισώματα, φάνηκε με ένα τρόπο διττό: από την μία δεν είχαμε την έκφραση αντισωμάτων, ενώ από την άλλη σε όποια δείγματα ανιχνεύθηκαν τέτοια, η συγκεκριμένη λήψη του α-

λινολενικού δεν τα επηρέασε. Ωστόσο δεν μπορούν να εξαχθούν γενικά συμπεράσματα, λόγω της διάρκειας της μελέτης και του μικρού αριθμού των εθελοντών.

- 2) Graff L, Gervais S, Turp M. "Advanced Nutrition and Human Metabolism", Second edition, Wey Publishing Company, 1995.
- 3) Sotgiu AF. Human requirements for *n*-polyunsaturated fatty acids. *Food Sci* 2000 Jul;79(7):261-70
- 4) Gervais H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3). *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68(3):159-73
- 5) Jakes MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):143S-53S
- 6) Sotgiu H, Jankuik M, Jann H, Winterberger E. Influence of polyunsaturated fatty acids on vasopressin-induced by 8-epi-PGF(2alpha) and 8-iso-PGE(2). *Pharmacology* 2000 Apr;69(3):153-60
- 7) Takaseki HJ, DeMichele SJ, Boyce PJ, Nourlati M, Foss EA, Barlett BA. Metabolism of dietary alpha-linolenic acid vs. eicosapentaenoic acid in rat human cells phospholipids during endotoxemia. *Lipids* 1998 Nov;33(11):1099-105
- 8) Takaseki K, Takaseki T, Watanabe S, Kobayashi T, Kawana H, Hara N, Mizawa Y. Effect of replacing a high linoleic oil with a low linoleic, high alpha-linolenic oil, as compared with supplementing EPA or DHA, on lowering lipid mediator production in rat polymorphonuclear leukocytes. *Red Blood Cell* 1994 Jan;21(6):538-44
- 9) Le Te Sacier A, Wilson A, Nettle S, Kelly F, Abedin L, Mann N, Turner A. Effect of dietary alpha-linolenic acid on thrombotic risk factors in vegetarian men. *Am J Clin Nutr* 1999 May;69(5):872-82
- 10) Calder PC. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of *n-3* polyunsaturated fatty acids. *Surv J Med Biol Res* 1995 Apr;31(4):467-80
- 11) Day HA. The *n-3* Anti-inflammatory effect of polyunsaturated fatty acids and aspirin-like 2 on normal and abnormal human lymphocytes. *Experiment* 1994 May;12(5):27-48-62
- 12) Jakes MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):143S-53S

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Κ.Α.Δημόπουλος, «Μαθήματα Βιοχημείας», Αθήνα, 1993.
- 2) Groff JL, Gropper S, Hunt SM, "Advanced Nutrition and Human Metabolism", Second edition, West Publishing Company, 1995.
- 3) Simopoulos AP, Human requirement for N-polyunsaturated fatty acids, *Poult Sci* 2000 Jul;79(7):961-70
- 4) Gerster H, Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)?, *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68(3):159-73
- 5) James MJ, Gibson RA, Cleland LG, Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production, *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):343S-8S
- 6) Sametz W, Jeschek M, Juan H, Wintersteiger R, Influence of polyunsaturated fatty acids on vasoconstrictions induced by 8-iso-PGF(2alpha) and 8-iso-PGE(2), *Pharmacology* 2000 Apr;60(3):155-60
- 7) Palombo JD, DeMichele SJ, Boyce PJ, Noursalehi M, Forse RA, Bistran BR, Metabolism of dietary alpha-linolenic acid vs. eicosapentaenoic acid in rat immune cell phospholipids during endotoxemia, *Lipids* 1998 Nov;33(11):1099-105
- 8) Ohhashi K, Takahashi T, Watanabe S, Kobayashi T, Okuyama H, Hata N, Misawa Y Effect of replacing a high linoleate oil with a low linoleate, high alpha-linolenate oil, as compared with supplementing EPA or DHA, on reducing lipid mediator production in rat polymorphonuclear leukocytes, *Biol Pharm Bull* 1998 Jun;21(6):558-64
- 9) Li D, Sinclair A, Wilson A, Nakkote S, Kelly F, Abedin L, Mann N, Turner A Effect of dietary alpha-linolenic acid on thrombotic risk factors in vegetarian men. *Am J Clin Nutr* 1999 May;69(5):872-82
- 10) Calder PC, Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, *Braz J Med Biol Res* 1998 Apr;31(4):467-90
- 11) Devi MA, Das NP, Antiproliferative effect of polyunsaturated fatty acids and interleukin-2 on normal and abnormal human lymphocytes, *Experientia* 1994 May 15;50(5):489-92
- 12) James MJ, Gibson RA, Cleland LG, Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000 Jan;71(1 Suppl):343S-8S13)

- 13) Kumar GS, Das UN, Effect of prostaglandins and their precursors on the proliferation of human lymphocytes and their secretion of tumor necrosis factor and various interleukins, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994 Jun;50(6):331-4
- 14) Jeffery NM, Sanderson P, Sherrington EJ, Newsholme EA, Calder PC, The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions, *Lipids* 1996 Jul;31(7):737-45
- 15) Ohata T, Fukuda K, Takahashi M, Sugimura T, Wakabayashi K, Suppression of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophage cells by omega 3 polyunsaturated fatty acids, *Jpn J Cancer Res* 1997 Mar;88(3):234-7
- 16) Oh-hashii K, Takahashi T, Watanabe S, Kobayashi T, Okuyama H Possible mechanisms for the differential effects of high linoleate safflower oil and high alpha-linolenate perilla oil diets on platelet-activating factor production by rat polymorphonuclear leukocytes. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1997 Dec;17(3):207-20
- 17) Kawasaki M, Toyoda M, Teshima R, Sawada J, Saito Y, Effect of alpha-linolenic acid on the metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and histamine release in RBL-2H3 cells, *Biol Pharm Bull* 1994 Oct;17(10):1321-5
- 18) Watanabe S, Sakai N, Yasui Y, Kimura Y, Kobayashi T, Mizutani T, Okuyama H A high alpha-linolenate diet suppresses antigen-induced immunoglobulin E response and anaphylactic shock in mice. *J Nutr* 1994 Sep;124(9):1566-73
- 19) Kankaanpaa P, Sutas Y, Salminen S, Lichtenstein A, Isolauri E, Dietary fatty acids and allergy, *Ann Med* 1999 Aug;31(4):282-7
- 20) Parks EJ, German JB, Davis PA, Frankel EN, Kappagoda CT, Rutledge JC, Hyson DA, Schneeman BO, Reduced oxidative susceptibility of LDL from patients participating in an intensive atherosclerosis treatment program, *Am J Clin Nutr* 1998 Oct;68(4):778-85
- 21) Fuller CJ, Jialal I, Effects of antioxidants and fatty acids on low-density-lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr* 1994 Dec;60(6 Suppl):1010S-1013S
- 22) Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D, Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men, *Am J Epidemiol* 1997 Jan 1;145(1):33-41

- 23) Hardwick SJ, Carpenter KL, Law NS, Van Der Veen C, Marchant CE, Hird R, Mitchinson MJ Toxicity of polyunsaturated fatty acid esters for human monocyte-macrophages: the anomalous behaviour of cholesteryl linolenate, *Free Radic Res* 1997 Apr;26(4):351-62
- 24) Mol MJ, Demacker PN, Stalenhoef AF The role of modification of lipoproteins and of the immune system in early atherogenesis, *Neth J Med* 1993 Aug;43(1-2):83-90
- 25) Roche HM, Unsaturated fatty acids, *Proc Nutr Soc* 1999 May;58(2):397-401
- 26) Mutanen M Comparison between dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids as regards diet-related diseases. *Biomed Pharmacother* 1997;51(8):314-7
- 27) Jeffery NM, Newsholme EA, Calder PC Level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet alter serum lipid levels and lymphocyte functions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997 Aug;57(2):149-60.
- 28) Kochetova MM, Eremina IV, Kliuchnikova ZhI, Solov'eva EF, Butusova NN, Torkhovskaia TI, Khalilov EM, The antiatherogenic action of plant oils with added omega-3 polyunsaturated fatty acids, *Biull Eksp Biol Med* 1993 Oct;116(10):407-9
- 29) Rukmini C, Raghuram TC, Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review, *J Am Coll Nutr* 1991 Dec;10(6):593-601
- 30) Jiang Z, Sim JS, Consumption of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched eggs and changes in plasma lipids of human subjects, *Nutrition* 1993 Nov-Dec;9(6):513-8
- 31) Bierenbaum ML, Reichstein R, Watkins TR, Reducing atherogenic risk in hyperlipemic humans with flax seed supplementation: a preliminary report, *J Am Coll Nutr* 1993 Oct;12(5):501-4
- 32) Μουτσόπουλος Χ.Μ., Εμμανουήλ Δ.Σ., “Βασικές αρχές παθοφυσιολογίας”, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα, 1995
- 33) Karlson P, “Κλινική Παθοβιοχημεία», Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα, 1987.
- 34) Harrison's, “Principles of Internal Medicine”, 12th Edition, McGrawHill, 1991.
- 35) Ross R, The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s, *Nature*, 362, 801-809, 1993.

- 36) Steinberg D, Witztum JL, Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts, *JAMA* 1990 Dec 19;264(23):3047-52
- 37) Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q, Is atherosclerosis an immunologically mediated disease?, *Immunol Today* 1995 Jan;16(1):27-33
- 38) Wick G, Kleindienst R, Schett G, Amberger A, Xu Q Role of heat shock protein 65/60 in the pathogenesis of atherosclerosis *Int Arch Allergy Immunol* 1995 May-Jun;107(1-3):130-1
- 39) Vaith P, Potempa LA, Deposition of modified or native C-reactive protein in atherosclerotic arteries?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Apr;20(4):1173-4
- 40) Mayr M, Kiechl S, Willeit J, Wick G, Xu Q, Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* 2000 Aug 22;102(8):833-9
- 41) Bannerman DD, Goldblum SE, Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury *Lab Invest* 1999 Oct;79(10):1181-99
- 42) Schutt C, CD14, *Int J Biochem Cell Biol* 1999 May;31(5):545-9
- 43) Kullo IJ, Gau GT, Tajik AJ, Novel risk factors for atherosclerosis, *Mayo Clin Proc* 2000 Apr;75(4):369-80
- 44) Henschen-Edman AH, On the identification of beneficial and detrimental molecular forms of fibrinogen, *Haemostasis* 1999;29(2-3):179-86
- 45) Μουτσόπουλος Χ.Μ., «Στοιχεία Βασικής και Κλινικής Ανοσολογίας», Εγαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Αθήνα 1995.
- 46) Roitt I, Brostoff J, Male D, "Immunology", Third edition, Mosby, 1993.
- 47) Janeway C, Travers P, «Κλινική Ανοσοβιολογία», Μετάφραση Π.Βλαχογιαννόπουλος, Δεύτερη έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, Αθήνα 1999.
- 48) Kuby J, "Immunology", Second edition, Freeman, 1994.
- 49) Rose N, Mackay I, "The Autoimmune Diseases", Third Edition, Academic Pres, 1998.
- 50) Μουτσόπουλος Χ.Μ., «Ανοσολογία: Αυτοάνοσα Ρευματικά Νοσήματα», Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1990.
- 51) Hansson G, "Immune responses in atherosclerosis", in : "Immune Function of the Vessel Wall", Harwood Academic Publishers, 1996

- 52) Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK, Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis, *J Clin Invest* 1985 Jul;76(1):125-31
- 53) Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK, Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque, *Arteriosclerosis* 1986 Mar-Apr;6(2):131-8
- 54) Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Claesson-Welsh L, Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain, *Clin Exp Immunol* 1986 May;64(2):261-8
- 55) Warner SJ, Auger KR, Libby P, Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells *J Immunol* 1987 Sep 15;139(6):1911-7
- 56) Libby P, Hansson GK, Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions, *Lab Invest* 1991 Jan;64(1):5-15
- 57) Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssonen K, Palinski W, Witztum JL, Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis, *Lancet* 1992 Apr 11;339(8798):883-7
- 58) Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, Chalmers JA, Cox EL, An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks, *Hum Pathol* 1987 Apr;18(4):375-80
- 59) Hughes GR, Immunology, lupus and atheroma, *Lupus* 2000;9(3):159-60
- 60) Vaarala O Atherosclerosis in SLE and Hughes syndrome *Lupus* 1997;6(6):489-90
- 61) Goerge J, Shoenfeld Y, The antiphospholipid syndrome: a crossroads of autoimmunity and atherosclerosis, *Lupus*, 6:559-50, 1997.
- 62) Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD, Hallett DC, Natural history of hypercholesterolemia in systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol* 1999 Oct;26(10):2137-43
- 63) Urowitz MB, Gladman DD, Accelerated atheroma in lupus—background, *Lupus*. 2000;9(3):161-5. Review.
- 64) Petri M, Spence D, Bone LR, Hochberg MC, Coronary artery disease risk factors in the Johns Hopkins Lupus Cohort: prevalence, recognition by patients, and preventive practices, *Medicine (Baltimore)*. 1992 Sep;71(5):291-302.

- 65) Petri M, Lakatta C, Magder L, Goldman D, Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis, *Am J Med.* 1994 Mar;96(3):254-9.
- 66) Rahman P, Urowitz MB, Gladman DD, Bruce IN, Genest J Jr, Contribution of traditional risk factors to coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus, *J Rheumatol.* 1999 Nov;26(11):2363-8.
- 67) Pruzanski W, de Beer FC, Stefanski E, Vadas, Serum amyloid A protein enhances the activity of secretory non-pancreatic phospholipase A2. *Biochem J.* 1995 Jul 15;309 (Pt 2):461-4.
- 68) Murai A, Miyahara T, Fujimoto N, Kameyama M, Lp(a) lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease and cerebral infarction. *Atherosclerosis.* 1986 Feb;59(2):199-204.
- 69) Borba EF, Santos RD, Bonfa E, Vinagre CG, Pileggi FJ, Cossermelli W, Maranhao RC, Lipoprotein(a) levels in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994 Feb;21(2):220-3.
- 70) Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1993 Apr 10;341(8850):923-5.
- 71) George J, Afek A, Gilburd B, Harats D, Shoenfeld Y, Autoimmunity in atherosclerosis: lessons from experimental models, *Lupus.* 2000;9(3):223-7. Review.
- 72) Iuliono L, Pratico D, Ferro D, Pittoni V, Valesini G, Lawson J, FitzGerald GA, Violi F Enhanced lipid peroxidation in patients positive for antiphospholipid antibodies. *Blood.* 1997 Nov 15;90(10):3931-5.
- 73) Ferro D, Pittoni V, Quinttarello C, Basili S, Saliola M, Caroselli C, Valesini G, Violi F, Coexistence of anti-phospholipid antibodies and endothelial perturbation in systemic lupus erythematosus patients with ongoing prothrombotic state. *Circulation.* 1997 Mar 18;95(6):1425-32.
- 74) Vaarala O, Puurunen M, Lukka M, Alfthan G, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T, Affinity-purified cardiolipin-binding antibodies show heterogeneity in their binding to oxidized low-density lipoprotein. *Clin Exp Immunol.* 1996 May;104(2):269-74.

- 75) Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK, Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997 Nov;17(11):3159-63.
- 76) Matsuda J, Gohchi K, Gotoh M, Kawasaki K, Katoh M, Beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibody is reactive to both beta2-glycoprotein I/oxidized as well as beta2-glycoprotein I/reduced cardiolipin, *Thromb Res*. 1999 Jul 1;95(1):63-7
- 77) Harris EN, Pierangeli SS, Gharavi AE, Diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a proposal for use of laboratory tests, *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S144-8
- 78) Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T, Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1997 Mar;107(3):569-73.
- 79) Matsuura E, Kobayashi K, Yasuda T, Koike T, Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis. *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S135-9
- 80) George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J, Barshack I, Kopolovic J, Shoenfeld Y, Immunolocalization of beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. *Circulation*. 1999 May 4;99(17):2227-30.
- 81) Shoenfeld Y, Ziporen L, Lessons from experimental APS models, *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S158-61
- 82) George J, Afek A, Gilburd B, Levy Y, Blank M, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y, Atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice is accelerated by immunization with anticardiolipin antibodies, *Lupus*. 1997;6(9):723-9.
- 83) Vaarala O, Antibodies to oxidized LDL, *Lupus*. 2000;9(3):202-5
- 84) Hamilton CA, Low-density lipoprotein and oxidized low-density lipoprotein: their role in the development of atherosclerosis, *Pharmacol Ther*. 1997;74(1):55-72
- 85) Viita H, Narvanen O, Yla-Herttuala S, Different apolipoprotein B breakdown patterns in models of oxidized low density lipoprotein. *Life Sci*. 1999;65(8):783-93.
- 86) Romero FL, Khamashta MA, Hughes GR, Lipoprotein(a) oxidation and autoantibodies: a new path in atherothrombosis, *Lupus*. 2000;9(3):206-9.
- 87) Wick G, Kleindienst R, Amberger A, "The role of heat shock protein 65/60 in the initial immune-mediated stages of atherosclerosis, in: "Immune Function of the Vessel Wall", Harwood Academic Publishers, 1996.

- 88) Xu O, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulning T, Luef G, Wick G, Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis, *Lancet*. 1993 Jan 30;341(8840):255-9.
- 89) Xu O, Schett G, Seitz CS, Hu Y, Gupta RS, Wick G, Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. *Circ Res*. 1994 Dec;75(6):1078-85.
- 90) Yalow RS, Glick SM, Roth J, Berson SA, Plasma insulin and growth hormone levels in obesity and diabetes, *Ann N Y Acad Sci* 1965 Oct 8;131(1):357-73
- 91) Hemmila I, "Applications of fluorescence in immunoassays", John Willey & Sons, INC, Volume 117, 1991.
- 92) Diamandis E.P., Christopoulos T.K., "Immunoassays", Academic Press, 1996.
- 93) Collins W.P., "Alternative Immunoassays", John Willey & Sons, 1985.
- 94) Αρτζόγλου Π, "Πρότυπα Υλικά και Μέθοδοι", Διήμερο Σεμινάριο: "Αξιοπιστία Εργαστηριακών Αποτελεσμάτων στην Κλινική Χημεία", Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας, Αθήνα, 1992.
- 95) Γερμενής Α, "Προαναλυτικοί παράγοντες και εργαστηριακή αξιοπιστία", Διήμερο Σεμινάριο: "Αξιοπιστία Εργαστηριακών Αποτελεσμάτων στην Κλινική Χημεία", Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας, Αθήνα, 1992.
- 96) «Ανοσοχημικές τεχνικές – εφαρμογές στην Κλινική Χημεία», Ημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας – Κλινικής Βιοχημείας, Αθήνα, 7 Ιουνίου, 1996.
- 97) Thompson RA, "Techniques in clinical immunology", Blackwell Scientific Publications, 1977.
- 98) Porstman T, Kiessig S.T., "Enzyme immunoassay techniques: An overview", *Journal of immunological methods*, 150, 50-71, 1992.
- 99) Hudson L, Hay F.C., "Practical Immunology", Blackwell Scientific Publications, 1980.
- 100) Johnstone A, Thorpe R, "Immunochemistry in practice", Blackwell Scientific Publications, 1982.
- 101) Thompson RA, "Techniques in clinical immunology", Blackwell Scientific Publications, 1977.
- 102) Τριχοπούλου Α, «Πίνακες Συνθέσεως Τροφίμων και Ελληνικών Φαγητών», Αθήνα, 1992.

- 103) Simopoulos AP, Essential Fatty Acid in health and chronic disease, *Am J Clin Nutr*, 70(3):560S-569S, 1999
- 104) Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, "The Antiphospholipid Syndrome: history, definition, classification and differential diagnosis", in the : *Antiphospholipid Syndrome*, CRC PRESS, 1996.
- 105) Alargon - Segovia D, Cardiel MH, Reyes E, Antiphospholipid arterial vasculopathy, *J Reumatology*, 16(6):762-767, 1989.
- 106) Hanly JG, Hong C, James H, Mansour M, Jones JV, Antiphospholipid antibodies require beta 2 glycoprotein I as cofactor, *J Rheumatology*, 19(9):1397-1402, 1992
- 107) Simatov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL, Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies, *J Clin Invest* 1995 Nov;96(5):2211-9
- 108) Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN, Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrom patients activate endothelial cells in vitro and in vivo, *Circulation* 1998 Apr 20;99(15):1997-2002
- 109) Lellouche F, Martinuzzo M, Said P, Maclouf J, Carreras LO, Imbalance of thromboxane/prostacyclin biosynthesis in patients with lupus anticoagulant, *Blood* 1991 Dec 1;78(11):2894-9
- 110) Oxholm P, Asmussen K, Wiik A, Horrobin DF, Essential fatty acid status in cell membranes and plasma of patients with primary Sjogren's syndrome. Correlations to clinical and immunologic variables using a new model for classification and assessment of disease manifestations, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998 Oct;59(4):239-45
- 111) Rossi E, Costa M Fish oil derivatives as a prophylaxis of recurrent miscarriage associated with antiphospholipid antibodies (APL): a pilot study *Lupus* 1993 Oct;2(5):319-23
- 112) Fedyk ER, Brown DM, Phipps RP, PGE2 regulation of B lymphocytes and T helper 1 and T helper 2 cells: induction of inflammatory versus allergic responses, *Adv Exp Med Biol* 1997;407:237-42

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΑ

1. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1.1 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS), pH 7.4

- NaCl 8.00 gr/l (0.14M)
- KCl 0.20 gr/l (2.7 mM)
- KH_2PO_4 0.20 gr/l (1.5 mM)
- Na_2HPO_4 1.15 gr/l (8.1 mM)

+ Νατραζίδιο (0.01%) (συντηρητικό)

Οι παραπάνω ποσότητες αλάτων διαλύονται σε 1 L H_2O και αναδεύονται μέχρι πλήρη διαλυτοποίησή τους. Το διάλυμα που προκύπτει αποτελεί το stock (10X), εκ του οποίου πέρνουμε το διάλυμα εργασίας με αραίωση σε H_2O (1 : 10).

1.2 Ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικών (carbonate-bicarbonate buffer), pH 9.5

- $\text{Na}_2\text{HCO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 0.1 M διάλυμα (28.62 gr/l) (A)
- NaHCO_3 , 0.1 M διάλυμα (8.4 gr/l) (B)

Αναμειγνύουμε 30 ml από το διάλυμα A με 70 ml από το διάλυμα B, για την παρασκευή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο σε θερμοκρασία 20 °C θα έχει pH 9.5.

1.3 Διάλυμα Δυαιθανολαμίνης, pH 9.8

Στο διάλυμα αυτό διαλύουμε το υπόστρωμα της Αλκαλικής Φωσφατάσης, λίγο πριν την χρήση του υποστρώματος.

- 97 ml δυαιθανολαμίνης
- 100 mg $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
- 800 ml H_2O

Ρυθμίζουμε το pH στο 9.8 και εν συνεχεία προσθέτουμε H_2O έως τα 1000 ml. Το διάλυμα φυλάγεται στο σκοτάδι στους 4 °C. Κατά την διάλυση του υποστρώματος, χρησιμοποιούμε 5 ml από το περαπάνω διάλυμα και 1 ταμπλέτα υποστρώματος.

2. ΥΛΙΚΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 2.1 **Πλακίδια ELISA** : Costar, EIA/RIA plate, code 9018, 96 well Flat Bottom, High Binding (USA)
Nunc – immunoplates, Maxisorp, 96 well, code 439454 (Denmark)
- 2.2 **Αυτόματες πιπέτες** : Πολυκάναλες (eppendorf) (50-200 μ l)
Μονοκάναλες (Genex Beta) (0.5-10 μ l / 10-100 / 100-1000 μ l)
- 2.3 **Σωληνάρια αραίωσης ορών** : 5 ml tubes, 75x12 mm, Sarstedt (Germany)
- 2.4 **Ακροφύσια πιπετών**: 0-200 μ l / 0-1000 μ l, Costar, universal fit pipette tips (USA)
- 2.5 **Καρδιολιπίνη**: Sigma, Lot. 34H8383, 100 mg (5.3 mg/ml) (from bovine heart)
- 2.6 **Απόλυτη αιθανόλη** : Merk, συσκευασία 2.5 L, UN 1170
- 2.7 **Tween 20**: SERVA, 500 ml, analytical grade
- 2.8 **Mouthing medium**: Med.Ca.Encintas, code 0961
- 2.9 **Υπόστρωμα ALP** : Sigma 104, phosphate substrate tablets, p-nitrophenylphosphate Disodium,, 5 mg/tablet, Lot 099H6121 (USA)
- 2.10 **β 2-γλυκοπρωτεΐνη I** : Behringer (Germany), human β 2-GPI (προσφορά, μόνο για ερευνητικούς σκοπούς)
- 2.11 **Ζελατίνη** : Sigma, G-7765, 250 ml, Lot 37h1205, teleostan gelatin from cold Water fish skin.
- 2.12 **Κυτταρικό υπόστρωμα ANA**: πλακίδια με επιστρωμένα επιθηλιακά κύτταρα Hep2, ANA slide, 508100, 12 wells, Lot 022148, INOVA Diagnostics (USA)
- 2.13 **IgG-ALP conjugated**: Sera Lab, code SDL-2518, 1 ml, 0.5 mg/ml, (Sussex)
- 2.14 **IgM-ALP conjugated**: Sera Lab, code SDL-2519, 1 ml, 0.5 mg/ml, (Sussex)
- 2.15 **anti-human IgA (non conjugated)** : rabbit, code A092, DAKO (Denmark)
- 2.16 **anti-rabbit IgG ALP conjugated** : Boehringer Mannheim, code 1214632,500U
- 2.17 **anti- human IgG/FITC conjugated** : DAKO A/S, code F0202 (Denmark)
- 2.18 **D-Dimmers**: (kit) Asserachrom, Diagnostica Stago, Lot 990521, 96 test (France)

3. ΟΡΓΑΝΑ

3.1 Ζυγός : OHAUS, GT 210

3.2 Αναδευτήρας : VWR, Moder 320 (stir and heat)

3.3 Πεχάμετρο : WTW, 537 mop, microprocessor, pHmeter

3.4 Επωαστήρας : Mennert, με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία

3.5 Μικροσκόπιο : φθορισμού και λευκού φωτός, συνδεδεμένο με Ηλεκτρονικό Υπολογιστή. Μοντέλο Nikon, PCM2000.

3.6 ELISA reader : Dynatech, MR4000, συνδεδεμένος με εκτυπωτή

3.7 Αυτόματος ανοσολογικός αναλυτής : DPC Immulite

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Όνομα.....

Ηλικία

Βάρος.....

Οδηγίες για τη συμπλήρωση αυτού του ημερολογίου

- ❖ Γράψε **ΌΛΑ** τα τρόφιμα (φαγητά ή ποτά) που θα φας σε μία εβδομάδα. Κάθε ημέρα ξεκινά από μια καινούργια σελίδα.
- ❖ Σημείωσε την ώρα που άρχισες να τρως το φαγητό σου ή το κολατσιό σου.
- ❖ Σημείωσε την εμπορική επωνυμία (μάρκα) του τροφίμου αν την θυμάσαι.
- ❖ Μην αλλάξεις τις συνήθειες του φαγητού σου και τη δίαιτά σου επειδή συμπληρώνεις αυτό το ημερολόγιο.
- ❖ Προσπάθησε να είσαι όσο το δυνατό πιο σαφής στις περιγραφές των τροφίμων. Για παράδειγμα:
Αντί για **σαλάτα** καλύτερα να γράψεις **σαλάτα μαρούλι**
κρέας **χοιρινή μπριζόλα ψητή**
τοστ **τοστ με ζαμπόν και τυρί**
Μην ξεχάσεις να γράψεις: τα διάφορα «σνακ», τα « τσιμπολογήματα» μεταξύ των γευμάτων, τα ροφήματα(καφέδες κ.τ.λ.), τα αναψυκτικά, τις τσίχλες και επίσης μην ξεχάσεις τα συμπληρώματα διατροφής όπως οι βιταμίνες και τα συμπληρώματα.
- ❖ Είναι πολύ σημαντικό να γράψεις σωστά τις ποσότητες αυτών που έφαγες. Για το λόγο αυτό διάβασε προσεκτικά τις παρακάτω οδηγίες.
Πρόσεξε: Σημείωσε μόνο την ποσότητα του φαγητού που πραγματικά έφαγες, και όχι ότι περίσσεψε στο πιάτο.

Γάλα – γιαούρτι: Υπολόγισε την ποσότητα χρησιμοποιώντας ως «μεζούρα» το ποτήρι, το φλιτζάνι και το κεσεδάκι ή γράψε άλλη τυποποιημένη συσκευασία. Μην ξεχάσεις να σημειώσεις την περιεκτικότητα σε λιπαρά

(πλήρες, 1,5%, άπαχο, κ.τ.λ.), αν είναι σοκολατούχο ή περιέχει φρούτα (π.χ. γιαούρτι με κομμάτια ροδάκινο).

Δημητριακά πρωινού: Υπολόγισε την ποσότητα σε κουταλιές της σούπας ή φλιτζάνια του τσαγιού. Μην ξεχάσεις να σημειώσεις το είδος (π.χ. κορν φλέικς, κουάκερ, κ.τ.λ.) τη ζάχαρη που έβαλες και βέβαια το γάλα.

Ψωμί-φρυγανιές-αρτοσκευάσματα: Σημείωσε το είδος : ψωμί άσπρο, μαύρο, ολικής αλέσεως, στρογγυλό ψωμάκι, κ.τ.λ. Γράψε την ποσότητα που έφαγες σε φέτες (μία φέτα σαν αυτή του ψωμιού για τост) ή κομμάτια π.χ. 1 φέτα ψωμί άσπρο, 3 φρυγανιές σικάλεως, 2 κράκερ, 1 κουλουράκι με σταφίδες, κ.τ.λ.

Ζυμαρικά-ρύζι (μαγειρεμένα): Υπολόγισε την ποσότητα χρησιμοποιώντας ως μεζούρα το φλιτζάνι του τσαγιού.

Τυρί: Γράψε το είδος (π.χ. κασέρι, γραβιέρα, φέτα κ.τ.λ.) και την ποσότητα χρησιμοποιώντας ως μεζούρα τη φέτα του τυριού για τост.

Αυγά: Γράψε τον αριθμό και τον τρόπο μαγειρέματος (π.χ. 2 αυγά τηγανητά, ομελέτα ή βραστά).

Κρέας-κοτόπουλο-ψάρι: Σημείωσε το είδος γράφοντας όσο μπορείς πιο αναλυτικά την ποσότητα, το μέγεθος και τον τρόπο μαγειρέματος (π.χ. 1 μεγάλη μπριζόλα χοιρινή ψητή στα κάρβουνα ή δύο μικρά μπαρμπούνια τηγανητά ή ένα μεσαίο μπούτι κοτόπουλο ψητό στο φούρνο). Προσοχή: Αν είναι μαγειρεμένο μαζί με κάτι άλλο, π.χ. κοτόπουλο με πατάτες στο φούρνο, γράψε ξεχωριστά για τις πατάτες.

Όσπρια-σούπες: Γράψε πόσα βαθιά πιάτα, ή πόσα φλιτζάνια του τσαγιού ή κουταλιές σούπας έφαγες (π.χ. 1 πιάτο φακές, 1 βαθύ πιάτο ψαρόσουπα, 3 κουταλιές της σούπας ρεβίθια).

Λαχανικά-σαλάτες: Υπολόγισε την ποσότητα χρησιμοποιώντας ως μεζούρα το φλιτζάνι του τσαγιού, την κουτάλα της σούπας ή απλά γράψε τον αριθμό. Μην ξεχάσεις να σημειώσεις το μέγεθος καθώς και το αν τα λαχανικά είναι φρέσκα ή έχουν μαγειρευτεί και πώς (π.χ. 1 φλιτζάνι λάχανο σαλάτα, 2 μεγάλα καρότα ωμά). Για τα τηγανητά λαχανικά (π.χ. τηγανητές πατάτες, κολοκυθάκια κ.τ.λ.) γράψε τον αριθμό των κομματιών που έφαγες ή γράψε την ποσότητα σε μερίδες (π.χ. 1 μερίδα fast food).

Φρούτα: Σημείωσε το είδος, τον αριθμό και το μέγεθος (π.χ. μια φέτα πεπόνι, 2 μεγάλα μήλα, 12 ρώγες σταφύλι). Μην ξεχάσεις να διευκρινήσεις αν το φρούτο είναι φρέσκο ή κονσέρβα.

Χυμοί φρούτων – αναψυκτικά: Υπολόγισε την ποσότητα χρησιμοποιώντας ως μεζούρα το ποτήρι ή το κουτάκι της συσκευασίας (330ml). Διευκρίνισε αν ο χυμός είναι φρέσκος ή τυποποιημένος καθώς και το είδος του αναψυκτικού (με ή χωρίς ανθρακικό, light κ.τ.λ.).

Άλλα ποτά: Γράψε πόσα ποτά ήπιας (π.χ. 1 βότκα πορτοκάλι) ή υπολόγισε την ποσότητα σε ποτήρια (μικρά ή μεγάλα), μπουκάλια ή κουτάκια (π.χ. 1 ποτηράκι κρασί κόκκινο, 1 μπουκάλι μπύρα κ.τ.λ.).

Γλυκά – σνακ: Για τα γλυκά (σοκολάτες, μπισκότα, παγωτά κ.τ.λ.) και τα σνακ (τυρόπιτες, μπουγάτσες κ.τ.λ.) χρησιμοποίησε ως μεζούρα το φλιτζάνι του τσαγιού, τον αριθμό των κομματιών ή γράψε την τυποποιημένη ποσότητα (π.χ. 1 ξυλάκι παγωτό κρέμα, 1 φλιτζάνι παγωτό παρφέ, ½ πάστα σοκολατίνα, 1 μεγάλη τυρόπιτα, 1 μικρό σακουλάκι πατατάκια).

Ζάχαρη – μέλι – βούτυρο: Υπολόγισε την ποσότητα σε κουταλάκια του γλυκού ή της σούπας.

Λάδι – βούτυρο: Υπολόγισε την ποσότητα που έβαλες στο φαγητό σου (στη σαλάτα, στο ψωμί, στα ζυμαρικά ή αλλού) σε κουταλάκια του γλυκού ή της σούπας. Μην ξεχάσεις να σημειώσεις το είδος του λαδιού ή του βουτύρου (π.χ. ελαιόλαδο, αγελαδινό βούτυρο, βιταμ κ.τ.λ.).

Σύνθετα φαγητά: Για τα σύνθετα φαγητά (π.χ. παστίσιο, γεμιστά, σπανακόπιτα, σπανακόρυζο) υπολόγισε την ποσότητα σε μερίδες, κομμάτια (μέτρια κομμάτια) ή κουταλιές της σούπας. Όπου είναι δυνατόν δώσε πληροφορίες χωριστά για τα επιμέρους συστατικά τους.

Παραδείγματα:

1 μέτρια μερίδα μουςακά

2 κομμάτια παστίσιο

αλλά αντί για :

κοτόπουλο με πατάτες στο φούρνο

γράψε :

1 μεσαίο κομμάτι κοτόπουλο στο φούρνο και 5
πατάτες (κομμάτια μεσαίου μεγέθους) φούρνου.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΠΤΥ
ΑΛΕ
α- ΠΙΝΟΠΕΝΙΚΟΥ --- 616.079
Κ. Αλεξαν
498617 4947

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



★ 0 8 6 1 7 ★