



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων

Μαρία Ζουρίδη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Αξιολόγηση και διευκρίνιση της επίδρασης του ελαϊκού οξέος και των
αντιοξειδωτικών συστατικών του ελαιολάδου στο σχηματισμό
αθηρωματικής πλάκας. Κλινική δοκιμή σε ζωικό μοντέλο
αθηρωμάτωσης»**



Τριμελής επιτροπή

Ανδριάννα Καλιώρα
Λέκτορας Χ.Π
(Επιβλέπουσα)

Νικόλαος Ανδρικόπουλος
Καθηγητής Χ.Π

Αντωνία Χίου
Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων

Μαρία Ζουρίδη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**«Αξιολόγηση και διευκρίνιση της επίδρασης του ελαϊκού οξέος και των
αντιοξειδωτικών συστατικών του ελαιολάδου στο σχηματισμό
αθηρωματικής πλάκας. Κλινική δοκιμή σε ζωικό μοντέλο
αθηρωμάτωσης»**

Τριμελής επιτροπή

Ανδριάννα Καλιώρα
Λέκτορας Χ.Π
(Επιβλέπουσα)

Νικόλαος Ανδρικόπουλος
Καθηγητής Χ.Π

Αντωνία Χίου
Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π

Αθήνα, 2011

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας–Φυσικοχημείας–Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας–Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη της Λέκτορα κ. Ανδριάννα.Καλιώρα

Με το πέρας της διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Λέκτορα κ. Ανδριάννα Καλιώρα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση του θέματος, την υποστήριξη και την καθοδήγησή της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Ανδρικόπουλο και την Επ. Καθηγήτρια κ. Αντωνία Χίου για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στη συγγραφή της εργασίας, τις παρατηρήσεις και την υποστήριξη τους, οι οποίες συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής δουλειάς.

Την υποψήφια διδάκτορα κ. Αριστεά Γκιοζάρη, την ευχαριστώ γιατί ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα, καθώς και για την υποστήριξη και τη συμπαράσταση της.

Τη φαρμακευτική εταιρεία ELPEN για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού και τη φιλοξενία των πειραματόζωων και τον κ. Απόστολο Παπαλόη, Δρ Βιολόγο και Διευθυντή του Ερευνητικού Τμήματος καθώς και το προσωπικό της εταιρείας, τους ευχαριστώ θερμά για τη μεγάλη βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αγάπη τους και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια και τους φίλους μου γιατί είναι πάντα δίπλα μου σε όλες μου τις επιλογές.

Στους γονείς μου, Χαράλαμπο και Ισμήνη

Περιεχόμενα

<u>Περίληψη</u>	7
<u>Summary</u>	8
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος	10
1.1 Περί Μεσογειακής Διατροφής	11
1.2 Ελαιόλαδο	12
1.2.1 Ορισμοί και κατηγορίες	12
1.2.2 Σύσταση ελαιολάδου.....	13
1.2.2.1 Τα λιπαρά οξέα.....	14
1.2.2.2 Σαπωνοποιήσιμο και μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου	15
1.2.3 Δομή και κατηγορίες των φαινολικών συστατικών	19
1.2.3.1 Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου	21
1.2.3.2 Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου	28
1.2.3.3 Δράσεις φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.....	29
1.3 Βιταμίνη E.....	31
1.3.1 Γενικά στοιχεία και δομή	31
1.3.2 Βιολογικός ρόλος	32
1.4 Τα οφέλη της κατανάλωσης ελαιολάδου στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου	33
1.5 Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών.....	38
1.5.1 Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης.....	38
1.5.2 Λιπιδαιμικό προφίλ του πλάσματος στην καρδιαγγειακή νόσο.....	39
1.5.3 Οξείδωση της LDL και οξειδωτική βλάβη	40
1.6 Φλεγμονή και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	44
1.7 Αρτηριακή πίεση	47
1.8 Μεταβολισμός των υδατανθράκων	48
1.9 Θρόμβωση.....	49
1.10 Τα MUFA ως μοναδικός καρδιοπροστατευτικός παράγοντας του ελαιολάδου	51
Κεφάλαιο 2: Μεθοδολογία	53
2.1 Τα πειραματόζωα- συνθήκες διαβίωσης	54
2.1.1 Η διατροφή των πειραματόζωων	55
2.2 Αναισθησία- αιμοληψία- ευθανασία.....	56
2.3 Βιοχημικές αναλύσεις	58
2.4 Ομοιογενοποίηση ιστών.....	58
2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford	59
2.6 Μέτρηση επιπέδων μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό	60

2.7 Μέτρηση TBARS (MDA).....	61
2.8 Μέτρηση των επιπέδων κυτταροκινών σε ιστό.....	62
2.9 Προσδιορισμός βιταμίνης E σε έτοιμη τροφή με HPLC	63
2.10 Προσδιορισμός βιταμίνης E σε έλαια	65
2.11 Ανάλυση με χρωματογραφία HPLC	65
2.12 Αξιολόγηση των ιστών μακροσκοπικά	67
2.13 Στατιστική επεξεργασία	68
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα-Συζήτηση	69
3.1 Χαρακτηριστικά των πειραματόζων.....	70
3.2Βιοχημικές μετρήσεις.....	72
3.2.1 Λιπιδιαμικό προφίλ	72
3.2.2 Ηπατικά ένζυμα.....	78
3.3 Συγκέντρωση βιταμίνης E σε έλαια και σε δείγματα τροφής	81
3.4 Μέτρηση των επιπέδων της μαλοναλδεΐδης (MDA)	85
3.5 Μέτρηση των επιπέδων κυτταροκινών	89
3.5.1 Επίπεδα του TNF- alpha.....	90
3.5.2 Επίπεδα της ιντερλευκίνης (IL-6)	93
3.5.3 Επίπεδα της C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP).....	96
3.6 Μακροσκοπική αξιολόγηση.....	99
Συμπεράσματα.....	102
Βιβλιογραφία.....	104

Περίληψη

Το καρδιαγγειακό όφελος από την κατανάλωση του ελαιολάδου, έχει καταγραφεί σε πολλές επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες και έχει επιβεβαιωθεί από πειραματικά αποτελέσματα σε διάφορα ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης. Το ελαιόλαδο, αντιπροσωπευτικό τρόφιμο της παραδοσιακής Μεσογειακής Διατροφής, εμφανίζει προστατευτική δράση στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η δράση του οφείλεται όχι μόνο στη σύσταση σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως ελαϊκό, αλλά και στην υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο ασαπωνοποιητό κλάσμα του. Χάρη στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη του δράση, τείνει να προάγει ένα καλύτερο λιπιδαιμικό προφίλ και ένα λιγότερο προθρομβωτικό περιβάλλον.

Σκοπός της παρούσας κλινικής δοκιμής ήταν να μελετηθεί η επίδραση του ελαιολάδου στο λιπιδαιμικό προφίλ, σε δείκτες οξειδωσης και σε δείκτες φλεγμονής σε πειραματικό ζωικό μοντέλο υπερχοληστερολαιμίας. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 20 αρσενικοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας που κατηγοριοποιήθηκαν τυχαία σε 5 ομάδες: υγιείς κόνικλοι σε συνήθη διατροφή, κόνικλοι σε διατροφή με χοληστερόλη, κόνικλοι σε διατροφή με χοληστερόλη και ελαιόλαδο και κόνικλοι σε διατροφή με χοληστερόλη και ηλιέλαιο.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι:

- δεν υπήρχε καμία μεταβολή στα επίπεδα των τοκοφερολών στα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν, ούτε και στα μίγματα των τροφών κατά το χρόνο που διαρκούσε η διαιτητική παρέμβαση
- η διαιτητική παρέμβαση με χοληστερόλη, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της LDL χοληστερόλη και των τριγλυκεριδίων και σε μείωση της HDL χοληστερόλης. Το ελαιόλαδο βελτίωσε το λιπιδαιμικό προφίλ, μειώνοντας την LDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια και αυξάνοντας την HDL χοληστερόλη μετά από παρέμβαση 8 εβδομάδων
- η διαιτητική παρέμβαση με χοληστερόλη, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των φλεγμονωδών παραγόντων (TNF-α, IL-6, CRP), ενώ η προσθήκη στη διατροφή ελαιολάδου μείωσε τα επίπεδά τους
- το ελαιόλαδο μείωσε τα επίπεδα της μαλοναλδεΐδης στο ήπαρ που προκάλεσε η διατροφή με χοληστερόλη
- το ελαιόλαδο συνέβαλε στη μείωση της ασπαρτικής τρανσαμινάσης του ορού και βελτιώσε τη μακροσκοπική εικόνα του ήπατος σε σύγκριση με το υπερχοληστερολαιμικό ζωϊκό μοντέλο

Summary

Olive oil is representative of the traditional Mediterranean Diet and has been found to exhibit several health benefits on humans. The cardiovascular benefits of virgin olive oil consumption have been established in many epidemiological and clinical studies, as well as in a series of studies in experimental animal models of atherosclerosis. The effect on cardiovascular disease is attributed in monounsaturated fatty acids, mainly oleic acid, and in high content of antioxidants of its unsaponifiable fraction. Due to the antioxidant and anti-inflammatory activities, virgin olive oil regulates lipid profile and promotes a less prothrombotic environment.

The purpose of this clinical trial was to study the effect of extra virgin olive oil (EVOO) on lipid profile, oxidative stress and inflammatory markers in an experimental animal model of hypercholesterolemia. Twenty male New Zealand rabbits were randomly assigned to five lab groups: healthy rabbits fed a standard diet, rabbits fed a cholesterol rich diet, rabbits fed a cholesterol rich diet and EVOO, and rabbits fed a cholesterol rich diet and sunflower oil.

Important experimental findings are listed below:

- no change in tocopherol concentration in oils or in experimental mixtures used were observed during the dietary intervention lasted 8 weeks
- dietary intervention with cholesterol led to an increase in LDL cholesterol and triglycerides and to a decrease in HDL cholesterol. EVOO improved the lipid profile reducing LDL cholesterol and triglycerides and increasing HDL cholesterol after 8 week-intervention
- dietary intervention with cholesterol resulted in increased levels of inflammation markers (TNF- α , IL-6, CRP), while EVOO in the diet lowered their levels
- EVOO reduced levels of malonaldehyde in liver caused by the cholesterol rich diet
- EVOO consumption regulated serum aspartate transaminase
- macroscopically, the livers of EVOO supplemented rabbits were markedly improved compared to hypercholesterolemic animal model and were comparable to livers resected from healthy animals.

In order to elucidate and clarify the activity of oleic acid and phenolic compounds of EVOO, additional experiments with different oil composition in oleic acid or phenolic compounds are needed. This study was only a precursor to elucidate the action of the constituents of virgin olive oil and how they exhibit their cardioprotective effect.

Συντμήσεις

SFA	κορεσμένα λιπαρά οξέα
MUFA	μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
PUFA	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
LDL	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
HDL	λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
VLDL	λιποπρωτεΐνη πού χαμηλής πυκνότητας
TG	τριγλυκερίδια
ROS	δραστικές ενώσεις οξυγόνου
NO	νιτρικό οξείδιο
TXB ₂	θρομβοξάνη B ₂
LTB ₄	λευκοτριένια B ₄
αTTP	πρωτεΐνη μεταφορέας α- τοκοφερόλης
AFB ₁	αφλατοξίνη B ₁
NF-κβ	πυρηνικός παράγοντας kappa B
VCAM-1	αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1
ICAM-1	μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης-1
IL 1,2,6	ιντερλευκίνη 1, 2,6
TNFα	παράγοντας νέκρωσης όγκων
CRP	C- αντιδρώσα πρωτεΐνη
SMC	λεία μυϊκά κύτταρα
HMGCoA	3-υδρόξυ-3-μεθυλογλουταρύλο-συνένζυμο A
vWF	παράγοντας von Willebrand
PAF	παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PGE2	προσταγλανδίνη E ₂
COX-1	κυκλοξυγονάση-1
COX-2	κυκλοξυγονάση-2
TXA ₂	θρομβοξάνη A ₂
PAI-1	ενεργοποιητής του αναστολέα του πλασμινογόνου
CHD	στεφανιαία νόσος
PBS	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
BHT	βουτυλο-υδροξυ-τολουόλιο
BSA	αλβουμίνη ορού μόσχου
MDA	μαλοναλδεϋδη
HCl	υδροχλώριο
TBA	θειοβαρβιτουρικό οξύ
SGOT	ασπαρτική αμινοτρανσφεράση
SGPT	αλανινική αμινοτρανσφεράση
γ-GT	γ-γλουταμινοτρανσφεράση
NAFLD	μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια
TBARS	θειοβαρβιτουρικές οξέο-αντιδραστικές ουσίες
IFN	ιντερφερόνη
LPS	λιποσακχαρίδιο
NOS	συνθετάση του οξειδίου του αζώτου
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος

1.1 Περί Μεσογειακής Διατροφής

Κατά την τελευταία δεκαετία παρατηρείται αύξηση του ενδιαφέροντος για τη Μεσογειακή Διατροφή ακόμα και από επιστήμονες από γεωγραφικές περιοχές με περιορισμένη παράδοση στη Μεσογειακή Διατροφή. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός, ότι η Μεσογειακή Διατροφή έχει συνδεθεί με μακροζωία, βελτίωση της ποιότητας της ζωής, μείωση της συχνότητας καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου καθώς και της γνωστικής υποβάθμισης, παρά το γεγονός ότι είναι ένα διατροφικό μοντέλο με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά σε αντίθεση με προτεινόμενες δίαιτες από άλλα μέρη του κόσμου (Perez-Jimenez *et al.*, 2005). Η αυξημένη περιεκτικότητα σε λίπος την καθιστά διατροφή με ιδιαίτερο γαστρονομικό ενδιαφέρον, καθώς το λίπος παρέχει στα τρόφιμα γευστικότητα, ενώ παράλληλα παρουσιάζει υψηλή αποδοχή. Σε αντίθεση με άλλα διατροφικά πρότυπα πλούσια σε λίπος όπως το Δυτικό, το μεγαλύτερο μέρος της Μεσογειακής Διατροφής προέρχεται από ένα μόνο συστατικό των τροφίμων, το ελαιόλαδο, το οποίο παρέχει περίπου το 85% της περιεκτικότητάς της σε λιπαρές ουσίες. Αυτό εξηγεί, γιατί η Μεσογειακή Διατροφή είναι χαμηλή σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη χωρίς trans λιπαρά οξέα, ενώ είναι πλούσια σε μονοακόρεστα, ιδιαίτερα σε ελαϊκό οξύ. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι το ελαιόλαδο διαθέτει ειδικά γαστρονομικά συστατικά και χάρη στην αφθονία του σε διάφορα μικροσυστατικά που δίνουν οσμή, χρώμα και γεύση, καθίσταται πιο εύκολη η κατανάλωση του (Serra-Majem *et al.*, 2003). Το ενδιαφέρον για τη Μεσογειακή Δίαιτα προήλθε στην πραγματικότητα από τη μελέτη των Επτά Χωρών. Ο Keys και οι συνεργάτες του, ήταν αυτοί που έδειξαν ότι ο ρυθμός θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο μετά από 5-15 χρόνια παρακολούθησης (follow-up) στη Νότια Ευρώπη, ήταν τρεις φορές μικρότερος από τη Βόρεια Ευρώπη ή τις Ηνωμένες Πολιτείες (Renaud *et al.*, 1995). Από τότε που η Lyon Heart Study έδειξε τα ευεργετικά αποτελέσματα της Μεσογειακής Διατροφής στην καρδιοπροστασία, πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση της στο καρδιαγγειακό σύστημα, αλλά και στους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Παρότι υπάρχουν αρκετά στοιχεία για το ρόλο της Μεσογειακής Διατροφής, δεν είναι απολύτως διευκρινισμένοι όλοι οι μηχανισμοί που εξηγούν το ρόλο αυτό.

1.2 Ελαιόλαδο

1.2.1 Ορισμοί και κατηγορίες

Ελαιόλαδο είναι το έλαιο, που παραλαμβάνεται από την ελαιοζύμη (πολτό) του καρπού του ελαιόδεντρου (*Olea europaea sativa*) (εικόνα 1.1) με αποκλειστικά μηχανικά μέσα, ενώ η επεξεργασία του γίνεται με φυσικές μεθόδους και σε θερμοκρασίες που δεν προκαλούν την αλλοίωση του. Το ελαιόλαδο συμβάλλει στο 4% της συνολικής παραγωγής φυτικού ελαίου, η παγκόσμια παραγωγή του οποίου είναι περίπου 2.000.000 τόνους/έτος. Λόγω της αυξανόμενης δημοτικότητας της Μεσογειακής Διατροφής, στην οποία



Εικόνα 1.1 Το ελαιόδεντρο (*Olea europaea*)

το ελαιόλαδο είναι η κύρια λιπαρή πηγή, η παραγωγή του επεκτείνεται πλέον και σε μη παραδοσιακές χώρες- παραγωγούς όπως οι Η.Π.Α, ο Καναδάς, η Αυστραλία, η Ν. Αμερική και η Ιαπωνία. Ανάλογα με τις χημικές του ιδιότητες και το βαθμό οξύτητάς του, το ελαιόλαδο κατατάσσεται σε διαφορετικές κατηγορίες, που λειτουργούν ως κατευθυντήριες γραμμές για τον καταναλωτή κατά την επιλογή των προνομιούχων ειδών του ελαίου (EEC Council regulations).

Οι κατηγορίες έχουν ως εξής:

- 1) *Παρθένο ελαιόλαδο*: έλαια που παραλαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο, μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες, σε συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ελαίου. Τα έλαια αυτής της κατηγορίας δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία, πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης. Τα έλαια αυτά κατατάσσονται και ταξινομούνται ως εξής:

α) *Εξαιρετικά Παρθένο Ελαιόλαδο* (extra virgin olive oil): το ελαιόλαδο του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα), δεν υπερβαίνει τα 0,8g ανά 100g ελαιολάδου (0,8%) και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή

β) *Παρθένο ελαιόλαδο* (virgin olive oil): η οξύτητα δεν υπερβαίνει το 2%

γ) *Ελαιόλαδο Λαμπάντε*: η οξύτητα είναι μεγαλύτερη από 2%, με κακή γεύση και οσμή

- 2) *Εξευγενισμένο ελαιόλαδο*: λαμβάνεται από τον εξευγενισμό παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3%.
- 3) *Ελαιόλαδο- αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα*: λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπαντέ, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1%.
- 4) *Ακατέργαστο πυρηνέλαιο*: το έλαιο που λαμβάνεται από τους πυρήνες της ελιάς, κατόπιν επεξεργασίας με διαλύτες ή με φυσικά μέσα ή το έλαιο που αντιστοιχεί (με εξαίρεση ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά) σε ελαιόλαδο λαμπαντέ.
- 5) *Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο*: λαμβάνεται από τον εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνελαίου, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0,3%.
- 6) *Πυρηνέλαιο*: λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από λαμπαντέ, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1%.

Από την κατάταξη αυτή μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι το πιο πολύτιμο είδος του ελαιολάδου είναι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, που προέρχεται από άθικτες ελιές οι οποίες τίθενται γρήγορα σε επεξεργασία υπό συνθήκες ψυχρής πίεσης. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιείται η ενεργοποίηση των κυτταρικών λιπασών και η υποβάθμιση των τριγλυκεριδίων.

1.2.2 Σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό στοιχείο της Μεσογειακής Διατροφής και θεωρείται συστατικό μιας ισορροπημένης και υγιεινής διατροφής. Η κατανάλωσή του συνίσταται καθημερινά. Διακρίνεται για την υψηλή τιμή του λόγου μονοακόρεστα/κορεσμένα λιπαρά οξέα, το υψηλό περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά συστατικά και την περιεκτικότητα του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (De La Lastra *et al.*, 2001). Αποτελεί πλούσια πηγή ελαϊκού οξέος (μονοακόρεστο), το οποίο θεωρείται πολύτιμο για την υγεία, αφού συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου (Vissoli *et al.*, 1995). Περιέχει επίσης κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως στεατικό και παλμιτικό και σε μικρότερες ποσότητες πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως λινελαϊκό και α-λινολενικό. Ωστόσο, εκτός από τα τριγλυκερίδια περιέχει σε μικρές ποσότητες μικροσυστατικά, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, φωσφατίδια, πολυφαινόλες, βιταμίνες, χρωστικές ουσίες, υδρογονάνθρακες, στερόλες, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες.

Γενικά, η σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα και φαινολικά συστατικά παρουσιάζει διακυμάνσεις που εξαρτώνται από: την ποικιλία των ελαιόκαρπων (Franconi *et al.*, 2006), τη γεωγραφική περιοχή που καλλιεργούνται (Vinha *et al.*, 2005), τις γεωργικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται (Gomez-Rico *et al.*, 2006), την ωριμότητα του καρπού κατά τη συγκομιδή (Gomez-Rico *et al.*, 2006) και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για εξαγωγή, επεξεργασία και αποθήκευση (Fregapane *et al.*, 2006, Kalua *et al.*, 2006).

1.2.2.1 Τα λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα αποτελούνται από μεγάλου μήκους αλυσίδες ατόμων άνθρακα, συνδεδεμένα με άτομα υδρογόνου. Κάθε αλυσίδα έχει ως αρχή μια μεθυλομάδα ($-CH_3$) και στο άλλο άκρο μια καρβοξυλομάδα ($-COOH$) (εικόνα 1.2). Η μεθυλομάδα είναι επίσης γνωστή ως άκρη ωμέγα ($-\omega$), ενώ η καρβοξυλομάδα ως άκρη δέλτα ($-\delta$). Συνήθως, έχουν στο μόριο τους άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Στα περισσότερα βιολογικά συστήματα το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας ποικίλει από 2-30 άτομα άνθρακα. Με βάση το μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας τα λιπαρά οξέα διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

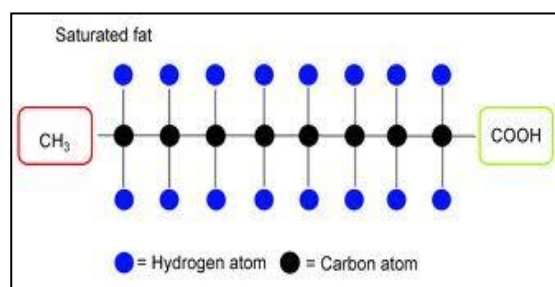
- βραχείας αλυσού, που περιέχουν 2-4 άτομα άνθρακα
- μέτριας αλυσού, που περιέχουν 6-12 άτομα άνθρακα
- μακρίας αλυσού, που περιέχουν περισσότερα από 12 άτομα άνθρακα

Ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών μεταξύ των ατόμων άνθρακα, δηλαδή των ατόμων υδρογόνου που είναι συνδεδεμένα στην ανθρακική αλυσίδα, διακρίνονται σε:

➤ **Κορεμένα λιπαρά οξέα** (saturated fatty acids, SFA), τα οποία δε διαθέτουν διπλούς δεσμούς στην ανθρακική αλυσίδα.

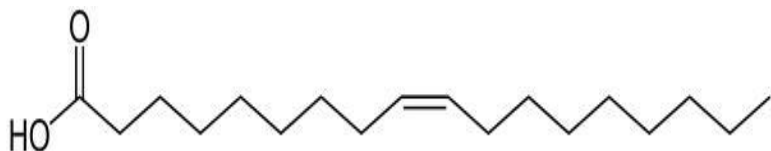
➤ **Ακόρεστα λιπαρά οξέα** (unsaturated fatty acids, UFA), εάν αυτά διαθέτουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς στην ανθρακική αλυσίδα. Λιπαρά οξέα με ένα

διπλό δεσμό, ονομάζονται μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (monounsaturated fatty acids, MUFA), ενώ με δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς ονομάζονται πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polysaturated fatty acids, PUFA). Τα πιο διαδεδομένα ακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1) που βρίσκεται κυρίως στο ελαιόλαδο και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (18:2) και α -λινολενικό οξύ (18:3), που απαντώνται κυρίως στο λινέλαιο, τα ιχθυέλαια και σε μικρότερες ποσότητες στο ηλιέλαιο. Τέλος, τα

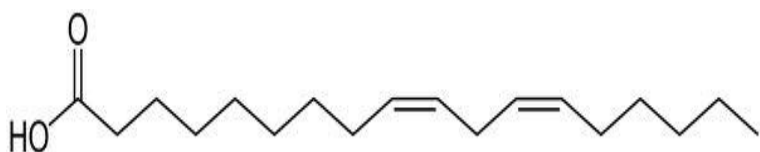


Εικόνα 1.2 Τυπική δομή κορεσμένου λιπαρού οξέος

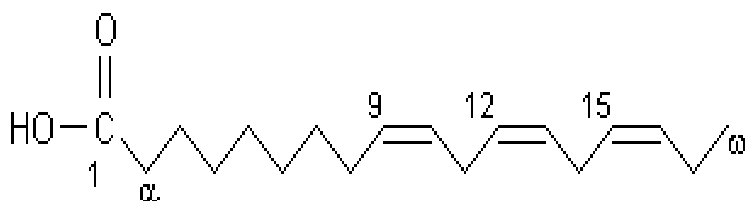
πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε ωμέγα-3 (ω -3) και ωμέγα 6 (ω -6) λιπαρά οξέα με βάση τη θέση του πρώτου διπλού δεσμού, ξεκινώντας την αρίθμηση από τον άνθρακα ωμέγα στην ανθρακική αλυσίδα.



Ελαιικό οξύ (18:1)



Λινελαϊκό οξύ (18:2)



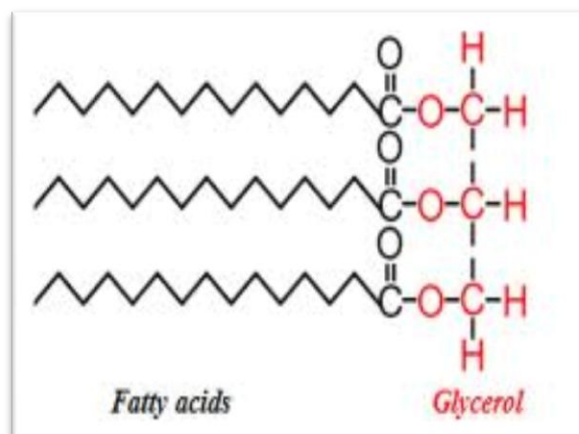
α -λινολενικό (18:3)

1.2.2.2 Σαπωνοποιήσιμο και μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου

Τα εδάδιμα συστατικά του ελαιολάδου μπορούν να διακριθούν στα σαπωνοποιήσιμα και τα μη σαπωνοποιήσιμα, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 98,5-99,5% και το 0,5-1,5% αντίστοιχα του ελαίου. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το σημαντικότερο μέρος των σαπωνοποιήσιμων συστατικών (Gustone *et al.*, 2004), ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από ελεύθερα λιπαρά οξέα και μικρότερης συγκέντρωσης συστατικά, που προέρχονται από τα λιπαρά οξέα, όπως οι μονο/διακυλογλυκερόλες, τα φωσφολιποειδή, οι εστέρες στερολών και οι κηροί. Τα μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά περιλαμβάνουν μη πτητικές ενώσεις που λαμβάνονται μετά από σαπωνοποίηση του ελαίου. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται λιποειδή, όπως οι στερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, οι υδρογονάνθρακες και οι χρωστικές, καθώς και μη πτητικές οργανικές ενώσεις (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2001, Servilli *et al.*, 2004,).

Τριγλυκερίδια

Τα περισσότερα λιπαρά οξέα του εδώδιμου ελαίου απαντώνται ως τριγλυκερίδια (εικόνα 1.3). Πρόκειται για μεικτούς εστέρες γλυκερόλης με ανώτερα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα έχουν αλυσίδα 14 έως 20 ατόμων άνθρακα και μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. Τα τριγλυκερίδια που βρίσκονται σε σημαντικές αναλογίες είναι τα: OOO (40-59%), POO (15-22%), OOL (12-20%), POL (5,5-7%), SOO (3-7%), PLO (4-5%), POP (2-4%) (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2001). Η σύστασή τους συνίσταται σε παρουσία ακόρεστου λιπαρού οξέος, συνήθως ελαϊκού οξέος, στο κέντρο ή στη θέση-2 του μορίου της γλυκερόλης.



Εικόνα 1.3 Τυπική δομή τριγλυκεριδίου

Μονο-διακυλογλυκερόλες

Η ύπαρξη μονο- και δι-ακυλογλυκερολών στο ελαιόλαδο οφείλεται, είτε στην ατελή βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων, είτε σε μερική υδρόλυση των τελευταίων. Στο παρθένο ελαιόλαδο η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων κυμαίνεται από 1-2,8%. Στο κλάσμα των διγλυκεριδίων επικρατούν αυτά με 34 και 36 άτομα άνθρακα. Στο κλάσμα των μονογλυκεριδίων κυριαρχούν η μονοελαϊλογλυκερόλη, η μονολινολεϊλογλυκερόλη και η μονοπαλμιτοϋλογλυκερόλη (De la Lastra *et al.*, 2001).

Λιπαρά οξέα

Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε ελαϊκό οξύ ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ (18:1 ω-9), που αντιπροσωπεύει το 56-84% των ολικών λιπαρών οξέων ενώ περιέχει μέτριες ποσότητες παλμιτικού και στεαρικού οξέος (Moreno *et al.*, 2003). Το λινελαϊκό (18:2 ω6) και το α-λινολενικό απαντώνται σε μικρές ποσότητες (Vissoli *et al.*, 2001, Moreno *et al.*, 2003). Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα κυριότερα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου και τα ποσοστά στα οποία απαντώνται σε αυτό.

Πίνακας 1.1 Τα κυριότερα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου

Ονομασία	Χημικός τύπος	Συμβολισμός χημ. τύπου	Ποσοστό %
Ελαϊκό (O)	$C_{17}H_{33}COOH$	$C(18:1) \Delta^9$ (cis)	55-83
Λινελαϊκό (L)	$C_{17}H_{31}COOH$	$C(18:2) \Delta^{9,12}$ (όλα cis)	3,5-21
α-λινολεϊκό (Ln)	$C_{17}H_{29}COOH$	$C(18:3) \Delta^{9,12,15}$ (όλα cis)	0-0,9

Πίνακας 1.1 Συνέχεια

<i>Ονομασία</i>	<i>Χημικός τύπος</i>	<i>Συμβολισμός χημ. τύπου</i>	<i>Ποσοστό %</i>
Παλμιτικό (P)	C ₁₅ H ₃₁ COOH	C(16:0)	7,5-20
Μυριστικό (M)	C ₁₃ H ₂₇ COOH	C(14:0)	0-0,5
Στεατικό (S)	C ₁₇ H ₃₅ COOH	C(18:0)	0,5-5
Αραχιδονικό (An)	C ₁₉ H ₄₁ COOH	C(20:4) Δ ^{5,8,11,14} (όλα cis)	0-0,6
Παλμιτελαϊκό	C ₁₅ H ₂₉ COOH	C(16:1) Δ ⁹ (cis)	0,3-3,5
Βεχενικό (Be)	C ₂₁ H ₄₃ COOH	C(22:0)	0-0,2
Εικοσαενοϊκό	C ₁₉ H ₃₇ COOH	C(18:1) Δ ⁹ (cis)	0-0,4

Κήροι

Πρόκειται για εστέρες μακράς αλύσου αλειφατικών αλκοολών (C₂₇-C₃₂). Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε κήρους είναι πολύ μικρή και δεν ξεπερνά τα 35mg/100g. Οι κήροι είναι παρόντες στο δέρμα της ελιάς προλαμβάνοντας από την αφυδάτωση (Jimenez *et al.*, 2001).

Φωσφολιπίδια

Το πρόσφατα παραγόμενο παρθένο ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες φωσφολιποειδών, ενώ το πεπαλαιωμένο ελαιόλαδο περιέχει πολύ μικρότερες. Μερικά φωσφολιποειδή που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η φωσφατιδυλοινωσιτόλη (De la Lastra *et al.*, 2001, Owen *et al.*, 2004).

Στερόλες

Οι στερόλες βρίσκονται στο ελαιόλαδο σε συγκέντρωση 1800-4939 mg/ kg (Mulinacci *et al.*, 2005). Πρόκειται για τετρακυκλικές ενώσεις που βιοσυντίθενται από το σκουαλένιο και απαντούν είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε εστεροποιημένες με λιπαρά οξέα. Οι κυριότερες στερόλες στο ελαιόλαδο είναι η β-σιτοστερόλη, η Δ-5-αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη. Σε μικρότερες ποσότητες απαντώνται και η χοληστερόλη, στιγμαστερόλη, 24-μεθυλενοχοληστερόλη κ.α. (De la Lastra *et al.*, 2001, Perona *et al.*, 2006). Οι τριτερπενικές διαλκοόλες, κυρίως η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη, απαντώνται επίσης στο ελαιόλαδο σε συγκέντρωση 1-20 mg/100g ελαίου (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2001). Το ποσοστό των

στερολών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της προέλευσης και της καθαρότητας του ελαιολάδου.

Υδρογονάνθρακες

Οι υδρογονάνθρακες αποτελούν το 30-50% του μη σαπωνοποιήσιμου κλάσματος του ελαιολάδου. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται το σκουαλένιο και τα καροτενοειδή. Το σκουαλένιο, είναι πρόδρομο μόριο των στερολών και η συγκέντρωσή του στο ελαιόλαδο (2500-9200 μg/g) είναι πολύ μεγαλύτερη έναντι άλλων φυτικών ελαίων. Τα καροτενοειδή με συγκέντρωση 0,5-1mg/100g ελαιολάδου, αποτελούνται από λουτεΐνη, β-καροτένιο και αρκετές ξανθίνες (De la Lastra *et al.*, 2001). Τα πιο σημαντικά καροτενοειδή του ελαιολάδου είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, υπεύθυνα για το χρώμα του ελαίου.

Τοκοφερόλες

Κύρια τοκοφερόλη στο ελαιόλαδο είναι η α-τοκοερόλη σε συγκέντρωση 52-87%, ενώ οι β- και γ- τοκοφερόλες απαντώνται σε μικρότερες ποσότητες της τάξης του 15-20% και 7-23% αντίστοιχα (De la Lastra *et al.*, 2001, Perona *et al.*, 2006).

Τερπενικές αλκοόλες

Οι τερπενικές αλκοόλες αποτελούν το 20-26% του κλάσματος των υδατανθράκων, στο ελαιόλαδο. Από αυτό έχουν απομονωθεί δύο άκυλα διτερπενοειδή: η φυτόλη και η γερανυλογερανιόλη (Boskou, 1996). Η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη, δύο σημαντικά διυδροξύ-τερπένια, παρέχουν πληροφορίες για την αναγνώριση των ακάθαρτων ελαίων (Κυριτσάκης, 1987).

Χρωστικές ουσίες

Στο ελαιόλαδο απαντούν δύο τάξεις φυσικών χρωστικών: (α) οι χλωροφύλλες και οι φαιοφυτίνες, και (β) τα καροτενοειδή (De la Lastra *et al.*, 2001). Οι α και β χλωροφύλλες καθώς και τα προϊόντα οξείδωσης τους υπάρχουν φυσικά στο ελαιόλαδο και είναι υπεύθυνα για το πρασινωπό χρώμα των ελαίων.

Λιπαρές αλκοόλες

Στο ελαιόλαδο απαντώνται κορεσμένες, αλειφατικές αλυσίδες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα (C₁₈-C₂₈). Οι κυριότερες λιπαρές αλκοόλες είναι η εξακοσανόλη, η οκτακοσανόλη και η τετρακοσανόλη (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2001). Το συνολικό ποσό των ενώσεων αυτών είναι περίπου 60-200 mg/ kg (Ranalli *et al.*, 1999).

Πτητικά συστατικά

Οι πτητικές ενώσεις παραμένουν στο παρθένο ελαιόλαδο κατά τη διάρκεια της μηχανικής διαδικασίας εξαγωγής του. Τονώνουν τους οσφρητικούς υποδοχείς και είναι υπεύθυνες για το συνολικό άρωμα του παρθένου ελαιολάδου (Angerosa *et al.*, 2004). Η ιδιότητα αυτή του ελαιολάδου, οφείλεται στην παρουσία πτητικών συστατικών σε πολύ μικρές ποσότητες, τα οποία ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του ελαιοκάρπου, το κλίμα της περιοχής που καλλιεργείται και την ποιότητα του ελαιολάδου (Alarcon de la Lastra *et al.*, 2001). Πολλές ενώσεις, κυρίως, καρβονυλικές ενώσεις, αλκοόλες, εστέρες και υδρογονάνθρακες έχουν αναγνωριστεί στα πτητικά κλάσματα του παρθένου ελαιολάδου.

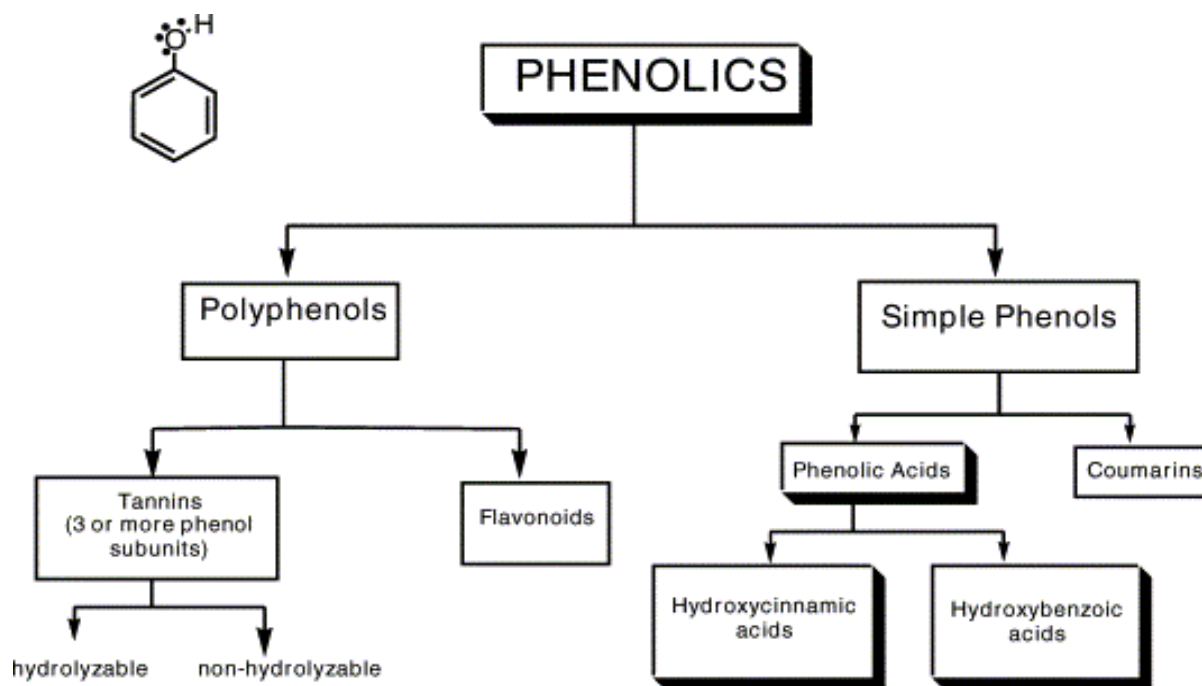
Φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά παρότι αποτελούν μικροσυστατικά του ελαιολάδου, προσδίδουν σε αυτό τις χαρακτηριστικές οργανοληπτικές του ιδιότητες. Βέβαια, οι προστατευτικές τους ιδιότητες όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, αποδεικνύοντας ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων. Σε επόμενο κεφάλαιο αναφέρονται εκτενέστερα η χημική δομή και οι ιδιότητες τους.

1.2.3 Δομή και κατηγορίες των φαινολικών συστατικών

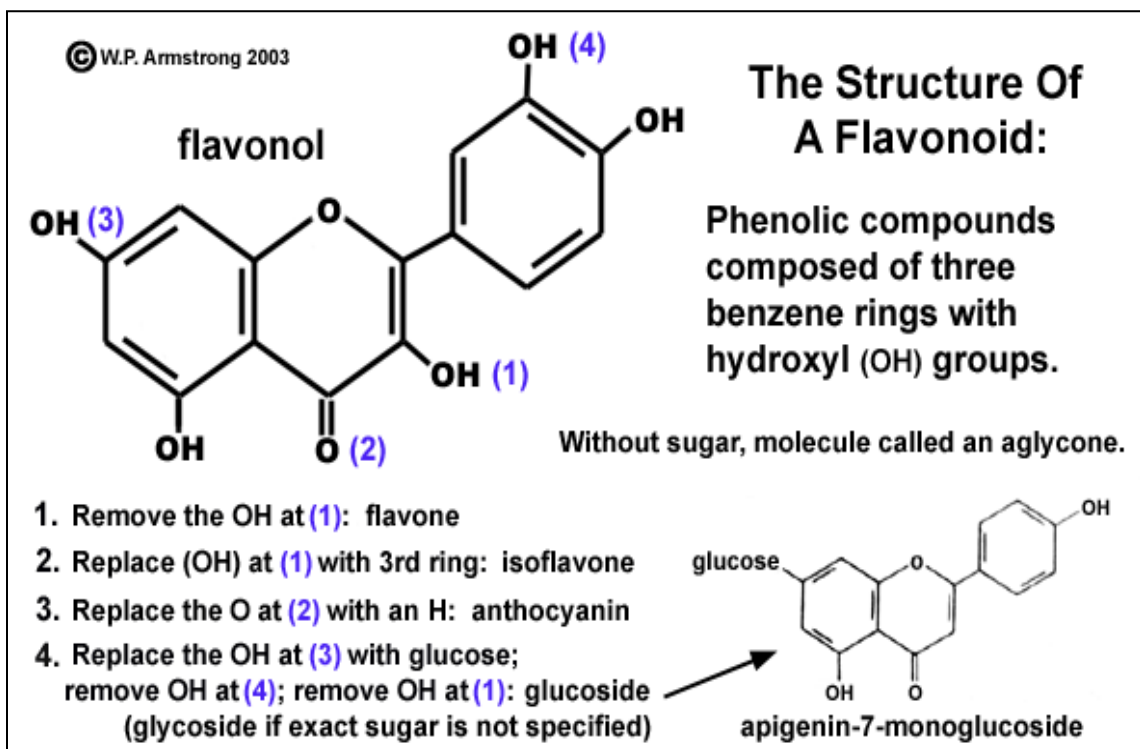
Με τον όρο φαινολικές ενώσεις ή φαινολικά συστατικά χαρακτηρίζεται μια κατηγορία χημικών ενώσεων, που αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο ο οποίος περιέχει ένα ή περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίων (Morton *et al.*, 2000). Δεδομένου ότι ο ορισμός αυτός συμπεριλαμβάνει και τις τερπενοειδείς ενώσεις, είναι προτιμότερος ένας ορισμός που βασίζεται στη μεταβολική προέλευση. Σύμφωνα με αυτήν, μαζί με τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και βρίσκονται εντός αυτών ελεύθερα, ή ενωμένα με μόρια γλυκόζης ή άλλα σάκχαρα (γλυκοζίτες ή γλυκοσίδες), ενώ πολλές περιλαμβάνουν αμίνες, οργανικά οξέα, λιπίδια και άλλα συστατικά (Zern, Fernandez, 2005). Φαινολικές ενώσεις θεωρούνται εκείνες, που προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου και βασικός τους ρόλος είναι η προστασία των φυτών από το φωτοσυνθετικό και το περιβαλλοντικό στρες (Morton *et al.*, 2000, Cirico *et al.*, 2005). Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, βασικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τη φαινυλαλανίνη, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος, από το γενικό βιοσυνθετικό μονοπάτι του φαινυλοπροπανίου και το ειδικό μονοπάτι σύνθεσης των φλαβονοειδών (Duthie *et al.*, 2000).

Ένας τρόπος κατηγοριοποίησης των φαινολικών ενώσεων, είναι ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν. Όπως δείχνει το σχήμα 1.1 οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε απλές φαινόλες, όταν έχουν έναν φαινολικό δακτύλιο και σε πολυφαινόλες όταν έχουν δύο ή περισσότερους. Στις απλές φαινόλες ανήκουν τα φαινολικά οξέα και οι κουμαρίνες, ενώ στις πολυφαινόλες τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες (Robins, 2003).



Σχήμα 1.1 Κατηγορίες φαινολικών συστατικών

Μία εκ των σημαντικότερων κατηγοριών των φαινολικών ενώσεων είναι τα φλαβονοειδή. Η χημική δομή των φλαβονοειδών στηρίζεται στην ύπαρξη του φλαβονικού σκελετού, ο οποίος αποτελείται από ένα αρωματικό δακτύλιο Α (Σχ. 1.2), ένα αρωματικό δακτύλιο Β (Σχ. 1.2) και από ένα κεντρικό ετεροδακτύλιο, ο οποίος φέρει οξυγόνο. Ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου, μπορούν να διακριθούν αρκετές ομάδες των φλαβονοειδών, όπως οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι φλαβονόλες, οι 3-φλαβονόλες, οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανιδίνες. Κάθε ομάδα αποτελείται από πολλές ενώσεις, οι οποίες διαφέρουν η μία από την άλλη, ως προς τους υποκαταστάτες του σκελετού και ιδιαίτερα τους υποκαταστάτες του Β δακτυλίου (Morton *et al.*, 2000, Duthie *et al.*, 2000).



Σχήμα 1.2. Δομή φλαβονοειδών

Οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και βρίσκονται σε αφθονία στην επιδερμίδα πολλών φρούτων, όπως τα μήλα, τα αχλάδια, τα ροδάκινα κ.α, σε λαχανικά, όπως το κρεμμύδι και το σπανάκι, στο πράσινο και το μαύρο τσάι, στο κόκκινο κρασί, στο κακάο και στη σοκολάτα (Morton *et al.*, 2000). Η περιεκτικότητα των διαφόρων φυτικών τροφίμων σε πολυφαινόλες, εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως το είδος, η ποικιλία, η έκθεση στο φως, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Duthie *et al.*, 2000).

1.2.3.1 Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου

Οι ευεργετικές ιδιότητες του παρθένου ελαιολάδου αποδόθηκαν στην υψηλή αναλογία MUFA, όπως το ελαϊκό οξύ το οποίο αντιπροσωπεύει το 70-80% των λιπαρών οξέων του παρθένου ελαιολάδου (Tripoli *et al.*, 2005). Επιπλέον, διαφορετικά είδη λαδιών (ηλιέλαιο, σογιέλαιο, κραμβέλαιο) πλούσια σε MUFA έχουν αποδειχθεί αναποτελεσματικά στο να μεταβάλλουν ευεργετικά παράγοντες κινδύνου χρόνιων νοσημάτων (Aquilera *et al.*, 2004, Harper *et al.*, 2006). Εκτός όμως από τα MUFA, το παρθένο ελαιόλαδο περιέχει ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό φαινολικών συστατικών, που τα άλλα έλαια δεν το περιέχουν. Το φαινολικό κλάσμα του παρθένου ελαιολάδου, έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά τις ιδιότητές του στην υγεία. Μεταγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, έχουν θετικά αποτελέσματα σε διάφορες παραμέτρους, πιθανώς μειώνοντας τον

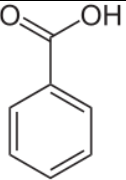
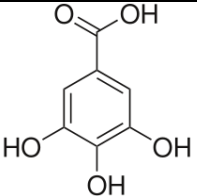
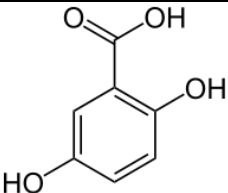
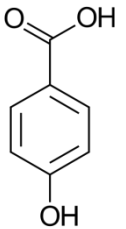
κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων (Martin-Moreno *et al.*, 1994, Visioli and Galli, 1995, Nicolaiew *et al.*, 1998, Stark and Madar, 2002, Visioli and Galli, 2002, Carluccio *et al.*, 2003, Psaltopoulou *et al.*, 2004, Boskou *et al.*, 2006, Covas *et al.*, 2006b). Η μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών ενισχύει την παραπάνω υπόθεση (Bai *et al.*, 1998, Visioli *et al.*, 2000a, Visioli *et al.*, 2000b, Miro Casas *et al.*, 2001, Tuck *et al.*, 2001, Tuck and Hayball, 2002, Vissers *et al.*, 2002, Miro-Casas *et al.*, 2003).

Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών παρουσιάζει διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών παρθένων ελαιολάδων (Gimeno *et al.* 2002). Οι διακυμάνσεις οφείλονται σε μια σειρά παραγόντων που περιλαμβάνουν: την ποικιλία των ελαιοκάρπων (Bruni *et al.*, 1994; Caravaca *et al.*, 2005, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2004, Cerretani *et al.*, 2005, Esti *et al.*, 1998, Franconi *et al.*, 2006, Gomez-Alonzo *et al.*, 2002, Sivakumar *et al.*, 2005, Vinha *et al.*, 2005), την περιφέρεια που καλλιεργείται (Vinha *et al.*, 2005), τις γεωργικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται (Bruni *et al.*, 1994, Romero *et al.*, 2002, Gomez-Rico *et al.*, 2006), την ωριμότητα του καρπού κατά τη συγκομιδή (Esti *et al.*, 1998, Brenes *et al.*, 1999, Tovar *et al.*, 2001, Gimeno *et al.*, 2002a, Kalua *et al.*, 2005, Sivakumar *et al.*, 2005, Gomez-Rico *et al.*, 2006), τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για εξαγωγή, επεξεργασία και αποθήκευση (Ranalli *et al.*, 1999, Brenes *et al.*, 2001, Di Giovacchino *et al.*, 2002, Rastrelli *et al.*, 2002, Okogeri and Tasioula-Margari, 2002, Gimeno *et al.*, 2002a, Gutierrez and Fernandez, 2002, Mailer and Ayton, 2004, Cerretani *et al.*, 2005, Fregapane *et al.*, 2006, Kalua *et al.*, 2006). Η συγκέντρωση του πολυφαινολικού κλάσματος ανέρχεται σε τιμές άνω των 800 mg/L και εξαρτάται από το κλίμα, το βαθμό ωρίμανσης των καρπών και τη μεταχείρισή τους (Tsimidou *et al.*, 1992). Συνήθως μειώνεται με την υπερωρίμανση των καρπών, αν και υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις στον κανόνα αυτό. Για παράδειγμα οι ελιές που παράγονται στα θερμότερα κλίματα και παρά την ταχύτερη ωρίμανση, τα έλαια που αποδίδουν είναι πιο πλούσια σε φαινόλες. Από την άλλη πλευρά, καρποί που έχουν συλλεχθεί με το χέρι, την κατάλληλη στιγμή, που φέρονται αμέσως σε ελαιοτριβεία, υποβάλλονται αμέσως σε επεξεργασία, συνθλίβονται και πιέζονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 25-30 °C, αποδίδουν υψηλής ποιότητας λάδι επίσης πλούσιο σε φαινολικά συστατικά. Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου, που αποτελούν το «πολικό κλάσμα» του, εμποδίζουν την αυτοοξειδωσή του, είναι υπεύθυνες για την εξαιρετική θερμική σταθερότητά του και συνεισφέρουν στο χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση. Οι κυριότερες είναι: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ολεωρωπαΐνη και τα πρωτοκατεχικό, γαλλικό, βανιλικό, π-υδροξυ-βενζοϊκό, συρινγγικό, 4-υδροξυ-φαινυλ-οξικό, ομαβανιλικό, κινναμικό, ο-κουμαρικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξέα.

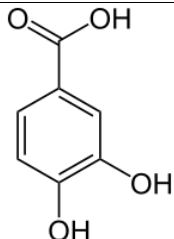
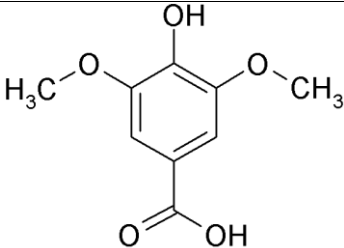
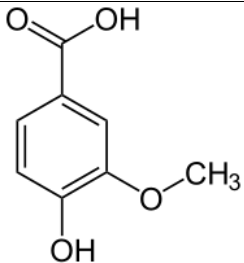
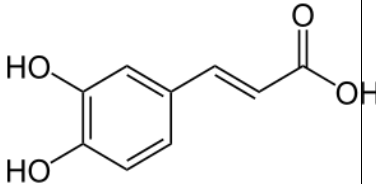
Υπάρχουν τουλάχιστον 36 δομικά διαφορετικά φαινολικά συστατικά που έχουν αναγνωριστεί (πίνακας 1.2). Αυτά μπορούν να ομαδοποιηθούν, σύμφωνα με τη χημική τους δομή στις εξής κατηγορίες (Cicerale *et al.*, 2009):

- *Φαινολικά οξέα*: οι ενώσεις αυτές μπορούν να διαιρεθούν σε 3 υποομάδες: α) παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, β) παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, γ) άλλα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους. Τα φαινολικά οξέα έχουν τη βασική δομή C6-C1 για το βενζοϊκό οξύ και C6-C3 για το κινναμικό οξύ (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005).
- *Φαινολικές αλκοόλες*: οι ενώσεις αυτές διαθέτουν μια υδροξυλική ομάδα στον αρωματικό υδρογονάνθρακα.
- *Σεκοριδοειδή*: η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία ελενολενικού οξέος ή παράγωγά του στη μοριακή τους δομή (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005). Τα πιο σημαντικά που απαντούν στο παρθένο ελαιόλαδο είναι διαλδεϋδικές μορφές δέκα ατόμων άνθρακα-μεθυλο-ελενολενικού οξέος συνδεδεμένο με υδροξυτυροσόλη, με τυροσόλη, ολεωρωπαΐνη με την άγλυκη μορφή της, aglycon ligstroside, ολεωρωπαΐνη, διαλδεϋδική άγλυκη ολεωρωπαΐνη, διαλδεϋδική άγλυκη ligstroside. Τα σεκοριδοειδή με τις λιγνάνες είναι τα πιο άφθονα φαινολικά του παρθένου ελαιολάδου.
- *Υδροξυ-ισοχρωμάνες*: αυτά τα φαινολικά είναι παράγωγα του 3,4-διυδρο-1-βενζοπυρένιου. Είναι φυσικά συστατικά που περιέχουν σύμπλοκο δακτυλίων (Bianco *et al.*, 2001).
- *Φλαβονοειδή*: περιέχουν 2 βενζοϊκούς δακτυλίους, ενωμένους με 1 γραμμική αλυσίδα με 3 άνθρακες. Μπορούν να διακριθούν σε φλαβόνες και φλαβονόλες.
- *Λιγνάνες*: η ακριβής δομή αυτού του τύπου των φαινολικών, δεν είναι απόλυτα ακριβής, αλλά βασίζεται στη συμπίκνωση των αρωματικών αλδεϋδων (Coultrate, 2002).

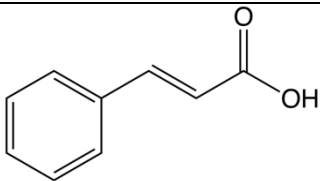
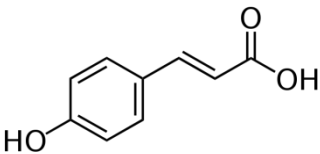
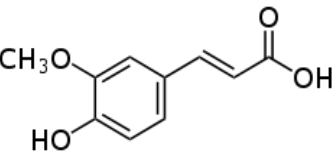
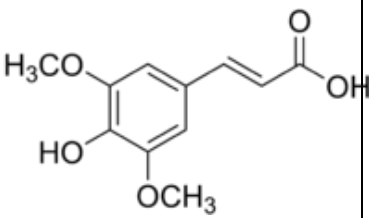
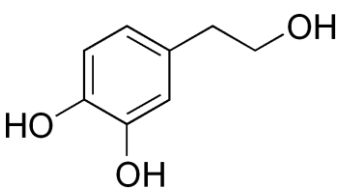
Πίνακας 1.2 Συγκεντρώσεις των διαφορετικών φαινολικών συστατικών που απαντούν στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο

Συστατικό	Δομή	Ποσότητα σε EVOO/VOO (mg/kg)	Ποσότητα σε ραφινρισμένο ελαιολάδου (mg/kg)	Βιβλιογραφική αναφορά
Βενζοϊκό οξύ		-	-	Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2005
Γαλλικό οξύ		0,1-1,4	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004; Coni <i>et al.</i> , 2000
Γεντιστικό οξύ		0,3-1,5	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ		ΔΑ	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004

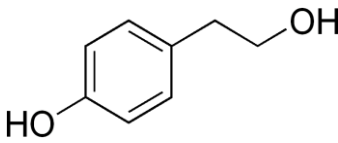
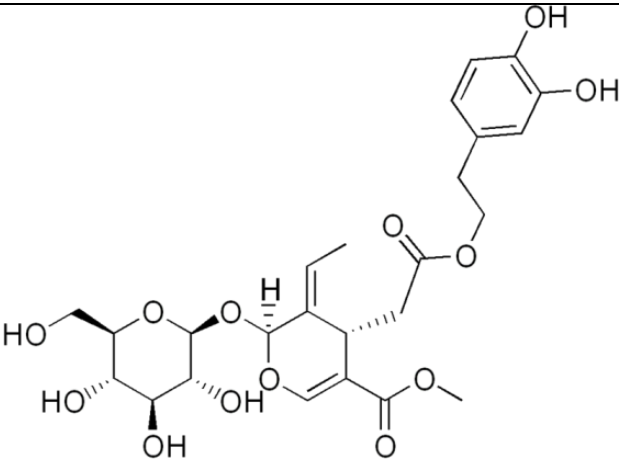
Πίνακας 1.2 Συνέχεια

Συστατικό	Δομή	Ποσότητα σε EVOO/VOO (mg/kg)	Ποσότητα σε ραφινάρισμένο ελαιολάδου (mg/kg)	Βιβλιογραφική αναφορά
Πρωτοκατεχικό οξύ		0,03-1,8	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004, Coni <i>et al.</i> , 2000
Συρινγικό οξύ		-	-	Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2005
Βανιλικό οξύ		0,2-0,4	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004, De Stefano <i>et al.</i> , 1999
Καφεϊκό οξύ		ΔΑ, 0,04-0,2	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004; Coni <i>et al.</i> , 2000; De Stefano <i>et al.</i> , 1999

Πίνακας 1.2 Συνέχεια

Συστατικό	Δομή	Ποσότητα σε EVOO/VOO (mg/kg)	Ποσότητα σε ραφινάρισμένο ελαιολάδου (mg/kg)	Βιβλιογραφική αναφορά
Κινναμικό οξύ		-	-	Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2005
p- Κουμαρικό οξύ		ΔΑ, 0,1-0,4	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004; Coni <i>et al.</i> , 2000
Φερουλικό οξύ		0,02-0,4	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004, Coni <i>et al.</i> , 2000, Gomez-Alonzo <i>et al.</i> , 2002
Σιναπικό οξύ		0,4	-	Carrasco Pancorbo <i>et al.</i> , 2004
Υδροξυτυροσόλη		0,5-14,4	1,7	Owen <i>et al.</i> , 2000a, Selvaggini <i>et al.</i> , 2006, Owen <i>et al.</i> , 2000b, Salvini <i>et al.</i> , 2006, Coni <i>et al.</i> , 2000, De Stefano <i>et al.</i> , 1999, Gill <i>et al.</i> , 2005, Gomez-Alonso <i>et al.</i> , 2003, Gomez-Alonzo <i>et al.</i> , 2002

Πίνακας 1.2 Συνέχεια

Τυροσόλη		0,5-14,4	1,7	Fabiani <i>et al.</i> , 2006, Owen <i>et al.</i> , 2000a; Franconi <i>et al.</i> , 2006, Selvaggini <i>et al.</i> , 2006, Caravaca <i>et al.</i> , 2005, Salvini <i>et al.</i> , 2006, Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2006, Coni <i>et al.</i> , 2000, De Stefano <i>et al.</i> , 1999, Gill <i>et al.</i> , 2005
Ολευρωπαΐνη		2,0	-	Coni <i>et al.</i> , 2000)

ΔΑ, δεν ανιχνεύεται. (-) δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία

1.2.3.2 Βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου

Η βιοδιαθεσιμότητα μιας ένωσης αναφέρεται στο βαθμό στον οποίο αυτή εξάγεται από ένα τρόφιμο και απορροφάται από τον οργανισμό (Martini, 2006). Ο βαθμός που θα απορροφηθεί και θα μεταβολιστεί μια πολυφαινόλη, εξαρτάται από παράγοντες όπως η χημική δομή (επηρεάζεται από το βαθμό γλυκοζυλίωση/αλκυλίωσης), η βασική δομή (βενζολικός ή φλαβονοειδικός πυρήνας), η σύζευξη με άλλες πολυφαινόλες, σακχαρα και οξέα, το μοριακό βάρος, ο βαθμός πολυμερισμού και η διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η πλειοψηφία των ερευνών σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου έχει επικεντρωθεί σε τρεις μεγάλες ενώσεις: την υδροξυτυροσόλη, την τυροσόλη και την ολεωρωπαΐνη, ενώ σε γενικές γραμμές τα φαινολικά συστατικά του παρθένου ελαιολάδου έχει αποδειχθεί ότι είναι άμεσα βιοδιαθέσιμα.

Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη απορροφώνται με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Visioli *et al.*, 2000, Caruso *et al.*, 2001). Ο Tuck και οι συνεργάτες του ανέφεραν αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους, όταν χορηγούνται ως διάλυμα ελαιολάδου σε σύγκριση με υδατικό διάλυμα. Οι διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα, οφείλονται στο υψηλό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του παρθένου ελαιολάδου. Αυτή η υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά, μάλλον έχει κάποιο προστατευτικό ρόλο στην κατανομή των φαινολικών συστατικών στο γαστρεντερικό σωλήνα πριν από την απορρόφηση (Tuck *et al.*, 2001).

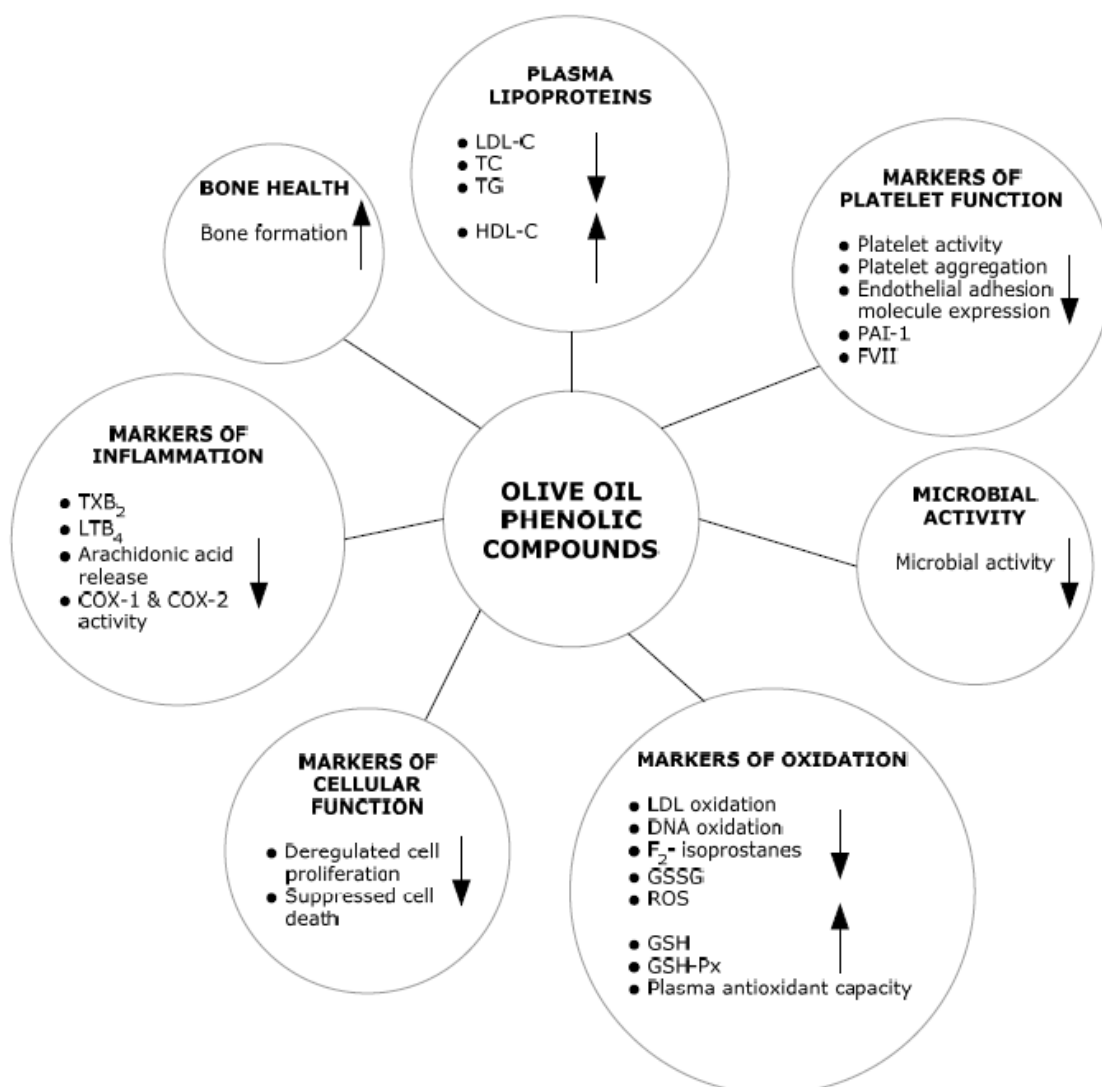
Ο μηχανισμός με τον οποίο απορροφώνται οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου παραμένει ασαφής. Ωστόσο η διαφορετική πολικότητα των διαφόρων ενώσεων, έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση τους (Vissers *et al.*, 2002). Για παράδειγμα, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη είναι πολικές ενώσεις και η απορρόφηση τους επέρχεται μέσω παθητικής διάχυσης (Manna *et al.*, 2000). Η πολική, αλλά μεγαλύτερη ένωση ολεωρωπαΐνη απορροφάται μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού από αυτόν της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Έχει προταθεί, ότι μπορεί να διαχέεται μέσα από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων των μεμβρανών και να απορροφάται μέσω ενός μεταφορέα της γλυκόζης (Edgecombe *et al.*, 2000).

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να εξεταστεί η ποσότητα των φαινολικών συστατικών που απεκκρίνεται. Μια μικρή ποσότητα αυτών των συστατικών στα ούρα, θα έδειχνε ότι οι εν λόγω ενώσεις απορροφώνται εύκολα. Η απέκκριση των φαινολικών κυρίως με τη μορφή υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, καθορίστηκε στο 5-16% (Vissers *et al.*, 2002), ενώ οι Visioli *et al.* ανέφερε την απέκκριση της χορηγηθείσας υδροξυτυροσόλης και

τυροσόλης να είναι μεταξύ 30-60% και 20-22% αντίστοιχα. Οι προαναφερόμενες διαπιστώσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι άνθρωποι απορροφούν μια σημαντική ποσότητα (~40-95%) των διατροφικών φαινολικών ενώσεων από την κατανάλωση ελαιολάδου (Visser *et al.*, 2002).

1.2.3.3 Δράσεις φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντιαλλεργική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιαθηρογόνο και αντιφλεγμονώδη δράση κι οι ιδιότητές τους αυτές μπορεί να φανούν ιδιαίτερα ωφέλιμες στην προστασία έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και μορφών καρκίνου (εικόνα 1.4) (Ovaskainen *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.4 Βιολογικές δράσεις φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Cicerale *et al.*, 2010)

Παρά το γεγονός ότι οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία από την κατανάλωση ελαιολάδου είναι γνωστές, οι βιολογικές δράσεις των φαινολικών του συστατικών έχουν επίσης

διερευνηθεί και επεκτείνονται στην αλληλεπίδραση τους με σημαντικά ενζυμικά συστήματα (εικόνα 1.4). Σε πειραματικές μελέτες (*in vivo* και *in vitro*) οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου έχουν αποδειχθεί ότι μεταβάλλουν ευεργετικά τη σύνθεση των λιπιδίων, των αιμοπεταλίων, την κυτταρική λειτουργία, τη μικροβιακή δραστηριότητα, το σχηματισμό των οστών, τις οξειδωτικές βλάβες και τη φλεγμονή.

Αντιοξειδωτική δράση

Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) οι οποίες συνεχώς σχηματίζονται ως αποτέλεσμα φυσικών μεταβολικών διαδικασιών, μπορούν να οξειδώσουν και να καταστρέψουν τα κυτταρικά μακρομόρια και πιθανόν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη εκφυλιστικών ασθενειών. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι σημαντικά, εξαιτίας του διπλού λειτουργικού τους ρόλου, διότι αποτρέπουν την οξείδωση των τροφίμων και συγκεκριμένα των λιπών, ενώ παράλληλα αυξάνουν το ποσό των αντιοξειδωτικών παραγόντων που έχουν οι οργανισμοί προστατεύοντάς τους έναντι ασθενειών. Τα πιο σημαντικά διαιτητικά αντιοξειδωτικά είναι κυρίως βιταμίνες (ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες, καροτένια) και φαινολικά συστατικά, τα οποία είναι παρόντα σε ποικιλία τροφίμων χαρακτηριστικών της μεσογειακής διατροφής, όπως το ελαιόλαδο (Berra *et al.*, 1995). Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά με πολλούς τρόπους. Στα οξειδωτικά συστήματα, δρουν ως δεσμευτές μετάλλων (Cu, Fe) μέσω της δημιουργίας χηλικών συμπλόκων με τα μεταλλικά ιόντα αποτρέποντας, τη δημιουργία υψηλών συγκεντρώσεων ριζών υδροξυλίου (Halliwell & Gutteridge *et al.*, 1990, Halliwell *et al.*, 1995). Ωστόσο, η σημαντικότερη αντιοξειδωτική τους δράση έγκειται στο γεγονός ότι έχουν την ικανότητα να δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Επιπλέον, αναγεννούν ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού τη βιταμίνη Ε. Ο μηχανισμός δέσμευσης των ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται με δύο τρόπους, πιο συγκεκριμένα μέσω μιας άμεσης διαδικασίας μεταφοράς υδρογόνου και μέσω μιας συζευγμένης μεταφοράς πρωτονίου και ηλεκτρονίου. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των ορθο-διφαινολίων σχετίζονται με την ικανότητα τους να σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλικών ομάδων και των φαινοξυλικών ριζών (Visioli & Galli, 1998b). Παρόμοιες μελέτες που έχουν γίνει στα φλαβονοειδή, έχουν δείξει ότι ο βαθμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας σχετίζεται με τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων (Rice-Evans *et al.*, 1996). Ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων και η θέση τους στο δακτύλιο είναι σημαντική, τόσο για τα φλαβονοειδή όσο και για τις φαινολικές ενώσεις. Όταν οι υποκαταστάτες βρίσκονται στην ορθο- ή στην παρα- θέση σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα, οι ρίζες τους είναι σταθερότερες συγκριτικά με υποκαταστάτες που βρίσκονται σε μετα- θέση (Finotti & Di Majo, 2003). Οι

βιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 1.2.

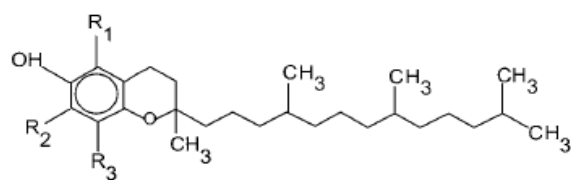
Πίνακας 1.2 Βιολογικές δράσεις φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (Visioli *et al.*, 2002)

Δράσεις φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου
Αναστολή της οξείδωσης της LDL
Αναστολή παραγωγής αποπρωτεϊνών
Αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων
Αναστολή παραγωγής TXB ₂ και LTB ₄ ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα
Εκκαθάριση υπεροξειδίου και άλλων δραστικών μορίων του οξυγόνου
Αναστολή της βλάβης του DNA
Αναστολή της αυξημένης παραγωγής NO
Αναστολή της βακτηριακής δράσης και ανάπτυξης
Κυτταροστατική δράση
Υποτασική δράση
Ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος
Αναστολή της ραγδαίας αύξησης του αριθμού των ουδετεροφίλων του αναπνευστικού
Αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος

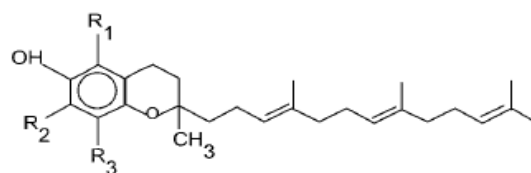
1.3 Βιταμίνη E

1.3.1 Γενικά στοιχεία και δομή

Ο όρος βιταμίνη E περιλαμβάνει τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες, παρουσιάζει τη βιολογική δράση της α-τοκοφερόλης (Morrissey and Sheehy, 1999, Neuzil *et al.*, 2004) και αναφέρεται σε μια οικογένεια συναφών ενώσεων που έχουν υδροξυλιωμένους αρωματικούς δακτύλιους και isoprenoid side chain (Machlin, 1991). Ο αριθμός των ομάδων μεθυλίου και το μοτίβο της μεθυλίωσης διακρίνουν τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες. Η α-τοκοφερόλη και η τοκοτριενόλη έχουν τρεις μεθυλικές ομάδες, η β- και η γ-τοκοφερόλη έχουν δυο μεθυλικές ομάδες και η δ-τοκοφερόλη έχει μια. (Kaempf-Rotzoll *et al.*, 2003). Υπάρχουν 8 ενώσεις βιταμίνης E: α-, β-, γ-, δ-τοκοφερόλη (εικόνα 1.5) και α-, β-, γ-, δ-τοκοτριενόλη. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο διαδεδομένη με τη μεγαλύτερη βιολογική δράση (Machlin, 1991) συγκριτικά με τα άλλα ισομερή (β, γ, δ). Η α-τοκοφερόλη βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος και αποτελεί περίπου το 90-100% της βιταμίνης E που



R ₁	R ₂	R ₂	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocopherol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocopherol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocopherol
H	H	CH ₃	δ-tocopherol



R ₁	R ₂	R ₂	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocotrienol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocotrienol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocotrienol
H	H	CH ₃	δ-tocotrienol

βρίσκεται στους ιστούς (Budowski and Sklan,

1989), ενώ η γ-τοκοφερόλη απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στη διατροφή (Parker, 1989,

Traber *et al.*, 1993).

Εικόνα 1.5 Βασική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών

Αν και όλες αυτές οι μορφές της βιταμίνης E έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σε κάποιο βαθμό ο οργανισμός χρησιμοποιεί κυρίως α-τοκοφερόλη (Arita *et al.*, 1995). Οι τοκοφερόλες μεταφέρονται είτε από λιποπρωτεΐνες, είτε με κάποιες ειδικές δεσμευτικές πρωτεΐνες των λιπιδίων. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη μεταφορέας της α-τοκοφερόλης (α-TTP) δείχνει προτίμηση σε α-τοκοφερόλη έχοντας λιγότερη συγγένεια για μη α-τοκοφερόλης μορφές βιταμίνης E, που θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί το σώμα δείχνει προτίμηση κυρίως σε α-τοκοφερόλη (Hosomi *et al.*, 1997).

1.3.2 Βιολογικός ρόλος

Τα φυτικά έλαια (ηλίανθος, σόγια, καλαμποκέλαιο), τα προϊόντα ολικής αλέσεως, οι ξηροί καρποί και οι σπόροι είναι πλούσιες πηγές βιταμίνης E. Αντιθέτως, τα παράγωγα ζωικών προϊόντων περιέχουν χαμηλές ποσότητες βιταμίνης E. Θεραπευτικές δράσεις της βιταμίνης E σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες δεν έχουν φανεί μέχρι στιγμής, παρόλο αυτά υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν ότι η βιταμίνη E προστατεύει τις μεμβράνες των κυττάρων, εμποδίζοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παρά το γεγονός αυτό, εξακολουθεί να είναι υπό αμφισβήτηση, αν η βιταμίνη E είναι ένας μεγάλος ρυθμιστής διαφόρων βιοχημικών δραστηριοτήτων ή ο ρόλος της περιορίζεται μόνο στην πρόληψη της λιπιδικής υπεροξειδωσης μακριάς αλύσου PUFA που αποτελούν λειτουργικές μονάδες των κυτταρικών μεμβρανών. Τα PUFA είναι σημαντικά για την ακεραιότητα των μεμβρανών και λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια των κυττάρων προς απάντηση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Ο ρόλος της βιταμίνης E στη μείωση του οξειδωτικού στρες προκαλείται από την AFB₁. Η πρόσληψη βιταμίνης E, έχει δείξει να μειώνει την AFB₁, τροποποιώντας τη δραστηριότητα του ηπατικού κυτοχρώματος P-

450 (Cassand *et al.*, 1993). Ο μεταβολισμός της AFB1 μειώνεται από την α-τοκοφερόλη μέσω της μείωσης του σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Ο μηχανισμός αυτός, θα μπορούσε να αποτελεί έναν από τους προστατευτικούς ρόλους της βιταμίνης E (Ibeh & Saxena, 1998). Εντούτοις, έχει αποδειχθεί ότι η βιταμίνη E αυξάνει την ποσότητα και τη δραστηριότητα των βιολογικών δεικτών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες, με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Alpsoy *et al.*, 2009).

Αντιοξειδωτική δράση

Μεταξύ των παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής ενός οργανισμού, είναι τα είδη των ελευθέρων ριζών (FRS) (Serafini *et al.*, 2000). Οι ελεύθερες ρίζες εξαιτίας της υψηλής δυνατότητας να καταστρέφουν τα βιολογικά συστήματα έχουν προταθεί ως παράγοντες που συμβάλλουν στη γήρανση (Sastre *et al.*, 2000). Σύμφωνα με τη θεωρία του Harman οι ελεύθερες ρίζες προάγουν μέσα από αερόβιο μεταβολισμό το οξειδωτικό στρες, με επακόλουθη βλάβη στα κύτταρα οδηγώντας στη γήρανση και τον κυτταρικό θάνατο (Serafini, 2000). Η ιστορία της σχέσης μεταξύ των αντιοξειδωτικών και της ανοσολογίας ξεκίνησε τα πρώτα χρόνια του 20^{ου} αιώνα με μια εκτίμηση ότι η έλλειψη αντιοξειδωτικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει σε νόσο (Bendich, 1992) και ότι τα αντιοξειδωτικά έχουν ανοσοδιεγερτικές δράσεις. (Del Rio *et al.*, 1998). Μια πιθανή αλλαγή στην οξείδωση είναι η αντιοξειδωτική ισορροπία, η οποία μπορεί να συμβάλλει στη μείωση των καρδιαγγειακών, νευρολογικών, μυικών, οπτικών, ανοσοποιητικών λειτουργιών με την πάροδο του χρόνου (Meydani, 2000). Η ισορροπία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, δεδομένου ότι συνθέτουν ROS ως κύριους παράγοντες για τη λειτουργία τους και λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας των μεμβρανών τους σε PUFA και όντας εμπλουτισμένα σε βιταμίνη E είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες. Μια άλλη ιδιότητα της είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-kB, που διεγείρεται από το οξειδωτικό στρες (Bellezo *et al.*, 1998), που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση των ελευθέρων ριζών και των προφλεγμονοδών κυτταροκινών.

1.4 Τα οφέλη της κατανάλωσης ελαιολάδου στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και νοσηρότητας στις βιομηχανικές χώρες. Το ποσοστό επίπτωσης εμφράγματος του μυοκαρδίου παρουσιάζει υψηλή μεταβλητότητα, με χαμηλότερο να αναφέρεται στις Μεσογειακές χώρες της Ευρώπης συγκριτικά με τις Βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες, τις Η.Π.Α ή την Αυστραλία (Tunstall-Pedoe *et al.*, 1999). Παραδόξως, αυτή η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου

εμφανίζεται παρά την υψηλή επικράτηση των κλασικών παραγόντων κινδύνου. Προστατευτικοί παράγοντες όπως η Μεσογειακή Διατροφή, θα μπορούσαν να συμβάλλουν για να εξηγήσουν αυτό το παράδοξο. Παρά το γεγονός ότι ένας υψηλός βαθμός υιοθέτησης της παραδοσιακής Μεσογειακής Διατροφής έχει συσχετισθεί με μείωση της συνολικής θνησιμότητας από καρκίνο, εντυπωσιακά είναι τα οφέλη σχετικά με την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα (Trichopoulou *et al.*, 2003, Knooks *et al.*, 2004, Parikh *et al.*, 2005).

Το ελαιόλαδο αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό τρόφιμο της παραδοσιακής Μεσογειακής Διατροφής και την πιο σημαντική πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA). Τα οφέλη στην υγεία από δίαιτες πλούσιες σε MUFA, όσον αφορά τα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα, είναι τα πρώτα που προκάλεσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στο διατροφικό αυτό μοντέλο.

Το 2004 ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (FDA) απέδωσε στο ελαιόλαδο “ισχυρισμούς υγείας” (health claims) και ορίζει σαφές ότι η κατανάλωση 2 κουταλιών της σούπας (23g/ημέρα) ελαιολάδου, αντί για την ίδια ποσότητα κορεσμένων λιπών είναι ικανή να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, λόγω της μονοακορεστότητας του (US Food and Drug Administration, 2004). Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα στοιχεία αυτά βασίζονται σε 73 κλινικές δοκιμές που διεξάγονται κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, σύμφωνα με τις οποίες η κατανάλωση αυτού του διατροφικού συστατικού διατηρεί τα επίπεδα της HDL και μειώνει αυτά της LDL.

Εκτός από τα οφέλη που απορρέουν από τα λιπίδια του, το ελαιόλαδο έχει και άλλες βιολογικές δράσεις που σχετίζονται με τα MUFA. Ωστόσο πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν μια πληθώρα ιδιοτήτων που σχετίζονται με την κατανάλωση ελαιολάδου και κατά ένα μεγάλο μέρος να οφείλεται στα μικροσυστατικά του. Το τρόφιμο αυτό, βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ, αναστέλλει το προθρομβωτικό περιβάλλον και συμβάλλει στην προστασία του ενδοθηλίου. Μπορεί να τροποποιεί, άμεσα ή έμμεσα, έναν αριθμό παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου και να συμβάλλει στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι όλοι αυτοί οι παράγοντες επιδρούν άμεσα στην ανάπτυξη αθηρωμάτων και μερικοί είναι αλληλένδετοι. Στον πίνακα 1.3 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα οφέλη μιας διατροφής πλούσια σε ελαιόλαδο.

Πίνακας 1.3 Τα οφέλη μιας διατροφής πλούσια σε ελαιόλαδο στους παράγοντες κινδύνου της στεφανιαίας νόσου και άλλων μηχανισμών που σχετίζονται με την αθηρογένεση (Perez-Jimenez *et al.*, 2007)

Επιβεβαιωμένα	Μειώνει τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και αυξάνει τα επίπεδα της HDL όταν αντικαθιστά στη διατροφή τους υδατάνθρακες
	Μειώνει τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης όταν αντικαθιστά στη διατροφή τα κορεσμένα λιπαρά οξέα
	Αυξάνει την αντίσταση της LDL στην οξειδωση
	Βελτιώνει το μεταβολισμό της γλυκόζης στο σακχαρώδη διαβήτη
Πιθανά	Βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου
	Ρυθμίζει τη φλεγμονή που επάγουν οι δίαιτες οι πλούσιες σε κορεσμένα λίπη
	Μειώνει την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων
	Μειώνει την αρτηριακή πίεση και άρα την ανάγκη για αντιυπερτασική θεραπεία
	Επάγει ένα λιγότερο προθρομβωτικό περιβάλλον

Τα μεταγευματικά επίπεδα των τριακυλογλυκερολών είναι μια μεταβολική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από αύξηση των ολικών τριγλυκεριδίων και σωματιδίων πλούσιων σε τριγλυκερίδια. Τα σωματίδια αυτά, συμβάλλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου αυξάνεται με την αύξηση της μεταγευματικής καμπύλης των λιπιδίων (Gaenger *et al.*, 2001). Ένας μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει αυτό, είναι η φλεγμονή που συνοδεύει την κατανάλωση των λιπών, προκαλώντας μια προ-οξειδωτική κατάσταση που ενεργοποιεί τα γονίδια που εμπλέκονται στην αντίδραση της φλεγμονής κατά τη διάρκεια της μεταγευματικής περιόδου (Kreeft *et al.*, 2005). Τα δεδομένα που προκύπτουν από *in vitro* μελέτη, σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων, παρέχουν αποδείξεις που υποστηρίζουν ότι η ενσωμάτωση ελαϊκού οξέος (Carluccio *et al.*, 1999) ή μερικών φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου (όπως υδροξυτυροσόλη και ολευρωπαίνη) (Carluccio *et al.*, 2003) στους πληθυσμούς των κυττάρων μειώνουν τα επίπεδα του αγγελιοφόρου RNA για τα μόρια κυτταρικής συνάφειας VCAM-1, αναστέλλοντας το μεταγραφικό παράγοντα NF-kB.

Τα μεταγευματικά επίπεδα TAG επηρεάζονται επίσης από το είδος του λίπους στη διατροφή (Williams *et al.*, 1998). Τα χυλομικρά που σχηματίζονται μετά από κατανάλωση ελαιολάδου, εισέρχονται στην κυκλοφορία πιο γρήγορα από αυτά που σχηματίζονται από την κατανάλωση κορεσμένων λιπών (Roche *et al.*, 1998). Αυτή η ιδιαιτερότητα δίνει στο ελαιόλαδο ένα λιγότερο αθηρογόνο χαρακτήρα, ακόμα και όταν τα μεταγευματικά επίπεδα TAG είναι παρόμοια από αυτά που προκαλούνται από άλλους τύπους ελαίων.

Επιπλέον, διαφορετικά είδη ελαίων πλούσια σε MUFA μπορούν να οδηγήσουν σε παρόμοια επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος και η μεταγευματική απόκριση να είναι διαφορετική. Ο Abia και οι συνεργάτες του (2001) έδειξε ότι η κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου σε σχέση με HOSO, μειώνει τη μεταγευματική απόκριση των τριγλυκεριδίων. Αυτό αποδεικνύει ότι άλλοι παράγοντες, όπως το λινελαϊκό οξύ ή η θέση κατανομής των λιπαρών οξέων στα τριγλυκερίδια μπορούν να είναι υπεύθυνα για τις μεταβολικές επιδράσεις. Μία άλλη έννοια που μελετάται τα τελευταία χρόνια αφορά στην επίδραση της συνήθους διαίτας στη μεταγευματική απάντηση των λιπιδίων. Έτσι μια δίαιτα πλούσια σε SFA (control) συγκρίθηκε με δύο άλλες που περιείχαν μέτρια ή υψηλά ποσοστά MUFA (Silva *et al.*, 2003). Μετά την παρέμβαση, η δίαιτα που ήταν πλούσια σε MUFA μείωσε την παραγωγή της απολιποπρωτεΐνης B-48, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα χυλομικρά αυξήθηκαν σε μέγεθος με αυτό το λίπος, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν μεγαλύτερα αλλά λιγότερο αθηρωματικά χυλομικρά. Το παραπάνω εύρημα θα μπορούσε να αποτελέσει το κλειδί για την εξήγηση της προστατευτικής δράσης του ελαιολάδου στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Τέλος, η ισοθερμидική υποκατάσταση των υδατανθράκων από MUFA, σε μια δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά, μειώνει τα τριγλυκερίδια του πλάσματος (Mensink *et al.*, 2003). Δεδομένου ότι η επίδραση στα TG, HDL, LDL έχει αποδειχθεί σε κάθε λιπαρό τρόφιμο με αυξημένη περιεκτικότητα σε MUFA ανεξάρτητα από την καταγωγή, η επίδραση των λιπιδίων δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στο ελαιόλαδο αλλά θα πρέπει να ερευνηθεί και σε άλλα έλαια πλούσια σε ελαϊκό οξύ (Thijssen *et al.*, 2005).

Το 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρύλο συνένζυμο Α (HMG CoA), ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της χοληστερόλης, ρυθμίζεται από πληθώρα παραγόντων. Ο Pallottini και οι συνεργάτες του, (2005) ανέφεραν υψηλή συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ROS και της αυξημένης δραστηριότητας της HMG αναγωγάσης σε ήπαρ αρουραίων. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες από παρθένο και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο μπορεί να έχουν μια πρόσθετη επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων, έτσι ώστε να μειώνεται η δραστηριότητα της HMG αναγωγάσης (Benkhalti *et al.*, 2002). Η Govas και οι συνεργάτες του, (2006) ανέφεραν ότι η κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου πλούσιο σε φαινολικά συστατικά για τρεις εβδομάδες αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της HDL. Παρά το γεγονός ότι η μέση αύξηση των επιπέδων της HDL ήταν μικρή (0,99mg/dL), οδήγησε στην υποψία ότι το παρθένο ελαιόλαδο επιδρά στο μεταβολισμό των λιπιδίων με διαφορετικούς μηχανισμούς από αυτούς των λιπαρών του οξέων. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι φαινολικές ενώσεις αυξάνουν τα επίπεδα της HDL, είναι σήμερα ασαφείς. Πιστεύεται, ότι ένας

μηχανισμός μπορεί να σχετίζεται με τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (Facchini *et al.*, 1996).

Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου της στεφανιαίας νόσου που είναι στενά συνδεδεμένος με τη διατροφή είναι η αρτηριακή πίεση. Η ικανότητα του ελαιολάδου να τροποποιεί την αρτηριακή πίεση είναι λιγότερη γνωστή. Μερικές πρόσφατες μελέτες σε υγιή άτομα εξέτασαν σε βάθος τα οφέλη της Μεσογειακής Διατροφής και απέδειξαν μείωση της αρτηριακής πίεσης, όταν συγκρίθηκαν δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα και υψηλής σε κορεσμένα (Mensink *et al.*, 1988 & Salas *et al.*, 1999). Η ευεργετική επίδραση του ελαιολάδου αναφέρθηκε και σε υπερτασικούς ασθενείς, όταν διαπιστώθηκε ότι εκείνοι που ακολουθούσαν μία δίαιτα πλούσια σε PUFA χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θεραπεία για την υπέρταση από εκείνους που κατανάλωναν ελαιόλαδο (Ferrara *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα μια έρευνας σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, έδειξαν ότι η Μεσογειακή Διατροφή συνδέθηκε με μια σημαντική μακροπρόθεσμη μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης του αίματος (Esposito *et al.*, 2004). Αν και το παγκόσμιο μοντέλο της μεσογειακής διατροφής περιλαμβάνει και άλλα συστατικά που είναι ικανά να μειώσουν την αρτηριακή πίεση, το ελαιόλαδο είναι αυτό που συμβάλλει κύρια σε αυτό το ρόλο. Η Psaltopoulou και οι συνεργάτες της, (2004) στη μελέτη EPIC παρατήρησαν ότι η προσήλωση στη μεσογειακή διατροφή σχετίστηκε με χαμηλότερη αρτηριακή πίεση αίματος, με το ελαιόλαδο να αποτελεί σημαντικό ατομικό προγνωστικό δείκτη της επίδρασης αυτής. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι η δράση αυτή δεν είναι απαραίτητως αποτέλεσμα μόνο του ελαϊκού οξέος αλλά και των μικροσυστατικών του παρθένου ελαιολάδου. Το ελαιόλαδο που είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, μειώνει τη συστολική πίεση σε υπερτασικούς ασθενείς με στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με άλλα έλαια που έχουν την ίδια σύσταση (Fito *et al.*, 2005).

Ο διαβήτης τύπου II αποτελεί και αυτός παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Ένα εύρημα που σήμερα θεωρείται «κλασσικό» είναι ότι μια δίαιτα πλούσια σε MUFA (33%) μειώνει τις απαιτήσεις σε ινσουλίνη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II σε σύγκριση με μια άλλη πλούσια σε υδατάνθρακες (Garg *et al.*, 1988). Αρκετές μελέτες φαίνεται να ενισχύουν τα δεδομένα αυτά ενώ σε μια μετα-ανάλυση αναφέρθηκε ότι συγκριτικά με τους υδατάνθρακες τα MUFA βελτιώνουν τόσο το λιπιδαιμικό όσο και το γλυκαιμικό προφίλ (Garg *et al.*, 1998). Αντίθετα σε δείγμα από υγιείς νεαρούς ενήλικες δε διαπιστώθηκαν διαφορές στην ευαισθησία της ινσουλίνης μετά από δίαιτες πλούσιες σε MUFA και άλλες πλούσιες σε υδατάνθρακες (Perez-Jimenez *et al.*, 2001). Ένα άλλο ερώτημα αφορά στην περίπτωση μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Σε ασθενείς με μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, η κατανάλωση υδατανθράκων θα αύξανε την προσφορά γλυκόζης στους ιστούς, αυξάνοντας ταυτόχρονα την

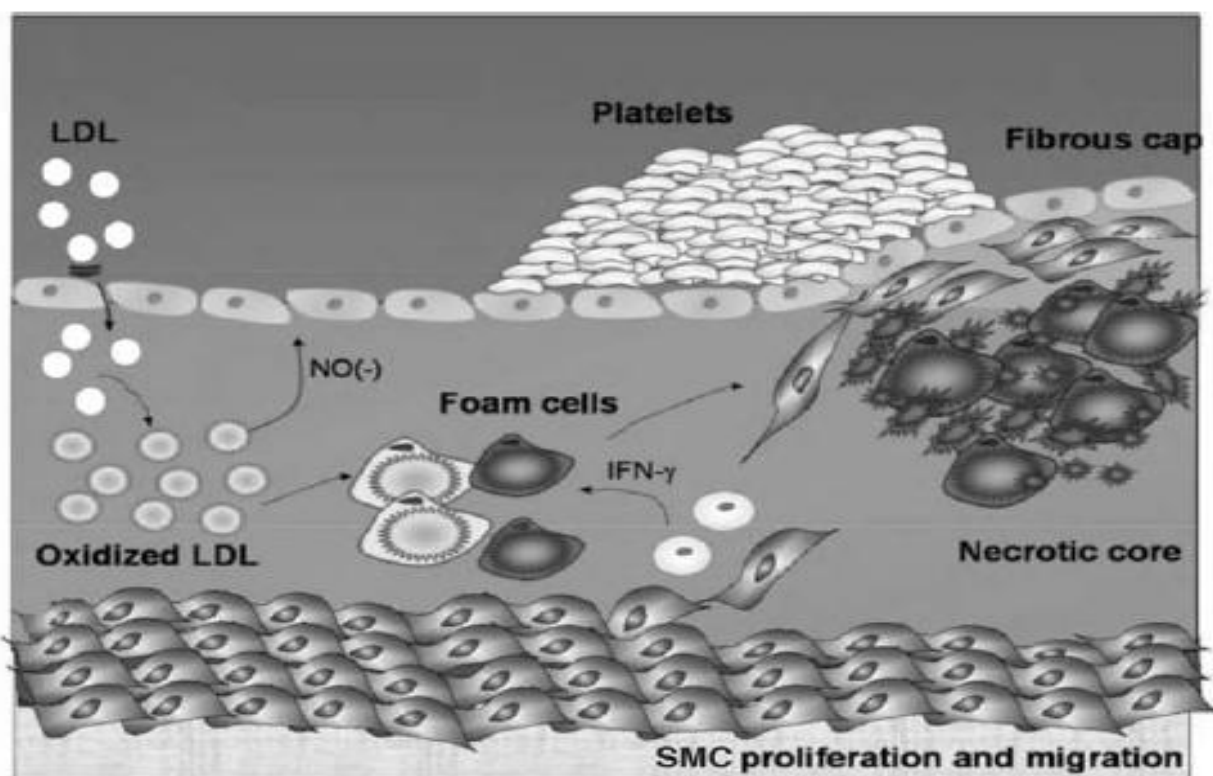
ανάγκη για ινσουλίνη, μια κατάσταση που θα μπορούσε να επιδεινώσει το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Στις περιπτώσεις αυτές η ισοθερμιδική κατανάλωση MUFA φαίνεται να βελτιώνει το μεταβολισμό της γλυκόζης, μειώνοντας την ανάγκη του οργανισμού για ινσουλίνη (Lichtenstein *et al.*, 2000 & Berry *et al.*, 1997). Τέλος, η επίδραση του διαιτητικού λίπους στο μεταβολισμό της γλυκόζης μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό σύνδεσμο μαζί με τις θετικές επιδράσεις του ελαιολάδου στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

1.5 Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών

1.5.1 Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που ξεκινά από την παιδική ηλικία και εξελίσσεται προοδευτικά. Εμφανίζεται σε διάφορα στάδια που περιλαμβάνουν οξειδωτικές, φλεγμονώδεις, πολλαπλασιαστικές, νεκρωτικές και θρομβωτικές διαδικασίες. Λαμβάνει χώρα στο αγγειακό ενδοθήλιο και πιο συγκεκριμένα στην αορτή και στις μικρής διαμέτρου αρτηρίες. Στην πραγματικότητα, η ευαισθησία για την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών στο αορτικό τόξο, είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα τμήματα. Στεφανιαίες, αγγειακές, εγκεφαλικές, πνευμονικές και νεφρικές αρτηρίες είναι ευπαθείς για ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και βασίζονται στη διαπερατότητα των αρτηριακών τοιχωμάτων, στην πίεση του αίματος, στη μεταφορά της LDL και στο μεταβολισμό.

Οι λιποπρωτεΐνες και τα κύτταρα του αίματος προσελκύονται στο ενδοθήλιο που έχει υποστεί βλάβη, όπου η αυξημένη διαπερατότητα ευνοεί την πρόσληψη αυτών των σωματιδίων και των κυττάρων και ξεκινά η ανάπτυξη της νόσου. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβάλλει στην εξέλιξη της πλάκας. Τα τροποποιημένα λιπίδια φαγοκυτταρώνονται και οδηγούν στο σχηματισμό αφρώδων κυττάρων και ραβδώσεων. Το επόμενο βήμα είναι ο πολλαπλασιασμός των λείων μυικών κυττάρων στον έσω χιτώνα, δημιουργώντας ινώδεις πλάκες, που ονομάζονται αθηρώματα. Τα αφρώδη κύτταρα, τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυικά κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί, εκκρίνουν μεταβολικά προϊόντα προκαλώντας προηγμένες βλάβες, όπου η φλεγμονή, η ασβεστοποίηση, η νέκρωση και οι θρομβωτικές διαδικασίες μπορούν να οδηγήσουν σε θανατηφόρες και μη θανατηφόρες συνέπειες (εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6 Δημιουργία αφρώδων κυττάρων και ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Η LDL προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα. Η έκφραση των υποδοχέων αυτών διαμεσολαβείται από κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α). Η ινώδης πλάκα σχηματίζεται. Χαρακτηρίζεται από μια αυξανόμενη μάζα των εξωκυττάρων λιπιδίων και η συσσώρευση SMC. Κυτοκίνες και παράγοντες αύξησης εκκρίνονται από τα μακροφάγα και τα T κύτταρα και είναι σημαντικά για τη μετανάστευση και τη διασπορά των SMC.

1.5.2 Λιπιδαιμικό προφίλ του πλάσματος στην καρδιαγγειακή νόσο

Οι εξισώσεις για τη χοληστερόλη του πλάσματος αναπτύχθηκαν στα μέσα του 1960 από τον Keys και Hegsted από δεδομένα που συλλέχθηκαν από ελεγχόμενες μελέτες διατροφής και έδειξαν ότι η κατανάλωση MUFA δεν επηρεάζει τα ολικά επίπεδα χοληστερόλης, αλλά η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων τα αυξάνει. Η κατανάλωση PUFA μειώνει την ολική χοληστερόλη στο μισό από αυτό που την αυξάνουν τα SFA.

Πολλές πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν το εύρημα αυτό, παρόλο αυτά υπάρχουν μερικά δεδομένα που δείχνουν ότι η κατανάλωση MUFA μειώνει την LDL και αυξάνει την HDL περισσότερο από τα PUFA (Howard *et al.*, 1995 & Mensink *et al.*, 1992). Τα αποτελέσματα από μια μετα-ανάλυση, αντικατάστασης των SFA από έλαια πλούσια σε MUFA και από άλλα πλούσια σε PUFA, ήταν παρόμοια όσον αφορούσαν την ολική χοληστερόλη, τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) και τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), ενώ τα έλαια που ήταν πλούσια σε PUFA έδειξαν μια ελαφριά μείωση των τριγλυκεριδίων (Gardner

et al., 1995). Έτσι η υπερχοληστερολαιμική επίδραση της αντικατάστασης SFA είτε από MUFA είτε από PUFA είναι συγκρίσιμη. Θα πρέπει να τονιστεί ότι όταν συγκρίνονται τα MUFA με τα PUFA είναι να σημαντικό να γίνεται η διάκριση μεταξύ ω -3 και ω -6 πολυακόρεστων. Η κατανάλωση ω -3 PUFA μειώνει τη συνολική θνησιμότητα που προκαλείται από έμφραγμα μυοκαρδίου (Bucher *et al.*, 2002). Είναι πιθανό ότι τα ω -3 δρουν μέσω διαφόρων μηχανισμών προστατεύοντας την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Έχουν αντιθρομβωτικές και αντιαθηρωματικές δράσεις, μειώνουν τη διείσδυση των μακροφάγων στο ενδοαγγειακό τοίχωμα καθώς και την προαθηρογόνο έκκριση των αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα (Harper *et al.*, 2001 & Demaison *et al.*, 2002).

Η συζήτηση επικεντρώνεται στο ποιο είναι το ιδανικό θερμιδικό υποκατάστατο των SFA: οι υδατάνθρακες ή τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα τα μονοακόρεστα. Δύο διαφορετικές μελέτες ανέφεραν παρόμοια συνολική μείωση της χοληστερόλης τόσο σε μια δίαιτα πλούσια σε MUFA και χαμηλή σε SFA, όσο και σε μια μειωμένης περιεκτικότητας σε λιπαρά και αυξημένης σε υδατάνθρακες (Grundy *et al.*, 1986 & Mensink *et al.*, 1987).

Η μεταγευματική λιπαιμία έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης καθώς σχετίζεται με αλλαγές στην οξείδωση (Roche *et al.*, 2000). Τόσο η ποσότητα όσο και το είδος του λίπους επηρεάζουν τα μεταγευματικά επίπεδα TAG. Η πρόσληψη παρθένου ελαιολάδου έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερα μεταγευματικά TRL και ταχύτερη εξαφάνιση των TRL-TG από το αίμα (Abia *et al.*, 2001). Τα χυλομικρά που σχηματίζονται ύστερα από την κατανάλωση ελαιολάδου ή ω -3 πολυακόρεστων, φαίνεται να εισέρχονται στην κυκλοφορία πιο γρήγορα και να απορροφώνται με ταχύτερους ρυθμούς.

1.5.3 Οξείδωση της LDL και οξειδωτική βλάβη

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου (Albertini *et al.*, 2002). Η οξείδωση των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών της LDL οδηγεί σε αλλαγή της λιποπρωτεΐνης με την οποία η LDL είναι πιο εύκολο να εισέλθει στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος και να προωθήσει την αθηρωματική διαδικασία (Witztum *et al.*, 1991).

Οι τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα είτε στο πλάσμα είτε στο εσωτερικό στρώμα της αρτηρίας από τη δράση των κυττάρων που σχετίζονται με τη λιποξυγονάση και τη μυελοϋπεροξειδάση (Martens & Holvoet, 2001) και αφορούν είτε στα λιπίδια, είτε στη δομή των πρωτεϊνών. Προκαλούνται από υδρολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα, ρίζες O, OH, O₂ ή άλλα

μη ενζυμικά μόρια (Kalliora *et al.*, 2006). Οι χημικώς τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας λαμβάνονται από τους υποδοχείς ή δεσμευτές στα μονοκύτταρα/ μακροφάγα, στα κύτταρα του Kupffer και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος της oxLDL στην αθηροσκλήρωση και συνεπώς στη στεφανιαία νόσο είναι πολλαπλός. Η οξειδωμένη LDL:

- επάγει την έκφραση των κυττάρων- μορίων προσκόλλησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (Shimozawa *et al.*, 2004)
- ενισχύει την έκφραση των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μορίων προσκόλλησης (E-σελεκτίνη, ICAM-1, VCAM-1)
- ενισχύει την είσοδο τους στο αγγειακό σύστημα, τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα και την τελική μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα
- ενισχύει τα T- κύτταρα να εκκρίνουν (Kalliora *et al.*, 2006):
 1. IL-1, η οποία αυξάνει τον ομαλό πολλαπλασιασμό των κυττάρων των μυών
 2. IL-2, που ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των T- κυττάρων
 3. IFN, που επάγει την έκφραση MHC στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα.

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν επίσης μια σειρά κυτοκινών που επηρεάζουν την έκφραση των διαμεσολαβητών της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης, όπως το NO. Μέχρι στιγμής η οξειδωμένη LDL είναι περισσότερο επιβλαβής για το αρτηριακό τοίχωμα από τη μη-οξειδωμένη LDL (Navab *et al.*, 1996, Napoli *et al.*, 1997).

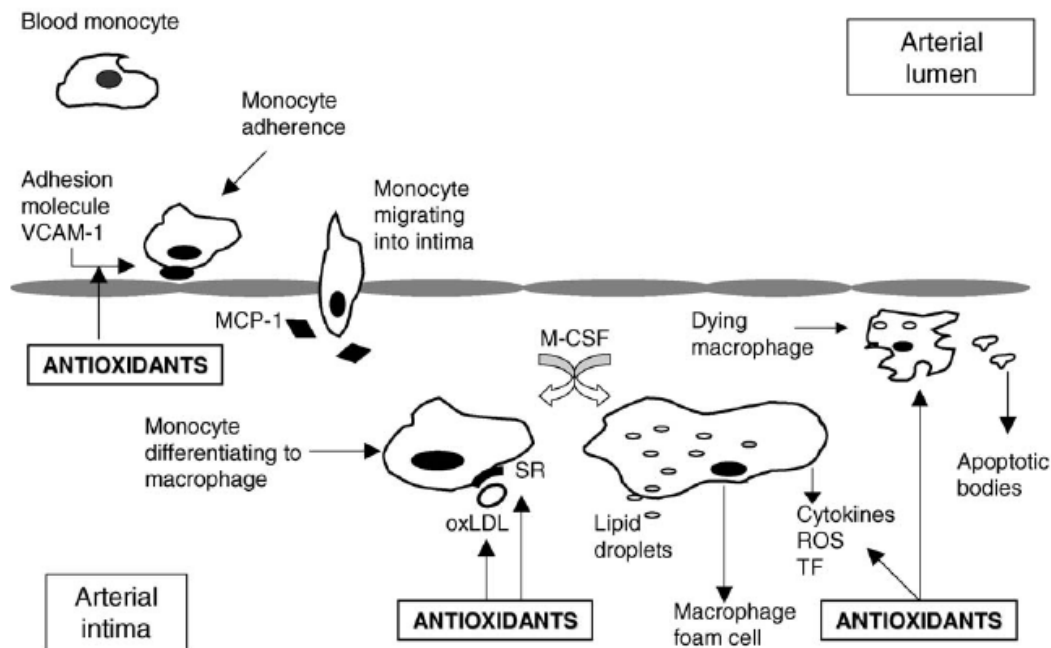
Υψηλές συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας oxLDL συσχετίζονται θετικά με τη σοβαρότητα των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων (Holvoet *et al.*, 2001, Weinbrenner *et al.*, 2003), ανεξάρτητα από το πάχος του έσω χιτώνα των καρωτίδων (Liu *et al.*, 2004) και αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες για στεφανιαία νόσο τόσο σε νοσούντες όσο και στο γενικό πληθυσμό.

Πληθώρα μελετών έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να συγκρίνουν τα αποτελέσματα διαιτών πλούσιες σε MUFA ή PUFA ή υδατάνθρακες, με την ευαισθησία της LDL στην οξείδωση. Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας που σχηματίζονται με την κατανάλωση ελαϊκού οξέος είναι λιγότερο ευαίσθητες στην οξείδωση από αυτές του λινολεϊκού οξέος. Σε σχέση με δίαιτες πλούσιες σε υδατάνθρακες, αυτές με αυξημένη περιεκτικότητα σε MUFA μειώνουν την ευαισθησία της λιποπρωτεΐνης στην οξείδωση.

Στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ελαιολάδου συμμετέχουν επίσης και τα μικροσυστατικά του (εικόνα 1.7). Αν και το σκουαλένιο και τα τερπένια έχουν επιδείξει αντιοξειδωτικές δράσεις σε πειραματικές συνθήκες (Covas *et al.*, 2006), οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών έχουν μελετηθεί εκτενώς. Σε *in vitro* μελέτες οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου όπως και άλλες πολυφαινόλες δείχνουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση κατά της οξείδωσης της LDL (Masella *et al.*, 2004, Fitó *et al.*, 2000). Σε ζωικά μοντέλα τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου απέδειξαν αντιοξειδωτική δράση *in vivo* (Visioli, 2000) και καθυστέρησαν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Το γεγονός ότι τα φαινολικά συστατικά είναι βιοδιαθέσιμα στους ανθρώπους ακόμα και σε δόσεις 25mL (22g/day) (Marrugat *et al.*, 2004), χαμηλότερες από αυτές που αναφέρθηκαν στη Μεσογειακή Διατροφή (30-50g/day), ενισχύουν τον πιθανό προστατευτικό τους ρόλο. Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου έχουν δοσοεξαρτώμενη απορρόφηση και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της κατανάλωσης ελαιολάδου.

Η ευαισθησία της LDL στην οξείδωση δεν εξαρτάται μόνο από την περιεκτικότητα της σε λιπαρά οξέα αλλά και από την περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες (βιταμίνη E, πολυφαινόλες) που συνδέονται με την LDL. Μεταγευματικά το οξειδωτικό στρες συνδέεται με τη μεταγευματική λιπαιμία και υπεργλυκαιμία. Σε δόσεις του ελαιολάδου κατά τις οποίες εμφανίζεται οξειδωτικό στρες (>40ml) τα φαινολικά συστατικά ρυθμίζουν το βαθμό οξείδωσης των λιπιδίων και της LDL. Η *in vivo* οξείδωση των λιπιδίων είναι χαμηλότερη μετά από υψηλή περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο (Covas *et al.*, 2006, Ruano *et al.*, 2005).

Σε πρόσφατη μελέτη, τη EUROLINE study καταδεικνύεται ο αντιοξειδωτικός ρόλος των φαινολικών συστατικών και το γεγονός ότι το ελαιόλαδο είναι κάτι περισσότερο από μια απλή πηγή MUFA (Machowetz *et al.*, 2007, Covas *et al.*, 2006). Στη μελέτη φαίνεται ότι έλαια με διαφορετική περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις επιδρούσαν διαφορετικά στα επίπεδα των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, για τα υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων, η αύξηση της HDL ήταν μεγαλύτερη, η μείωση του λόγου ολική χοληστερόλη/HDL μεγαλύτερη και η οξειδωτική βλάβη του DNA μικρότερη.



Εικόνα 1.7 Αθηρογενετική διαδικασία. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών (Kaliora *et al.*, 2006)

Το μέγεθος των σωματιδίων της LDL σχετίζεται με την οξειδωτική υποβάθμιση των λιποπρωτεϊνών. Περισσότερο επιρρεπείς στην οξείδωση είναι οι μικρές πυκνές LDL που εισέρχονται στο αρτηριακό τοίχωμα πιο εύκολα επιταχύνοντας την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης (Hidaka *et al.*, 2005). Επίσης το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζεται από το διαιτητικό λίπος. Δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα οδηγούν σε μείωση του μεγέθους τους (Krauss *et al.*, 1995). Δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε MUFA που βασίζονται στο ελαιόλαδο αυξάνουν το μέγεθος των σωματιδίων της LDL περισσότερο από μια δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες και αυτά επηρεάζονται από το γονότυπο της apo E (Moreno *et al.*, 2004).

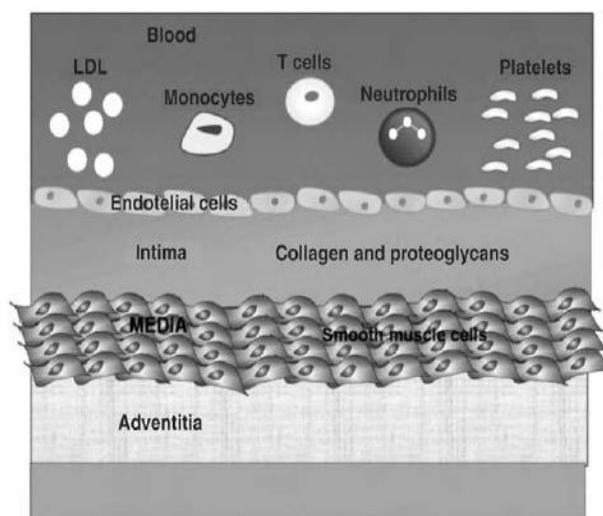
Τέλος, με βάση τα υπάρχοντα ερευνητικά δεδομένα, η ομάδα εμπειρογνομόνων της Διεθνούς Διάσκεψης Ελαιολάδου και Υγείας που πραγματοποιήθηκε στη Jaen της Ισπανίας τον Οκτώβριο του 2004, κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:

- ❖ δεδομένα σχετικά με τα οφέλη των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου στον άνθρωπο, από καθημερινές ημερήσιες ποσότητες αυτού είναι αμφιλεγόμενα
- ❖ η προστατευτική δράση στην οξείδωση των λιπιδίων εμφανίζεται καλύτερα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες
- ❖ τα ευεργετικά αποτελέσματα στην οξείδωση των λιπιδίων εμφανίζονται σε δείκτες που συνδέονται άμεσα με την οξείδωση της LDL

- ❖ προσεκτικά ελεγχόμενες κλινικές μελέτες σε κατάλληλους πληθυσμούς ή σε μεγάλο δείγμα καλούνται να δείξουν σε ποιες συνθήκες τα φαινολικά συστατικά μπορούν να ασκήσουν ευεργετική επίδραση στον έλεγχο του οξειδωτικού στρες.

1.6 Φλεγμονή και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

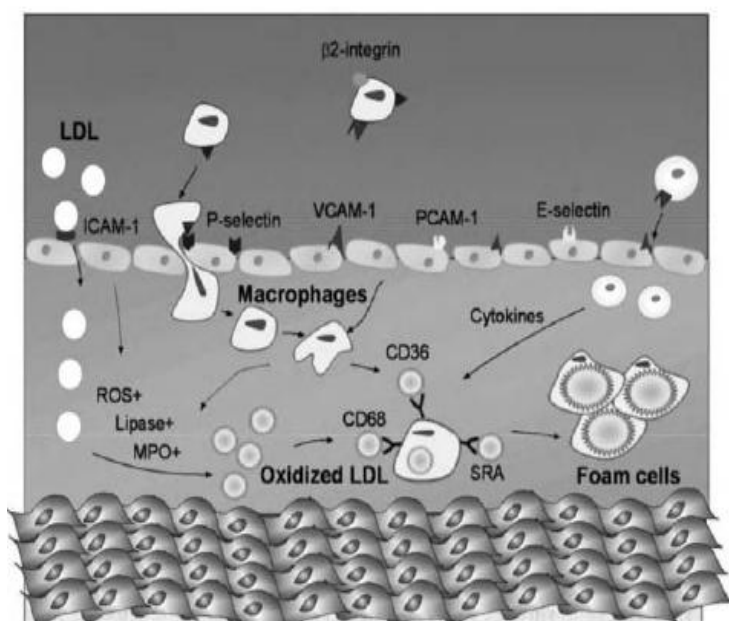
Η αθηροσκλήρωση θεωρείται ότι είναι μια φλεγμονώδης νόσος (Ross, 1999) και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της. Το αγγειακό ενδοθήλιο διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, με την απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών ουσιών, κυρίως NO και προστακυκλίνης, καθώς και αγγειοσυσταλτικών ουσιών όπως θρομβωξάνη B2 (TXB₂), ελεύθερες ρίζες και ενδοθηλίνη. Σε ένα φυσιολογικό ενδοθήλιο (εικόνα 1.8) παράγοντες όπως η μεσολάβηση NO για αγγειοδιαστολή και η εξάλειψη του διαχωρισμού των αιμοπεταλίων,



αναστέλλουν τη φλεγμονή. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση επάγει τη λιπόλυση και ο παράγοντας vWF

δρα ως θρομβολυτικός. Στο ενδοθήλιο η αγγειοσύσπαση, η φλεγμονή, ο πολλαπλασιασμός με τη μεσολάβηση παραγόντων ανάπτυξης, η συσσώρευση αιμοπεταλίων από τα μόρια προσκόλλησης (E-σελεκτίνη) οδηγούν σε δυσλειτουργία και μακροπρόθεσμα σε επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων την αγγειακή αναδιαμόρφωση (Kaliora *et al.*, 2006). Μεταξύ των φλεγμονωδών μεσολαβητών που απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο είναι τα εικοσανοειδή που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ: προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂), λευκοτριένια B₄, παράγοντας ενεργοποίησης ουδετεροφίλων, θρομβοξάνη και PAF (Dogne *et al.*, 2004).

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα είναι κύτταρα που υπάρχουν σε όλα τα αθηροσκληρωτικά στάδια. Εκτός από το να προωθούν την οξείδωση της LDL μέσω της παραγωγής ελυθέρων ριζών, εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IL-1, TNF-α οι οποίες επάγουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνη (Ross, 1999) (εικόνα 1.9). Τα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας προσελκύονται από αυτά τα μόρια, εισέρχονται στο ενδοθήλιο από το οποίο μεταναστεύουν στον υπενδοθηλιακό χώρο. Στο ενδοθήλιο τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, τα οποία με τη σειρά τους δεσμεύουν την οξειδωμένη LDL προς σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, οδηγώντας στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Ως προφλεγμονώδης απάντηση απελευθερώνεται η κύρια αγγελιοφόρος κυτοκίνη IL-6 από τα μακροφάγα, η οποία μετά τη δέσμευσή της στο ήπαρ προάγει την έκκριση της CRP, το σημαντικότερο δείκτη φλεγμονής (Jialal *et al.*, 2001 και 2004). Οι συγκεντρώσεις της IL-6 και CRP στον ορό έχουν αποδειχθεί ότι είναι προάγγελοι της στεφανιαίας νόσου και μαζί με την ICAM-1 έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη της



Εικόνα 1.9 Διαδικασία πυροδότησης. Μεταβολή στο ενδοθήλιο και αυξημένη διαπερατότητα σε μακρομόρια όπως LDL. Η LDL υποβάλλεται σε οξειδωτική τροποποίηση ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με ενεργές ρίζες οξυγόνου και αυξάνει την έκφραση της χημειοτακτικής πρωτεΐνης 1 των μονοκυττάρων (MCP-1) και των μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, ICAM-1, P-σελεκτίνη, E-σελεκτίνη) από το ενδοθήλιο.

αθηροσκλήρωσης. Συγκεκριμένα η μέτρηση της συγκέντρωσης της IL-6 αποτελεί τον καλύτερο δείκτη για την πρόβλεψη της περιφερειακής αθηροσκλήρωσης (Kritchevsky *et al.*, 2005, Tzoulaki *et al.*, 2005).

Πολυάριθμες κλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της διαιτητικής παρέμβασης στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, μεταξύ των οποίων πολλές σχετίζονται με το δυναμικό των αντιοξειδωτικών που προέρχονται από τη διατροφή. Ο βαθμός δυσλειτουργίας σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα οξείδωσης της LDL,

δυσλιπιδαιμία, αύξηση κατά κύριο λόγο της LDL και μείωση της HDL, υπέρταση και διαβήτη. Κάποια ευρήματα δείχνουν ότι τόσο τα κύρια όσο και τα δευτερεύοντα συστατικά του ελαιολάδου μπορούν να κλιμακώσουν τη φλεγμονή και την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου. Σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων το ελαϊκό οξύ ανέστειλε την έκφραση του VCAM-1, την πρόσφυση των μονοκυττάρων και το βασικό μεταγραφικό παράγοντα NF-kB (Massaro *et al.*,

2002). Σε ζωικά μοντέλα μια διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο καταστέλλει τη δραστηριότητα των φυσικών κυττάρων φονέων (Yaqoob *et al.*, 1994) και την έκφραση των υποδοχέων για την IL-2 και την τρανσφερίνη (Yaqoob *et al.*, 1994).

Μελέτες σε ανθρώπους υποστηρίζουν επίσης, την ευεργετική επίδραση της διατροφής πλούσιας σε ελαιόλαδο στη φλεγμονή. Η δέσμευση της LDL στα μονοκύτταρα που προσκολλώνται στο ενδοθηλιακό τοίχωμα, ήταν χαμηλότερη όταν η διατροφή ήταν πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα σε σχέση με τη διατροφή πλούσια σε πολυακόρεστα ή σε κορεσμένα λιπαρά οξέα σε υγιή άτομα (Mata *et al.*, 1996). Ο Yaqoob και οι συνεργάτες του, ανέφεραν μείωση της έκκρισης του ICAM-1 από τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος σε υγιή άτομα που κατανάλωσαν διατροφή πλούσια σε ελαϊκό οξύ για διάστημα 2 μηνών. Επιπλέον, σε μια διετή παρακολούθηση ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο διαπιστώθηκε ότι εκτός από τη βελτίωση του καρδιαγγειακού λιπιδαιμικού προφίλ μια παρέμβαση με Μεσογειακού Τύπου Διατροφή βελτίωσε την ενδοθηλιακή λειτουργία και τα επίπεδα των αγγειακών δεικτών φλεγμονής (Esposito *et al.*, 2004).

Η χαμηλή οξειδωτική ικανότητα του ελαιικού οξέος καθώς και τα μικροσυστατικών του ελαιολάδου φάνηκαν να μειώνουν την ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως του NF-kB μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Thanos *et al.*, 1995). Υπό την έννοια αυτή έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση ενός γεύματος πλούσιο σε ελαιόλαδο δεν ενεργοποιεί τον NF-kB στα μονοκύτταρα, όπως κάνουν δίαιτες πλούσιες σε PUFA και SFA (Bellido *et al.*, 2004).

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το ελαϊκό οξύ δεν είναι το μόνο υπεύθυνο για όλες τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του ελαιολάδου. Τα συστατικά από το ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου (α-τοκοφερόλη, β-σιτοστερόλη, τριτερπένια, φαινολικές ενώσεις) έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Perona *et al.*, 2006). Ένα φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου, η ολεοκανθόλη φαίνεται να έχει παρόμοιες ιδιότητες, καθώς αναστέλλουν την COX-1 και COX-2 (Beauchamp *et al.*, 2005).

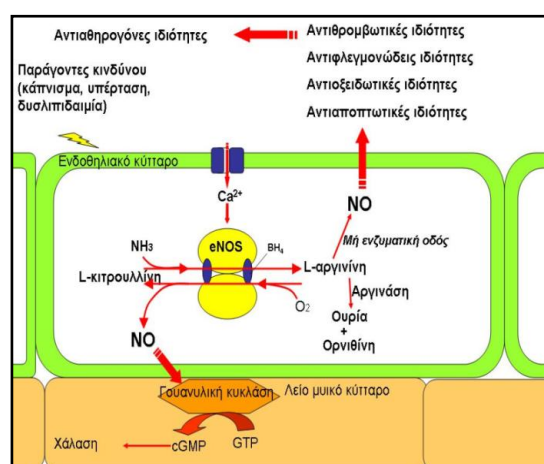
Οι αντιφλεγμονώδεις και καρδιοπροστατευτικές δράσεις του ελαιολάδου και των φαινολικών συστατικών του στον άνθρωπο έχουν εξετασθεί σε σειρά μελετών στις οποίες φαίνεται η ικανότητά τους να μειώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ (Bogani *et al.*, 2007). Αν και τα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δραστηριότητάς τους.

1.7 Αρτηριακή πίεση

Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί σήμερα τον συχνότερο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού και της παχυσαρκίας, η οποία τείνει να πάρει επιδημικές διαστάσεις. Όταν η καρδιά συστέλλεται, το αίμα προωθείται σπρώχνοντας τα τοιχώματα των αρτηριών και υποχρεώνοντάς τες να διασταλούν. Οι αρτηρίες, μικρές ή μεγάλες, αντιστέκονται στη ροή του αίματος. Το μέτρο της καθαρής δύναμης, που στη συστολή της καρδιάς σπρώχνει τα τοιχώματα των αγγείων προς τα έξω, είναι γνωστό ως συστολική αρτηριακή πίεση. Μετά τη συστολή η καρδιά χαλαρώνει και τα τοιχώματα των αγγείων επανακάμπτονται. Μια μέτρηση εκείνη τη στιγμή αντιπροσωπεύει τη διαστολική αρτηριακή πίεση.

Μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους έδειξαν ότι η αντικατάσταση των κορεσμένων με μονοακόρεστα λιπαρά οξέα στη διαίτα, οδήγησε σε μείωση της αρτηριακής πίεσης σε άνδρες και γυναίκες. Επιπλέον, μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της αρτηριακής πίεσης και της Μεσογειακής Διατροφής και της κατανάλωσης ελαιολάδου έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμιακές μελέτες (Martinez-Gonzalez, 2006). Σε υπερτασικούς ασθενείς το ελαιόλαδο ήταν πιο αποτελεσματικό στη μείωση της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης καθώς και στην αντι-υπερτασική θεραπεία, από δίαιτες πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Perona *et al.*, 2004). Ο Fito και οι συνεργάτες του, υποστηρίζοντας την υπόθεση αυτή ανέφεραν μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης, μετά από κατανάλωση ελαιολάδου υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά καθώς επίσης και μείωση της οξειδωμένης LDL.

Στην ιδιοπαθή υπέρταση μια σημαντική αιτία για την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα του NO (Guzik *et al.*, 2002). Το οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ανιόντων υπεροξειδίου, μειώνει τη διαθεσιμότητα του NO και αναστέλλει την έκφραση της συνθάσης του NO (εικόνα 1.10). Η αντιοξειδωτική δράση του παρθένου ελαιολάδου θα μπορούσε να εξηγήσει την προστατευτική επίδραση του παρθένου ελαιολάδου στα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης. Με αυτή την έννοια αντιυπερτασικές ιδιότητες έχουν αναφερθεί και για άλλες διατροφικές πολυφαινόλες (Engler *et al.*, 2006). Για παράδειγμα οι πολυφαινόλες από το κόκκινο κρασί φαίνεται να είναι



Εικόνα 1.10 Μεταβολική οδός οξειδίου του αζώτου

σε θέση να ενισχύσουν την έκφραση της σύνθεσης του NO, με επακόλουθη απελευθέρωση NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Leikert *et al.*, 2002). Το ενδοθήλιο ασκεί σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου μέσω της απελευθέρωσης αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών ουσιών. Μια διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο φάνηκε να είναι σε θέση να μετριάξει την αντίδραση του αγγειακού δακτυλίου της αορτής σε υπερτασικούς αρουραίους (Herrera *et al.*, 2001).

Ο ρόλος των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου όσον αφορά τον έλεγχο της αγγειοδιαστολής του ενδοθηλίου έχει πρόσφατα απεικονιστεί. Ο Ruan και οι συνεργάτες του (2000) ανέφεραν, ότι ένα γεύμα που περιέχει ελαιόλαδο με αυξημένη περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών, βελτίωσε την αγγειοδιαστολή του ενδοθηλίου κατά τη διάρκεια μεταγευματικής κατάστασης, περισσότερο από ένα άλλο με χαμηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά. Στην ίδια μελέτη, εκτός από τη βελτίωση της ισχαιμικής υπεραιμίας, παρατηρήθηκε μείωση του οξειδωτικού στρες και των μεταβολιτών του NO, γεγονός που υποδηλώνει μια σύνδεση μεταξύ των φαινομένων αυτών. Είναι λοιπόν πιθανόν τα οφέλη του ελαιολάδου και των φαινολικών του ενώσεων σχετικά με την αρτηριακή πίεση να επιτυγχάνονται μέσω της προστατευτικής τους δράσης στην αγγειακή λειτουργία του ενδοθηλίου.

1.8 Μεταβολισμός των υδατανθράκων

Η ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου του αίματος βρίσκεται κάτω από αυστηρό ορμονολογικό έλεγχο. Η έκκριση της ινσουλίνης διεγείρεται από την υπεργλυκαιμία και αποτέλεσμα της δράσης της είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης σακχάρου και η αύξηση των αποθεμάτων υδατανθράκων αυξάνοντας αφ' ενός την πρόσληψη γλυκόζης από το ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς και αφ' ετέρου τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η έκκριση ινσουλίνης αναστέλλεται από την υπογλυκαιμία, ενώ παράλληλα διεγείρεται η έκκριση γλυκαγόνης, αυξητικής ορμόνης, κορτιζόλης και κατεχολαμινών η δράση των οποίων οδηγεί σε αυξημένη γλυκογονόλυση και νεογλυκογένεση με αποτέλεσμα αυξημένη ηπατική παραγωγή γλυκόζης, αύξηση των επιπέδων στο αίμα σε βάρος των αποθεμάτων υδατανθράκων.

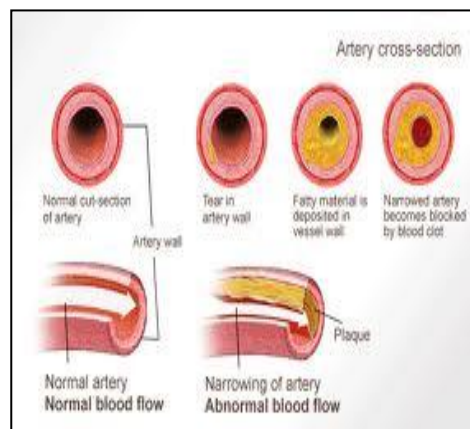
Για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας κα δυσλιπιδαιμίας σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Διαβητικών (Franz *et al.*, 2004) δύο τρόποι έχουν αναφερθεί: δίαιτα χαμηλή σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και υψηλή σε υδατάνθρακες ή υψηλής περιεκτικότητας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαβητικούς ασθενείς δίαιτες πλούσιες σε MUFA μείωσαν τις απαιτήσεις σε ινσουλίνη σε σχέση με χαμηλές σε λιπαρά

και αυξημένες σε υδατάνθρακες δίαιτες, ενώ σε μια μετα- ανάλυση η δίαιτα πλούσια σε MUFA βελτίωσε το προφίλ των λιποπρωτεϊνών, καθώς και το γλυκαιμικό έλεγχο ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην ινσουλίνη νηστείας και στη συγκέντρωση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (Garg *et al.*, 1998). Μεταγενέστερες μελέτες δεν έχουν διαπιστώσει διαφορές μεταξύ των δύο αυτών διαφορετικών τύπων διατροφής όσον αφορά το γλυκαιμικό έλεγχο σε διαβητικούς ασθενείς (Lopez *et al.*, 2006).

Στη μελέτη PREDIMED σε μη διαβητικούς ασθενείς (Estruch *et al.*, 2006) και σε άλλη μελέτη σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο (Esposito *et al.*, 2004) η Μεσογειακή Διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο οδήγησε σε μείωση της γλυκόζης νηστείας καθώς και μείωση της αντίστασης της ινσουλίνης. Επιπλέον δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι δίαιτες πλούσιες σε MUFA προκαλούν αύξηση του σωματικού βάρους σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, παρέχοντας το συμπέρασμα ότι η πρόσληψη ενέργειας είναι ελεγχόμενη. Ως εκτούτου μια διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο μπορεί να είναι επωφελής για ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη που προσπαθούν να ελέγξουν το σωματικό τους βάρος.

1.9 Θρόμβωση

Η θρόμβωση είναι ο σχηματισμός ενός θρόμβου αίματος (θρόμβος), μέσα σε ένα αιμοφόρο αγγείο, εμποδίζοντας τη ροή του αίματος μέσω του κυκλοφορικού συστήματος (εικόνα 1.11). Όταν ένα αιμοφόρο αγγείο υποστεί τραύμα, ο οργανισμός χρησιμοποιεί αιμοπετάλια και ινώδες για να σχηματιστεί ένας θρόμβος αίματος, καθώς το πρώτο βήμα για την επισκευή του (αιμόσταση) είναι να αποτραπεί η απώλεια αίματος. Δύο διαδικασίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση: η πήξη και η ινωδόλυση.



Εικόνα 1.11 Δημιουργία θρόμβου

Οι δίαιτες πλούσιες σε MUFA, φαίνεται να επιδρούν στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ένα βασικό βήμα για τη διαδικασία πήξης του αίματος, σε σχέση με τη διατροφή πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (Smith *et al.*, 2003). Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), προκαλεί τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων και είναι ένας ισχυρός μεσολαβητής για την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και τη δέσμευσή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Mueller *et al.*, 1995). Οι αγωνιστές του PAF έχουν αποδειχθεί να ασκούν προστατευτική δράση κατά της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της ανάπτυξης της

αθηροσκλήρωσης. Το ελαιόλαδο, ιδιαίτερα το πολικό κλάσμα των λιπιδίων του, είναι πλούσιο σε PAF αγωνιστές σε σύγκριση με τα σπορέλαια. Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κουνέλια που τρέφονταν με ελαιόλαδο, ο PAF μειώθηκε, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν μικρότερη, η οξειδωση στο πλάσμα ήταν μειωμένη, η βλάβη στο πάχος των αρτηριών είχε ελαττωθεί και τα τοιχώματα διατηρούσαν την ελαστικότητά τους.

Η θρομβωξάνη A_2 (TXA_2) που παράγεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια οδηγεί σε αύξηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τα φαινορικά συστατικά του ελαιολάδου φάνηκε να μειώνουν τις συγκεντρώσεις της TXA_2 και TXB_2 στον ορό ανθρώπων (Bogani *et al.*, 2007, Fito *et al.*, 2005). Σε αρουραίους που τρέφονταν με δίαιτες πλούσιες σε ελαιόλαδο αποδείχτηκε: α) σημαντική καθυστέρηση στην απόφραξη της αορτής από θρόμβο, μείωση της συχνότητας εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου με συνήθη δίαιτα (Brzosko *et al.*, 2002) και β) μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της υποενδοθηλιακής θρομβογεννητικότητας σε σύγκριση με την ομάδα που τρεφόταν με κορεσμένα λιπαρά οξέα (De la Cruz *et al.*, 2000).

Ο παράγοντας von Willebrand (vWF, von Willebrand factor), είναι σημαντικός ενδοθηλιακός δείκτης και σχετίζεται με το σχηματισμό θρόμβου. Μια διατροφή πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα του vWF στο πλάσμα τόσο σε διαβητικούς ασθενείς όσο και σε υγιή άτομα. Ένας άλλος παράγοντας, ο FVII που αποτελεί βασική πρωτεΐνη στη θρόμβωση και παράγοντα κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται με διατροφή πλούσια σε ελαϊκό οξύ (Temme *et al.*, 1999). Ως ένα γενικό πρότυπο δίαιτες πλούσιες σε MUFA φαίνεται να έχουν μειωμένη μεταγευματική απόκριση του παράγοντα FVII σε σχέση με SFA και παρόμοια με αυτή των PUFA (L'opez-Miranda *et al.*, 2006). Η διατροφή που έχει προηγηθεί επηρεάζει τη μεταγευματική ενεργοποίηση του παράγοντα.

Στη σταθεροποίηση και στην πρόοδο του θρόμβου σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ινωδολυση, ως ένας μηχανισμός που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου των ιστών t-PA και ενός ισχυρού φυσικού αναστολέα του PAI-1. Τα επίπεδα του PAI-1 στο πλάσμα έχουν αποδειχθεί ότι μειώνονται με δίαιτες πλούσιες σε MUFA σε σύγκριση με SFA, ενώ δεν διαφέρουν από δίαιτες πλούσιες σε πολυακόρεστα ή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα (Lopez *et al.*, 2006).

1.10 Τα MUFA ως μοναδικός καρδιοπροστατευτικός παράγοντας του ελαιολάδου

Ο τρόπος ζωής και οι διατροφικές συνήθειες συνιστούν αποτελεσματικές παρεμβάσεις προκειμένου να μειώνονται οι παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο (CHD). Για δεκαετίες, πολυάριθμες μελέτες εξετάζουν το ρόλο των λιπαρών οξέων της διατροφής και πώς αυτά επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις χοληστερόλης στον ορό και τη στεφανιαία νόσο (Mente *et al.*, 2009). Δύο κύρια ευρήματα προέκυψαν από τις μελέτες των Keys, de Lorgeril και Salen και Hegsted *et al.*: 1) η υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) ήταν διατροφικός παράγοντας που συσχετιζόταν πιο συχνά με υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης του πλάσματος και με υψηλότερα ποσοστά στεφανιαίας νόσου και 2) τα χαμηλότερα ποσοστά στεφανιαίας νόσου βρέθηκαν σε πληθυσμούς που κατανάλωναν δίαιτες με το ελαιόλαδο να αποτελεί τη βασική πηγή λίπους (π.χ., Μεσογειακή Δίαιτα). Ως συνέπεια, σε επόμενες έρευνες έγινε η προσπάθεια να προσδιοριστεί το καλύτερο υποκατάστατο των SFA μεταξύ πολλών υποψηφίων, συμπεριλαμβανομένων των MUFA, των PUFA, των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Ουδέτερα αποτελέσματα στα επίπεδα της χοληστερόλης του πλάσματος, αναφέρθηκαν στο τέλος του 1950 και στις αρχές του 1960 από τον Keys και τους συνεργάτες του, όταν χρησιμοποίησαν το ελαιόλαδο ως πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων.

Αν και εξακολουθεί να είναι αρκετά δημοφιλής η αντικατάσταση στις δίαιτες των κορεσμένων λιπαρών οξέων, από τα μονοακόρεστα για την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων (Lloyd-Jones *et al.*, 2010), πρόσφατα στοιχεία από μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα τονίζουν την προσεκτική ελεγχόμενη αποτίμηση των οφελών των MUFA (Warensjo *et al.*, 2008, Jakobsen *et al.*, 2009). Άλλα έλαια πλούσια σε MUFA (canola, high oleic sunflower oil) δεν ήταν ευρέως διαθέσιμα πάντα και η χρήση τους άρχισε να επεκτείνεται όταν οι Mattson και Grundy χρησιμοποίησαν ηλιέλαιο εμπλουτισμένο με ελαϊκό οξύ σαν πηγή MUFA και πρότειναν την πιθανή αντικατάσταση του στη διατροφή αντί για SFA, καθώς βρέθηκε μείωση των συγκεντρώσεων της LDL, χωρίς βέβαια καμία μεταβολή στη συγκέντρωση της HDL.

Το ελαιόλαδο διαφέρει από τα άλλα έλαια πλούσια σε MUFA στα εξής:

- ✓ είναι χαμηλότερης περιεκτικότητας σε PUFA (σε σύγκριση με canola, oleinate)
- ✓ είναι υψηλότερης περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (σε σύγκριση με canola, oleinate, hoso)
- ✓ είναι χαμηλότερης περιεκτικότητας σε φυτικές στερόλες από τα άλλα έλαια πλούσια σε MUFA (110mg/100g)

✓ είναι υψηλότερης περιεκτικότητας σε σκουαλένιο (500mg/100g) (Truswell *et al.*, 1998).

Αν και οι άμεσες συγκρίσεις της κατανάλωσης ελαιολάδου και άλλων ελαίων πλούσιων σε MUFA σπανίζουν στον άνθρωπο, οι διαφορές στην ποσοστιαία σύνθεση των λιπαρών οξέων μπορούν εν μέρει να τροποποιήσουν τα αποτελέσματα, όσον αφορά την ικανότητα των MUFA από διαφορετικές πηγές να διαφοροποιούν τα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα.

Επιπλέον, ο τύπος του ελαιολάδου θα μπορούσε να επηρεάσει το βαθμό της αθηροπροστασίας. Για παράδειγμα, το παρθένο ελαιόλαδο διατηρεί τα περισσότερα από τα λιπόφιλα συστατικά του (συμπεριλαμβανομένων την α- τοκοφερόλη, β- καροτένια και φαινολικά φλαβονοειδή συστατικά με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες), ενώ το εξευγενισμένο ελαιόλαδο χάνει το μεγαλύτερο μέρος των αντιοξειδωτικών του κατά τη διαδικασία του εξευγενισμού (Vissoli *et al.*, 2001). Ως αποτέλεσμα αυτού, το παρθένο ελαιόλαδο είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην αύξηση της αντοχής των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας στο οξειδωτικό στρες, στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα και στη μείωση του λόγου ολική χοληστερόλη/ HDL (Bos *et al.*, 2009).

Στις μέρες μας, λοιπόν, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί πλέον στη μελέτη των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και στις ποικίλες δράσεις τους αφού φαίνεται να διαδραματίζουν το σημαντικότερο ρόλο στη πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ως εκ τούτου είναι εξαιρετικά πιθανό ότι το ελαϊκό οξύ είναι ένας μεταξύ άλλων παραγόντων που ευθύνονται για τις ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι υπάρχουν αρκετά είδη ελαίων, που λαμβάνονται μέσω γενετικής επιλογής και είναι πλούσια σε MUFA και πλέον διαθέσιμα στην αγορά (ηλιέλαιο, σογιέλαιο, κραμβέλαιο).

Κεφάλαιο 2: Μεθοδολογία

2.1 Τα πειραματόζωα- συνθήκες διαβίωσης

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιούνται 20 υγιείς, ενήλικες (3 μηνών), άρρενες κόνικλοι *Orytoagus cuniculus* (Εικόνα 8.1), τύπου New Zealand που προέρχονται από εγκεκριμένη μονάδα παροχής πειραματοζώων. Διαθέτουν ώριμο πεπτικό σύστημα και σύνηθες μικροβιακό φορτίο. Αμέσως μετά την παραλαβή τους στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις ακολουθεί περίοδος εγκλιματισμού για χρόνο 2 εβδομάδων. Οι κόνικλοι διαβιούν σε ανοξείδωτα κελιά υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C και υγρασία 50%)



Εικόνα 2.1 Κόνικλος τύπου New Zealand στο κελί του

διατηρώντας κύκλο φωτός-σκότους 12:12 ώρες. Η συνήθης διατροφή τους είναι τυποποιημένη τροφή εργαστηρίου με συγκεκριμένη σύσταση μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών (πίνακας 2.1). Η πρόσβαση σε τροφή και νερό είναι ελεύθερη.

Πίνακας 2.1 Σύσταση τροφής των κουνελιών

Λιπαρά	4%	Βιταμίνη Α	7500 U.I/ kg
Παλμιτικό οξύ	0,531%	Βιταμίνη D ₃	900 U.I/ kg
Στεατικό οξύ	0,079%	Βιταμίνη Ε	31,5 mg/ kg
Ελαϊκό οξύ	0,434%	Βιταμίνη Β1	2,940 mg/ kg
Λινελαϊκό οξύ	1,707%	Βιταμίνη Β2	8,640 mg/ kg
Λινολενικό οξύ	0,708%	Βιταμίνη Β6	2,970 mg/ kg
Ω6/ Ω3	2,413	Βιταμίνη Β12	0,015 mg/ kg
Βιοτίνη	0,030 mg/ kg	Φολικό οξύ	2,916 mg/ kg
Χολίνη	151,2 mg/ kg	Παντοθενικό οξύ	7,560 mg/ kg

2.1.1 Η διατροφή των πειραματόζων

Την ημέρα 0, δηλαδή την ημέρα έναρξης των πειραμάτων καταγράφεται το σωματικό βάρος όλων των ζώων. Οι κόνικλοι χωρίζονται με τυχαιοποιημένο τρόπο σε 5 ομάδες (1, 2, 3, 4, 5) και σε καθεμία τοποθετούνται 4 ζώα (Α, Β, Γ, Δ). Η ομάδα 1 αποτελεί τους υγιείς μάρτυρες (control), ενώ οι υπόλοιπες το πειραματικό ζωικό μοντέλο. Ύστερα από εκτέλεση πιλοτικού πειράματος, προκειμένου να καθοριστούν οι ιδανικές απαραίτητες ποσότητες και μετά από τον έλεγχο του σωματικού τους βάρους, ορίσθηκαν η τροφή και τα μίγματα αυτής. Τα συστατικά ήταν (εικόνα 2.2): τυποποιημένη ξηρά τροφή, σκόνη χοληστερόλης, γλυκερόλη, έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (Μινέρβα χωριό, Κορωνέϊκη ποικιλία) και ηλιέλαιο (Μινέρβα), ανάλογα με την ομάδα.. Η τροφή ή το μίγμα ήταν 700g για κάθε πειραματόζωο και η αλλαγή της γινόταν κάθε τρεις μέρες, προκειμένου να διατηρείται όσο το δυνατόν πιο φρέσκια και να προστατεύεται από τις οξειδώσεις. Στον πίνακα 2.2 παρατίθεται η τροφή ανά ομάδα πειραματοζώων.



Εικόνα 2.2 Τα συστατικά του μίγματος της τροφής

Πίνακας 2.2 Σύσταση τροφής

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΟΦΗΣ
Α	700 gr ξηράς τροφής
Β	700 gr ξηράς τροφής+ 2% γλυκερόλη (14ml)
Γ	700 gr ξηράς τροφής+ 2% γλυκερόλη (14ml)+ 1% χοληστερόλη (7g)
Δ	700 gr ξηράς τροφής+ 2% γλυκερόλη (14ml) +1% χοληστερόλη (7g)+ 10% έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (70ml)
Ε	700gr ξηράς τροφής+ 2% γλυκερόλη (14ml) +1% χοληστερόλη (7g)+ 10% ηλιέλαιο (70ml)

Τα πειραματόζωα ζυγίζονται κάθε τρεις μέρες και καταγράφεται το σωματικό τους βάρος. Επίσης, καταγράφεται και η ποσότητα της τροφής που καταναλώνουν τις μέρες αυτές (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Ζύγισμα κουνελιού και τροφής

2.2 Αναισθησία- αιμοληψία- ευθανασία

Αντιδραστήρια-όργανα:

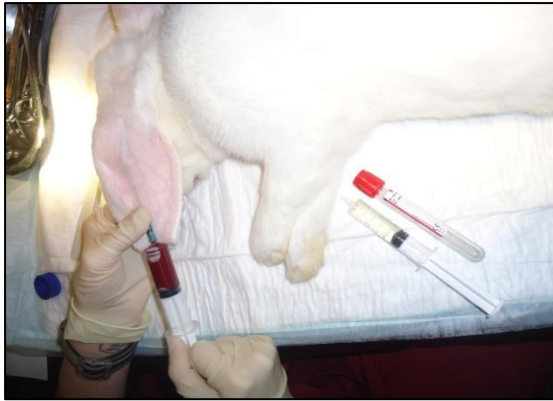
Κεταμίνη, ξυλαζίνη (Rompun), πεντοθάλη (Pentothal), φυσιολογικός ορός, υγρό άζωτο (-196°C), 10% φορμαλίνη σε φυσιολογικό ορό

Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: σύριγγες (5,10mL), γάζες, χειρουργικές λαβίδες Adson, οφθαλμικά κυρτά ψαλίδια, νυστέρια μίας χρήσης (No21), Eppendorfs (1.5mL), φυσιολογικός ορός, γυάλινα σωληνάκια συλλογής ορού αίματος, πλαστικές πιπέτες των 5ml.

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R), υπερκατάψυξη (-80°C)

Αναλυτική πορεία:

Την τελευταία μέρα των πειραμάτων (εβδομάδα 8) γίνεται καταγραφή του ΣΒ όλων των ζώων και ακολουθεί αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης-ξυλαζίνης (50mg/kg και 5mg/kg, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορό. Μετά από περίπου 15 min παραμονής, ακολουθεί αιμοληψία από την περιφερική ωτιαία φλέβα και στη συνέχεια ευθανασία με ενδοφλέβια έγχυση πεντοθάλης (Pentothal) (30mg/kg).



Εικόνα 2.4.α Αιμοληψία

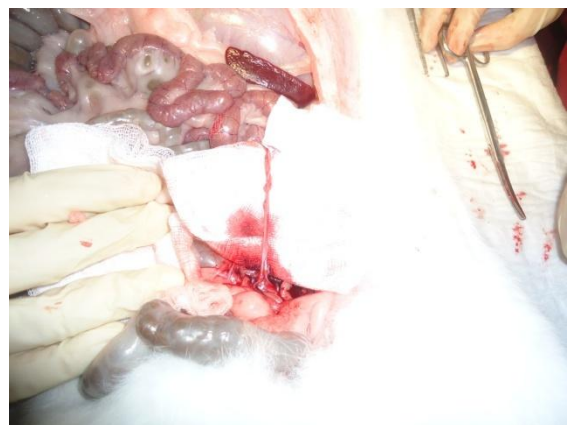


Εικόνα 2.4.β Χορήγηση πεντοθάλης

Το αίμα που παραλαμβάνεται παραμένει για 20 min σε ηρεμία και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 3000 rcf για 10 λεπτά στους 4° C. Τα υπερκείμενα μοιράζονται σε eppendorfs και ο ορός φυλάσσεται σε υπερκατάψυξη (-80° C). Ακολούθως, πραγματοποιείται τομή στην περιτοναϊκή κοιλότητα και παρασκευάζονται και αφαιρούνται οι καρωτίδες, το αορτικό τόξο, η κοιλιακή αορτή, η καρδιά και το ήπαρ. Στις εικόνες 2.6.α, β, γ, δ παρουσιάζονται τα εν λόγω όργανα. Τα όργανα διαχωρίζονται σε μικρότερα κομμάτια και τοποθετούνται σε eppendorfs. Αυτά που προορίζονται για μέτρηση κυτοκινών φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (-196° C), ενώ τα υπόλοιπα σε φορμαλίνη 10% για μικροσκοπική εξέταση. Στο τέλος όλων των ευθανασιών, τα δείγματα ιστών, εκτός εκείνων προς ιστοπαθολογική ανάλυση, φυλάσσονται σε υπερκατάψυξη (-80°C).



Εικόνα 2.5. α. καρωτίδα,



β.κοιλιακή αορτή



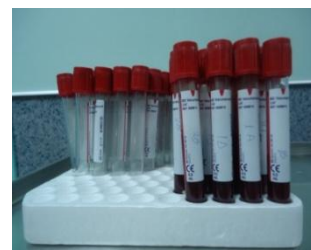
Εικόνα 2.6.γ. Ήπαρ



δ. Καρδιά και αορτικό τόξο

2.3 Βιοχημικές αναλύσεις

Αμέσως μετά την αιμοληψία, το αίμα τοποθετείται σε απλά σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό, για την παραλαβή του ορού (εικόνα 2.7). Το αίμα παραμένει σε κατάσταση ηρεμίας για 20 min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για την παραλαβή του ορού. Ο ορός τοποθετείται σε eppendorfs (1ml) και τοποθετούνται σε υπερκατάψυξη στους -80°C . Με τη χρήση εξειδικευμένων βιοχημικών αναλυτών και kit αναλύονται ως προς συγκεκριμένες παραμέτρους. Αυτές είναι: γλυκόζη (mg/ dL), ουρία (mg/ dL), κρεατινίνη (mg/ dL), ουρικό οξύ (mg/ dL), χοληστερόλη (mg/ dL), τριγλυκερίδια (mg/ dL), HDL (mg/ dL), LDL (mg/ dL), ολικά λιπίδια (mg/ dL), τρανσαμινάση SGOT (IU/ L), τρανσαμινάση SGPT (IU/ L), γ -GT (U/ L), αλκαλική φωσφατάση (IU/ L), ολική χολερυθρίνη (mg/ dL), άμεσος χολερυθρίνη (mg/ dL).



Εικόνα 2.7 Δείγματα αίματος σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό

2.4 Ομοιογενοποίηση ιστών

Αντιδραστήρια-όργανα:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 20mM και PH 7.4, 0.5M βουτυλο-υδροξυ τολουόλιο (BHT) σε ακετονιτρίλιο, φυσιολογικός ορός

Κωνικές φιάλες (50mL) και (100mL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου (5mL) με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, eppendorfs (1.5mL), αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL και 100-1000μL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ομογενοποιητής (ULTRA-TURAX, IKA-Labortechnik), vortex, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)
Απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία:

Οι ιστοί ζυγίζονται σε ζυγό ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, πλένονται με φυσιολογικό ορό και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα με PBS (10mL/3g ιστού) και BHT (10μL/mL ομογενοποιημένου ιστού). Το BHT χρησιμοποιείται για αναστολή της αυτοοξειδωσης του δείγματος κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, που πραγματοποιείται σε ομογενοποιητή και διαρκεί περίπου 0,5min. Ακολουθεί vortex και φυγοκέντριση (3000rcf στους 4°C) για 10min ώστε να παραληφθεί το εκχύλισμα ιστών. Το υπερκείμενο μοιράζεται σε eppendorfs και φυλάσσεται σε υπερκατάψυξη (-80° C) για περαιτέρω χρήση.

2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford

Αντιδραστήρια-όργανα:

Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)

Αντιδραστήριο Bradford, πρότυπο διάλυμα 2mg/mL αλβουμίνης ορού μόσχου (BSA) σε PBS 20mM και PH 7.4

Κυψελίδες (1.5mL), eppendorfs (1.5mL), αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, vortex

Απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής «Brilliant Blue G-250» με πρωτεΐνες, δημιουργώντας ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Αυτό εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm.

Αναλυτική πορεία:

- ✓ **Καμπύλη αναφοράς:** Σε πρώτο στάδιο προετοιμάζονται τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά διαλύματα BSA συγκέντρωσης 0,1 έως 1,4mg/mL (0,1, 0,4, 0,8, 1,4mg/mL), τα οποία αραιώνονται με ανάλογη ποσότητα PBS μέχρι τελικού όγκου 500μL. Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex και παραμονή 5min σε κατάσταση

ηρεμίας. Στη συνέχεια προστίθενται στις κυψελίδες 250μL αντιδραστηρίου Bradford και 5μL από καθεμία στάνταρ συγκέντρωση πρωτεΐνης (αλβουμίνης). Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm και η προκύπτουσα γραμμική ευθεία, αποδίδει εξίσωση τύπου $y = ax + \beta$ ($R^2 \approx 1$). Το «y» αντιπροσωπεύει την τιμή απορρόφησης και το «x» τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης εκφραζόμενης σε μg/mL.

- ✓ **Δείγματα ιστού:** Τα ομοιογενοποιημένα εκχυλίσματα ιστών αραιώνονται σε PBS σε αναλογία 1:50 για το ήπαρ και 1:30 για τον καρδιακό ιστό. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και vortex για 30 περίπου δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθενται στις κυψελίδες 250μL αντιδραστηρίου Bradford και 5μL από κάθε δείγμα. Για το τυφλό (blank) χρησιμοποιούνται 5μL PBS (buffer). Τα δείγματα παραμένουν σε ηρεμία για 5min, απουσία φωτός μέχρι τη φωτομέτρησή τους (595nm).

2.6 Μέτρηση επιπέδων μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό

Αντιδραστήρια- όργανα:

Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)

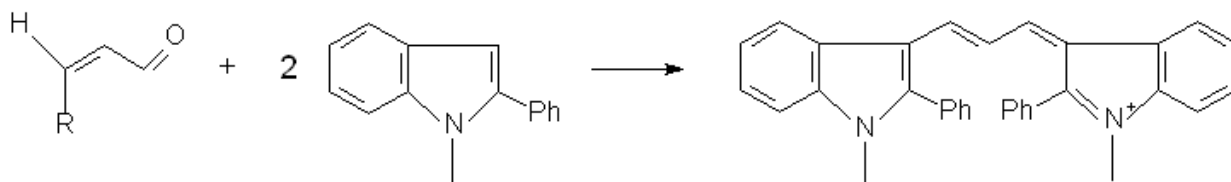
Εξειδικευμένο MDA Kit

Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου των 5 ή 10 mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο και πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων

Υδατόλουτρο, απλή φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5417C), vortex

Αρχή της μεθόδου:

Η δοκιμασία στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστηρίου N-methyl-2-phenylindole με τη μαλοναλδεϋδη (MDA), όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής απορροφά στα 586nm.



MDA : R = OH

4-hydroxyalkenal : R= hydroxyalkyl

$\lambda_{\max} = 586_{\max} \text{ nm}$

Αναλυτική πορεία:

Τα επίπεδα της MDA των δειγμάτων ιστού μετρώνται σε φασματοφωτόμετρο σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standard, τα control και τα δείγματα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπροπυλενίου προστίθενται 200μL δείγματος και 650μL αντιδραστηρίου (N-methyl-2-phenylindole σε ακετονυτρίλιο). Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex και προστίθενται 150μL HCl (12N). Μετά από ισχυρή ανάδευση, τα δείγματα επωάζονται στους 45°C για 60 min. Με το τέλος της επώασης γίνεται φυγοκέντρηση (15.000rcf, 15 min) και παραλαμβάνεται η υπερκείμενη στιβάδα. Τέλος, μετράται η απορόφηση στα 586nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pmols/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς.

2.7 Μέτρηση TBARS (MDA)

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εξειδικευμένο ELISA kit για τη μέτρηση των TBARS

Απιονισμένο νερό

ELISA reader

Πιπέτες (50-500μL)

Tips

Αρχή της μεθόδου

Τα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Τα άγνωστα δείγματα που περιέχουν MDA ή τα πρότυπα MDA αντιδρούν με TBA στους 95°C. Μετά από μια σύντομη επώαση, τα δείγματα και τα πρότυπα μπορούν να μετρηθούν είτε φασματοφωτομετρικά ή φθορισμομετρικά. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 532nm.

Αναλυτική πορεία:

- ✓ **Δείγματα ορού:** Τα επίπεδα της MDA στο πλάσμα μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου sandwich kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα στάνταρ σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL προστίθεται αρχικά 100μL control, standard ή δείγματος και 100μL διαλύτη (SDS Lysis Solution). Επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται

250μL TBA και ακολουθεί επώαση για 45-60 λεπτά σε υδρόλουτρο στους 95°C. Αφού κρυώσουν τα δείγματα σε πάγο ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3000rpm. Παραλαμβάνονται 300μL από το υπερκείμενο σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθενται 300μL βουτανόλης. Ακολουθεί ανάδευση για 1-2 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000rpm. Στο τέλος παραλαμβάνονται 220μL από το υπεκείμενο και μετράται η απορρόφηση στα 532nm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μM, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

- ✓ **Καμπύλη αναφοράς:** Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα MDA (250 pg/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, 0,98 και 0 μM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της MDA σε μM και ψ η απορρόφηση στα 532nm.

2.8 Μέτρηση των επιπέδων κυτταροκινών σε ιστό

Αντιδραστήρια-όργανα:

Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)

Εξειδικευμένα Elisa Kit για TNF-α, IL-6, CRP

Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου των 5 ή 10 mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, eppendorfs των 1.5mL και πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

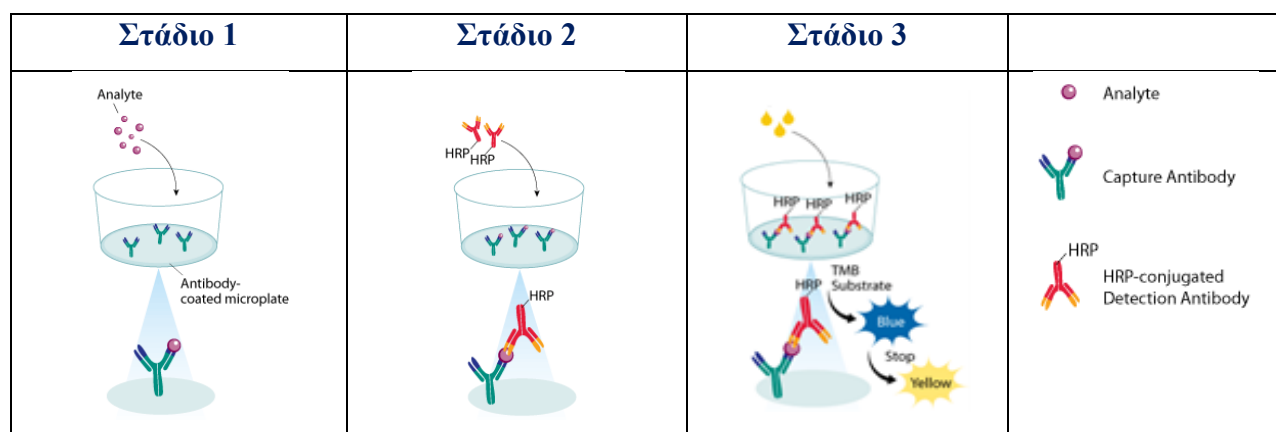
Αρχή της μεθόδου:

Η κυτταροκίνη προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (Capture antibody) και στη συνέχεια προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής (Detection antibody) της προσδεμένης κυτταροκίνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική πορεία:

Τα επίπεδα της κυτταροκίνης στα δείγματα ιστού μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής

εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζεται το τρυβλίο όπου θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Συγκεκριμένα, προστίθενται 100μL μονοκλωνικού αντισώματος και το τρυβλίο επωάζεται για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (3x400μL), ενώ παράλληλα προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standard, τα control και τα δείγματα. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο προστίθενται 100μL standard, control ή δείγματος και ακολουθεί επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 3 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 3 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (H_2O_2 και tetramethylbenzidine 1:1). Το τρυβλίο επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H_2SO_4 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς.



2.9 Προσδιορισμός βιταμίνης E σε έτοιμη τροφή με HPLC

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα εξανίου, BHT

Διαλύτης χλωροφορμίου/ μεθανόλης

Δοκιμαστικός σωλήνας με βιδωτό πώμα (2mL), φιαλίδια (1,5mL)

Αυτόματες πιπέτες και tips

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, vortex, φυγόεντρος, εξατμιστήρας Speed Vac

Παρασκευή μέσου εκχύλισης

Αρχικά παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα εξανίου/ BHT. Το BHT είναι αντιοξειδωτικό, το οποίο προστατεύει τα φυσικά αντιοξειδωτικά των τροφίμων από την οξείδωση. Το πυκνό διάλυμα εξανίου είχε συγκέντρωση 1mg/ mL. Από το πυκνό αυτό διάλυμα παρασκευάζεται το αραιό διάλυμα εργασίας. Προστίθενται 0,5 mL πυκνού διαλύματος σε 49,5 mL εξανίου. Έτσι η συγκέντρωση του BHT στο διαλύτη εκχύλισης είναι 10mg/ 1000mL ή 10ppm.

Πειραματική διαδικασία παραλαβής βιταμίνης E από τα δείγματα τροφής

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται δείγματα μιγμάτων τροφής ελαιολάδου και ηλιέλαιου την ημέρα 1 (παράθεση τροφής), την ημέρα 2 και την ημέρα 3 (πίνακας 2.3). Σκοπός είναι να διαπιστωθεί αν υπάρχει οποιαδήποτε μεταβολή στη βιταμίνη E, μέχρι την ημέρα αντικατάστασης της τροφής με φρέσκια.

Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας είναι τα ακόλουθα:

1. Το τρόφιμο ζυγίζεται (περίπου 1g) σε ζυγό ακριβείας σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα (πίνακας 2.3)
2. Προστίθεται διάλυμα εξανίου/ BHT (5mL) στο σωλήνα με το τρόφιμο
3. Το μίγμα αναδεύεται στο vortex για 2 min και τοποθετείται στη φυγόκεντρο (3000 rpm) για 5 min
4. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και στη συνέχεια στο Speed Vac όπου ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση (μέχρι ξηρού), για την παραλαβή της οργανικής φάσης
5. Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται 5 φορές με προσθήκη στο δοκιμαστικό σωλήνα με το τρόφιμο, εκ νέου, διαλύτη για ποσοτική παραλαβή
6. Οι οργανικές φάσεις αναμείχθηκαν και ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση στο Speed Vac
7. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά, με επαναλαμβανόμενες προσθήκες διαλύτη (χλωροφόρμιο/ μεθανόλη 1:1) σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα των 2 mL
8. 500 μ L από το αναδιαλυόμενο σε χλωροφόρμιο/ μεθανόλη δείγμα τοποθετείται σε φιαλίδιο για την ανάλυση HPLC

Πίνακας 2.3 Βάρος δειγμάτων και όγκος αναδιάλυσης

Είδος τροφής	Βάρος (g)	Όγκος αναδιάλυσης (mL)
OO1	0,13	2
OO2	0,15	2
OO3	0,13	2
SF1	0,13	2
SF2	0,15	2
SF3	0,13	2

2.10 Προσδιορισμός βιταμίνης E σε έλαια

Προετοιμασία δείγματος για τον προσδιορισμό βιταμίνης E σε έλαια

Για τον προσδιορισμό της βιταμίνης E στα έλαια, ζυγίζονται περίπου 90 mg ελαίου σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και τοποθετούνται σε φιαλίδια (πίνακας 2.4). Στη συνέχεια προστίθενται 900μL διαλύματος χλωροφορμίου / μεθανόλης 1:1 χρωματογραφικής καθαρότητας και το μίγμα αναδεύτηκε στο vortex. Για κάθε δείγμα η διαδικασία έγινε εις διπλούν.

Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για τα έλαια που προστίθενται στην τροφή την ημέρα 1, την ημέρα 2 και την ημέρα 3 (πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4 Βάρος ελαίων και όγκος αναδιάλυσης

Είδος ελαίου	Βάρος (g)	Όγκος αναδιάλυσης (mL)
OO1	0,090	1
OO2	0,089	1
SF1	0,090	1
SF2	0,090	1
SF3	0,088	1

2.11 Ανάλυση με χρωματογραφία HPLC

Αντιδραστήρια – Όργανα

Μεθανόλη, ισοπροπανόλη, ακετονιτρίλιο χρωματογραφικής καθαρότητας

Φωσφορικό οξύ

Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας

Πρότυπες ουσίες

Υγρός χρωματογράφος με αυτόματο δειγματολήπτη: HP-1050 (Agilent Technologies)

Ανιχνευτές: συστοιχίας διόδων (DAD HP-1050), φθορισμομετρικός αναλυτής (FLD)

Στήλη ανάστροφης φάσης: Nucleosil C18 100 (125x4.6μ)

Ροή διαλυτών: 1mL/ min

Αρχή της μεθόδου

Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για το διαχωρισμό.

Καμπύλες αναφοράς για τις τοκοφερόλες

Ζυγίζονται 5 mg α-, β-, δ-τοκοφερόλης σε ζυγό ακριβείας τα οποία διαλύθηκαν σε 10 mL μεθανόλης. Στη συνέχεια κατασκευάζεται πολυπρότυπο το οποίο περιέχει τις τοκοφερόλες στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: α-τοκοφερόλη 100μg/ mL, γ-τοκοφερόλη 50μg/ mL, δ-τοκοφερόλη 50μg/mL. Από το διάλυμα πολυπροτύπου λαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες, ώστε να παρασκευαστούν διαλύματα, τα οποία περιέχουν την α-, β- και δ-τοκοφερόλη σε συγκεντρώσεις

Οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς μέσω των οποίων έγινε ο προσδιορισμός της α-, β-, γ-, δ-τοκοφερόλης ήταν οι ακόλουθες:

α- τοκοφερόλη: $y = 5,2875x - 0,3768$

γ- τοκοφερόλη: $y = 26,003x + 0,3753$

δ- τοκοφερόλη: $y = 16,499x + 5,5934$

όπου y = μg τοκοφερόλης και x = εμβαδόν κορυφής

Χρωματογραφική ανάλυση της βιταμίνης E

Χρησιμοποιείται υγρός χρωματογράφος HP 1050 (Agilent Technologies) εφοδιασμένος με αυτόματο δειγματολήπτη. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνονται χρησιμοποιώντας ανιχνευτή σειράς φωτοδίοδων (DAD) και φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FLD). Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται στήλη Nucleosil C18 100 (125x4.6μ) και ένα σύστημα 4 διαλυτών αποτελούμενο από νερό οξινισμένο με φωσφορικό οξύ (pH=3), μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και προπανόλη-2 με βαθμωτή έκλυση (πίνακας 2.5). Από κάθε δείγμα πραγματοποιούνται εκχύσεις των 50μL. Η ανίχνευση των τοκοφερολών γίνεται φθορισμομετρικά, χρησιμοποιώντας μήκος κύματος διέγερσης 295 nm και μήκος κύματος

εκπομπής 330 nm (lex 295 nm, lem 330nm). Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με εξωτερική καμπύλη αναφοράς προτύπων ουσιών α-, γ- και δ- τοκοφερόλης 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων

Πίνακας 2.5 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης

Time (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)	MeOH (%)	IPA (%)
0	10	0	90	0
10	5	0	95	0
20	0	0	100	0
25	0	0	100	0
26	0	20	20	60
36	0	20	20	60
41	10	0	90	0

2.12 Αξιολόγηση των ιστών μακροσκοπικά

Μετά την ευθανασία, παρασκευάζονται και αφαιρούνται το ήπαρ, η καρδιά, η κοιλιακή αορτή και οι καρωτίδες. Η αξιολόγησή τους γίνεται με γυμνό οφθαλμό, παρατηρώντας το χρώμα, την υφή, τη σύσταση ή αλλοιώσεις στην εξωτερική επιφάνειά τους. Στη συνέχεια τεμαχίζονται προκειμένου να ελεγχθεί το εσωτερικό τους και να διαπιστωθεί αν υπάρχουν και εκεί αλλοιώσεις χαρακτηριστικές της αθηροσκλήρωσης.

Μακροσκοπική εικόνα φυσιολογικού ήπατος: έχει χρώμα ερυθροκαστανό, λεία επιφάνεια και καλύπτεται από λεπτή ινώδη κάψα. Η επιφάνεια τομής έχει χρώμα καφετί και διακρίνονται καθαρά τα ηπατικά λόβια.

Μακροσκοπική εικόνα ήπατος με λιπώδη εκφύλιση: Σε ελαφριές μορφές, το μέγεθος του ήπατος εμφανίζεται φυσιολογικό ή μικρότερο του φυσιολογικού. Το χρώμα του είναι κιτρινωπό και φαίνεται τόσο από την ινώδη κάψα του, όσο και από την επιφάνεια τομής του. Η σύσταση του είναι μαλακή και εύθρυπτη. Σε βαριές μορφές, το ήπαρ εμφανίζεται διογκωμένο, με υποστρόγγυλα άκρα και λεία επιφάνεια. Η τομή του παρεγχύματος του, είναι ομοιόμορφα λιπαρή χωρίς λοβιώδη κατανομή της αλλοίωσης. Είναι έντονα αποχρωματισμένο, με ομοιόμορφο ανοιχτό κίτρινο χρώμα.

Μακροσκοπική εικόνα φυσιολογικής καρδιάς: η καρδιά αποτελείται από δύο άνω κοιλότητες με λεπτά τοιχώματα, που ονομάζονται κόλποι, και δύο κάτω κοιλότητες με παχύτερα τοιχώματα, που ονομάζονται κοιλίες. Η καρδιά περιβάλλεται από το περικάρδιο, έναν ινώδη σάκο με δύο πέταλα. Το σπλαγγχνικό πέταλο εφάπτεται άμεσα στη καρδιά και αποτελεί μέρος του επικαρδίου.

Το περίτονο (τοιχωματικό) πέταλο του περικαρδίου χωρίζεται από το σπλαγχνικό με ένα λεπτό στρώμα υγρού (συνολικά 10-20 εκ.) που επιτρέπει στην καρδιά να κινείται ελεύθερα μέσα στον περικαρδιακό σάκο. Έχει σχήμα ανεστραμμένου αμβλέος κώνου (γιατί πάντα βρίσκεται σε διαστολή) και είναι μαλακή στην αφή. Στην κοιλότητα του περικαρδίου υπάρχει διαυγούς χρώματος ορώδες υγρό. Το περικάρδιο εμφανίζεται διαφανές με λείες και στιλπνές επιφάνειες.

Μακροσκοπική εικόνα αθηρωματικής καρδιάς: εναπόθεση λιπώδους στον περικαρδιακό ιστό, στο μυοκάρδιο και στα τοιχώματα των αρτηριών δυσχεραίνοντας την ομαλή ροή του αίματος. Έχει χρώμα φαιοκίτρινο και εύθρυπτη σύσταση.

2.13 Στατιστική επεξεργασία

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 18.0. Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test) οι συγκρίσεις έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One-Way-Anova) με εφαρμογή του Bonferroni test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Χαρακτηριστικά των πειραματόζωων

Το πειραματικό μοντέλο των μη γενετικά υπερλιπιδαιμικών κουνελιών είναι ευρέως αποδεκτό σε μελέτες αθηροσκλήρωσης. Διαφορετικά επίπεδα διαιτητικής χοληστερόλης (0,8-2%) χρησιμοποιούνται για διαφορετικές χρονικές περιόδους για τη δημιουργία πειραματικής νόσου (Subbiah *et al.*, 1989, Wojcicki *et al.*, 1991, Shepard *et al.*, 1992). Τα κουνέλια της Νέας Ζηλανδίας, ανήκουν στην κατηγορία των πειραματόζωων που όταν φράξει πειραματικά μιας στεφανιαία αρτηρία τους, δεν παθαίνουν έμφραγμα. Αυτό συμβαίνει γιατί αυτόματα η παράπλευρη κυκλοφορία, δηλαδή τα μικρά αρτηρίδια ενεργοποιούνται και αιματώνουν την περιοχή που έπαψε να αιματώνεται από την αρτηρία που πειραματικά έφραξε. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν ως πειραματόζωα στην παρούσα κλινική μελέτη.

Είκοσι κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας κατηγοριοποιήθηκαν τυχαία σε 5 ομάδες (βλέπε πίνακα 2.2). Το σωματικό βάρος των πειραματόζωων καταγραφόταν δύο φορές/εβδομάδα. Ομοίως γινόταν η καταγραφή της τροφής που είχε καταναλωθεί και η αντικατάσταση της με φρέσκια. Αυτό συνέβαινε προκειμένου να αποφευχθούν οξειδώσεις των συστατικών της τροφής, καθώς και για τη διατήρηση της ευχάριστης γεύσης και οσμής της. Οι κόνικλοι καταναλώνουν περίπου 150 g ξηράς τροφής ημερησίως. Η ποσότητα της τροφής που ήταν στη διάθεση τους, ήταν 700 g για 3 ημέρες και η πρόσβαση σε αυτή γινόταν κατά βούληση. Τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν είναι έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (Μινέρβα χωριό, Κορωνέϊκη ποικιλία) και ηλιέλαιο (Μινέρβα) και τα χαρακτηριστικά τους αναφέρονται στον πίνακα 3.1, όπως αυτά αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος. Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα σωματικά βάρη την ημέρα έναρξης του πειράματος, την ημέρα λήξης αυτού, καθώς και η μεταβολή τους. Όλα τα ζώα παρουσίασαν αύξηση του σωματικού βάρους γεγονός που υποδηλώνει τον εγκλιματισμό τους στη νέα τροφή. Παρόλο αυτά παρατηρούμε ότι στα ζώα της ομάδας 1, η μεταβολή του βάρους ήταν μεγαλύτερη από αυτή των άλλων ομάδων, ίσως επειδή η φυσιολογική ξηρά τροφή είναι περισσότερο αποδεκτή.

Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά έξτρα παρθένου ελαιολάδου Μινέρβα χωριό, Κορωνέϊκη ποικιλία

	Ανά 100 mL	Ανά 10 g
Ενέργεια	824 kcal	40 kcal
Πρωτεΐνες	0	0
Υδατάνθρακες	0	0
Λιπαρά	92 g	10 g
Κορεσμένα	13 g	14 g

Πίνακας 3.1 Συνέχεια

	Ανά 100 mL	Ανά 10 g
Μονοακόρεστα	73 g	0,7 g
Πολυακόρεστα	6 g	0,7 g
Φυτικές ίνες	0	0
Νάτριο	0	0
Οξύτητα	έως 0,8%	
Υπεροξείδια	έως 20 m EqO ₂ / kg	
Κήροι	έως 250 ppm	

Πίνακας 3.2 Σωματικό βάρος των πειραματοζώων στην έναρξη και λήξη του πειράματος και η μεταβολή τους

ΟΜΑΔΑ	ΒΑΡΟΣ (g) (αρχή)	ΒΑΡΟΣ (g) (τέλος)	ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΑΡΟΥΣ (g)
1α	2800	3685	885
1β	3620	4405	785
1γ	2980	3980	1000
1δ	3690	4490	800
2α	3075	4090	1015
2β	3035	3610	575
2γ	3170	4025	855
2δ	3079	3880	801
3α	3015	3355	340
3β	2905	3430	525
3γ	2885	3550	665
3δ	3020	3440	420
4α	2950	3610	660
4β	2640	3475	835
4γ	2915	3835	920
4δ	2970	3740	770
5α	2940	3770	830
5β	3025	3550	525
5γ	3005	3635	630
5δ	3035	3570	535

Η μεταβολή του βάρους σχετίζεται επίσης με την ηλικία των ζώων. Λόγω του νεαρού της ηλικίας του είναι απόλυτα φυσιολογικό να αυξάνει το βάρος τους, αφού στην ηλικία των 6 ετών, που είναι πια ενήλικο ζυγίζει περίπου 5,5 kg. Το σωματικό βάρος μπορεί να επηρεάζεται από τη σύσταση της διατροφής, από την ηλικία του κόνικλου, από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον διαβίωσής του, από το βαθμό σωματικής άσκησης ή ακόμα και από διάφορες ασθένειες (υπερτριγλυκεριδαιμία, υπερχοληστερολαιμία, παχυσαρκία, βακτηριακές μολύνσεις κ.α.).

Οι κόνικλοι όντας ζώα που δείχνουν αντοχή στο στρες, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό πολλές από τις καθημερινές τους συνήθειες ή ακόμα δυσκολεύουν τις πειραματικές διαδικασίες. Η αλλαγή της σύστασης της τροφής στο συγκεκριμένο πείραμα αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα. Σε αυτό ίσως να οφείλεται η μικρότερη μεταβολή βάρους, που παρουσιάστηκε στην ομάδα 3 (παρέμβαση με χοληστερόλη). Αντίθετα, η μεταβολή αυτή ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα 4 (παρέμβαση με ελαιόλαδο), πιθανά λόγω της ευχάριστης οσμής και γεύσης του ελαιολάδου. Προκειμένου να αποφευχθούν στρεσογόνοι παράγοντες που μπορεί να προέρχονται από το περιβάλλον διαβίωσης, τοποθετήθηκαν μέσα στα κλουβιά ξύλινα μικρά αντικείμενα. Θεωρήθηκε, ότι η ενασχόληση των πειραματόζωων με παιχνίδια θα μειώσει πιθανές συνθήκες στρες και θα βοηθήσει στην ομαλή διεξαγωγή του πειράματος.

Τα κλουβιά καθαρίζονταν καθημερινά και 2 φορές/εβδομάδα παρατηρούνταν τα κόπρανα των ζώων για να διαπιστωθεί η πιθανότητα παθολογικής κατάστασης (π.χ. διάρροια).

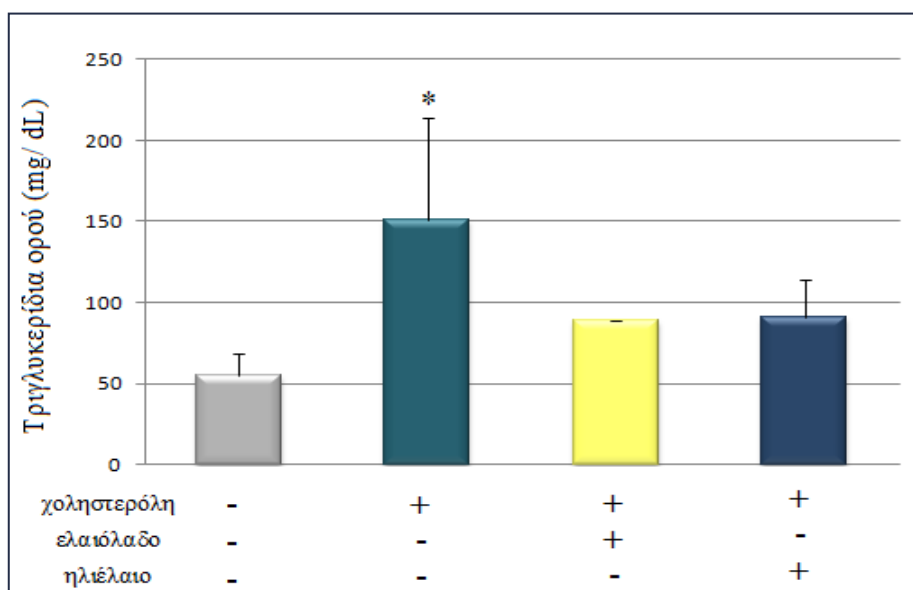
3.2 Βιοχημικές μετρήσεις

3.2.1 Λιπιδιαμικό προφίλ

Κάθε 2 εβδομάδες πραγματοποιείται αιμοληψία και παραλαβή του ορού του αίματος, προκειμένου να γίνουν βιοχημικές εξετάσεις και να προσδιοριστεί το λιπιδιαμικό προφίλ των ζώων. Το λιπιδιαμικό προφίλ του αίματος αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα αιτιοπαθογένειας διαφόρων μεταβολικών νοσημάτων. Μετά από διαιτητική παρέμβαση 8 εβδομάδων, πραγματοποιείται ανάλυση των βιοχημικών παραμέτρων των ζώων. Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος.

Τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στην ομάδα control είναι $55,2 \pm 13,9 \text{ mg/dL}$, στην ομάδα με παρέμβαση χοληστερόλης $150,5 \pm 63,4 \text{ mg/dL}$, στην ομάδα με παρέμβαση ελαιολάδου $88,5 \pm 0,4 \text{ mg/dL}$ και στην ομάδα με παρέμβαση ηλιέλαιου $91,2 \pm 23,2 \text{ mg/dL}$. Παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση στα ζώα που λάμβαναν διαιτητική χοληστερόλη, που υποδηλώνει ότι η

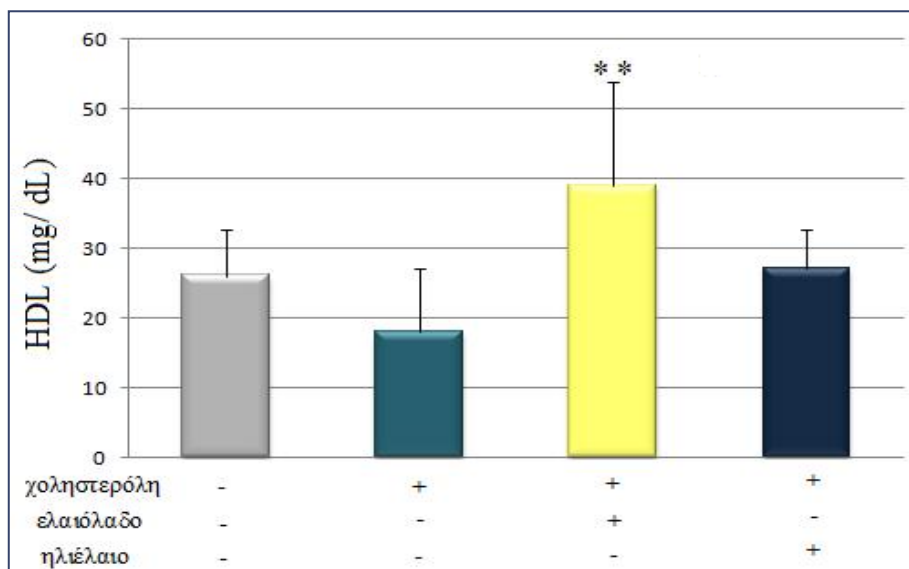
χοληστερόλη αυξάνει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και μάλιστα στατιστικά σημαντικά ($p=0,006$). Η προσθήκη ελαιόλαδου και ηλιέλαιου στη διατροφή μείωσε τα επίπεδα τους, χωρίς όμως αυτά να είναι στατιστικά σημαντικά.



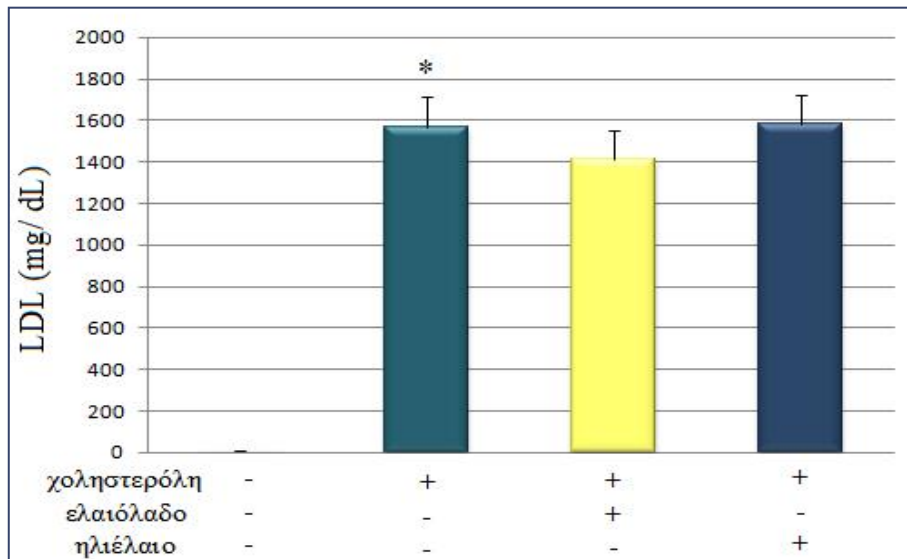
Σχήμα 3.1 Μέτρηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος σε χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

. Στο σχήμα 3.2 παρατίθενται οι μετρήσεις των επιπέδων της HDL. Για την ομάδα που λάμβανε τυποποιημένη τροφή (control), χοληστερόλη, ελαιόλαδο και ηλιέλαιο τα επίπεδα της HDL είναι: $26 \pm 6,6$ mg/ dL, $18 \pm 9,1$ mg/ dL, $39 \pm 14,8$ mg/ dL, $27 \pm 5,6$ mg/ dL αντίστοιχα. Στα ζώα που έπαιρναν χοληστερόλη, η HDL παρουσίασε μείωση που δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ το ελαιόλαδο φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα της με στατιστική σημαντικότητα $p=0,037$ σε σύγκριση με την ομάδα της χοληστερόλης. Αντίστοιχα το ηλιέλαιο οδήγησε και αυτό σε αύξηση της HDL που δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Στο σχήμα 3.3 φαίνονται οι μετρήσεις των επιπέδων της LDL. Σημαντική είναι η αύξηση της LDL μετά από προσθήκη στην τροφή διαιτητικής χοληστερόλης, με τα επίπεδά της να είναι $1566 \pm 152,9$ mg/ dL και $p=0,000$. Στην ομάδα control, ελαιόλαδου και ηλιέλαιου οι τιμές της έχουν ως εξής: $7,2 \pm 2,6$ mg/ dL, $1412,2 \pm 142,4$ mg/ dL, $1586,7 \pm 134,5$ mg/ dL αντίστοιχα. Όπως φαίνεται το ελαιόλαδο προκάλεσε μικρή μείωση της LDL, ενώ στην ομάδα του ηλιέλαιου παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα.



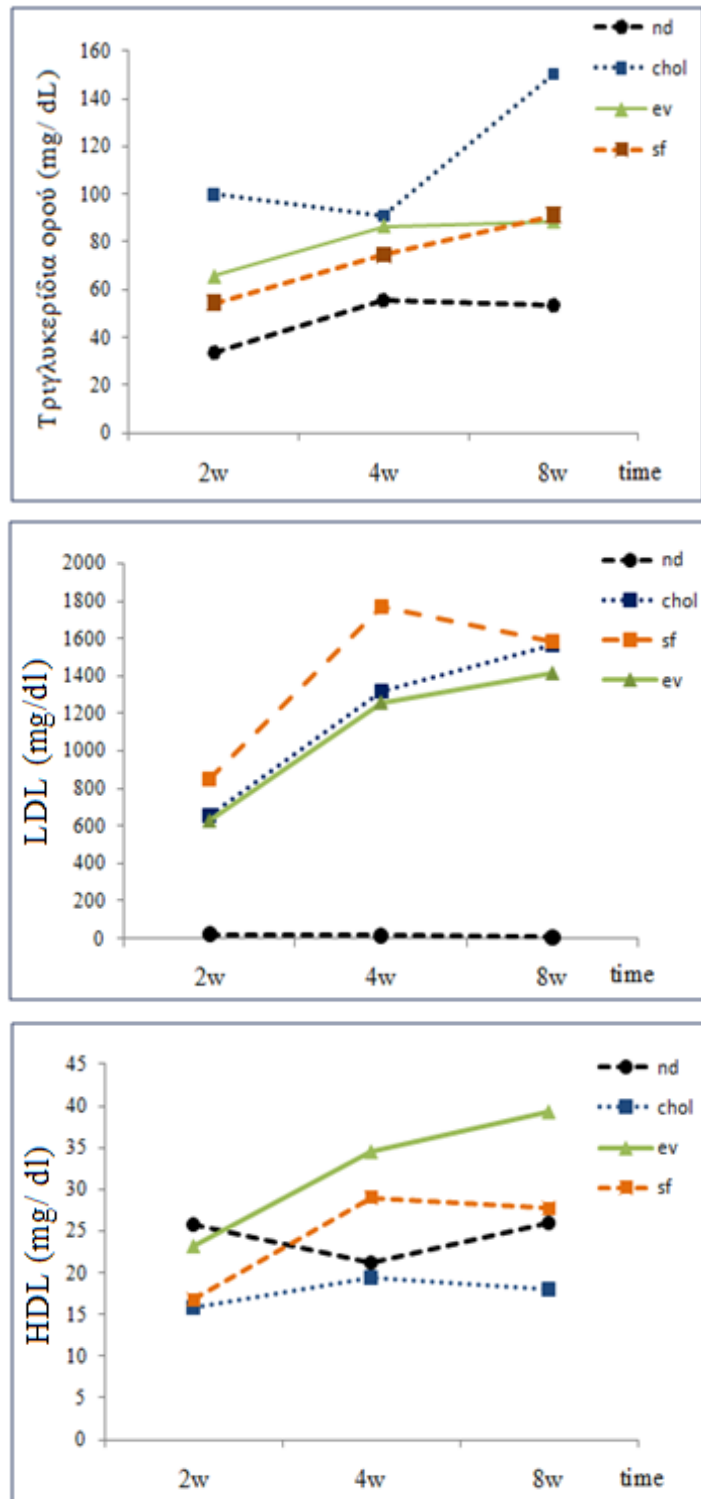
Σχήμα 3.2 Μέτρηση των επιπέδων της HDL στον ορό του αίματος σε χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (<0,05) μεταξύ της τροφής με διαιτητική παρέμβαση ελαιολάδου και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση με χοληστερόλη. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας



Σχήμα 3.3 Μέτρηση των επιπέδων της LDL στον ορό του αίματος σε χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (<0,05) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Για να υπάρχει σαφής σύγκριση των αποτελεσμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της κλινικής δοκιμής έγιναν συγκρίσεις των επιπέδων των τριγλυκεριδίων, της HDL και της LDL χοληστερόλης στις 2, στις 4 και στις 8 εβδομάδες της πειραματικής διαδικασίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.4. Όσον αφορά τα τριγλυκερίδια στις 4 εβδομάδες φαίνεται να μειώνονται περίπου 9 mg/dL, που αυτό ίσως οφείλεται σε μειωμένη κατανάλωση τροφής περίοδο. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή στις 8 εβδομάδες η αύξηση που παρατηρείται είναι μεγάλη και στατιστικά σημαντική (σχήμα 3.1). Τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στην ομάδα του ελαιολάδου και του ηλιέλαιου, ήταν καθ' όλη τη διάρκεια χαμηλότερα από αυτά της ομάδας της χοληστερόλης. Αναφορικά με την LDL, τα επίπεδά της βρίσκονται σε συνεχή αύξηση από τις 2 έως τις 8 εβδομάδες, με την ομάδα του ηλιέλαιου να παρουσιάζει μεγαλύτερη αύξηση ακόμα και από αυτή της χοληστερόλης. Αντίθετα, τα ζώα που λάμβαναν μαζί με την τροφή τους και ελαιόλαδο παρουσιάζουν

πρόοδο στα επίπεδα της LDL. Και στις 3 χρονικές στιγμές η LDL είναι μειωμένη συγκριτικά με την ομάδα της χοληστερόλης. Τέλος, τα επίπεδα της HDL μειώνονται κατά πολύ συγκρίνοντας τα με την ομάδα control, ενώ η προσθήκη του ελαιολάδου φαίνεται να τα βελτιώνει σημαντικά



Σχήμα 3.4 Σύγκριση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων, της HDL και LDL στις 2, 4 και 8 εβδομάδες

αυξάνοντάς τα από 23,2 mg/ dL στις 2 εβδομάδες σε 39,2 mg/ dL στις 8 εβδομάδες. Το ηλιέλαιο επίσης αύξησε τα επίπεδα της HDL από 16,7 mg/ dL σε 27,7 mg/ dL. Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη η προσθήκη χοληστερόλης στη τροφή των πειραματόζων οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της LDL χοληστερόλης, ενώ μείωσε τα επίπεδα της HDL. Το ελαιόλαδο φάνηκε να έχει προστατευτικό ρόλο αυξάνοντας τα επίπεδα της HDL και να μειώνοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων.

Η διατροφή μπορεί να επηρεάσει την αθηροσκλήρωση ρυθμίζοντας τις λειτουργικές ιδιότητες των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Ειδικότερα το περιβάλλον των λιπιδίων του αγγειακού ενδοθηλίου, επηρεάζει τη φλεγμονώδη αντίδραση στην αθηροσκλήρωση και μπορεί να έχει συνολικά ευεργετικό επίδραση (Ringseis & Eder, 2010). Με την ανακάλυψη της σχέσης μεταξύ του διατροφικού λίπους και της αθηροσκλήρωσης, δίαιτες πλούσιες σε ελαιόλαδο έχουν αναγνωριστεί για την προστατευτική τους δράση (Acin *et al.*, 2007). Οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου στην καρδιαγγειακή νόσο έχουν αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητα σε MUFA, κυρίως ελαϊκό οξύ (Massimo *et al.*, 2004). Τα MUFA είναι αποτελεσματικά στη βελτίωση των λιπιδίων του ορού μέσα από τη μείωση της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων της LDL και την αύξηση της HDL (Moreno & Mitjavila, 2003). Εκτός αυτού, έχει αποδειχθεί ότι το ελαιόλαδο μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα (Tahvonnen *et al.*, 2005) η οποία μαζί με τη βελτίωση των λιπιδίων προστατεύει από την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Η διατροφή αρουραίων με αθηρογονική διαίτα (4% χοληστερόλη) βρέθηκε να αυξάνει τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, LDL, TG του ορού, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή ROS (Wakf *et al.*, 2010).

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι μια από τις σημαντικότερες καρδιοπροστατευτικές δράσεις του διατροφικού ελαϊκού οξέος είναι η ποσοτική και ποιοτική ρύθμιση των επιπέδων της χοληστερόλης στον ορό του αίματος. Η υπερχοληστερολαιμία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την αθηροσκλήρωση. Ενώ η υψηλή κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε κορεσμένο λίπος αυξάνει τις συγκεντρώσεις της χοληστερόλης στο πλάσμα, η διατροφική αντικατάσταση των κορεσμένων με μονοακόρεστα ή πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της (Mattson *et al.*, 1985, Mensink *et al.*, 1992).

Ειδικότερα, η κατανάλωση υψηλής περιεκτικότητας μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στη διατροφή, σε σύγκριση με πολυακόρεστα, διαθέτει το πλεονέκτημα επιλεκτικής μείωσης της LDL χωρίς να μειώνει την HDL (Mattson *et al.*, 1985), η αφθονία της οποίας είναι καθοριστικής σημασίας για την απομάκρυνση της περίσσειας της χοληστερόλης από τους εξωηπατικούς ιστούς και τη μεταφορά της στο ήπαρ και στα όργανα (αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης)

(Rigotti *et al.*, 1997). Πιο πρόσφατα ευρήματα έχουν δείξει ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου μπορούν να προσφέρουν περαιτέρω οφέλη στα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα συγκριτικά με τη μονοακορεστότητα τους (οξύτητα). Ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά (366mg/kg) αυξάνει τα επίπεδα της HDL, εκτός της μείωσης των επιπέδων των τριγλυκεριδίων σε σχέση με ελαιόλαδο χαμηλής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (Covas *et al.*, 2006).

Συγκρίνοντας την επίδραση διατροφής πλούσιας σε PUFA (ηλιέλαιο) με μια ισοθερμιδική Μεσογειακού τύπου Διατροφή πλούσια σε MUFA (ελαιόλαδο) στα μεταγευματικά επίπεδα των λιποπρωτεϊνών, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, χαμηλότερα επίπεδα βρέθηκαν μετά από τη διατροφή πλούσια σε ελαιϊκό οξύ (Thomsen *et al.*, 2003). Επιπλέον, σε διαβητικούς αρουραίους συμπληρωματική διατροφή με ελαιόλαδο έδειξε χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με το ηλιέλαιο ή ιχθυέλαιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ελαιόλαδο συμβάλει στον καλύτερο έλεγχο της υπερτριγλυκεριδαιμίας που συνοδεύει το διαβήτη (Giron *et al.*, 1999).

Σε πειραματικό μοντέλο αρουραίων τύπου Wistar, μετά από διατροφή τεσσάρων εβδομάδων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και της LDL στην ομάδα που λάμβανε χοληστερόλη και ελαιόλαδο και χοληστερόλη και ηλιέλαιο συγκριτικά με την ομάδα που λάμβανε χοληστερόλη, τα επίπεδα της οποίας αυξήθηκαν λόγω της διαιτητικής χοληστερόλης (Krzeminski *et al.*, 2003). Σε προηγούμενη έρευνα της ίδιας ομάδας το ελαιόλαδο επηρέασε θετικά το μεταβολισμό των λιπιδίων και την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Έτσι, όταν στα πειραματόζωα χορηγήθηκε παρθένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο λαμπάντε οι διαφορές στα λιπίδια ορού ήταν σημαντικές μόνο μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν με παρθένο ελαιόλαδο ή λαμπάντε και της ομάδας που διατρεφόταν με χοληστερόλη, όχι όμως και μεταξύ των δύο πρώτων και της ομάδας με συνήθη διατροφή. (Gorinstein *et al.*, 2002). Διατυπώθηκε μάλιστα η υπόθεση ότι η υποχοληστερολαιμική επίδραση του ελαιολάδου οφείλεται στην αύξηση της ροής της χολής, της χοληφόρου χοληστερόλης, της συγκέντρωσης των χολικών οξέων και την επακόλουθη αύξηση αυτών των ενώσεων στα κόπρανα και μάλιστα ότι οι φαινόλες του ελαιολάδου ήταν τα βιοδραστικά συστατικά. Άλλωστε, αυτό εξηγούσε την ισχυρότερη δράση του παρθένου ελαιολάδου έναντι του λαμπάντε.

Σε πειραματικό μοντέλο κουνελιών η διατροφή 6 εβδομάδων με ελαιόλαδο (15%) μείωσε στατιστικά σημαντικά την ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια και αύξησε την HDL, αποτελέσματα που έρχονται σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη αν και το ελαιόλαδο

που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10% και περίοδος παρέμβασης 8 εβδομάδες. Τα υψηλά τριγλυκερίδια που παρατηρήθηκαν στην ομάδα αθηρογονικής διατροφής (1% χοληστερόλη+SFA) οφείλονται στην υψηλή περιεκτικότητα της διατροφής σε λίπος (De La Cruz *et al.*, 2000). Σε άλλη μελέτη σε κόνικλους, χρησιμοποιήθηκε διατροφή υψηλή σε χοληστερόλη (1,5%) και λαρδί (3,5%) για 50 ημέρες. Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της χοληστερόλης και της LDL, καθώς και αυξημένη ευαισθησία της LDL στην οξείδωση η οποία συνδέεται με ανάπτυξη αγγειακών βλαβών (Ramirez-Tortosa *et al.*, 1998). Προσθήκη χοληστερόλης (1,3%) σε πειραματικό αθηρογονικό μοντέλο κουνελιών, οδηγεί σε αύξηση της χοληστερόλης στην αορτή και συγκεκριμένα στο αορτικό τόξο με τη δημιουργία ραβδώσεων (Aquilera *et al.*, 2002). Αυτό οφείλεται μάλλον στην υψηλή διαπερατότητα της oxLDL στο αορτικό τόξο μετά από διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη. Επιπλέον, η ηπατική στεάτωση που παρατηρήθηκε στην αθηρογονική ομάδα υποστηρίζει τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων χοληστερόλης στα επίπεδα της LDL των ζώων που έλαβαν πειραματικά διαιτητικά λιπίδια. Η παρουσία MUFA και ω-3 PUFA στην αορτή μετά από διατροφική παρέμβαση με ελαιόλαδο, μπορεί να εξηγήσει τα χαμηλά επίπεδα βλάβης σε σύγκριση με το ηλιέλαιο.

Τέλος, οι Rudel *et al* (1998) διαπίστωσαν παρόμοιο βαθμό ανάπτυξης βλάβης σε υπερχοληστερολαιμικά ποντίκια, συγκρίνοντας τα ζώα που είχαν τραφεί με MUFA και αυτά που κατανάλωναν κορεσμένα λίπη, ενώ η κατανάλωση PUFA στη διατροφή τους είχε σημαντικά λιγότερες βλάβες. Οι λόγοι για την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών οφείλονται στο είδος του ζώου και στην πηγή λίπους που χρησιμοποιούν.

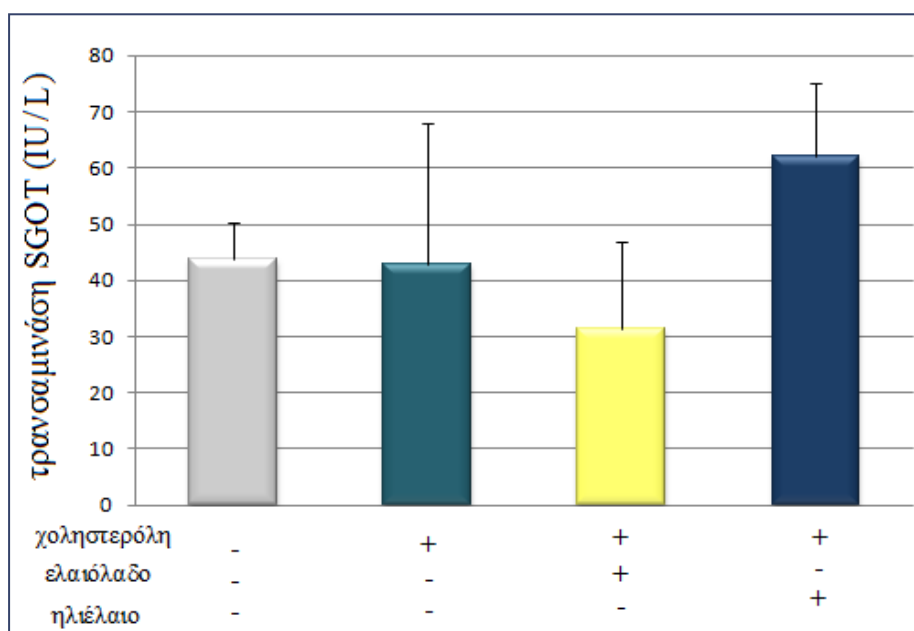
3.2.2 Ηπατικά ένζυμα

Το λιπώδες ήπαρ συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ενός καρδιαγγειακού επεισοδίου. Ο αυξημένος αυτός κίνδυνος φαίνεται να σχετίζεται με τη συστηματική φλεγμονή που συνοδεύει το λιπώδες ήπαρ και η οποία επιταχύνει τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών, που προκαλούν στεφανιαία νόσο και άλλα καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι βασικές μεταβολικές και χημικές λειτουργίες του ήπατος γίνονται με τη βοήθεια ηπατικών ενζύμων, τα οποία υπάρχουν κανονικά στο αίμα μόνο σε μικρές ποσότητες.

Σημαντική λοιπόν είναι η διερεύνηση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων καθώς έχουν καθοριστικό ρόλο για τις ζωτικές λειτουργίες του αίματος. Οι κυριότερες βιοχημικές εξετάσεις που αφορούν το ήπαρ είναι οι τρανσαμινάσες (ασπαρτική τρανσαμινάση- AST- SGOT και αλανινική τρανσαμινάση- ALT- SGPT), η γ-GT, η αλκαλική φωσφατάση και η χολερυθρίνη.

Ασπαρτική τρανσαμινάση (AST)

Η ασπαρτική τρανσαμινάση (AST- Aspartate transaminase), γνωστή και ως γλουταμινική οξαλική τρανσαμινάση ορού (SGOT- Serum glutamil Oxaloacetic Transaminase) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αλληλομετατροπή των αμινοξέων και των κετοξέων με μεταφορά αμινομάδων και ειδικότερα καταλύει την ανταλλαγή της αμινομάδας του ασπαρτικού με την οξο- ομάδα του 2- κετογλουταρικού για το σχηματισμό οξαλικού και γλουταμινικού. Η SGOT είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλους τους ιστούς με σημαντικές ποσότητες στην καρδιά και στο ήπαρ. Σχεδόν όλη η ποσότητα του ενζύμου είναι ενδοκυττάρια και οποιαδήποτε βλάβη στους ιστούς αυτούς προκαλεί απελευθέρωση του ενζύμου SGOT στην κυκλοφορία γεγονός που προσδίδει την ικανότητα να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κυτταρικής καταστροφής.



Σχήμα 3.5 Μέτρηση των επιπέδων της SGOT στον ορό του αίματος σε χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Χρησιμοποιείται στη διάγνωση ηπατικών και ισχαιμικών καρδιακών νοσημάτων. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη θα αναλυθούν μόνο οι αλλαγές στην ασπαρτική τρανσαμινάση, αφού η αλανινική αμινοτρανσφεράση αποτελεί δείκτη για τη διάγνωση μόνο ηπατικών νοσημάτων.

Στο σχήμα 3.5 παρουσιάζονται τα διαφορετικά επίπεδα της τρανσαμινάσης SGOT για 3 ομάδες παρέμβασης. Αυτά είναι: $43,7 \pm 6,5$ IU/L, $43 \pm 24,9$ IU/L, $31,5 \pm 15,5$ IU/L, $62 \pm 3,1$ IU/L για το control, την ομάδα της χοληστερόλης, του ελαιολάδου και του ηλιέλαιου αντίστοιχα. Το ελαιόλαδο φαίνεται να μειώνει το ηπατικό αυτό ένζυμο σε σχέση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με την ομάδα της χοληστερόλης, ενώ το ηλιέλαιο αυξάνει τα επίπεδα του.

Η υπερβολική ακατάλληλη διαιτητική πρόσληψη λίπους σε συνδυασμό με την περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη, τη συνεχή υδρόλυση των TG μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και άλλες γενετικές αλλαγές στα βασικά μεταβολικά μονοπάτια των λιπιδίων, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα (Sanyal *et al.*, 2001) που οδηγεί σε υπερβολική συσσώρευση λίπους στο μυϊκό ιστό και αυξάνει τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων και των εστέρων χοληστερόλης στο ήπαρ. Η υψηλή συγκέντρωση TG στο αίμα με τη μορφή VLDL συνοδεύει αυτή την κατάσταση και προκαλεί τη δραστηριότητα των μεταφορέων εστέρων χοληστερόλης από τις VLDL στην HDL και την επακόλουθη κάθαρση της HDL και μείωση της συγκέντρωσής της (Sanyal *et al.*, 2001).

Μελέτες σε ανθρώπους και ζώα υποδεικνύουν ότι οι διαιτητικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη λιπώδη διήθηση και την υπεροξειδωση των λιπιδίων σε διάφορους τύπους νοσημάτων του ήπατος, συμπεριλαμβανομένης της NAFLD (μη αλκοολική λιπώδης ηπατική νόσος) (Fernández *et al.*, 1997, Mezey *et al.*, 1998). Πρόσφατα αξιολογήθηκε η επίδραση των διαφορετικών τύπων διατροφικών λιπών στην περιεκτικότητα των λιπιδίων του ήπατος και το οξειδωτικό στρες, σε ήπαρ αρουραίων με πειραματική NAFLD (Hussein *et al.*, 2007). Σε αυτή τη μελέτη το ελαιόλαδο μείωσε τη συσσώρευση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, βελτίωσε την αντίσταση στην ινσουλίνη, αύξησε την απελευθέρωση των TG από το ήπαρ και μείωσε τη ροή των ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον περιφερικό λιπώδη ιστό πίσω στο ήπαρ. Η θεραπεία με ισορροπημένη διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο συνέβαλε στην ανάκαμψη του ήπατος από ηπατική στεάτωση (Hernández *et al.*, 2005). Αυτό επιτεύχθηκε με τη μείωση της ενεργοποίησης των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων από τα MUFA, που είναι λιγότερο ευάλωτα στην οξείδωση.

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν τον ευεργετικό ρόλο του ελαιολάδου στη βελτίωση των λιπιδίων του πλάσματος (Alonso *et al.*, 2006). Το παρθένο ελαιόλαδο έχει βιοδραστικές ενώσεις με ευεργετική αντιοξειδωτική δράση (Etherton *et al.*, 2002). Η ολεοκανθόλη, φυσικό συστατικό που βρίσκεται στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, είναι ένα φυσικό αντιφλεγμονώδες που έχει δραστηριότητα και χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα της ιβουπροφαίνης (Beauchamp *et al.*, 2005). Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου τα MUFA και το ελαιόλαδο μπορούν να μεταβάλλουν το περιεχόμενο των ηπατικών TG δεν είναι σαφές. Η διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο συμβάλλει στην ανακατανομή του λίπους του σώματος και τροποποιεί τη λιπολυτική αποτελεσματικότητα των λιποκυττάρων (Soriguer *et al.*, 2003). Το ελαϊκό οξύ μειώνει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ηπατική γλυκονεογένεση και λιπογένεση, σε αρουραίους με λιπώδες ήπαρ (Sato *et al.*, 2007). Πολυφαινόλες που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, όπως η ολεωρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, το καφεϊκό οξύ, έχουν σημαντική

αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Lampe *et al.*, 1999, Covas *et al.*, 2006). Σε λευκοκύτταρα αρουραίων, τα μόρια αυτά έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την παραγωγή λευκοτριενίων B₄ στο επίπεδο της λιποξυγονάσης-5 και μειώνουν την παραγωγή των ROS (de la Puerta *et al.*, 1999).

Η κατανάλωση ελαιολάδου αποκλειστικά ή ως συστατικού γεύματος οδηγεί μεταγευματικά, σε αντίστροφη συσχέτιση με τον TNF-α και τα επίπεδα των κυττάρων των μορίων προσκόλλησης, καθώς και βελτιωμένη γλυκαιμική ανοχή (Martinez *et al.*, 2005). Επιπλέον, μια Μεσογειακού τύπου Διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο της αθηροσκλήρωσης και τον αριθμό των υπολειμμάτων των χυλομικρών σε σύγκριση με μια διατροφή πλούσια σε λινελαϊκό οξύ (Järvinen *et al.*, 2005). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του ελαιολάδου έγκειται στη μείωση της ενεργοποίησης του NF-kB, στη μείωση της οξείδωσης της LDL και στη βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη.

3.3 Συγκέντρωση βιταμίνης E σε έλαια και σε δείγματα τροφής

Η βιταμίνη E αποτελεί κυρίαρχη βιταμίνη στα έλαια. Λόγω της λιπόφιλης φύσης της εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στις κυτταρικές μεμβράνες. Αποτελεί το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό, συντελώντας στη σταθερότητα της μεμβράνης. Προστατεύει τις βασικές κυτταρικές δομές από την καταστροφή που προκαλούν οι οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες και τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στην αντιοξειδωτική της λειτουργία, εντάσσεται η επίδραση της στην κυτταρική απάντηση στο οξειδωτικό στρες μέσω της διαφοροποίησης των οδών μεταγωγής σημάτων (Azzi *et al.*, 1999).

Στην παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός της βιταμίνης E έγινε με τη χρήση μεθόδου υγρής χρωματογραφίας. Σκοπός ήταν να μελετηθεί αν η βιταμίνη E στο ελαιόλαδο και στο ηλιέλαιο αλλοιώνεται με την πάροδο των ημερών είτε ξεχωριστά στο κάθε έλαιο, είτε στο μίγμα ελαίου- τροφής.

Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της βιταμίνης E στο ελαιόλαδο κατά την πάροδο 3 ημερών. Η συνολική βιταμίνη E στο ελαιόλαδο την ημέρα 1 αντιστοιχούσε σε 18,7 mg/ 100g ελαιολάδου, ενώ την ημέρα 2 και 3 σε 14,9 και 15,7 mg/ 100g ελαιολάδου αντίστοιχα. Το ποσοστό της βιταμίνης E που παρέμεινε στην ενεργή του μορφή, χωρίς να οξειδωθεί είναι 79,8% και 84,3 % για τη δεύτερη και τρίτη μέρα αντίστοιχα.

Πίνακας 3.3 Συνολική βιταμίνη E σε mg/ 100 g ελαιολάδου την ημέρα 1 (OO1), την ημέρα 2 (OO2) και την ημέρα 3 (OO3)

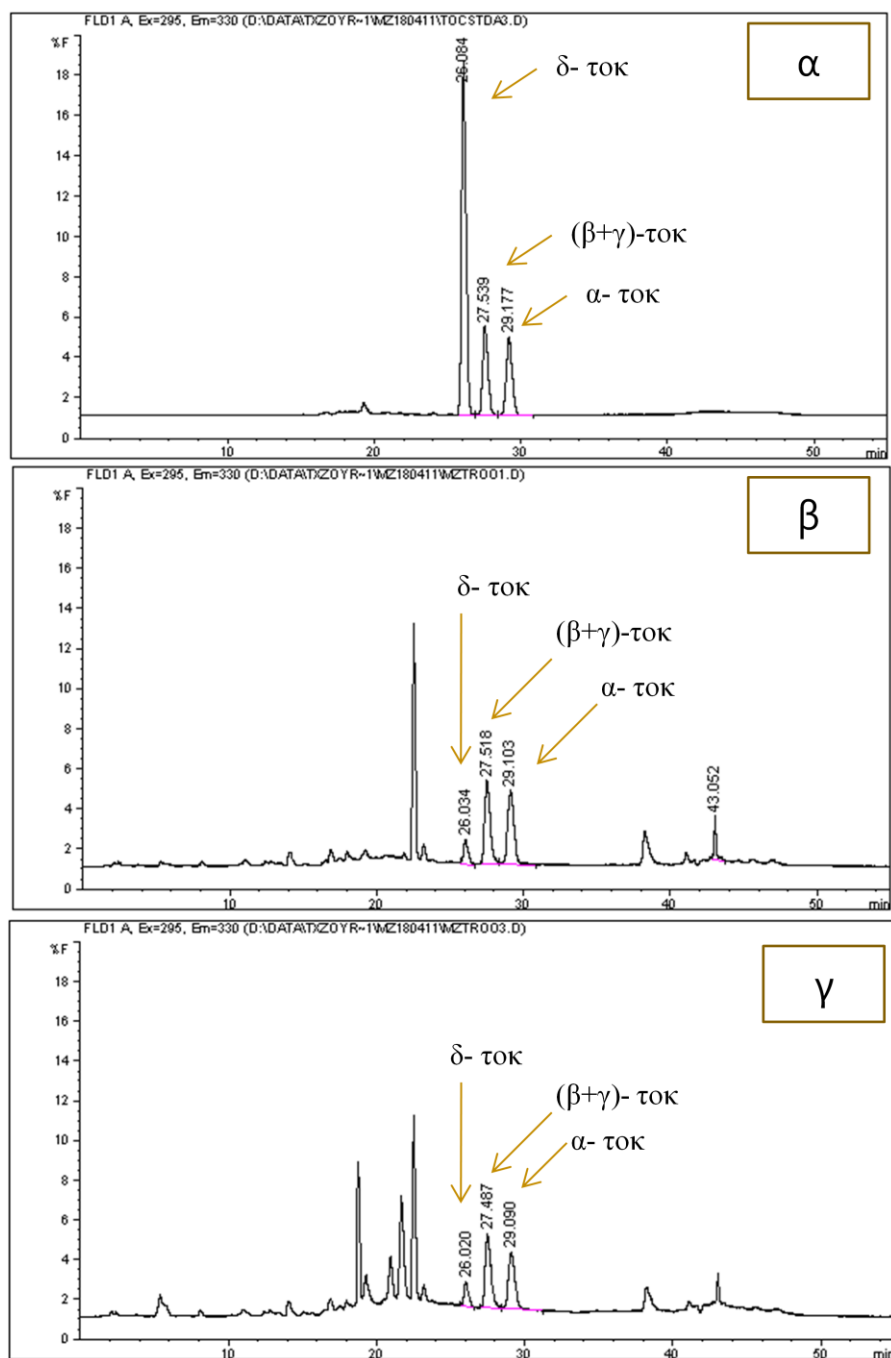
ελαιόλαδο	έλαιο (g)	δ- τοκοφερόλη (mg/100g ελαίου)	(β+γ)- τοκοφερόλη (mg/ 100g ελαίου)	α- τοκοφερόλη (mg/ 100g ελαίου)	συνολική βιταμίνη E (mg/ 100g ελαίου)
OO1	0,090	0	0,5	18,2	18,7
OO2	0.089	0	0,4	14,5	14,9
OO3	0,090	0	0,4	15,3	15,7

Στον πίνακα 3.4 φαίνονται τα αποτελέσματα για τη βιταμίνη E στο ηλιέλαιο. Η συγκέντρωση της βιταμίνης E την πρώτη, δεύτερη και τρίτη ημέρα κυμαίνεται στα ίδια περίπου επίπεδα 34,1, 38,4 και 34,3 mg/ 100g ηλιελαίου αντίστοιχα. Καμία μεταβολή δεν υπήρξε στην συγκέντρωση της βιταμίνης.

Πίνακας 3.4 Συνολική βιταμίνη E σε mg/ 100 g ηλιελαίου την ημέρα 1 (sf1), την ημέρα 2 (sf2) και την ημέρα 3 (sf3)

Ηλιέλαιο	έλαιο (g)	δ- τοκοφερόλη (mg/ 100g ελαίου)	(β+γ)- τοκοφερόλη (mg/ 100g ελαίου)	α- τοκοφερόλη (mg/ 100g ελαίου)	συνολική βιταμίνη E (mg/ 100g ελαίου)
sf1	0,090	0,4	4,3	29,4	34,1
sf2	0.089	0,4	4,9	33,0	38,4
sf3	0,088	0,4	4,4	29,6	34,4

Αφού δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στη βιταμίνη E στα δύο έλαια, ελαιόλαδο και ηλιέλαιο, επόμενο βήμα αποτέλεσε η μέτρηση της βιταμίνης E και ο καθορισμός της ποσότητας που παραμένει δραστική σε μίγματα τροφής. Το ένα μίγμα αποτελούσαν από τυποποιημένη τροφή κουνελιών και ελαιόλαδο (OO), ενώ το άλλο τυποποιημένη τροφή και ηλιέλαιο (sf). Από τον πίνακα 3.5 συγκρίνοντας την ημέρα 1 με την ημέρα 3, διαπιστώνεται ότι και σε μίγμα τροφής η ποσότητα της βιταμίνης E παραμένει σταθερή. Πιο συγκεκριμένα την ημέρα 1, η βιταμίνη E αντιστοιχεί σε 2,6 mg/ 100g ελαιολάδου ενώ την ημέρα 3 σε 2,1 mg. Αντίστοιχα για το ηλιέλαιο την ημέρα 1 βρίσκεται σε επίπεδα της τάξης των 2,5 mg και την ημέρα 3 στα 2,8 mg/ 100g ηλιελαίου. Στο σχήμα 3.6 δίνεται το ανάλογο χρωματογράφημα.



Σχήμα 3.6 Τυπικό HPLC χρωματογράφημα **α.** πρότυπων ουσιών α, (β+γ) και δ τοκοφερολών, **β.** τοκοφερολών σε μίγμα τροφής και εξτρα παρθένου ελαιολάδου εκτεθειμένου στις πειραματικές συνθήκες για 24h, **γ.** τοκοφερολών σε μίγμα τροφής και εξτρα παρθένου ελαιολάδου εκτεθειμένου στις πειραματικές συνθήκες για 72h

Πίνακας 3.5 Συνολική βιταμίνη E σε mg/ 100 g τροφής. Σε μίγμα τροφής με ελαιόλαδο και με ηλιέλαιο την ημέρα 1 (OO1) (sf1) και την ημέρα 3 (OO3) (sf3) αντίστοιχα

τροφή	βάρος τροφής (g)	δ- τοκοφερόλη (mg/ 100g τροφής)	(β+γ)- τοκοφερόλη (mg/ 100g τροφής)	α- τοκοφερόλη (mg/ 100g τροφής)	συνολική βιταμίνη E (mg/ 100g τροφής)
OO1	0,13	0,1	0,4	2,0	2,6
OO3	0,13	0,2	0,4	1,6	2,1
sf1	0,13	0,1	0,4	1,9	2,5
sf3	0,13	0,2	0,7	1,9	2,8

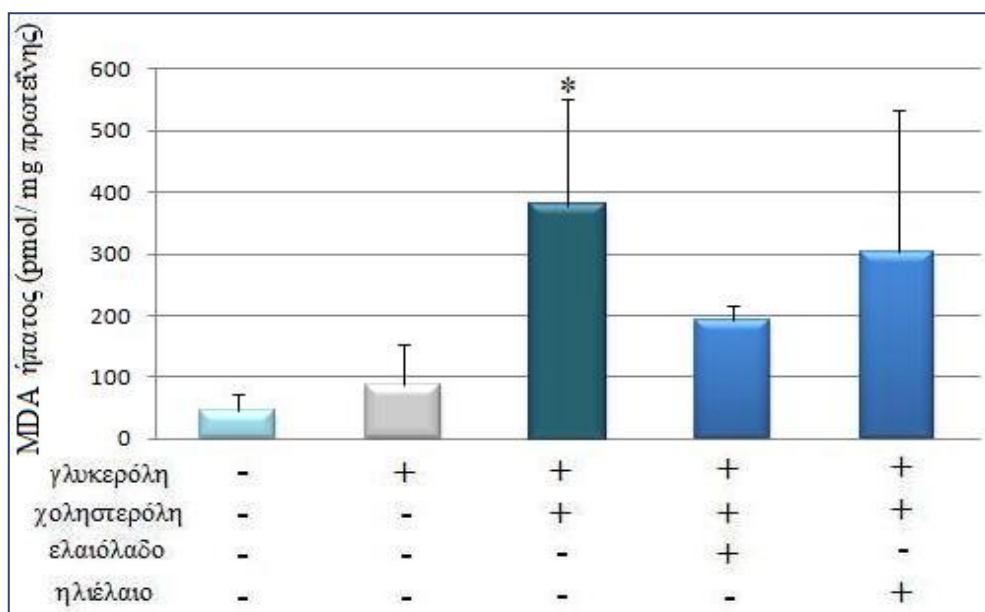
Το ηλιέλαιο είναι το πλουσιότερο φυτικό έλαιο σε α- τοκοφερόλη (Bester *et al.*, 2010), ενώ περιέχει και μεγάλη ποικιλία στερολών όπως καμπεστερόλη, β- σιτοστερόλη και άλλες. Η βιταμίνη E βρίσκεται σε αυτό σε διπλάσιες περίπου ποσότητες. Σε αυτή την αυξημένη ποσότητα κυρίως α- τοκοφερόλης και παρά την υψηλή του αναλογία σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (60-70%) οφείλεται η σταθερότητα των συστατικών του, ύστερα από έκθεση σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Το ελαιόλαδο αποτελείται κυρίως από MUFA, εκ των οποίων το ελαϊκό οξύ αποτελεί το 72-79% και αντιοξειδωτικά συστατικά, τις πολυφαινόλες (Owen *et al.*, 2000). Σε σύγκριση με τα PUFA τα MUFA είναι λιγότερο ευάλωτα στην οξείδωση. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αύξηση της διαθεσιμότητας των αντιοξειδωτικών στη δραστική τους μορφή και κατά συνέπεια στην υψηλότερη σταθερότητα του ελαιολάδου (Eder *et al.*, 2006, Diniz *et al.*, 2004). Τα μικροσυστατικά του ελαιολάδου όχι μόνο έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία αλλά επίσης είναι σημαντικά για το χρόνο ζωής και τη σταθερότητα του ελαιολάδου. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν επανειλημμένα χαρακτηριστεί ως ισχυρά αντιοξειδωτικά. Πολλές ερευνητικές ομάδες αναφέρουν ότι το ποσό των φαινολικών ενώσεων στο παρθένο ελαιόλαδο σχετίζεται ιδιαίτερα με τη σταθερότητα του (Gutierrez *et al.*, 1999, Baldioli *et al.*, 1996, Arapicio *et al.*, 1999). Έτσι οι πολυφαινόλες συμμετέχουν ενεργά στην προστασία του ελαιολάδου από την οξείδωση και τα παρθένα ελαιόλαδα με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, είναι πιο ανθεκτικά στην αυτοοξείδωση (Boskou., 1996). Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο περιεχόμενο των παρθένων ελαιολάδων σε πολυφαινόλες και στη σταθερότητά τους έναντι της οξείδωσης. (Gutfinger, 1981). Σε ανάλογη έρευνα διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα του ελαιολάδου κατά της αυτό-οξείδωσης σχετίζεται τόσο με την ολική περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες, όσο και με την αναλογία υδροξυτυροσόλης/ τυροσόλη (Psomiadou *et al.*, 2002). Από μόνη της η τυροσόλη δε συμβάλλει στη σταθερότητα του ελαιολάδου, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τους Papadopoulos *et al* (1991), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η τυροσόλη δε συμβάλλει στην αντιοξειδωτική επιδράση, ενώ η

υδροξυτυροσώλη έχει κάποια επίδραση. Παρόλο τη συμφωνία για την ταύτιση των φαινολικών συστατικών με τη σταθερότητα του ελαιολάδου οι απόψεις για το αν οι τοκοφερόλες σχετίζονται με αυτή διίστανται. Κανένας συσχετισμός δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε α- τοκοφερόλη και της οξειδωτικής του σταθερότητας (De Stafani *et al.*, 2000), ενώ αντίθετα οι Gutierrez *et al.* (1999) βρήκαν να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση.

3.4 Μέτρηση των επιπέδων της μαλοναλδεΐδης (MDA)

Η MDA είναι η κύρια αλδεΐδη που σχηματίζεται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων σε οξειδωτικό στρες. Η κύρια πηγή της MDA σε βιολογικά δείγματα είναι η υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με 2 ή περισσότερους διπλούς δεσμούς, που ανάμεσα τους υπάρχει ένα μεθυλένιο. Η παραγωγή αυτής της αλδεΐδης χρησιμεύει ως βιοδείκτης, για την εκτίμηση του επιπέδου του οξειδωτικού στρες σε ένα οργανισμό. Για παράδειγμα, η μέθοδος που εφαρμόζεται για την αξιολόγηση του βαθμού οξείδωσης της LDL είναι φωτομετρική με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) (Armstrong & Browne, 1994). Το μόριο της LDL είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες (Belcher *et al.*, 1999) και η οξειδωμένη της μορφή ενοχοποιείται για την έναρξη της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης (Pietzsch & Julius 2001), ενώ η μη τροποποιημένη LDL δεν είναι σημαντικά τοξική. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της οξείδωσης, προσδιορίζεται η συγκέντρωση συμπλέγματος θειοβαρβιτουρικού οξέος-μαλοναλδεΐδης (TBA- MDA), που αποτελεί δευτερεύον προϊόν οξείδωσης των λιπαρών οξέων.

Στο σχήμα 3.7 παρατίθενται οι μετρήσεις των επιπέδων μαλοναλδεΐδης στο ήπαρ. Η μαλοναλδεΐδη που εκφράζεται σε pmol/ mg πρωτεΐνης, ήταν 44 ± 27 pmol/ mg πρωτεΐνης για τα ζώα που λάμβαναν φυσιολογική τροφή, $86 \pm 68,4$ pmol/ mg πρωτεΐνης, $378 \pm 173,1$ pmol/ mg πρωτεΐνης, $193 \pm 21,8$ pmol/ mg πρωτεΐνης και $302 \pm 230,5$ pmol/ mg πρωτεΐνης για την τροφή με παρέμβαση γλυκερόλης, χοληστερόλης, ελαιολάδου και ηλιέλαιου αντίστοιχα. Μόνο στα κουνέλια που έπαιρναν μίγμα τροφής με χοληστερόλη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των προϊόντων οξείδωσης των λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το control δείγμα (φυσιολογική τροφή) ($p=0,03$), γεγονός που σημαίνει ότι δημιουργήθηκε το αθηρωματικό μοντέλο πειραματόζωων. Στην ομάδα με την παρέμβαση του ελαιολάδου η μείωση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων ήταν μεγάλη και μάλιστα μεγαλύτερη από αυτή του ηλιέλαιου αλλά όχι στατιστικά σημαντική ($p=0,689$).



Σχήμα 3.7 Μέτρηση των επιπέδων μαλοναλδεϋδης στο ήπαρ, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Η μέτρηση των επιπέδων της μαλοναλδεϋδης πραγματοποιήθηκε και στην καρδιά. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.6

Πίνακας 3.6 Τα επίπεδα της MDA στην καρδιά για τις 5 ομάδες του πειράματος. Όπου nd= normal diet, gl= glycerol, ev= extra virgin oil, sf= sunflower oil. Οι τιμές εκφράζονται σε pmol/ mg πρωτεΐνης και είναι ο μ.ο. $\pm$ SD. Όπου δ.α= δεν ανιχνεύονται

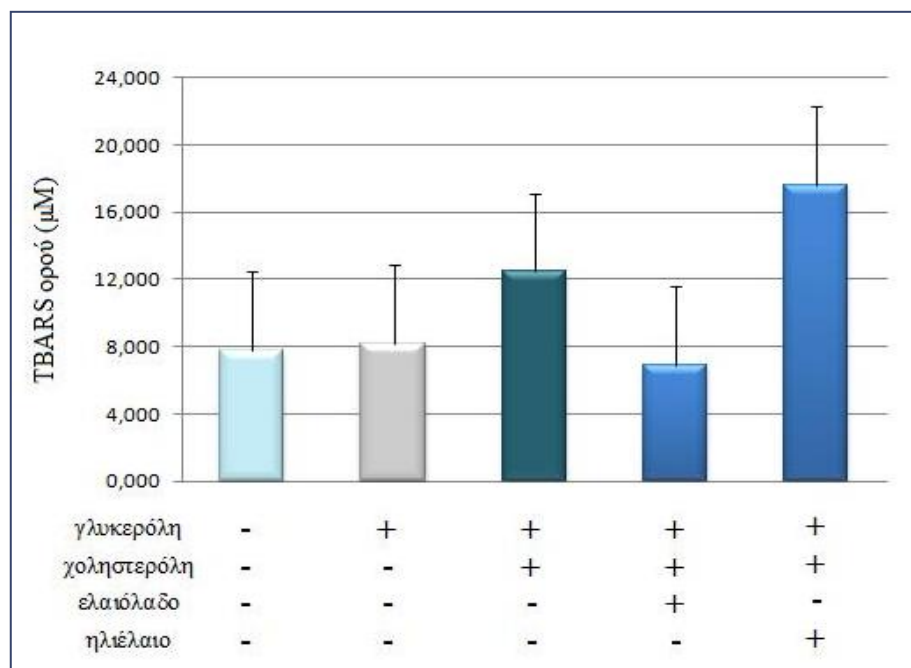
MDA heart		MDA pmol/ mg πρωτεΐνης
nd		δ.α
gl		2,6
chol		66,6
ev		66,6
sf		45,3

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα τα επίπεδα της MDA δεν ανιχνεύονται στην καρδιά.

Το προϊόν της αντίδρασης της MDA και του TBA είναι ένα σύμπλοκο υψηλής απορροφητικότητας, το οποίο μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί με φασματοφωτόμετρο. Μια από τις πρώτες και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανίχνευση της MDA είναι εκείνη που αναπτύχθηκε από τον Yagi (1976) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε TBARS για τον ορό του αίματος.

Τα αποτελέσματα από τη χρήση της παραπάνω μεθόδου στον ορό φαίνονται στο σχήμα 3.8. Η παρέμβαση του ελαιολάδου οδήγησε σε μείωση των προϊόντων οξείδωσης της LDL (6,8

$\pm 4,8 \mu\text{M}$ MDA), χωρίς αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Η προσθήκη χοληστερόλης στην τροφή επέφερε αύξηση της οξείδωσης της LDL της τάξης των $12,4 \pm 4,7 \mu\text{M}$ MDA και του ηλιέλαιου $17,6 \pm 4,6 \mu\text{M}$ MDA, ενώ αυτή της φυσιολογικής τροφής ήταν $7,7 \pm 4,6 \mu\text{M}$ MDA. Καμία όμως διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$).



Σχήμα 3.8 Μέτρηση των επιπέδων TBARS στον ορό, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα που εξετάζεται *in vivo* αποδίδεται κυριότερα στις περιεχόμενες πολυφαινόλες. Παρόλο αυτά δεν υπάρχουν σαφή συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητά τους. Σε εθελοντές που κατανάλωναν διατροφή πλούσια σε πολυφαινόλες για 3 εβδομάδες δεν παρατηρήθηκε μείωση της οξειδωμένης LDL στον ορό (Vissers *et al.*, 2001).

Σε μελέτη σε αρουραίους τύπου Wistar διερευνήθηκε η επίδραση συμπληρωμάτων βρώσιμων ελαίων στην υπεροξείδωση των λιπιδίων του ήπατος. Οι αρουραίοι ταΐστηκαν με τυποποιημένη τροφή, καθώς και με τροφή εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο, ηλιέλαιο και κραμβέλαιο για 4 εβδομάδες. Από το σύνολο των πειραμάτων σε βρέθηκε το ελαιόλαδο να συμβάλλει στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, ούτε όμως φάνηκε να υπάρχει αντιοξειδωτική προστασία που να αποδίδεται σε αυτό (Eder *et al.*, 2006). Ωστόσο, η χημική ανάλυση από τους Briante *et al* (2004), έδειξε ότι οι πολυφαινόλες που απαντούν στο ελαιόλαδο ($< 23 \mu\text{g}$ ολεωρωπαΐνη/ mg και $18 \mu\text{g}$ υδροξυτυροσόλης/ mg) μπορεί να έχουν αντιοξειδωτική και προ-οξειδωτική δράση. Διατυπώθηκε το συμπέρασμα ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο έχουν προ-οξειδωτική δράση στην LDL, ενώ σε υψηλές

συγκεντρώσεις έχουν αντιοξειδωτική δράση. Τα ιόντα μετάλλων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα επίπεδα της οξειδωμένης LDL *in vivo*. Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου πάντως φαίνεται να μειώνουν την από ιόντα Cu οξειδωτική τροποποίηση της LDL (Briante *et al.*, 2004, Visioli *et al.*, 1995).

Το παρθένο ελαιόλαδο σε σύγκριση με εμπλουτισμένο με α- τοκοφερόλη ηλιέλαιο επιδεικνύει υψηλότερη προστασία στην οξείδωση της LDL (Aquilera *et al.*, 2004). Οι δυο τύποι ελαίου χορηγήθηκαν σε άνδρες με περιφερική αγγειακή νόσο για 4 μήνες. Το συνολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο στο αίμα από την κατανάλωση ελαιολάδου ήταν μικρότερο από αυτό του ηλιέλαιου. Ωστόσο το ελαιόλαδο φάνηκε να προστατεύει την LDL από την οξείδωση *ex vivo*. Ακόμη και αν γινόταν εμπλουτισμός του ηλιέλαιου με επιπλέον βιταμίνη E, στους εθελοντές που προσλάμβαναν το έλαιο με την υψηλή βιταμίνη E και τη μεγαλύτερη ακορεστότητα, η οξειδωτική σταθερότητα της LDL ήταν μικρότερη από την ομάδα που προσλάμβανε ελαιόλαδο. Διατυπώθηκε το συμπέρασμα, ότι στην οξείδωση της LDL τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου ήταν ισχυρότεροι αναστολείς από τη βιταμίνη E του ηλιέλαιου.

Από την άλλη μεριά η ολεωρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη έχουν αποδειχθεί να εμφανίζουν μια δόσοεξαρτώμενη σχέση με την οξείδωση της LDL (Aquilera *et al.*, 2004, Visioli *et al.*, 2002, Owen *et al.*, 2002) και φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από τη βιταμίνη E. Σε έρευνα των Andrikopoulos *et al.*, (2002) εκτός από την ολεωρωπαϊνή, η ρουτίνη, η κερκετίνη και η λουτεολίνη, πολυφαινόλες που απαντούν στο ελαιόλαδο σε μικρότερες συγκεντρώσεις από την υδροξυτυροσόλη και την ολεωρωπαϊνή, έδειξαν την ίδια αναστολή της οξείδωσης της LDL με εκείνη της ολεωρωπαϊνής. Η επίδραση των πολυφαινολών αυτών στην οξείδωση της LDL μπορεί να αποδοθεί στο μειωμένο σχηματισμό μικρής αλύσου αλδεϋδών και υπεροξειδίων των λιπιδίων καθώς και στην αύξηση της περιεκτικότητας της βιταμίνης E στο μόριο της λιποπρωτεΐνης. Η υδροξυτυροσόλη έχει αποδειχθεί να μειώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Visioli *et al.*, 2002, Fabiani *et al.*, 2002), δράση που μαζί με τις προαναφερθείσες σχετίζονται με μειωμένη φλεγμονώδη αντίδραση. Οι δύο αυτές ενώσεις, η ολεωρωπαϊνή (που προέρχεται από εκχύλισμα φύλλων ελιάς) και η υδροξυτοροσόλη, δρούν συνεργιστικά για την αναστολή της LDL από την οξείδωση και κατά συνέπεια για την αναστολή της αθηροσκλήρωσης (Briante *et al.*, 2004).

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κόνικλους δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην οξείδωση της LDL μεταξύ της διατροφής με παρθένο ελαιόλαδο και αυτής με

χοληστερόλη (Aquilera *et al.*, 2002). Οι συγκεντρώσεις της MDA ήταν μειωμένες σε διατροφή με εξευγενισμένο έλαιο μόνο όταν γινόταν σύγκριση με το ηλιέλαιο (Wiseman *et al.*, 1996).

Η μείωση της MDA ήπατος που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, αν και όχι στατιστικά σημαντική, έχει μεγάλη βιολογική σημασία. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το ελαιόλαδο μειώνει το οξειδωτικό στρες έχει διατυπωθεί ότι είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε MUFA, κυρίως ελαϊκό οξύ που είναι λιγότερο ευαίσθητο στην οξείδωση, καθώς και η υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο ασαπωνοποίητο κλάσμα και έχουν βρεθεί μόνο στο παρθένο ελαιόλαδο. Η μείωση στα επίπεδα της MDA στο ήπαρ, μπορεί τελικά να συμβάλλει στη μείωση της ηπατικής βλάβης (Grissa *et al.*, 2008).

Η υπερχοληστερολαιμία επάγει τη λιπιδική υπεροξείδωση, η οποία προκαλεί αύξηση των επιπέδων της MDA οδηγεί σε διέγερση του αντιοξειδωτικού συστήματος στην αορτή (Boccio *et al.*, 1990). Έτσι σε κουνέλια που λάμβαναν βιταμίνη E ή/ και ιχθυέλαιο βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα TBARS στην αορτή, συγκριτικά με εκείνα που έπαιρναν χοληστερόλη.

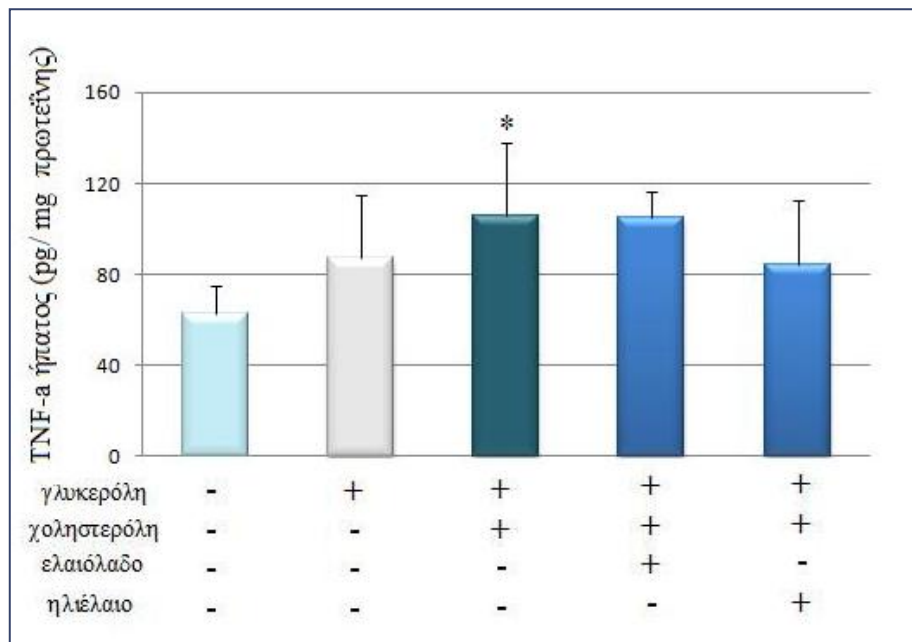
3.5 Μέτρηση των επιπέδων κυτταροκινών

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η αθηροσκλήρωση δεν είναι απλώς μια διαταραχή των λιπιδίων αλλά και μία φλεγμονώδης νόσος (Hansson *et al.*, 2006). Τα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, οι οποίες ασκούν τόσο προ- όσο και αντι- φλεγμονώδεις δράσεις. Προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες της κατηγορίας της ιντερλευκίνης θεωρούνται βασικοί παράγοντες στη χρόνια αγγειακή φλεγμονή, χαρακτηριστική της αθηροσκλήρωσης (Mangge *et al.*, 2004). Η παρουσία ιντερλευκινών και των υποδοχέων τους έχει αποδειχθεί σε αθηρωματικούς ιστούς και τα επίπεδα στον ορό αρκετών από αυτές βρέθηκε να σχετίζονται θετικά με τη στεφανιαία νόσο και τις επιπτώσεις της. Εκτός από τις ιντερλευκίνες, κυτταροκίνες που σχετίζονται με τα μακροφάγα όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), ο παράγοντας που αναστέλλει τη μετανάστευση των μακροφάγων (MIF), η ιντερφερόνη (IFN) αποτελούν και αυτοί βασικοί παράγοντες στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης (Bernhagen *et al.*, 2007, Harvey *et al.*, 2006). Ανάλυση της τοπικής αγγειακής φλεγμονής και των κυτταροκινών που εκφράζονται σε αθηρωματικές πλάκες έδειξε ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των προ-φλεγμονωδών και των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών και ότι αυτή η ισορροπία είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη της βλάβης.

3.5.1 Επίπεδα του TNF- alpha

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α) είναι μία πλειοτροπική κυτταροκίνη που ασκεί ισχυρή προφλεγμονώδη δράση σε αθηροσκληρωτικές καθώς και σε άλλες μεταβολικές και φλεγμονώδεις διαταραχές όπως η παχυσαρκία, η ινσουλινοαντίσταση, επίσης παράγοντες κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Ο TNF-α παράγεται κυρίως από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Τα επίπεδα του TNF-α συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο επανεμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου, πάχυνση των καρωτίδων του μέσου και έσω χιτώνα, διαταραχές των τριγλυκεριδίων και της ομοιόστασης της γλυκόζης και με την ηλικία που σχετίζεται με την αθηροσκλήρωση. Όπως όλες οι κυτοκίνες μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, ενώ προκαλεί άμεσα ή έμμεσα και οξειδωτικό στρες ή οξείδωση λιπιδίων, φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (Wang & Oosterhof, 2000). Σημαντικός είναι και ο ρόλος του στον κυτταρικό θάνατο μέσα από μια ποικιλία κυτταρικών μηχανισμών. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αυτές οι κυτοτοξικές επιδράσεις είναι σημαντικές στην άμυνα του ξενιστή προκαλώντας την έναρξη τόσο αντιογκογόνου διαδικασίας όσο και τη ρύθμιση ανάπτυξης και τη διαφοροποίηση του κυττάρου (Ferrari *et al.*, 1999).

Έχει αναφερθεί μια σχέση μεταξύ της φλεγμονής και των λιπιδίων του μεταβολισμού. Ο TNF-α λειτουργεί ως κλειδί πρωτεΐνη που επηρεάζει και μεσολαβεί στον ενδιάμεσο μεταβολισμό (Zhank *et al.*, 2009). Για το λόγο αυτό επόμενο βήμα στην παρούσα μελέτη ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων του στο ήπαρ. Στο σχήμα 3.9 παρατηρείται μια αρκετά μεγάλη αύξηση των επιπέδων του TNF- α στην ομάδα που έπαιρνε χοληστερόλη της τάξης των $105,4 \pm 32,3$ pg/ mg πρωτεΐνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου $62,4 \pm 12,3$ pg/ mg πρωτεΐνης. Η αύξηση αυτή έχει στατιστική σημαντικότητα $p=0,05$. Στην ομάδα που έπαιρναν ελαιόλαδο ο TNF- α ήταν $104,6 \pm 11,9$ pg/ mg πρωτεΐνης ενώ στην ομάδα του ηλιέλαιου $84,6 \pm 27,7$ pg/ mg πρωτεΐνης. Φαίνεται ότι στην ομάδα που γινόταν παρέμβαση με ηλιέλαιο τα επίπεδα του TNF- α μειώθηκαν περίπου $20,7 \pm 4,5$ pg/ mg πρωτεΐνης, η μείωση όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$).



Σχήμα 3.9 Μέτρηση των επιπέδων του TNF- α στο ήπαρ , μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά (<0,05) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Οι συγκεντρώσεις του TNF-α στην καρδιά και στον ορό παρουσιάζονται στον πίνακα 3.7 και 3.8 αντίστοιχα.

Πίνακας 3.7 Οι συγκεντρώσεις του TNF-α στην καρδιά για τις 5 ομάδες του πειράματος. Όπου nd= normal diet, gl= glycerol, ev= extra virgin oil, sf= sunflower oil. Οι τιμές είναι ο μ.ο και εκφράζονται σε pg/ mg πρωτεΐνης. Η στατιστική σημαντικότητα ήταν $p > 0,05$

TNF-α hrt	TNF-α pg/ mg πρωτεΐνης
nd	102,9
gl	41,5
chol	119,9
ev	58,5
sf	52,24

Πίνακας 3.8 Οι συγκεντρώσεις του TNF-α στην ορό για τις 5 ομάδες του πειράματος. Όπου nd= normal diet, gl= glycerol, ev= extra virgin oil, sf= sunflower oil. Οι τιμές είναι ο μ.ο και εκφράζονται σε pg/ mL πρωτεΐνης. Η στατιστική σημαντικότητα ήταν $p > 0,05$. Όπου δ.α= δεν ανιχνεύεται

TNF-α ορού	TNF-α pg/ mg πρωτεΐνης
nd	δ.α
gl	178,2
chol	δ.α
ev	δ.α
sf	δ.α

Βιβλιογραφικά, το ελαιόλαδο φαίνεται να αποτελεί μοριακό διαμορφωτή της φλεγμονής και της ανοσολογικής απάντησης. Σε ζωικό μοντέλο αρουραίων ο TNF-α μειώθηκε μετά από 8 εβδομάδες διατροφής με ελαιόλαδο (Tappia *et al.*, 1994). Σε άλλες μελέτες ερευνήθηκαν οι επιπτώσεις των διατροφικών λιπών στην κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων (Wallace *et al.*, 2000). Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι το λιποσακχαρίδιο (LPS) που διεγείρεται με την παραγωγή του TNF-α, μειώθηκε με την αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαίου. Η παραγωγή του NO από τα μακροφάγα ήταν αυξημένη σε ζώα που είχαν τραφεί με ελαιόλαδο σε σύγκριση με το ηλιέλαιο. Οι Moreno και οι συνεργάτες του (2001), επιβεβαίωσαν την αύξηση του NO καθώς επίσης και μείωση στην κινητοποίηση του αραχιδονικού οξέος και της παραγωγής προσταγλανδίνης E₂ στα μακροφάγα κύτταρα ζώων που τρέφονταν με ελαιόλαδο. Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου διαφοροποιεί τη φλεγμονή. Η ολευρωπαϊνή αυξάνει την παραγωγή NO στα μακροφάγα κύτταρα του πολυσακχαρίτη μέσω της επαγωγής του ενζύμου συνθετάση του NO, αυξάνοντας τη λειτουργική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών (Visioli *et al.*, 1998).

Ο TNF-α διαδραματίζει μείζονα ρόλο στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην επαγωγή της σύνθεσης άλλων κυτταροκινών, οι οποίες διευρύνουν την περαιτέρω έκφραση των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης όπως η ICAM-1, η VCAM-1 και η E-σελεκτίνη (Hennig & Toborek., 2001). Η αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-α, είναι σημαντική για την έναρξη της έκφρασης σειράς γονιδίων που με τη σειρά τους προωθούν την κυτταρική προσκόλληση και άλλες διαδικασίες για την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Zhang *et al.*, 2007). Αθηρογονική δίαιτα με 4% χοληστερόλη για χρονικό διάστημα 3 μηνών προκάλεσε σημαντική αύξηση του TNF-α στον ορό των αρουραίων (Wakf *et al.*, 2010). Σε αθηρωματικό μοντέλο κουνελιών η χρήση χοληστερόλης 2% για 4 εβδομάδες αύξησε την έκφραση του γονιδίου του TNF-α (Libinaki *et al.*, 2010), που επιβεβαιώθηκε και από άλλη μελέτη (Teixeira *et al.*, 2007). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κόνικλους οι συγκεντρώσεις του TNF-α στο πλάσμα ήταν χαμηλότερες στα ζώα που έχουν τραφεί με ιχθυέλαιο σε σύγκριση με το ηλιέλαιο (Pablo *et al.*, 1998, Sadeghi *et al.*, 1999). Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδίως το λινολεϊκό οξύ φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση αγγειακών παραγόντων και συγκεκριμένα κυτοκινών (Toborek *et al.*, 1998). Μερικά από τα οφέλη των ω-3 PUFA, μπορεί να οφείλονται στη μεταβολή των λιποπρωτεϊνών και στην ικανότητα τους να αναστέλλουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου (Aguilera *et al.*, 2000).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η διατροφή μπορεί να επιδρά στο αγγειακό ενδοθήλιο μέσω της αύξησης του ποσού του ελαϊκού οξέος στο αρτηριακό τοίχωμα και της αντικατάστασης των SFA με PUFA (Covas, 2007). Η αλλαγή στη σύνθεση του τοιχώματος των αγγείων είναι ευνοϊκή για 3 λόγους:

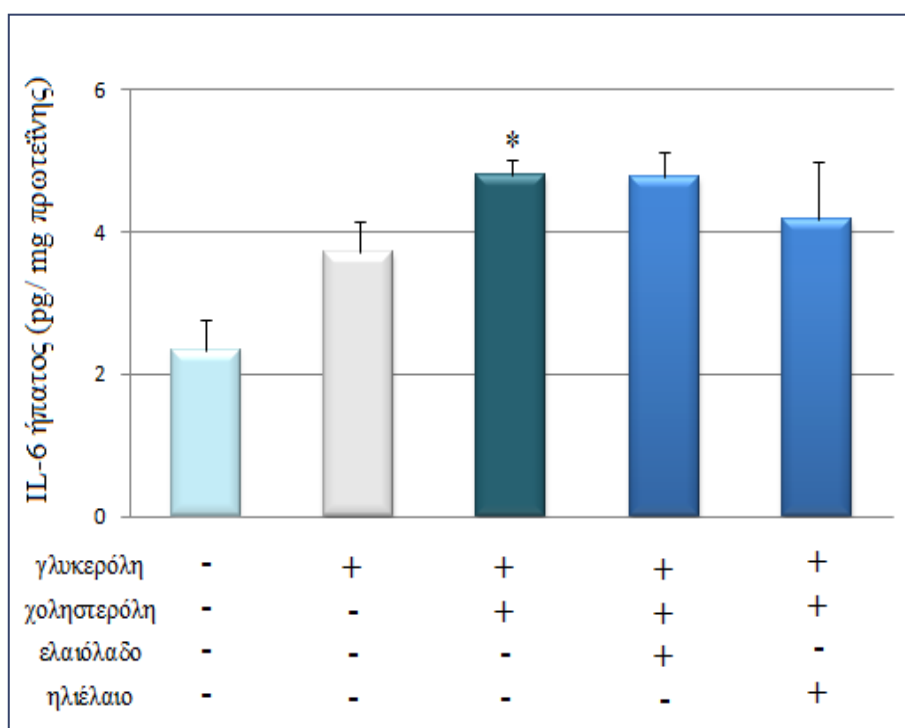
1. τα SFA είναι αθηρογόνα και ευνοούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της μείωσης της προστακυκλίνης και της αύξησης της παραγωγής θρομβοξάνης
2. τα PUFA, μειώνουν τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων και την προθρομβωτική ικανότητα του αρτηριακού τοιχώματος
3. η συσσώρευση MUFA στο αρτηριακό τοίχωμα, μειώνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης που συμμετέχουν στην επιλεκτική πρόσληψη μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα (Perona *et al.*, 2006).

Το ελαϊκό οξύ μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης μέσω της προστατευτικής του επίδρασης στην αγγειακή βλάβη. Παρά τις ευεργετικές δράσεις που αποδίδονται στο ελαϊκό οξύ είναι πιθανό ότι και άλλα συστατικά με αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, όπως τα φαινολικά συστατικά ευθύνονται για τις δράσεις του ελαιολάδου, που παρατηρούνται σε πειραματικές μελέτες. Η ολευροπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη, έχουν τις ισχυρότερες δεσμευτικές ιδιότητες από όλα τα φαινολικά του ελαιολάδου (Oram *et al.*, 2004). Ο Massaro και οι συνεργάτες του (2002) υπέθεσαν ότι τα συστατικά αυτά ασκούν προστατευτική δράση, αναστέλλοντας την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω των ROS και αντιστρέφοντας την έλλειψη ισορροπίας μεταξύ αυξημένου οξειδωτικού στρες και μειωμένης αντιοξειδωτικής κατάστασης.

3.5.2 Επίπεδα της ιντερλευκίνης (IL-6)

Η ιντερλευκίνη- 6 είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που ρυθμίζει διάφορες πτυχές της ανοσολογικής απάντησης, της οξείας φάσης της αντίδρασης και της αιμοποίησης. Παράγεται από ένα αριθμό διαφορετικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιημένων μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων. Η σύνθεση της IL- 6 επάγεται από την IL- 1 και κατά συνέπεια οι συγκεντρώσεις της στον ορό είναι συχνά μια αντανάκλαση της δραστηριότητας της IL- 1 *in vivo*. Η IL- 6 αναστέλλει την έκκριση του TNF-α και της IL-1 (Kopf *et al.*, 1994), ενώ ενεργοποιεί την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ (Xing *et al.*, 1998) και τον υποθάλαμο- υποφυσιακό άξονα ώστε να συμβάλλει στον έλεγχο της φλεγμονής. Με αυτή την έννοια αποτελεί τόσο μια προ- φλεγμονώδη όσο και μια αντι- φλεγμονώδη κυτταροκίνη.

Στο σχήμα 3.10 παρουσιάζονται τα επίπεδα της IL- 6 στο ήπαρ των κουνελιών. Η συγκέντρωση της IL- 6 του ήπατος στα ζώα που λάμβαναν τυποποιημένη τροφή ήταν $2,3 \pm 0,45$ pg/ mg πρωτεΐνης. Παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση της IL- 6 στην ομάδα με διατροφική παρέμβαση χοληστερόλης $4,7 \pm 0,2$ pg/ mg πρωτεΐνης ($p < 0,05$) σε σύγκριση με την ομάδα control που λάμβανε φυσιολογική τροφή, χωρίς καμία παρέμβαση. Η IL- 6 στην ομάδα με το ελαιόλαδο ήταν $4,7 \pm 0,3$ και στην ομάδα με το ηλιέλαιο $4,1 \pm 0,8$ pg/ mg πρωτεΐνης αντίστοιχα. Στην ομάδα με το ηλιέλαιο εμφανίζεται μείωση με τάση στατιστικής σημαντικότητας ($p=0,07$).



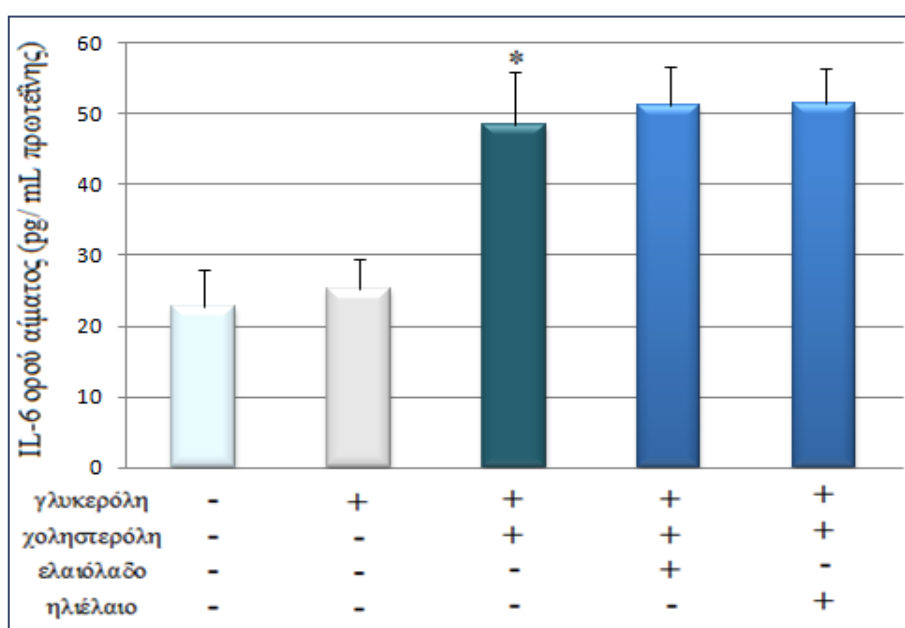
Σχήμα 3.10 Μέτρηση των επιπέδων IL- 6 στο ήπαρ, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση και ο (**) στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ των ομάδων. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Στον πίνακα 3.9 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της IL-6 στη καρδιά. Είναι προφανές ότι για το χρόνο που διήρκεσε το πείραμα, δεν ήταν δυνατή η βλάβη στον καρδιακό ιστό, όπως παρατηρήθηκε στο ήπαρ.

Πίνακας 3.9 Οι συγκεντρώσεις της IL-6 στην καρδιά για τις 5 ομάδες του πειράματος. Όπου nd= normal diet, gl= glycerol, ev= extra virgin oil, sf= sunflower oil. Οι τιμές είναι ο μ.ο και εκφράζονται σε pg/ mg πρωτεΐνης. Η στατιστική σημαντικότητα ήταν $p>0,05$

IL-6 hrt	IL-6 pg/mg πρωτεΐνης
nd	7,4
gl	2,5
chol	4,9
ev	5,4
sf	2,7

Στο σχήμα 3.11 παρατηρείται ότι τα επίπεδα της ιντερλευκίνης 6 στον ορό του αίματος, της ομάδας control είναι 22,8 pg/mL πρωτεΐνης ενώ αυτής που λάμβανε χοληστερόλη είναι 48,5 pg/mL πρωτεΐνης. Η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,032$) Για τις ομάδες του ελαιολάδου και του ηλιέλαιου τα επίπεδα της IL-6 είναι 51,1 και 51,5 pg/mL πρωτεΐνης αντίστοιχα. Καμία από αυτές τις τιμές δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.11 Οι συγκεντρώσεις της IL-6 στον ορό του αίματος, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση. Οι τιμές αποτελούν το μ.ο±SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Η υπερχοληστερολαιμία προκαλεί δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, πρώιμο χαρακτηριστικό της αθηροσκλήρωσης που οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής των μορίων προσκόλλησης και των κυτταροκινών, γεγονός που εξηγεί την αύξηση των επιπέδων της IL-6.

Στο σύνολο της βιβλιογραφίας απαντούν τόσο θετικά όσο και αρνητικά δεδομένα ως προς τη συσχέτιση της IL- 6 με την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, ενώ σε κάποιες μελέτες δεν προσδιορίζεται ουσιαστικός ρόλος. Αυτό πιθανά να οφείλεται στο πειραματικό set- up (μοντέλο πειραματόζωου, αρσενικό- θηλυκό, διατροφή, ηλικία ζώων, διάρκεια πειράματος). Επιπλέον, η IL- 6 μπορεί να έχει ένα διφασικό αποτέλεσμα στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης ως αντανάκλαση των προ- φλεγμονωδών και αντί- φλεγμονωδών δράσεων της (Xing *et al.*, 1998).

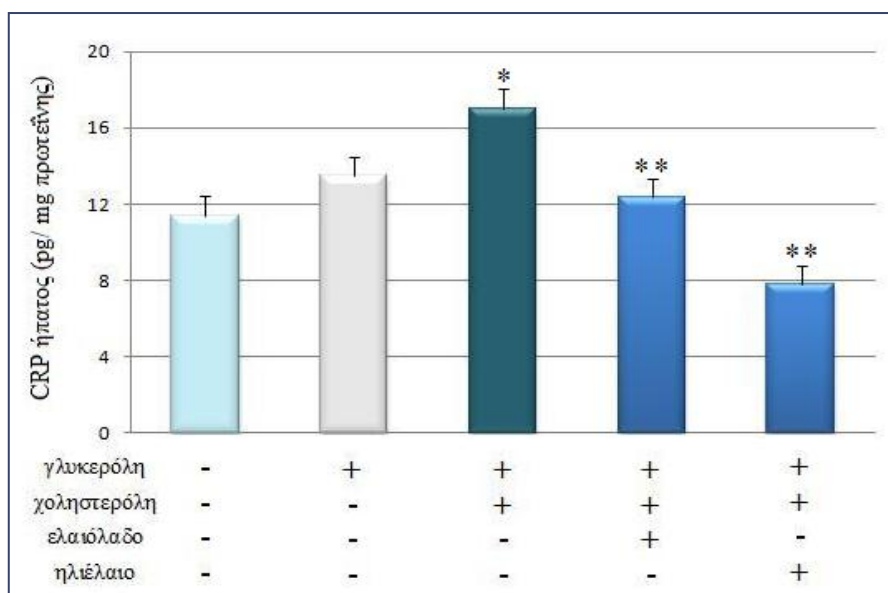
Οι IL-6 και η CRP, έχουν συσχετιστεί με την αθηροσκλήρωση και αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (Tzoulaki *et al.*, 2005). Η άμεση εμπλοκή της στην ανάπτυξη αθηρωματικών βλαβών, προτάθηκε από πειράματα σε μύες στα οποία έγινε παρέμβαση με ανασυνδυασμένη IL- 6 για 6-21 εβδομάδες και βρέθηκε ότι αυξήθηκε το μέγεθος της βλάβης σε αυτά που τρέφονταν με υψηλή σε χοληστερόλη διατροφή (Huber *et al.*, 1999). Σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο η προσθήκη παρθένου ελαιολάδου στη διατροφή για 3 εβδομάδες οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της IL-6 (Fito *et al.*, 2007). Στη μελέτη Framingham, σε ενήλικες υπερτασικούς ασθενείς η IL-6 ορού σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας (Vasan *et al.*, 2003). Μετά από 3 μήνες παρέμβαση με ελαιόλαδο σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο τα επίπεδα της IL-6 στον ορό μειώθηκαν σημαντικά (PREDIMED study) (Mena *et al.*, 2009).

3.5.3 Επίπεδα της C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP)

Η φλεγμονή έχει προταθεί να συμβάλλει σε διαφορετικά στάδια στην παθογένεια της στεφανιαίας νόσου, συμπεριλαμβανομένων της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης δια βίου και τις οξείες αθηροθρομβωτικές εκδηλώσεις, που προκαλούν ισχαιμική νέκρωση σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (Lowe *et al.*, 2006, Smeeth *et al.*, 2004). Η CRP αποτελεί συστηματικό δείκτη φλεγμονής και έχει μελετηθεί εκτενώς (Pepys *et al.*, 2003). Ο φυσιολογικός της ρόλος είναι η σύνδεση με τη φωσφοχολίνη (που εκφράζεται στην επιφάνεια νεκρών κυττάρων και σε κάποια είδη βακτηρίων) προκειμένου να ενεργοποιηθεί το σύστημα συμπληρώματος. Η ηπατική σύνθεση της CRP βρίσκεται υπό εξαιρετικά ευαίσθητη μεταγραφική ρύθμιση μέσω προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως της IL- 6, IL- 1 και TNF-α έτσι ώστε κάθε σχεδόν μορφή τραυματισμού ιστών, λοίμωξη, φλεγμονή και στρες, σχετίζονται με αύξηση των επιπέδων της (Kushner *et al.*, 2006).

Στο σχήμα 3.12 παρατίθενται τα αποτελέσματα της μέτρησης της CRP στο ήπαρ. Η συγκέντρωση της CRP για την ομάδα χωρίς καμία παρέμβαση ήταν $11,4 \pm 0,6$ pg/ mg πρωτεΐνης.

Για τις ομάδες με παρέμβαση χοληστερόλης, ελαιολάδου και ηλιέλαιου η CRP ήταν $17,4 \pm 1,1$, $12,3 \pm 12,4$, $7,8 \pm 2,9$ pg/ mg πρωτεΐνης αντίστοιχα. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στην ομάδα της χοληστερόλης ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,008$). Σημαντική μείωση των επιπέδων της CRP φαίνεται να υπάρχει στην ομάδα με παρέμβαση ελαιολάδου, όπως και σε αυτή του ηλιέλαιου ($p= 0,005$ και $p= 0,001$ αντίστοιχα).



Σχήμα 3.12 Οι συγκεντρώσεις της CRP στο ήπαρ, μετά από παρέμβαση με διαφορετικής σύστασης τροφή. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ της φυσιολογικής τυποποιημένης τροφής και της τροφής που έχει γίνει παρέμβαση και ο (**) στατιστικά σημαντική διαφορά ($<0,05$) μεταξύ των ομάδων ελαιολάδου και ηλιέλαιου συγκριτικά με την ομάδα χοληστερόλης. Οι τιμές είναι ο μ.ο και $\pm$ SD των 4 ζώων της κάθε ομάδας

Στους πίνακες 3.10 και 3.11 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της CRP στην καρδιά και στον ορό αντίστοιχα. Είναι προφανές ότι για το χρόνο που διήρκεσε το πείραμα, δεν ήταν δυνατή η βλάβη στον καρδιακό ιστό, όπως παρατηρήθηκε στο ήπαρ.

Πίνακας 3.10 Οι συγκεντρώσεις της CRP στην καρδιά για τις 5 ομάδες του πειράματος. Όπου nd= τυποποιημένη διατροφή, gl= γλυκερόλη, ev= έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, sf= ηλιέλαιο. Οι τιμές είναι ο μ.ο και εκφράζονται σε pg/ mg πρωτεΐνης. Η στατιστική σημαντικότητα ήταν $p>0,05$

CRP hrt	CRP pg/mg πρωτεΐνης
nd	7,8
gl	6,3
chol	6,8
ev	6,5
sf	6,5

Πίνακας 3.11 Οι συγκεντρώσεις της CRP στον ορό για τις 5 ομάδες του πειράματος. Όπου nd= τυποποιημένη διατροφή, gl= γλυκερόλη, ev= έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, sf= ηλιέλαιο. Οι τιμές είναι ο μ.ο και εκφράζονται σε pg/mL πρωτεΐνης. Η στατιστική σημαντικότητα ήταν $p>0,05$. Όπου δ.α= δεν ανιχνεύεται

CRP ορού	CRP pg/mL πρωτεΐνης
nd	δ.α
gl	δ.α
chol	δ.α
ev	δ.α
sf	δ.α

Η CRP στον ορό των ζώων δεν ανιχνεύτηκε με τα διαθέσιμα αντιδρατήρια.

Στη διεθνή βιβλιογραφία πολλά στοιχεία υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο της CRP στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Έχει βρεθεί ότι δεσμεύει τη φωσφοχολίνη της οξειδωμένης LDL (Chang *et al.*, 1999), ρυθμίζει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνει την πρόσληψη LDL από τα μακροφάγα (Zwaka *et al.*, 2001), αναστέλλει την έκφραση της συνθετάσης του NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής (Venugopal *et al.*, 2002) και αυξάνει την έκφραση και τη δραστηριότητα του ενεργοποιητή του αναστολέα-1 του πλασμινογόνου. Σήμερα θεωρείται ότι παρέχει ισχυρή πιθανότητα πρόβλεψης του καρδιαγγειακού κινδύνου, σε σχέση με τα επίπεδα της LDL (Ridker *et al.*, 2003). Παράγεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα ενώ ρυθμίζεται και εκκρίνεται σε απάντηση της κυτοκίνης IL-6. Η CRP πιστεύεται ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη αθηρωματικών βλαβών μέσω της ικανότητας της να επιταχύνει ορισμένες διαδικασίες που συμβαίνουν στην αθηροσκλήρωση, πολλές από τις οποίες εξαρτώνται από την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με τα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου (Jialal *et al.*, 2004). Όχι μόνο έχει αναφερθεί να συμμετέχει στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Pasceri *et al.*, 2001) αλλά φαίνεται, επίσης, να μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO συμβάλλοντας στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Σε αθηρωματικό μοντέλο κονίκλων παρεμβαίνοντας στη διατροφή με 2% χοληστερόλη για 4 εβδομάδες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της CRP στον ορό (Libinaki *et al.*, 2010). Στη μελέτη των Fito και των συνεργατών του, (2007) η κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου ήταν πιο αποτελεσματική από του ραφιναρισμένου μειώνοντας τα επίπεδα της CRP σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Σε μια προοπτική μελέτη (PREDIMED study) η παρέμβαση για 3 μήνες με παρθένο ελαιόλαδο σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της CRP (Mena *et al.*, 2009)

Πολυάριθμες πειραματικές μελέτες και μελέτες παρατήρησης σε ανθρώπους έχουν βρεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης ω -3 και ω -6 λιπαρών οξέων και των συστηματικών δεικτών φλεγμονής (Riediger *et al.*, 2009). Η διαιτητική πρόσληψη MUFA, ιδίως ελαϊκού οξέος, φαίνεται να έχει αντιφλεγμονώδεις δράσεις και στην περίπτωση του ελαιολάδου, το ελαϊκό οξύ και τα φαινολικά συστατικά να μειώνουν τα επίπεδα της CRP της παρούσας μελέτης.

Το ηλιέλαιο φάνηκε να μειώνει επίσης, τα επίπεδα της CRP. Μια πιθανή εξήγηση, μπορούσε να είναι η αυξημένη περιεκτικότητα του ηλιέλαιου σε ω -6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως λινελαϊκό, τα οποία φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση των αγγειακών παραγόντων και συγκεκριμένα κυτοκινών (Toborek *et al.*, 1998) καθώς και στη διπλάσια περιεκτικότητα του σε βιταμίνη E, που είναι επίσης αντιοξειδωτικό συστατικό.

Η προστατευτική επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής σχετίζεται με τη μείωση των συστηματικών δεικτών φλεγμονής καθώς και της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονώδεις διεργασίες. Η παραδοσιακή Μεσογειακή Διατροφή με την κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου έχει φανεί να μειώνει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη διαδικασία της φλεγμονής (IFN), το οξειδωτικό στρες και τη βλάβη του DNA (Konstantinidou *et al.*, 2010). Η μείωση της IFN που παρατηρήθηκε σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων, αποτελεί βασικό φλεγμονώδη μεσολαβητή για την προαγωγή της έκκρισης της IL-6 και ρυθμιστή της σύνθεσης της CRP στο ήπαρ (Corpack *et al.*, 2001). Ο εμπλουτισμός της διατροφής με παρθένο ελαιόλαδο, σε ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο, ανέστειλε την έκφραση του γονιδίου της COX-2 και τους υποδοχείς της LDL και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων (MCP-1) (Corte *et al.*, 2010). Έτσι, ότι τα οφέλη που σχετίζονται με την κατανάλωση Μεσογειακού τύπου Διατροφής και ειδικά του ελαιολάδου που είναι πλούσιο σε ελαϊκό οξύ και φαινολικά συστατικά, μπορεί πέρα από κάθε άλλη κλασσική και τεκμηριωμένη γνώση, επιπλέον σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση. Η Μεσογειακή Διατροφή συστήνεται ως ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης.

3.6 Μακροσκοπική αξιολόγηση

Κατά τη διάρκεια της ευθανασίας παρασκευάστηκαν και απομονώθηκαν τα προς μελέτη όργανα, ήπαρ, καρδιά, καρωτίδες, αορτικό τόξο και κοιλιακή αορτή. Ενδεικτικά παρουσιάζονται εικόνες ιστών από τις διαφορετικές ομάδες των πειραματόζωων.

Στη εικόνα 3.1 παρουσιάζεται το ήπαρ (αριστερά) των ζώων που λάμβαναν τυποποιημένη τροφή. Το χρώμα του είναι ερυθροκαστανό και η επιφάνεια του λεία. Διακρίνεται καθαρά η χοληδόχος κύστη. Η καρδιά (δεξιά) έχει χρώμα ερυθρό και το περικάρδιο εμφανίζεται διαφανές με λεία επιφάνεια.



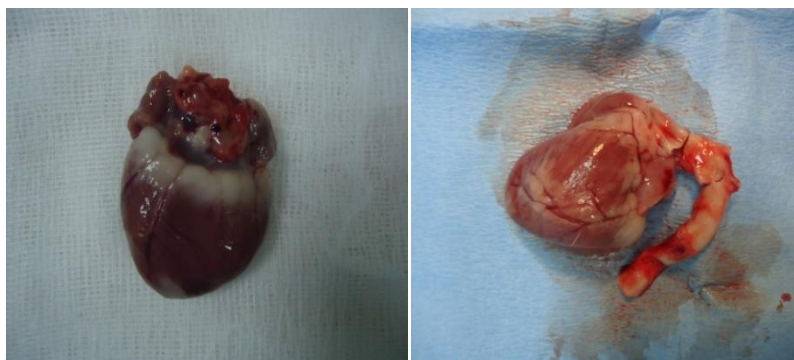
Εικόνα 3.1 Φυσιολογικό ήπαρ και καρδιά

Στην εικόνα 3.2 φαίνεται το ήπαρ υπερχοληστερολαιμικού ζώου (αριστερά) και η τομή αυτού (δεξιά). Λόγω της εναπόθεσης σε αυτό λιπαρών ουσιών, είναι έντονα αποχρωματισμένο με υποστρόγγυλα άκρα. Η τομή του παρεγχύματος του είναι ομοιόμορφα λιπαρή χωρίς λοβιώδη κατανομή της αλλοίωσης.



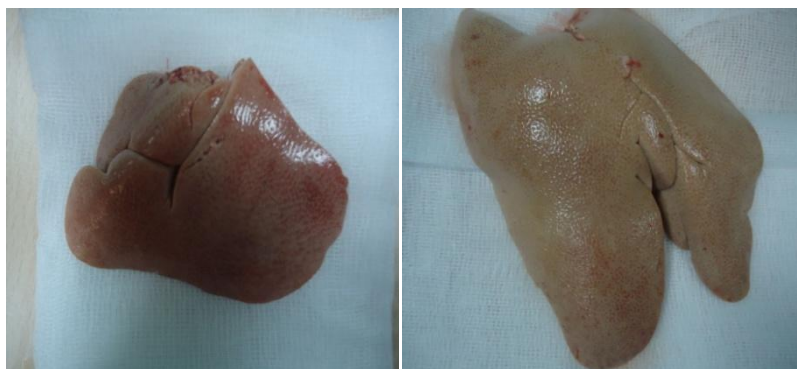
Εικόνα 3.2 Ήπαρ και τομή ήπατος υπερχοληστερολαιμικού ζώου

Στην εικόνα 3.3 διακρίνεται η καρδιά ενός υπερχοληστερολαιμικού ζώου. Παρατηρείται εναπόθεση λίπους στον περικαρδιακό ιστό και το χρώμα της είναι φαιοκίτρινο. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται και το αορτικό τόξο το οποίο λόγω εναπόθεσης λιπαρών ουσιών έχει χάσει την ελαστικότητα του.



Εικόνα 3.3 Καρδιά υπερχοληστερολαιμικού ζώου

Στην εικόνα 3.4 συγκρίνονται το ήπαρ ενός κονίκλου που ακολουθούσε διατροφή με ελαιόλαδο (αριστερά) με εκείνου που λάμβανε ηλιέλαιο (δεξιά). Η διαφορά στο χρώμα είναι εμφανής, ελαφρώς αποχρωματισμένο και φαιοκίτρινο αντίστοιχα.



Εικόνα 3.4 Ήπαρ κουνελιού με διατροφή ελαιολάδου και ηλιέλαιου

Στην εικόνα 3.5 συγκρίνεται η καρδιά των παραπάνω ζώων. Αριστερά, είναι η εικόνα της καρδιάς ζώου με προσθήκη στη διατροφή του ελαιολάδου. Η εναπόθεση λιπαρών ουσιών στο περικάρδιο είναι περιορισμένη και το χρώμα του καρδιακού ιστού διατηρείται στα φυσιολογικά πλαίσια. Δεξιά, φαίνεται η καρδιά ζώου με προσθήκη στη διατροφή του ηλιέλαιου. Διακρίνονται ένας λευκός σχηματισμός, λόγω των λιπαρών ουσιών, ενώ το χρώμα είναι φαιό.



Εικόνα 3.5 Καρδιά κουνελιού με διατροφή ελαιολάδου και ηλιελαίου

Συμπεράσματα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν βασική αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, ανεξάρτητα από τις πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της ιατρικής περίθαλψης. Το διαιτητικό λίπος είναι ένας από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, που συνδέεται με τη συχνότητα εμφάνισης των ασθενειών αυτών. Την τελευταία δεκαετία παρουσιάζεται αυξημένο ενδιαφέρον γύρω από το διατροφικό πρότυπο της Μεσογειακής Διατροφής κύριο συστατικό της οποίας αποτελεί το ελαιόλαδο.

Στην παρούσα κλινική δοκιμή, η διατροφική παρέμβαση στο διαιτητικό λίπος επηρέασε σημαντικά τους βιοχημικούς δείκτες που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, η προσθήκη χοληστερόλης στη διατροφή των κόνικλων οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων, της LDL χοληστερόλης και σε μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης σε σχέση με τα ζώα που λάμβαναν τυποποιημένη διατροφή. Αντίθετα, η διατροφική παρέμβαση με ελαιόλαδο βελτίωσε το λιπιδαιμικό προφίλ, μειώνοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και αυξάνοντας την HDL, αναφορικά με τις υπόλοιπες ομάδες που μελετήθηκαν. Όσον αφορά τα ηπατικά ένζυμα, το ελαιόλαδο μείωσε την ασπαρτική τρανσαμινάση του ορού, ενώ το ηλιέλαιο οδήγησε σε αύξηση αυτού του ενζύμου.

Συνεχίζοντας, η διατροφική παρέμβαση με ελαιόλαδο φάνηκε να περιορίζει την οξείδωση των λιπών στο ήπαρ, καθώς βρέθηκε μείωση των επιπέδων της MDA, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και μετά την εξέταση των αποτελεσμάτων σχετικά με τα επίπεδα των TBARS στον ορό.

Επιπρόσθετα, η διαιτητική πρόσληψη χοληστερόλης επηρέασε τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και συγκεκριμένα αυξάνει τα επίπεδα του TNF-α και της IL-6 στο ήπαρ, αποτέλεσμα που δεν αντιστρέφεται ανεξάρτητα της διαιτητικής παρέμβασης. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει και μετά την εξέταση των αποτελεσμάτων αναφορικά με τα επίπεδα της IL-6 στον ορό. Εξαίρεση αποτελούν τα επίπεδα της IL-6 στην καρδιά, όπου παρατηρήθηκε ότι η διατροφική πρόσληψη χοληστερόλης, επίσης αυξάνει τα επίπεδα της, ωστόσο φαίνεται ότι η διατροφική παρέμβαση τόσο με ελαιόλαδο όσο και με ηλιέλαιο πιθανόν να σχετίζεται με μείωσή τους. Τα επίπεδα της CRP, επίσης, σημείωσαν αύξηση ύστερα από την προσθήκη χοληστερόλης στη διατροφή των κόνικλων. Ωστόσο σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μετά από τη διατροφική παρέμβαση με ελαιόλαδο και ηλιέλαιο, με τη μεγαλύτερη να εμφανίζεται στην ομάδα του ηλιέλαιου.

Εξετάζοντας το ποσοστό της βιταμίνης Ε που παραμένει δραστικό στην ενεργή του μορφή, παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει μεταβολή στο ελαιόλαδο, στο ηλιέλαιο και στα μίγματα τροφής αντίστοιχα.

Ολοκληρώνοντας, αξιολογώντας μακροσκοπικά τα προς εξέταση όργανα παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο χρώμα, στην υφή και στην όψη μεταξύ των ομάδων. Συγκεκριμένα το ήπαρ της ομάδας της χοληστερόλης ήταν αποχρωματισμένο με υποστρόγυλα άκρα. Ωστόσο φάνηκε ότι το ελαιόλαδο και σε μικρότερο βαθμό το ηλιέλαιο, να μην επηρεάζει σε τέτοιο βαθμό τη μορφολογία του ήπατος όταν και αυτά προστέθηκαν στη διατροφή. Επιπλέον, σημαντικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν και στον καρδιακό ιστό στην ομάδα της χοληστερόλης. Αυτές περιλαμβάνουν την εναπόθεση λίπους στον περικαρδιακό ιστό και την αλλαγή του χρώματος από ερυθρό σε φαιοκίτρινο. Η προσθήκη του ελαιολάδου βελτίωσε την μακροσκοπική εικόνα της καρδιάς. Αντίθετα, με τη διατροφική παρέμβαση ηλιέλαιου δεν παρατηρήθηκε τέτοια βελτίωση.

Για τη διαλεύκανση και διευκρίνιση της δράσης του ελαϊκού οξέος και των φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου, απαιτούνται επιπλέον μελέτες με έλαια διαφορετικής σύστασης σε ελαϊκό οξύ ή σε φαινολικά συστατικά (απογυμνωμένα ή εμπλουτισμένα σε αυτά). Η μελέτη αυτή αποτέλεσε μόνο προάγγελο για τη διαλεύκανση της δράσης των συστατικών του παρθένου ελαιολάδου και για τον τρόπο με τον οποίο ασκούν την καρδιοπροστατευτική τους δράση.

Βιβλιογραφία

- Abia R, Pacheco YM, Perona JS, et al. The metabolic availability of dietary triacylglycerols from two high oleic oils during the postprandial period does not depend on the amount of oleic acid ingested by healthy men. *J Nutr* 2001. 131, 59–65
- Acín S, Navarro MA, Osada J, et al. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr Biochem* 2007. 18(6), 418-424
- Aguilera CM, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, et al. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr* 2004. 23, 673–681
- Aguilera CM, Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, et al. Gil Sunflower, virgin-olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis *Atherosclerosis* 2002. 162, 335–344
- Aguilera CM, Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, et al. Do MUFA and PUFA have beneficial effects on development of cardiovascular disease? *Rec Res Dev Lipids* 2000. 4, 369–9
- Alacron de La Lastra C, et al. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des* 2001. 7, 933-50
- Albertini R, Moratti R and DeLuca G. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. *Curr Mol Med* 2002. 2, 579–592
- Alonso A, Ruiz-Gutierrez V, Martínez-González MA. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr* 2006. 9, 251-257
- Alpsoy L, Yildirim A, Agar G, et al. The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicol. Ind. Health* 2009. 25, 121–127
- Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN et al. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low density lipoprotein oxidation. *J Med Food* 2002. 5, 1-7
- Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, et al. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A* 2004. 1054, 17–31
- Aparicio R, Rodal L, Albi MA et al. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J Agric Food Chem* 1999. 47, 4150-4155
- Arita M, Sato Y, Miyata A, et al. Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem J* 1995. 306(2), 437–443

- Armstrong D, Brown R. The analysis of free radical, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemical laboratory. *Free Rad Diagn Med* 1994. 366, 43-58
- Azza M, Wakf E, Hamdy A, et al. Association between inflammation and the risk of cardiovascular disorders in atherogenic male rats: Role of virgin and refined olive oil. *J Am Sci* 2010. 6, 807-817
- Azzi A, Boscobonik D, Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 1992. 208, 547-57
- Bai C, Yan X, Takenaka M, et al. Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC-MS. *J Agric Food Chem* 1998. 46, 3998–4001
- Baldioli M, Servili M, Perretti G et al. Antioxidant capacity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAACS* 1996. 73, 1589-1593
- Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, et al. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005. 437,45–6
- Belcher JD, Marker PH, Gerger P, et al. Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 1999. 133, 605-612
- Bellezo JM, Leingang KA, Bulla GA, et al. Modulation of lipopolysaccharide-mediated activation in rat Kupffer cells by antioxidants. *J Lab Clin Med* 1998. 131(1), 36–44
- Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 2004. 80, 1487–1491
- Bendich A. Vitamins and immunity. *J Nutr* 1992. 122(3), 601–603
- Benkhalti F, Prost J, Paz E, et al. Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nut Res* 2002. 22, 1067–1075
- Bernhagen J, Krohn R, Lue H, et al. MIF is a noncognate ligand of CXCR chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007. 13, 587–596
- Berra B, Caruso D, Cortesi N, et al. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *La Riv Ital Sost Grasse* 1995. 72, 285–288
- Berry EM. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1997. 66, 991 –997
- Bester D, Esterhuyse AJ, Truter EJ et al. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr Res Rev* 2010. 23, 334–348
- Bianco A, Coccioli F, Guiso M, et al. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry* 2001. 77, 405–411

- Boccio GD, Lapenna D, Porreca E, et al. Aortic antioxidant defence mechanisms: Time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1990. 81(2),127–35
- Bogani P, Galli C, Villa M, et al. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 2007. 190, 181–6
- Bos MB, de Vries JH, Feskens EJ, et al. Effect of a high monounsaturated fatty acid diet and a Mediterranean diet on serum lipids and insulin sensitivity in adults with mild abdominal obesity. *Curr Atheroscl Rep* 2008. 10, 518–522
- Boskou D. Olive oil: chemistry and technology. AOCS 2006. 2, 52–83
- Boskou, D., Olive oil: chemistry and technology. Illinois 1996.
- Brenes M, Garcia A, Garcia P, et al. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2001. 49, 5609–5614
- Brenes M, Garcia A, Garcia P, et al. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J Agric Food Chem* 1999. 47, 3535–3540
- Briante R, Febbraio F, Nucci R. Antioxidant/ prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu²⁺-induced oxidation of human low-density lipoprotein (LDL). *Chem Biodivers* 2004. 1, 1716–1729
- Bruni N, Cortesi N, Fiorino P. Influence of agricultural techniques, cultivar and area of origin on characteristics of virgin olive oil and levels of some of its “minor” components. *Olivie* 1994. 1, 28–34
- Brzosko S, De Curtis A, Murzilli S, et al. Effect of extra virgin olive oil on experimental thrombosis and primary hemostasis in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002. 12, 337–42
- Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2002. 112, 298–304
- Caravaca AM, Pancorbo AC, Diaz BC, et al. Electrophoretic identification and quantification of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis* 2005. 26, 3538– 3551
- Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, et al. Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999. 19, 220–228
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003. 23, 622–629
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, et al. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J Sep Sci* 2005. 28, 837–858

- Carrasco-Pancorbo A, Cruces-Blanco C, Segura Carretero A, et al. Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *J Agric Food Chem* 2004. 52, 6687–6693
- Caruso D, Visioli F, Patelli R, et al. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism* 2001. 50, 1426–1428
- Cassand P, et al. Effect of vitamin E dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B1. *Mutat Res* 1993. 319, 309–316
- Cerretani L, Bendini A, Rotondi A, et al. Analytical comparison of monovarietal virgin olive oils obtained by both a continuous industrial plant and low-scale mill. *Eur J Lip Sci Techn* 2005. 107, 93–100
- Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, et al. *Pro Natl Acad Sci U. S. A.* 2002. 99, 13043–13048
- Cicerale S, Conlan XA, Barnett NW, et al. Influence of heat on biological activity and concentration of oleocanthal—A natural anti-inflammatory agent in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2009. 57, 1326–1330
- Cicerale S, Xavier A, Sinclair A, et al. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009. 49, 218–236
- Cirico TL, Omaye ST. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxic* 2005
- Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2007. 75, 468–477
- Gomez-Rico A, Salvador MD, La Greca, et al. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J Agric Food Chem* 2006. 54, 7130–7136
- Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, et al. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 2000. 35, 45– 54
- Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Pro Nutr Soc* 2001. 60, 349–356
- Coulter TP. Food. The chemistry of its components. Royal Soc Chem, Cambridge 2002
- Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol Res* 2007. 55 (3), 175-186
- Covas MI, de la Torre K, Farre-Albaladejo M, et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation is modulated by olive oil phenolic compound in humans. *Free Rad Biol Med* 2006. 40, 608–16
- Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. *Ann Int Med* 2006. 145, 333–41
- De la Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, et al. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res* 2000. 100, 305–15

- De La Cruz¹ J, Villalobos M, Carmona¹ A, et al. Antithrombotic Potential of Olive Oil Administration in Rabbits with Elevated Cholesterol Thrombosis Research 2000. 100, 305–315
- De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 1999. 57, 445-449
- De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, et al. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999. 99, 779-785
- Jakobsen MU, O'Reilly E, Heitmann BL, et al.: Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2009. 89, 1425–1432
- De Pablo MA, Ortega E, Gallego AM, et al. The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo* 1998. 44, 57–67
- De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case control study in Uruguay. *Nutr Cancer* 2000. 37, 140-144
- De Stefano G, Piacquadio P, Servili M, et al. Effect of extraction systems on the phenolic of virgin olive oils. *Lipid-Fett* 1999. 101, 328–332
- Del Rio M, Ruedas G, Medina S, et al. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* 1998. 63(10), 871–881
- Demaision L, Moreau D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 2002. 59, 463–477
- Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur J Lip Sci Tech* 2002. 104, 587–601
- Diniz YSA, Cicogna AC, Padovani CR, et al. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition* 2004. 20, 230–234
- Dogné JM, de Leval X, Hanson J, et al. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators. Part I. Thromboxane modulators. *Curr Med Chem* 2004. 11, 1223–1241
- Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA. Plant polyphenols in cancer and heart disease : implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* 2000. 13, 79-106
- Eder E, Wacker M, Lutz U, et al. Oxidative stress related DNA adducts in the liver of female rats fed with sunflower-, rapeseed-, olive- or coconut oil supplemented diets. *Chem Biol Interact* 2006. 159, 81–89
- Edgecombe S, Stretch GL, Hayball PJ. Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nutr* 2000. 130, 2996–3002

- Engler MB, Engler MM. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr Rev* 2006. 64, 109–118
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004. 292, 1440–1446
- Esti M, Cinquanta L, La Notte E. Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *J Agric Food Chem* 1998. 46, 32– 35
- Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006. 145, 1–11
- Llorente-Cortes V, Estruch R, Mena M, et al. Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2010. 208, 442– 450
- Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P et al. Cancer chemoprevention by hydroxytorosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev* 2002. 11, 351-358
- Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, et al. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* 2006. 136, 614–619
- Facchini F, Coulston AM, Reaven GM. Relation between dietary vitamin intake and resistance to insulinmediated glucose disposal in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1996. 63, 946–949
- Fernández MI, Torres MI, Gil A, et al. Steatosis and collagen content in experimental liver cirrhosis are affected by dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Scand J Gastroenterol* 1997. 32, 350-356
- Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, et al. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med* 2000. 160, 837 –842
- Ferrari R. The role if TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 1999. 40, 97-105
- Fito M, Cladellas M, de la Torre R, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomised, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005. 181, 149–158
- Fito M, Cladellas M, de la Torre R, et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2007. 1-5

- Fito M, Cladellas M, de la Torre R, et al. The members of the SOLOS Investigators. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005. 181, 149–158
- Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, et al. Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids* 2000. 35, 633–638
- Franconi F, Coinu R, Carta S, et al. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J Agric Food Chem* 2006. 54, 3121–3125
- Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, et al. Nutrition principles and recommendations in diabetes. *Diabetes Care* 2004. 27(Suppl 1), 36–46
- Fregapane G, Lavelli V, Leon S, et al. Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *Eur J Lip Sci Techn* 2006. 108, 134–142
- Gaenzer H, Sturm W, Neumayr G, et al. Pronounced postprandial lipemia impairs endotheliumdependent dilation of the brachial artery in men. *Cardiovasc Res* 2001. 52, 509–516
- Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995. 15, 1917–1927
- Garg A, Bonanome A, Grundy SM, et al. Comparison of high-carbohydrate diet with a highmonounsaturated- fat diet in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988. 319, 829–834
- Garg A. High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1998. 67, 577–582
- Gill CI, Boyd A, McDermott E, et al. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int J Can* 2005. 117, 1–7
- Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, et al. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, alpha-tocopherol, and beta-carotene) in virgin olive oil. *Food Chem* 2002a. 78, 207–211
- Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, et al. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutrition* 2002b. 56, 114–120
- Giron MD, Sanchez F, Hortelano P, et al. Effects of dietary fatty acids on lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1999. 48, 455–460
- Gomez-Alonso S, Fregapane G, Salvador MD, et al. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J Agric Food Chem* 2003. 51, 667–672
- Gomez-Alonzo S, Salvador MD, Fregapane G. Phenolic compounds profile of Cornicarba virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 6812–6817

- Gomez-Rico A, Salvador M.D, La Greca M, et al. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J Agric Food Chem* 2006. 54, 7130–7136
- Gonzalez-Gallego J, Sanchez- Campos S, Tunon MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* 2007. 22, 287-293
- Gorinstein S, Leontowicz H, Lojek, A, et al. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 6102-6108
- Grundey SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N Engl J Med* 20 1986. 314, 745-748
- Gustone FD. *The chemistry of oils and fats: Sources, Composition, Properties and Uses* 2004
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 1981. 58, 966-968
- Gutierrez F, Fernandez JL. Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of “extra” quality. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 571–577
- Gutierrez F, Jimenez B, Ruiz A et al. Effect of olive oil ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J Agric Food Chem* 1999. 47, 121-127
- Guzik TJ, West NE, Pillai R, et al. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002. 39, 1088–1094
- Halliwell B & Gutteridge MC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enz* 1990. 186, 1–85
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J et al. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995. 33, 601–617
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006. 6, 508–519
- Harper CR, Edwards MC, Jacobson TA. Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects. *J Nutr* 2006. 136, 2844–2848
- Harper CR, Jacobson TA. The fats of life. The role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2001. 161, 2185– 2192
- Harvey EJ, Ramji DP. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or antiatherogenic? *Cardiovasc Res* 2005. 67, 11–20
- Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, et al. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 1965. 17, 281–95

- Hennig B, Toborek M. Nutrition and endothelial cell function: implications in atherosclerosis. *Nutr Res* 2001. 21 (1-2), 279-293
- Hernández R, Martínez-Lara E, Cañuelo A, et al. Steatosis recovery after treatment with a balanced sunflower or olive oil-based diet: involvement of perisinusoidal stellate cells. *World J Gastroenterol* 2005. 11, 7480-7485
- Herrera MD, Perez-Guerrero C, Marhuenda E, et al. Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 2001. 86, 349–357
- Hidaka A, Inoue K, Kutsukake S, et al. Decrease in the particle size of low-density lipoprotein (LDL) by oxidation. *Bioorg Med Chem Lett* 2005. 15, 2781–2785
- Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001. 21, 844-848
- Hosomi A, Arita M, Sato Y, et al. Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 1997. 409, 105–108
- Howard BV, Hannah JS, Heiser CC, et al. Polyunsaturated fatty acids result in greater cholesterol lowering and less triacylglycerol elevation than do monounsaturated fatty acids in a dose-response comparison in a multiracial study group. *Am J Clin Nutr* 1995. 62, 392–402
- Huber SA, Sakkinen P, Conze D, et al. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999. 19, 2364–2367
- Hussein O, Grosovski M, Lasri E, et al. Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 2007. 13, 361-368
- Ibeh IN, Saxena DK. Effect of alpha-tocopherol supplementation on the impact of aflatoxin B1 on the testes of rats. *Exp Toxicol Pathol* 1988. 50, 221–224
- Impellizzeri J, Lin J. A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning oleocanthal with probated antiinflammatory activity in extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem* 2006. 54, 3204–3208
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-Reactive protein: Risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004. 44, 6–11
- Jialal I, Devaraj S. Inflammation and atherosclerosis: the value of the highsensitivity C-reactive protein assay as a risk marker. *Am J Clin Pathol* 2001. 116(Sup), 108–115
- Jimenez J, Rondon D, Martinez L, et al. Chemical composition of olive oils. In: Mataix, J. (ed.) *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. Universidad de Granada and PULEVA Food, Granada, Spain 2001. 115–136

- Kaempf-Rotzoll DE, Traber MG, Arai H. Vitamin E and transfer proteins Curr Opin Lipidol 2003. 14, 249-254
- Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis Atherosclerosis 2006. 187, 1–17
- Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR et al. Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. J Agric Food Chem 2005. 53, 8054–8062
- Kalua CM, Bedgood DR, Bishop AG, et al. Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. J Agric Food Chem 2006. 54, 7641–7651
- Kasdallah-Grissaa A, Nakbia A, Koubaaa N, et al. Dietary virgin olive oil protects against lipid peroxidation and improves antioxidant status in the liver of rats chronically exposed to ethanol. Nutr Res 2008. 28,472–479
- Keys A, Anderson JT, Grande F: Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diets. Lancet 1957. 2, 960–966
- Keys A. Effects of different dietary fats on plasma-lipid levels. Lancet 1965. 17, 318–319
- Keys A: Coronary heart disease in seven countries. Circulation 1970. 41(Suppl1), 186-195
- Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women. The HALE Project. JAMA 2004. 292, 1433–1439
- Konstantinidou V, Covas MI, Aguayo D, et al. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. J Agric Food Chem 2010. 24, 2546-257
- Kopf M, Baumann H, Freer G et al. Impaired immune and acute- phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature 1994. 368, 339-342
- KraussRM, DreonDM. Low-density-lipoprotein subclasses and response to a low-fat diet in healthy men. Am J Clin Nutr Aug 1995. 62, 478S–487S
- Kreeft AJ, Moen CJ, Porter G, et al. Genomic analysis of the response of mouse models to high-fat feeding shows a major role of nuclear receptors in the simultaneous regulation of lipid and inflammatory genes. Atherosclerosis 2005. 182, 249–257
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med 2002. 113 Suppl 9B,71-88
- Kritchevsky SB, Cesari M, Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. Cardiovasc Res 2005. 66, 265–275

- Krzeminski R, Gorinstein S, Leontowicz H et al. Effect of Different Olive Oils on Bile Excretion in Rats Fed Cholesterol-Containing and Cholesterol-Free Diets. *J Agric Food Chem* 2003. 51, 5774-5779
- Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 2006. 119, 166e17-166e28
- Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 1999. 70, 475S-490S
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002.106, 1614–1617
- Libinaki R, Tesanovic S, Heal A, et al. Effect of tocopheryl phosphate on key biomarkers of inflammation: Implication in the reduction of atherosclerosis progression in a hypercholesterolaemic rabbit model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010. 37, 587–592
- Lichtenstein A, Schwab US. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis* 2000. 150, 227–243
- Liu ML, Ylitalo K, Salonen R, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein and its association with carotid intima-media thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004. 24, 1492–1497
- Llorente-Cortes V, Estruch R, Mena MP, et al. Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2010. 208, 442-450
- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Todd M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics 2010 Update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010. 121, e18-e209
- Lopez-Miranda J, Badimon L, Bonanome A, et al. Monounsaturated fat and cardiovascular risk. *Nutr Rev* 2006. 64(s2), 2–12
- Lowe GDO, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: weighing the evidence. *Curr Atheroscler Rep* 2006. 8, 421–428
- Machlin LJ. Vitamin E. In “Handbook of Vitamins,” (L. J. Machlin, Ed.), 2nd ed. 1991. 99–146. Marcel Dekker Inc., New York.
- Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in North and South Europeans. *FASEB J* 2007. 137, 84–87
- Mailer RJ, Ayton J. Comparison of olive oil (*Olea europaea*) quality extracted by stonemill and hammermill. *N Zeal J Crop Hor Sci* 2004. 32, 325–330
- Mangge H, Hubmann H, Pilz S, et al. Beyond cholesterol–inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2004. 42, 467–474

- Manna C, Galletti P, Maisto G, et al. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2000. 470, 341–344
- Marrugat J, Covas MI, Fito M, et al. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. A randomized controlled trial. *Eur J Nutr* 2004. 43, 140–147
- Martinez-Gonzalez MA. The SUN cohort study. *Public Health Nutr* 2006. 9, 127–131
- Martini FH. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*, 7 ed.; Pearson Education Inc.: San Francisco, CA, USA, 2006.
- Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, et al. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Canc* 1994. 58, 774–780
- Masella R, Vari R, Diarchivio M, et al. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr* 2004. 134, 785–791
- Massaro M, Carluccio MA, Paolicchi A, et al. Mechanisms for reduction of endothelial activation by oleate: inhibition of nuclear factor-kappaB through antioxidant effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002. 67, 175–181
- Massimo C, Lucio T, Jes M, et al. Extra virgin olive oil and oleic acid. *Nutr Clin Diet Hosp* 2009. 29 (3), 12–24
- Mata P, Alonso R, Lopez-Farre A, et al. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996. 16, 1347–1355
- Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in men. *J Lipid Res* 1985. 26, 194–202
- Mena M, Sacanella E, Vazquez-Agell M, et al. Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr* 2009. 89, 248–56
- Mensink RP, Janssen MC, Katan MB. Effect on blood pressure of two diets differing in total fat but not in saturated and polyunsaturated fatty acids in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1988. 47, 976–980
- Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992. 12, 911–919
- Mensink RP, Katan MB. Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoproteins in healthy men and women. *Lancet* 1987. 1, 122–125

- Mente A, de Koning L, Shannon HS, et al. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2009. 169, 659–669
- Meydani M. Effect of functional food ingredients: Vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000. 71(suppl), 1665-1668
- Mezey E. Dietary fat and alcoholic liver disease. *Hepatology* 1998. 28, 901-905
- Miro Casas E, Albadalejo MF, Covas Planells MI, et al. Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil. *Clin Chem* 2001. 47, 341–343
- Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, et al. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem* 2003. 49, 945–952
- Moreno JA, Perez-Jimenez F, Marin C, et al. The effect of dietary fat on LDL size is influenced by apolipoprotein E genotype in healthy subjects. *J Nutr* 2004. 134, 2517–2522
- Moreno JJ, Carbonell T, Sanchez T, et al. Olive oil decreases both oxidative stress and the production of arachidonic acid metabolites by the prostaglandin G/H synthase pathway in rat macrophages. *J Nutr* 2001. 131, 2145–2149
- Moreno JJ, Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review) *J Nutr Biochem* 2003. 14 , 182-195
- Morrissey P A, Sheehy PJA. Optimal nutrition: Vitamin E. *Proc Nutr Soc* 1999. 58, 459-488
- Morton LW, Caccetta RA, Puddey IB, et al. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds. *Clin Exp Pharmac Physiol* 2000. 27, 152-159
- Mueller HW, Haught CA, McNatt JM, et al. Measurement of platelet-activating factor in a canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advanced coronary artery disease. *Circ Res* 1995. 77, 54–63
- Mulinacci N, Giaccherini C, Innocenti M, et al. Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives. *J Sci Food Agric* 2005. 85, 662–670
- Napoli C, Triggiani M, Palumbo G, et al. Glycosylation enhances oxygen radical-induced modifications and decreases acetylhydrolase activity of human low density lipoprotein. *Basic Res Cardiol* 1997. 92, 96–105
- Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. The Ying and Tang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996. 16, 831-842
- Neuzil J, Tomasetti M, Mellick AS, et al. Vitamin E analogues: A new class of inducers of apoptosis with selective anti-cancer effects. *Curr Cancer Drug Targets* 2004. 4(4), 355–372
- Nicolaiew N, Lemort N, Adorni L, et al. Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann Nutr Metab* 1998. 42, 251–260

- Okogeri O, Tasioula-Margari M. Changes occurring in phenolic compounds and alpha-tocopherol of virgin olive oil during storage. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 1077–1080
- Oram JF, Bornfeldt KE. Direct effects of long-chain non-esterified fatty acids on vascular cells and their relevance to macrovascular complications of diabetes. *Front Biosci* 2004. 9, 1240–1253
- Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, et al. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 2008. 138(3), 562–566
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Canc* 2000. 36, 1235– 1247
- Owen RW, Haubner R, Wurtele G, et al. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Canc Prev* 2004. 13, 319–326
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, et al. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 2000. 38, 647–659
- Pallottini V, Martini C, Pascolini A, et al. 3- Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme .A reductase deregulation and age-related hypercholesterolemia: a new role for ROS. *Mech Ageing Dev* 2005. 126, 845 –851
- Papadopoulos G, Boskou G. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Food Chem Toxicol* 1991. 68, 669–671
- Parikh P, McDaniel MC, Ashen MD, et al. Diets and cardiovascular disease. An evidence-based assessment. *J Am Coll Cardiol* 2005. 45, 1379–1387
- Parker RS. Dietary and biochemical aspects of vitamin E. *Adv Food Nutr Res* 1989. 33, 157–232
- Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001. 103, 2531–2534
- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003. 111, 1805–1812
- Perez-Jimenez F, de Cienfuegos AG, Badimon L, et al., International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 2005. 35, 421–424
- Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Perez et al. A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia* 2001. 44, 2038 –2043
- Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, et al. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res* 2007. 51, 1199–1208

- Perona J, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006. 17, 429-445
- Perona JS, Canizares J, Montero E, et al. Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin Nutr* 2004. 23, 1113–1121
- Pietzch J, Julius U. Different susceptibility to oxidation of proline and arginine residues of apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoproteins. *FEBS letter* 2001. 491, 123-126
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, et al. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 2004. 80, 1012–1018
- Psomiadou E, Tsimidou M. Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 716-721
- Ramirez-Tortosa MC, Aguilera CM, Quiles JL, et al. Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu²⁺ induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis. *Biofactors* 1998. 8, 79–85
- Ranalli A, Ferrante ML, De Mattia G, et al. Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *J Agric Food Chem* 1999. 47, 417–424
- Rastrelli L, Passi S, Ippolito F, et al. Rate of degradation of alpha-tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 5566–5570
- Renaud S. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995. 61 (suppl), 13605-13675
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996. 20, 933–956
- Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003. 107, 363–369
- Riediger ND, Othman RA, Suh M, et al. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc* 2009. 109, 668-679
- Rigotti A, Trigatti B, Babitt J, et al. Scavenger receptor BI: a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1997. 8, 181 –188
- Ringseis R, Eder K. Fatty acids and signaling in endothelial cells prostaglandins. *Leuko Essen Fatty Acids* 2010. 82, 189–198
- Robins RJ. Phenolic acids in food. An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 2003. 51, 2866-2887

- Roche HM, Gibney MJ. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk* 2000. 7, 317–324
- Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, et al., Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998. 68, 552–560
- Romero MP, Tovar MJ, Girona J, et al. Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *J Agric Food Chem* 2002. 50, 5349–5354
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999. 340, 115–126
- Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, et al. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 2005. 46, 1864–1868
- Rudel LW, Kelley K, Sawyer JK, et al. Dietary monounsaturated fatty acids promote aortic atherosclerosis in LDL receptor-null, human ApoB100-overexpressing transgenic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998. 18, 1818-1827
- Ryan M, Mc Inerney D, Owens D, et al. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endotheliumdependent vasoreactivity. *QJM* 2000. 93, 85–91
- Sadeghi S, Wallace FA, Calder PC. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* 1999. 96, 404–410
- Salas J, Lopez Miranda J, Jansen S, et al. The diet rich in monounsaturated fat modifies in a beneficial way carbohydrate metabolism and arterial pressure. *Med Clin (Barc)* 1999. 113, 765 –769
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001. 120, 1183-1192
- Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, et al. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000. 32, 189–198
- Sato K, Arai H, Mizuno A, et al. Dietary palatinose and oleic acid ameliorate disorders of glucose and lipid metabolism in Zucker fatty rats. *J Nutr* 2007. 137, 1908-1915
- Selvaggini R, Servili M, Urbani S, et al. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J Agric Food Chem* 2006. 54, 2832–2838
- Serafini M. Dietary vitamin E and T cell-mediated function in the elderly: Effectiveness and mechanism of action. *Int J Dev Neurosci* 2000. 18(4–5), 401–410

- Serra-Majem Ll, Ngo de la Cruz J, Ribas L, et al. Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* 2003, 57, 2-7
- Serrano-Martinez M, Palacios M, Martinez-Losa E, et al. A Mediterranean dietary style influences TNF-alpha and VCAM-1 coronary blood levels in unstable angina patients. *Eur J Nutr* 2005. 44, 348-354
- Servili M, Selvaggini R, Esposto S, et al. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chrom A* 2004. 1054, 113-127
- Sheila A, Wiseman, Jolanda NNJ, Nanneke J. et al. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits *Atherosclerosis* 1996. 20, 5-23
- Shepard RK, Miller JG, Wickline SA. Quantification of atherosclerosis plaque composition in cholesterol-fed rabbits with 50-Mhz acoustic microscopy. *Arterioscler Thromb* 1992. 12, 1127-1234
- Shimozawa M, Naito Y, Manabe H, et al. 7-Ketocholesterol enhances the expression of adhesion molecules on human aortic endothelial cells by increasing the production of reactive oxygen species. *Redox Rep* 2004. 9(6), 370–375
- Silva KD, Kelly CN, Jones AE, et al. Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 2003. 166, 73–84
- Sivakuma C, Uccella N. HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. *Chem Nat Compounds* 2005. 41, 588–591
- Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, et al. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 2004. 351, 2611–2618
- Smith RD, Kelly CN, Fielding BA, et al. Long-term monounsaturated fatty acid diets reduce platelet aggregation in healthy young subjects. *Br J Nutr* 2003. 90, 597–606
- Soriguer F, Moreno F, Rojo-Martínez G, et al. Monounsaturated n-9 fatty acids and adipocyte lipolysis in rats. *Br J Nutr* 2003. 90, 1015-1022
- Stark AH, Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev* 2002. 60, 170–176
- Subbiah MTR, Sprinkle JD, Rymaszewski Z, et al. Short-term exposure to high dietary cholesterol in early life: arterial changes and response after normalization of plasma cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1989. 50, 68–72
- Tahvonen RL, Schwab US, Linderborg KM, et al. Black currant seed oil and fish oil supplements differ in their effects on fatty acid profiles of plasma lipids, and

- concentrations of serum total and lipoprotein lipids, plasma glucose and insulin. *J Nutr Biochem* 2005. 16, 353-359
- Tappia PS, Grimble RF. Complex modulation of cytokine induction by endotoxin and tumour necrosis factor from peritoneal macrophages of rats by diets containing fats of different saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid composition. *Clin Sci (Lond)* 1994. 87, 173-178
- Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. Effects of diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids on blood coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1999.81, 259-263
- Thanos D, Maniatis T. NF-kappaB: a lesson in family values. *Cell* 1995. 80, 529-532
- Thijssen MA, Mensink RP. Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans. *Am J Clin Nutr* 2005. 82, 510-516
- Thomsen C, Storm H, Holst JJ, et al. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2003. 77, 605–611
- Toborek M, Hennig B. The role of linoleic acid in endothelial cell gene expression. Relationship to atherosclerosis. *Subcell Biochem* 1998. 30, 415–436
- Tovar MJ, Motilva MJ, Romero MP. Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J Agric Food Chem* 2001. 49, 5502–5508
- Traber MG, Carpentier YA, Kayden HJ, et al. Alterations in plasma alpha- and gammatocopherol concentrations in response to intravenous infusion of lipid emulsions in humans. *Metabolism* 1993. 42, 701–709
- Trakhtenberg H. Effect of Different Olive Oils on Bile Excretion in Rats Fed. *J Agric Food Chem* 2003. 51 (19), 5774–5779
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, et al. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003. 348, 2599–2608
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 2005. 18, 98–112
- Truswell AS, Choudhury N: Monounsaturated oils do not all have the same effect on plasma cholesterol. *Eur J Clin Nutr* 1998. 52, 312–315
- Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, et al. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr* 2001. 131, 1993–1996
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 2002. 13, 636– 644

- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHOMONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999. 353, 1547–1557
- Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation* 2005. 112, 976–983
- US Food and Drug Administration. Press Release P04-100. November 1, 2004. <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html>. Accessed on October 28, 2006
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, et al. Demonstration That C-Reactive Protein Decreases eNOS Expression and Bioactivity in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation* 2002. 106, 1439–1441
- Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, et al. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem* 2005. 89, 561–568
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, et al. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995. 117, 25–32
- Visioli F, Bellosta S, Galli C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci* 1998. 62, 541–546
- Visioli F, Caruso D, Grande S, et al. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr* 2005. 44, 121–127
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, et al. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 1995. 117, 25–32
- Visioli F, Galli C, Bornet F, et al. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* 2000. 468, 159–160
- Visioli F, Galli C, Galli G et al. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur J Lipid Sci* 2002. 104, 677–684
- Visioli F, Galli C, Plasmati E, et al. Olive oil phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation* 2000. 102, 2169–2171
- Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* 1998. 56, 142–147
- Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscl Rep* 2001. 3, 64–67
- Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 2002. 22, 65–75

- Visioli F, Vinceri FF, Galli C. Waste water from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia* 1995. 46, 4292-4296
- Visioli, F., Caruso, D., Galli, C., et al., (2000a). Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem and Biophys Res Commun*, 278, 797–799
- Vischers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, et al. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 2002. 132, 409–417
- Vischers MN, Zock PL, Wiseman SA, et al. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 2001. 55, 334–341
- Wallace FA, Neely SJ, Miles EA, et al. Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumour cells. *Immunol Cell Bio*. 2000. 78, 40–48
- Wang XL, Oosterhof J. Tumor necrosis factor α G-308A polymorphism and risk for coronary artery disease. *Clin Sci* 2000. 98, 435-437
- Warensjö E, Sundström J, Vessby B, et al: Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* 2008. 88, 203–209
- Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003. 168, 99–106
- Williams CM. Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. *Atherosclerosis* 1998. 141, 87–92
- Wilson and Ralph B, D’Agostino T, Benjamin E, et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without Prior Myocardial Infarction: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2003. 107, 1486-1491
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991. 88, 1785–1792
- Wojcicki J, Rozewicka L, Barcew-Wiszniewska B, et al. Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1991. 87, 9–16
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local and systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998. 101, 311-320
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976. 15, 212-216
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 1994. 41, 241–247
- Yki-Järvinen H. Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med* 2005. 37, 347-356

- Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effect of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005. 135, 2291-2294
- Zhand H, Park Y, WU J, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction *Clin Sci* 2009. 116, 219–230
- Zhang G, Zhang W. Heart rate, lifespan, and mortality risk. *Ageing Res Rev* 2009. 8, 52–60
- Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. Torzewski. C-Reactive Protein–Mediated Low Density Lipoprotein Uptake by Macrophages : Implications for Atherosclerosis. *Circulation* 2001. 103, 1194–1197