

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ – ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Η επίδραση του α-λινολενικού οξέος σε παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης και ο
ρόλος της Μεσογειακού τύπου διαίτας

Γιώργος Κ. Πάσχος
Διαιτολόγος – Διατροφολόγος

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2004

Στους γονείς μου

Πίνακας περιεχομένων

A. Ευχαριστίες	1
B. Σύντομο βιογραφικό σημείωμα.....	3
Γ. Θεωρητικό μέρος.....	9
Κεφάλαιο 1. Αθηροσκλήρωση	9
α. Γενική επισκόπηση	9
β. Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης	9
Κεφάλαιο 2. Παράγοντες κινδύνου	15
α. Λιποπρωτεΐνες του ορού.....	15
β. Πυκνότητα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL).....	18
γ. Απολιποπρωτεΐνες A-I και B ορού	19
δ. Απολιποπρωτεΐνη E, πολυμορφισμός της απολιποπρωτεΐνης E.....	21
ε. Δείκτες φλεγμονής	23
στ. Μόρια προσκόλλησης.....	25
Κεφάλαιο 3. Διατροφή και παράγοντες κινδύνου	27
α. Μεσογειακή διαίτα	27
β. ω-3 λιπαρά οξέα.....	28
Δ. Πειραματικό μέρος.....	33
Κεφάλαιο 4. Εισαγωγή – Σκοπός εργασίας.....	33
Κεφάλαιο 5. Δημοσίευση 1 Το α-λινολενικό οξύ της διατροφής μειώνει την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, το αμυλοειδές A του ορού και την ιντερλευκίνη 6 σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς.....	37
Κεφάλαιο 6. Δημοσίευση 2 Η επίδραση διαίτας εμπλουτισμένης σε α-λινολενικό οξύ στα διαλυτά μόρια προσκόλλησης σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς	53
Κεφάλαιο 7. Δημοσίευση 3 Η διαίτα επηρεάζει την αντι-φλεγμονώδη δράση του α-λινολενικού οξέος σε δυσλιπιδαιμικούς	69
Κεφάλαιο 8. Δημοσίευση 4 Ο γονότυπος της απολιποπρωτεΐνης E σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς και η ανταπόκριση λιπιδίων του αίματος και δεικτών φλεγμονής στο α-λινολενικό οξύ.....	87
Κεφάλαιο 9. Δημοσιεύσεις σε περιοδικά με ανεξάρτητους κριτές	113
E. Συμπεράσματα.....	153
ΣΤ. Περίληψη	161
Z. Αναφορές.....	163

A. Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη έλαβε χώρα στο Τμήμα Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και την Καρδιολογική Κλινική του Λαϊκού Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών. Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Ανάπτυξης, Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και εν μέρει από την Unilever/Ελαΐς στην Ελλάδα. Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Κυριακίδη και Βοττέα, διευθυντές της Καρδιολογικής Κλινικής του Λαϊκού για την παροχή του χώρου στον οποίο πραγματοποιήθηκε η συλλογή των εθελοντών της μελέτης καθώς και η παρακολούθησή τους. Στη διάρκεια της μελέτης έτυχα της βοήθειας της γιατρού κ. Θεριού και του νοσοκόμου κ. Πετράκη οι οποίοι μου προσέφεραν την πολύτιμη κλινική τους εμπειρία. Είχα επίσης την ευκαιρία να συνεργαστώ με τον γιατρό κ. Ραλλίδη τον οποίο και ευχαριστώ για την σημαντική βοήθεια.

Η εξαγωγή μέρους των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκε σε εργαστήριο του Κέντρου Διατροφής και Ασφάλειας Τροφίμων του Πανεπιστημίου του Surrey υπό την επίβλεψη του καθηγητή Dr. Griffin, τον οποίο και ευχαριστώ για τη συνεργασία και τις εύστοχες παρατηρήσεις σχετικά με τη μελέτη.

Ένα άτομο που οφείλω να ευχαριστήσω είναι το επ. καθηγητής κ. Γιαννακούρης. Ο κ. Γιαννακούρης παρακολούθησε το σύνολο της πορείας μου στη διάρκεια της μελέτης από τη συλλογή των δειγμάτων έως τη συγγραφή των επιστημονικών δημοσιεύσεων και με βοήθησε σε κάθε μου βήμα. Δεν θα ξεχάσω τις ατελείωτες ώρες που μοιρασθήκαμε συζητώντας για την παρούσα μελέτη.

Ο Κώστας ο Πέτροβας ήταν το άτομο που με εισήγαγε στο εργαστήριο. Άλλαξε τον τρόπο με τον οποίο αντιλαμβάνομαι την επιστημονική γνώση και με έμαθε να δουλεύω σκληρά για τους στόχους μου. Αποτέλεσε μια ανεξάντλητη πηγή γνώσης και απαντήσεων σε όποια ερώτηση είχα σχετικά με την ανοσολογία και τις τεχνικές του εργαστηρίου, και ήταν συνεχώς οδηγός μου για τα επόμενα βήματά μου.

Το να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου κ. Σκοπούλη είναι πολύ λίγο σε σχέση με τα όσα της οφείλω. Ήταν εκείνη που υποστήριξε τις προσπάθειες μου από την πρώτη στιγμή της μελέτης αυτής. Η καθοδήγησή της μου έδωσε την ευκαιρία να αναπτύξω τις ικανότητες που χρειάζομαι για την επίτευξη της μελέτης. Η συνεργασία μου μαζί της αποτέλεσε πάντα την ώθηση προς τους στόχους μου.

Πως θα μπορούσα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Ζαμπέλα, του οποίου η βοήθεια ήταν πέρα από απαραίτητη για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης. Η

επίβλεψη του κ. Ζαμπέλα λειτούργησε ως ασφαλιστική δικλείδα σε όλες μου τις προσπάθειες. Η συνεισφορά του ήταν πηγή έμπνευσης για μένα, ενώ το να μαθαίνω από τα σχόλια και τις διορθώσεις του μου έδινε πάντα ικανοποίηση.

B. Σύντομο βιογραφικό σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία γέννησης: 3 Ιουλίου 1976
 Εθνικότητα: Ελληνική
 Διεύθυνση: Γρ. Λαμπράκη 36, 43200 Παλαμάς ΕΛΛΑΔΑ
 Τηλέφωνο: +306976773934
 +302444022538
 Email: gpaschos@hua.gr
 Οικογενειακή κατάσταση: άγαμος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

01/09/1999 – Διδακτορικό Δίπλωμα, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο,
 Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Αθήνα,
 Ελλάδα. Τίτλος διδακτορικής διατριβής: «Η επίδραση
 του α-λινολενικού οξέος σε παράγοντες κινδύνου
 αθηροσκλήρωσης και ο ρόλος της Μεσογειακού τύπου
 δίαιτας», επιβλέπων: Δρ. Ζαμπέλας Α.
 01/09/1995 – 17/07/1999 Πτυχίο Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο
 Πανεπιστήμιο, Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας -
 Διατροφής, Αθήνα, Ελλάδα. Πτυχιακή Μελέτη:
 «Διαιτητικοί παράγοντες και καρκίνος», επιβλέπων:
 Καθηγ. Σκοπούλη Φ.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (πολύ καλά), Γερμανικά (μέτρια).

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

26/05/2003 – 26/05/2004 Στρατιωτική θητεία
 14/06/2000 – 11/10/2001 Επιστημονικός συνεργάτης – Καρδιολογική κλινική,
 Γενικό Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών, Ελλάδα

05/10/1998 – 28/05/1999 Πρακτική άσκηση Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο
Αθηνών, Ελλάδα.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Υποτροφία Χαροκοπείου Ιδρύματος για μεταπτυχιακούς φοιτητές.
Αριστείο διάκρισης σπουδών κατά το ακαδημαϊκό έτος 1997-8, Ίδρυμα Κρατικών
Υποτροφιών.

ΣΥΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΚΟΙΝΩΤΗΤΕΣ

Ελληνική Εταιρία Λιπιδιολογίας και Αθηροσκλήρωσης

ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

20/03/2003 – 26/03/2003 9^ο Σεμινάριο του προγράμματος European Nutrition
Leadership Programme (ENLP), Parc Alvisse Hotel,
Luxembourg.

27/01/2002 – 09/02/2002 Πρόγραμμα εκπαίδευσης Σωκράτης «Καινοφανή και
Λειτουργικά τρόφιμα», Πανεπιστήμιο Ghent, Τμήμα
Γεωπονικής και Εφαρμοσμένων Βιολογικών
Επιστημών, Βαρσοβία, Γεωπονική Σχολή.

14/10/2001 – 02/11/2001 Εκπαίδευση στη μέθοδο κλασματοποίησης της LDL
μέσω υπερφυγοκέντρωσης στο εργαστήριο Διατροφής
και Ασφάλειας Τροφίμων του Τμήματος Βιοϊατρικής
και Επιστημών Ζωής στο Πανεπιστήμιο του Surrey.

01/02/2000 – 05/07/2000 Εκπαίδευση σε ανοσολογικές τεχνικές στο Εργαστήριο
Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Απομόνωση DNA
- Προσδιορισμός γονοτύπου με πολυμερισμό αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
και επακόλουθο digestion με ένζυμο περιορισμού
- Προσδιορισμός αντισωμάτων για αυτοαντισώματα έναντι φωσφολιπιδίων και
πρωτεϊνών με ανοσοενζυμοπροσροφητική τεχνική (ELISA): αντι-καρδιολιπινικά

αντισώματα (aCL, IgG - IgM), αντισώματα έναντι β2 γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2GPI, IgG-IgM-IgA).

- Ανοσοηλεκτροφορετικές τεχνικές για προσδιορισμό αντισωμάτων
- Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου ομφάλιου λώρου (human umbilical vein endothelial cell) HUVEC για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων έναντι ενδοκυττάρων συστατικών με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού
- Κλασματοποίηση LDL μέσω υπερφυγοκέντρωσης
- Ανάλυση της σύστασης της μεμβράνης ερυθροκυττάρων σε λιπαρά οξέα μέσω αέριας χρωματογραφίας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Rallidis LS, **Paschos G**, Liakos GK, Velissaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A. Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis*. 2003; 167: 237-42.
2. Zampelas A, **Paschos G**, Rallidis L, Yiannakouris N. Linoleic acid to alpha-linolenic acid ratio. From clinical trials to inflammatory markers of coronary artery disease. *World Rev Nutr Diet*. 2003; 92: 92-108.
3. Rallidis LS, **Paschos G**, Papaioannou M, Liakos GK, Panagiotakos DB, Anastasiadis G, Zampelas A. The effect of diet enriched with α-linolenic acid on soluble cellular adhesion molecules in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis*. 2004; 174: 127-132.
4. **Paschos GK**, Rallidis LS, Liakos GK, Panagiotakos DB, Anastasiadis G, Votteas V and Zampelas A. Background diet influences the anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid in dyslipidaemic subjects. *Br J Nutr*. 2004; 92: 649-655.
5. **Paschos GK**, Yiannakouris N, Rallidis LS, Davies I, Griffin BA, Zampelas A. Apolipoprotein E genotype in dyslipidaemic patients and response of blood lipids and inflammatory markers to alpha-linolenic acid. *Angiology*. (in press)

Κεφάλαια σε βιβλίο

«Διατροφή και Δυσλιπιδαιμία». Ζαμπέλας Α, Πάσχος Γ, Ελισάφ Μ. στο
«Κλινική Διατροφή» επιμέλεια Αντώνης Ζαμπέλας, Εκδόσεις Πασχαλίδης
(υπό προετοιμασία)

Περίληψεις

1. Paschos G., Hourdakis M., Alexaki K., Sitara M., Zampelas A. “Effect of α-linolenic acid supplementation on serum lipid levels and immune factors in healthy volunteers”. 6th Hellenic Nutrition and Dietetics Congress. 24-26 Nov. 2000, Athens. (Conference Abstract book) (oral presentation)
2. G. Paschos, N. Yiannakouris, L. Rallidis, G. Liakos, A. Zampelas. “Apolipoprotein E genotype and the response of blood lipids and blood inflammatory indices to α-linolenic acid in hyperlipidaemic subjects”. 73rd EAS Congress. July 7-10, 2002, Salzburg, Austria. Atherosclerosis 2002, 3(Suppl.):182. (poster presentation)
3. G. Paschos, I. Davies, B.A. Griffin, E. Theriu, G. Anastasiadis, A. Zampelas. “Supplementation of α-linolenic or linoleic acids does not improve plasma lipid levels when the background diet is a Mediterranean-type”. 73rd EAS Congress. July 7-10, 2002, Salzburg, Austria. Atherosclerosis 2002, 3(Suppl.):182. (poster presentation)
4. L. Rallidis, G. Paschos, G. Liakos, A. Velissaridou, E. Papasteriadis, A. Zampelas. “Effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on pro-inflammatory cytokines in dyslipidaemic patients”. 73rd EAS Congress. July 7-10, 2002, Salzburg, Austria. Atherosclerosis 2002, 3(Suppl.):190. (poster presentation)
5. L. Rallidis, G. Paschos, G. Liakos, M. Papaioanou, A. Zampelas, A. Velissaridou, E. Papasteriadis. “Diet supplementation with n-3 fatty acids reduces inflammatory markers levels in dyslipidaemic CHD patients”. 23rd Hellenic Conference on Cardiology. 30 October – 2 November, 2002, Athens, Greece. (No: 408, Conference Abstract book). (poster presentation)

6. G. Paschos, L. Rallidis, G. Anastasiadis and A. Zampelas. "Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid in hyperlipidaemic subjects and Mediterranean diet". Second Congress of the European Chapter of the American College of Nutrition. November 15-16, 2002, Athens, Greece. (Conference Abstract book). (poster presentation)

Γ. Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1. Αθηροσκλήρωση

α. Γενική επισκόπηση

Ο όρος αρτηριοσκλήρωση προέρχεται από τις Ελληνικές λέξεις αρτηρία και σκλήρωση και περιγράφει ένα σύνολο ασθενειών που προσβάλλουν διαφορετικά τμήματα του αρτηριακού δέντρου, οδηγώντας συχνά σε απόφραξη των αρτηριών. Οι ασθένειες αυτές ποικίλλουν από την αρτηριδιοσκλήρωση, η οποία καταλήγει σε εκφυλιστικές αλλαγές και ίνωση των μικρών αρτηριών (αρτηρίδια), έως την αθηροσκλήρωση, την εκτεταμένη νόσο των μεσαίου και μεγάλου μεγέθους μυϊκών αρτηριών, κυρίως των στεφανιαίων αρτηριών, της αορτής, της καρωτίδας, των μειζόνων αρτηριών που τροφοδοτούν τον εγκέφαλο και των αρτηριών που τροφοδοτούν το περιφερικό αγγειακό σύστημα, κατά κύριο λόγο τις αρτηρίες των ποδιών, όπως οι λαγόνιες και επιφανειακές μηριαίες αρτηρίες. Κατά συνέπεια, η αθηροσκλήρωση είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας των Δυτικών κοινωνιών καθώς προκαλεί το έμφραγμα του μυοκαρδίου, τα καρδιοεγκεφαλικά επεισόδια, το αορτικό ανεύρυσμα και την περιφερειακή αγγειοπάθεια.

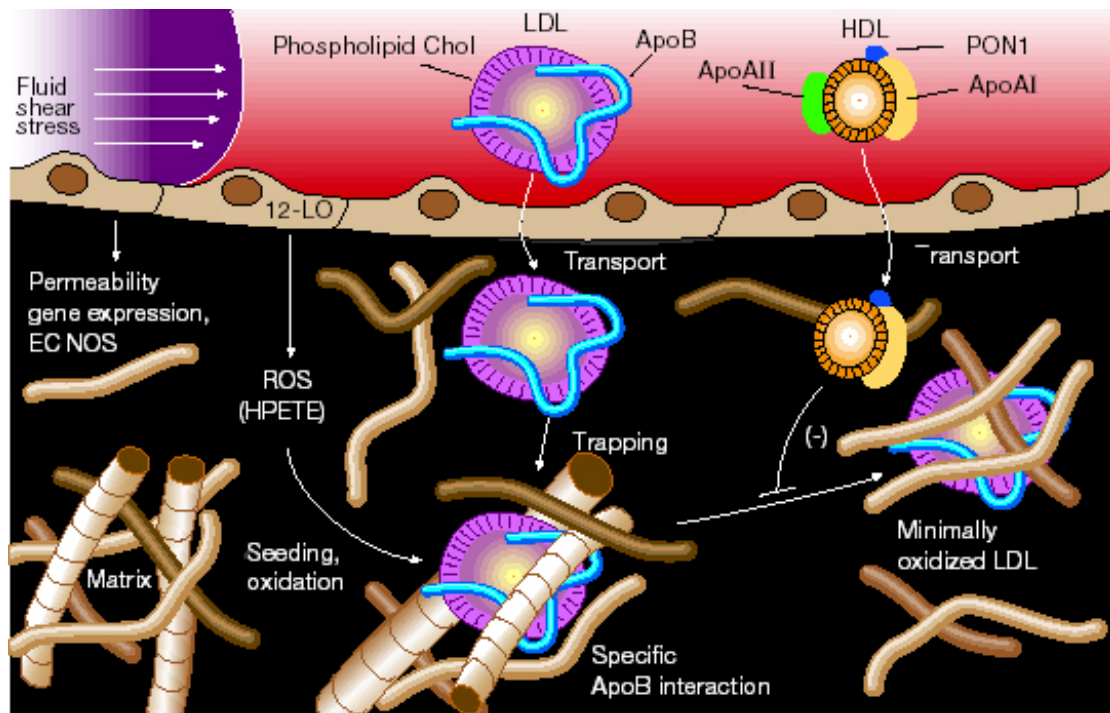
β. Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση είναι μια εκφυλιστική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από πολυάριθμους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την έναρξη και την εξέλιξη της νόσου. Παρόλο που έχει περιγραφεί σχεδόν πριν από 150 χρόνια (Virchow 1856 [1]) η πρωταρχική αιτία της νόσου δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί. Εντούτοις, είναι πια σαφές ότι η αθηροσκλήρωση δεν αποτελεί απλά μια εκφυλιστική συνέπεια του γήρατος αλλά μια χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε οξύ κλινικό περιστατικό μετά από ρήξη της αθηροματικής πλάκας και επακόλουθη θρόμβωση.

Ένα κύριο γεγονός που χαρακτηρίζει την έναρξη της αθηροσκλήρωσης είναι η συσσώρευση μορίων χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) στον υπενδοθηλιακό χώρο. Η είσοδος της LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο με παθητική διάχυση γίνεται στα πλαίσια του φυσιολογικού της ρόλου για την μεταφορά χοληστερόλης στα κύτταρα όλου του σώματος (Εικόνα 1). Ο ρυθμός εισόδου της LDL διαμέσω του αρτηριακού τοιχώματος εξαρτάται από τρεις παράγοντες: τη συγκέντρωση της LDL στο πλάσμα [2], την αρτηριακή πίεση [3] και τη διαπερατότητα του αρτηριακού τοιχώματος η οποία αυξάνει με την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης [4]. Θα πρέπει εδώ

να σημειωθεί ότι η διαπερατότητα του αρτηριακού τοιχώματος είναι διαφορετική σε διαφορετικά σημεία του αρτηριακού δένδρου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιοχές των αρτηριών όπου η αιματική ροή είναι συνεχής είναι ελλειψοειδή σε σχήμα και ευθυγραμμισμένα με την κατεύθυνση της ροής. Τα κύτταρα σε περιοχές αρτηριακής διακλάδωσης όπου η αιματική ροή διαταράσσεται έχουν πολυγωνικό σχήμα και ακαθόριστο προσανατολισμό. Αυτές οι τελευταίες περιοχές παρουσιάζουν αυξημένη διαπερατότητα σε μακρομόρια όπως η LDL και αποτελούν θέσεις προτεραιότητας για το σχηματισμό αθηροματικής πλάκας [5].

Η συσσώρευση LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο προάγει την τροποποίηση της μέσω οξείδωσης, λιπόλυσης, πρωτεόλυσης και σχηματισμού συσσωματωμάτων. Η

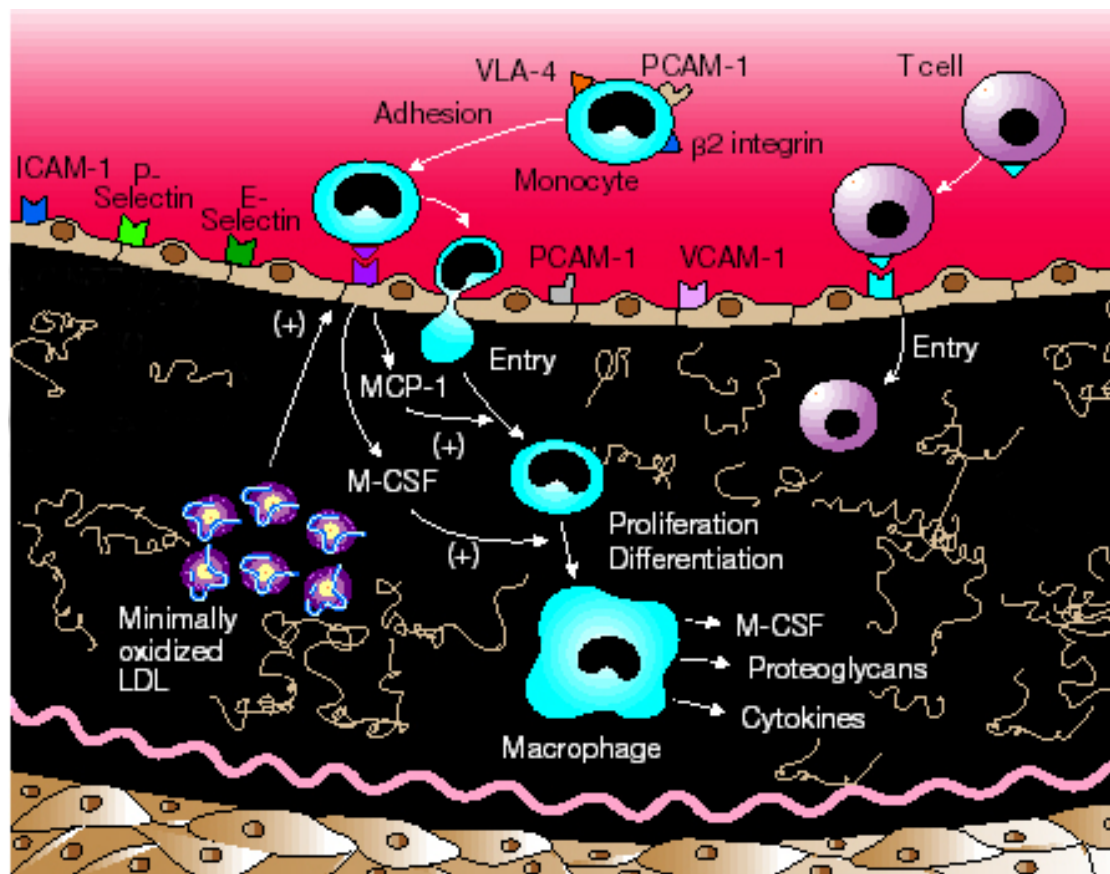


Εικόνα 1. Έναρξη σχηματισμού πλάκας. Fluid shear stress, διατατική τάση υγρού; phospholipid chol, χοληστερόλη φωσφολιπιδίων; LDL, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας; Apo, απολιποπρωτεΐνη; HDL, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη; PON1, παραοξονάση; permeability, διαπερατότητα; gene expression, έκφραση γονιδίων; EC NOS, συνθετάση νιτρικού οξέος ενδοθηλιακών κυττάρων; ROS (HPETE), αντιδρώσες μορφές οξυγόνου (υδροπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ); Transport, μεταφορά; Trapping, εγκλωβισμός; Matrix, μεσοκυττάρια ουσία; Seeding, ενδοπυρήνωση; oxidation, οξείδωση; specific ApoB interaction, ειδική αλληλεπίδραση απολιποπρωτεΐνης B; minimally oxidized LDL, μερικώς οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας.

Εικόνα από Lusis 2000 Nature 407:233-241

συσσωμάτωση της LDL δημιουργεί το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο η LDL δεν προστατεύεται πλέον από τις αντιοξειδωτικές ουσίες που παρέχουν αποτελεσματική προστασία της LDL στο πλάσμα ή τα εξωκυττάρια υγρά. Η συσσωμάτωση εκθέτει την LDL στα οξειδωτικά προϊόντα των κυττάρων του αγγείου και προάγει το σχηματισμό της «μερικώς οξειδωμένης» LDL [6]. Η συσώρευση «μερικώς οξειδωμένης» LDL διεγείρει την παραγωγή μιας σειράς προφλεγμονωδών μορίων [7], μορίων προσκόλλησης [8] και αυξητικών παραγόντων [9] από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 2).

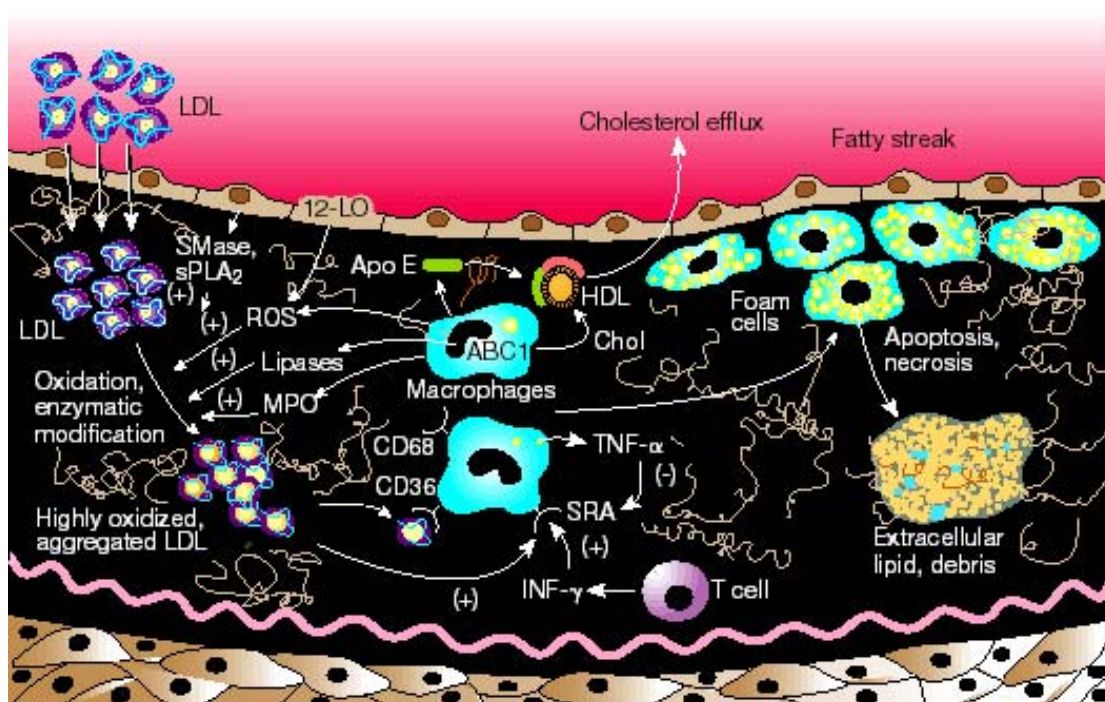
Τα μόρια προσκόλλησης προάγουν την είσοδο συγκεκριμένων τύπων λευκοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα. Το πρώτο στάδιο της προσκόλλησης, η



Εικόνα 2. Προσέλκυση λευκοκυττάρων. Adhesion, προσκόλληση; Monocyte, μονοκύτταρο; Integrin, ιντεγκρίνη; MCP-1, πρωτεΐνη χημειοπροσέλκυσης μονοκυττάρων 1; proliferation, πολλαπλασιασμός; Differentiation, διαφοροποίηση; Macrophage, μακροφάγο; Proteoglycans, πρωτεογλυκάνες; Cytokines, κυτταροκίνες; minimally oxidized LDL, μερικώς οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας. Εικόνα από Lusis 2000 Nature 407:233-241

κύλιση των λευκοκυττάρων κατά μήκος της επιφάνειας του ενδοθηλίου καθοδηγείται από τις σελεκτίνες οι οποίες δεσμεύονται σε υδατάνθρακες-συνδετά μόρια των λευκοκυττάρων [10]. Τα μόρια προσκόλλησης: μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (VCAM-1) και διακυττάριο μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1), καθοδηγούν την σταθερή προσκόλληση μονοκυττάρων και T κυττάρων στο ενδοθήλιο [11]. Μετά την είσοδο στο αρτηριακό τοίχωμα, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η κυτταροκίνη M-CSF είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η «μερικώς οξειδωμένη» LDL διεγείρει την παραγωγή του M-CSF σε συνδυασμό με άλλα προφλεγμονώδη μόρια όπως αναφέρθηκε παραπάνω [9] (Εικόνα 2).

Η περεταίρω τροποποίηση της LDL εντός του αρτηριακού τοιχώματος παράγει έντονα οξειδωμένα μόρια LDL. Τα μόρια αυτά αναγνωρίζονται από μια



Εικόνα 3. Σχηματισμός αφρώδων κυττάρων. Cholesterol efflux, απομάκρυνση χοληστερόλης; Fatty streak, λιπαρή λωρίδα, SMase, σφιγγομυελινάση; sPLA₂, εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂; Enzymatic modification, ενζυματική τροποποίηση; Highly oxidized, aggregated LDL, υψηλά οξειδωμένη, συσσωρευμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας; Lipases, λιπάσες; MPO, μυελοϋπεροξειδάση; SRA, υποδοχέας καθαριστής κλάσης A; Foam cells, αφρώδη κύτταρα; Apoptosis, απόπτωση; Necrosis, νέκρωση; Extracellular lipid debris, εξωκυττάριο υπόλειμμα λιπιδίων. Εικόνα από Lusis 2000 Nature 407:233-241

ομάδα υποδοχέων γνωστοί ως μη ειδικοί υποδοχείς καθαριστές (scavenger receptors). Τα μακροφάγα εκφράζουν υποδοχείς καθαριστές μέσω των οποίων προσλαμβάνουν τα οξειδωμένα μόρια της LDL, οδηγώντας στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Η έκφραση υποδοχέων καθαριστών (scavenger receptors) ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες στα συνδετά μόρια των οποίων περιλαμβάνονται οξειδωμένα λιπαρά οξέα, κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων- α (TNF- α) και η ιντερφερόνη- γ (IFN- γ), καθώς και ο M-CSF (Εικόνα 3).

Οι αθηροματικές πλάκες σε επόμενο στάδιο της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης χαρακτηρίζονται από αύξηση των εξωκυττάρων λιπιδίων (που προέρχονται από την απόπτωση των αφρώδων κυττάρων) και συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) εξωκυττάριας ουσίας προερχόμενης από αυτά. Οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα και τα T κύτταρα έχουν καθοριστικό ρόλο για την προσέλκυση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας [12]. Αυτού του είδους οι «ινώδεις» πλάκες έχουν τυπικά ένα ινώδες κάλυμμα που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα και εξωκυττάρια ουσία που περιγράφει τα όρια του νεκρωτικού πυρήνα, ο οποίος είναι πλούσιος σε λιπίδια. Οι πλάκες μπορούν να γίνουν ιδιαίτερα σύνθετες στα τελευταία στάδια της νόσου με ασβεστοποίηση, εξέλκωση της επιφάνειας του αυλού και αιμορραγία από τα αρτηρίδια που αναπτύσσονται εντός της πλάκας από το μεσοκυττάριο χώρο του τοιχώματος του αγγείου [13].

Κεφάλαιο 2. Παράγοντες κινδύνου

α. Λιποπρωτεΐνες του ορού

Η LDL χοληστερόλη είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [14]. Οι αποδείξεις για την αθηρογενετικότητα της LDL προέρχονται από μελέτες σε πειραματόζωα, γενετικές μορφές υπερχοληστερολαιμίας, πληθυσμιακές έρευνες και κλινικές μελέτες σε ανθρώπους. Τα υψηλά επίπεδα LDL στον ορό επιφέρουν ταχύτατη ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε μελέτες με διαφορετικά είδη πειραματόζωων [15]. Η σχέση της υπερχοληστερολαιμίας με την αιτιολογία της αθηροσκλήρωσης υποδεικνύεται επίσης από την εμφάνιση πρώιμης αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου σε άτομα με οικογενή υπερχοληστερολαιμία [16]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ασθενείς με γενετικής αιτιολογίας υψηλά επίπεδα LDL εμφανίζουν πρώιμη στεφανιαία νόσο ακόμα και κατά την απουσία άλλων παραγόντων κινδύνου [17]. Επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν τα υψηλά επίπεδα LDL ως αιτιολογικό παράγοντα για τη στεφανιαία νόσο [18]. Οι μελέτες Framingham Heart Study [19], Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) [20], και Lipid Research Clinics (LRC) trial [21,22] αναδεικνύουν άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης (και της ολικής χοληστερόλης), και το ρυθμό εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε άνδρες και γυναίκες χωρίς προηγούμενο στεφανιαίο επεισόδιο. Η ίδια συσχέτιση ισχύει για την επανεμφάνιση στεφανιαίου επεισοδίου σε άτομα με εγκατεστημένη τη νόσο [23-25]. Μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς υποστηρίζουν ότι οι πληθυσμιακές ομάδες με υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης εμφανίζουν υψηλότερο ρυθμό εμφάνισης αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου από εκείνες με χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης [26-28]. Άτομα που μεταναστεύουν από περιοχές όπου η μέση χοληστερόλη του ορού στο γενικό πληθυσμό είναι χαμηλή σε περιοχές με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στον πληθυσμό, παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης τους καθώς προσαρμόζονται στο καινούργιο τους περιβάλλον. Τα υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης συνοδεύονται από υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [29,30]. Τέλος, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση των επιπέδων της LDL του ορού μέσω τροποποίησης της διατροφής [31] ή φαρμακευτικής θεραπείας [32-34] μείωσε σε σημαντικό βαθμό την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

Παρόλο που η συμβολή των αυξημένων επιπέδων τριγλυκεριδίων του πλάσματος στον κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης αποτελεί θέμα διαφωνίας για αρκετά χρόνια, ένας σημαντικός αριθμός αποτελεσμάτων από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν την τελευταία δεκαετία υποστηρίζει το ρόλο των επιπέδων των τριγλυκεριδίων ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν μια ανεξάρτητη συσχέτιση ανάμεσα στα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [35,36]. Η αδυναμία συσχέτισης ανάμεσα στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου που παρατηρείται σε κάποιες από τις μελέτες είναι σε ορισμένο βαθμό αποτέλεσμα της φυσιολογικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων στο αίμα [37]. Εκτός αυτού, οι μελέτες αρτηριακής απεικόνισης CLAS και MARS [38,39] στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν παράγοντες μείωσης των τριγλυκεριδίων αποδίδουν την αδυναμία συσχέτισης στην ετερογένεια των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια. Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες περιλαμβάνουν διαφορετικά είδη λιποπρωτεϊνών με διαφορετικό μέγεθος, πυκνότητα και σύνθεση σε λιπίδια και κυμαίνονται από τα χυλομικρά έως τις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL). Η μελέτη MARS συσχέτισε μόνο τις μικρού μεγέθους λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDLs) και τις IDLs (υπολειμματικά σωματίδια των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών) με την εμφάνιση, τη σοβαρότητα και την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης, υποδεικνύοντας ότι μόνο τα υπολειμματικά σωματίδια των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών είναι αθηρογόνα. Ανάμεσα σε διάφορες μορφές υπερτριγλυκεριδαιμίας γενετικής αιτιολογίας, μόνο η οικογενής δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα υπολειμματικών σωματιδίων της VLDL, αυξάνει την προδιάθεση για την εμφάνιση πρώιμης στεφανιαίας νόσου [40]. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η αθηρογενετικότητα των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών αυξάνει καθώς μειώνεται το μέγεθος τους και αυξάνεται η περιεκτικότητά τους σε εστέρες χοληστερόλης. Τα αποτελέσματα των μελετών Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial [41] και Lopid Coronary Angiographic Trial [42] – τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες στις οποίες εφαρμόστηκε στεφανιαία αγγειογραφία και εξετάστηκε η επίδραση των φιβρατών – υποστηρίζουν τη σχέση ανάμεσα στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες και την αθηροσκλήρωση. Στις μελέτες αυτές, η μείωση των τριγλυκεριδίων χωρίς ταυτόχρονα σημαντική αλλαγή των

επιπέδων της LDL-χοληστερόλης οδήγησε σε μείωση του ρυθμού εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης των στεφανιαίων αρτηριών τόσο στις άθικτες αρτηρίες όσο και στα τμήματα αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.

Μια σειρά προτεινόμενων μηχανισμών επεξηγούν την αθηρογενετικότητα της υπερτριγλυκεριδαιμίας. Οι VLDL, IDL και τα υπολειμματικά σωματίδια των χυλομικρών είναι άμεσα αθηρογόνα καθώς έχουν την ικανότητα να διαπερνούν το ενδοθήλιο του αγγείου, κατακρατώνται εντός του αρτηριακού τοιχώματος και έχουν παρόμοια δράση με την οξειδωμένη LDL [43]. Επιπρόσθετα, η υπερτριγλυκεριδαιμία καθιστά την ίδια την LDL περισσότερο αθηρογόνο με το να αυξάνει την ανταλλαγή τριγλυκεριδίων για εστέρες χοληστερόλης ανάμεσα στις VLDL και τις LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πλούσιων σε τριγλυκερίδια μορίων LDL τα οποία μετατρέπονται σε «μικρά και πυκνά» μόρια LDL μέσω της λιπολυτικής δράσης της ηπατικής λιπάσης [44]. Η ανάλογη αύξηση στη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης και δικαιολογεί τη συσχέτιση χαμηλών επιπέδων HDL χοληστερόλης και υπερτριγλυκεριδαιμίας [45].

Ανάμεσα στα επίπεδα HDL χοληστερόλης και την συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου υπάρχει μια ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση, η οποία είναι ανεξάρτητη από άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου [46]. Μεγάλος αριθμός αποτελεσμάτων επιδημιολογικών μελετών [47,48] υποστηρίζει ότι τα χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης στον ορό αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες. Μελέτες σε ανθρώπους [49] και πειραματόζωα [50] με γενετικής αιτιολογίας χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης υποστηρίζουν περεταίρω την ανεξάρτητη επίδραση των χαμηλών επιπέδων χοληστερόλης στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Η HDL θεωρείται ότι προστατεύει έναντι της αθηροσκλήρωσης προάγοντας την απομάκρυνση του πλεονάσματος χοληστερόλης από τα μακροφάγα που βρίσκονται στο αρτηριακό τοίχωμα και την επαναφορά της χοληστερόλης αυτής στο ήπαρ για απέκκριση στη χολή, μια διαδικασία γνωστή ως αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης [51]. Η HDL θεωρείται ευρέως επίσης ότι κατέχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες [52]. Η HDL έχει φανεί να προστατεύει την LDL από οξείδωση προκαλούμενη μέσω χαλκού σε ex vivo πειράματα [53]. Η LDL ποντικών με επιδεκτικότητα γενετικής αιτιολογίας στην ανάπτυξη αθηροματικών πλακών ήταν ιδιαίτερα επιδεκτική στην οξείδωση μέσω κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος και μπορούσε να καταστεί ανθεκτική στην οξείδωση μετά από επώαση με

απολιποπρωτεΐνη A-I in vitro [54]. Η επώαση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων με HDL ή απολιποπρωτεΐνη A-I ανέστειλε την ικανότητα των κυττάρων να οξειδώσουν την LDL [55]. Τέλος, η HDL πιστεύεται ότι κατέχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η επώαση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων φλέβας ομφάλιου λώρου με HDL μείωσε την προκαλούμενη μέσω κυτταροκινών αύξηση στην έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως τα ICAM-1, VCAM-1, και η E-σελεκτίνη [56,57]. Σε πειράματα in vivo, ανασυγκροτημένη HDL που περιείχε ανθρώπινη απολιποπρωτεΐνη A-I μείωσε την έκφραση VCAM-1 μετά από τραυματισμό της καρωτίδας σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της από E [58]. Παρόλα αυτά, οι δράσεις αυτές δεν επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα άλλων μελετών.

β. Πυκνότητα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL)

Οι Krauss και Burke ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν ξεχωριστά υποείδη της LDL ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων της πριν από περισσότερα από 20 χρόνια [59]. Από τότε, η LDL του πλάσματος θεωρείται ένα ετερογενές σύνολο σωματιδίων τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος, πυκνότητα περιεχόμενο σε λιπίδια και τη δυνατότητα να προάγουν την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Τα μικρά σωματίδια LDL έχει βρεθεί να εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [60] και έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κατά τρεις φορές κίνδυνο για εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τα μεγάλα σε μέγεθος και υψηλής πυκνότητας σωματίδια LDL [61]. Μια σειρά προοπτικών μελετών υποστηρίζει την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην παρουσία των μικρών και πυκνών σωματιδίων LDL και τον αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου [62-64]. Ο σχηματισμός των μικρών και πυκνών LDL καθορίζεται κυρίως από τα τριγλυκερίδια του ορού και ρυθμίζεται από την υπατική λιπάση και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης [65].

Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί με στόχο την εξήγηση της αυξημένης αθηρογενετικότητας των μικρών και πυκνών LDL. Μελέτες που εξέτασαν την επίδραση της LDL σε καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών υποδεικνύουν ότι τα μικρά και πυκνά σωματίδια LDL έχουν μειωμένη συγγένεια με τον υποδοχέα της LDL σε σύγκριση με τις LDL κανονικού μεγέθους, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη παραμονή τους στο πλάσμα [66,67]. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μικρές και πυκνές LDL οξειδώνονται πιο γρήγορα σε σχέση με τις μεγάλες και υψηλής πυκνότητας LDL [68,69]. Επιπρόσθετα, οι μικρές LDL μπορούν να το αρτηριακό

τοιχώμα με μεγαλύτερη ευκολία [70] και έχει φανεί ότι αλληλεπιδρούν σε μεγάλο βαθμό με τις πρωτεογλυκάνες του αρτηριακού τοιχώματος [71].

γ. Απολιποπρωτεΐνες A-I και B ορού

Η απολιποπρωτεΐνη A-I είναι η κύρια πρωτεΐνη της HDL, αποτελώντας περίπου το 70% της συνολικής πρωτεΐνης της HDL. Τα επίπεδα της απολιποπρωτεΐνης A-I στο πλάσμα έχουν συσχετισθεί αντίστροφα με τη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε διάφορες επιδημιολογικές μελέτες [72-75]. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια [76] και κουνέλια [77] επιδεκτικά στην αθηροσκλήρωση έδειξαν ότι η έκφραση ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης A-I αναστέλλει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Η επίδραση αυτή σχετίζεται με την ικανότητα της απολιποπρωτεΐνης A-I στο να προάγει την απομάκρυνση της χοληστερόλης από τα κύτταρα [78].

Η απολιποπρωτεΐνη B είναι η κύρια πρωτεΐνη των LDL και VLDL. Η απολιποπρωτεΐνη B εξυπηρετεί τόσο τη διατήρηση της ακεραιότητας των σωματιδίων της LDL όσο και τον έλεγχο των επιπέδων της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα μέσω της πρόσδεσής της στου υποδοχείς της LDL [79]. Μελέτες [72,80] υποδεικνύουν ότι τα υψηλά επίπεδα ολικής απολιποπρωτεΐνης B συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.

Τόσο η απολιποπρωτεΐνη B όσο και η απολιποπρωτεΐνη A-I έχουν προταθεί ως προγνωστικοί παράγοντες για τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου [81-84]. Τα αποτελέσματα μελετών διασταυρούμενων ομάδων υποστηρίζουν ότι οι απολιποπρωτεΐνες B και A-I είναι πιθανά καλύτεροι δείκτες σε σχέση με την LDL και την HDL χοληστερόλη για τη διάκριση μεταξύ ασθενών με στεφανιαία νόσο και άτομα της ομάδας ελέγχου [85,86]. Στη μελέτη Johns Hopkins Coronary Artery Disease (JH-CAD) εξετάστηκε η ικανότητα των επιπέδων των κύριων λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα, ολικής απολιποπρωτεΐνης B και A-I, καθώς και του καπνίσματος, της υπέρτασης, του σακχαρώδη διαβήτη, της ηλικίας και του φύλου στην πρόβλεψη της ύπαρξης στεφανιαίας νόσου η οποία τεκμηριώθηκε αγγειογραφικά σε 99 άνδρες ηλικίας ≤ 50 ετών και 104 γυναίκες ηλικίας ≤ 60 ετών [87]. Μετά από ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης, τα υψηλά επίπεδα απολιποπρωτεΐνης B προέβλεψαν την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου καλύτερα από ότι η LDL χοληστερόλη, ενώ τα χαμηλά επίπεδα απολιποπρωτεΐνης A-I ήταν καλύτερος προγνωστικός δείκτης της ύπαρξης

στεφανιαίας νόσου σε σχέση με την HDL χοληστερόλη. Η απολιποπρωτεΐνη A-I στους άνδρες και η απολιποπρωτεΐνη B στις γυναίκες αποτέλεσαν τους ισχυρότερους προγνωστικούς δείκτες για τη στεφανιαία νόσο. Η μελέτη Quebec Cardiovascular Study είναι μια ακόμη προοπτική μελέτη που υποδεικνύει ότι η απολιποπρωτεΐνη B είναι ισχυρότερη της ολικής και της LDL χοληστερόλης ως δείκτης του κινδύνου αγγειακής νόσου [88]. Η διακριτική ισχύς της απολιποπρωτεΐνης B στην εκτίμηση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου παρέμεινε σημαντική ακόμη και μετά τον έλεγχο για τριγλυκερίδια και HDL χοληστερόλη, ενώ ανάμεσα στις μεταβλητές αυτές η απολιποπρωτεΐνη B αποδείχθηκε αυτή με την ισχυρότερη συσχέτιση με τη στεφανιαία νόσο. Η μελέτη Apoprotein-related Mortality Risk Study (AMORIS) είναι η πιο πρόσφατη και μεγαλύτερη μελέτη που διερευνά εάν η απολιποπρωτεΐνες B και A-I είναι προγνωστικοί δείκτες του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [89]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης που εξέτασε 175553 Σουηδούς για διάστημα 5.5 ετών κατά μέσο όρο, οι αυξημένες συγκεντρώσεις απολιποπρωτεΐνης B σε συνδυασμό με μειωμένες συγκεντρώσεις απολιποπρωτεΐνης A-I συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων. Επιπλέον, μετά από έλεγχο για ηλικία, ολική χοληστερόλη και τριγλυκερίδια, οι τιμές των απολιποπρωτεϊνών B και A-I αυξάνουν την ισχύ του μοντέλου στο να προβλέπει την εμφάνιση θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Η εξήγηση στο γιατί οι απολιποπρωτεΐνες B και A-I είναι ισχυρότεροι προγνωστικοί παράγοντες για τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου σε σχέση με την LDL-χοληστερόλη είναι ίσως το γεγονός ότι ο αριθμός των αθηρογόνων σωματιδίων που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη B και των αντι-αθηρογόνων σωματιδίων που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη A-I είναι πιο σημαντικοί παράγοντες σε σύγκριση με την ποσότητα των λιπιδίων που περιέχονται ανά σωματίδιο. Η μέτρηση των απολιποπρωτεϊνών B και A-I στο πλάσμα είναι κατ' εκτίμηση ανάλογο με την ποσοτικοποίηση του αριθμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν τις απολιποπρωτεΐνες B και A-I αντίστοιχα, καθώς το κάθε σωματίδιο περιέχει ένα μόνο μόριο απολιποπρωτεΐνης B ή A-I [90]. Πέρα από αυτό η συγκέντρωση της απολιποπρωτεΐνης B μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης της πυκνότητας των σωματιδίων της LDL. Η ποσότητα της χοληστερόλης που περιέχεται στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη B μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Έτσι, για μια δεδομένη συγκέντρωση χοληστερόλης, ο μεγάλος αριθμός των

λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B ισοδυναμεί με αυξημένο αριθμό μικρών και πυκνών σωματιδίων LDL, τα οποία έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (βλέπε πυκνότητα LDL).

δ. Απολιποπρωτεΐνη E, πολυμορφισμός της απολιποπρωτεΐνης E

Η απολιποπρωτεΐνη E είναι μια πρωτεΐνη με μέγεθος 34kDa η οποία περιέχεται στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες και την HDL και η οποία αποτελεί συνδετό μόριο για την εκκαθάριση μέσω υποδοχέα στο ήπαρ των λιποπρωτεϊνών αυτών από την κυκλοφορία [91]. Η σημασία της απολιποπρωτεΐνης E στην ομοιόσταση της χοληστερόλης γίνεται φανερή σε πειράματα με ποντίκια με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E, τα οποία αναπτύσσουν αθηροσκλήρωση ως αποτέλεσμα της σοβαρής υπερχοληστερολαιμίας που εμφανίζουν [92]. Άμεση απόδειξη για το ρόλο της απολιποπρωτεΐνης E στην εκκαθάριση των υπολειμματικών σωματιδίων των λιποπρωτεϊνών στο ήπαρ παρέχεται από τη μελέτη των Linton και συνεργατών [93] η οποία έδειξε ότι η εκκαθάριση των υπολειμματικών σωματιδίων μέσω πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον υποδοχέα της LDL εξαρτάται απόλυτα από την απολιποπρωτεΐνη E. Η απολιποπρωτεΐνη E συμμετέχει επίσης στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από τα κύτταρα. Η σύγκριση των ικανοτήτων του πλάσματος να απομακρύνει χοληστερόλη ανάμεσα σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της apo E και διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της apo E ομόζυγα για την έκφραση του ανθρώπινου E3 αλληλομόρφου επιβεβαιώνει ότι η απολιποπρωτεΐνη E συμμετέχει στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από τα κύτταρα [94]. Πέρα από το ρόλο της στο μεταβολισμό των λιπιδίων η απολιποπρωτεΐνη E διαφοροποιεί τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων. Η απολιποπρωτεΐνη E είναι ισχυρός αναστολέας της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων [95]. Τα αποτελέσματα μιας *in vitro* μελέτης έδειξαν ότι η έκφραση IFN γ από τα T κύτταρα αναστάλθηκε κατά την παρουσία συνθετικού ανάλογου της απολιποπρωτεΐνης E [96]. Πρόσφατα, μια μελέτη σε παχύσαρκους ενήλικες αποκάλυψε μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του ορού της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και της απολιποπρωτεΐνης E [97]. Ο πιθανολογούμενος ρόλος της απολιποπρωτεΐνης E στη φλεγμονή απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της απολιποπρωτεΐνης E είναι πολυμορφικό με τρία αλληλόμορφα τα ε2, ε3 και ε4 που παράγουν αντίστοιχα τρεις διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης [98]. Οι διαφορετικές ισομορφές της

απολιποπρωτεΐνης E αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών έχοντας ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των επιπέδων της χοληστερόλης στην κυκλοφορία ανάμεσα στις διαφορετικές ισομορφές. Οι φορείς του ε2 αλληλομόρφου έχουν μικρότερη ικανότητα για το σχηματισμό και τη μεταφορά μορίων VLDL και χυλομικρών από το πλάσμα στο ήπαρ, λόγω της ικανότητας πρόσδεσης της απολιποπρωτεΐνης που συντίθεται από το ε2 αλληλόμορφο. Αντίθετα, οι φορείς των E3 και E4 αλληλόμορφων έχουν μεγαλύτερη ικανότητα στο να φέρνουν εις πέρας τις παραπάνω διαδικασίες. Ενώ οι απολιποπρωτεΐνες ε4 και ε3 προσδένονται με επαρκή συνάφεια στους υποδοχείς λιποπρωτεϊνών, η απολιποπρωτεΐνη E2 προσδένεται με λιγότερο από το 2 τοις εκατό αυτής της συνάφειας [99]. Έτσι, σε σύγκριση με τους φορείς των ε3 και ε4 αλληλομόρφων, οι φορείς του ε2 αλληλομόρφου απεκκρίνουν το λίπος της δίαιτας από την κυκλοφορία με πολύ πιο αργό ρυθμό [100]. Η διαφορά στην πρόσληψη των μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση στη ρύθμιση των υποδοχέων της LDL στο ήπαρ, το οποίο με τη σειρά του συμβάλλει στις διαφορές μεταξύ των ατόμων με διαφορετικό γονότυπο στα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης [101-103]. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν διερευνήσει την άμεση επίδραση του πολυμορφισμού της απολιποπρωτεΐνης E στη στεφανιαία νόσο, καθώς και στα επίπεδα της χοληστερόλης. Ένας σημαντικός αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι οι φορείς του ε4 αλληλομόρφου είναι ιδιαίτερα επιδεκτικοί στην ανάπτυξη εκτεταμένων αθηροματικών πλακών ενώ έχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο [104-107]. Η εξήγηση που προτείνεται αφορά την υψηλή συνάφεια πρόσδεσης της ε4 ισομορφής στους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών, η οποία οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης στον ορό. Μελέτες σε χώρες όπως η Φιλανδία, η Σκωτία και η Βόρεια Ιρλανδία έδειξαν ότι οι πληθυσμοί με τα υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης και τον υψηλότερο δείκτη θνησιμότητας λόγω στεφανιαίας νόσου έχουν αυξημένη συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου [108,109]. Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν το ε2 αλληλόμορφο με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [104]. Η συσχέτιση του E2 αλληλομόρφου με υψηλότερα επίπεδα υπολειμματικών σωματιδίων λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια αποτελεί πιθανότατα την εξήγηση της πιο πάνω συσχέτισης.

Λίγα είναι γνωστά για τη σχέση του πολυμορφισμού της απολιποπρωτεΐνης E με τη φλεγμονή. Η μελέτη των Manttari και συνεργατών [110] συσχέτισε το ε4 αλληλόμορφο με χαμηλότερα επίπεδα C αντιδρώσας πρωτεΐνης σε μια υποομάδα της

μελέτης Helsinki Heart Study [111]. Αυτή είναι η μοναδική μελέτη που συσχετίζει τον πολυμορφισμό του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E με τη φλεγμονή.

ε. Δείκτες φλεγμονής

Η διαδικασία ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης αποτελείται από μια σειρά γεγονότων σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο τα οποία μπορούν συνολικά να περιγραφούν ως μια φλεγμονώδης αντίδραση στη συσσώρευση χοληστερόλης στο αρτηριακό τοίχωμα [112]. Η άποψη αυτή οδήγησε στην αναζήτηση αξιόπιστων συστηματικών δεικτών της φλεγμονής των αθηροματικών πλακών

Η CRP είναι ο μόνος δείκτης που συσχετίζεται ανεξάρτητα με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Προηγούμενες κλινικές μελέτες έχουν βρει αυξημένα επίπεδα CRP σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου [113,114]. Επιπρόσθετα, προοπτικές μελέτες καταδεικνύουν τα επίπεδα της CRP στο πλάσμα ως ανεξάρτητο προδιαθεσικό παράγοντα τόσο για την ανάπτυξη μελλοντικού στεφανιαίου επεισοδίου [115] όσο και για την έκβαση ασθενών με οξεία στεφανιαία σύνδρομα, ακόμη και κατά την απουσία βλάβης του μυοκαρδίου. Τα επίπεδα της CRP σχετίζονται με το μακροπρόθεσμο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίου επεισοδίου και την προδιάθεση έναντι του θανάτου από καρδιαγγειακά αίτια, ενώ παραμένουν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης σε πολυπαραγοντική ανάλυση [116]. In vitro και in vivo μελέτες υποδεικνύουν ότι η CRP μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση μορίων προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιδρώντας στην πρωτεΐνη χημειοπροσέλκυσης μονοκυττάρων 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) [117]. Παρά τις διάφορες υποθέσεις, δεν υπάρχει άλλος τεκμηριωμένος μηχανισμός μέσω του οποίου να εξηγείται η σχέση της CRP με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης.

Το αμυλοειδές A του ορού (serum amyloid A, SAA) είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης η οποία συναντάται κυρίως στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Το ήπαρ είναι η κύρια θέση παραγωγής του SAA αν και παράγεται επίσης από τα μακροφάγα των αθηροματικών πλακών στον άνθρωπο [118]. Η μελέτη Physicians' Health Study [119], αποκάλυψε μια θετική συσχέτιση του SAA με τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ο ρόλος του SAA στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης δεν έχει ακόμη κατανοηθεί. Μια σειρά μελετών προτείνει τη σχέση του SAA στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Το SAA είναι πιθανό να επηρεάζει την ικανότητα της HDL να αποκρίνει τη χοληστερόλη από τα κύτταρα, αντικαθιστώντας

την απολιποπρωτεΐνη A-I [120]. Το SAA είναι επίσης δυνατό να επηρεάζει τη δραστηριότητα της ακυλοτρανσφεράσης λεκιθίνης-χοληστερόλης (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT) [121], και μέσω αυτής τη συγκέντρωση χοληστερόλης στις HDL. Τέλος, ο ρόλος του SAA στην αθηροσκλήρωση αφορά πιθανόν άλλες δράσεις του όπως η αναστολή του πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων [122,123] και η αναστολή της προσκόλλησης και διείσδυσης μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων σε ιστούς [124,125].

Ο παράγοντας ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) είναι ένας παράγοντας διαφοροποίησης, προσέλκυσης και πολλαπλασιασμού μονοκυττάρων/μακροφάγων [126]. Εκφράζεται από ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα στις αθηροματικές πλάκες μετά την διέγερση από παράγοντες όπως η μερικώς τροποποιημένη LDL, ο TNF- α και η IL-1, όχι όμως και στα τοιχώματα των αγγείων χωρίς αλλοιώσεις [127,128]. Η τοπική έκφραση του M-CSF στις αθηροματικές πλάκες ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων και την έκφραση του υποδοχέα καθαριστή, με αποτέλεσμα τη γένεση αφρωδών κυττάρων [129]. Η αναγκαιότητα της ύπαρξης του M-CSF στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης καταδεικνύεται από μια μελέτη σε διαγονιδιακά ποντίκια. Όταν ποντίκια με έλλειψη του M-CSF διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της apo E, οι απόγονοι ανέπτυξαν αθηροσκλήρωση σε πολύ μικρό βαθμό παρά τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στην κυκλοφορία [130]. Εντούτοις, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της σχέσης του M-CSF με την αθηροσκλήρωση.

Η IL-6 ανήκει στις κυτταροκίνες που είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την αυξημένη έκφραση δεικτών φλεγμονής από το ήπαρ, όπως η CRP και το SAA. Τα επίπεδα της IL-6 στον ορό σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου, ενώ η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική ακόμη και μετά τον έλεγχο για τα επίπεδα της CRP [131]. Η IL-6 εκφράζεται από μια σειρά κυττάρων στα οποία περιλαμβάνονται τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα των αθηροματικών πλακών [132]. Έχει προταθεί ότι η IL-6 μειώνει την έκφραση του υποδοχέα καθαριστή από τα μακροφάγα [133]. Έχει επίσης βρεθεί ότι η IL-6 αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης από το ενδοθήλιο [134].

στ. Μόρια προσκόλλησης

Η συγκέντρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού από την κυκλοφορία και η επακόλουθη διείσδυση διαμέσω του ενδοθηλίου πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από τα μόρια προσκόλλησης [135]. Τα επίπεδα των μορίων προσκόλλησης έχουν προταθεί ως χρήσιμος προδιαθεσικός παράγοντας για καρδιαγγειακά επεισόδια τόσο στον υγιή πληθυσμό όσο και σε διάφορες νόσους, παρόλο που ο παθοφυσιολογικός τους ρόλος παραμένει αδιευκρίνιστος [136]. Μια σειρά μελετών σε αρχικά υγιείς εθελοντές ανέδειξε το ICAM-1 του ορού (sICAM-1) όχι όμως και το VCAM-1 του ορού (sVCAM-1) ως προγνωστικό δείκτη για μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια [137-141]. Η συγκέντρωση του sVCAM-1 και σε μικρότερο βαθμό του sICAM-1 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων σε διαφορετικές μελέτες δευτερογενούς πρόληψης [142-144]. Τα μόρια προσκόλλησης στον ορό έχουν επίσης θεωρηθεί βιοχημικοί δείκτες της έκτασης και της σοβαρότητας της αθηροσκλήρωσης. Τόσο το sVCAM-1 όσο και το sICAM-1 συσχετίστηκαν με το πάχος του τοιχώματος της καρωτίδας, ένα δείκτη της πρώιμης μορφής αθηροσκλήρωσης [145]. Επιπρόσθετα, το sVCAM-1 εμφανίζεται ως δείκτης της σοβαρότητας της αθηροσκλήρωσης καθώς συσχετίζεται με την έκταση της αθηροσκλήρωσης στην περιφερική κυκλοφορία [146,147]. Τα επίπεδα του sVCAM-1 συσχετίζονται με την έκφραση του μορίου στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και έτσι οι διαλυτές στον ορό μορφές του μορίου προσκόλλησης μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστος δείκτης της ενεργοποίησης του ενδοθηλίου [147]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα αθηροματικών πλακών σε ανθρώπινες αρτηρίες εμφανίζουν αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης [11,148].

Κεφάλαιο 3. Διατροφή και παράγοντες κινδύνου

α. Μεσογειακή δίαιτα

Ο όρος «Μεσογειακή δίαιτα» περιγράφει τις διατροφικές συνήθειες των ελαιοπαραγωγικών περιοχών της Μεσογείου στα τέλη του 1950 και τις αρχές του 1960, όταν οι συνέπειες του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου είχαν ξεπερασθεί και η συνήθεια του «πρόχειρου» φαγητού δεν είχε ακόμη φτάσει στις περιοχές αυτές [149]. Η μελέτη των επτά χωρών (Seven Countries Study) [150] ήταν η αφορμή για το ενδιαφέρον που δημιουργήθηκε γύρω από τις διατροφικές συνήθειες των λαών της Μεσογείου συγκρίνοντας τους δείκτες θνησιμότητας των ενηλίκων μέσης ηλικίας ανάμεσα στη βόρεια και τη νότια Ευρώπη. Ο πληθυσμός της Κρήτης βρέθηκε με τον καλύτερο δείκτη υγείας και τους χαμηλότερους δείκτες θνητότητας και θνησιμότητας λόγω στεφανιαίας νόσου και καρκίνου σε σύγκριση των επτά χωρών, όπως επίσης και σε επόμενη ανάλυση στην οποία περιλήφθηκαν 16 χώρες μεταξύ των οποίων και χώρες της Μεσογείου [151]. Ο παράγοντας στον οποίο αποδόθηκε το άριστο επίπεδο υγείας και οι χαμηλότεροι δείκτες θνησιμότητας ήταν η δίαιτα του πληθυσμού της Κρήτης.

Προοπτικές μελέτες σε ηλικιωμένους υποστηρίζουν τις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής διαίτας. Η ύπαρξη στοιχείων της Μεσογειακής διαίτας στο διαιτολόγιο του αγροτικού ελληνικού πληθυσμού σχετίστηκε με σημαντική μείωση του δείκτη θνησιμότητας [152]. Η αποτελεσματικότητα διαιτολογίων με χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διαίτας εξετάσθηκε σε μη μεσογειακούς πληθυσμούς της Δανίας [153] και της Αυστραλίας [154] οι οποίοι εφάρμοσαν τα διαιτολόγια με στόχο να αποκλειστεί η πιθανή επίδραση άλλων συγχυτικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών επιβεβαιώνουν τη σχέση της Μεσογειακής διαίτας με χαμηλά επίπεδα ολικής θνησιμότητας. Άλλες προοπτικές μελέτες εξέτασαν την επίδραση ενός Μεσογειακού-τύπου διαιτολογίου στην πρόοδο της στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Η μελέτη της Λυών (Lyon Diet Heart Study) είναι μια μελέτη δευτερογενούς πρόληψης που εξέτασε εάν ένα Μεσογειακού-τύπου διαιτολόγιο, σε σύγκριση με τη δίαιτα 1^{ου} βήματος (Step I American Heart Association diet), μπορεί να μειώσει την επανεμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου [155]. Η μελέτη έδειξε μείωση της συχνότητας θανάτου κατά 70%. Πρόσφατα, η μελέτη Ινδο-μεσογειακής διαίτας (Indo-Mediterranean Diet Heart Study) [156] έδειξε ότι μια δίαιτα με τα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διαίτας

σχετίστηκε με σημαντική μείωση της εμφάνισης μη θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου, αιφνίδιου θανάτου και ολικών καρδιακών επεισοδίων σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου

Το κύριο χαρακτηριστικό της Μεσογειακής δίαιτας είναι η αφθονία μη επεξεργασμένων τροφών φυτικής προέλευσης παράγονται τοπικά και καταναλώνονται φρέσκα στην εποχή ωρίμανσής τους. Το ελαιόλαδο αποτελεί την κύρια πηγή λίπους, τα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται καθημερινά σε μικρές ποσότητες, τα ψάρια και τα πουλερικά καταναλώνονται σε μικρές με μέτριες ποσότητες, το κόκκινο κρέας καταναλώνεται σε μικρές ποσότητες και το κρασί καταναλώνεται σε μικρές με μέτριες ποσότητες συνοδεύοντας τα κύρια γεύματα [157]. Οι διατροφικές αυτές συνήθειες οδηγούν σε υψηλή αναλογία μονοακόρεστου/κορεσμένου λίπους, σχετικά υψηλή ολική πρόσληψη λίπους, υψηλή πρόσληψη αντιοξειδωτικών βιταμινών και μέτρια πρόσληψη αιθανόλης [158].

β. ω-3 λιπαρά οξέα

ι. ω-3 λιπαρά οξέα μακράς αλύσου

Ήδη από το 1953 υπήρξε ενδιαφέρον για την ιδιαίτερα χαμηλή θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακών επεισοδίων μεταξύ των Εσκιμών της Γροιλανδίας, το είδος του λίπους της διατροφής των οποίων είναι πολύ διαφορετικό από αυτό της δυτικής δίαιτας, καθώς εκείνοι καταναλώνουν περισσότερα θαλασσινά πλούσια στα ω-3 λιπαρά οξέα μακράς αλύσου εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) (20:5ω3) και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA) (22:6ω3) [159].

Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι οι άνδρες που κατανάλωναν ψάρι μία τουλάχιστον φορά την εβδομάδα εμφάνιζαν χαμηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο σε σχέση με άνδρες που δεν κατανάλωναν ψάρι [160,161]. Στη μελέτη Chicago Western Electric Study [162], η κατανάλωση ψαριού φάνηκε να έχει θετική επίδραση στη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο μετά από παρακολούθηση 30 ετών. Η μελέτη των Zhang και συνεργατών [163] συσχέτισε την κατανάλωση ψαριού με μειωμένη ολική θνησιμότητα, θνησιμότητα από ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο και εγκεφαλικό επεισόδιο στις 36 χώρες που συμμετείχαν στη μελέτη. Επιπρόσθετα, σε μελέτη που εξέτασε Ιάπωνες που ζούσαν στην Ιαπωνία ή τη Βραζιλία [164], αναφέρεται δοσοεξαρτώμενη αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας εβδομαδιαίας κατανάλωσης ψαριού και τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Στη μελέτη Nurses' Health Study [165], που πραγματοποιήθηκε

σε γυναίκες, η πρόσληψη ψαριού και ω-3 λιπαρών οξέων παρουσίασε αντίστροφη συσχέτιση με τη συχνότητα θανάτου από στεφανιαία νόσο.

Τα ω-3 λιπαρά οξέα εξετάστηκαν επίσης σε μελέτες δευτερογενούς πρόληψης της στεφανιαίας νόσου. Στη μελέτη Diet and Reinfarction Trial, η ολική θνησιμότητα 2 ετών μειώθηκε κατά 29% σε επιζώντες εμφράγματος του μυοκαρδίου που κατανάλωσαν ψάρια πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα τουλάχιστον 2 φορές την εβδομάδα [166]. Η μεγαλύτερη προοπτική μελέτη που εξέτασε την αποτελεσματικότητα των ω-3 λιπαρών οξέων στη δευτερογενή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου είναι η μελέτη GISSI-Prevention Study [167]. Μετά από παρακολούθηση 3.5 ετών, η ομάδα που πήρε τα ω-3 λιπαρά οξέα παρουσίασε σημαντική μείωση της ολικής θνησιμότητας, των μη θανατηφόρων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου και των μη θανατηφόρων εγκεφαλικών επεισοδίων.

Οι μηχανισμοί που θεωρούνται υπεύθυνοι για τις παρατηρούμενες δράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου στο καρδιαγγειακό σύστημα αφορούν μια σειρά από ιδιότητες όπως η υποτριγλυκεριδαιμική [168], η υποτασική [169], η αντι-θρομβωτική [170], η αντι-αρρυθμική [171] και η αντι-φλεγμονώδης ιδιότητα [172]. Η υποτριγλυκεριδαιμική δράση των EPA και DHA έχει αποσαφηνισθεί με βάση τα αποτελέσματα σειράς μελετών. Η ημερήσια πρόσληψη 4 γραμμαρίων ω-3 λιπαρών οξέων που προέρχονται από ιχθυέλαιο μείωσε τις συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων του ορού κατά 25% με 30% [168]. Τα ω-3 λιπαρά οξέα μειώνουν την σύνθεση VLDL τριγλυκεριδίων όπως έδειξαν μελέτες κινητικής σε ανθρώπους, εξίδρωμα ήπατος πειραματόζωων και απομονωμένα ηπατοκύτταρα [173]. Η αντιφλεγμονώδης δράση των ω-3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου έχει περιγραφεί σε μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους. Ένας αριθμός μελετών σε πειραματόζωα υποδεικνύει ότι το ιχθυέλαιο μειώνει τη δραστηριότητα των κυττάρων «φυσικοί φονείς» και των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή IL-2 και IFN-γ [βλέπε 174-176 για βιβλιογραφική ανασκόπηση]. Κατά τον ίδιο τρόπο, η συμπλήρωση της διατροφής υγιών εθελοντών με ω-3 λιπαρά οξέα που προέρχονται από ιχθυέλαια οδηγεί στη μείωση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, μείωση της χημειοταξίας μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων, μειωμένη παραγωγή IL-1, IL-2, IFN-γ, IL-6 και TNF-α [177], καθώς και μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών οξειάς φάσης [178] και μορίων προσκόλλησης από τα μονοκύτταρα [179,180].

ii. α-λινολενικό οξύ

Το α-λινολενικό οξύ (ALA) (18:3n-3) είναι ο μεταβολικός πρόδρομος των ω-3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου EPA και DHA. Ένα αυξανόμενο σύνολο δεδομένων που προέρχονται από πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύει ότι το ALA συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και θανατηφόρου ισχαιμικής καρδιοπάθειας. Στη μελέτη EURAMIC study, το ALA του λιπώδους ιστού παρουσίασε αντίστροφη συσχέτιση με το σχετικό κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου [181]. Χρησιμοποιώντας το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων της 10ετούς παρακολούθησης στη μελέτη Nurses' Health Study, ο Hu και συνεργάτες [182] ανέφερε μια δοσοεξαρτώμενη συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη ALA και το σχετικό κίνδυνο θανατηφόρου ισχαιμικού επεισοδίου. Παρόμοια ευρήματα παρουσιάστηκαν στην μελέτη Health Professionals' Study, στην οποία η αύξηση της πρόσληψης ALA συσχετίστηκε με μείωση του κινδύνου οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου [183]. Τέλος, στη μελέτη National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study, το ALA συσχετίστηκε αντίστροφα με την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου [184].

Η συσχέτιση του ALA με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου δεν επιβεβαιώθηκε στο σύνολο των τεσσάρων προοπτικών μελετών που εξέτασαν την αποτελεσματικότητα του ALA στην πρόληψη της νόσου. Η μελέτη Indian Experiment of Infarct Survival [185] αναφέρει σημαντική μείωση του συνόλου των καρδιακών επεισοδίων για την ομάδα που έλαβε λάδι από σπόρο σιναπιού το οποίο παρείχε 2.9 γραμμάρια ALA ημερησίως. Στη μελέτη της Λυών (Lyon Heart Trial), βρέθηκε σημαντική μείωση των θανάτων από καρδιακά αίτια καθώς και των μη θανατηφόρων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου [155]. Παρόλα αυτά, η παρατηρούμενη ευεργετική επίδραση είναι δύσκολο να αποδοθεί αποκλειστικά στο ALA καθώς πολλά άλλα θρεπτικά συστατικά διαφοροποιήθηκαν στη διάρκεια της μελέτης. Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, η μελέτη Norwegian Vegetable Oil Experiment [186] έδειξε ότι η κατανάλωση 10mL λινελαίου ανά ημέρα δεν επηρέασε την εμφάνιση νέων στεφανιαίων επεισοδίων, τη συχνότητα αιφνίδιων θανάτων και τη συνολική θνησιμότητα. Σε συμφωνία με την πιο πάνω μελέτη, η μελέτη Mediterranean Alpha-Linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) Study [187] έδειξε ότι η κατανάλωση μαργαρίνης πλούσιας σε ALA μείωσε τον εκτιμώμενο 10ετή κίνδυνο ισχαιμικού επεισοδίου μόνο κατά πολύ μικρό

βαθμό, που δεν διέφερε από το βαθμό μείωσης που προκάλεσε η συμπλήρωση της δίαιτας με λινελαϊκό οξύ.

Στην προσπάθεια να εξηγηθεί η αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο ALA και τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου που προκύπτει από τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών, μια σειρά κλινικών μελετών εξέτασαν την επίδραση της διατροφικής πρόσληψης ALA στις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Τα αποτελέσματα των μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε υγιείς εθελοντές με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων είναι συγκρουόμενα με την επίδραση του ALA να ποικίλει από υπολιπιδαιμική [188-193] έως καμιά επίδραση [194-197]. Επιπρόσθετα, οι παραπάνω μελέτες χαρακτηρίζονται από μια σειρά περιορισμών που αφορούν το σχεδιασμό της μελέτης [189], τη διαιτητική πηγή πρόσληψης του ALA [192], και του αριθμού των συμμετεχόντων στη μελέτη [188-193] κάνοντας την εξαγωγή συμπερασμάτων ακόμη πιο δύσκολη. Η ικανότητα του ALA να μειώνει τις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών στον ορό έχει επίσης εξετασθεί σε δυσλιπιδαιμικούς εθελοντές [155,187,198-202]. Τα αποτελέσματα και αυτών των μελετών είναι συγκρουόμενα, καθώς κάποιες από τις μελέτες δεν παρουσιάζουν επίδραση του ALA [155,198,199], ενώ άλλες εμφανίζουν μείωση των συγκεντρώσεων των λιπιδίων στον ορό [187,200-202]. Η ανακολουθία μεταξύ των μελετών μπορεί τουλάχιστον κατά ένα μέρος να αποδοθεί στις διαφορές της ημερήσιας πρόσληψης ALA. Πολλές από τις παραπάνω μελέτες χαρακτηρίζονται από περιορισμούς που αφορούν τον αριθμό των συμμετεχόντων [198,200,202] ή την ύπαρξη άλλων διατροφικών παραγόντων που επηρεάζουν την επίδραση του ALA [155,201], και οι οποίοι συμβάλλουν επίσης στην παρατηρούμενη ανακολουθία. Έχει επίσης προταθεί ότι η υπολιπιδαιμική δράση του ALA που παρατηρείται σε κάποιες από τις παραπάνω μελέτες μπορεί να αποδοθεί στην αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων της δίαιτας. Συμπερασματικά, η επίδραση του ALA στις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών του ορού και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το ALA της δίαιτας μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό των λιπιδίων στους ανθρώπους χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση.

Περισσότερο υποσχόμενες στο να εξηγήσουν την αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο ALA και τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου είναι οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του ALA. Το ALA βρέθηκε *in vitro* να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων από αρουραίους και ανθρώπους [203-205] και να μειώνει την παραγωγή IL-2 από διεγερμένα κύτταρα ποντικών και ανθρώπων [206]. Η χορήγηση

δίαιτας που περιείχε πολύ υψηλές ποσότητες λινελαίου, πλούσιου σε ALA σε πειραματόζωα οδήγησε σε μειωμένο πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων, μειωμένη δραστηριότητα των κυττάρων «φυσικοί φονείς» και μειωμένη απάντηση ξενιστή σε μόσχευμα [207]. Ο αριθμός των μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους και εξέτασαν την επίδραση του ALA στη φλεγμονή είναι προς το παρόν μικρός. Η πρόσθεση λινελαίου το οποίο παρείχε περίπου 15 γραμμάρια ALA ανά ημέρα, σε μια δίαιτα χαμηλή σε λίπος (συνολική ενέργεια από λίπος 29%) οδήγησε σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων της κυκλοφορίας μετά από 6 εβδομάδες, ενώ τα επίπεδα των κυκλοφορούντων αντισωμάτων δεν επηρεάστηκαν [208]. Η παραγωγή IL-1β από μονοκύτταρα μειώθηκε σημαντικά μετά την εισαγωγή εθελοντών σε μια δίαιτα πλούσια σε ALA (9 γραμμάρια ALA/ημέρα) για 2 εβδομάδες [209]. Επιπρόσθετα, μια υψηλή δόση ALA (περίπου 15 γραμμάρια/ημέρα) αναφέρθηκε ότι μειώνει την παραγωγή IL-1β και TNF-α σε ανθρώπους [210]. Μια μικρότερη δόση 2 γραμμαρίων ALA/ημέρα βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα των διαλυτών μορφών του μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (VCAM-1) και της E-σελεκτίνης στο πλάσμα [180].

Δ. Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 4. Εισαγωγή – Σκοπός εργασίας

Το αυξημένο ενδιαφέρον σχετικά με την επίδραση των ω-3 λιπαρών οξέων στην αθηροσκλήρωση προέρχεται από τα ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών που αφορούν την κατανάλωση ψαριού. Σε αντίθεση με τα ω-3 λιπαρά οξέα μακράς αλύσου, οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες για το ALA. Παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις προερχόμενες από επιδημιολογικές μελέτες που υποστηρίζουν την αντι-αθηρογόνο δράση του ALA [181-184], τα αποτελέσματα κλινικών μελετών δεν συνηγορούν σε μια ανεξάρτητη σχέση του ALA με παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Η επίδραση της συμπλήρωσης της διατροφής με ALA στα λιπίδια του πλάσματος δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί. Ελεγχόμενες μελέτες απαιτούνται για τη διαλεύκανση της επίδρασης του ALA στον μεταβολισμό των λιπιδίων.

Η γενετική ετερογένεια που παρουσιάζει ο κάθε πληθυσμός ανθρώπων σχετίζεται με την δια-ατομική διακύμανση διαφόρων παραμέτρων του πληθυσμού αυτού. Οι πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων θεωρούνται σημαντικοί στον καθορισμό των επιπέδων νηστείας για διάφορους παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης [211]. Μπορούμε για το λόγο αυτό να θεωρήσουμε τον πολυμορφισμό σχετικών γονιδίων ως πιθανό συγχυτικό παράγοντα που εμπλέκεται στην ανακολουθία των αποτελεσμάτων των μελετών για το ALA της διατροφής. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τον πολυμορφισμό γονιδίων για περαιτέρω έλεγχο των αποτελεσμάτων μας. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η γενετική «ποικιλία» μπορεί να επηρεάζει την ανταπόκριση των εθελοντών σε διατροφικές παρεμβάσεις [212]. Ο πολυμορφισμός της απολιποπρωτεΐνης E είναι ένας από τους πιο καλά μελετημένους γενετικούς πολυμορφισμούς, κυρίως για την επίδραση του στο λιπιδαιμικό προφίλ και τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου ενώ είναι ο μόνος που συσχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [213]. Υπάρχουν ενδείξεις που υποδεικνύουν ότι η ανταπόκριση στις δράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων καθορίζεται τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό από το γονότυπο της απολιποπρωτεΐνης E [214]. Μέχρι σήμερα δεν έχει υπάρξει μελέτη που να εξετάζει την ανταπόκριση στο ALA σε σχέση με τον πολυμορφισμό της απολιποπρωτεΐνης E.

Πολλές από τις προηγούμενες μελέτες για τη συμπλήρωση της δίαιτας με ALA δεν εξέτασαν τη συνολική διαίτα των συμμετεχόντων στη μελέτη. Ένα συχνό λάθος αφορά την κατάσταση κατά την οποία η διατροφική πρόσληψη άλλων

θρεπτικών συστατικών πέρα από το ALA διαφέρει μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Έχει ήδη περιγραφεί ότι θρεπτικά συστατικά όπως τα λιπαρά οξέα [215], η χοληστερόλη της δίαιτας [216], οι βιταμίνες C και E [217], και οι διαιτητικές ίνες [218] μπορούν να επηρεάσουν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Διαφορές στην πρόσληψη αυτών των θρεπτικών συστατικών κατά την έναρξη της περιόδου συμπλήρωσης της δίαιτας με ALA καθώς και οι αλλαγές στην πρόσληψη τους κατά τη διάρκεια της μελέτης είναι ικανές να επηρεάσουν την ανταπόκριση στο ALA. Πέρα από τον έλεγχο της συνολικής δίαιτας, το είδος της δίαιτας είναι μια ακόμη παράμετρος που χρήζει προσοχής. Πολλές από τις προηγούμενες μελέτες για την επίδραση του ALA της διατροφής σε παράγοντες κινδύνου για την αθηροσκλήρωση πραγματοποιήθηκαν σε εθελοντές των οποίων η δίαιτα είχε τα χαρακτηριστικά ενός τυπικά δυτικοποιημένου διαιτολογίου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι εθελοντές ακολουθούσαν διαιτολόγιο φτωχό σε λίπος. Αποτελεί θέμα προς διερεύνηση εάν η ανταπόκριση στο ALA επηρεάζεται από το είδος της συνολικής δίαιτας. Οι μελέτες δευτερογενούς πρόληψης Lyon Diet Heart Study [155] και Indo-Mediterranean Diet Heart Study [156] εισήγαγαν τους εθελοντές τους σε δίαιτα με χαρακτηριστικά της Μεσογειακής δίαιτας εμπλουτισμένης σε ALA. Παρόλα αυτά οι παραπάνω μελέτες δεν είναι δυνατό να απαντήσουν στην ερώτηση σχετικά με την επίδραση ενός διαιτολογίου Μεσογειακού-τύπου στις δράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων και συγκεκριμένα του ALA. Δεν υπάρχει προς το παρόν μελέτη που να εξετάζει την επίδραση του ALA σε συνάρτηση με ένα διαιτολόγιο Μεσογειακού-τύπου.

Η έρευνα γύρω από την αιτιολογία της αθηροσκλήρωσης προήγαγε τις γνώσεις μας κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας και άλλαξε την άποψη για τη νόσο προς μια χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία [112]. Η κατανόηση του κυρίαρχου ρόλου της φλεγμονής στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης αποκαλύπτει ένα αριθμό συσχετιζόμενων παραγόντων. Οι πιθανές αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες του ALA υποστηρίζονται από ένα αριθμό μελετών [208-210]. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει προς το παρόν μελέτη που να εξετάζει την επίδραση της συμπλήρωσης της δίαιτας με ALA σε ένα εύρος παραγόντων που σχετίζονται με τους μηχανισμούς φλεγμονής της διαδικασίας ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσει την επίδραση του ALA σε παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Συγκεκριμένα, σκοπός μας ήταν να εξετάσουμε την επίδραση του ALA της διατροφής στα επίπεδα

των λιπιδίων του πλάσματος δυσλιπιδαιμικών ασθενών, μιας ομάδας που τεκμηριωμένα βρίσκεται σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης. Επιπρόσθετα, στόχος μας ήταν να εξετάσουμε τα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών που συσχετίζονται με την εγκατάσταση αθηροσκλήρωσης μετά από χορήγηση ALA. Τέλος, ένας ακόμη στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την επίδραση ενός διαιτολογίου Μεσογειακού τύπου στην ανταπόκριση στο ALA της διατροφής.

Κεφάλαιο 5. Δημοσίευση 1

Το α-λινολενικό οξύ της διατροφής μειώνει την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, το αμυλοειδές Α του ορού και την ιντερλευκίνη 6 σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς

Περίληψη

Η φλεγμονή κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου. Εξετάσαμε την επίδραση της συμπλήρωσης της διατροφής με α-λινολενικό οξύ (ALA 18:3ω3) στα επίπεδα δεικτών φλεγμονής δυσλιπιδαιμικών ασθενών. *Μέθοδοι:* Συγκεντρώσαμε 76 δυσλιπιδαιμικούς άνδρες (μέση ηλικία = 51 ± 8 έτη) που ακολουθούσαν την τυπική ελληνική δίαιτα. Τους καταναμίσαμε με τυχαίο τρόπο σε δύο ομάδες ώστε να λάβουν είτε 15ml λινελαίου (πλούσιο σε ALA) ανά ημέρα (n=50) είτε 15ml καρδαμελαίου (πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ (LA, 18:2ω6)) ανά ημέρα (n=26). Ο λόγος ω6:ω3 στην ομάδα που έλαβε το λινέλαιο ήταν 1.3:1 και στην ομάδα που έλαβε το καρδαμέλαιο 13.2:1. Το χρονικό διάστημα για το οποίο οι συμμετέχοντες στη μελέτη έλαβαν τα δύο έλαια διήρκεσε 3 μήνες. Τα επίπεδα λιπιδίων, C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), αμυλοειδούς α του ορού (SAA) και ιντερλευκίνης 6 (IL-6) στο αίμα προσδιορίστηκαν πριν και μετά το πειραματικό διάστημα της μελέτης. CRP και SAA προσδιορίστηκαν μέσω νεφελομετρίας ενώ η IL-6 μέσω ανοσοπροσδιορισμού. *Αποτελέσματα:* Η συμπλήρωση της διαίτας με τη χορήγηση ALA μείωσε σημαντικά τα επίπεδα CRP, SAA και IL-6. Ο διάμεσος της CRP μειώθηκε κατά 38% (1.24 έναντι 0.93 mg/l, $P=0.0008$) του SAA κατά 23.1% (3.24 έναντι 2.39 mg/l, $P=0.0001$) και της IL-6 κατά 10.5% (2.18 έναντι 1.7 pg/ml, $P=0.01$). Η μείωση των δεικτών της φλεγμονής ήταν ανεξάρτητη των αλλαγών στα επίπεδα των λιπιδίων. Η συμπλήρωση της διαίτας με LA δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις CRP, SAA και IL-6 στον ορό αλλά μείωσε τα επίπεδα της χοληστερόλης. *Συμπεράσματα:* Η συμπλήρωση της διαίτας με ALA για 3 μήνες μείωσε σημαντικά τα επίπεδα CRP, SAA και IL-6 σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς. Αυτή η αντιφλεγμονώδης δράση μπορεί να αποτελεί ένα πρόσθετο μηχανισμό μέσω του οποίου τα ω3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φυτικής προέλευσης ασκούν την

ευεργετική τους επίδραση τόσο κατά την πρωτογενή όσο και τη δευτερογενή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου.

1. Εισαγωγή

Ένας σημαντικός αριθμός παρατηρήσεων υποστηρίζει τον κεντρικό ρόλο της φλεγμονής σε όλες τις φάσεις της διαδικασίας σχηματισμού της αθηροσκληρωτικής πλάκας [1]. Η πρόοδος στην κατανόηση της αθηροσκλήρωσης επεκτείνει την αντίληψη για τη νόσο πέρα από τη συσσώρευση λιπιδίων. Κλινικές μελέτες συσχετίζουν πρωτεΐνες οξείας φάσης και κυτταροκίνες της κυκλοφορίας με αυξημένο κίνδυνο για μελλοντικά αγγειακά επεισόδια και υποστηρίζουν την πιθανότητα της ενεργής συμμετοχής τους στην παθογένεση της νόσου [2,3].

Λίπη της διατροφής πλούσια σε α-λινολενικό οξύ (ALA, 18:3ω3) έχουν αναφερθεί να τροποποιούν ορισμένες φλεγμονώδεις αντιδράσεις σε μελέτες με πειραματόζωα [4] και κλινικές μελέτες [5]. Το ALA είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ που περιέχεται σε φυτικά έλαια. Αποτελεί τον πρόδρομο για το σχηματισμό των μακράς αλύσου ω3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) (20:5ω3) και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA) (22:6ω3) τα οποία έχουν την ικανότητα να αντικαθιστούν το αραχιδονικό οξύ (20:4ω6) και να μειώνουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών εικοσανοειδών προσταγλανδίνη E₂ και λευκοτριένιο B₄. Το αραχιδονικό οξύ προέρχεται από την προσθήκη διπλών δεσμών και επιμήκυνση του λινελαϊκού οξέος (LA) (18:2ω6).

Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο ALA της διατροφής και τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου [6-8]. Στη μελέτη της Λυών μια Μεσογειακή δίαιτα πλούσια σε ALA αποδείχθηκε ευεργετική στη δευτερογενή πρόληψη του εμφράγματος του μυοκαρδίου [9]. Ένας αριθμός μελετών έχουν εξετάσει την επίδραση του ALA στα επίπεδα των λιπιδίων του αίματος και υποδεικνύει ότι οι πιθανές αντιαθηρογόνες ιδιότητες του δεν οφείλονται στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ [10-14].

Καθώς δεν υπάρχει μελέτη που να συσχετίζει το ALA της διατροφής με δείκτες φλεγμονής, εξετάσαμε εάν η συμπλήρωση της διαίτας με ALA επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών οξείας φάσης C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και αμυλοειδές α του ορού (SAA) καθώς και της κυτταροκίνης ιντερλευκίνη 6 (IL-6) σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Εθελοντές

Οι εθελοντές συγκεντρώθηκαν από την Καρδιολογική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν σχετικά με την κατάσταση της υγείας τους, τη χρήση φαρμάκων, τις διατροφικές συνήθειες και τη συνήθεια να ασκούνται. Άτομα που παρουσίαζαν φλεγμονή, έπασχαν από ενδοκρινή, ηπατική ή αγγειακή νόσο, με αρτηριακή πίεση $>$ από 145/95 mmHg, που βρίσκονταν σε φαρμακευτική αγωγή που επηρεάζει το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, με τη συνήθεια να καταναλώνουν $>$ από 30 μονάδες αλκοόλ την εβδομάδα, που κάπνιζαν περισσότερα από 10 τσιγάρα την ημέρα ή που πραγματοποιούσαν περισσότερες από 6 ώρες έντονης άσκησης ανά εβδομάδα αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Η λήψη αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, βιταμινών ή άλλων διατροφικών συμπληρωμάτων απαγορεύθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης.

2.2 Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη μας ήταν μια μελέτη παρέμβασης με παράλληλο σχεδιασμό. Ακολουθήσαμε μια αναλογία 2:1 για να σχηματίσουμε την ομάδα ALA (άτομα που έλαβαν ALA) και την ομάδα LA (άτομα που έλαβαν LA) αντίστοιχα. Η μελέτη διήρκεσε 12 εβδομάδες. Οι εθελοντές εξετάστηκαν κατά την είσοδό τους στη μελέτη ώστε να ακολουθούν μια δίαιτα που να προσομοιώνει το μέσο ελληνικό διαιτολόγιο. Ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες και το συνήθη τρόπο ζωής τους κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι εθελοντές κατανεμήθηκαν με τυχαίο τρόπο ώστε να λάβουν ένα από τα δύο έλαια, σχηματίζοντας δύο ομάδες: την ομάδα ALA, η οποία έλαβε 15ml λινελαίου ανά ημέρα που περιείχε περίπου 8 γραμμάρια ALA και την ομάδα LA, η οποία έλαβε 15ml καρδαμελαίου ανά ημέρα που περιείχε περίπου 11 γραμμάρια LA. Η πρόσληψη σχεδιάστηκε έτσι ώστε ο λόγος ω -6: ω -3 να γίνει 1.3:1 για την ομάδα ALA και 13.2:1 για την ομάδα LA καθώς και ώστε η συνολική πρόσληψη λίπους να παραμείνει σταθερή στις δύο ομάδες. Λινέλαιο και καρδαμέλαιο χορηγήθηκαν από την εταιρία Savant International, UK. Τα έλαια λαμβάνονταν 3 φορές την ημέρα, μια κουταλιά του τσαγιού των 5ml με κάθε γεύμα.

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε μετά από 12ωρη νηστεία. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να κρατήσουν ένα ημερολόγιο με τα τρόφιμα που κατανάλωσαν την ημέρα πριν από την πρώτη αιμοληψία και να καταναλώσουν ακριβώς τα ίδια τρόφιμα την ημέρα μετά τη δεύτερη αιμοληψία.

Η σύσταση των δύο ελαίων δίνεται στον πίνακα 1. Ο σχεδιασμός της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη επισκεφθήκαν την καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου μια φορά το μήνα όπου και τους χορηγήθηκαν τα έλαια. Οι συμμετέχοντες ζυγίστηκαν σε κάθε επίσκεψη και ερωτήθηκαν σχετικά με τις συνήθειες του καπνίσματος και της φυσικής δραστηριότητας.

Πίνακας 1

Σύσταση των δύο ελαίων ανά 100 γραμμάρια

	λινέλαιο	καρδαμέλαιο
Παλμιτικό οξύ (γρ.)	5.9	5.7
Στεαρικό οξύ (γρ.)	3.6	2.4
Αραχιδονικό οξύ (γρ.)	-	0.5
Ελαϊκό οξύ (γρ.)	18.2	11.5
Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (γρ.)	-	0.5
Λινελαϊκό οξύ (γρ.)	13.9	74.4
α-λινολενικό οξύ (γρ.)	54.2	0.5
Ολικές στερόλες (γρ.)	0.4	0.4
Ολικές τοκοφερόλες (μγρ.)	54.27	48.21

2.3 Δίαιτες

Η διατροφική αξιολόγηση βασίστηκε σε ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ώστε να καθοριστεί η διαίτα των εθελοντών. Η συχνότητα κατανάλωσης γάλακτος, ψωμιού, φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, ελαιόλαδου, ψαριών και κρέατος καταγράφηκε μαζί με μια διατροφική ανάκληση 24ωρου. Η διατροφική πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τους εθελοντές κατά τη διάρκεια της μελέτης ελέγχθηκε μέσω ενός 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων για κάθε μήνα. Οι μέρες που καταγράφηκαν στο ημερολόγιο ήταν 2 καθημερινές και 1 ημέρα από το σαββατοκύριακο. Τα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος NUTRITIONIST V (Version 2.1 First Data Bank Inc. USA). Η παρακολούθηση των συνηθειών καπνίσματος, του δείκτη μάζας σώματος, της φυσικής δραστηριότητας και των διατροφικών συνηθειών

των εθελοντών πραγματοποιήθηκε μέσω τηλεφωνικών κλήσεων μια φορά την εβδομάδα και μέσω των μηνιαίων επισκέψεων στο νοσοκομείο.

2.4 Συλλογή δειγμάτων αίματος και εργαστηριακές τεχνικές

Οι εθελοντές επισκεφθήκαν την καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου για τη συλλογή δειγμάτων αίματος δύο φορές, στην αρχή και το τέλος της πειραματικής περιόδου. Σε κάθε επίσκεψη και μετά από 12ωρη νηστεία, συγκεντρώθηκαν δείγματα αίματος στις 08:00 το πρωί. Οι εθελοντές ξάπλωσαν σε ύπτια θέση για 10 λεπτά πριν τη συλλογή αίματος. Το αίμα συγκεντρώθηκε σε γυάλινα σωληνάρια χωρίς μέσο συντήρησης (Vacutainer tube, Becton Dickinson) για τον προσδιορισμό των λιπιδίων και των φλεγμονωδών δεικτών του ορού. Όλες οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν χωρίς αποκλεισμό της φλέβας. Τα σωληνάρια συλλογής του αίματος διατηρήθηκαν σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και στους 4° C, εντός 2 ωρών από την αιμοληψία. Τα δείγματα του ορού αποθηκεύτηκαν στους -80° C για περαιτέρω ανάλυση.

Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL χοληστερόλης) στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με τη χρήση ενζυματικής χρωματογραφίας σε αυτοματοποιημένο αναλυτή ACE (Sciapparelli Biosystems Inc., USA). Ο προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων περιέλαβε αντιδράσεις υδρόλυσης και οξείδωσης. Η ανάλυση της συγκέντρωσης της HDL χοληστερόλης στον ορό πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης ανοσοκαταστολής υγρής φάσης. Η χοληστερόλη των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL χοληστερόλη) υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης του Friedewald [15].

Η ανάλυση της CRP πραγματοποιήθηκε μέσω υψηλής ευαισθησίας ανοσονεφελομετρίας ενισχυόμενης μέσω σωματιδίων (N Latex, Date-Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) με εύρος προσδιορισμού από 0.175 έως 1100 mg/l. Το SAA μετρήθηκε επίσης μέσω ανοσονεφελομετρίας ενισχυόμενης μέσω σωματιδίων (N Latex, Date-Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) με εύρος προσδιορισμού από 0.75 έως 1000 mg/l. Η IL-6 προσδιορίστηκε μέσω ανοσοενζυμικής τεχνικής στερεής φάσης (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) με εύρος προσδιορισμού από 0.156 έως 10 pg/ml. Η διακύμανση εντός και μεταξύ των αναλύσεων για CRP και SAA ήταν <5% και για την IL-6 <12%. Όλες οι

αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από ένα αναλυτή ο οποίος δεν γνώριζε το χρόνο λήψης του δείγματος και το είδος της διατροφικής παρέμβασης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο βιοχημικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα για τη CRP, το SAA και την IL-6 τα οποία δεν είχαν κανονική κατανομή εκφράστηκαν με χρήση του διαμέσου. Οι διαφορές στους δείκτες της φλεγμονής εντός και μεταξύ των ομάδων αναλύθηκαν με ανάλυση Wilcoxon signed rank test και Mann-Whitney U-test, αντίστοιχα. Οι διαφορές για τις μεταβλητές που παρουσίασαν κανονική κατανομή αναλύθηκαν με την ανάλυση Student t-test. Ο δείκτης συσχέτισης του Pearson χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στις μεταβλητές. Οι μη συνεχείς μεταβλητές αναλύθηκαν με τη χρήση της μεθόδου εκτιμητριών των χ^2 . Τιμές του $P < 0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Stat ViewTM II.

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηριστικά κατά την έναρξη

76 εθελοντές ολοκλήρωσαν τη μελέτη. Οι ομάδες ALA και LA δεν διέφεραν ως προς την ηλικία (50.4 ± 7.3 έναντι 52 ± 7.7 , $P=0.33$) και το δείκτη μάζας σώματος (28.42 ± 3.44 έναντι 28 ± 3.19 , $P=0.63$). Το ποσοστό των καπνιστών (<10 τσιγάρα ανά ημέρα) ήταν παρόμοιο στις δύο ομάδες (24 έναντι 23%, $P=0.85$). Κανείς από τους συμμετέχοντες της μελέτης δεν άλλαξε τις καπνιστικές του συνήθειες κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ο λόγος $\omega-6:\omega-3$ ήταν συγκρίσιμος στις δίαιτες των δύο ομάδων πριν τη χορήγηση των ελαίων (7.5:1 και 7:1) ενώ μετά τη χορήγηση οι λόγοι άλλαξαν σε 1.3:1 και 13.2:1 στις ομάδες ALA και LA, αντίστοιχα. Παρά τη χορήγηση των ελαίων, η πρόσληψη θερμίδων μέσω λίπους ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ανάμεσα στις ομάδες ALA και LA, σε όλη τη διάρκεια της μελέτης (Πίνακας 2). Το λιπιδαιμικό προφίλ και οι δείκτες της φλεγμονής κατά την έναρξη της μελέτης στις δύο ομάδες παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2

Μέση διατροφική πρόσληψη ενέργειας και θρεπτικών συστατικών για άτομα με δυσλιπιδαιμία σε δίαιτες εμπλουτισμένες με ALA και LA

Δίαιτα	Ομάδα ALA (μέσος $\pm$ T.A.)	Ομάδα LA (μέσος $\pm$ T.A.)	P-τιμή
Πρωτεΐνες %	15.1 $\pm$ 2.4	14.9 $\pm$ 2.2	0.564
Υδατάνθρακες %	47.7 $\pm$ 3.8	47.8 $\pm$ 4.2	0.613
Λίπη %	35.9 $\pm$ 4.1	35.9 $\pm$ 4.4	0.477
Αλκοόλ %	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	0.524
Ενέργεια (Θερμ.)	2181.8 $\pm$ 243.1	2183.2 $\pm$ 237.6	0.638
Πρωτεΐνες (γρ.)	82.4 $\pm$ 10.3	81.3 $\pm$ 11.5	0.356
Υδατάνθρακες (γρ.)	260.2 $\pm$ 20.6	260.9 $\pm$ 21.8	0.672
Λίπη (γρ.)	87.0 $\pm$ 11.1	87.1 $\pm$ 10.7	0.521
Αλκοόλ (γρ.)	4.1 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 1.3	0.395
Χοληστερόλη (μγρ.)	216.4 $\pm$ 27.0	218.3 $\pm$ 30.6	0.449
Κορεσμένα λίπη (γρ.)	22.8 $\pm$ 2.6	23.2 $\pm$ 2.8	0.518
Μονοακόρεστα λίπη (γρ.)	46.5 $\pm$ 4.3	46.6 $\pm$ 4.8	0.753
Πολυακόρεστα λίπη (γρ.)	11.9 $\pm$ 1.2	12.0 $\pm$ 1.4	0.687
α -λινολενικό οξύ (γρ.)	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.524
Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (γρ.)	0.3 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.08	0.373
Δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (γρ.)	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.04	0.465
Βιταμίνη C (μγρ.)	120.1 $\pm$ 14.6	120.7 $\pm$ 15.3	0.316
Διαιτητικές ίνες (γρ.)	25.4 $\pm$ 3.0	25.2 $\pm$ 3.6	0.759

3.2 Λιπίδια και δείκτες φλεγμονής στον ορό μετά την διαιτητική παρέμβαση

Αναφορικά με τα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα, τα επίπεδα χοληστερόλης παρέμειναν αμετάβλητα στην ομάδα ALA, ενώ μειώθηκαν στην ομάδα LA ($P=0.04$) (Πίνακας 3). Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης μειώθηκαν στην ομάδα του ALA ($P=0.005$).

Τα επίπεδα της CRP, του SAA και της IL-6 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση μετά την χορήγηση του ALA (Πίνακας 3). Η μείωση του διάμεσου ήταν 38% για τη CRP, 23.1% για τον SAA και 10.5% για την IL-6. Οι δείκτες της φλεγμονής δεν παρουσίασαν καμία στατιστική διαφορά μετά τη χορήγηση του LA (Πίνακας 3). Επιπρόσθετα, συγκρίναμε τις διαφορές (Δ =επίπεδα πριν-επίπεδα μετά την παρέμβαση) της CRP, του SAA και της IL-6 στην ομάδα του ALA με τις διαφορές της CRP, του SAA και της IL-6 στην ομάδα του LA. Οι Δ CRP, Δ SAA και Δ IL-6 της ομάδας του ALA διέφεραν σημαντικά από τις αντίστοιχες διαφορές στην ομάδα

Πίνακας 3

Λιπιδαιμικό προφίλ, δείκτες φλεγμονής και δείκτης μάζας σώματος (BMI) πριν και μετά τη χορήγηση ALA και LA

Μεταβλητές	Πριν	Μετά	P τιμή
Ομάδα ALA (n=50)			
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	232±34	226±36	0.27
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	155±84	163±87	0.16
HDL χοληστερόλη(mg/dl)	42.7±10.4	41±10.2	0.005
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	154±37	152±36	0.59
CRP (mg/l)	1.24 (0.72-3.7)	0.93 (0.56-1.8)	0.0008
SAA (mg/l)	3.24 (2.3-5.3)	2.39 (1.7-3.9)	0.0001
IL-6 (pg/ml)	2.18 (1.35-3.9)	1.7 (1.3-2.8)	0.01
BMI (kg/m ²)	28.42±3.44	28.40±3.44	0.25
Ομάδα LA (n=26)			
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	234±46*	218±46	0.04
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	173±113*	156±86	0.13
HDL χοληστερόλη(mg/dl)	39.2±7.4*	38.3±8	0.25
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	154±43*	149±44	0.36
CRP (mg/l)	1.54 (0.62-3.1)*	1.25 (0.64-1.7)	0.35
SAA (mg/l)	3.52 (2.1-4.9)*	3.34 (2.15-4.4)	0.58
IL-6 (pg/ml)	1.77 (1.3-2.7)*	2.2 (1.1-2.7)	0.69
BMI (kg/m ²)	28±3.19*	28±3.22	0.8

Οι τιμές για τους δείκτες φλεγμονής είναι διάμεσοι με το 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο. LDL, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη; HDL, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη; CRP, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη; SAA, αμυλοειδές A του ορού; IL-6, ιντερλευκίνη-6; BMI, δείκτης μάζας σώματος.

* P=ΜΣ (λιπίδια, φλεγμονώδεις δείκτες και BMI στην ομάδα LA έναντι των αντίστοιχων επιπέδων λιπιδίων, φλεγμονωδών δεικτών και BMI της ομάδας ALA)

LA (0.525 (-0.13-2.46) έναντι 0.04 (-0.41-0.4), P=0.01, 0.75 (-0.03-1.91) έναντι 0.04 (-0.6-0.59), P=0.03 και 0.19 (-0.04-1.46) έναντι 0.04 (-1.05-0.48), P=0.04, αντίστοιχα).

Η μείωση των φλεγμονωδών δεικτών στην ομάδα του ALA ήταν ανεξάρτητη από τις αλλαγές των λιπιδίων καθώς δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις αλλαγές των δεικτών της φλεγμονής και τις αλλαγές στα λιπίδια (Πίνακας 4). Οι αλλαγές του κάθε δείκτη φλεγμονής στην ομάδα του ALA συσχετίστηκαν με τις αλλαγές των υπολοίπων δεικτών (ΔCRP έναντι ΔSAA, r=0.62, P=0.001, ΔCRP έναντι ΔIL-6, r=0.53, P=0.0001 και ΔSAA έναντι ΔIL-6, r=0.62, P=0.001).

4. Συζήτηση

Η μελέτη μας έδειξε ότι άτομα με δυσλιπιδαιμία παρουσιάζουν σημαντική μείωση των δεικτών της φλεγμονής όταν παρέχεται στη δίαιτά τους ALA όχι όμως και LA για διάστημα 3 μηνών.

Στη μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι ίδιες ποσότητες ALA και LA για τις ομάδες ALA και LA, αντίστοιχα. Η σκοπιμότητα του γεγονότος αυτού αφορά την επιδίωξη να μειώσουμε το λόγο ω-6:ω-3 σε ρεαλιστικά επίπεδα. Στόχος μας ήταν να μειώσουμε το λόγο ω-6:ω-3 στην ομάδα του ALA και να αυξήσουμε το λόγο ω-6:ω-3 στην ομάδα του LA. Έτσι, με τις ποσότητες των ALA και LA που επιλέξαμε

Πίνακας 4

Συσχέτιση ανάμεσα στις αλλαγές των τιμών δεικτών φλεγμονής και λιπιδίων στα 50 άτομα που έλαβαν το ALA

		r	P τιμή
Δ CRP έναντι	Δ χοληστερόλης	-0.07	0.63
	Δ τριγλυκεριδίων	-0.25	0.09
	Δ LDL χοληστερόλης	0.015	0.92
	Δ HDL χοληστερόλης	-0.093	0.52
Δ SAA έναντι	Δ χοληστερόλης	-0.068	0.64
	Δ τριγλυκεριδίων	-0.18	0.21
	Δ LDL χοληστερόλης	0.014	0.93
	Δ HDL χοληστερόλης	0.03	0.83
Δ IL-6 έναντι	Δ χοληστερόλης	-0.28	0.06
	Δ τριγλυκεριδίων	-0.30	0.07
	Δ LDL χοληστερόλης	-0.16	0.27
	Δ HDL χοληστερόλης	-0.14	0.31

Οι τιμές Δ είναι τιμές κατά πριν – τιμές μετά την διαιτητική παρέμβαση.
Συντομογραφίες όπως στον πίνακα 3

επιτύχαμε ένα λόγο ω-6:ω-3 1.3:1 στην ομάδα του ALA και 13.2:1 στην ομάδα του LA. Επιπρόσθετα, οι χορηγούμενες ποσότητες ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν παρείχαν παρόμοια ποσότητα θερμίδων μέσω λίπους στις δύο ομάδες. Αυτό είναι σημαντικό καθώς οι διαφορές στην ολική πρόσληψη λίπους μπορούν να επηρεάζουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις [16].

Η προστατευτική δράση των τροφών που είναι πλούσιες σε ALA έχει αναφερθεί σε μελέτες τόσο πρωτογενούς όσο και δευτερογενούς πρόληψης της στεφανιαίας νόσου. Ο Ascherio και συνεργάτες [7] βρήκε μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην

πρόσληψη ALA και τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Στη μελέτη των Hu και συνεργατών [8], η διαιτητική πρόσληψη ALA εξετάστηκε σε σχέση με τον κίνδυνο θανατηφόρου ισχαιμικού επεισοδίου μεταξύ των συμμετεχόντων της μελέτης Nurses' Health Study. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης η υψηλότερη πρόσληψη ALA σχετίστηκε με χαμηλότερο σχετικό κίνδυνο θανατηφόρου ισχαιμικού επεισοδίου. Στη μελέτη της Λυών όπου μια Μεσογειακού τύπου δίαιτα, πλούσια σε ALA χορηγήθηκε σε επιζώντες ενός πρώτου εμφράγματος του μυοκαρδίου εμφανίστηκε σημαντική μείωση της επανεμφάνισης καρδιακών επεισοδίων και της ολικής θνησιμότητας [9].

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με στόχο να εξηγηθεί ο προστατευτικός ρόλος του ALA [17,18]. Μελέτες σε σκύλους έδειξαν ότι η άμεση χορήγηση ALA μπορεί να προστατέψει έναντι της ίνωσης των κοιλιών της καρδιάς που προκαλεί η ισχαιμία [19,20]. Στις ευεργετικές δράσεις του ALA περιλαμβάνεται η βελτίωση της ανταπόκρισης των αρτηριών [21], η μέτρια μείωση της αρτηριακής πίεσης [22] και αντι-αιμοπεταλιακή δράση [23]. Τέλος, έχει προταθεί μια αντι-φλεγμονώδης δράση του ALA [24] η οποία υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα της μελέτης μας.

Η αθηροσκλήρωση θεωρείται μια χρόνια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μικρού βαθμού φλεγμονή των αγγείων [1,2]. Οι φλεγμονώδεις δείκτες εμφανίζονται αυξημένοι σε ασθενείς με χρόνια σταθερή στηθάγχη και οξεία στεφανιαία σύνδρομα ενώ έχει αναφερθεί ότι κατέχουν προγνωστική αξία για την εμφάνιση επακόλουθων στεφανιαίων επεισοδίων [25-27].

Στη μελέτη μας, η CRP, το SAA και η IL-6 παρουσίασαν σημαντική μείωση μετά από χορήγηση ALA για χρονικό διάστημα 3 μηνών. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρεται στα ευρήματα αυτά. Η μείωση αυτή που παρατηρείται είναι ανεξάρτητη από τις αλλαγές των λιπιδίων. Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου μειώνονται οι δείκτες της φλεγμονής είναι άγνωστος. Ο Caughey και συνεργάτες [28] αναφέρει ότι μια δίαιτα πλούσια σε ALA ανέστειλε την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων α και την IL-1 β σε υγιείς εθελοντές. Περισσότερα δεδομένα υπάρχουν σε σχέση με τα ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που προέρχονται από ιχθυέλαια EPA και DHA. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ALA είναι πιθανό να μην αναπαράγει τις δράσεις του ιχθυελαίου [17,29]. Η συμπλήρωση της δίαιτας υγιών εθελοντών με ιχθυέλαιο για 6 εβδομάδες μείωσε την παραγωγή IL-2 από τα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα [30]. Ο Kremer και συνεργάτες [31] αναφέρει μείωση της παραγωγής IL-1 από τα μακροφάγα και

λευκοτριενίου B₄ από τα ουδετερόφιλα όταν χορηγήθηκε ιχθυέλαιο σε ασθενείς με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα. Σε άλλη μελέτη [32], η συμπλήρωση της δίαιτας υγιών εθελοντών με ιχθυέλαιο περιόρισε την ικανότητα των μονοπύρηνων να συνθέτουν IL-1 β , IL-1 α και παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α *in vitro*.

Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί την μειωμένη παραγωγή αυτών των κυτταροκινών αφορά την τροποποίηση της παραγωγής μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος. Τα ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προκαλούν αλλαγές στα παράγωγα των ενζύμων κυκλοοξυγενάση και λιποξυγενάση όπως η μείωση της παραγωγής της προσταγλανδίνης E₂ και του λευκοτριενίου B₄ [4]. Και οι δύο αυτοί μεταβολίτες αυξάνουν την απελευθέρωση IL-6 *in vitro* [33]. Αντιστρόφως, η μείωση αυτών των εικοσανοειδών μπορεί πιθανά να εξηγήσει τη μείωση της IL-6. Η IL-6 είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη [34], η οποία ελέγχει την παραγωγή CRP και SAA από το ήπαρ [35,36]. Έτσι, είναι εύλογο να θεωρήσουμε ότι η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA καταστέλλει αρχικά την απελευθέρωση IL-6, η οποία στη συνέχεια περιορίζει την παραγωγή CRP και SAA. Η ενδεχόμενη αθηρογενετικότητα των δεικτών της φλεγμονής, όπως η CRP [37], ενισχύει την υπόθεση ότι η αντιφλεγμονώδης επίδραση του ALA αντικατοπτρίζει πιθανά μια ευεργετική αντι-αθηρογόνο δράση.

Η συμπλήρωση της δίαιτας με LA μείωσε σημαντικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης. Το εύρημα αυτό έχει επαρκώς τεκμηριωθεί και είναι γνωστό ότι οφείλεται την αυξημένη σύνθεση υποδοχέων της LDL. Παρόλα αυτά, η χορήγηση ALA δεν επηρέασε τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης ενώ συγχρόνως μείωσε τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Υπάρχουν και άλλες μελέτες που υποδεικνύουν ότι δεν υφίσταται υπολιπιδαιμική δράση του ALA. Συγκεκριμένα, στη μελέτη MARGARIN, η οποία συγκέντρωσε εθελοντές με πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές νόσους, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ήταν χαμηλότερα στην ομάδα που λάμβανε το ALA σε σύγκριση με την ομάδα που λάμβανε το LA [10]. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλης μελέτης η οποία έδειξε ότι μια δίαιτα πλούσια σε λινέλαιο και χαμηλή σε λίπος που παρείχε 20 γραμμάρια ALA ημερησίως για ένα μήνα, οδήγησε σε χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης, σε σύγκριση με τη δίαιτα ελέγχου (πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα) και μια δίαιτα πλούσια σε έλαιο ελαιοκράμβης (πλούσιο σε ελαϊκό οξύ) [21]. Παρόλα αυτά, σε άλλη μελέτη σε άνδρες με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, η επίδραση μιας δίαιτας πλούσιας σε ALA στα επίπεδα της LDL και HDL

χοληστερόλης δεν διέφερε από την επίδραση μιας δίαιτας πλούσιας σε LA [14]. Κατά συνέπεια, οι ενδείξεις σχετικά με τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες του ALA, σε ότι αφορά τη βελτίωση του προφίλ των λιπιδίων, δεν είναι πειστικές.

Η παρούσα μελέτη χαρακτηρίζεται από ορισμένους περιορισμούς οι οποίοι θα πρέπει να αναφερθούν. Πρώτα από όλα, δεν εφαρμόσαμε το σχεδιασμό διασταυρούμενων ομάδων ο οποίος είναι ισχυρότερος στην αποκάλυψη στατιστικών διαφορών σε σχέση με μια παρέμβαση παράλληλου σχεδιασμού. Η απόφασή μας οφείλεται στην πιθανότητα εμφάνισης του φαινομένου της παραμονής επιδράσεων από προηγούμενο χρονικό διάστημα καθώς η περίοδος «αποτοξίνωσης» που απαιτείται δεν μπορεί να προσδιορισθεί για μελέτες που αφορούν λιπίδια. Υπολογίζοντας μια ενδιάμεση περίοδο «αποτοξίνωσης» τουλάχιστον 2 μηνών, η συνολική διάρκεια της μελέτης θα έπρεπε να επιμηκυνθεί στους 8 μήνες. Ένας τέτοιος σχεδιασμός θα δημιουργούσε προβλήματα συμμόρφωσης των εθελοντών, συνυπολογίζοντας ότι η συμμόρφωση στον ελληνικό πληθυσμό είναι σχετικά χαμηλή. Δεύτερον, οι δόσεις των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων που χορηγήσαμε μέσω των συμπληρωμάτων που δόθηκαν στη μελέτη μας είναι δύσκολο να επιτευχθούν μέσω μιας συνήθους δίαιτας. Παρόλα αυτά, προϊόντα όπως μαργαρίνες εμπλουτισμένες με τα κατάλληλα λιπαρά οξέα μπορούν να παραχθούν από τη σχετική βιομηχανία. Οι μαργαρίνες αυτές μπορούν να αντικαταστήσουν άλλες πηγές πρόσληψης λίπους στη δίαιτα υπερλιπιδαιμικών ασθενών.

Συμπερασματικά, η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA μειώνει τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς. Αυτή η αντιφλεγμονώδης επίδραση παρέχει ένα μηχανισμό που πιθανότατα εξηγεί την ευεργετική επίδραση του ALA στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου. Η ελκυστικότητα της υπόθεσης αυτής ενισχύεται από την αύξηση των ενδείξεων ότι οι φλεγμονώδεις δείκτες σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης.

Αναφορές

- [1] Ross R. Atherosclerosis*/an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340:115-26.
- [2] Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002;105:1135-43.

- [3] Shah PK. Circulating markers of inflammation for vascular risk prediction. Are they ready for prime time? *Circulation* 2000;105:1758-9.
- [4] Chavali SR, Zhong WW, Forse RA. Dietary α -linolenic acid increases TNF- α , and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS: effects of sesamin on the D-5 desaturation of v6 and v3 fatty acids in mice. *Prostag Leukotr Ess* 1998;58:185-91.
- [5] Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;72:42-8.
- [6] Dolecek TA. Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:177-82.
- [7] Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996;313:84-90.
- [8] Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary intake of α -linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:890-7.
- [9] De Lorgenil M, Renaud S, Mamelle N, et al. Mediterranean α -linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994;343:1454-9.
- [10] Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ, et al. Effect of an increased intake of α -linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean α -linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:221-7.
- [11] Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 1990;51:1028-34.
- [12] McDonald BE, Gerrard JM, Bruce VM, Corner EJ. Comparison of the effect of canola oil and sunflower oil on plasma lipids and lipoproteins and on in vivo thromboxane A₂ and prostacyclin production in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 1989;50:1382-8.
- [13] Wardlaw GM, Snook JT, Lin MC, Puangco MA, Kwon JS. Serum lipid and apolipoprotein concentrations in healthy men on diets enriched in either canola oil or safflower oil. *Am J Clin Nutr* 1991;54:104-10.

- [14] Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998;80:163-7.
- [15] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- [16] Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669-73.
- [17] de Deckere EAM, Korner O, Verschuren PM, Katan MB. Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:749-53.
- [18] O'Keefe J, Harris WS. Omega-3 fatty acids: time for clinical implementation? *Am J Cardiol* 2000;85:1239-41.
- [19] Kang JX, Leaf A. Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;71:202-7.
- [20] Billman GE, Kang JX, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure v3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 1999;99:2452-7.
- [21] Nestel PJ, Pomeroy SE, Sasahara T, et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1163-70.
- [22] Bemelmans WJE, Muskiet FAJ, Feskens EJM, et al. Associations of alpha-linolenic acid and linoleic acid with risk factors for coronary heart disease. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:865-71.
- [23] Lanzmann-Petithory D. Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging* 2001;5:179-83.
- [24] Endres S, von Schacky C. n-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:48-52.
- [25] Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
- [26] Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94:847-77.
- [27] Rallidis LS, Zolindaki MG, Manioudaki HS, Laoutaris PN, Velissaridou AH, Papasteriadis EG. Prognostic value of Creactive protein, fibrinogen, interleukin-6, and

macrophage colony stimulating factor in severe unstable angina. *Clin Cardiol* 2002;25:505-10.

[28] Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996;63:116-22.

[29] Mantzioris E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and α -linolenic acids and their respective long-chain metabolites. *Am J Clin Nutr* 1995;61:320-4.

[30] Endres S, Meydani SN, Ghorbani R, Schindler R, Dinarello CA. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leuk Biol* 1993;54:599-603.

[31] Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum* 1990;33:810-20.

[32] Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989;320:265-71.

[33] Leal-Berumen I, O'Byrne P, Gupta A, Richards CD, Marshal JS. Prostanoid enhancement of interleukin-6 production by rat peritoneal mast cells. *J Immunol* 1995;154:4759-67.

[34] Herity NA. Interleukin 6: a message from the heart. *Heart* 2000;84:9-10.

[35] Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 1990;7:147-59.

[36] Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:381-8.

[37] Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and atherothrombosis. *Ital Heart* 2001;2:196-9.

Κεφάλαιο 6. Δημοσίευση 2

Η επίδραση δίαιτας εμπλουτισμένης σε α-λινολενικό οξύ στα διαλυτά μόρια προσκόλλησης σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς

Περίληψη

Θεωρία: Η προσκόλληση και η είσοδος των λευκοκυττάρων διαμέσω του ενδοθηλίου αποτελούν στάδια κριτικής σημασίας στη διαδικασία σχηματισμού των αθηροσκληρωτικών πλακών που πραγματοποιούνται σε μεγάλο βαθμό από τα μόρια προσκόλλησης των κυττάρων (CAM). Εξετάσαμε εάν η συμπλήρωση της δίαιτας με α-λινολενικό οξύ (ALA, 18:3ω-3) επηρεάζει τα επίπεδα των διαλυτών μορφών των CAM σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς. *Μέθοδοι:* Συγκεντρώσαμε 90 άνδρες ασθενείς με δυσλιπιδαιμία (μέση ηλικία 51 ± 8 έτη) που ακολουθούσαν μια τυπική ελληνική δίαιτα. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη κατανεμήθηκαν με τυχαίο τρόπο είτε σε 15ml λινελαίου (πλούσιο σε ALA) ανά ημέρα ($n=60$) ή σε 15ml καρδαμελαίου (πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ [LA, 18:2ω-6]) ανά ημέρα ($n=30$). Ο λόγος ω-6:ω-3 στην ομάδα που έλαβε το λινέλαιο ήταν 1.3:1 και στην ομάδα που έλαβε το καρδαμέλαιο ήταν 13.2:1. Η διατροφική παρέμβαση διήρκεσε 12 εβδομάδες. Μετρήθηκαν τα επίπεδα λιπιδίων, διαλυτής μορφής του διακυττάρου μορίου προσκόλλησης-1 (sICAM-1), διαλυτής μορφής του μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (sVCAM-1) και διαλυτής μορφής της E-σελεκτίνης. *Αποτελέσματα:* Η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA μείωσε σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα sVCAM-1 (μείωση διαμέσου 18.7% [577.5ng/ml έναντι 487ng/ml, $P=0.0001$]). Στην ομάδα που έλαβε το LA μειώθηκε επίσης το sVCAM-1 σε μικρότερο όμως βαθμό (μείωση διαμέσου 10.6% [550.5ng/ml έναντι 496ng/ml, $P=0.0001$]). Μετά από έλεγχο για τη συνήθεια του καπνίσματος, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στη μείωση των επιπέδων του sVCAM-1 ανάμεσα στις δύο ομάδες ($P=0.205$). Η μείωση του sVCAM-1 ήταν ανεξάρτητη από τις αλλαγές των λιπιδίων και στις δύο ομάδες. *Συμπεράσματα:* Η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA για 12 εβδομάδες μείωσε σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα του sVCAM-1 σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς. Η επίδραση αυτή αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φυτικής προέλευσης ασκούν την προστατευτική τους δράση έναντι της ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου.

Επιπλέον, η συμπλήρωση της δίαιτας με LA μείωσε σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα sVCAM-1, μια δράση που χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση.

1. Εισαγωγή

Η φλεγμονώδης απάντηση έχει κεντρικό ρόλο σε όλες τις φάσεις της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας [1]. Η προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθηλιακό κύτταρο και η επακόλουθη μεταφορά του από την κυκλοφορία στο αγγειακό τοίχωμα διαμέσω του ενδοθηλίου αποτελεί γεγονός κριτικής σημασίας στην παθογένεση της έναρξης και της εξέλιξης των αθηροσκληρωτικών πλακών [2,3]. Η διαδικασία αυτή έρχεται εις πέρας σε μεγάλο βαθμό μέσω των μορίων προσκόλλησης των κυττάρων (CAM) τα οποία εκφράζονται στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ανταπόκριση σε διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες [3]. Το διακυττάριο μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1) και το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (VCAM-1) είναι δύο μέλη της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών που έχουν σημαντικούς άλλα διαφορετικούς ρόλους στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο [4]. Μια δεύτερη ομάδα CAM, η ομάδα των σελεκτινών, περιλαμβάνει την E-σελεκτίνη η οποία φέρνει εις πέρας την παροδική μεταφορά μέσω κύλισης των μονοκυττάρων κατά μήκος του ενδοθηλίου ενώ τα VCAM-1 και ICAM-1 υλοποιούν τη σταθερή προσκόλληση του μονοκυττάρου στα ενδοθηλιακά κύτταρα [5].

Μελέτες της παθολογίας της αθηροσκλήρωσης έχουν ανιχνεύσει CAM σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές πλάκες [6,7] ενώ διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη των CAM αναπτύσσουν λιγότερες αθηροσκληρωτικές πλάκες σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια [8]. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν επίσης ένα πιθανό ρόλο των διαλυτών μορφών των CAM (sCAM) στην πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου [9-14].

Το α-λινολενικό οξύ (ALA, 18:3ω-3) είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ που βρίσκεται σε έλαια σπόρων φυτικής προέλευσης. Είναι ο πρόδρομος για το σχηματισμό των μακράς αλύσου ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) (20:5ω-3) και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA) (22:6ω-3) τα οποία μπορούν να αντικαταστήσουν το αραχιδονικό οξύ (AO) (20:4ω-6) και να μειώσουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών εικοσανοειδών προσταγλανδίνη E₂ και λευκοτριένιο B₄. Το

ΑΟ προέρχεται από την απομάκρυνση απλών δεσμών και την επιμήκυνση του λινελαϊκού οξέος (LA) (18:2ω-6). Τα λίπη της διατροφής που είναι πλούσια σε ALA έχει αναφερθεί ότι τροποποιούν την φλεγμονώδη απάντηση σε πειραματόζωα [15] και ανθρώπους [16].

Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο ALA της διατροφής και τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου [17-19]. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε εάν η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA που οδηγεί σε μείωση του λόγου ω-6:ω-3 σε περίπου 1:1 επηρεάζει τα επίπεδα των διαλυτών μορφών των ICAM-1 (sICAM-1), VCAM-1 (sVCAM-1) και E-σελεκτίνης (sE-σελεκτίνη) σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Εθελοντές

Οι εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη συγκεντρώθηκαν από την καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν σχετικά με την κατάσταση της υγείας τους, τη χρήση φαρμάκων, τις διατροφικές συνήθειες και τη συνήθεια να ασκούνται. Άτομα που παρουσίαζαν προϋπάρχουσα φλεγμονή ή υπέρταση, που βρίσκονταν σε φαρμακευτική αγωγή που επηρεάζει το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, με τη συνήθεια να καταναλώνουν > από 30 μονάδες αλκοόλ την εβδομάδα, που κάπνιζαν περισσότερα από 10 τσιγάρα την ημέρα ή που πραγματοποιούσαν περισσότερες από 6 ώρες έντονης άσκησης ανά εβδομάδα αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Η λήψη αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων, απαγορεύθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης.

2.2 Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη μας ήταν μια μελέτη παρέμβασης με παράλληλο σχεδιασμό. Ακολουθήσαμε μια αναλογία 2:1 για να σχηματίσουμε την ομάδα ALA (άτομα που έλαβαν ALA) και την ομάδα LA (άτομα που έλαβαν LA) αντίστοιχα. Η μελέτη διήρκεσε 12 εβδομάδες. Οι εθελοντές εξετάστηκαν κατά την είσοδό τους στη μελέτη ώστε να ακολουθούν μια δίαιτα που να προσομοιώνει το μέσο ελληνικό διαιτολόγιο. Ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρήσουν τις διαιτητικές τους συνήθειες και το

συνήθη τρόπο ζωής τους κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι εθελοντές κατανεμήθηκαν με τυχαίο τρόπο ώστε να λάβουν ένα από τα δύο έλαια, σχηματίζοντας δύο ομάδες: την ομάδα ALA (n=60) και την ομάδα LA (n=30). Η ομάδα ALA έλαβε 15ml λινελαίου ανά ημέρα που περιείχε 8.1 γραμμάρια ALA και 2 γραμμάρια LA. Η συνολική ω-6 πρόσληψη άλλαξε από 10.4 γραμμάρια (9.1 γραμμάρια ήταν LA) σε 12.4 γραμμάρια ανά ημέρα ενώ η συνολική πρόσληψη ω-3 άλλαξε από 1.5 γραμμάρια (0.9 γραμμάρια ήταν ALA) σε 9.6 γραμμάρια ανά ημέρα. Αυτό οδήγησε σε αλλαγή του λόγου ω-6:ω-3 από 7:1 σε 1.3:1. Η ομάδα LA έλαβε 15ml καρδαμελαίου ανά ημέρα που περιείχε 11.16 γραμμάρια LA, 0.075 γραμμάρια AO, 0.075 γραμμάρια EPA και 0.075 γραμμάρια ALA. Η συνολική πρόσληψη ω-6 άλλαξε από 10.5 γραμμάρια (9.3 γραμμάρια ήταν LA) σε 21.735 γραμμάρια ανά ημέρα ενώ η συνολική πρόσληψη ω-3 άλλαξε από 1.5 γραμμάρια (1 γραμμάριο ήταν ALA) σε 1.65 γραμμάρια ανά ημέρα. Αυτό οδήγησε σε αλλαγή του λόγου ω-6:ω-3 από 7:1 σε 13.2:1. Η συνολική πρόσληψη λίπους παρέμεινε σταθερή στις δύο ομάδες. Λινέλαιο και καρδαμέλαιο χορηγήθηκαν από την εταιρία Savant International, UK. Τα έλαια λαμβάνονταν 3 φορές την ημέρα, μια κουταλιά του τσαγιού των 5ml με κάθε γεύμα. Η σύσταση των δύο ελαίων δίνεται στον πίνακα 1. Ο σχεδιασμός της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη επισκεφθήκαν την καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου μια φορά το μήνα όπου και τους χορηγήθηκαν τα έλαια. Οι συμμετέχοντες ζυγίστηκαν σε κάθε επίσκεψη και ερωτήθηκαν σχετικά με τις συνήθειες του καπνίσματος και της φυσικής δραστηριότητας.

Πίνακας 1
Σύσταση των δύο ελαίων ανά 100 γραμμάρια

	λινέλαιο	καρδαμέλαιο
Παλμιτικό οξύ (γρ.)	5.9	5.7
Στεαρικό οξύ (γρ.)	3.6	2.4
Αραχιδονικό οξύ (γρ.)	-	0.5
Ελαϊκό οξύ (γρ.)	18.2	11.5
Εικοσαπενταενοϊκό οξύ (γρ.)	-	0.5
Λινελαϊκό οξύ (γρ.)	13.9	74.4
α-λινολενικό οξύ (γρ.)	54.2	0.5
Ολικές στερόλες (γρ.)	0.4	0.4
Ολικές τοκοφερόλες (μγρ.)	54.27	48.21

2.3 Δίαιτες

Η διατροφική αξιολόγηση βασίσθηκε σε ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ώστε να καθοριστεί η δίαιτα των εθελοντών. Η συχνότητα κατανάλωσης γάλακτος, ψωμιού, φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, ελαιόλαδου, ψαριών και κρέατος καταγράφηκε μαζί με μια διατροφική ανάκληση 24ωρου. Η διατροφική πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τους εθελοντές κατά τη διάρκεια της μελέτης ελέγχθηκε μέσω ενός 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων για κάθε μήνα. Οι μέρες που καταγράφηκαν στο ημερολόγιο ήταν 2 καθημερινές και 1 ημέρα από το σαββατοκύριακο. Τα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος NUTRITIONIST V (Version 2.1 First Data Bank Inc. USA).

2.4 Συλλογή δειγμάτων αίματος και εργαστηριακές τεχνικές

Τα δείγματα αίματος συγκεντρώθηκαν στις 8 το πρωί μετά από 12ωρη νηστεία, στην αρχή και το τέλος της πειραματικής περιόδου. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και στους 4° C, εντός 2 ωρών από την αιμοληψία και αποθηκεύτηκαν στους -80° C για περαιτέρω ανάλυση.

Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL χοληστερόλης) στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με τη χρήση ενζυματικής χρωματογραφίας σε αυτοματοποιημένο αναλυτή ACE (Sciapparelli Biosystems Inc., USA). Η χοληστερόλη των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL χοληστερόλη) υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης του Friedewald [20].

Η ανάλυση των sICAM-1, sVCAM-1 και E-σελεκτίνης πραγματοποιήθηκε μέσω ποσοτικής ανοσοενζυμικής τεχνικής στερεής φάσης (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK). Η διακύμανση εντός και μεταξύ των αναλύσεων για τα sCAM ήταν <10%. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από ένα αναλυτή ο οποίος δεν γνώριζε το χρόνο λήψης του δείγματος και το είδος της διατροφικής παρέμβασης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο βιοχημικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα για το sICAM-1, το sVCAM-1 και την sE-σελεκτίνη τα οποία δεν είχαν κανονική κατανομή εκφράστηκαν με χρήση του διαμέσου. Οι διαφορές στα CAM εντός και μεταξύ των ομάδων αναλύθηκαν με ανάλυση Wilcoxon signed rank test και Mann-Whitney U-test, αντίστοιχα. Οι διαφορές για τις μεταβλητές που παρουσίασαν κανονική κατανομή αναλύθηκαν με την ανάλυση Student t-test. Οι δείκτες συσχέτισης του Pearson και του Spearman χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθεί η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στις μεταβλητές με κανονική κατανομή και σε αυτές με μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα. Οι συσχετίσεις μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών αναλύθηκαν με τη χρήση της μεθόδου εκτιμητριών των χ^2 . Τέλος, οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ALA και LA σε σχέση με τις τιμές του sVCAM-1 αξιολογήθηκαν με τη χρήση πολυπαραγοντικής ανάλυσης των διακυμάνσεων, μετά από έλεγχο για τη συνήθεια του καπνίσματος. Τιμές του $P < 0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος STATISTICA 2002, Έκδοση 6 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma).

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηριστικά κατά την έναρξη

Ογδόντα-τρεις από του 90 εθελοντές που εισαχθήκαν ολοκλήρωσαν τη μελέτη (πέντε εθελοντές εγκατέλειψαν από την ομάδα του ALA και δύο από την ομάδα του LA). Επιπλέον, πέντε εθελοντές (τρεις από την ομάδα του ALA και δύο από την ομάδα του LA) εμφάνισαν συγκέντρωση CRP μεγαλύτερη από 10mg/l σε μία από τις δύο αιμοληψίες, πιθανότατα λόγω λανθάνουσας φλεγμονής και αποκλείστηκαν από την ανάλυση. Πέρα από αυτό, δύο εθελοντές (της ομάδας ALA) αποκλείστηκαν από τη μελέτη λόγω έλλειψης των δειγμάτων ορού. Για το λόγο αυτό αναφέρουμε τα αποτελέσματα των 76 εθελοντών που παρέμειναν (50 της ομάδας ALA και 26 της ομάδας LA). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ALA και LA ως προς την ηλικία των εθελοντών (50.4 ± 7.3 έναντι 52 ± 7.7 , $P=0.33$). Επιπρόσθετα, το ποσοστό των καπνιστών (<10 τσιγάρα ανά ημέρα) ήταν παρόμοιο στις δύο ομάδες (24% έναντι 23%, $P=0.85$). Ο λόγος ω -6: ω -3 ήταν συγκρίσιμος στις δίαιτες των δύο ομάδων πριν τη χορήγηση των ελαίων (7.5:1 και

7:1) ενώ μετά τη χορήγηση οι λόγοι άλλαξαν σε 1.3:1 και 13.2:1 στις ομάδες ALA και LA, αντίστοιχα. Παρά τη χορήγηση των ελαίων, η πρόσληψη θερμίδων μέσω λίπους ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ανάμεσα στις ομάδες ALA και LA, σε όλη τη διάρκεια της μελέτης (Πίνακας 2). Το λιπιδαιμικό προφίλ και η sCAM κατά την έναρξη της μελέτης στις δύο ομάδες παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2

Μέση διατροφική πρόσληψη ενέργειας και θρεπτικών συστατικών για άτομα με δυσλιπιδαιμία σε δίαιτες εμπλουτισμένες με ALA και LA

Δίαιτα	Ομάδα ALA (μέσος $\pm$ T.A.)	Ομάδα LA (μέσος $\pm$ T.A.)	P-τιμή
Ενέργεια (Θερμ.)	2181.8 $\pm$ 243.1	2183.2 $\pm$ 237.6	0.638
Πρωτεΐνες %	15.1 $\pm$ 2.4	14.9 $\pm$ 2.2	0.564
Υδατάνθρακες %	47.7 $\pm$ 3.8	47.8 $\pm$ 4.2	0.613
Λίπη %	35.9 $\pm$ 4.1	35.9 $\pm$ 4.4	0.477
Κορεσμένα λίπη (γρ.)	22.8 $\pm$ 2.6	23.2 $\pm$ 2.8	0.518
Μονοακόρεστα λίπη (γρ.)	46.5 $\pm$ 4.3	46.6 $\pm$ 4.8	0.753
Πολυακόρεστα λίπη (γρ.)	11.9 $\pm$ 1.2	12.0 $\pm$ 1.4	0.687
α -λινολενικό οξύ (γρ.)	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.524
Λινελαϊκό οξύ (γρ.)	9.1 $\pm$ 1.2	9.3 $\pm$ 1.1	0.463
Χοληστερόλη (μγρ.)	216.4 $\pm$ 27.0	218.3 $\pm$ 30.6	0.449
Αλκοόλ %	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	0.524
Διαιτητικές ίνες (γρ.)	25.4 $\pm$ 3.0	25.2 $\pm$ 3.6	0.759

3.2 Λιπίδια και δείκτες φλεγμονής στον ορό μετά την διαιτητική παρέμβαση

Αναφορικά με τα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα, τα επίπεδα χοληστερόλης παρέμειναν αμετάβλητα στην ομάδα ALA, ενώ μειώθηκαν στην ομάδα LA ($P=0.04$) (Πίνακας 3). Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης μειώθηκαν στην ομάδα του ALA ($P=0.005$).

Τα επίπεδα του sVCAM-1 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση μετά την χορήγηση του ALA (Πίνακας 3). Η μείωση του διάμεσου ήταν 18.7%. Επιπρόσθετα, στην ομάδα του LA, τα επίπεδα του sVCAM-1 μειώθηκαν επίσης σημαντικά και η σχετική μείωση του διάμεσου ήταν 10.6%. Όταν συγκρίναμε τις δύο ομάδες δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα επίπεδα του sVCAM-1, μετά από έλεγχο για τις καπνιστικές συνήθειες των συμμετεχόντων ($P=0.205$).

Η μείωση του sVCAM-1 στις ομάδες του ALA και του LA ήταν ανεξάρτητη από τις αλλαγές των λιπιδίων καθώς δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις αλλαγές

του sVCAM-1 και τις αλλαγές στα λιπίδια στις αντίστοιχες ομάδες (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Πίνακας 3

Λιπιδαιμικό προφίλ, διαλυτά μόρια προσκόλλησης των κυττάρων (sCAM) και δείκτης μάζας σώματος (BMI) πριν και μετά τη χορήγηση ALA και LA

Μεταβλητές	Πριν	Μετά	P τιμή
Ομάδα ALA (n=50)			
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	232±34	226±36	0.27
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	155±84	163±87	0.16
HDL χοληστερόλη(mg/dl)	42.7±10.4	41±10.2	0.005
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	154±37	152±36	0.59
sVCAM-1 (ng/ml)	577.5 (530-655)	487 (437-521)	0.0001
sICAM-1 (ng/ml)	206 (177-236)	205 (182-248)	0.26
sE-σελεκτίνη (ng/ml)	44.6 (37-54)	42.7 (36-55)	0.25
BMI (kg/m ²)	28.42±3.44	28.40±3.44	0.25
Ομάδα LA (n=26)			
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	234±46*	218±46	0.04
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	173±113*	156±86	0.13
HDL χοληστερόλη(mg/dl)	39.2±7.4*	38.3±8	0.25
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	154±43*	149±44	0.36
sVCAM-1 (ng/ml)	550.5 (509-622)*	496 (450-554)	0.0001
sICAM-1 (ng/ml)	191 (181-219)*	200 (183-223)	0.18
sE-σελεκτίνη (ng/ml)	42.9 (39-53) *	42.8 (37-54)	0.65
BMI (kg/m ²)	28±3.19*	28±3.22	0.8

Οι τιμές για τα sCAM είναι διάμεσοι με το 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο.

LDL, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη; HDL, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη; sVCAM-1, διαλυτό μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1; sICAM-1, διαλυτό διακυττάριο μόριο προσκόλλησης-1; BMI, δείκτης μάζας σώματος.

* P=ΜΣ (λιπίδια, μόρια προσκόλλησης και BMI στην ομάδα LA έναντι των αντίστοιχων επιπέδων λιπιδίων, μόρια προσκόλλησης και BMI της ομάδας ALA)

4. Συζήτηση

Η μελέτη μας δείχνει ότι μια δίαιτα εμπλουτισμένη σε ALA για 12 εβδομάδες μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του sVCAM-1 σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς. Επιπρόσθετα, η συμπλήρωση της διαίτας με LA μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του sVCAM-1.

Καθώς προηγούμενες μελέτες [21,22] ανέφεραν ποικιλία επιδράσεων του καπνίσματος στα επίπεδα των sCAM (αύξηση του sICAM-1, καμία επίδραση στο sVCAM-1), επιλέξαμε να αποκλείσουμε από τη μελέτη άτομα που κάπνιζαν περισσότερα από 10 τσιγάρα ημερησίως με στόχο να περιορίσουμε την επίδραση του καπνίσματος. Παρά τη μικρή ποσότητα και την ίδια αναλογία καπνιστών ανάμεσα στις δύο ομάδες, πραγματοποιήσαμε μια επιπλέον πολυπαραγοντική ανάλυση στην

οποία περιλάβαμε τις συνήθειες καπνίσματος και διαπιστώσαμε ότι δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματα που βρέθηκαν μετά την ανάλυση και τα αποτελέσματα που παρουσιάζουμε εδώ.

Στη μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι ίδιες ποσότητες ALA και LA για τις ομάδες ALA και LA, αντίστοιχα. Η σκοπιμότητα του γεγονότος αυτού αφορά την επιδίωξη να μειώσουμε το λόγο ω -6: ω -3 σε ρεαλιστικά επίπεδα. Στόχος μας ήταν να μειώσουμε το λόγο ω -6: ω -3 στην ομάδα του ALA και να αυξήσουμε το λόγο ω -6: ω -3 στην ομάδα του LA. Έτσι, με τις ποσότητες των ALA και LA που επιλέξαμε επιτύχαμε ένα λόγο ω -6: ω -3 1.3:1 στην ομάδα του ALA και 13.2:1 στην ομάδα του LA. Επιπρόσθετα, οι χορηγούμενες ποσότητες ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν παρείχαν παρόμοια ποσότητα θερμίδων μέσω λίπους στις δύο ομάδες. Αυτό είναι σημαντικό καθώς οι διαφορές στην ολική πρόσληψη λίπους μπορούν να επηρεάζουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις [23].

Η προστατευτική δράση των τροφών που είναι πλούσιες σε ALA έχει αναφερθεί σε μελέτες τόσο πρωτογενούς όσο και δευτερογενούς πρόληψης της στεφανιαίας νόσου [17-19]. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με στόχο να εξηγηθεί ο προστατευτικός ρόλος του ALA οι οποίοι αφορούν την αντι-φλεγμονώδη δράση [16], την αντι-αρρυθμική δράση [24], τη βελτίωση της ανταπόκρισης των αρτηριών [25], τη μέτρια μείωση της αρτηριακής πίεσης [26] και την αντι-αιμοπεταλιακή δράση [27] του ALA.

Υπάρχει πλήθος αποδείξεων ότι η φλεγμονή έχει κεντρικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, καθώς όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης χαρακτηρίζονται από δυναμική αλληλεπίδραση των κυττάρων της φλεγμονής, των κυτταροκινών και των χημειοτακτικών παραγόντων που βρίσκονται εντός του αρτηριακού τοιχώματος [1]. Ένα από τα κυρίαρχα γεγονότα της έναρξης της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας είναι η προσκόλληση μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα η οποία έρχεται εις πέρας σε μεγάλο βαθμό από τα CAM. Η έκφραση των CAM είναι σχετικά χαμηλή στα φυσιολογικά αγγειακά κύτταρα ενώ αυξάνεται μετά από διάφορα ερεθίσματα όπως οι κυτταροκίνες και οι οξειδωτικοί παράγοντες. Τα sCAM προέρχονται από αποβολή ή πρωτεολυτική απόσχιση των μορίων που βρίσκονται στις μεμβράνες και μπορούν να αποτελέσουν δείκτες της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων [28]. Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει συσχέτιση των μορίων προσκόλλησης με την επακόλουθη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε υγιή άτομα ενώ υπάρχουν ενδείξεις για προγνωστική αξία των sCAM για τα οξέα στεφανιαία επεισόδια [9-14,29].

Στη μελέτη μας, τα επίπεδα sVCAM-1, όχι όμως και των sICAM-1 και E-σελεκτίνης, παρουσίασαν σημαντική μείωση μετά από χορήγηση ALA για χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρεται στα ευρήματα αυτά. Υπάρχει μικρός αριθμός μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των ιχθυελαίων στα CAM. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ιχθυέλαια είναι πιθανό να μην αναπαράγουν τις δράσεις του ALA. Ο Seljeflot και συνεργάτες [30] ανέφεραν ότι η χορήγηση ιχθυελαίων για 6 εβδομάδες αύξησε τα επίπεδα sVCAM-1 και sE-σελεκτίνης. Η υπόθεσή τους είναι ότι αυτή η δυσμενής επίδραση των ω-3 λιπαρών οξέων είναι πιθανό να σχετίζεται με την παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων οι οποίοι με τη σειρά τους είναι δυνατό να ενεργοποιούν τον πυρηνικό παράγοντα-κΒ (ΠΠ-κΒ) ο οποίος είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας. Μια άλλη μελέτη [31] αναφέρει μείωση των συγκεντρώσεων του sVCAM-1 μόνο στους άνδρες που ήταν μεγαλύτεροι από 55 ετών και όχι τους νεότερους άνδρες (<40 ετών) που έλαβαν συμπλήρωμα ιχθυελαίου για 12 εβδομάδες.

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου μειώνεται το sVCAM-1 μετά τη διατροφική χορήγηση ALA είναι άγνωστος. Σε προηγούμενη μελέτη [16], αναφέραμε ότι η συμπλήρωση της διαίτας με ALA μείωσε τα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών, όπως η CRP και η IL-6 στην ίδια ομάδα ασθενών. Έχει επίσης βρεθεί ότι η CRP μπορεί να προκαλέσει σημαντική έκφραση CAM στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα [32]. Έτσι, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η μείωση του CRP που προκλήθηκε από τη συμπλήρωση της διαίτας με ALA μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση CAM. Παρόλα αυτά, είναι πολύ πιθανό ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα επηρεάζουν τη φλεγμονώδη διαδικασία με ένα πιο πολύπλοκο τρόπο. Ο De Caterina και συνεργάτες [33] έδειξε ότι η προσθήκη DHA σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ανέστειλε την έκφραση VCAM-1 και E-σελεκτίνης που προκλήθηκε από κυτταροκίνες ή λιποπολυσακχαρίτες. Επιπλέον, ο Weber και συνεργάτες [34] έδειξε ότι το DHA ανέστειλε την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα ΠΠ-κΒ. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συμπλήρωση της διαίτας με ALA μειώνει τα επίπεδα του sVCAM-1 μέσω των μεταβολιτών του, όπως το DHA, που αναστέλλει την ενεργοποίηση του ΠΠ-κΒ, το μεταγραφικό παράγοντα που αποτελεί τον τελικό κοινό παρονομαστή της έκφρασης CAM.

Ένα ακόμη εύρημα της μελέτης μας ήταν η σημαντική μείωση του sVCAM-1 μετά τη συμπλήρωση της διαίτας με LA, αν και η μείωση αυτή ήταν μικρότερη σε σχέση με

το ALA. Το εύρημα αυτό ήταν σε ένα βαθμό μη αναμενόμενο, καθώς σε προηγούμενη μελέτη [16], δεν παρουσιάσαμε αντιφλεγμονώδη επίδραση της δίαιτας που ήταν πλούσια σε LA. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί [35,36] ότι σε πειράματα επώασης ενδοθηλιακών κυττάρων με ιντερλευκίνη-1α, ω-6 PUFA όπως το ΑΟ ανέστειλαν την έκφραση VCAM-1 αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα ω-3 ΠΟΛΑ. Έχει προταθεί ότι ο μεγαλύτερος αριθμός διπλών δεσμών των ω-3 PUFA σε σύγκριση με τα ω-6 PUFAs είναι καθοριστικός για την μεγαλύτερη ικανότητα στην αναστολή της ενεργοποίησης του ενδοθηλίου.

Σε ότι αφορά τα επίπεδα λιπιδίων του πλάσματος, παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων χοληστερόλης μετά τη συμπλήρωση της δίαιτας με LA και μια μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης μετά από τη χορήγηση ALA. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η χορήγηση LA οδηγεί στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, κάτι που δεν παρατηρείται μετά τη συμπλήρωση της δίαιτας με ALA. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που δείχνουν ότι οι δίαιτες που είναι εμπλουτισμένες σε ALA δεν έχουν υποχοληστερολαιμική δράση [37,38].

Η παρούσα μελέτη χαρακτηρίζεται από ορισμένους περιορισμούς οι οποίοι θα πρέπει να αναφερθούν. Πρώτα από όλα, εφαρμόσαμε μια παρέμβαση παράλληλου σχεδιασμού αντί για μια μελέτη διασταυρούμενων ομάδων η οποία είναι ισχυρότερη στην αποκάλυψη στατιστικών διαφορών. Η απόφασή μας οφείλεται στην πιθανότητα εμφάνισης του φαινομένου της παραμονής επιδράσεων από προηγούμενο χρονικό διάστημα καθώς η περίοδος «αποτοξίνωσης» που απαιτείται δεν μπορεί να προσδιορισθεί για μελέτες που αφορούν λιπίδια. Υπολογίζοντας μια ενδιάμεση περίοδο «αποτοξίνωσης» τουλάχιστον 2 μηνών, η συνολική διάρκεια της μελέτης θα έπρεπε να επιμηκυνθεί στους 8 μήνες. Ένας τέτοιος σχεδιασμός θα δημιουργούσε προβλήματα συμμόρφωσης των εθελοντών, συνυπολογίζοντας ότι η συμμόρφωση στον ελληνικό πληθυσμό είναι σχετικά χαμηλή. Δεύτερον, οι δόσεις των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων που χορηγήσαμε μέσω των συμπληρωμάτων που δόθηκαν στη μελέτη μας είναι δύσκολο να επιτευχθούν μέσω μιας συνήθους δίαιτας. Παρόλα αυτά, προϊόντα όπως μαργαρίνες εμπλουτισμένες με τα κατάλληλα λιπαρά οξέα μπορούν να παραχθούν από τη σχετική βιομηχανία. Οι μαργαρίνες αυτές μπορούν να αντικαταστήσουν άλλες πηγές πρόσληψης λίπους στη δίαιτα υπερλιπιδαιμικών ασθενών.

Συμπερασματικά, η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA μειώνει τα επίπεδα του sVCAM-1 σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς. Αυτή η επίδραση είναι πιθανό να

αντικατοπτρίζει ένα πιθανό αντιαθηρογόνο μηχανισμό που συμβάλλει στην ευεργετική επίδραση των ω -3 PUFAs φυτικής προέλευσης στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου. Επιπρόσθετα, η συμπλήρωση της διαίτας με LA μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του sVCAM-1. Η ευεργετική επίδραση των δύο συμπληρωμάτων στα επίπεδα του sVCAM-1 δείχνει ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση ώστε να βελτιστοποιηθεί ο λόγος ω -6: ω -3 της διαίτας που παρέχει την καλύτερη επίδραση στους φλεγμονώδεις δείκτες δυσλιπιδαιμικών ασθενών.

Αναφορές

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- [2] Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.
- [3] Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107:85–97.
- [4] Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules. Part 1. *N Engl J Med* 1996;334:1526–9.
- [5] Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866–73.
- [6] Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Tidey RR. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in atherosclerotic plaques: implications for positive feedback monocyte recruitment in the pathogenesis of the plaque. *Am J Pathol* 1992;140:665–73.
- [7] Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223–9.
- [8] Nageh MF, Sandberg ET, Marotti RK. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1517–20.
- [9] Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J* 2002;23:1569–74.

- [10] Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, et al. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88–92.
- [11] Malik I, Danesh J, Whincup P, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* 2001;358:971–6.
- [12] Haim M, Tanne D, Boyko V, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease: data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1133–8.
- [13] de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:423–6.
- [14] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:1336–42.
- [15] Chavali SR, Zhong WW, Forse RA. Dietary α -linolenic acid increases TNF- α , and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS: effects of sesamin on the δ -5 desaturation of ω 6 and ω 3 fatty acids in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998;58:185–91.
- [16] Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, Velissaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A. Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 2003;167:237–42.
- [17] Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996;313:84–90.
- [18] Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:890–7.
- [19] De Lorgenil M, Renaud S, Mamelle N, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994;343:1454–9.
- [20] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.

- [21] Blann AD, Steele C, McCollum CN. The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thromb Res* 1997;85:433–8.
- [22] Takeuchi N, Kawamura T, Kanai A, et al. The effect of cigarette smoking on soluble adhesion molecules in middle-aged patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2002;19:57–64.
- [23] Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669–73.
- [24] Kang JX, Leaf A. Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;71:202–7.
- [25] Nestel PJ, Pomeroy SE, Sasahara T, et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n.3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1163–70.
- [26] Bemelmans WJE, Muskiet FAJ, Feskens EJM, et al. Associations of alpha-linolenic acid and linoleic acid with risk factors for coronary heart disease. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:865–71.
- [27] Lanzmann-Petithory D. Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging* 2001;5:179–83.
- [28] Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993;14:506–12.
- [29] Rallidis LS, Gika HI, Zolindaki MG, Xydas TA, Paravolidakis KE, Velissaridou AH. Usefulness of elevated levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in predicting in-hospital prognosis in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2003;92:1195–7.
- [30] Seljeflot I, Arnesen H, Brude IR, Nenseter MS, Drevon CA, Hjermann I. Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest* 1998;28:629–35.
- [31] Miles EA, Thies F, Wallace FA, et al. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clin Sci* 2001;100:91–100.
- [32] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165–8.
- [33] De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone Jr MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of pro-atherogenic and pro-inflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1829–36.

- [34] Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber P. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:622–8.
- [35] De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000;71:213–23.
- [36] De Caterina R, Bernini W, Carluccio MA, Liao JK, Libby P. Structural requirements for inhibition of cytokine-induced endothelial activation by unsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 1998;39:1062–70.
- [37] Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998;80:163–7.
- [38] Sanderson P, Finnegan YE, Williams CM, et al. UK Food Standards Agency α -linolenic acid workshop report. *Br J Nutr* 2002;88:573–9.

Κεφάλαιο 7. Δημοσίευση 3

Η διαίτα επηρεάζει την αντι-φλεγμονώδη δράση του α-λινολενικού οξέος σε δυσλιπιδαιμικούς

Περίληψη

Τα μακράς αλύσου ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που προέρχονται από ιχθυέλαια είναι γνωστό ότι κατέχουν αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Εξετάσαμε την επίδραση του α-λινολενικού οξέος (ALA), πρόδρομο των μακράς αλύσου ω-3 λιπαρών οξέων, στα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών και διαλυτών μορίων προσκόλλησης των κυττάρων (sCAM) στον ορό δυσλιπιδαιμικών ανδρών, σε σχέση με τη διαίτά τους. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη κατανεμηθήκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τις διατροφικές τους συνήθειες: *A*: εικοσιένα δυσλιπιδαιμικά άτομα που ακολουθούν μια Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαίτα και *B*: δεκαεννέα δυσλιπιδαιμικά άτομα που ακολουθούσαν ένα δυτικοποιημένο ελληνικό διαιτολόγιο. Όλοι οι εθελοντές έλαβαν συμπλήρωμα 8.1 γραμμαρίων ALA ημερησίως για 12 εβδομάδες. Προσδιορίσαμε τις συγκεντρώσεις του αμυλοειδούς A του ορού (SAA) της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), του παράγοντα ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων (M-CSF), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του διαλυτού μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (sVCAM-1), του διαλυτού διακυττάρου μορίου προσκόλλησης-1 (sICAM-1) και της διαλυτής E-σελεκτίνης στην αρχή και το τέλος της περιόδου χορήγησης του ALA. Οι συγκεντρώσεις κατά την έναρξη των φλεγμονωδών δεικτών και των sCAM ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες με τις διαφορετικές δίαιτες. Το είδος της διαίτας είχε σημαντική επίδραση στην ανταπόκριση των φλεγμονωδών δεικτών στη χορήγηση ALA. Συγκεκριμένα, η ομάδα που ακολουθούσε τη δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα παρουσίασε σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων του SAA ($P < 0.001$), της CRP ($P = 0.002$), του M-CSF ($P = 0.005$) και της IL-6 ($P = 0.04$). Η ομάδα που ακολουθούσε το Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολόγιο παρουσίασε σημαντική μείωση μόνο των συγκεντρώσεων του M-CSF ($P = 0.003$). Οι συγκεντρώσεις του sVCAM-1 μειώθηκαν σημαντικά τόσο στην ομάδα που ακολουθούσε το δυτικοποιημένο ελληνικό διαιτολόγιο ($P = 0.001$) όσο και στην ομάδα που ακολουθούσε το Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολόγιο, ($P = < 0.001$). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση ALA μείωσε σε μεγαλύτερη έκταση τα επίπεδα των φλεγμονωδών

δεικτών στον ορό όταν η δίαιτα ήταν πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και φτωχή σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

Εισαγωγή

Η κατανάλωση διαίτων πλούσιων σε ω-3 λιπαρά οξέα έχει συνδεθεί με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης (Ascherio *et al.* 1995). Επιπλέον, τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία διαφόρων χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων και τα αποτελέσματα τους προσδίδουν αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες (Calder, 2001). Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των φλεγμονωδών γεγονότων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η προσκόλληση των μονοκυττάρων της κυκλοφορίας στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η επακόλουθη διείσδυση τους διαμέσω του αγγειακού ενδοθηλίου αποτελούν απαραίτητα στάδια στην παθογένεση της νόσου (Ross, 1999). Έχει προταθεί ότι οι αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες των ω-3 λιπαρών οξέων εξηγούν δυνητικά τη συσχέτισή τους με τη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης (Calder, 2001). Παρόλα αυτά, άλλες μελέτες σε ανθρώπους δεν επιβεβαιώνουν τις αντι-φλεγμονώδεις δράσεις των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν διάφορα αποτελέσματα όταν εξέτασαν την επίδραση των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην παραγωγή κυτταροκινών από μονοκύτταρα. Μελέτες συμπλήρωσης της διαίτας με εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA) έδειξαν μείωση της σύνθεσης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α), της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) από τα μονοκύτταρα υγιών εθελοντών (Endres *et al.* 1989; Meydani *et al.* 1991; Caughey *et al.* 1996). Αντίθετα, άλλες μελέτες εμφανίζουν έλλειψη επίδρασης των ω-3 PUFAs στη σύνθεση των ίδιων κυτταροκινών (Schmidt *et al.* 1996; Blok *et al.* 1997; Yaqoob *et al.* 2000). Η επίδραση του α-λινολενικού οξέος (ALA), του πρόδρομου των EPA και DHA, στους φλεγμονώδεις δείκτες είναι επίσης αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα, από τη μια μεριά έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή TNF-α και IL-1β από μονοκύτταρα υγιών εθελοντών που διεγέρθηκαν με λιποπολυσακχαρίτη μειώθηκε μετά από υψηλή δόση διαιτητικού ALA (Caughey *et al.* 1996).

Επιπρόσθετα, σε προηγούμενη μας μελέτη (Rallidis *et al.* 2003) η χορήγηση ALA μείωσε τις συγκεντρώσεις IL-6 και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) στον ορό. Από την άλλη μεριά, άλλες μελέτες έδειξαν ότι το ALA δεν επηρέασε την παραγωγή TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 ή ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) από μονοκύτταρα (Thies *et al.* 2001). Πρόσφατα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η πρόσληψη ≤ 9.5 γραμμαρίων ALA/ημέρα ή ≤ 1.7 γραμμάρια EPA+DHA/ημέρα δεν διαφοροποιούν την παραγωγή κυτταροκινών από μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα παρόλο που η σύνθεση των μονοκύτταρων σε λιπαρά οξέα άλλαξε σε σημαντικό βαθμό (Kew *et al.* 2003).

Ένας αριθμός *in vitro* μελετών υποδεικνύει μια κατασταλτική επίδραση των ω -3 λιπαρών οξέων στην έκφραση μορίων προσκόλλησης στα κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων (De Caterina *et al.* 1994; Weber *et al.* 1995; Khalfoun *et al.* 1996; Collie-Duguid & Wahle, 1996). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα μελετών που χορήγησαν συμπληρώματα σε ανθρώπους είναι αντικρουόμενα. Κάποιες από τις μελέτες αυτές έδειξαν ότι EPA συν DHA μείωσαν τις συγκεντρώσεις διαλυτών μορφών των μορίων προσκόλλησης στο πλάσμα (Abe *et al.* 1998; Thies *et al.* 2001), ενώ άλλες αναφέρουν το αντίθετο (Seljeflot *et al.* 1998; Johansen *et al.* 1999).

Τα αποτελέσματα μελετών της επίδρασης ιχθυελαίου στις συγκεντρώσεις CRP στο πλάσμα είναι επίσης αντικρουόμενα. Παρόλο που έχει βρεθεί μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση της CRP και του περιεχομένου των κοκκιοκυττάρων σε DHA (Madsen *et al.* 2001), μια πρόσφατη μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα απέτυχε να επαληθεύσει αυτό το εύρημα (Madsen *et al.* 2003). Κατά αντιστοιχία, η χορήγηση ω -3 PUFAs σε υγιείς εθελοντές δεν διαφοροποίησε τα επίπεδα της CRP στο πλάσμα (Vega-Lopez *et al.* 2004).

Ενδείξεις από το 1950 υπέδειξαν ότι οι χώρες της Μεσογείου βρίσκονται μεταξύ των χωρών με τις χαμηλότερες συχνότητες εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων με τους αντίστοιχους δείκτες προσδόκιμου επιβίωσης να είναι μεταξύ των υψηλότερων (Nestle, 1995). Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον ελληνικό πληθυσμό, η υιοθέτηση ενός διαιτολογίου Μεσογειακού τύπου από άτομα με μεταβολικό σύνδρομο σχετίστηκε με σημαντική μείωση του κινδύνου ανάπτυξης οξέων στεφανιαίων επεισοδίων (Pitsavos *et al.* 2003).

Ο στόχος μας ήταν να εξετάσουμε την επίδραση του ALA της διατροφής στα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών και διαλυτών μορφών μορίων προσκόλλησης (sCAM) που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση σε συνάρτηση με το είδος της δίαιτας. Για το

σκοπό αυτό, συγκεντρώσαμε εθελοντές που ακολουθούσαν είτε ένα διαιτολόγιο Μεσογειακού/Κρητικού τύπου ή μια δυτικοποιημένη ελληνική δίαιτα.

Εθελοντές και μέθοδοι

Εθελοντές

Οι εθελοντές της μελέτης συγκεντρώθηκαν από τη μονάδα της δοκιμασίας κοπώσεως στην καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου μετά από αξιολόγηση του ιατρικού τους ιστορικού, φυσική εξέταση, ηλεκτροκαρδιογράφημα και εργαστηριακές αναλύσεις. Συγκεντρώθηκαν πενήντα άνδρες εθελοντές ηλικίας 35 με 67 έτη, με διάγνωση δυσλιπιδαιμίας, χωρίς ένδειξη στεφανιαίας νόσου (CHD). Τα κριτήρια επιλογής περιλάμβαναν επίπεδα ολικής χοληστερόλης υψηλότερα από 5.20 mmol/L, και/ή HDL χοληστερόλης χαμηλότερα από 1.03 mmol/L. Άτομα με ένδειξη λοίμωξης ή συνυπάρχοντος σακχαρώδους διαβήτη, υπέρτασης, νεφρικής, ηπατικής ή φλεγμονώδους νόσου αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Επίσης αποκλείστηκαν, άτομα σε υπολιπιδαιμική αγωγή, συνήθη κατανάλωση 30 μονάδων αλκοόλ ανά εβδομάδα, κάπνισμα περισσότερων από 10 τσιγάρων την ημέρα, ή συνήθη έντονη άσκηση για περισσότερο από 6 ώρες την εβδομάδα. Από τους πενήντα άνδρες που εγγράφηκαν, ένας εγκατέλειψε πριν την ολοκλήρωση της μελέτης λόγω γαστρεντερικής δυσφορίας. Άλλα εννέα άτομα είτε εγκατέλειψαν είτε αποκλείστηκαν από τη μελέτη καθώς δεν συμμορφώθηκαν με το πρωτόκολλο στη διάρκεια των 12 εβδομάδων. Έτσι, σαράντα άτομα ολοκλήρωσαν τη μελέτη.

Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη μας ήταν μια μελέτη μονής παρέμβασης με παράλληλο σχεδιασμό. Πριν την παρέμβαση πραγματοποιήθηκε διατροφική αξιολόγηση ώστε να κατανεμηθούν οι εθελοντές σε δύο ομάδες ανάλογα με τη δίαιτά τους. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από άτομα που ακολουθούσαν μια δίαιτα με χαρακτηριστικά της ονομαζόμενης Μεσογειακής/Κρητικής διαίτας όπως αυτή περιγράφηκε στη μελέτη των επτά χωρών (Kafatos *et al.* 2000) (n 21). Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από άτομα που ακολουθούσαν μια δυτικοποιημένη ελληνική δίαιτα (n 19).

Όλοι οι εθελοντές έλαβαν 15ml λινελαίου/ημέρα για 12 εβδομάδες. Το έλαιο περιλάμβανε περίπου 8 γραμμάρια ALA (ω -3) και λαμβανόταν 3 φορές την ημέρα, μια κουταλιά του τσαγιού των 5ml με κάθε γεύμα. Ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες και το συνήθη τρόπο ζωής τους και τους συστήθηκε να αποφύγουν τη λήψη αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων, βιταμινών ή άλλων συμπληρωμάτων διατροφής κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι εθελοντές επιβλέφθηκαν σε ότι αφορά τις διατροφικές τους συνήθειες, την κατανάλωση αλκοόλ και τη φυσική τους δραστηριότητα μέσω τηλεφωνικών κλήσεων μια φορά την εβδομάδα και μέσω των επισκέψεων στο νοσοκομείο. Τα άτομα ζυγίστηκαν μια φορά το μήνα. Κατά τη διάρκεια των επισκέψεων στο νοσοκομείο χορηγήθηκαν τα έλαια. Το ύψος και το βάρος μετρήθηκε με τους εθελοντές σε ελαφρύ ρουχισμό και μετά από αφαίρεση των παπουτσιών. Το λινέλαιο χορηγήθηκε από την εταιρία Savant International, UK. Η εξαγωγή του λινελαίου έγινε μέσω ψυχρής πίεσης κάτω από N_2 . Η αποθήκευση του έγινε σε σκουρόχρωμα μπουκάλια στους 4° C. Δεν προστέθηκαν αντιοξειδωτικά στο έλαιο. Η σύνθεση του ελαίου σε λιπαρά οξέα δίνεται στον πίνακα 1. Οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στη μελέτη ενώ το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Πίνακας 1. Σύνθεση του λινελαίου σε λιπαρά οξέα, ολικές στερόλες και ολικές τοκοφερόλες (ανά 100 γραμμάρια).

<i>Συστατικά</i>	
Παλμιτικό οξύ (γρ.)	5·9
Στεαρικό οξύ (γρ.)	3·6
Ελαϊκό οξύ (γρ.)	18·2
Λινελαϊκό οξύ (γρ.)	13·9
α -λινολενικό οξύ (γρ.)	54·2
Ολικές στερόλες (γρ.)	0·4
Ολικές τοκοφερόλες (μγρ.)	54·27

Δίαιτες

Η διατροφική αξιολόγηση βασίσθηκε σε πιστοποιημένο ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων που περιλάμβανε τρόφιμα της Μεσογειακής πυραμίδας (Trichopoulou, 2000). Η συχνότητα κατανάλωσης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, ψωμιού, φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, ελαιόλαδου, ψαριών,

πουλερικών, κόκκινου κρέατος και προϊόντων κρέατος καθώς και κρασιού καταγράφηκε ενώ υπολογίστηκε το σκορ μηνιαίας κατανάλωσης τροφίμων. Η σύνθεση της δίαιτας των δύο ομάδων σε θρεπτικά συστατικά παρουσιάζεται στον πίνακα 2. Η διατροφική πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ελέγχθηκε μέσω τριών 4ήμερων ημερολογίων καταγραφής τροφίμων (ένα για κάθε 4 εβδομάδες). Οι μέρες που καταγράφηκαν στο ημερολόγιο ήταν 3 καθημερινές και 1 ημέρα από το σαββατοκύριακο. Τα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος NUTRITIONIST V (Version 2.1 First Data Bank Inc. USA) όπως αυτό τροποποιήθηκε για τον ελληνικό πληθυσμό (Yannakoulia *et al.* 2003).

Εργαστηριακές τεχνικές

Οι εθελοντές προσήλθαν στην καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου σε δύο περιπτώσεις για τη συλλογή αίματος, στην αρχή και το τέλος της μελέτης. Σε κάθε επίσκεψη τα δείγματα αίματος συγκεντρώθηκαν στις 8 το πρωί μετά από 12ωρη νηστεία των εθελοντών. Η συλλογή του αίματος έγινε σε γυάλινα σωληνάρια χωρίς μέσο συντήρησης (Vacutainer tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) για τον προσδιορισμό των φλεγμονωδών δεικτών του ορού. Όλες οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν χωρίς αποκλεισμό της φλέβας. Τα σωληνάρια συλλογής του αίματος διατηρήθηκαν σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και στους 4° C, εντός 2 ωρών από την αιμοληψία. Τα δείγματα του ορού αποθηκεύτηκαν στους -80° C για περαιτέρω ανάλυση. Τα επίπεδα CRP και αμυλοειδούς A του ορού προσδιορίστηκαν με τη χρήση υψηλής ευαισθησίας ανοσονεφελομετρίας ενισχυόμενης μέσω σωματιδίων (N Latex, Date-Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) με εύρος προσδιορισμού από 0.175 έως 1100 mg/l και 0.75 έως 1000 mg/l, αντίστοιχα. Η IL-6 και ο M-CSF προσδιορίστηκε μέσω ανοσοενζυμικής τεχνικής στερεής φάσης (ELISA) (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK). Η διακύμανση εντός και μεταξύ των αναλύσεων για CRP, SAA και M-CSF ήταν <5% και για την IL-6 <10%. Το διαλυτό μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1, το διαλυτό διακυττάριο μόριο προσκόλλησης-1 και η διαλυτή E-σελεκτίνη αναλύθηκαν μέσω ποσοτικής ELISA (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK). Η διακύμανση εντός και μεταξύ των αναλύσεων για τα CAM ήταν <10%. Όλες οι αναλύσεις

πραγματοποιήθηκαν δύο φορές από ένα αναλυτή ο οποίος δεν γνώριζε το χρόνο λήψης του δείγματος και το είδος της διαίτας. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο βιοχημικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας.

Πίνακας 2. Σύνθεση των δύο διαίτων σε θρεπτικά συστατικά.

<i>Δίαιτα:</i>	Μεσογειακού/ Κρητικού τύπου δίαιτα	Δυτικοποιημένη ελληνική δίαιτα	<i>P-τιμή</i>
	Μέσος (ΤΑ)	Μέσος (ΤΑ)	
Ενέργεια (joules)	9169·86 (1118·46)	9154·32 (959·28)	0·348
Πρωτεΐνες %	13·2 (3·1)	16·0 (1·8)	0·009
Υδατάνθρακες %	47·8 (3·8)	44·4 (4·4)	0·007
Λίπη %	37·7 (4·8)	38·2 (4·2)	0·467
SFAs (γρ.)	22·3 (2·5)	38·6 (3·2)	0·018
MUFAs (γρ.)	49·5 (5·8)	32·6 (4·9)	0·034
PUFAs (γρ.)	13·7 (2·0)	12·1 (1·7)	0·171
α-λινολενικό οξύ (γρ.)	0·9 (0·3)	1·1 (0·2)	0·215
EPA (γρ.)	0·3 (0·05)	0·3 (0·08)	0·249
DHA (γρ.)	0·4 (0·04)	0·3 (0·05)	0·311
Χοληστερόλη (μγρ.)	214·8 (24·4)	370·1 (31·0)	0·004
Αλκοόλ %	1·3 (0·3)	1·4 (0·4)	0·741
Βιταμίνη C (μγρ.)	122·4 (13·0)	117·8 (18·4)	0·002
Διαιτητικές ίνες (γρ.)	26·7 (3·3)	22·4 (4·1)	0·021

SFAs, κορεσμένα λιπαρά οξέα; MUFAs, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα; PUFAs, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα; EPA, εικοσαπενταενοϊκό οξύ; DHA, δοκοσαεξαενοϊκό οξύ.

Στατιστική ανάλυση

Τα κλινικά και διαιτητικά χαρακτηριστικά εκφράστηκαν με τη χρήση του μέσου και της τυπικής απόκλισης εκτός εάν δηλώνεται το αντίθετο. Τα δεδομένα για τους φλεγμονώδεις δείκτες και τα μόρια προσκόλλησης δεν είχαν κανονική κατανομή και εκφράστηκαν με χρήση του διαμέσου και των 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου. Οι διαφορές των κλινικών και διατροφικών χαρακτηριστικών κατά την έναρξη της μελέτης ανάμεσα στις ομάδες με τις διαφορετικές δίαιτες αναλύθηκαν με την ανάλυση ανεξάρτητων δειγμάτων Student t-test (μετά από λογαριθμική μετατροπή), με την εξαίρεση του καπνίσματος για το οποίο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος

εκτιμητριών των χ^2 . Καθώς τα δεδομένα για τις συγκεντρώσεις δεικτών φλεγμονής και sCAM δεν είχαν κανονική κατανομή ακόμη και μετά την λογαριθμική τροποποίηση των τιμών, ο προσδιορισμός των διαφορών κατά την έναρξη και πριν και μετά τη χορήγηση ALA έγινε με μη παραμετρικές αναλύσεις (Mann-Whitney U-test και Wilcoxon signed rank test, αντίστοιχα). Η ανάλυση Mann-Whitney U-test χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη σύγκριση των ποσοστιαίων διαφορών των συγκεντρώσεων των δεικτών φλεγμονής και sCAM πριν και μετά την περίοδο χορήγησης ALA ανάμεσα στις ομάδες με τις διαφορετικές δίαιτες. Η ποσοστιαία διαφορά υπολογίστηκε ως ο διάμεσος των ποσοστιαίων διαφορών των εξατομικευμένων τιμών. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο $P < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS for Windows, version 10.0.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Αποτελέσματα

Χαρακτηριστικά κατά την έναρξη

Οι εθελοντές που εγγράφηκαν στις δύο ομάδες δεν διέφεραν ως προς την ηλικία, το BMI, την αρτηριακή πίεση και τον αριθμό κοκκιοκυττάρων, λεμφοκυττάρων ή μονοκυττάρων-κοκκιοκυττάρων. Ο αριθμός καπνιστών (λιγότερα από δέκα τσιγάρα ανά ημέρα) ήταν παρόμοιος στις δύο ομάδες (Πίνακας 3).

Το σωματικό βάρος και ο αριθμός λευκοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων-κοκκιοκυττάρων δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά κατά τη διάρκεια της μελέτης. Η ανασκόπηση των ημερολογίων καταγραφής τροφίμων έδειξε ότι η δίαιτα των εθελοντών παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Δείκτες φλεγμονής στο αίμα

Οι διάμεσοι των τιμών SAA, CRP, M-CSF και IL-6 των δύο ομάδων, πριν και μετά των χορήγηση ALA παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Ο μόνος δείκτης φλεγμονής που παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση και στις δύο ομάδες μετά τη χορήγηση ALA ήταν ο M-CSF, ενώ CRP, SAA και IL-6 μειώθηκαν σημαντικά μόνο στην ομάδα που ακολουθούσε την δυτικοποιημένη ελληνική δίαιτα. Η διαφορά στην

ανταπόκριση των δεικτών φλεγμονής στη χορήγηση του ALA στις δύο ομάδες επιβεβαιώθηκε μέσω της σύγκρισης των ποσοστιαίων διαφορών εντός κάθε ενός από τις δύο ομάδες (Εικόνα 1). Οι ποσοστιαίες αλλαγές του SAA και της CRP στην ομάδα που ακολουθούσε τη δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα ήταν σημαντικά

Πίνακας 3. Κλινικά δεδομένα των ομάδων που ακολουθούσαν τις δύο διαφορετικές δίαιτες.

<i>Μεταβλητές</i>	Μεσογειακού/ Κρητικού τύπου διαίτα	Δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα	<i>P-τιμή</i>
	(n=21)	(n=19)	
Ηλικία (έτη)	50·2 (6·3)	48·7 (8·3)	ΜΣ
BMI (κιά/μ ²)	28·6 (3·6)	27·8 (3·6)	ΜΣ
ΛΚ (x10 ³)	6·4 (1·6)	7·3 (1·9)	ΜΣ
Λεμφοκύτταρα (x10 ³)	2·2 (0·9)	2·3 (0·7)	ΜΣ
Μονοκύτταρα & Κοκκιοκύτταρα (x10 ³)	4·3 (1·0)	5·0 (1·7)	ΜΣ
Αρτηριακή πίεση			
Συστολική	126·6 (16)	125·6 (16·7)	ΜΣ
Διαστολική	80·8 (11)	80·2 (11)	ΜΣ
Καπνιστές (ναι/όχι)	4/17	4/15	ΜΣ

Οι τιμές των χαρακτηριστικών κατά την έναρξη είναι οι μέσοι με τις τυπικές τους αποκλίσεις (ΤΑ) στις παρενθέσεις, με την εξαίρεση των καπνιστών όπου οι τιμές αφορούν αριθμό εθελοντών.

BMI, δείκτης μάζας σώματος; ΛΚ, λευκοκύτταρα; ΜΣ, μη σημαντικό.

διαφορετικές από τις αλλαγές στην ομάδα που ακολουθούσε το Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολόγιο ($P=0·005$ και $P=0·038$, αντίστοιχα). Καμιά σημαντική συσχέτιση δεν βρέθηκε ανάμεσα στη χοληστερόλη της διαίτας, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFAs), τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs) και τα PUFAς με τους δείκτες φλεγμονής που εξετάστηκαν σε καμιά από τις δύο ομάδες. Επιπρόσθετα, η συσχέτιση ανάμεσα στη βιταμίνη C της διαίτας και τους δείκτες φλεγμονής δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Διαλυτές μορφές μορίων προσκόλλησης των κυττάρων

Τα επίπεδα του sVCAM-1 μειώθηκαν σημαντικά με τη χορήγηση ALA και στις δύο ομάδες ($P<0·001$ στην ομάδα που ακολουθούσε το Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολόγιο και $P=0·001$ στην ομάδα που ακολουθούσε το δυτικοποιημένο ελληνικό

διαιτολόγιο). Τα επίπεδα του sICAM-1 και της sE-σελεκτίνης παρέμειναν αδιαφοροποίητα και στις δύο ομάδες (Πίνακας 5).

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις φλεγμονωδών δεικτών στον ορό δυσλιπιδαιμικών ασθενών που ακολουθούν δύο διαφορετικές δίαιτες, πριν και μετά την χορήγηση α-λινολενικού οξέος.

Μεταβλητές	Πριν	Μετά	% Δ*	P-τιμή
Ομάδα Μεσογειακού/ Κρητικού διαιτολογίου (n=21)				
SAA (mg/L)	2.51 (2.20-4.5)	2.40 (1.70-3.00)	-3.6	0.16
CRP (mg/L)	0.96 (0.54-1.82)	0.99 (0.56-2.10)	2.0	0.51
M-CSF (pg/mL)	283 (257-309)	258 (226-292)	-15.0	0.006
IL-6 (pg/mL)	2.0 (1.12-3.15)	1.66 (0.99-2.13)	-4.5	0.08
Ομάδα δυτικοποιημένης ελληνικής διαίτας (n=19)				
SAA (mg/L)	3.65 (2.5-5.8)†	2.38 (1.39-3.40)	-36.4	0.0002
CRP (mg/L)	1.8 (1.19-4.4)†	1.10 (0.59-1.60)	-36.1	0.002
M-CSF (pg/mL)	279 (237-328)†	232.0 (195-284.0)	-21.9	0.005
IL-6 (pg/mL)	2.28 (1.34-4.80)†	1.70 (1.26-2.40)	-7.9	0.03

Οι τιμές είναι διάμεσοι με το 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο.

SAA, αμυλοειδές Α του ορού; CRP, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη; M-CSF, παράγοντας ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων; IL-6, ιντερλευκίνη-6.

* % Δ: διάμεσος ποσοστιαίων διαφορών πριν και μετά $[(v2-v1)/v1]$

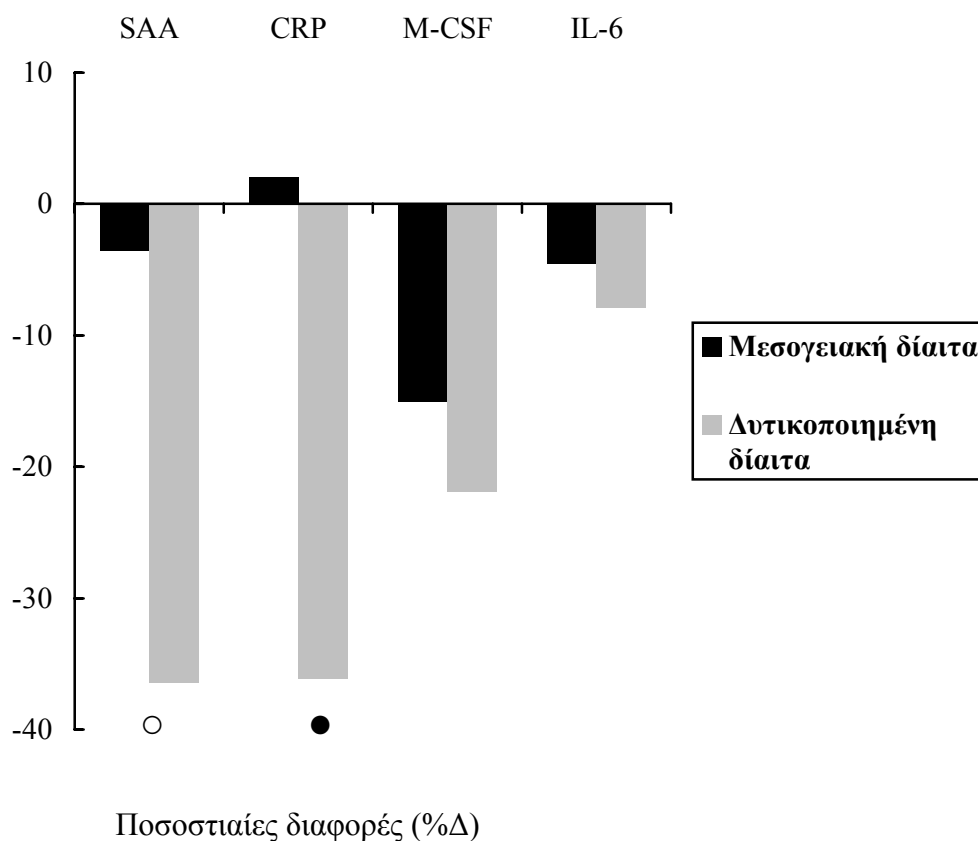
†P=MΣ (φλεγμονώδεις δείκτες της ομάδας Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολογίου έναντι των αντίστοιχων φλεγμονωδών δεικτών της ομάδας δυτικοποιημένου ελληνικού διαιτολογίου)

Συζήτηση

Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν ότι η αυξημένη διαιτητική πρόσληψη ALA για 3 μήνες ήταν ικανή να μειώσει στις συγκεντρώσεις φλεγμονωδών δεικτών και διαλυτής μορφής του μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς. Η επίδραση αυτή ήταν περισσότερο ισχυρή στην ομάδα που ακολουθούσε τη δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα σε σύγκριση με την ομάδα που ακολουθούσε το Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολόγιο.

Η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ήταν διαφορετική στις δύο ομάδες. Η ομάδα που ακολουθούσε τη δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα εμφάνισε υψηλότερη πρόσληψη

Εικόνα 1. Ποσοστιαίες διαφορές των συγκεντρώσεων των φλεγμονωδών δεικτών μετά την χορήγηση α-λινολενικού οξέος για τις δυο διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το διαιτολόγιο. ○Σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες $P<0.05$; ●Σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες $P<0.01$. Η σύγκριση των ποσοστιαίων διαφορών πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση Mann-Whitney U-test. % Δ: διάμεσος ποσοστιαίων διαφορών πριν και μετά $[(v2-v1)/v1]$



πρωτεϊνών, ενώ η πρόσληψη υδατανθράκων ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα που ακολουθούσε το Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολόγιο. Η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων και χοληστερόλης ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα της δυτικοποιημένης ελληνικής διαίτας σε σχέση με την ομάδα του Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολογίου. Περίπου το 16% της συνολικής ενέργειας στην ομάδα της δυτικοποιημένης ελληνικής διαίτας προήλθε από κορεσμένα λιπαρά οξέα, μια πρόσληψη που μπορεί να θεωρηθεί υψηλή σε σύγκριση με τις συστάσεις του αμερικάνικου οργανισμού για την καρδιά (Adult Treatment Panel III, 2001). Από την άλλη μεριά, η ομάδα του Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολογίου παρουσίασε αυξημένη πρόσληψη MUFAs, βιταμίνης C και φυτικών ινών. Οι προσλήψεις αυτές είναι σε συμφωνία με το βασικό ορισμό της Μεσογειακής/Κρητικής διαίτας (Kafatos *et al.* 2000) και του «Δυτικοποιημένου» διαιτητικού προφίλ (Lewis *et al.* 1981), αντίστοιχα.

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις διαλυτών μορίων προσκόλλησης των κυττάρων σε δυσλιπιδαιμικούς εθελοντές που ακολουθούσαν δύο διαφορετικά είδη διαιτολογίου, πριν και μετά τη χορήγηση α-λινολενικού οξέος.

Μεταβλητές	Πριν	Μετά	% Δ*	P-τιμή
Ομάδα Μεσογειακού/ Κρητικού διαιτολογίου (n=21)				
sVCAM-1 (ng/mL)	610 (534-787)	543 (487-601)	-10.1	<0.001
sICAM-1 (ng/mL)	201 (173-232)	204 (173-254)	1.7	0.19
sE-σελεκτίνη (ng/mL)	44.2 (35.0-55.1)	44.0 (37.5-55.1)	-3.9	0.99
Ομάδα δυτικοποιημένης ελληνικής δίαιτας (n=19)				
sVCAM-1 (ng/mL)	592 (506-625)†	495 (430-570)	-18.3	0.001
sICAM-1 (ng/mL)	219 (196-264) †	222 (192-279)	0.1	0.91
sE-σελεκτίνη (ng/mL)	47.8 (31.6-65.9) †	47.8 (31.6-67.1)	-2.9	0.31

Οι τιμές είναι διάμεσοι με το 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο.

sVCAM, διαλυτό μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1; sICAM-1, διαλυτό διακυττάριο μόριο προσκόλλησης-1.

* % Δ: διάμεσος ποσοστιαίων διαφορών πριν και μετά [(v2-v1)/v1]

†P=MΣ (μόρια προσκόλλησης της ομάδας Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαιτολογίου έναντι των αντίστοιχων μορίων προσκόλλησης της ομάδας δυτικοποιημένου ελληνικού διαιτολογίου)

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από δυναμική αλληλεπίδραση κυττάρων της φλεγμονής, κυτταροκινών και χημειοτακτικών παραγόντων (Ross, 1999). Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η επακόλουθη διείσδυση διαμέσω του ενδοθηλίου, είναι ένα εναρκτήριο γεγονός της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης που πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από τα CAM (Price & Loscalzo, 1999). Τα sCAM προέχονται από αποβολή ή πρωτεολυτική απόσχιση των μορίων που βρίσκονται στις μεμβράνες και μπορούν να αποτελέσουν δείκτες της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (Gearing & Newman, 1993). Από την άλλη μεριά, αυξανόμενες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι φλεγμονώδεις δείκτες όπως η CRP μπορούν επίσης να έχουν άμεσο παθογενετικό ρόλο στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης (Pasceri *et al.* 2000). Άλλοι φλεγμονώδεις δείκτες όπως το SAA, ο M-CSF και η IL-6 είναι παρόντες στις αθηροματικές πλάκες και υπάρχουν μελέτες που θεωρούν ότι οι δείκτες αυτοί έχουν ρόλο στην ανάπτυξη των αθηροματικών πλακών (Clinton *et al.* 1992; Meek *et al.* 1994; DeGraba, 1997). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν τη σημασία πραγματοποίησης μελετών παρέμβασης που να στοχεύουν στη μείωση των δεικτών

φλεγμονής, μείωση η οποία μπορεί να μεταφραστεί σε κλινικό όφελος σε ότι αφορά την πρόληψη της στεφανιαίας νόσου.

Όπως αναφέραμε σε προηγούμενη μελέτη (Rallidis *et al.* 2003), η συμπλήρωση της δίαιτας με ALA μείωσε τις συγκεντρώσεις φλεγμονωδών δεικτών. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την μείωση των συγκεντρώσεων των φλεγμονωδών δεικτών μέσω του ALA παραμένει άγνωστος, αν και η καταστολή της παραγωγής εικοσανοειδών είναι πιθανό ότι σχετίζεται (James *et al.* 2000). Έχουμε προτείνει σε άλλη μελέτη ότι η μείωση της παραγωγής προσταγλανδίνης E₂ και λευκοτριενίου B₄ καθώς και η επακόλουθη μείωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 και TNF-α μειώνει την απελευθέρωση IL-6, η οποία με τη σειρά της μειώνει την ηπατική παραγωγή CRP και SAA (Rallidis *et al.* 2003). Οι IL-6 και TNF-α είναι γνωστό ότι προκαλούν σημαντική αύξηση της παραγωγής M-CSF τόσο από ενδοθηλιακά όσο και από λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων σε κυτταρικές καλλιέργειες (Clinton *et al.* 1992), και κατά συνέπεια ελέγχουν την έκφραση του M-CSF. Επιπρόσθετα, τα CAM εκφράζονται στη μεμβράνη του ενδοθηλίου σε απάντηση σε διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως η CRP και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Price & Loscalzo, 1999).

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε ώστε να εξετάσει τη συσχέτιση ανάμεσα στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του ALA και τις διατροφικές συνήθειες. Παρουσιάζουμε εδώ μια μεγαλύτερη ανταπόκριση των φλεγμονωδών δεικτών στην ομάδα της δυτικοποιημένης ελληνικής δίαιτας. Εντούτοις, δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη διατροφική πρόσληψη συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών και τη συγκέντρωση φλεγμονωδών δεικτών. Παρόλα αυτά, μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν κατασταλτικές επιδράσεις συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, όπως το ελαϊκό οξύ που επηρέασε την ανοσολογική απόκριση *in vivo* (Yaqoob, 2002), ενώ μια δίαιτα πλούσια σε MUFAs οδήγησε σε μείωση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια ανθρώπινων περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων (Yaqoob *et al.* 1998). Ένας μικρός αριθμός μελετών υποδεικνύει αντιφλεγμονώδη δράση της βιταμίνης C. Έχει αναφερθεί συσχέτιση ανάμεσα στην έλλειψη βιταμίνης C και τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού (Schoenherr & Jewell 1997). Οι συγκεντρώσεις της CRP στον ορό έχουν συσχετισθεί αρνητικά με τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης C στον ορό σε άτομα με περιφερική αγγειακή νόσο (Langlois *et al.* 2001), και ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση της υγείας τους (Schorah *et al.* 1996). Παρόλο που οι προσλήψεις MUFAs και βιταμίνης C ήταν διαφορετικές ανάμεσα στις δύο ομάδες με τις

διαφορετικές δίαιτες που μελετήσαμε, τα αποτελέσματά μας δεν αποκαλύπτουν άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην διατροφική πρόσληψη των θρεπτικών αυτών συστατικών και την αντιφλεγμονώδη δράση του ALA.

Ένας περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι η έλλειψη ομάδας ελέγχου. Ένας δεύτερος περιορισμός είναι ότι δεν αναλύθηκε η σύνθεση των φωσφολιπιδίων του πλάσματος σε λιπαρά οξέα. Για το λόγο αυτό, δεν μπόρεσαν να πραγματοποιηθούν συσχετίσεις ανάμεσα στα λιπαρά οξέα και τους φλεγμονώδεις δείκτες. Τα δεδομένα της διαιτητικής πρόσληψης λιπαρών οξέων, που βασίσθηκαν στα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων των συμμετεχόντων στη μελέτη δεν αποκάλυψαν καμία συσχέτιση. Επιπλέον, καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στη βιταμίνη C και τους φλεγμονώδεις δείκτες, παρόλο που τα θρεπτικά αυτά συστατικά καταναλώθηκαν σε διαφορετικές ποσότητες στις δύο ομάδες με τις διαφορετικές δίαιτες. Παρόλο που τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ορισμένοι φλεγμονώδεις δείκτες μειώθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό όταν το ALA χορηγήθηκε στην ομάδα της δυτικοποιημένης διαίτας σε σύγκριση με την ομάδα της Μεσογειακής διαίτας, τα δεδομένα μας δεν μπορούν να επιβεβαιώσουν ότι η Μεσογειακή διαίτα κατέχει μια εγγενή αντιφλεγμονώδη δράση.

Συμπερασματικά, θεωρούμε ότι η χορήγηση ALA είναι δυνητικά πιο αποτελεσματική στη μείωση ορισμένων δεικτών φλεγμονής όταν οι ασθενείς ακολουθούν μια δυτικοποιημένη διαίτα σε σχέση με μια Μεσογειακή διαίτα ελληνικού τύπου. Οι μηχανισμοί που εξηγούν την παρατήρηση αυτή παραμένει να διερευνηθούν.

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς ευχαριστούν τους γιατρούς Ε. Καρποδίνη, Ε. Θεριού και το προσωπικό της καρδιολογικής κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου, για τη βοήθεια στην παρακολούθηση των εθελοντών. Επιθυμούμε επίσης να ευχαριστήσουμε τον Δρ. Ν. Γιαννακούρη (Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο) για την επεξεργασία του κειμένου αυτής της δημοσίευσης.

Αναφορές

- Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, *et al.* (1998) Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 723-731.
- Adult Treatment Panel III. Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (2001) Executive summary of the third report of the national Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* **285**, 2486-2497.
- Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, *et al.* (1995) Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *N Engl J Med* **332**, 977-982.
- Blok WL, Deslypere JP, Demacker PN, *et al.* (1997) Pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy volunteers fed various doses of fish oil for 1 year. *Eur J Clin Invest* **27**, 1003-1008.
- Calder PC (2001) Omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet* **88**, 109-116.
- Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, *et al.* (1996) The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* **63**, 116-122.
- Clinton SK, Underwood R, Hayes L, *et al.* (1992) Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* **140**, 301-316.
- Collie-Duguid ESR & Wahle KWJ (1996) Inhibitory effect of fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 969-974.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr & Libby P (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of pro-atherogenic and pro-inflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* **14**, 1829-1836.
- DeGraba TJ (1997) Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* **49**, 15-19.

- Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, *et al.* (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* **320**, 265-271.
- Gearing AJ & Newman W (1993) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14**, 506-512.
- James MJ, Gibson RA & Cleland LG (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* **71**, 343-348.
- Johansen O, Seljeflot I, Hostmark AT & Arnesen H (1999) The effect of supplementation with omega-3 fatty acids on soluble markers of endothelial function in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1681-1686.
- Kafatos A, Verhagen H, Moschandreas J, *et al.* (2000) Mediterranean diet of Crete: Foods and nutrient content. *J Am Diet Ass* **100**, 1487-1493.
- Kew S, Banerjee T, Minihane AM, *et al.* (2003) Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* **77**, 1287-1295.
- Khalfoun B, Thibault G, Bardos P & Lebranchu Y (1996) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human lymphocyte-endothelial cell adhesion. *Transplantation* **62**, 1649-1657.
- Langlois M, Duprez D, Delanghe J, *et al.* (2001) Serum vitamin C concentration is low in peripheral arterial disease and is associated with inflammation and severity of atherosclerosis. *Circulation* **103**, 1863-1868.
- Lewis B, Hammett F, Katan M, *et al.* (1981) Towards an improved lipid-lowering diet: additive effects of changes in nutrient intake. *Lancet* **ii**, 1310-1313.
- Madsen T, Skou HA, Hansen VE, *et al.* (2001) C-reactive protein, dietary n-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* **88**, 1139-1142.
- Madsen T, Christensen JH, Blom M & Schmidt EB (2003) The effect of dietary n-3 fatty acids on serum concentrations of C-reactive protein: a dose-response study. *Br J Nutr* **89**, 517-522.
- Meek RL, Urieli-Shoval S & Benditt EP (1994) Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3186-3190.

- Meydani SN, Endres S, Woods MM, *et al.* (1991) Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* **121**, 547-555.
- Nestle M (1995) Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr* **61**, 1313-1320.
- Pasceri V, Willerson JT & Yeh ETH (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* **102**, 2165-2168.
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, *et al.* (2003) The Adoption of Mediterranean Diet Attenuates the Development of Acute Coronary Syndromes in People with the Metabolic Syndrome. *Nutr J* **2**, 1.
- Price DT & Loscalzo J (1999) Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* **107**, 85-97.
- Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, *et al.* (2003) Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* **167**, 237-242.
- Ross R (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126.
- Schmidt EB, Varming K, Moller JM, Bulow Pedersen I, Madsen P & Dyerberg J (1996) No effect of a very low dose of n-3 fatty acids on monocyte function in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest* **56**, 87-92.
- Schoenherr WD & Jewell DE (1997) Nutritional modification of inflammatory diseases. *Semin Vet Med Surg* **12**, 212-222.
- Schorah CJ, Downing C, Piripitsi A, *et al.* (1996) Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in critically ill patients. *Am J Clin Nutr* **63**, 760-765.
- Seljeftot I, Arnesen H, Brude IR, Nenseter MS, Drevon CA & Hjermann I (1998) Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest* **28**, 629-635.
- Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, *et al.* (2001) Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* **36**, 1183-1193.
- Trichopoulou A (2000) From Research to Education: The Greek experience. *Nutrition* **16**, 528-531.

- Vega-Lopez S, Kaul N, Devaraj S, Cai RY, German B & Jialal I (2004) Supplementation with omega3 polyunsaturated fatty acids and all-rac alpha-tocopherol alone and in combination failed to exert an anti-inflammatory effect in human volunteers. *Metabolism* **53**, 236-240.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U & Weber PC (1995) Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α . *Arterioscler Thromb and Vasc Biol* **15**, 622-628.
- Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, *et al.* (2003) Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 1730-1736.
- Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, *et al.* (1998) Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* **67**, 129-135.
- Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA & Calder PC (2000) Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* **30**, 260-274.
- Yaqoob P (2002) Monounsaturated fatty acids and immune function. *Eur J Clin Nutr* **56**, 9-13.

Κεφάλαιο 8. Δημοσίευση 4

Ο γονότυπος της απολιποπρωτεΐνης E σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς και η ανταπόκριση λιπιδίων του αίματος και δεικτών φλεγμονής στο α-λινολενικό οξύ

Περίληψη

Στόχος Η επίδραση της χορήγησης α-λινολενικού οξέος (ALA) στα λιπίδια του αίματος και τους δείκτες φλεγμονής, σε σχέση με το γονότυπο της απολιποπρωτεΐνης (apo) E. **Σχεδιασμός** Οι δίαιτες πενήντα δυσλιπιδαιμικών ανδρών συμπληρώθηκαν με 15ml λινελαίου ανά ημέρα, για 12 εβδομάδες. Αναδρομικά, βρέθηκαν τρεις διαφορετικοί γονότυποι της apo E ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $n=7$; $\epsilon 3/\epsilon 3$, $n=33$; $\epsilon 3/\epsilon 4$, $n=10$). **Αποτελέσματα** Δεν βρέθηκαν διαφορές σε καμία από τις μεταβλητές κατά την έναρξη της μελέτης ανάμεσα στα άτομα με διαφορετικό γονότυπο της apo E. Η χορήγηση ALA οδήγησε σε μικρή αλλά σημαντική μείωση της χοληστερόλης της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (από 1.12 mmol/L σε 1.08 mmol/L, $P=0.008$) και των επιπέδων της apo A-I (από 1.28 g/L σε 1.24 g/L, $P=0.036$) στους ομοζυγώτες $\epsilon 3/\epsilon 3$. Επιπρόσθετα, η χορήγηση ALA οδήγησε σε σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων αμυλοειδούς A του ορού (SAA) ($P=0.014$), της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) ($P=0.013$), του παράγοντα ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων (M-CSF) ($P < 0.001$) και της ιντερλευκίνης (IL)-6 ($P=0.028$) στον ορό. Τα επίπεδα SAA και M-CSF του ορού μειώθηκαν επίσης στην ομάδα $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($P=0.005$ και $P=0.017$, αντίστοιχα). Αντίθετα, το ALA δεν επηρέασε κανένα από τους δείκτες φλεγμονής στην ομάδα $\epsilon 2/\epsilon 3$. **Συμπέρασμα** Το ALA είναι δυνατό να επηρεάζει ευεργετικά τη φλεγμονή σε δυσλιπιδαιμικούς που φέρουν το γονότυπο apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ και apo $\epsilon 3/\epsilon 4$, όχι όμως και σε φορείς του $\epsilon 2$ αλληλομόρφου.

Εισαγωγή

Η δυσλιπιδαιμία είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης που έχει τεκμηριωθεί επαρκώς (1). Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζεται πλέον ως σημαντικός παράγοντας της αθηρογενετικής διαδικασίας (2). Η απολιποπρωτεΐνη (apo) E έχει σημαντικό

προστατευτικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και η γενετική ποικιλότητα στην περιοχή του γονιδίου της συνδέεται με την επιδεκτικότητα στην αγγειακή νόσο (3,4). Η apo E είναι κυρίως γνωστή για το ρόλο της στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων της χοληστερόλης στο πλάσμα. Η πρωτεΐνη αυτή του πλάσματος λειτουργεί ως συνδετό μόριο για τους υποδοχείς λιποπρωτεϊνών των κυττάρων. Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η apo E είναι δυνατό να είναι προστατευτική έναντι της αθηροσκλήρωσης μέσω μηχανισμών που είναι ανεξάρτητοι με την ικανότητά της να επηρεάζει τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα, όπως η ρύθμιση χρόνιων φλεγμονωδών απαντήσεων που πραγματοποιούνται μέσω μακροφάγων και λεμφοκυττάρων (4,5). *In vitro* μελέτες σε κύτταρα έδειξαν ότι η έκφραση της apo E όχι μόνο τροποποιείται άλλα επίσης τροποποιεί την παραγωγή κυτταροκινών τόσο από μακροφάγα όσο και από T-λεμφοκύτταρα (6,7). Έτσι, η apo E φαίνεται ότι επηρεάζει άμεσα τις απαντήσεις του ανοσοποιητικού που είναι μέρος της αθηρογενετικής διαδικασίας.

Η γενετική ποικιλότητα της περιοχής του γονιδίου της apo E αφορά τρία αλληλόμορφα που είναι κοινά στον πληθυσμό (ε2, ε3 και ε4), τα οποία κωδικοποιούν τρεις ισομορφές πρωτεϊνών που διαφέρουν σε ένα μόνο αμινοξύ και το ηλεκτρικό τους φορτίο. Αυτή η τελευταία διαφορά συμβάλλει στη διαφορετική συνάφεια των τριών ισομορφών με τους υποδοχείς η οποία είναι πιθανά υπεύθυνη για τη συσχέτιση σε επιδημιολογικές μελέτες ανάμεσα στον γονότυπο της apo E, τα επίπεδα λιπιδίων στον ορό και τον κίνδυνο αγγειακής νόσου (3,8). Το αλληλόμορφο ε4 έχει συσχετισθεί με αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) και apo B στον ορό (8,9). Σε συμφωνία με αυτό, έχει προταθεί ότι τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης σε άτομα με το αλληλόμορφο ε4 είναι πιο ευαίσθητα σε αλλαγές της διαίτας σε σχέση με τα επίπεδα σε άτομα με διαφορετικά αλληλόμορφα (10,11).

Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι η διατροφική πρόσληψη α-λινολενικού οξέος (ALA; 18:3ω-3) σχετίζεται αντίστροφα με τον κίνδυνο θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου (CHD) (12,13). Η μελέτη της Λυών έδειξε ότι μια διαίτα Μεσογειακού τύπου πλούσια σε ALA ήταν περισσότερο αποτελεσματική στην πρόληψη της επανεμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων σε σχέση με τη συνήθως προτεινόμενη «μετα-εμφραγματική» διαίτα (14). Η Μεσογειακή διαίτα έχει ιστορικά συσχετισθεί με χαμηλή θνησιμότητα από CHD σε περιοχές όπως η Κρήτη τη δεκαετία του 1960 (15). Αργότερα βρέθηκε ότι οι

Κρητικοί είχαν 3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση ALA στο πλάσμα σε σχέση με τους συμμετέχοντες στη μελέτη στο Zutphen (Ολλανδία) (16). Παρόλα αυτά, οι κλινικές μελέτες που εξέτασαν τις επιδράσεις του ALA στα λιπίδια του αίματος είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (17-20). Από την άλλη μεριά, υπάρχουν ενδείξεις ότι το ALA κατέχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (21,22), υποδεικνύοντας ότι οι ευεργετικές δράσεις του ALA είναι πιθανά ανεξάρτητες από το μεταβολισμό της χοληστερόλης.

Η πιθανότητα μη ειδικοί δείκτες της χρόνιας μικρού-βαθμού φλεγμονής να προβλέπουν τον κίνδυνο στεφανιαίων επεισοδίων υποστηρίζεται από ένα αριθμό μελετών (23). Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) έχει συσχετισθεί με την ύπαρξη και τη σοβαρότητα της αθηροσκλήρωσης και έχει βρεθεί να προβλέπει τα οξέα στεφανιαία επεισόδια σε προοπτικές μελέτες (24,25). Άλλοι δείκτες φλεγμονής όπως το αμυλοειδές Α του ορού (SAA), ο παράγοντας ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων (M-CSF) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) έχουν ανιχνευθεί σε αθηροσκληρωτικές πλάκες και είναι πιθανό να έχουν ρόλο στην ανάπτυξη των αθηροσκληρωτικών πλακών (26-28).

Καθώς η apo E φαίνεται να έχει ένα πολυπαραγοντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και να σχετίζεται με τη φλεγμονώδη διαδικασία, υποθέσαμε ότι ο πολυμορφισμός της apo E θα μπορούσε να επηρεάζει την ανταπόκριση στο ALA. Για το λόγο αυτό εξετάσαμε το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο γονότυπο της apo E και το ALA σε δείκτες της φλεγμονής, σε δυσλιπιδαιμικούς άνδρες.

Μέθοδοι

Εθελοντές

50 άνδρες ηλικίας 35 με 67 έτη, με διάγνωση δυσλιπιδαιμίας χωρίς ένδειξη CHD αποτέλεσαν τον πληθυσμό της μελέτης Όλοι οι συμμετέχοντες συγκεντρώθηκαν από την μονάδα δοκιμασίας κοπώσεως της καρδιολογικής κλινικής του Λαϊκού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών, μετά από αξιολόγηση του ιατρικού τους ιστορικού, φυσική εξέταση, ηλεκτροκαρδιογράφημα και εργαστηριακές αναλύσεις. Οι εθελοντές αποκλείστηκαν από τη μελέτη στην περίπτωση ύπαρξης ενός από τα παρακάτω: λοίμωξη, ενδοκρινής, ηπατική, αγγειακή ή αιμοστατική νόσος, υπέρταση, αγωγή που επηρεάζει το μεταβολισμό των λιπιδίων, συνήθης κατανάλωση 30 μονάδων αλκοόλ (1 μονάδα=8 γραμμάρια αλκοόλ) ανά εβδομάδα, κάπνισμα

περισσότερων από 10 τσιγάρων την ημέρα, ή συνήθης έντονη άσκηση για περισσότερο από 6 ώρες την εβδομάδα. Οι διαιτητικές συνήθειες και η φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκαν με τη χρήση ερωτηματολογίου. Όλοι οι συμμετέχοντες αξιολογήθηκαν κατά την είσοδό τους στη μελέτη ώστε να ακολουθούν το μέσο ελληνικό διαιτολόγιο (βλέπε διατροφική αξιολόγηση). Το ύψος και το βάρος μετρήθηκαν με του ασθενείς σε ελαφρύ ρουχισμό και μετά την αφαίρεση των παπουτσιών. Η αρτηριακή πίεση σε καθιστή θέση μετρήθηκε μετά από 10 λεπτά ηρεμίας σε δύο ξεχωριστές χρονικές στιγμές. Όλοι οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση συμμετοχής στη μελέτη, η οποία εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του νοσοκομείου.

Σχεδιασμός της μελέτης

Όλοι οι εθελοντές έλαβαν 15ml λινελαίου/ημέρα που περιλάμβανε περίπου 8.1 γραμμάρια ALA (ω -3) για 12 εβδομάδες. Το έλαιο λαμβανόταν 3 φορές την ημέρα, μια κουταλιά του τσαγιού των 5ml με κάθε γεύμα. Ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρήσουν τις διαιτητικές τους συνήθειες και το συνήθη τρόπο ζωής τους και τους συστήθηκε να αποφύγουν τη λήψη αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων, βιταμινών ή άλλων συμπληρωμάτων διατροφής κατά τη διάρκεια των 12 εβδομάδων της μελέτης. Οι εθελοντές επιβλέφθηκαν από διαιτολόγους-ερευνητές σε ότι αφορά τις διατροφικές τους συνήθειες, την κατανάλωση αλκοόλ και τη φυσική τους δραστηριότητα μέσω τηλεφωνικών κλήσεων μια φορά την εβδομάδα και μέσω των επισκέψεων στο νοσοκομείο. Οι επισκέψεις πραγματοποιούνταν μία φορά το μήνα και στη διάρκεια τους χορηγούνταν το έλαιο. Η συμμόρφωση των εθελοντών αξιολογήθηκε μέσω της επιστροφής των άδειων μπουκαλιών. Τα άτομα ζυγίστηκαν σε κάθε επίσκεψη. Αναδρομικά, μετά το τέλος της περιόδου παρέμβασης, ελέγχθηκε ο πολυμορφισμός του γονιδίου της apo E στους εθελοντές, οι οποίοι κατανεμήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με το γονότυπο της apo E. Το λινέλαιο χορηγήθηκε από την εταιρία Savant International, Leeds, UK. Η σύνθεση του ελαίου σε λιπαρά οξέα δίνεται στον πίνακα 1.

Διατροφική αξιολόγηση

Η διατροφική αξιολόγηση βασίστηκε σε ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και μια διατροφική ανάκληση 24ώρου. Η συχνότητα κατανάλωσης γάλακτος, ψωμιού, φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, ελαιόλαδου, ψαριών και κρέατος

σε συνδυασμό με την διατροφική ανάκληση 24ώρου, μας επέτρεψε να επιλέξουμε εθελοντές ου ακολουθούσαν το μέσο ελληνικό διαιτολόγιο (βλέπε Πίνακα 2). Η συμμόρφωση στη δίαιτα ελέγχθηκε μέσω τριών 4ήμερων ημερολογίων καταγραφής τροφίμων (ένα για κάθε 4 εβδομάδες). Οι μέρες που καταγράφηκαν στο ημερολόγιο ήταν 3 καθημερινές και 1 ημέρα από το σαββατοκύριακο. Τα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων αναλύθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Nutritionist V Diet Analysis software (Version 2.1 First Data Bank Inc. USA) όπως αυτό τροποποιήθηκε για τον ελληνικό πληθυσμό, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (29).

Εργαστηριακές τεχνικές

Οι εθελοντές προσήλθαν στην καρδιολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου σε δύο περιπτώσεις για τη συλλογή αίματος, στην αρχή και το τέλος της μελέτης. Σε κάθε επίσκεψη τα δείγματα αίματος συγκεντρώθηκαν στις 8 το πρωί μετά από 12ωρη νηστεία των εθελοντών. Οι εθελοντές παρέμειναν ξαπλωμένοι σε ύπτια θέση για 10 λεπτά πριν την αιμοληψία. Η συλλογή του αίματος έγινε σε γυάλινα σωληνάρια χωρίς μέσο συντήρησης (Vacutainer tube, Becton Dickinson) για τον προσδιορισμό των λιπιδίων και των φλεγμονωδών δεικτών του ορού, και σε σωληνάρια K₃EDTA για την απομόνωση του DNA. Όλες οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν χωρίς αποκλεισμό της φλέβας. Τα σωληνάρια συλλογής του αίματος διατηρήθηκαν σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και στους 4° C, εντός 2 ωρών από την αιμοληψία. Τα δείγματα του ορού αποθηκεύτηκαν στους -80° C για περαιτέρω ανάλυση. Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL χοληστερόλης) στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με τη χρήση ενζυματικής χρωματογραφίας σε αυτοματοποιημένο αναλυτή ACE (Sciapparelli Biosystems Inc., USA). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων apo A-I και apo B στον ορό πραγματοποιήθηκε μέσω νεφελομετρικής ανοσοκαθίζησης σε αναλυτή ACE. Ο διαχωρισμός των υποτάξεων της LDL πραγματοποιήθηκε μέσω υπερφυγοκέντρωσης, όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως από τον Griffin και συνεργάτες (30).

Τα επίπεδα CRP και αμυλοειδούς A του ορού προσδιορίστηκαν με τη χρήση υψηλής ευαισθησίας ανοσονεφελομετρίας ενισχυόμενης μέσω σωματιδίων (N Latex, Date-Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) με εύρος προσδιορισμού από 0.175 έως 1100 mg/l και 0.75 έως 1000 mg/l, αντίστοιχα. Η IL-6 και ο M-CSF

προσδιορίστηκε μέσω ανοσοενζυμικής τεχνικής στερεής φάσης (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK) με εύρος προσδιορισμού από 0.156 έως 10 pg/ml και 25.3 έως 1715 pg/ml, αντίστοιχα. Η διακύμανση εντός και μεταξύ των αναλύσεων για CRP, SAA και M-CSF ήταν <5% και για την IL-6 <10%. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Για περιορισμό της διακύμανσης, τα δείγματα πριν και μετά την χορήγηση ALA μετρήθηκαν στην ίδια ανάλυση.

Το γενομικό DNA απομονώθηκε από τον πυρήνα λευκοκυττάρων με τη μέθοδο εξαγωγής μέσω άλατος (31). Ο γονότυπος της apo E προσδιορίστηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ΑΑΠ) και επακόλουθη πέψη με ένζυμο περιορισμού *Hha I* (*New England Biolabs*), όπως περιγράφηκε από τον Reymer και συνεργάτες (32).

Στατιστική ανάλυση

Τα κλινικά και διαιτητικά χαρακτηριστικά καθώς και τα επίπεδα λιπιδίων στον ορό εκφράστηκαν με τη χρήση του μέσου και της τυπικής απόκλισης (ΤΑ) εκτός εάν δηλώνεται το αντίθετο. Τα δεδομένα για τους φλεγμονώδεις δείκτες εκφράστηκαν με χρήση του διαμέσου και των 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου. Οι διαφορές των κλινικών και διατροφικών χαρακτηριστικών καθώς και των επιπέδων των λιπιδίων στον ορό κατά την έναρξη της μελέτης ανάμεσα στις ομάδες με το διαφορετικό γονότυπο apo E αναλύθηκαν με την στατιστική Welch, ώστε να συνυπολογιστούν μη ομοιόμορφες διακυμάνσεις. Η συσχέτιση ανάμεσα στο κάπνισμα και το γονότυπο αξιολογήθηκε με τη χρήση του ελέγχου *Fisher's exact*, λόγω του μικρού αριθμού των συμμετεχόντων στη μελέτη. Οι διαφορές στα επίπεδα λιπιδίων του ορού πριν και μετά τη χορήγηση του ALA προσδιορίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης σχετικών δειγμάτων Student t-test, μετά από έλεγχο κανονικότητας με τη χρήση του ελέγχου Wilk's test. Τα δεδομένα για τριγλυκερίδια, apo A-I και apo B τροποποιήθηκαν λογαριθμικά για να διορθωθεί η μη κανονική τους κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν όμως οι μη τροποποιημένες τιμές των μέσων για διευκόλυνση της ερμηνείας τους. Καθώς τα δεδομένα για τις συγκεντρώσεις δεικτών φλεγμονής δεν είχαν κανονική κατανομή ακόμη και μετά την λογαριθμική τροποποίηση των τιμών, ο προσδιορισμός των διαφορών κατά την έναρξη (Mann-Whitney U-test) και πριν και μετά τη χορήγηση ALA (Wilcoxon signed rank test) έγινε με μη παραμετρικές αναλύσεις. Τιμές του P μικρότερες του 0.05 θεωρήθηκαν ως σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση

πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS statistical software (SPSS for Windows, release 10.0.5).

Αποτελέσματα

Η κατανομή των γονοτύπων της apo E και τα χαρακτηριστικά κατά την έναρξη

Από τους 50 δυσλιπιδαιμικούς εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη, 33 ήταν ομόζυγοι για το συχνότερα εμφανιζόμενο αλληλόμορφο ε3 (γονότυπος ε3/ε3), επτά ήταν φορείς του γονότυπου ε2/ε3 ενώ δέκα είχαν γονότυπο ε3/ε4. Κανένα άτομο δεν παρουσίασε γονότυπο ε2/ε2, ε2/ε4 ή ε4/ε4. Η κατανομή των αλληλομόρφων ήταν: ε2, 7.0%; ε3, 83.0%, ε4, 10.0%.

Τα άτομα με διαφορετικό γονότυπο της apo E δεν διέφεραν ως προς το δείκτη μάζας σώματος (BMI), τη μέση αρτηριακή πίεση, τον αριθμό λευκοκυττάρων (ΛΚ) και την συνήθεια του καπνίσματος (Πίνακας 2). Επιπρόσθετα, δεν υπήρχαν διαφορές στην κατανάλωση θρεπτικών συστατικών ανάμεσα στις ομάδες με διαφορετικό γονότυπο της apo E, περιλαμβανομένων και των ALA και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Πίνακας 2). Τα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων έδειξαν ότι η δίαιτα των εθελοντών παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον, το σωματικό βάρος, η αρτηριακή πίεση καθώς και ο αριθμός ΛΚ των εθελοντών δεν άλλαξε σημαντικά στη διάρκεια της μελέτης (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Ο πίνακας 3 δείχνει τις μέσες τιμές ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, πυκνότητας της LDL, HDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, apo A-I και apo B πριν και μετά την χορήγηση ALA τόσο για τον πληθυσμό της μελέτης στο σύνολο όσο και για τις υποομάδες του γονότυπου της apo E. Σε συμφωνία με τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη, οι εθελοντές παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και apo B (5.98 ± 0.87 mmol/L, 3.97 ± 0.95 mmol/L, 1.74 ± 0.95 mmol/L and 1.22 ± 0.14 g/L, αντίστοιχα) κατά την έναρξη. Οι μέσες τιμές των επιπέδων λιποπρωτεϊνών, apo A-I και apo B του ορού καθώς και της πυκνότητας της LDL, κατά την έναρξη ήταν παρόμοιες μεταξύ των τριών γονοτύπων της apo E. Στο σύνολο των εθελοντών (n=50), η χορήγηση του ALA οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 3.7% ($P=0.011$) και 3.1% ($P=0.030$) των επιπέδων HDL χοληστερόλης και apo A-I του ορού, αντίστοιχα. Η μείωση για τις HDL χοληστερόλη και apo A-I παρατηρήθηκε επίσης στην ομάδα apo ε3/ε3 με μειώσεις κατά 4.1% ($P=0.008$) και 3.8% ($P=0.036$), αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές τόσο στην

ομάδα από $e2/e3$ όσο και στην ομάδα $e3/e4$. Καμιά σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεων ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και από B στον ορό καθώς και της πυκνότητας της LDL δεν παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση του ALA τόσο στο σύνολο των εθελοντών όσο και στις υποομάδες του γονότυπου της από E.

Ο πίνακας 4 δείχνει την επίδραση της χορήγησης ALA στις συγκεντρώσεις SAA, CRP, M-CSF και IL-6 σε 50 δυσλιπιδιαμικούς εθελοντές και στις υποομάδες των γονοτύπων. Τα επίπεδα των φλεγμονωδών δεικτών κατά την έναρξη ήταν παρόμοια μεταξύ των γονοτύπων της από E. Τα επίπεδα του SAA στον ορό μειώθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση ALA στο σύνολο του πληθυσμού ($P<0.001$). Στην ανάλυση αυτή αποκλείσαμε δύο άτομα με επίπεδα SAA κατά την έναρξη πάνω από το 98° εκατοστημόριο (>50 mg/L). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια όταν τα δύο αυτά άτομα περιλήφθηκαν στην ανάλυση. Η μείωση του SAA εκδηλώθηκε στις ομάδες $e3/e3$ ($P=0.014$) και $e3/e4$ ($P=0.005$) κατά 15.9% και 28.8%, αντίστοιχα. Μια παρόμοια τάση παρατηρήθηκε στην ομάδα των $e2/e3$ ατόμων αν και η μείωση (16.7%) δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P=0.24$). Η ανταπόκριση των ατόμων με το γονότυπο $e2/e3$ ποικίλει ιδιαίτερα από αύξηση κατά 37.2% έως μείωση κατά 39.4%, ενώ το σύνολο των ατόμων $e3/e4$ παρουσίασε μείωση του SAA που κυμαινόταν από 18.6% έως 58.4% (Εικόνα 1).

Η χορήγηση ALA μείωσε τον M-CSF του ορού. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στο σύνολο των ατόμων ($P<0.001$), στις υποομάδες από $e3/e3$ ($P<0.001$) και $e3/e4$ ($P=0.017$), όχι όμως και στην ομάδα $e2/e3$ ($P=0.18$). Παρόλα αυτά, οι διαφορές ανάμεσα στους φορείς $e2/e3$ και $e3/e4$ δεν ήταν σημαντικές με τους περισσότερους από τους φορείς του αλληλομόρφου $e2$ να εμφανίζουν μείωση του M-CSF από 0.9% έως 32.9% (Εικόνα 1).

Η συγκέντρωση του SAA μειώθηκε στο σύνολο των εθελοντών μετά τη χορήγηση ALA ($P=0.002$) λόγω κυρίως της σημαντικής μείωσης στα άτομα $e3/e3$ ($P=0.013$). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα άτομα με γονότυπο από E $e2/e3$ και $e3/e4$. Η IL-6 του ορού μειώθηκε επίσης σημαντικά στο σύνολο των εθελοντών ($P=0.024$) και την υποομάδα του γονότυπου $e3/e3$ ($P=0.028$) μετά το ALA, ενώ οι ομάδες $e2/e3$ και $e3/e4$ δεν παρουσίασαν αλλαγή.

Συζήτηση

Στη μελέτη εξετάσαμε εάν ο πολυμορφισμός της apo E επηρεάζει την ανταπόκριση των λιπιδίων του αίματος και των φλεγμονωδών δεικτών στη χορήγηση ALA (8.1 γρ./ημέρα για 12 εβδομάδες), σε μια ομάδα 50 δυσλιπιδαιμικών ανδρών μέσης ηλικίας. Παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση ALA σχετίστηκε με σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων στον ορό για το SAA και τον M-CSF στις υποομάδες των ε3/ε3 και ε3/ε4 ατόμων, ενώ συγχρόνως μειώθηκαν τα επίπεδα CRP και IL-6 στα άτομα ε3/ε3. Παρόλα αυτά, το ALA δεν σχετίστηκε με τους φλεγμονώδεις δείκτες στην ομάδα των ατόμων που έφεραν το ε2 αλληλόμορφο. Επίσης, δεν βρέθηκαν ευεργετικές επιδράσεις του ALA στα επίπεδα των λιπιδίων νηστείας του ορού που να είναι ειδικές για συγκεκριμένο γονότυπο της apo E.

Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (PUFA) που βρίσκονται στα ιχθυέλαια, συγκεκριμένα το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA), έχουν εκτεταμένα μελετηθεί για τις επιδράσεις τους στα λιπίδια του αίματος και έχει τεκμηριωθεί ότι κατέχουν υποτριγλυκεριδαιμικές ιδιότητες (33) και ότι μειώνουν τη στεφανιαία θνησιμότητα (34,35). Σε υψηλές δόσεις, τα ω-3 PUFAs μειώνουν επίσης τη χοληστερόλη και έχουν αντι-θρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (36). Το κατά πόσο το ALA κατέχει παρόμοιες ευεργετικές δράσεις στις συγκεντρώσεις των λιπιδίων του ορού δεν είναι ακόμη γνωστό. Μελέτες μικρής διάρκειας στην πρωτογενή (17,37,38) και τη δευτερογενή πρόληψη (14,39) δεν έδειξαν επίδραση της χορήγησης ALA στα επίπεδα νηστείας τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στον ορό. Όταν συνέκριναν το καρδαμέλαιο, το ηλιέλαιο, το λινέλαιο και το ιχθυέλαιο, ο Kestin και συνεργάτες (17) και ο Singer και συνεργάτες (38) δεν παρουσίασαν διαφορά της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης ή της HDL χοληστερόλης του ορού μετά από χορήγηση λινελαίου σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς. Έχει προταθεί ότι το ALA δεν επηρεάζει τα τριγλυκερίδια του αίματος ενώ μειώνει την LDL χοληστερόλη πιθανότατα όταν αντικαθιστά κορεσμένα λιπαρά οξέα (33).

Οι μελέτες που εξέτασαν την επίδραση του ALA στους δείκτες της φλεγμονής είναι αντικρουόμενοι. Πιο συγκεκριμένα, από τη μία μεριά έχει προταθεί ότι η παραγωγή TNF-α και IL-1β από μονοκύτταρα υγιών εθελοντών που διεγέρθηκαν μέσω λιποπολυσακχαρίτη μειώθηκε μετά από υψηλή δόση ALA στη δίαιτα (40). Επιπρόσθετα, σε προηγούμενη μελέτη μας (22), η χορήγηση ALA μείωσε τις

συγκεντρώσεις IL-6 και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης στον ορό. Από την άλλη μεριά, άλλες μελέτες έδειξαν ότι το ALA δεν επηρέασε την παραγωγή TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 ή ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) από τα μονοκύτταρα (41). Πρόσφατα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η πρόσληψη ≤ 9.5 γραμμαρίων ALA ή ≤ 1.7 γραμμαρίων EPA+DHA/ημέρα δεν επηρέασε την παραγωγή κυτταροκινών από μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα παρόλο που η σύσταση των μονοκύτταρων κυττάρων σε λιπαρά οξέα άλλαξε σημαντικά (42).

Η αρχική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των 50 δυσλιπιδαιμικών ατόμων που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ως μια ομογενής ομάδα απέτυχε επίσης να αποκαλύψει κάποια υποτριγλυκεριδαιμική ή υποχοληστερολαιμική δράση του ALA (22). Σε συνάρτηση με τη συμβολή της apo E στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και τις επιδράσεις του γονότυπου της apo E στα επίπεδα νηστείας των λιπιδίων (8,9) και την ανταπόκριση των λιποπρωτεϊνών σε διατροφικές παρεμβάσεις (43), αποφασίσαμε να αναλύσουμε ξανά τα αποτελέσματά μας σε σχέση με τα αλληλόμορφα του γονιδίου αυτού. Αυτή η ανάλυση θα μπορούσε να αποκαλύψει πιθανές ανταποκρίσεις στο ALA, ειδικές για συγκεκριμένους γονότυπους της apo E, οι οποίες δεν αποκαλύπτονται όταν τα δεδομένα αναλύονται χωρίς ο πολυμορφισμός της apo E να λαμβάνεται υπόψη. Επιπρόσθετα, σε μια πρόσφατη μελέτη η οποία παρουσίασε σημαντική υποτριγλυκεριδαιμική δράση της λήψης ιχθυελαίου σε 50 άτομα με αθηρογόνο λιποπρωτεϊνικό φαινότυπο, O Minihane και συνεργάτες (44) ανέφεραν σημαντική επίδραση του γονότυπου της apo E στην ανταπόκριση των λιπιδίων στις διατροφικές παρεμβάσεις, με τους φορείς του ε2 αλληλομόρφου (n=8) να εμφανίζουν σημαντική μείωση της μεταγευματικής αύξησης των τριγλυκεριδίων σε σχέση με τα άτομα που δεν ήταν φορείς του ε2. Παρόλα αυτά, στη μελέτη μας δεν βρέθηκαν ενδείξεις που να υποστηρίζουν ευεργετική δράση του ALA στα λιπίδια του αίματος που να είναι ειδική για συγκεκριμένο γονότυπο της apo E. Η χορήγηση ALA όχι μόνο απέτυχε να παρουσιάσει ευεργετική δράση στα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης του ορού αλλά οδήγησε από την άλλη μεριά σε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων HDL χοληστερόλης σε συνδυασμό με σημαντική μείωση των επιπέδων της apo A-I, στο σύνολο των εθελοντών και την ομάδα ε3/ε3. Οι μειώσεις αυτές έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες όπου η δίαιτα εμπλουτίστηκε με ALA (17,45). Οι μειώσεις των επιπέδων της HDL χοληστερόλης και της apo A-I δεν εμφανίστηκαν στις ομάδες με γονότυπο ε2/ε3 και ε3/ε4.

Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε ανάμεσα στο γονότυπο της apo E και τα επίπεδα νηστείας των λιπιδίων κατά την έναρξη. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με ότι έχει παρατηρηθεί στους περισσότερους πληθυσμούς ανθρώπων, στους οποίους το αλληλόμορφο ε4 τείνει να αυξάνει τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης στον ορό, ενώ το αλληλόμορφο ε2 έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (8,9). Η έλλειψη συσχέτισης του αλληλομόρφου ε4 με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης ορού έχει επίσης παρατηρηθεί σε άλλες εθνότητες (46,47) και είναι πιθανό να εξηγεί τουλάχιστον σε ένα βαθμό γιατί το ε4 αλληλόμορφο δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης CHD και εμφράγματος του μυοκαρδίου στον ελληνικό πληθυσμό (48).

Σε αντίθεση με τα λιπίδια του ορού, παρατηρήθηκε ευεργετική επίδραση του ALA σε δείκτες φλεγμονής για τους δυσλιπιδαιμικούς εθελοντές της μελέτης. Έχουμε αναφέρει σε προηγούμενη μελέτη (22) ότι τα επίπεδα του SAA, της CRP και της IL-6 στην κυκλοφορία μειώθηκαν σημαντικά μετά από μια 3μηνη περίοδο παρέμβασης (κατά 23.1%, 38.0% και 10.5%, αντίστοιχα). Εδώ αναφέρουμε για πρώτη φορά ότι τα επίπεδα του M-CSF στον ορό μειώθηκαν επίσης μετά από χορήγηση ALA (κατά 23.8%, $P < 0.001$). Ο M-CSF πιστεύεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα, ένα από τα εναρκτήρια γεγονότα της αθηροσκλήρωσης (49). Το εύρημα ότι ο M-CSF εκφράζεται στις αθηροσκληρωτικές όχι όμως και τις φυσιολογικές ανθρώπινες αρτηρίες (27), σε συνδυασμό με τον κεντρικό ρόλο των μακροφάγων στην αθηροσκλήρωση υποδεικνύει ότι ο M-CSF ανήκει ίσως στις διάφορες κυτταροκίνες που ελέγχουν την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του ALA που παρατηρήθηκαν πιθανότατα βρίσκονται πίσω από τις ευεργετικές του δράσεις στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη της CHD (12-14). Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός μέσω του οποίου η χορήγηση ALA προκαλεί μείωση των δεικτών της φλεγμονής παραμένει άγνωστος, αν και η καταστολή της παραγωγής εικοσανοειδών είναι πιθανό ότι εμπλέκεται. Έχει προταθεί ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα οδηγούν σε καταστολή της σύνθεσης θρομβοξανής A_2 από τα μονοκύτταρα, και αυτό οδηγεί σε μείωση της σύνθεσης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) και της IL-1β (50). Ο Caughey και συνεργάτες (40) έδειξαν ότι μια δίαιτα εμπλουτισμένη με λινέλαιο, που παρείχε 13.7 γραμμάρια ALA ανά ημέρα, μπορεί να αναστείλει την *ex vivo* παραγωγή TNF-α και IL-1β κατά 30% σε τέσσερις εβδομάδες. Οι κυτταροκίνες αυτές είναι γνωστό ότι προκαλούν σημαντική αύξηση

της έκφρασης M-CSF τόσο από τα ενδοθηλιακά όσο και από τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων σε καλλιέργεια (27), και κατά συνέπεια θεωρείται ότι ελέγχουν την έκφραση του M-CSF. Είναι για το λόγο αυτό ιδιαίτερα πιθανό το ALA να μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του M-CSF μέσω της καταστολής της παραγωγής εικοσανοειδών. Επιπρόσθετα, το ALA μπορεί να μειώσει τη σύνθεση IL-6 μέσω καταστολής της παραγωγής TNF- α και IL-1, καθώς η IL-6 απελευθερώνεται σε απάντηση στη διέγερση από αυτές τις κυτταροκίνες που προέρχονται από μονοκύτταρα. Η μείωση των επιπέδων της IL-6 στον ορό που εμφανίστηκε στην παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με τις αναφορές για τα ω -3 λιπαρά οξέα στη βιβλιογραφία, όπως αυτή ανασκοπείται από τον McCarty (51). Η IL-6 είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη (52) που με τη σειρά της ελέγχει την ηπατική παραγωγή SAA και CRP (23).

Ένα ακόμη νέο εύρημα της μελέτης μας είναι ότι η γενετική ποικιλία του γονιδίου της apo E επηρεάζει την ανταπόκριση των φλεγμονωδών δεικτών στη χορήγηση ALA. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε, δεν υπάρχει προηγούμενη μελέτη που να εξετάζει τις πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στο γονότυπο της apo E και την ανταπόκριση των δεικτών της φλεγμονής στα ω -3 λιπαρά οξέα, ενώ δύο μελέτες (53,54) έχουν δείξει σημαντική επίδραση της φαινοτυπικής ποικιλίας της apo E στα επίπεδα της CRP στον ορό. Ο Manttari και συνεργάτες (53) ανέφερε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό της apo E και τα επίπεδα της CRP σε δυσλιπιδαιμικούς άνδρες μέσης ηλικίας, με τους ομοζυγώτες ε3/ε3 να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα CRP στον ορό σε σύγκριση με τους φορείς των ε2 και ε4 αλληλομόρφων. Σε άλλη μελέτη, η οποία έδειξε μια αρνητική και ανεξάρτητη επίδραση της apo E στις συγκεντρώσεις της CRP σε παχύσαρκους ενήλικες, ο Back-Ngohou και συνεργάτες (54) ανέφερε ότι τα επίπεδα της CRP στον ορό συσχετίστηκαν ισχυρά και αντίστροφα με τα επίπεδα της apo E στον ορό μόνο στην υποομάδα των ατόμων ε3/ε3, ενώ δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση στην υποομάδα ε3/ε4. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υποδεικνύουν μια πιθανή ειδική επίδραση των ισομορφών της apo E στη φλεγμονή. Στη μελέτη μας σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του γονότυπου της apo E με τα επίπεδα της CRP ή τα επίπεδα της IL-6, του SAA και του M-CSF κατά την έναρξη, αν και η μεγαλύτερη ευεργετική επίδραση της χορήγησης ALA στους δείκτες της φλεγμονής παρουσιάστηκε στα άτομα με γονότυπο apo E ε3/ε3 και ε3/ε4. Πιο συγκεκριμένα, ενώ βρέθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων του SAA και του M-CSF μετά το ALA στις ομάδες ε3/ε3 και

ε3/ε4, σε συνδυασμό με σημαντική μείωση των επιπέδων της CRP και της IL-6 στα ε3/ε3 άτομα, δεν εμφανίστηκε ευεργετική αλλαγή των δεικτών της φλεγμονής στην υποομάδα των φορέων του ε2 αλληλομόρφου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι μια υψηλή πρόσληψη ALA είναι πιθανό να μην βοηθά δυσλιπιδαιμικά άτομα με το ε2 αλληλομόρφο, τουλάχιστον σε ότι αφορά την καταστολή των κυτταροκινών και της φλεγμονώδους απάντησης. Τα ευρήματά μας, παρόλα αυτά, βασίζονται σε σχετικά μικρό αριθμό φορέων του ε2 αλληλομόρφου και χρειάζονται επιβεβαίωση από περαιτέρω μελέτες.

Ως αποτέλεσμα του μικρού αριθμού ατόμων σε κάθε μία από τις υποομάδες με το διαφορετικό γονότυπο της apo E, ιδιαίτερα στις ομάδες των φορέων των ε4 και ε2 αλληλομόρφων, η ισχύς της μελέτης να ανιχνεύει διαφορές των παραμέτρων που εξετάσαμε πριν και μετά την περίοδο παρέμβασης ήταν περιορισμένη για τις αναλύσεις που έγιναν στις υποομάδες. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι είχαμε τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μικρή ομάδα των φορέων του ε4 αλληλομόρφου εξασφαλίζει σε ορισμένο βαθμό την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κατανομή των αλληλομόρφων της apo E στην ομάδα των δυσλιπιδαιμικών που εξετάσαμε δεν διέφερε από την κατανομή που έχει αναφερθεί προηγουμένως σε μια ομάδα 240 υγιών Ελλήνων (48), και είναι επίσης παρόμοια με την κατανομή που αναφέρεται σε άλλες μελέτες για πληθυσμούς της νότιας Ευρώπης (55,56).

Είναι σημαντικό στο σημείο αυτό να αναφερθούμε στη σημασία της διαφορετικής κατανομής γονιδίων και δίαιτας μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών σε ότι αφορά την αθηρογένεση. Πράγματι, η κατανομή των αλληλομόρφων της apo E στον ελληνικό πληθυσμό (57) είναι σημαντικά διαφορετική σε σχέση με την κατανομή σε πληθυσμούς της βόρειας Ευρώπης (58). Επιπρόσθετα, η δίαιτα του ελληνικού πληθυσμού έχει πολλές διαφορές σε σύγκριση με τη δίαιτα των βορειοευρωπαίων (59). Είναι κατά συνέπεια ιδιαίτερα πιθανό ότι η επίδραση του γονοτύπου της apo E στην ανταπόκριση των δεικτών της φλεγμονής στο ALA να είναι ειδική και συγκεκριμένη για τον ελληνικό πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, είναι δυνατό οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων και διατροφής να εξηγούν τουλάχιστον μερικώς τις διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα σε πληθυσμούς ως προς την ανταπόκρισή τους στη δίαιτα (60). Η έννοια της αλληλεπίδρασης γονιδίων και διατροφής περιγράφει την τροποποίηση της επίδρασης συστατικών της δίαιτας σε ένα

συγκεκριμένο φαινότυπο (για παράδειγμα τη συγκέντρωση των λιπιδίων στο πλάσμα) από ένα γενετικό πολυμορφισμό. Εναλλακτικά, η έννοια αναφέρεται στην τροποποίηση από τη δίαιτα μιας επίδρασης της γενετικής ποικιλίας σε ένα χαρακτηριστικό του φαινοτύπου. Παρόλο που υπάρχει ένας αριθμός μελετών για την επίδραση της αλληλεπίδρασης γονιδίων και διατροφής στην ανάπτυξη νόσων, η αλληλεπίδραση γονιδίων και διατροφής χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στις ισομορφές της apo E και την φλεγμονώδη απάντηση είναι άγνωστοι, το γεγονός όμως ότι η apo E εμπλέκεται στην ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντησης (4) υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να ισχύει. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η apo E αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (61) και μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό CD4 και CD8 T κυττάρων που ενεργοποιείται μέσω μιτογόνων (7). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υποδεικνύουν άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην ανασταλτική ικανότητα διαφορετικών λιποπρωτεϊνών και την περιεκτικότητά τους σε apo E. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό ότι αυτή η κατασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού δεν είναι μια κυτταροτοξική επίδραση καθώς επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο άλλα αποτελέσματα της διέγερσης μέσω μιτογόνων όπως είναι η παραγωγή IL-2 και ιντερφερόνης-γ από τα T λεμφοκύτταρα (4,7). Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο που και πώς δρα η apo E ώστε να αναστέλλει την ανταπόκριση των λεμφοκυττάρων ή πώς γενικότερα τροποποιεί την φλεγμονώδη διαδικασία. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται ώστε να διευκρινισθούν τα ζητήματα αυτά και να περιγραφεί ο τρόπος με τον οποίο οι ισομορφές της apo E μπορούν να τροποποιούν τις δράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων στη φλεγμονή.

Ένας αριθμός περιορισμών της παρούσας μελέτης θα πρέπει να αναφερθεί. Πρώτα από όλα, η μελέτη είναι μια απλή-τυφλή μελέτη παράλληλου σχεδιασμού με χρήση εικονικού φαρμάκου αντί για μια μελέτη διασταυρούμενων ομάδων δύο φάσεων η οποία είναι ισχυρότερη στην αποκάλυψη στατιστικών διαφορών. Παρόλα αυτά, ένας σχεδιασμός διασταυρούμενων ομάδων θα ήταν δυνατό να οδηγήσει στο φαινόμενο της παραμονής επιδράσεων από προηγούμενο χρονικό διάστημα καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την περίοδο «αποτοξίνωσης» που απαιτείται μετά την χορήγηση ALA. Ένας δεύτερος περιορισμός της μελέτης αφορά την ημερήσια δόση του ALA που χορηγήσαμε μέσω του λινελαίου η οποία είναι δύσκολο να επιτευχθεί μέσω μιας συνήθους διαίτας. Παρόλα αυτά, προϊόντα όπως μαργαρίνες εμπλουτισμένες με τα

κατάλληλα λιπαρά οξέα μπορούν να παραχθούν για το σκοπό αυτό από τη σχετική βιομηχανία. Ένας τελευταίος περιορισμός αφορά τον μικρό αριθμό ατόμων στις ομάδες των φορέων των ε2 και ε4 αλληλομόρφων. Αυτός είναι ένας κοινός περιορισμός των μελετών παρέμβασης στις οποίες η συμμόρφωση των συμμετεχόντων είναι χαμηλή.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η χορήγηση ALA σε δυσλιπιδαιμικούς εθελοντές είχε ευεργετική επίδραση στον M-CSF και άλλους συστηματικούς δείκτες της φλεγμονής ενώ ο γονότυπος της apo E επηρεάζει την ανταπόκριση σε αυτή την διαιτητική θεραπεία. Λόγω του περιορισμένου αριθμού των φορέων των αλληλομόρφων ε2 και ε4, τα αποτελέσματα αυτά χρειάζονται επιβεβαίωση από μεγαλύτερη μελέτη στην οποία ο έλεγχος του γονοτύπου θα είναι προοπτικός και θα χρησιμοποιείται για την επιλογή των εθελοντών της μελέτης. Αυτό θα επιτρέψει την ύπαρξη ομάδων με τον ίδιο αριθμό ατόμων με διαφορετικό γονότυπο και έτσι θα μεγιστοποιήσει τη στατιστική ισχύ του μοντέλου. Παρόλα αυτά, η μελέτη μας παρέχει προκαταρκτικές ενδείξεις που υποδεικνύουν την ύπαρξη ρόλου του πολυμορφισμού της apo E στη ρύθμιση των επιδράσεων των ω-3 λιπαρών οξέων, εύρημα που εάν επιβεβαιωθεί θα έχει δυνητικά κλινική σημασία.

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε του εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη. Οι συγγραφείς ευχαριστούν επίσης τους γιατρούς Γ. Αναστασιάδη, Ε. Καρποδίνη και Ε. Θεριού καθώς και το προσωπικό της καρδιολογικής κλινικής του Λαϊκού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου, για τη βοήθεια που παρείχαν.

Η μελέτη υποστηρίχθηκε από το ελληνικό υπουργείο ανάπτυξης, Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (χρηματοδότηση 97ΕΛ-55) και μερικώς από την Becel/Ελαΐς.

Αναφορές

1. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 299-309.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.

3. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-1255.
4. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 243-251.
5. Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis DP. Apolipoprotein E polymorphism and Atherosclerosis. *Angiology* 2003; 54: 59-71.
6. Brand K, Mackman N, Curtiss LK. Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J Clin Invest* 1993; 91: 2031-2039.
7. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol* 1994; 159: 124-139.
8. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
9. Boerwinkle E, Visvikis S, Welsh D, et al. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Med Gene.* 1987; 27: 567-582.
10. Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H. Serum cholesterol response to dietary cholesterol and apoprotein E phenotype. *Lancet* 1988; 2: 1261.
11. Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P et al. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1994; 35: 1965-1975.
12. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996; 313: 84-90.
13. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE et al. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 890-897.

14. de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994; 343:1454-1459.
15. Kromhout D, Keys A, Aravanis C et al. Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 889-894.
16. Sandker GW, Kromhout D, Aravanis C et al. Serum cholesteryl ester fatty acids and their relation with serum lipids in elderly men in Crete and The Netherlands. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 201-208.
17. Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 1028-1034.
18. Wardlaw GM, Snook JT, Lin MC, Puangco MA, Kwon JS. Serum lipid and apolipoprotein concentrations in healthy men on diets enriched in either canola oil or safflower oil. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 104-110.
19. Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998; 80: 163-167.
20. Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 221-227.
21. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 343-348.
22. Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, Velissaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A. Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 2003; 167: 237-242.
23. Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 2000; 343: 1179-1182.
24. Koenig W, Sund M, Frohlich M et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and

- Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999; 99: 237-242.
25. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 537-547.
 26. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3186-3190.
 27. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 301-316.
 28. DeGraba TJ. Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* 1997; 49: 15-19.
 29. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1730-1736.
 30. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990; 83: 59-67.
 31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
 32. Reymer WA, Groenemeyer BE, van de Burg R, Kastelein J. Apolipoprotein E genotyping on agarose gels. *Clin.Chem* 1995; 41: 1046-1047.
 33. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1645-1654.
 34. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*. 1999; 354: 447-455.
 35. Harris WS, Park Y, Isley WL. Cardiovascular disease and long-chain omega-3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 9-14.

36. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002; 21: 495-505.
37. Nydahl M, Gustafsson IB, Ohrvall M, Vessby B. Similar serum lipoprotein cholesterol concentrations in healthy subjects on diets enriched with rapeseed and with sunflower oil. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 128-137.
38. Singer P, Wirth M, Berger I. A possible contribution of decrease in free fatty acids to low serum triglyceride levels after diets supplemented with n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1990; 83: 167-175.
39. Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 11: 485-491.
40. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 116-122.
41. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G et al. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 2001; 36: 1183-1193.
42. Kew S, Banerjee T, Minihane AM et al. Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1287-1295.
43. Ordovas JM. The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 171-187.
44. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC et al. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1990-1997.
45. Nestel PJ, Pomeroy SE, Sasahara T et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1163-1170.

46. Deiana L, Res GM, Carru C et al. Lack of influence of apolipoprotein E4 on lipoprotein levels in the island population of Sardinia. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 290-294.
47. Aguilar CA, Talavera G, Ordovas JM et al. The apolipoprotein E4 allele is not associated with an abnormal lipid profile in a native American population following its traditional lifestyle. *Atherosclerosis* 1999; 142: 409-414.
48. Kolovou G, Yiannakouris N, Hatzivassiliou M et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with myocardial infarction in Greek patients with coronary artery disease. *Curr Med Res Opin* 2002; 18: 118-124.
49. Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum free cultures. *J Immunol* 1987; 139: 3703-3709.
50. Caughey GE, Pouliot M, Cleland LG, James MJ. Regulation of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta synthesis by thromboxane A2 in non-adherent human monocytes. *J Immunol* 1997; 158: 351-358.
51. McCarty MF. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med Hypotheses* 1999; 52: 465-477.
52. Herity NA. Interleukin 6: a message from the heart. *Heart* 2000; 84: 9-10.
53. Manttari M, Manninen V, Palosuo T, Ehnholm C. Apolipoprotein E polymorphism and C-reactive protein in dyslipidemic middle-aged men. *Atherosclerosis* 2001; 156: 237-238.
54. Bach-Ngohou K, Nazih H, Nazih-Sanderson F et al. Negative and independent influence of apolipoprotein E on C-reactive protein (CRP) concentration in obese adults. Potential anti-inflammatory role of apoE in vivo. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1752-1758.
55. James RW, Boemi MG, Giansanti R, Fumelli R, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Tromb* 1993; 13: 1456-1459.
56. Bailleul S, Couders R, Landais V, Lefevre G, Rainhvarg D, Etienne J. Direct phenotyping of human apolipoprotein E in plasma: application to population frequency distribution in Paris (France). *Hum Hered* 1993; 43: 159-165.

57. Kolovou GD, Daskalova DC, Hatzivassiliou M et al. The epsilon 2 and 4 alleles of apolipoprotein E and ischemic vascular events in the Greek population – Implications for the interpretation of similar studies. *Angiology* 2003; 54: 51-58.
58. Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M et al. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis* 2000; 152: 475-488.
59. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003; 348: 2599-2608.
60. Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1098-1111.
61. Pepe MG, Curtiss LK. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol* 1986; 136: 3716-3723.

Πίνακας 1. Σύνθεση του λινελαίου σε λιπαρά οξέα, ολικές στερόλες και ολικές τοκοφερόλες (ανά 100 γραμμάρια).

<u>Συστατικά</u>	
Παλμιτικό οξύ (γρ.)	5·9
Στεαρικό οξύ (γρ.)	3·6
Ελαϊκό οξύ (γρ.)	18·2
Λινελαϊκό οξύ (γρ.)	13·9
α-λινολενικό οξύ (γρ.)	54·2
Ολικές στερόλες (γρ.)	0·4
Ολικές τοκοφερόλες (μγρ.)	54·27

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά και σύνθεση της δίαιτας ανάλογα με το γονότυπο της apo E.

<u>Μεταβλητή</u>	Σύνολο (n=50)	ε2/ε3 (n=7)	ε3/ε3 (n=33)	ε3/ε4 (n=10)	<i>P</i> -τιμή
Ηλικία (έτη)	50.4 ± 7.3	51.1 ± 5.0	52.0 ± 7.1	47.6 ± 6.8	0.031
BMI (κιλά/μ ²)	28.4 ± 3.4	27.6 ± 2.5	28.5 ± 3.9	28.7 ± 2.6	0.70
Συστολική ΑΠ (mm Hg)	121.8 ± 12.0	120.7 ± 11.0	122.4 ± 12.7	120.7 ± 11.2	0.68
Διαστολική ΑΠ (mm Hg)	79.2 ± 8.5	79.3 ± 7.9	79.3 ± 9.3	78.5 ± 7.1	0.75
ΛΚ (x10 ³)	6.8 ± 1.9	7.4 ± 2.4	6.9 ± 2.0	6.1 ± 1.2	0.23
Καπνιστές (ναι/όχι)	22/28	4/3	15/18	3/7	0.53
<u>Διαιτητική πρόσληψη</u>					
Ενέργεια (joules)	2181 ± 243	2213 ± 262	2177 ± 250	2196 ± 231	0.49
Πρωτεΐνες %	15.1 ± 2.4	15.0 ± 3.3	15.2 ± 5.4	14.9 ± 4.4	0.59
Υδατάνθρακες %	47.7 ± 3.8	48.3 ± 6.3	47.5 ± 12.4	48.0 ± 7.5	0.77
Λίπη %	35.9 ± 4.1	36.5 ± 4.6	35.7 ± 8.5	37.1 ± 5.3	0.63
SFAs (γρ.)	16.1 ± 3.6	16.2 ± 3.2	16.1 ± 3.4	16.1 ± 3.5	0.30
MUFAs (γρ.)	14.9 ± 3.3	14.5 ± 3.4	14.7 ± 3.2	15.5 ± 3.7	0.39
PUFAs (γρ.)	5.5 ± 1.2	5.3 ± 1.6	5.5 ± 1.3	5.5 ± 1.4	0.47
ALA (γρ.)	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.53
EPA (γρ.)	0.3 ± 0.06	0.4 ± 0.10	0.3 ± 0.09	0.4 ± 0.06	0.62
DHA (γρ.)	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.07	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.08	0.82
Χοληστερόλη (μγρ.)	216 ± 27.0	215 ± 29.3	216 ± 28.2	214 ± 26.4	0.73
Αλκοόλ %	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.4	0.57
Βιταμίνη C (μγρ.)	120.1 ± 14.6	120.2 ± 23.3	119.7 ± 18.1	119.3 ± 20.4	0.46
Διαιτητικές ίνες (γρ.)	25.4 ± 3.0	25.8 ± 4.5	25.2 ± 4.2	24.7 ± 4.5	0.38

BMI, δείκτης μάζας σώματος; ΑΠ, αρτηριακή πίεση; ΛΚ, λευκοκύτταρα BP, SFAs, κορεσμένα λιπαρά οξέα; MUFAs, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα; PUFAs, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα; ALA, α-λινολενικό οξύ; EPA, εικοσαπενταενοϊκό οξύ; DHA, δοκοσαεξαενοϊκό οξύ

Πίνακας 3. Προφίλ λιποπρωτεϊνών ορού δυσλιπιδαιμικών ατόμων πριν και μετά τη χορήγηση ALA για 12 εβδομάδες και στις υποομάδες που ορίζει ο γονότυπος της apo E.

	Πριν	Μετά	
Μεταβλητή	Μέσος ± ΤΑ	Μέσος ± ΤΑ	P-τιμή ^a
Ολική χοληστερόλη (mmol/L)*			
Σύνολο (n=50)	5.98 ± 0.87	5.84 ± 0.95	0.27
ε2/ε3 (n=7)	5.70 ± 1.02	5.72 ± 1.32	0.94
ε3/ε3 (n=33)	6.12 ± 0.83	5.92 ± 0.85	0.16
ε3/ε4 (n=10)	5.72 ± 0.86	5.66 ± 1.06	0.89
LDL- χοληστερόλη (mmol/L)*			
Σύνολο (n=50)	3.97 ± 0.95	3.90 ± 0.92	0.33
ε2/ε3 (n=7)	3.74 ± 0.79	3.48 ± 0.76	0.29
ε3/ε3 (n=33)	4.16 ± 0.79	3.95 ± 0.91	0.10
ε3/ε4 (n=10)	3.89 ± 0.83	3.88 ± 1.10	0.57
πυκνότητα LDL (g/mL)*			
Σύνολο (n=50)	1.029 ± 0.003	1.029 ± 0.004	0.88
ε2/ε3 (n=7)	1.028 ± 0.004	1.028 ± 0.004	0.56
ε3/ε3 (n=33)	1.029 ± 0.003	1.029 ± 0.004	0.91
ε3/ε4 (n=10)	1.030 ± 0.004	1.030 ± 0.003	0.65
HDL- χοληστερόλη (mmol/L)*			
Σύνολο (n=50)	1.10 ± 0.27	1.06 ± 0.26	0.011
ε2/ε3 (n=7)	1.13 ± 0.29	1.10 ± 0.27	0.51
ε3/ε3 (n=33)	1.12 ± 0.26	1.08 ± 0.28	0.008
ε3/ε4 (n=10)	1.00 ± 0.28	0.97 ± 0.18	0.53
Τριγλυκερίδια (mmol/L)*			
Σύνολο (n=50)	1.74 ± 0.95	1.83 ± 1.01	0.38
ε2/ε3 (n=7)	1.60 ± 0.47	1.70 ± 0.67	0.20
ε3/ε3 (n=33)	1.83 ± 1.01	1.95 ± 1.15	0.39
ε3/ε4 (n=10)	1.51 ± 1.01	1.47 ± 0.45	0.83
Απο Α-I (g/L)*			
Σύνολο (n=50)	1.27 ± 0.15	1.23 ± 0.17	0.030
ε2/ε3 (n=7)	1.20 ± 0.18	1.16 ± 0.14	0.18
ε3/ε3 (n=33)	1.28 ± 0.14	1.24 ± 0.18	0.036
ε3/ε4 (n=10)	1.25 ± 0.16	1.24 ± 0.16	0.88
Απο Β (g/L)*			
Σύνολο (n=50)	1.22 ± 0.14	1.21 ± 0.18	0.60
ε2/ε3 (n=7)	1.20 ± 0.14	1.17 ± 0.22	0.48
ε3/ε3 (n=33)	1.23 ± 0.13	1.20 ± 0.16	0.64
ε3/ε4 (n=10)	1.20 ± 0.18	1.26 ± 0.22	0.26

ALA, α-λινολενικό οξύ; Απο, απολιποπρωτεΐνη

* Μη σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες του apo E κατά την έναρξη

^a P-τιμές από t-tests για σχετιζόμενες τιμές. Λογαριθμική τροποποίηση έγινε για τις τιμές τριγλυκεριδίων apo A-I και apo B πριν την ανάλυση.

Πίνακας 4 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής στον ορό δυσλιπιδαιμικών ατόμων πριν και μετά τη χορήγηση ALA για 12 εβδομάδες και στις υποομάδες που ορίζει ο γονότυπος της apo E.

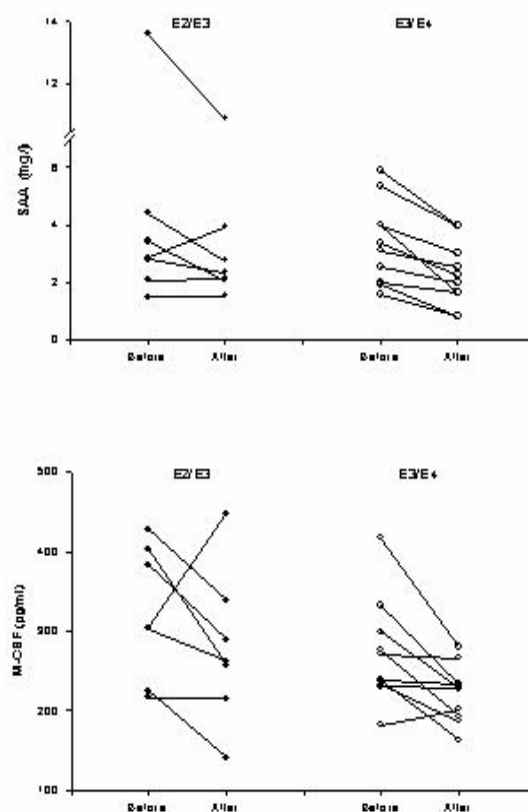
<i>Μεταβλητή</i>	Πριν		Μετά		<i>P-τιμή</i> ^a
	Μέσος ± TA	Διάμεσος [25 ^ο -75 ^ο εκατοστημόριο]	Μέσος ± TA	Διάμεσος [25 ^ο -75 ^ο εκατοστημόριο]	
SAA (mg/L) *					
Σύνολο (n=48)	4.4 ± 4.1	3.2 [2.3-5.3]	3.0 ± 2.7	2.4 [1.6-3.8]	<0.001
ε2/ε3 (n=7)	4.4 ± 4.2	2.9 [2.1-4.4]	3.7 ± 3.3	2.3 [2.1-3.9]	0.24
ε3/ε3 (n=31)	4.7 ± 4.7	3.0 [2.3-5.4]	3.1 ± 2.9	2.4 [1.5-3.9]	0.014
ε3/ε4 (n=10)	3.4 ± 1.4	3.2 [2.0-4.3]	2.3 ± 1.1	2.1 [1.4-3.2]	0.005
CRP (mg/L) *					
Σύνολο (n=50)	3.01 ± 3.95	1.24 [0.71-3.70]	1.57 ± 1.65	0.93 [0.56-1.93]	0.002
ε2/ε3 (n=7)	3.23 ± 2.73	1.43 [1.07-5.78]	1.85 ± 1.28	1.84 [0.53-2.98]	0.091
ε3/ε3 (n=33)	3.29 ± 4.54	1.24 [0.62-3.37]	1.69 ± 1.88	0.99 [0.56-1.79]	0.013
ε3/ε4 (n=10)	1.94 ± 2.19	1.09 [0.66-2.48]	0.97 ± 0.77	0.71 [0.35-1.68]	0.33
M-CSF (pg/mL)*					
Σύνολο (n=50)	310 ± 84	295 [258-364]	250 ± 75	241 [193-280]	<0.001
ε2/ε3 (n=7)	323 ± 84	304 [225-403]	276 ± 99	262 [196-339]	0.18
ε3/ε3 (n=33)	319 ± 87	295 [265-365]	253 ± 77	248 [192-281]	<0.001
ε3/ε4 (n=10)	272 ± 66	255 [232-307]	221 ± 36	229 [192-242]	0.017
IL-6 (pg/mL) *					
Σύνολο (n=50)	3.2 ± 2.8	2.2 [1.4-3.9]	2.4 ± 1.7	1.7 [1.3-2.9]	0.024
ε2/ε3 (n=7)	2.7 ± 1.0	2.5 [1.7-3.3]	2.4 ± 1.2	2.1 [1.6-3.4]	0.61
ε3/ε3 (n=33)	3.4 ± 3.3	2.3 [1.3-4.3]	2.5 ± 1.9	1.7 [1.3-3.0]	0.028
ε3/ε4 (n=10)	2.5 ± 1.8	1.7 [1.2-4.5]	1.8 ± 1.0	1.6 [1.2-2.3]	0.37

ALA, α-λινολενικό οξύ; SAA, αμυλοειδές Α του ορού; CRP, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη; M-CSF, παράγοντας ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων; IL-6, ιντερλευκίνη-6

* Μη σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες του apo E κατά την έναρξη με την ανάλυση Kruskal-Wallis test

^a P-τιμές με μη-παραμετρική ανάλυση (Wilcoxon) test

Εικόνα 1. Τιμές συγκεντρώσεων αμυλοειδούς Α του ορού (SAA) και παράγοντα ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων (M-CSF) πριν και μετά τη χορήγηση α-λινολενικού οξέος (ALA) για 12 εβδομάδες των ατόμων στις ομάδες με γονότυπο απολιποπρωτεΐνης E ε2/ε3 και ε3/ε4.



Κεφάλαιο 9. Δημοσιεύσεις σε περιοδικά με ανεξάρτητους κριτές



Atherosclerosis 167 (2003) 237–242

ATHEROSCLEROSIS

www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patientsLoukianos S. Rallidis^{a,*}, Georgios Paschos^b, Georgios K. Liakos^c, Aggeliki H. Velissaridou^c, Georgios Anastasiadis^d, Antonis Zampelas^b^a Department of Cardiology, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece^b Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece^c Biochemistry Laboratory, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece^d Department of Cardiology, Laiko Hospital, Athens, Greece

Received 1 July 2002; received in revised form 18 November 2002; accepted 6 December 2002

Abstract

Background: Inflammation plays an important role in the pathogenesis of coronary artery disease. We examined whether dietary supplementation with α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) affects the levels of inflammatory markers in dyslipidaemic patients. **Methods:** We recruited 76 male dyslipidaemic patients (mean age = 51 ± 8 years) following a typical Greek diet. They were randomly assigned either to 15 ml of linseed oil (rich in ALA) per day ($n = 50$) or to 15 ml of safflower oil (rich in linoleic acid (LA, 18:2n-6)) per day ($n = 26$). The ratio of n-6:n-3 in linseed oil supplemented group was 1.3:1 and in safflower oil supplemented group 13.2:1. Dietary intervention lasted for 3 months. Blood lipids and C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), and interleukin-6 (IL-6) levels were determined prior and after intervention. CRP and SAA were measured by nephelometry and IL-6 by immunoassay. **Results:** Dietary supplementation with ALA decreased significantly CRP, SAA and IL-6 levels. The median decrease of CRP was 38% (1.24 vs. 0.93 mg/l, $P = 0.0008$), of SAA 23.1% (3.24 vs. 2.39 mg/l, $P = 0.0001$) and of IL-6 10.5% (2.18 vs. 1.7 pg/ml, $P = 0.01$). The decrease of inflammatory markers was independent of lipid changes. Dietary supplementation with LA did not affect significantly CRP, SAA and IL-6 concentrations but decreased cholesterol levels. **Conclusions:** Dietary supplementation with ALA for 3 months decreases significantly CRP, SAA and IL-6 levels in dyslipidaemic patients. This anti-inflammatory effect may provide a possible additional mechanism for the beneficial effect of plant n-3 polyunsaturated fatty acids in primary and secondary prevention of coronary artery disease.

© 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: α -Linolenic acid; C-reactive protein; Dyslipidaemia; Interleukin-6; Linoleic acid; Serum amyloid A

1. Introduction

There is substantial evidence that inflammation plays a central role in all phases of the atherosclerotic process [1]. Our understanding of atherosclerosis has evolved beyond the view that it is a bland lipid storage disease. Clinical studies show correlation of circulating acute phase reactants or cytokines with increased risk for future vascular events and raise the possibility of active contribution to their pathogenesis [2,3].

Dietary fats rich in α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) have been reported to modulate some of the inflammatory responses in experimental animal models [4] and clinical trials [5]. ALA is an essential fatty acid present in vegetable oils. It is the precursor for the formation of the marine long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) eicosapentaenoic acid (EPA) (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA) (22:6n-3) which can displace arachidonic acid (20:4n-6) and reduce the production of proinflammatory eicosanoids prostaglandin E_2 and leukotriene B_4 . Arachidonic acid is derived by desaturation and elongation of linoleic acid (LA) (18:2n-6).

Epidemiological studies indicate that there is an inverse association between dietary ALA and risk of

* Corresponding author. Address: 74 Thermopylon Street, Argroupolis 16451, Greece. Tel./fax: +30-210-992-9106.
E-mail address: rallidis@ath.forthnet.gr (L.S. Rallidis).

myocardial infarction [6–8]. In the Lyon Diet Heart Study a Mediterranean diet rich in ALA was beneficial in secondary prevention of myocardial infarction [9]. A number of studies have also investigated the effect of ALA on blood lipid levels and indicated that its possible antiatherogenic properties are not due to the improvement in blood lipid profile [10–14].

As there is no study to correlate dietary ALA with inflammatory markers we investigated whether dietary supplementation with ALA affects the levels of acute phase reactants C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) and the cytokine interleukin-6 (IL-6) in dyslipidaemic patients.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Subjects were recruited from the Department of Cardiology of 'Laiko' Hospital and were then screened regarding their health status, medication usage, diet and exercise pattern. Subjects with presence of infection, endocrine, liver or vascular disease, blood pressure > 145/95 mmHg, on medication known to affect lipoprotein metabolism, habitual consumption of > 30 units alcohol per week, smoking habits (≥ 10 cigarettes per day) or habitual undertaking of > 6 h of vigorous exercise per week were excluded from the study. Intake of anti-inflammatory drugs or vitamin or other dietary supplements was forbidden during the experimental period.

2.2. Study design

Our study was an interventional study of parallel design. We followed a 2:1 process to form the ALA (subjects supplied with ALA) and LA (subjects supplied with LA) group, respectively. Experimental period lasted for 12 weeks. Subjects screened at entry to be following the average Greek diet. They were asked to maintain their dietary habits and usual lifestyle. Subjects were randomly divided into two groups and assigned to one of the two oils supplementation: ALA group 15 ml of linseed oil per day containing approximately 8 g of ALA and LA group 15 ml of safflower oil per day containing approximately 11 g of LA. The intake was designed to be such in order to achieve a n-6:n-3 ratio of 1.3:1 in the ALA group and 13.2:1 in the LA group as well as to keep the total fat intake constant in both groups. Linseed and safflower oils were provided by Savant International, UK. Supplement was taken three times per day, one teaspoon of 5 ml per meal. Blood samples collection was carried out following a 12-h fast. The volunteers were asked to keep a record of what they consumed the day before the first blood collection and

Table 1
Oils composition per 100 g

	linseed oil	safflower oil
Palmitic acid (g)	5.9	5.7
Stearic acid (g)	3.6	2.4
Arachidonic acid (g)	–	0.5
Oleic acid (g)	18.2	11.5
Eicosapentaenoic acid (g)	–	0.5
Linoleic acid (g)	13.9	74.4
α -Linolenic acid (g)	54.2	0.5
Total sterols (g)	0.4	0.4
Total tocopherols (mg)	54.27	48.21

they were also asked to consume exactly the same meals the day before the second blood collection.

The composition of the two oils is given in Table 1. The study design was approved by the Ethical Committee of the Harokopio University and the volunteers gave their informed consent. The subjects visited the Department of Cardiology at 'Laiko' Hospital once a month and the oils were provided to them. The subjects were weighed at each visit and were asked for their smoking and physical activity habits.

2.3. Diets

Dietary assessment based on a food frequency questionnaire was used to define the background diet of the subjects. Frequency of milk, bread, fruits, vegetables, legume, olive oil, fish and meat consumption was recorded together with a dietary 24 h recall. The subjects' dietary intake during the intervention period was checked by one 3-day dietary record per month. The recorded days comprised of 2 weekdays and 1 weekend day. The diet diaries were analyzed by the NUTRITION-IST v program (Version 2.1 First Data Bank Inc. USA). Supervision for smoking habit, body mass index, physical activity and dietary habits was checked by phone calls once a week and by monthly visits to the hospital.

2.4. Blood sampling and laboratory methods

The volunteers attended the Department of Cardiology at 'Laiko' Hospital twice for blood collection, at the beginning and the end of the experimental period. At each visit, and after a 12-h overnight fast, blood samples were collected at 08:00 h. Subjects laid supine for 10 min prior to the blood collection. Blood was collected into a glass tube without preservative (Vacutainer tube, Becton Dickinson) for serum lipids and inflammatory indices determination. All samples were collected without occlusion. The Vacutainer tubes were kept on ice and were then centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C

within 2 h from blood collection. Serum samples were stored at -80°C for further analysis.

Plasma total cholesterol, triglycerides, and high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels were determined using enzymatic colorimetric assays on an ACE analyzer (Sciapparelli Biosystems Inc., USA). Total cholesterol and triglycerides determination included reactions of hydrolyzation and oxidation. Analysis of serum HDL cholesterol concentrations was carried out by a liquid stable reagent-immunoinhibition method. Low density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated by the Friedewald equation [15].

CRP was assayed by high sensitivity particle-enhanced immunonephelometry (N Latex, Date-Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) with a range from 0.175 to 1100 mg/l. SAA was also measured by particle-enhanced immunonephelometry (N Latex, Date-Behring Marburg GmbH) with a range from 0.75 to 1000 mg/l. IL-6 was assayed by enzyme linked immunoassay (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) with a range from 0.156 to 10 pg/ml. The intra-assay and inter-assay coefficient of variation for CRP and SAA was $<5\%$ and for IL-6 $<12\%$. All samples were assayed by a single operator blinded to the timing of sampling and type of dietary intervention. The measurements were performed at the Biochemistry Laboratory of General Hospital of Nikea.

2.5. Statistical analysis

The data on CRP, SAA and IL-6 which were not normally distributed were expressed as medians. Differences of inflammatory markers within and between groups were analysed by Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney *U*-test. Differences for the normally distributed variables were analysed with the Student *t*-test. Pearson's correlation coefficients were used to assess relationships between variables. Discontinuous variables were tested by a contingency χ^2 -test. A *P* value <0.05 was considered significant. The Stat View™ II statistical package was used.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

A total number of 76 subjects completed the study. ALA and LA group were matched for age (50.4 ± 7.3 vs. 52 ± 7.7 , $P=0.33$) and body mass index (28.42 ± 3.44 vs. 28 ± 3.19 , $P=0.63$). The percentage of light smokers (<10 cigarettes per day) was similar in the two groups (24 vs. 23%, $P=0.85$). None of the participating subjects changed his smoking habits during the intervention period. The n-6:n-3 ratios were comparable in the background diets of the two groups (7.5:1 and 7:1)

while after the supplementation the ratios changed to 1.3:1 and 13.2:1 in the ALA and LA groups, respectively. Despite supplementation the calories intake from fat in both groups was similar. In addition, no differences in nutrient intake between ALA and LA groups were observed, during the intervention period (Table 2).

Lipid profile and inflammatory markers at baseline in the two groups are shown in Table 3.

3.2. Serum lipids and inflammatory markers after dietary intervention

Regarding plasma lipid levels, in ALA group cholesterol levels remained unaltered whereas in LA group they were decreased ($P=0.04$) (Table 3). On the other hand, in ALA group, HDL cholesterol levels were decreased ($P=0.005$).

CRP, SAA and IL-6 levels showed a statistically significant reduction after administration of ALA (Table 3). The median decrease of CRP was 38%, of SAA 23.1% and of IL-6 10.5%. Inflammatory markers did not show any statistical difference after the administration of diet rich in LA (Table 3). In addition, we compared changes (Δ = levels prior-levels after intervention) in CRP, SAA and IL-6 in ALA group with changes in CRP, SAA and IL-6 in LA group. ΔCRP , ΔSAA and $\Delta\text{IL-6}$ in the ALA group differed significantly from corresponding changes in the LA group (0.525 (-0.13 – 2.46) vs. 0.04 (-0.41 – 0.4), $P=0.01$, 0.75 (-0.03 – 1.91) vs. 0.04 (-0.6 – 0.59), $P=0.03$ and 0.19 (-0.04 – 1.46) vs. 0.04 (-1.05 – 0.48), $P=0.04$, respectively).

The reduction of inflammatory markers in the ALA group was independent of lipid changes since there was no significant correlation between changes in inflammatory markers with those in lipids (Table 4). Changes in one inflammatory marker in the ALA group were correlated significantly with changes of each other inflammatory marker (ΔCRP vs. ΔSAA , $r=0.62$, $P=0.001$, ΔCRP vs. $\Delta\text{IL-6}$, $r=0.53$, $P=0.0001$ and ΔSAA vs. $\Delta\text{IL-6}$, $r=0.62$, $P=0.001$).

4. Discussion

Our study indicates that dyslipidaemic patients demonstrate a significant reduction in inflammatory indices when supplied with ALA but not with LA diet for 3 months.

We did not use exactly the same amounts of ALA and LA supplements in the ALA and LA groups, respectively. This occurred because we were aiming to lower the n-6:n-3 ratio at physiologically realistic levels. Our target was to decrease the n-6:n-3 ratio in the ALA group and to increase the n-6:n-3 ratio in the LA group. Therefore, with the amounts of ALA and LA that we chose we achieved a n-6:n-3 ratio in the ALA group of

Table 2

Mean daily intakes of energy and nutrients for dyslipidaemic subjects on ALA and LA enriched diets

Diet	ALA group (mean $\pm$ S.D.)	LA group (mean $\pm$ S.D.)	P value
Proteins %	15.1 $\pm$ 2.4	14.9 $\pm$ 2.2	0.564
Carbohydrates %	47.7 $\pm$ 3.8	47.8 $\pm$ 4.2	0.613
Fats %	35.9 $\pm$ 4.1	35.9 $\pm$ 4.4	0.477
Alcohol %	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	0.524
Energy (kcal)	2181.8 $\pm$ 243.1	2183.2 $\pm$ 237.6	0.638
Proteins (g)	82.4 $\pm$ 10.3	81.3 $\pm$ 11.5	0.356
Carbohydrates (g)	260.2 $\pm$ 20.6	260.9 $\pm$ 21.8	0.672
Fats (g)	87.0 $\pm$ 11.1	87.1 $\pm$ 10.7	0.521
Alcohol (g)	4.1 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 1.3	0.395
Cholesterol (mg)	216.4 $\pm$ 27.0	218.3 $\pm$ 30.6	0.449
Saturated fats (g)	22.8 $\pm$ 2.6	23.2 $\pm$ 2.8	0.518
Monounsaturated fats (g)	46.5 $\pm$ 4.3	46.6 $\pm$ 4.8	0.753
Polyunsaturated fats (g)	11.9 $\pm$ 1.2	12.0 $\pm$ 1.4	0.687
α -Linolenic acid (g)	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.524
Eicosapentaenoic acid (g)	0.3 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.08	0.373
Docosahexaenoic acid (g)	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.04	0.465
Vitamin C (mg)	120.1 $\pm$ 14.6	120.7 $\pm$ 15.3	0.316
Dietary fiber (g)	25.4 $\pm$ 3.0	25.2 $\pm$ 3.6	0.759

1.3:1 and 13.2:1 in the LA group. In addition, these dietary supplementations that we used provided a similar intake of calories from fat in both groups. This is important since differences in total fat intake can modulate the inflammatory responses [16].

The protective effect of foods rich in ALA has been reported both in primary and secondary prevention of coronary artery disease. Ascherio et al. [7] found an inverse association between intake of ALA and risk of coronary artery disease. In the study of Hu et al. [8], the dietary intake of ALA was examined in relation to the risk of fatal ischaemic heart disease among participants in the Nurses' Health Study. According to the results of this study a higher intake of ALA was associated with a lower relative risk of fatal ischaemic heart disease. In the Lyon Diet Heart Study when a Mediterranean ALA rich diet was given in survivors of the first myocardial infarction there was significant reduction of recurrence of cardiac events and overall mortality [9].

Several mechanisms have been proposed to explain the protective effect of ALA [17,18]. Dog studies have shown that acute infusion of ALA can prevent ischaemia-induced ventricular fibrillation [19,20]. Other beneficial effects include an improvement in arterial compliance [21], modest blood pressure reduction [22] and antiplatelet effect [23]. Finally an anti-inflammatory effect has been proposed [24] which is supported by the results of our study.

Atherosclerosis is considered a chronic disorder characterized by low-grade vascular inflammation [1,2]. Inflammatory markers are found elevated in patients with chronic stable angina and acute coronary syndromes and their prognostic value for subsequent coronary events has also been reported [25–27].

In our study CRP, SAA and IL-6 showed a significant reduction after the 3-month dietary intervention with ALA. To our knowledge this is the first study to report these findings. The reduction was observed independently of lipid changes. The exact mechanism of suppression of inflammatory markers is unknown. Caughey et al. [28] reported that diet enriched in ALA inhibited the production of tumor necrosis factor- α and IL-1 β in healthy volunteers. More data exist from diets enriched with marine n-3 PUFAs EPA and DHA. However, it has to be specified that ALA may not fully reproduce the effects of fish oils [17,29]. Dietary supplementation with fish oil in healthy volunteers for 6 weeks suppressed IL-2 production from peripheral mononuclear cells [30]. Kremer et al. [31] reported a reduction in macrophage IL-1 and neutrophil leukotriene B₄ production when dietary fish oil was provided in patients with active rheumatoid arthritis. In another study [32], dietary supplementation with fish oil in healthy volunteers suppressed the capacity of mononuclear cells to synthesize IL-1 β , IL-1 α and tumor necrosis factor- α in vitro.

A possible mechanism for the decreased production of these cytokines is the alteration in the type of arachidonic acid metabolites. n-3 PUFAs induce changes in both cyclooxygenase and lipoxygenase products such as reduction in production of prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ [4]. Both metabolites enhance the release of IL-6 in vitro [33]. Conversely, a decrease in these eicosanoids could explain the reduction of IL-6. IL-6 is a pleiotropic cytokine [34], which controls CRP and SAA hepatic production [35,36]. Therefore, it is plausible to speculate that dietary supplementation with ALA primarily suppresses IL-6 release which secondary suppresses CRP and SAA production. The atherogenic

Table 3

Lipid profile, inflammatory markers and body mass index (BMI) before and after the dietary intervention in the ALA and LA groups

Variables	Before	After	P value
<i>ALA group (n = 50)</i>			
Total cholesterol (mg/dl)	232 ± 34	226 ± 36	0.27
Triglycerides (mg/dl)	155 ± 84	163 ± 87	0.16
HDL cholesterol (mg/dl)	42.7 ± 10.4	41 ± 10.2	0.005
LDL cholesterol (mg/dl)	154 ± 37	152 ± 36	0.59
CRP (mg/l)	1.24 (0.72–3.7)	0.93 (0.56–1.8)	0.0008
SAA (mg/l)	3.24 (2.3–5.3)	2.39 (1.7–3.9)	0.0001
IL-6 (pg/ml)	2.18 (1.35–3.9)	1.7 (1.3–2.8)	0.01
BMI (kg/m ²)	28.42 ± 3.44	28.40 ± 3.44	0.25
<i>LA group (n = 26)</i>			
Total cholesterol (mg/dl)	234 ± 46*	218 ± 46	0.04
Triglycerides (mg/dl)	173 ± 113*	156 ± 86	0.13
HDL cholesterol (mg/dl)	39.2 ± 7.4*	38.3 ± 8	0.25
LDL cholesterol (mg/dl)	154 ± 43*	149 ± 44	0.36
CRP (mg/l)	1.54 (0.62–3.1)*	1.25 (0.64–1.7)	0.35
SAA (mg/l)	3.52 (2.1–4.9)*	3.34 (2.15–4.4)	0.58
IL-6 (pg/ml)	1.77 (1.3–2.7)*	2.2 (1.1–2.7)	0.69
BMI (kg/m ²)	28 ± 3.19*	28 ± 3.22	0.8

Values of inflammatory markers are expressed as median and 25th and 75th percentile. CRP, C-reactive protein; HDL, high density lipoprotein; IL-6, interleukin-6; LDL, low density lipoprotein; SAA, serum amyloid A.

* P = NS (lipid, inflammatory markers and BMI of LA group vs. corresponding levels of lipid, inflammatory markers and BMI of ALA group).

potential of the inflammatory markers, such as CRP [37], favors our hypothesis that the anti-inflammatory effect of ALA may reflect a beneficial anti-atherogenic action.

Supplementation with LA decreased significantly total cholesterol levels. This finding is well documented and is known to be due to an increased synthesis of LDL receptors. However, supplementation with ALA did not change total cholesterol levels but it decreased HDL cholesterol levels. Other studies also suggest that there is no hypolipidaemic effect of ALA. In particular, in the MARGARIN Study, which recruited subjects with multiple cardiovascular risk factors, HDL cholesterol

levels were lower in the ALA group than in the LA group [10]. This comes in accordance with another study which showed that a flaxseed oil/low fat diet providing 20 g of ALA daily for 1 month, resulted in the lowest HDL cholesterol levels, in comparison with the control diet (rich in saturated fatty acids) and a diet supplemented with canola oil (rich in oleic acid) [21]. However, in another study, the effects of an ALA-rich diet on LDL and HDL cholesterol levels did not differ from the effects of a LA-rich diet, in normolipidaemic men [14]. Therefore, the evidence regarding the cardioprotective properties of ALA, as far as the improvement of lipid profile is concerned, is not conclusive.

Few limitations of this study have to be addressed. First, we did not apply a cross-over design which is inherently much stronger than a parallel interventional study. We did it because a cross-over design has the problem of carryover effect as the wash-out period cannot be specified in lipid interventional trials. Counting an intermediate wash-out period of at least 2 months, the total study period should be prolonged to 8 months. This design could raise compliance problems, taking into consideration that compliance in Greek populations is relatively low. Second, the doses of n-3 and n-6 that we provided by the supplements in our study are difficult to be achieved by the usual dietary intake. However, products like spreads fortified with the appropriate fatty acids can be produced by relevant industries. These spreads can substitute other sources of fat in the diet of hyperlipidaemic patients.

In conclusion, dietary supplementation with ALA decreases inflammatory markers in dyslipidaemic pa-

Table 4

Correlation between changes in inflammatory markers and those in lipids in 50 subjects with dietary supplementation with ALA

		r	P value
Δ CRP vs.	Δ cholesterol	−0.07	0.63
	Δ triglycerides	−0.25	0.09
	Δ LDL cholesterol	0.015	0.92
	Δ HDL cholesterol	−0.093	0.52
Δ SAA vs.	Δ cholesterol	−0.068	0.64
	Δ triglycerides	−0.18	0.21
	Δ LDL cholesterol	0.014	0.93
	Δ HDL cholesterol	0.03	0.83
Δ IL-6 vs.	Δ cholesterol	−0.28	0.06
	Δ triglycerides	−0.30	0.07
	Δ LDL cholesterol	−0.16	0.27
	Δ HDL cholesterol	−0.14	0.31

Δ values are values at baseline—values after dietary intervention. Abbreviations as in Table 3.

tients. This anti-inflammatory effect may provide a possible mechanism for the beneficial effect of ALA in primary and secondary prevention of coronary artery disease. The attractiveness of this assumption is enforced by the growing evidence that inflammatory markers are pathophysiologically involved in atherogenesis.

References

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- [2] Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.
- [3] Shah PK. Circulating markers of inflammation for vascular risk prediction. Are they ready for prime time? *Circulation* 2000;105:1758–9.
- [4] Chavali SR, Zhong WW, Forse RA. Dietary α -linolenic acid increases TNF- α , and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS: effects of sesamin on the Δ -5 desaturation of ω 6 and ω 3 fatty acids in mice. *Prostag Leukotr Ess* 1998;58:185–91.
- [5] Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;72:42–8.
- [6] Dolecek TA. Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:177–82.
- [7] Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996;313:84–90.
- [8] Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:890–7.
- [9] De Lorgeuil M, Renaud S, Marmelle N, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994;343:1454–9.
- [10] Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ, et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:221–7.
- [11] Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 1990;51:1028–34.
- [12] McDonald BE, Gerrard JM, Bruce VM, Corner EJ. Comparison of the effect of canola oil and sunflower oil on plasma lipids and lipoproteins and on in vivo thromboxane A2 and prostacyclin production in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 1989;50:1382–8.
- [13] Wardlaw GM, Snook JT, Lin MC, Puangco MA, Kwon JS. Serum lipid and apolipoprotein concentrations in healthy men on diets enriched in either canola oil or safflower oil. *Am J Clin Nutr* 1991;54:104–10.
- [14] Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998;80:163–7.
- [15] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [16] Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669–73.
- [17] de Deckere EAM, Korner O, Verschuren PM, Katan MB. Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:749–53.
- [18] O'Keefe J, Harris WS. Omega-3 fatty acids: time for clinical implementation? *Am J Cardiol* 2000;85:1239–41.
- [19] Kang JX, Leaf A. Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;71:202–7.
- [20] Billman GE, Kang JX, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure ω 3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 1999;99:2452–7.
- [21] Nestel PJ, Pomeroy SE, Sasahara T, et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1163–70.
- [22] Bemelmans WJE, Muskiet FAJ, Feskens EJM, et al. Associations of alpha-linolenic acid and linoleic acid with risk factors for coronary heart disease. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:865–71.
- [23] Lanzmann-Petithory D. Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging* 2001;5:179–83.
- [24] Endres S, von Schacky C. n-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:48–52.
- [25] Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417–24.
- [26] Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94:847–77.
- [27] Rallidis LS, Zolindaki MG, Manioudaki HS, Laoutaris PN, Velissaridou AH, Papasteriadis EG. Prognostic value of C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6, and macrophage colony stimulating factor in severe unstable angina. *Clin Cardiol* 2002;25:505–10.
- [28] Coughlin GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996;63:116–22.
- [29] Mantzioris E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and α -linolenic acids and their respective long-chain metabolites. *Am J Clin Nutr* 1995;61:320–4.
- [30] Endres S, Meydani SN, Ghorbani R, Schindler R, Dinarello CA. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leuk Biol* 1993;54:599–603.
- [31] Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum* 1990;33:810–20.
- [32] Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989;320:265–71.
- [33] Leal-Berumen I, O'Byrne P, Gupta A, Richards CD, Marshal JS. Prostanoid enhancement of interleukin-6 production by rat peritoneal mast cells. *J Immunol* 1995;154:4759–67.
- [34] Herity NA. Interleukin 6: a message from the heart. *Heart* 2000;84:9–10.
- [35] Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 1990;7:147–59.
- [36] Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:381–8.
- [37] Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and atherothrombosis. *Ital Heart* 2001;2:196–9.



The effect of diet enriched with α -linolenic acid on soluble cellular adhesion molecules in dyslipidaemic patients

Loukianos S. Rallidis^{a,*}, Georgios Paschos^b, Maria L. Papaioannou^c, Georgios K. Liakos^c,
Demosthenes B. Panagiotakos^b, Georgios Anastasiadis^d, Antonis Zampelas^b

^a Department of Cardiology, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece

^b Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece

^c Biochemistry Laboratory, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece

^d Department of Cardiology, Laiko Hospital, Athens, Greece

Received 4 August 2003; received in revised form 1 December 2003; accepted 27 January 2004

Abstract

Background: Leukocyte adhesion and transendothelial migration, the critical pathogenic components in the development of atherosclerotic lesions, are largely mediated by cellular adhesion molecules (CAMs). We examined whether dietary supplementation with α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) affects the levels of soluble forms of CAMs in dyslipidaemic patients. **Methods:** We recruited 90 male dyslipidaemic patients (mean age = 51 ± 8 years) following a typical Greek diet. They were randomly assigned either to 15 ml of linseed oil (rich in ALA) per day ($n = 60$) or to 15 ml of safflower oil (rich in linoleic acid [LA, 18:2n-6]) per day ($n = 30$). The ratio of $n-6:n-3$ in linseed oil supplemented group was 1.3:1 and in safflower oil supplemented group 13.2:1. Dietary intervention lasted for 12 weeks. Blood lipids, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and soluble E-selectin (sE-selectin) were measured. **Results:** Dietary supplementation with ALA significantly decreased sVCAM-1 levels (median decrease 18.7% [577.5 ng/ml versus 487 ng/ml, $P = 0.0001$]). In the LA supplemented group, sVCAM-1 was also significantly decreased but to a lesser extent (median decrease 10.6% [550.5 ng/ml versus 496 ng/ml, $P = 0.0001$]). After controlling for smoking habits, no significant difference was observed in the reduction of sVCAM-1 levels between the two treatment arms ($P = 0.205$). The decrease of sVCAM-1 was independent of lipid changes in both groups. **Conclusions:** Dietary supplementation with ALA for 12 weeks significantly decreases sVCAM-1 levels in dyslipidaemic patients. This effect presents a potential mechanism for the beneficial effect of plant $n-3$ polyunsaturated fatty acids in the prevention of coronary artery disease. In addition, dietary supplementation with LA significantly decreases sVCAM-1 levels, an effect which requires further investigation.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: α -Linolenic acid; Dyslipidaemia; E-selectin; Intercellular adhesion molecule-1; Linoleic acid; Vascular cell adhesion molecule-1

1. Introduction

Inflammatory response plays a central role in all phases of the atherosclerotic process [1]. Leukocyte adhesion to endothelial cell and subsequent transendothelial migration from the blood to the arterial intima is a critical pathogenic component in the initiation and progression of atherosclerotic lesions [2,3]. This process is largely mediated by cellular adhesion molecules (CAMs), which are expressed on the endothelial membrane in response to sev-

eral inflammatory stimuli, such as C-reactive protein (CRP) and pro-inflammatory cytokines [3]. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) are two members of the immunoglobulin superfamily that play important but different roles in the adhesion of leukocytes to the vascular endothelium [4]. A second group of CAMs, the selectin group, includes E-selectin that facilitate transient rolling of monocytes along endothelium while VCAM-1 and ICAM-1 mediates a firm adhesion of monocytes to endothelial cells [5].

Pathological studies have detected CAMs in human atherosclerotic plaques [6,7] while knock-out mice deficient in CAMs develop fewer atherosclerotic lesions than normal mice [8]. Recent studies have also suggested a possible

* Corresponding author. Tel.: +30-3210-992-9106;

mobile: +30-6974410591; fax: +30-3210-992-9106.

E-mail address: rallidis@ath.forthnet.gr (L.S. Rallidis).

role for soluble forms of CAMs (sCAMs) in the prognostic stratification of coronary artery disease [9–14].

α -Linolenic acid (ALA, $18:3n-3$) is an essential fatty acid present in vegetable oils. It is the precursor for the formation of the marine long chain $n-3$ polyunsaturated fatty acids (PUFAs), eicosapentaenoic acid (EPA) ($20:5n-3$) and docosahexaenoic acid (DHA) ($22:6n-3$) which can displace arachidonic acid (AA) ($20:4n-6$) and reduce the production of pro-inflammatory eicosanoids prostaglandin E_2 and leukotriene B_4 . AA is derived by desaturation and elongation of linoleic acid (LA) ($18:2n-6$). Dietary fats rich in ALA have been reported to modulate the inflammatory response in experimental animal models [15] and humans [16].

Epidemiological studies indicate that there is an inverse association between dietary ALA and risk of myocardial infarction [17–19]. In the present study, we investigated whether dietary supplementation with ALA that lowers the $n-6:n-3$ ratio to approximately 1:1 affects the levels of soluble ICAM-1 (sICAM-1), soluble VCAM-1 (sVCAM-1) and soluble E-selectin (sE-selectin) in dyslipidaemic patients.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Subjects were recruited from the Department of Cardiology of “Laiko” Hospital where they were screened regarding the health status, medication usage, diet and exercise pattern. We excluded subjects with coexistent inflammatory disease or hypertension, on medication affecting lipoprotein metabolism, habitually consuming >30 units alcohol per week, with smoking habits (≥ 10 cigarettes per day), or habitually undergoing >6 h of vigorous exercise per week. Intake of anti-inflammatory drugs was discouraged during the experimental period.

2.2. Study design

Our study was an intervention study of parallel design. We followed a 2:1 process to form the ALA (subjects supplied with ALA) and LA (subjects supplied with LA) group, respectively. Experimental period lasted for 12 weeks. Subjects following the average Greek diet were screened at entry. They were asked to maintain their dietary habits and usual lifestyle. Subjects were randomly divided into two groups and assigned to ALA ($n = 60$) or LA ($n = 30$) enriched diet. The ALA group was supplied with 15 ml of linseed oil per day which provided 8.1 g of ALA and 2 g of LA. The total $n-6$ intake changed from 10.4 g (9.1 g was LA) to 12.4 g per day and total $n-3$ intake changed from 1.5 g (0.9 g was ALA) to 9.6 g per day. This resulted in changing the $n-6:n-3$ ratio from 7:1 to 1.3:1. The LA group was supplied with 15 ml of safflower oil per day which provided

Table 1
Oil composition per 100 g

Fatty acid	Linseed oil	Safflower oil
Palmitic acid (g)	5.9	5.7
Stearic acid (g)	3.6	2.4
Arachidonic acid (g)	—	0.5
Oleic acid (g)	18.2	11.5
Eicosapentaenoic acid (g)	—	0.5
Linoleic acid (g)	13.9	74.4
α -Linolenic acid (g)	54.2	0.5
Total sterols (g)	0.4	0.4
Total tocopherols (mg)	54.27	48.21

11.16 g of LA, 0.075 g of AA, 0.075 g of EPA and 0.075 g of ALA. Total $n-6$ intake changed from 10.5 g (9.3 g was LA) to 21.735 g per day and total $n-3$ intake changed from 1.5 g (1 g was ALA) to 1.65 g per day. This resulted in changing the $n-6:n-3$ ratio from 7:1 to 13.2:1. The total fat intake was kept constant in both groups. Linseed and safflower oils were provided by Savant International, UK. The supplement was taken thrice per day, one teaspoon of 5 ml per meal.

The composition of the two oils is given in Table 1. The study design was approved by the Ethical Committee of the Harokopio University and the volunteers gave their informed consent. The subjects visited the Department of Cardiology at “Laiko” Hospital once a month and the oils were provided to them. The subjects were weighed at each visit and were asked for their smoking and physical activity habits.

2.3. Diets

Dietary assessment based on a food frequency questionnaire was used to define the background diet of the subjects. Frequency of milk, bread, fruits, vegetables, legume, olive oil, fish and meat consumption was recorded together with a dietary 24 h recall. The subjects’ dietary intake during the intervention period was checked by one 3-day dietary record per month. The recorded days comprised of two weekdays and one weekend day. The diet diaries were analysed by the Nutritionist V program (Version 2.1, First Data Bank Inc., USA).

2.4. Blood sampling and laboratory methods

Venous blood samples were obtained at 8 h after a 12-h overnight fast, at the beginning and the end of the experimental period. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C within 2 h from blood collection and were stored at -80°C for further analysis.

Serum total cholesterol, triglycerides and high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels were determined using enzymatic colorimetric assays on an ACE analyser (Sciaparelli Biosystems Inc., USA). Low density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated by the Friedewald equation. [20].

sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin were measured by quantitative sandwich enzyme immunoassay (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK). The intra-assay and inter-assay coefficient of variation for sCAMs was <10%. All samples were assayed in duplicate and by a single operator blinded to the timing of sampling and type of dietary intervention. The measurements were performed at the Biochemistry Laboratory of General Hospital of Nikea.

2.5. Statistical analysis

The data on sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin which were not normally distributed were expressed as medians. Differences of sCAMs within and between groups were analysed by Wilcoxon signed rank test and Mann–Whitney *U*-test, respectively. Differences for the normally distributed variables were analysed with the Student's paired *t*-test. Pearson's correlation coefficients were used to assess relationships between normally distributed variables and Spearman correlation coefficient was applied to assess correlation between skewed variables. Associations between qualitative variables were tested by the contingency χ^2 criterion. Finally, differences between the ALA and LA group regarding sVCAM-1 values were evaluated using multivariate analysis of covariance (MANCOVA), after controlling for smoking habits. A *P*-value <0.05 was considered significant. The STATISTICA 2002, Version 6 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma) statistical package was used.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

Eighty-three of 90 initially recruited subjects completed the study (five subjects dropped out from ALA and two from LA group). In addition, five subjects (three from ALA group and two from LA group) had CRP concentration greater than 10 mg/l at one of the two blood collections, probably due to occult infection, and were excluded from analysis. Furthermore, data from two subjects (ALA group) for whom serum sample was missing were excluded. Therefore, we report results from the remaining 76 subjects (ALA group, 50 and LA group, 26). No statistically significant differences were observed between ALA and LA group regarding age of the participants (50.4 ± 7.3 versus 52 ± 7.7 , $P = 0.33$). Moreover, the percentage of light smokers (<10 cigarettes per day) was similar in the two groups (24% versus 23%, $P = 0.85$). The $n : n - 3$ ratios were comparable in the background diets of the two groups (7.5:1 and 7:1) while after the supplementation, the ratios changed to 1.3:1 and 13.2:1 in the ALA and LA groups, respectively. Despite supplementation, the energy intake from fat in both groups was similar. In addition, no differences in nutrient intake between ALA and LA groups were observed, during the intervention period (Table 2).

Table 2

Mean daily intakes of energy and nutrients for dyslipidaemic subjects on α -linolenic (ALA) and linoleic acid (LA) enriched diets

Diet	Mean $\pm$ S.D.		<i>P</i> -value
	ALA group	LA group	
Energy (kcal)	2181.8 $\pm$ 243.1	2183.2 $\pm$ 237.6	0.638
Proteins (%)	15.1 $\pm$ 2.4	14.9 $\pm$ 2.2	0.564
Carbohydrates (%)	47.7 $\pm$ 3.8	47.8 $\pm$ 4.2	0.613
Fats (%)	35.9 $\pm$ 4.1	35.9 $\pm$ 4.4	0.477
Saturated fats (g)	22.8 $\pm$ 2.6	23.2 $\pm$ 2.8	0.518
Monounsaturated fats (g)	46.5 $\pm$ 4.3	46.6 $\pm$ 4.8	0.753
Polyunsaturated fats (g)	11.9 $\pm$ 1.2	12.0 $\pm$ 1.4	0.687
α -Linolenic acid (g)	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.524
Linoleic acid (g)	9.1 $\pm$ 1.2	9.3 $\pm$ 1.1	0.463
Cholesterol (mg)	216.4 $\pm$ 27.0	218.3 $\pm$ 30.6	0.449
Alcohol (%)	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	0.524
Dietary fibre (g)	25.4 $\pm$ 3.0	25.2 $\pm$ 3.6	0.759

Lipid profile and sCAMs at baseline in the two groups are shown in Table 3.

3.2. Serum lipids and sCAMs after dietary intervention

Regarding plasma lipid levels in ALA group, cholesterol level remained unaltered whereas it decreased in LA group ($P = 0.04$) (Table 3). On the other hand, in ALA group, HDL cholesterol level decreased ($P = 0.005$).

sVCAM-1 levels showed a statistically significant reduction after administration of ALA (Table 3). The relative median decrease of sVCAM-1 levels before and after the ALA administration was 18.7%. Moreover, in the LA supplemented group, sVCAM-1 levels were also significantly decreased and the relative median decrease was 10.6%. When the two dietary interventions were compared, no statistical difference was observed as regards sVCAM-1 levels, after controlling for smoking habits of the participants ($P = 0.205$).

The reduction of sVCAM-1 in the ALA and LA groups was independent of lipid changes since there was no significant correlation between change in sVCAM-1 with those in lipids in the corresponding groups (data not shown).

4. Discussion

Our study shows that diet enriched with ALA for 12 weeks significantly reduces sVCAM-1 levels in dyslipidaemic patients. In addition, dietary supplementation with LA significantly decreases sVCAM-1 levels.

Since previous studies [21,22] have reported a variable effect of smoking on sCAMs levels (increase of sICAM-1, no effect on sVCAM-1), we preferred to exclude individuals who smoked ≥ 10 cigarettes per day in order to minimize the smoking effect. Despite the small proportion and matching of light smokers between the two groups, we performed an additional multivariate analysis including smoking habits, and no differences on the presented results were observed.

Table 3

Lipid profile, soluble cellular adhesion molecules (sCAMs) and body mass index (BMI) before and after the dietary intervention in the α -linolenic (ALA) and linoleic acid (LA) groups

Variables	Before dietary intervention	After dietary intervention	P-value
ALA group ($n = 50$)			
Total cholesterol (mg/dl)	232 $\pm$ 34	226 $\pm$ 36	0.27
Triglycerides (mg/dl)	155 $\pm$ 84	163 $\pm$ 87	0.16
HDL cholesterol (mg/dl)	42.7 $\pm$ 10.4	41 $\pm$ 10.2	0.005
LDL cholesterol (mg/dl)	154 $\pm$ 37	152 $\pm$ 36	0.59
sVCAM-1 (ng/ml)	577.5 (530–655)	487 (437–521)	0.0001
sICAM-1 (ng/ml)	206 (177–236)	205 (182–248)	0.26
sE-selectin (ng/ml)	44.6 (37–54)	42.7 (36–55)	0.25
BMI (kg/m ²)	28.42 $\pm$ 3.44	28.40 $\pm$ 3.44	0.25
LA group ($n = 26$)			
Total cholesterol (mg/dl)	234 $\pm$ 46*	218 $\pm$ 46	0.04
Triglycerides (mg/dl)	173 $\pm$ 113*	156 $\pm$ 86	0.13
HDL cholesterol (mg/dl)	39.2 $\pm$ 7.4*	38.3 $\pm$ 8	0.25
LDL cholesterol (mg/dl)	154 $\pm$ 43*	149 $\pm$ 44	0.36
sVCAM-1 (ng/ml)	550.5 (509–622)*	496 (450–554)	0.0001
sICAM-1 (ng/ml)	191 (181–219)*	200 (183–223)	0.18
sE-selectin (ng/ml)	42.9 (39–53)*	42.8 (37–54)	0.65
BMI (kg/m ²)	28 $\pm$ 3.19*	28 $\pm$ 3.22	0.8

Values of sCAMs are expressed as median and 25th and 75th percentile and lipid and BMI values as mean $\pm$ S.D. sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; sE-selectin, soluble E-selectin; HDL, high density lipoprotein and LDL, low density lipoprotein.

* $P = \text{NS}$ (levels of lipids, sCAMs and BMI of LA group vs. corresponding levels of lipids, sCAMs and BMI of ALA group).

We did not use exactly the same amounts of ALA and LA supplements in the ALA and LA groups, respectively. This occurred because we were aiming to lower the $n-6:n-3$ ratio at physiologically realistic levels. Our target was to decrease the $n-6:n-3$ ratio in the ALA group and to increase the $n-6:n-3$ ratio in the LA group. Therefore, with the amounts of ALA and LA that we chose, we achieved $n-6:n-3$ ratio in the ALA group of 1.3:1 and 13.2:1 in the LA group. In addition, this dietary supplementation provided a similar intake of calories from fat in both groups. This is important, since, differences in total fat intake can modulate the inflammatory responses [23].

The beneficial effect of foods rich in ALA has been reported both in primary and secondary prevention of coronary artery disease [17–19]. Proposed mechanisms for the protective effect of ALA are anti-inflammatory effect [16], antiarrhythmic effect [24], improvement in arterial compliance [25], modest blood pressure reduction [26] and antiplatelet effect [27].

There is extensive evidence that inflammation plays a central role in atherosclerosis, since, all stages of atherosclerosis are characterized by the dynamic interaction of inflammatory cells, cytokines and chemokines in the arterial wall [1]. One of the key initial events in the atherosclerotic process is the adhesion of monocytes to endothelial cells which is largely mediated by CAMs. The expression of CAMs is relatively low in normal vascular cells and is upregulated in response to various stimuli, such as cytokines and oxidants. sCAMs originate from shedding or proteolytic cleavage of membrane-bound molecules and may serve as markers of endothelial cell activation [28]. Several studies have

reported an association of adhesion molecules with subsequent incidence of coronary heart disease among healthy individuals and there is also evidence suggesting a prognostic value of sCAMs in acute coronary syndromes [9–14,29].

In our study, the levels of sVCAM-1 but not of sICAM-1 and sE-selectin showed a significant reduction after the 12-week dietary intervention with ALA. To our knowledge, this is the first study to report these findings. There are only a few studies with conflicting results regarding the effect of fish oils on sCAMs. However, it should be emphasized that fish oils may not fully reproduce the effects of ALA. Seljeflot et al. [30] reported that supplementation with fish oils for 6 weeks increased the levels of sVCAM-1 and sE-selectin. They hypothesized that this adverse effect of $n-3$ PUFAs could be related to the production of oxidants which in turn could have activated the nuclear factor- κ B (NF- κ B) which is an important transcription factor. Another study [31] reported a reduction of sVCAM-1 concentrations only in males >55 years but not in young males (<40 years) who received a fish oil supplementation for 12 weeks.

The exact mechanism of sVCAM-1 reduction after dietary intervention with ALA is unknown. In a previous study [16], we reported that dietary supplementation with ALA decreased the levels of inflammatory markers, such as CRP and IL-6, in the same group of patients. It has also been shown that CRP can induce significant expression of CAMs in human endothelial cells [32]. Therefore, we could speculate that reduction of CRP produced by dietary supplementation with ALA could result in reduced expression of CAMs. However, it is more likely that $n-3$ fatty acids affect the inflammatory cascade in a more complicated fashion.

De Caterina et al. [33] showed that DHA added to cultured endothelial cells inhibited the expression of VCAM-1 and E-selectin induced by cytokines or lipopolysaccharide. In addition, Weber et al. [34] showed that DHA inhibited the activation of the NF- κ B system of transcription factors. Therefore, we can hypothesize that dietary supplementation with ALA through its metabolites, such as DHA, reduces sVCAM-1 levels by inhibiting the activation of the NF- κ B system which appears to be the final common denominator of CAMs expression.

We also found in our study, a significant reduction of sVCAM-1 after dietary supplementation with LA, although to a lesser extent than with dietary supplementation with ALA. This was, to some extent, an unexpected finding because, in our previous study [16], we failed to demonstrate an anti-inflammatory effect with diet enriched with LA. However, it has been shown [35,36] that in endothelial cells incubated with interleukin-1 α , $n-6$ PUFAs such as AA, could inhibit expression of VCAM-1 but to a lesser degree compared with $n-3$ PUFAs. It was suggested that greater number of double bonds of $n-3$ PUFAs compared with $n-6$ PUFAs is critical for the greater activity in inhibiting the endothelial activation.

Regarding plasma lipid levels, in this study, we observed a reduction in cholesterol levels following LA supplementation and a decrease in HDL cholesterol levels at the end of the ALA supplementation period. These findings suggest that LA supplementation result in an improvement of plasma lipid profile, something that is not observed with dietary supplementation with ALA. This is in accordance with other studies which showed no hypocholesterolaemic effect of ALA enriched diets [37,38].

Some limitations of this study need to be addressed. Firstly, we applied an intervention study of parallel design instead of a cross-over design which is inherently much stronger. We did it because a cross-over design has the problem of carryover effect, as the wash-out period cannot be specified in lipid intervention trials. Counting an intermediate wash-out period of at least 2 months, the total study period would have been prolonged to 8 months. This design could raise compliance problems, taking into consideration that compliance in Greek populations is relatively low. Secondly, the doses of $n-3$ and $n-6$ PUFAs that we provided by the supplements are difficult to be achieved by the usual dietary intake. However, products like spreads fortified with the appropriate fatty acids can be produced by relevant industries. These spreads can substitute other sources of fat in the diet of hyperlipidaemic patients.

In conclusion, dietary supplementation with ALA for 12 weeks decreases sVCAM-1 in dyslipidaemic patients. This effect may represent a possible antiatherogenic mechanism contributing to the beneficial effect of plant $n-3$ PUFAs in the prevention of coronary artery disease. In addition, dietary supplementation with LA significantly decreases sVCAM-1 levels. The favourable effect of both diets on sVCAM-1 levels shows that there is need for further investigation to

optimize the $n-6:n-3$ ratio in the diet which will provide the best effect on inflammatory markers of dyslipidaemic subjects.

References

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- [2] Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.
- [3] Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107:85–97.
- [4] Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules. Part 1. *N Engl J Med* 1996;334:1526–9.
- [5] Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866–73.
- [6] Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Tidey RR. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in atherosclerotic plaques: implications for positive feedback monocyte recruitment in the pathogenesis of the plaque. *Am J Pathol* 1992;140:665–73.
- [7] Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223–9.
- [8] Nagel MF, Sandberg ET, Marotti RK. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1517–20.
- [9] Mulvihill NT, Foley JB, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J* 2002;23:1569–74.
- [10] Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, et al. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88–92.
- [11] Malik I, Danesh J, Whincup P, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* 2001;358:971–6.
- [12] Haim M, Tanne D, Boyko V, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease: data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1133–8.
- [13] de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:423–6.
- [14] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:1336–42.
- [15] Chavali SR, Zhong WW, Forse RA. Dietary α -linolenic acid increases TNF- α , and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS: effects of sesamin on the Δ -5 desaturation of ω 6 and ω 3 fatty acids in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998;58:185–91.
- [16] Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, Velissaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A. Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 2003;167:237–42.
- [17] Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996;313:84–90.
- [18] Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary intake of α -linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:890–7.
- [19] De Lorge M, Renaud S, Mamelle N, et al. Mediterranean α -linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994;343:1454–9.

- [20] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [21] Blann AD, Steele C, McCollum CN. The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thromb Res* 1997;85:433–8.
- [22] Takeuchi N, Kawamura T, Kanai A, et al. The effect of cigarette smoking on soluble adhesion molecules in middle-aged patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2002;19:57–64.
- [23] Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669–73.
- [24] Kang JX, Leaf A. Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;71:202–7.
- [25] Nestel PJ, Pomeroy SE, Sasahara T, et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n–3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1163–70.
- [26] Bemelmans WJE, Muskiet FAJ, Feskens EJM, et al. Associations of alpha-linolenic acid and linoleic acid with risk factors for coronary heart disease. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:865–71.
- [27] Lanzmann-Petithory D. Alpha-linolenic acid and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging* 2001;5:179–83.
- [28] Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993;14:506–12.
- [29] Rallidis LS, Gika HI, Zolindaki MG, Xydias TA, Paravolidakis KE, Velissaridou AH. Usefulness of elevated levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in predicting in-hospital prognosis in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2003;92:1195–7.
- [30] Seljeflot I, Amesen H, Brude IR, Nenseter MS, Drevon CA, Hjermann I. Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest* 1998;28:629–35.
- [31] Miles EA, Thies F, Wallace FA, et al. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clin Sci* 2001;100:91–100.
- [32] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165–8.
- [33] De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone Jr MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of pro-atherogenic and pro-inflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1829–36.
- [34] Weber C, Erd W, Pietsch A, Danesch U, Weber P. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:622–8.
- [35] De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000;71:213–23.
- [36] De Caterina R, Bemini W, Carluccio MA, Liao JK, Libby P. Structural requirements for inhibition of cytokine-induced endothelial activation by unsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 1998;39:1062–70.
- [37] Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998;80:163–7.
- [38] Sanderson P, Finnegan YE, Williams CM, et al. UK Food Standards Agency alpha-linolenic acid workshop report. *Br J Nutr* 2002;88:573–9.

Background diet influences the anti-inflammatory effect of α -linolenic acid in dyslipidaemic subjects

George K. Paschos¹, Loukianos S. Rallidis², Georgios K. Liakos³, Demosthenes Panagiotakos¹, George Anastasiadis⁴, Vasilios Votteas⁴ and Antonis Zampelas^{1*}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, 70 El Venizelou Street, Athens 17671, Greece

²Second Department of Cardiology, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece

³Biochemistry Laboratory, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece

⁴Department of Cardiology, Laiko Hospital, Athens, Greece

(Received 15 December 2003 – Revised 18 May 2004 – Accepted 2 June 2004)

Long-chain *n*-3 PUFA from fish oils are known to have anti-inflammatory effects. We evaluated the effect of α -linolenic acid (ALA), precursor of *n*-3 fatty acids, on serum inflammatory markers and soluble cellular adhesion molecules (sCAM) of dyslipidaemic males, relative to their background diet. Participants were assigned to two groups, based upon food intake patterns: (a) twenty-one dyslipidaemic subjects who habitually ate a Mediterranean–Cretan-type diet; (b) nineteen dyslipidaemic subjects who normally ate a Westernised Greek diet. All were supplemented with 8.1 g ALA/d for 12 weeks. We determined serum amyloid A (SAA), C-reactive protein (CRP), macrophage colony-stimulating factor (MCSF), IL-6, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble E-selectin concentrations at the beginning and the end of the ALA supplementation period. Serum baseline concentrations of inflammatory markers and sCAM were similar across the diet groups. Type of diet had a significant impact on the response of inflammatory markers to ALA supplementation. The Westernised Greek diet group showed a reduction in SAA ($P<0.001$), CRP ($P=0.002$), MCSF ($P=0.005$) and IL-6 ($P=0.04$) concentrations. The Mediterranean–Cretan-type background diet group showed a significant reduction only in MCSF concentrations ($P=0.003$). The sVCAM-1 concentrations were significantly reduced in both the Westernised Greek diet group ($P=0.001$) and the Mediterranean–Cretan-type diet group ($P<0.001$). The present study demonstrated that ALA supplementation lowered the serum concentrations of inflammatory markers more profoundly when the background diet was rich in saturated fatty acids and poor in MUFA.

α -Linolenic acid: Mediterranean diet: Inflammatory markers: Cellular adhesion molecules

Consumption of diets rich in *n*-3 fatty acids has been linked with low prevalence of atherosclerosis (Ascherio *et al.* 1995). Furthermore, *n*-3 fatty acids have been used to treat various chronic inflammatory conditions and have been shown to have anti-inflammatory properties (Calder, 2001). Immune system cells are inherent parts of inflammatory events involved in the development and progression of atherosclerosis. The adhesion of circulating blood monocytes to the endothelial cells and their subsequent transmigration across the vascular endothelium are prerequisite steps in the pathogenesis of the disease (Ross, 1999). It has been proposed that the anti-inflammatory properties of *n*-3 fatty acids can explain the correlation with the low prevalence of atherosclerosis (Calder, 2001). However, other human studies do not confirm the anti-inflammatory effect of *n*-3 PUFA.

Previous studies have shown variable results when reporting effects of *n*-3 PUFA on cytokine production by

mononuclear cells. Dietary supplementation studies with EPA and docosahexaenoic acid (DHA) have shown a decrease in monocyte synthesis of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in healthy subjects (Endres *et al.* 1989; Meydani *et al.* 1991; Caughey *et al.* 1996). In contrast, other studies documented a lack of effect of *n*-3 PUFA on the synthesis of the same cytokines (Schmidt *et al.* 1996; Blok *et al.* 1997; Yaqoob *et al.* 2000). The effects of α -linolenic acid (ALA), the precursor of EPA and DHA, on inflammatory markers are also controversial. In particular, on the one hand, it has been reported that the production of TNF- α and IL-1 β was suppressed by lipopolysaccharide-stimulated monocytes of healthy volunteers after a high dose of dietary ALA (Caughey *et al.* 1996). In addition, in our previous report (Rallidis *et al.* 2003), supplementation with ALA reduced serum IL-6 and C-reactive protein (CRP) concentrations. On the other hand, other research has demonstrated that ALA did not affect the

Abbreviations: ALA, α -linolenic acid; CRP, C-reactive protein; DHA, docosahexaenoic acid; MCSF, macrophage colony-stimulating factor; SAA, serum amyloid A; sCAM, soluble cellular adhesion molecules.

* Corresponding author: Dr Antonis Zampelas, fax +30 210 9549141, email azampelas@hua.gr

production of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 or interferon- γ by mononuclear cells (Thies *et al.* 2001). Recent evidence has documented that intake levels of ≤ 9.5 g ALA/d or ≤ 1.7 g EPA+DHA/d did not alter the production of cytokines by monocytes and lymphocytes although the fatty acid composition of mononuclear cells was significantly altered (Kew *et al.* 2003).

A number of *in vitro* studies suggest a suppressive effect of *n*-3 fatty acids on adhesion molecule expression by vascular endothelial cells (De Caterina *et al.* 1994; Weber *et al.* 1995; Khalfoun *et al.* 1996; Collie-Duguid & Wahle, 1996). Results from human supplementation studies, however, are inconsistent. Some have shown that supplementation with EPA+DHA reduced the plasma concentration of soluble forms of adhesion molecules (Abe *et al.* 1998; Thies *et al.* 2001), while other studies report the opposite (Seljeflot *et al.* 1998; Johansen *et al.* 1999).

Results of fish oil experiments on plasma CRP concentrations also are inconsistent. Although a significant inverse correlation between serum CRP concentrations and content of DHA in granulocytes has been demonstrated (Madsen *et al.* 2001), a recent study by the same research group failed to reproduce this finding (Madsen *et al.* 2003). Similarly, the administration of *n*-3 PUFA to healthy individuals did not alter plasma CRP levels (Vega-Lopez *et al.* 2004).

Evidence since the 1950s has demonstrated that Mediterranean countries display rates of chronic diseases that are among the lowest in the world with corresponding life expectancies that are among the highest (Nestle, 1995). In a recent study conducted in the Greek population, the adoption of the Mediterranean diet by subjects with the metabolic syndrome was associated with a significant reduction of the risk of developing acute coronary events (Pitsavos *et al.* 2003).

Our objective was to examine the effect of dietary ALA on inflammatory markers and soluble cellular adhesion molecules (sCAM) related to atherosclerosis with regard to a dietary variable. For this purpose, volunteers were recruited who followed either a Mediterranean-Cretan-type diet or a Westernised Greek diet.

Subjects and methods

Subjects

Subjects were recruited from the treadmill test unit in the Department of Cardiology of Laiko Hospital after screening by medical history, physical examination, electrocardiograph, and laboratory analysis. Fifty male volunteers aged 35 to 67 years, first diagnosed for dyslipidaemia, without evidence of CHD, were recruited. Entry criteria for recruitment included a total cholesterol concentration higher than 5.20 mmol/l, and/or an HDL-cholesterol concentration lower than 1.03 mmol/l. Subjects with evidence of infection or coexistent diabetes mellitus, hypertension, renal, liver or inflammatory disease were excluded. In addition, subjects taking lipid-lowering drugs, habitually consuming more than thirty units alcohol per week, smoking ten or more cigarettes per d, or habitually vigorously exercising at the level of >6 h/week were excluded. Of the fifty men enrolled, one withdrew before completion of the study because of gastrointestinal discomfort.

An additional nine subjects either withdrew or were excluded for non-compliance during the 12-week intervention. Thus, forty subjects completed the entire study.

Study design

A single intervention of parallel design was carried out. Dietary assessment was performed before the intervention to allocate volunteers according to their background diet into two groups. The first group was a group of subjects habitually following a diet characteristic of the so-called Mediterranean-Cretan diet as described in the Seven Countries Study (Kafatos *et al.* 2000) (*n* 21); the second group of subjects habitually followed a Westernised Greek diet (*n* 19).

All subjects were supplemented with 15 ml flaxseed oil/d for 12 weeks. Supplements contained approximately 8 g ALA (*n*-3) and were taken three times daily, one 5 ml teaspoon/meal. The subjects were asked to maintain their dietary habits and usual lifestyle and were instructed to avoid the intake of anti-inflammatory drugs, vitamins or other dietary supplements throughout the intervention period. The subjects were supervised in respect of their dietary habits, alcohol consumption and physical activity habits by phone calls once per week and by visits to the hospital. The subjects were weighed monthly. At the time of the patient visits, they were provided with the oil supplements. Heights and weights were measured with the subjects in light clothing and shoes removed. Flaxseed-oil supplements were provided by Savant International (Savant Distribution Ltd, Leeds, UK). Flaxseed oil was extracted by cold pressing under N₂. It was stored in brown bottles at 4°C. No additional antioxidants were added. Fatty acid composition of the oil is given in Table 1. All subjects provided written informed consent, and the study protocol was approved by the ethical committee of Harokopio University.

Diets

Dietary assessments were based on a validated food-frequency questionnaire that included food items from the Mediterranean diet pyramid (Trichopoulos, 2000). Frequencies of milk and dairy products, bread, fruits, vegetables, legumes, olive oil, fish, poultry, red meat and meat products, and wine consumption were recorded and a monthly food consumption score calculated. Dietary compositions of the two groups are depicted in Table 2. Dietary compliance was assessed by a total of three 4 d dietary records (one every 4 weeks). The recorded days

Table 1. Fatty acid, total sterol and total tocopherol composition of the flaxseed oil (per 100 g)

Constituents	
Palmitic acid (g)	5.9
Stearic acid (g)	3.6
Oleic acid (g)	18.2
Linoleic acid (g)	13.9
α -Linolenic acid (g)	54.2
Total sterols (g)	0.4
Total tocopherols (mg)	54.27

Table 2. Nutrient composition of the two diets
(Mean values and standard deviations)

Diet...	Mediterranean-Cretan-type diet		Westernised Greek diet		P value
	Mean	SD	Mean	SD	
Energy (J)	9169.86	1118.46	9154.32	959.28	0.348
Proteins (%)	13.2	3.1	16.0	1.8	0.009
Carbohydrates (%)	47.8	3.8	44.4	4.4	0.007
Fats (%)	37.7	4.8	38.2	4.2	0.467
SFA (g)	22.3	2.5	38.6	3.2	0.018
MUFA (g)	49.5	5.8	32.6	4.9	0.034
PUFA (g)	13.7	2.0	12.1	1.7	0.171
α -Linolenic acid (g)	0.9	0.3	1.1	0.2	0.215
EPA (g)	0.3	0.05	0.3	0.08	0.249
DHA (g)	0.4	0.04	0.3	0.05	0.311
Cholesterol (mg)	214.8	24.4	370.1	31.0	0.004
Alcohol %	1.3	0.3	1.4	0.4	0.741
Vitamin C (mg)	122.4	13.0	117.8	18.4	0.002
Dietary fibre (g)	26.7	3.3	22.4	4.1	0.021

SFA, saturated fatty acids; DHA, docosahexaenoic acid.

included three weekdays and one weekend day. The diet diaries were analysed using the Nutritionist V Diet Analysis software (version 2.1, First Data Bank Inc., San Bruno, CA, USA) as modified for the Greek population (Yannakoulia *et al.* 2003).

Analytical procedures

The volunteers attended the Department of Cardiology at Laiko Hospital on two occasions for blood collection; at the beginning and end of the experimental period. At each visit blood samples were collected at 08.00 hours after the subjects had fasted overnight (12 h). Blood was collected into a glass tube without preservative (vacutainer tube; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) for the determination of serum inflammatory indices. All samples were collected without occlusion. The vacutainer tubes were kept on ice until centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C within 2 h of blood collection. Serum samples were stored at -80°C for further analysis. CRP and serum amyloid A (SAA) were assayed by particle-enhanced immunonephelometry (N Latex; Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) with a range from 0.175 to 1100 mg/l and 0.75 to 1000 mg/l, respectively. IL-6 and macrophage colony-stimulating factor (MCSF) were measured by high-sensitivity ELISA (R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK). The intra-assay and inter-assay CV were <5% for CRP, SAA and MCSF and <10% for IL-6. Soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble E-selectin were assayed by quantitative sandwich ELISA (R & D Systems Europe Ltd). The intra-assay and inter-assay CV for sCAM was <10%. All samples were assayed twice by a single operator blinded to sample timing and diet category. To minimise variability, samples before and after the ALA supplementation for each subject were run in one assay. All measurements were performed at the biochemistry laboratory of the General Hospital of Nikaia.

Statistical analysis

Clinical and dietary traits are expressed as mean values and standard deviations, unless otherwise stated. Data on inflammatory markers and adhesion molecules were not normally distributed and therefore were expressed as the median and the 25th and 75th percentiles. Differences in the baseline concentrations of clinical and dietary traits between diet groups were assessed using Student's independent samples *t* tests (after log transformation), with the exception of smoking status where the χ^2 test was used. Since data on inflammatory markers and sCAM concentrations were not normally distributed even after the logarithmic transformation of the values, non-parametric analyses were performed to determine differences at baseline (Mann-Whitney *U* test), and before and after ALA supplementation (Wilcoxon signed ranks test). The Mann-Whitney *U* test also was used to compare percentage differences of inflammatory markers and sCAM concentrations before and after the ALA supplementation period between the two diet groups. Percentage difference was calculated as the median of the percentage differences of individual values. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Data were analysed using SPSS statistical software (SPSS for Windows, version 10.0.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Baseline characteristics

The subjects enrolled in the two dietary groups did not differ in regard to age, BMI, blood pressure and leucocyte, lymphocyte, or monocyte-granulocyte count. The number of light smokers (less than ten cigarettes per d) was similar across the two groups (Table 3).

Body weight and leucocyte, lymphocyte, and monocyte-granulocyte counts did not change significantly during the course of the study. A review of diet diaries indicated that the subjects' background diet remained unchanged throughout the study.

Table 3. Baseline clinical data of the two different background diet groups (Mean values and standard deviations)

Diet...	Mediterranean-Cretan-type diet (n 21)		Westernised Greek diet (n 19)		P value
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (years)	50.2	6.3	48.7	8.3	NS
BMI (kg/m ²)	28.6	3.6	27.8	3.6	NS
Leucocytes ($\times 10^3$)	6.4	1.6	7.3	1.9	NS
Neutrophils ($\times 10^3$)	3.8	1.1	4.1	1.3	
Lymphocytes ($\times 10^3$)	2.2	0.9	2.3	0.7	NS
Monocytes ($\times 10^3$)	0.32	0.12	0.37	0.14	NS
Blood pressure (mmHg)					
Systolic	126.6	16	125.6	16.7	NS
Diastolic	80.8	11	80.2	11	NS
Light smokers: yes (n)	4		4		NS
no (n)	17		15		

Blood inflammatory markers

Median values of SAA, CRP, MCSF and IL-6 of the two dietary groups before and after the ALA supplementation are presented in Table 4. The only inflammatory marker to present a statistically significant reduction in both groups after ALA supplementation was MCSF, while CRP, SAA and IL-6 were decreased significantly, but only in the Westernised Greek diet group. The difference of response of the inflammatory markers to the ALA supplementation in the two background diets was confirmed by comparison of percentage differences within each of the two diet groups (Fig. 1). Percentage changes of SAA and CRP in the Westernised Greek diet group were significantly different from changes in the group following the Mediterranean-Cretan-type diet ($P=0.005$ and $P=0.038$, respectively). No significant correlations were found between dietary cholesterol, saturated fatty acids, MUFA and PUFA, and the investigated inflammatory markers in the two groups. Furthermore, correlations between dietary vitamin C intake and inflammatory markers were not statistically significant.

Soluble cellular adhesion molecules

Levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 decreased significantly with ALA supplementation in both patient groups ($P<0.001$ in the Mediterranean-Cretan-type diet and $P=0.001$ in the Westernised Greek diet). The levels of soluble intercellular adhesion molecule and soluble E-selectin also remained unaltered in both groups (Table 5).

Discussion

Our data reveal that an increased dietary intake of ALA for 3 months was sufficient to reduce inflammatory markers and soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in dyslipidaemic subjects. This effect was more evident for the group following the Westernised Greek diet compared with the group following the Mediterranean-Cretan-type diet.

Nutrient intakes were different in the two diet groups. The Westernised Greek diet group showed higher intakes of protein, while carbohydrate intakes were lower

Table 4. Serum concentrations of inflammatory markers in dyslipidaemic volunteers following two different background diets before and after α -linolenic acid supplementation* (Median values and 25th and 75th percentiles)

Variables	Before†		After		Percentage difference‡	P value
	Median	25th–75th percentile	Median	25th–75th percentile		
Mediterranean–Cretan-type diet group (n 21)						
SAA (mg/l)	2.51	2.20–4.5	2.40	1.70–3.00	–3.6	0.16
CRP (mg/l)	0.96	0.54–1.82	0.99	0.56–2.10	2.0	0.51
MCSF (pg/ml)	283	257–309	258	226–292	–15.0	0.006
IL-6 (pg/ml)	2.0	1.12–3.15	1.66	0.99–2.13	–4.5	0.08
Westernised Greek diet group (n 19)						
SAA (mg/l)	3.65	2.5–5.8	2.38	1.39–3.40	–36.4	0.0002
CRP (mg/l)	1.8	1.19–4.4	1.10	0.59–1.60	–36.1	0.002
MCSF (pg/ml)	279	237–328	232.0	195.0–284.0	–21.9	0.005
IL-6 (pg/ml)	2.28	1.34–4.80	1.70	1.26–2.40	–7.9	0.03

SAA, serum amyloid A; CRP, C-reactive protein; MCSF, macrophage colony-stimulating factor.

* For details of subjects and diets, see Tables 1–3 and pp. 650–652.

† The median values of the inflammatory markers for the Mediterranean-Cretan-type diet group were not significantly different from the corresponding values for the Westernised Greek diet group at baseline.

‡ Percentage difference was calculated as the median of the percentage differences of individual values.

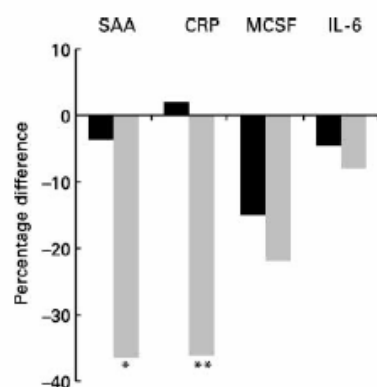


Fig. 1. Percentage differences of concentrations of inflammatory markers after the α -linolenic acid supplementation of subjects with the two different background diets, the Mediterranean-Cretan-type diet (■) and the Westernised Greek diet (▨). SAA, serum amyloid A; CRP, C-reactive protein; MCSF, macrophage colony-stimulating factor. Percentage difference was calculated as the median of the percentage differences of individual values. The comparison of percentage differences was made by the Mann-Whitney *U* test. There were significant differences between the two diet groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

compared with the Mediterranean-Cretan-type diet group. Intakes of saturated fatty acids and cholesterol were significantly higher in the Westernised Greek diet group than the Mediterranean-Cretan-type diet group. Approximately 16% of energy intakes in the Westernised Greek diet group came from saturated fatty acids, a pattern that would be considered high when compared with the American Heart Association recommendations (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). On the other hand, the Mediterranean-Cretan-type diet group showed a higher intake of MUFA, vitamin C and dietary fibre. These intakes are in accord with the basic definition of the Mediterranean-Cretan diet (Kafatos *et al.* 2000) and the 'Westernised' diet profile (Lewis *et al.* 1981), respectively.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disorder characterised by a dynamic interaction of inflammatory

cells, cytokines and chemokines (Ross, 1999). Leucocyte adhesion to endothelial cells and subsequent transendothelial migration, an initial event in the atherosclerotic process, is largely mediated by cell adhesion molecules (Price & Loscalzo, 1999). The sCAM originate from the shedding or proteolytic cleavage of membrane-bound molecules and may serve as markers of endothelial cell activation (Gearing & Newman, 1993). On the other hand, there is growing evidence that inflammatory markers such as CRP may also play a direct pathogenic role in the atherosclerotic process (Pasceri *et al.* 2000). Other inflammatory markers such as SAA, MCSF and IL-6 are present in atherosclerotic lesions and research has suggested that these markers play a role in the development of atherosclerotic plaques (Clinton *et al.* 1992; Meek *et al.* 1994; DeGruha, 1997). Such results indicate the importance of interventions aimed at the reduction of inflammatory markers, which may be translated in clinical benefit regarding the prevention of CHD.

As we have previously reported (Rallidis *et al.* 2003), dietary ALA supplementation reduces the concentrations of inflammatory markers. The mechanisms responsible for the suppression of the concentrations of inflammatory markers by ALA, however, remain unknown, although suppression of eicosanoid production may be involved (James *et al.* 2000). We have proposed elsewhere that the reduction of prostaglandin E_2 and leucotriene B_4 production and the subsequent reduction of pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α decreases IL-6 release which in turn reduces the hepatic production of CRP and SAA (Rallidis *et al.* 2003). IL-1 and TNF- α are known to induce a large increase in MCSF secretion from both vascular endothelial and smooth muscle cells in cultures (Clinton *et al.* 1992), and thus control MCSF expression. Moreover, cellular adhesion molecules are expressed on the endothelial membrane in response to several inflammatory stimuli, such as CRP and pro-inflammatory cytokines (Price & Loscalzo, 1999).

The present study was designed to investigate associations between the anti-inflammatory effect of ALA and background dietary patterns. We report here a greater responsiveness of the inflammatory markers in the

Table 5. Soluble cellular adhesion molecule concentrations in dyslipidaemic volunteers following two different background diets before and after α -linolenic acid supplementation*

(Median values and 25th and 75th percentiles)

Variables	Before†		After		Percentage difference‡	P value
	Median	25th–75th percentile	Median	25th–75th percentile		
Mediterranean–Cretan-type diet group (n 21)						
sVCAM-1 (ng/ml)	610	534–787	543	487–601	–10.1	<0.001
sICAM-1 (ng/ml)	201	173–232	204	173–254	1.7	0.19
sE-selectin (ng/ml)	44.2	35.0–55.1	44.0	37.5–55.1	–3.9	0.99
Westernised Greek diet group (n 19)						
sVCAM-1 (ng/ml)	592	506–625	495	430–570	–18.3	0.001
sICAM-1 (ng/ml)	219	196–264	222	192–279	0.1	0.91
sE-selectin (ng/ml)	47.8	31.6–65.9	47.8	31.6–67.1	–2.9	0.31

sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sE-selectin, soluble E-selectin.

*For details of subjects and diets, see Tables 1–3 and pp. 650–652.

†The median values of the soluble cellular adhesion molecules for the Mediterranean-Cretan-type diet group were not significantly different from the corresponding values for the Westernised Greek diet group at baseline.

‡Percentage difference was calculated as the median of the percentage differences of individual values.

Westernised Greek diet group. Still, we found no correlations between the dietary intake of specific nutrients and concentration of inflammatory markers. Animal studies, however, have demonstrated suppressive effects of individual nutrients, such as oleic acid on *in vivo* immune responses (Yaqoob, 2002), while a high-MUFA diet resulted in a reduction in the expression of adhesion molecules by human peripheral blood mononuclear cells (Yaqoob *et al.* 1998). A limited number of studies have suggested an anti-inflammatory effect of vitamin C. An association between vitamin C deficiency and immune dysfunction has been reported (Schoenherr & Jewell, 1997). Serum CRP concentrations have been correlated negatively with serum vitamin C concentration in peripheral arterial disease (Langlois *et al.* 2001), and critically ill patients (Schorah *et al.* 1996). Although intakes of MUFA and vitamin C were different in the two diet groups we investigated, our data do not reveal a direct correlation between the dietary intake of these nutrients and the anti-inflammatory effect of ALA.

One limitation of the present study is the lack of a control group. A second limitation is that plasma phospholipid fatty acid composition data were not collected; therefore, associations between fatty acids and inflammatory markers could not be drawn. Still, our data on dietary fatty acid composition, based upon participants' dietary diaries, revealed no association. Furthermore, no associations were observed between vitamin C and inflammatory markers, although these nutrients were consumed in different quantities by the two dietary groups. Although our data indicated that some inflammatory markers were decreased more when ALA was supplemented in Westernised diets compared with a Mediterranean diet, our data could not confirm that the Mediterranean diet possessed an intrinsic anti-inflammatory effect.

In conclusion, we speculate that ALA supplementation would be more effective in the reduction of some inflammatory markers if patients were consuming a Westernised diet, rather than a Greek-Mediterranean type of diet. The mechanisms for these effects remain to be elucidated.

Acknowledgements

The authors thank Dr E. Karpodini, Dr E. Theriou, and the staff of the Department of Cardiology, Laiko Hospital, for assistance with the management of the subjects. We also wish to thank Dr N. Yiannakouris (Harokopio University) for his review of the manuscript. This project was supported by the Greek Ministry of Development, General Secretariat for Research and Technology (grant 97EL-55) and in part by Becel Institute/Unilever Bestfoods Greece.

References

- Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, Osmundsen K, Smith CW & Ballantyne CM (1998) Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 723–731.
- Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci EL & Willett WC (1995) Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *N Engl J Med* **332**, 977–982.
- Blok WL, Deslypere JP, Demacker PN, van der Ven-Jongekrijg J, Hectors MP, van der Meer JW & Katan MB (1997) Pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy volunteers fed various doses of fish oil for 1 year. *Eur J Clin Invest* **27**, 1003–1008.
- Calder PC (2001) Omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet* **88**, 109–116.
- Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG & James MJ (1996) The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* **63**, 116–122.
- Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW & Libby P (1992) Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* **140**, 301–316.
- Collie-Duguid ESR & Wahle KWJ (1996) Inhibitory effect of fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 969–974.
- De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr & Libby P (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of pro-atherogenic and pro-inflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* **14**, 1829–1836.
- DeGrua TJ (1997) Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* **49**, 15–19.
- Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, *et al.* (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* **320**, 265–271.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001) Executive Summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497.
- Gearing AJ & Newman W (1993) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14**, 506–512.
- James MJ, Gibson RA & Cleland LG (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* **71**, 343–348.
- Johansen O, Seljeflot I, Hostmark AT & Arnesen H (1999) The effect of supplementation with omega-3 fatty acids on soluble markers of endothelial function in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1681–1686.
- Kafatos A, Verhagen H, Moschandreas J, Apostolaki I & van Westerop JJ (2000) Mediterranean diet of Crete: foods and nutrient content. *J Am Diet Ass* **100**, 1487–1493.
- Kew S, Banerjee T, Minihane AM, Finnegan YE, Muggli R, Albers R, Williams CM & Calder PC (2003) Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* **77**, 1287–1295.
- Khalifoun B, Thibault G, Bardos P & Lebranchu Y (1996) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit *in vitro* human lymphocyte-endothelial cell adhesion. *Transplantation* **62**, 1649–1657.
- Langlois M, Duprez D, Delanghe J, De Buyzere M & Clement DL (2001) Serum vitamin C concentration is low in peripheral arterial disease and is associated with inflammation and severity of atherosclerosis. *Circulation* **103**, 1863–1868.

- Lewis B, Hammett F, Katan M, Kay RM, Merckx I, Nobels A, Miller NE & Swan AV (1981) Towards an improved lipid-lowering diet: additive effects of changes in nutrient intake. *Lancet* **ii**, 1310–1313.
- Madsen T, Christensen JH, Blom M & Schmidt EB (2003) The effect of dietary n-3 fatty acids on serum concentrations of C-reactive protein: a dose-response study. *Br J Nutr* **89**, 517–522.
- Madsen T, Skou HA, Hansen VE, Fog L, Christensen JH, Toft E & Schmidt EB (2001) C-reactive protein, dietary n-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* **88**, 1139–1142.
- Meek RL, Urieli-Shoval S & Benditt EP (1994) Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3186–3190.
- Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA & Gorbach SL (1991) Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* **121**, 547–555.
- Nestle M (1995) Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr* **61**, 1313–1320.
- Pasceri V, Willerson JT & Yeh ETH (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* **102**, 2165–2168.
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Papaioannou I, Papadimitriou L, Tousoulis D, Stefanadis C & Toutouzas P (2003) The adoption of Mediterranean diet attenuates the development of acute coronary syndromes in people with the metabolic syndrome. *Nutr J* **2**, 1.
- Price DT & Loscalzo J (1999) Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* **107**, 85–97.
- Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, Vellissaridou AH, Anastasiadis G & Zampelas A (2003) Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* **167**, 237–242.
- Ross R (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115–126.
- Schmidt EB, Varming K, Møller JM, Bulow Pedersen I, Madsen P & Dyerberg J (1996) No effect of a very low dose of n-3 fatty acids on monocyte function in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest* **56**, 87–92.
- Schoenherr WD & Jewell DE (1997) Nutritional modification of inflammatory diseases. *Semin Vet Med Surg* **12**, 212–222.
- Schorah CJ, Downing C, Piripitsi A, Gallivan L, Al-Hazaa AH, Sanderson MJ & Bodenham A (1996) Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in critically ill patients. *Am J Clin Nutr* **63**, 760–765.
- Seljefflot I, Arnesen H, Brude IR, Nenseter MS, Drevon CA & Hjermann I (1998) Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest* **28**, 629–635.
- Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA & Calder PC (2001) Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* **36**, 1183–1193.
- Trichopoulos A (2000) From research to education: the Greek experience. *Nutrition* **16**, 528–531.
- Vega-Lopez S, Kaul N, Devaraj S, Cai RY, German B & Jialal I (2004) Supplementation with omega3 polyunsaturated fatty acids and all-rac alpha-tocopherol alone and in combination failed to exert an anti-inflammatory effect in human volunteers. *Metabolism* **53**, 236–240.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U & Weber PC (1995) Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 622–628.
- Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D & Mantzoros CS (2003) Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 1730–1736.
- Yaqoob P (2002) Monounsaturated fatty acids and immune function. *Eur J Clin Nutr* **56**, 9–13.
- Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA & Calder PC (1998) Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* **67**, 129–135.
- Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA & Calder PC (2000) Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* **30**, 260–274.

Apolipoprotein E Genotype in Dyslipidaemic Patients and Response of Blood Lipids and Inflammatory Markers to Alpha-Linolenic Acid

George K. Paschos¹, Nikos Yiannakouris², Loukianos S. Rallidis³, Ian Davies⁴, Bruce A. Griffin⁴, Demosthenes B. Panagiotakos¹, Fotini N. Skopouli¹, Vasilios Votteas⁵,
Antonis Zampelas¹

¹ Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece

² Department of Home Economics and Ecology, Harokopio University, Athens, Greece

³ Department of Cardiology, General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece

⁴ Centre for Nutrition and Food Safety, School of Biomedical and Life Sciences,
University of Surrey, Guildford, UK

⁵ Department of Cardiology, Laiko University Hospital, Athens, Greece

Address for correspondence and requests to reprints:

Antonis Zampelas, PhD
Laboratory of Nutrition and Clinical Dietetics,
Department of Nutrition-Dietetics, Harokopio University,
70 El. Venizelou St., Athens 17671, Greece.
Tel: +30 (210) 9549153
Fax: +30 (210) 9549141
E-mail: azampelas@hua.gr

Abstract

Objective The effect of alpha-linolenic acid (ALA) supplementation on blood lipids and inflammatory markers, in relation to apolipoprotein (apo) E genotype. **Design** The diets of fifty dyslipidaemic male patients were supplemented with 15ml of flaxseed oil per day, for 12 weeks. Retrospectively, three apo E genotype variants were found ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $n=7$; $\epsilon 3/\epsilon 3$, $n=33$; $\epsilon 3/\epsilon 4$, $n=10$). **Results** No significant differences were found between apo E genotypes in any variables at baseline. ALA supplementation produced a small but significant decrease in high-density lipoprotein cholesterol (from 1.12 mmol/L to 1.08 mmol/L, $P=0.008$) and apo A-I levels (from 1.28 g/L to 1.24 g/L, $P=0.036$) in the $\epsilon 3/\epsilon 3$ homozygotes. In addition, ALA supplementation resulted in a significant decrease in the serum concentration of serum amyloid A (SAA) ($P=0.014$), C-reactive protein (CRP) ($P=0.013$), macrophage colony stimulating factor (MCSF) ($P < 0.001$) and interleukin (IL)-6 ($P=0.028$). Serum SAA and MCSF were also significantly decreased in the $\epsilon 3/\epsilon 4$ group ($P=0.005$ and $P=0.017$, respectively). In contrast, ALA produced no effects on any of the inflammatory markers in the $\epsilon 2/\epsilon 3$ group. **Conclusion** ALA may have beneficial effects on inflammation in dyslipidaemic carriers of the apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotypes, but not in carriers of the $\epsilon 2$ allele.

Key words: alpha-linolenic acid, apolipoprotein E polymorphism, inflammatory markers, serum lipid levels, dyslipidemia

Introduction

Dyslipidemia is well established as a risk factor for the development of atherosclerosis (1). In addition, immunological activation has now been recognized as an important component in the atherogenic process (2). Apolipoprotein (apo) E plays a protective role in atherosclerosis and genetic variation at this locus has been linked to susceptibility to vascular disease (3,4). Apo E is best known for its role in the maintenance of plasma cholesterol levels. This plasma protein serves as a ligand for cellular lipoprotein receptors. However, recent data indicate that apo E may be atheroprotective by mechanisms that are independent of its ability to alter plasma cholesterol levels, including regulation of macrophage- and lymphocyte-mediated chronic inflammatory responses (4,5). *In vitro* cellular studies show that apo E expression not only is modified but also modifies both macrophage and T-lymphocyte cytokine production (6,7). Thus apo E appears to directly influence the immune responses that are part of the atherogenic process.

Genetic variation at the apo E locus results from three common alleles in the population ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$), which code for three protein isoforms that differ by a single amino acid and their charge. This latter property confers different receptor binding affinities on the three isoforms that may underlie the epidemiological associations between apo E genotype, serum lipid levels and vascular disease risk (3,8). The $\epsilon 4$ allele has been associated with elevated serum total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and apo B levels (8,9). In accordance with this, it has been proposed that LDL-cholesterol levels in subjects with the $\epsilon 4$ allele are more sensitive to dietary changes than those in subjects with other ϵ alleles (10,11).

Large epidemiological studies provided evidence to suggest that the dietary intake of alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3) is inversely associated with risk of fatal coronary heart disease (CHD) (12,13). The Lyon Diet Heart Study showed that a Mediterranean diet rich in ALA was more successful in preventing the recurrence of cardiovascular events than a usual, post-infarct, prudent diet (14). The Mediterranean diet has been historically associated with low CHD mortality in such regions as Crete in the 1960s (15). Subsequently, Cretans has been shown to have a 3-fold higher concentration of plasma ALA than the participants of the Zutphen study (Netherlands) (16). However, clinical studies reporting the effects of ALA on blood lipids have produced inconsistent results (17-20). On the other hand, evidence exists on the anti-inflammatory properties of ALA (21,22), suggesting that the beneficial effects of ALA may be independent of cholesterol metabolism.

The possibility that non-specific markers of chronic low-grade inflammation might predict the risk of coronary events is supported by a number of studies (23). C-reactive protein (CRP) has been associated with the presence and severity of atherosclerosis, and has been found to predict acute coronary events in prospective studies (24,25). Other inflammatory markers like serum amyloid A (SAA), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), and interleukin 6 (IL-6) are present in the atherosclerotic lesions and they may play a role in the development of atherosclerotic plaques (26-28).

Since apo E appears to play a multifunctional role in atherosclerosis and to be implicated in the inflammatory process, we hypothesized that the common apo E polymorphism could influence responsiveness to ALA. We therefore aimed to evaluate the effect of the interaction between apo E genotypes and ALA on inflammatory markers, in dyslipidaemic males.

Methods

Subjects

The study population consisted of 50 men, aged 35 to 67 years, diagnosed with dyslipidemia, without clinical evidence of CHD. They were all recruited from the treadmill test Unit in the Department of Cardiology of Laiko University Hospital, Athens, after screening by medical history, physical examination, electrocardiograph and laboratory analysis. Subjects were excluded if any of the following were present: infection, endocrine, liver, vascular or haemostatic disease, hypertension, medication known to affect lipoprotein metabolism, habitual consumption of more than 30 units alcohol (1 unit=8g of alcohol) per week, smoking more than 10 cigarettes per day, or habitual undertaking of more than 6 h of vigorous exercise per week. Dietary habits and exercise pattern were assessed by questionnaire. All study participants were screened at entry to follow the average Greek diet (see diet assessment). Height and weight were measured with subjects in light clothing and shoes removed. Sitting arterial blood pressure was measured after 10 min rest on two separate occasions. All subjects gave their written informed consent to the study, which was approved by the local Ethical Committee.

Study design

Subjects were supplemented with 15 ml of flaxseed oil per day containing approximately 8.1 g of ALA (n-3) for 12 weeks. The supplement was taken three times per day, one teaspoon of 5 ml per meal. All participants were instructed to maintain their dietary habits and usual lifestyle and to avoid intake of anti-inflammatory drugs, vitamins or other dietary supplements throughout the 12-week experimental period. Research dietitians supervised the participants for their dietary habits, alcohol consumption and physical activity habits by phone calls once a week and visits to the hospital. Visits were held once a month and subjects were provided with the oil. Compliance was assessed by the return of empty bottles. Subjects were also weighed at each visit. Following the intervention period, and retrospectively, subjects were screened for the apo E polymorphism and they were allocated into three groups according to the apo E genotype. Flaxseed oil was provided by Savant International, Leeds, UK. The fatty acid composition of the oil is given in Table 1. [Table 1]

Dietary assessment

Dietary assessment was based on a food frequency questionnaire and a dietary 24-h recall. Frequency of milk, bread, fruits, vegetables, legume, olive oil, fish and meat consumption together with the 24-h dietary recall, allowed us to select volunteers following the average Greek diet (see Table 2). Dietary compliance was assessed by a total of three 4-day dietary record (one every four weeks). The recorded days comprised of three weekdays and one weekend day. The diet diaries were analyzed using the Nutritionist V Diet Analysis software (Version 2.1, First Data Bank Inc. USA), modified for the Greek population, as previously described (29).

Analytical procedures

The volunteers attended the Department of Cardiology at Laiko University Hospital on two occasions for blood collection, at the beginning and the end of the experimental period. On each visit, blood samples were collected at 8.00 am after 12 h overnight fast. Subjects laid supine for 10 min prior to the blood collection. Blood was collected into a glass tube without preservative (*Vacutainer tube*, *Becton*

Dickinson) for serum lipids and inflammatory indices determination, and a K₃EDTA tube for DNA isolation. All samples were collected without occlusion. The tubes were kept on ice and until centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4° C within 2 h of blood collection. Serum samples were stored at -80° C for further analysis. Serum total cholesterol, triglyceride, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels were determined using enzymatic colorimetric assays on an ACE analyzer (*Sciapparelli Biosystems Inc., USA*). Serum concentrations of apo A-I and apo B were determined by turbidimetric immunoprecipitation assays on the ACE analyzer. LDL subclasses were separated by density-gradient ultracentrifugation, as previously described by Griffin et al (30). CRP and SAA were assayed by particle-enhanced immunonephelometry (*N Latex, Date-Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany*) with a range from 0.175 to 1100 mg/L and 0.75 to 1000 mg/L, respectively. IL-6 and MCSF were measured with high sensitivity enzyme linked immunoassay (*R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, U.K.*) with a range from 0.156 to 10 pg/mL and 25.3 to 1715 pg/mL, respectively. The intra-assay and inter-assay coefficient of variation was <5% for CRP, SAA and MCSF and <10% for IL-6. All samples were assayed in duplicate. To minimize variability, samples before and after the ALA supplementation for each subject were run in the same assay.

Genomic DNA was extracted from leukocyte nuclei by the salting-out method (31). Apo E genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification and subsequent digestion with *Hha* I (*New England Biolabs*), as described by Reymer et al (32).

Statistical analysis

Data on clinical parameters, dietary intake and serum lipid levels are expressed as the mean and standard deviation (SD), unless otherwise stated. Inflammatory markers are also expressed as the median with 25th and 75th percentile. Differences in baseline levels of clinical, dietary and serum lipid traits between ApoE genotype were assessed using Welch statistic, in order to account for the unequal variances. The association between smoking status and genotypes were assessed using the *Fisher's exact* test due to the small number of participants. Differences in serum lipid levels before and after the ALA supplementation period were determined by Student's paired samples *t*-tests, after controlling for normality using the Wilk's test. Serum triglycerides, apo A-I and apo B values were log-transformed to correct for skewed distribution, but untransformed mean values are presented for ease of interpretation. Since data on inflammatory markers were not normally distributed even after logarithmic transformation, non-parametric analyses were performed to determine differences at baseline (Kruskal-Wallis test) and before and after ALA supplementation (Wilcoxon signed ranks test). *P*-values less than 0.05 were considered as significant. Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software (SPSS for Windows, release 10.0.5).

Results

Apo E genotype distribution and baseline characteristics

Of the 50 dyslipidaemic subjects studied, 33 were homozygous for the most frequent $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype, seven carried the $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype while ten had the $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype. No individual expressed an $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ or $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotype. The allele distribution was as follows: $\epsilon 2$, 7.0%; $\epsilon 3$, 83.0%, $\epsilon 4$, 10.0%.

Subjects with different apo E genotypes did not differ in body mass index (BMI), average sitting blood pressure, white blood cell (WBC) count, and smoking status

(Table 2). In addition, there were no differences in the consumption of nutrients between the apo E genotype groups, including ALA and other polyunsaturated fatty acids (Table 2). The diet diaries indicated that subjects' background diet remained unchanged throughout the study. Moreover, body weights and blood pressure, as well as the WBC count of the volunteers, did not change significantly during the course of the study (data not shown).

[Table 2]

Table 3 shows mean values of total cholesterol, LDL cholesterol, LDL density, HDL cholesterol, triglycerides, apo A-I and apo B before and after the ALA supplementation for the study population as a whole and in each apo E genotype subgroup. In accordance with the entry criteria for recruitment, subjects exhibited elevated levels of total and LDL cholesterol, triglycerides and apo B (5.98 ± 0.87 mmol/L, 3.97 ± 0.95 mmol/L, 1.74 ± 0.95 mmol/L and 1.22 ± 0.14 g/L, respectively) at baseline. Mean baseline levels of serum lipoproteins, apo A-I and apo B, as well as LDL density, were similar across the three apo E genotypes. In the subjects group as a whole ($n=50$), ALA supplementation resulted in statistically significant decreases of 3.7% ($P=0.011$) and 3.1% ($P=0.030$) in serum HDL cholesterol and apo A-I levels, respectively. Reductions in HDL cholesterol and apo A-I were also observed in the apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ group with decreases of 4.1% ($P=0.008$) and 3.8% ($P=0.036$), respectively. No differences were shown in either the apo $\epsilon 2/\epsilon 3$ or the $\epsilon 3/\epsilon 4$ groups. There was no significant difference in the serum concentration of total cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride, and apo B or LDL density either in the whole group or the apo E genotype subgroups after ALA supplementation.

[Table 3]

Table 4 shows the effect of ALA supplementation on SAA, CRP, MCSF and IL-6 concentrations in the 50 dyslipidaemic subjects and in the genotypic subgroups. Baseline levels of inflammatory markers were similar across apo E genotypes. Serum levels of SAA were markedly decreased after ALA supplementation in the study population as a whole ($P<0.001$). In this analysis, we excluded two subjects with baseline levels of SAA above the 98th percentile (>50 mg/L). However, similar results were obtained when these two subjects were included in the analysis. The reduction in SAA was evident in the $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($P=0.014$) and $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($P=0.005$) groups by 15.9% and 28.8%, respectively. A similar trend was observed in the group of $\epsilon 2/\epsilon 3$ individuals, but the reduction (16.7%) was not significant ($P=0.24$). The response in subjects with the $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype was highly variable ranging from an increase of 37.2% to a decrease of 39.4%, while all $\epsilon 3/\epsilon 4$ individuals displayed reductions in SAA ranging from 18.6% to 58.4% (Figure 1).

[Table 4]

[Figure 1]

Decreases in serum MCSF were also apparent following the ALA supplementation. A significant decrease was observed for the group as a whole ($P<0.001$), the apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($P<0.001$) and $\epsilon 3/\epsilon 4$ subgroups ($P=0.017$), but not for the $\epsilon 2/\epsilon 3$ group ($P=0.18$). In this case, however, differences between $\epsilon 2/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ s were unremarkable, with most of the $\epsilon 2$ allele carriers displaying decreases in MCSF that ranged from 0.9% to 32.9% (Figure 1).

The concentration of serum CRP decreased in the whole group in response to ALA supplementation ($P=0.002$) due, in the main, to a significant reduction in the $\epsilon 3/\epsilon 3$ subjects ($P=0.013$). In contrast, no statistically significant differences were observed in those with the apo $\epsilon 2/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype. Serum IL-6 was also

significantly decreased in the whole group ($P=0.024$) and in the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype subgroup ($P=0.028$) in response to ALA, while $\epsilon 2/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ showed no change.

Discussion

We investigated whether the common apo E polymorphism influences the response of blood lipids and inflammatory markers to ALA supplementation (8.1 g/day for 12 weeks), in a group of 50 dyslipidaemic middle-aged males. We found that ALA supplementation was associated with a significant reduction in the serum concentration of SAA and MCSF in the subgroups of $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ subjects, in addition to a significant reduction in CRP and IL-6 levels in $\epsilon 3/\epsilon 3$ individuals. However, ALA was not associated with inflammatory markers in the group of $\epsilon 2$ allele carriers. We also found no apo E genotype-specific beneficial effects of ALA on fasting serum lipid levels.

The long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) found in fish oils, namely eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have been extensively studied for their effects on blood lipids and it is well established that they possess hypotriglyceridemic properties (33) and reduce coronary mortality (34,35). In high doses, n-3 PUFAs also lower cholesterol and have antithrombotic and anti-inflammatory properties (36). Whether ALA also exerts similar beneficial effects on serum lipid concentrations is yet not clear. Short-term studies in primary (17,37,38) and secondary prevention (14,39) showed no effect of ALA supplementation on fasting serum triglyceride and cholesterol levels. When comparing safflower, sunflower, linseed and fish oils, Kestin et al (17) and Singer et al (38) reported no change in serum total cholesterol, LDL cholesterol or HDL cholesterol after linseed oil supplementation in hyperlipidaemic patients. It has been proposed that ALA does not affect blood triglycerides and it lowers LDL cholesterol probably only when it replaces saturated fatty acids (33).

Studies on the effect of ALA on inflammatory markers are controversial. In particular, on the one hand, it has been reported that TNF- α and IL-1 β production were suppressed by lipopolysaccharide-stimulated monocytes of healthy volunteers after a high dose of dietary ALA (40). In addition, in our previous report (22) supplementation with ALA reduced serum IL-6 and C-reactive protein (CRP) concentrations. On the other hand, other research has demonstrated that ALA did not affect the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 or interferon- γ (IFN- γ) by mononuclear cells (41). Recent evidence has documented that intake levels of ≤ 9.5 g ALA/d or ≤ 1.7 g EPA+DHA/d did not alter production of cytokines by monocytes and lymphocytes although fatty acid composition of mononuclear cells was significantly altered (42).

Initial analysis performed for all 50 dyslipidaemic participants of the present study as a homogeneous group also failed to reveal a hypotriglyceridemic or hypocholesterolemic effect of ALA (22). In view of the contribution of apo E on lipoprotein metabolism and the effects of the apo E genotype on fasting lipid levels (8,9) and on lipoprotein responsiveness to dietary manipulations (43), we decided to reanalyze our results in relation to allele variants of this gene. This could reveal potential apo E genotype-specific responses to ALA, previously undisclosed when the data were analyzed without considering the apo E polymorphism. Moreover, in a recent study showing a significant hypotriglyceridemic effect of fish oil supplementation in 50 subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype, Minihane et al (44) reported a striking impact of apo E genotype on lipid responses to this dietary intervention, with $\epsilon 2$ allele carriers ($n=8$) displaying a marked reduction in

postprandial incremental triglyceride response relative to non- $\epsilon 2$ carriers. However, no evidence for an apo E genotype-specific beneficial effect of ALA on blood lipids was found in our study. ALA supplementation not only failed to exert a beneficial effect on serum triglyceride or cholesterol levels, but also resulted in a small, but statistically significant, reduction in HDL cholesterol levels, consistent with a significant reduction in apo A-I levels, in the overall and apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ group. These reductions have been previously reported by other studies where diet was enriched with ALA (17, 45). Decreases in HDL cholesterol and apo A-I levels were not nearly so apparent in the $\epsilon 2/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotypes.

We also found no relationship between apo E genotype and baseline fasting lipid levels. This is in contrast with what has been observed in most human populations, in whom the $\epsilon 4$ allele tends to increase serum total and LDL cholesterol, whereas the $\epsilon 2$ allele has the opposite effect (8,9). The lack of association of the $\epsilon 4$ allele with elevated serum cholesterol levels has also been observed in other ethnic groups (46,47), and it may explain, at least in part, why in our population the $\epsilon 4$ allele does not increase the risk of CHD and myocardial infarction (48).

In contrast to serum lipids, a beneficial effect of ALA on markers of inflammation was observed in this group of dyslipidaemic subjects. We previously reported (22) that circulating levels of SAA, CRP and IL-6 were significantly reduced after the 3-month intervention period (by 23.1%, 38.0% and 10.5%, respectively). Here we report for the first time that serum levels of MCSF are also significantly reduced in response to ALA (by 23.8%, $P < 0.001$). MCSF is believed to play a key role in the differentiation of monocytes to macrophages in the arterial intima, one of the earliest events in atherosclerosis (49). The finding that MCSF is expressed in atherosclerotic but not normal human arteries (27), together with the central role of the macrophage in atherosclerosis suggests that MCSF may be one of several cytokines that modulate monocyte activation during atherogenesis. The observed anti-inflammatory properties of ALA may underlie its beneficial effect in primary and secondary prevention of CHD (12-14). However, the mechanism(s) underlying the reduction of inflammatory markers following supplementation with ALA remain unknown, although suppression of eicosanoid production is likely to be involved. It has been suggested that n-3 fatty acids lead to a suppression of thromboxane A_2 synthesis in monocytes, and this results in a decrease in tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β synthesis (50). Caughey et al (40) demonstrated that a diet enriched with flaxseed oil, providing 13.7g ALA per day, can inhibit the *ex vivo* production of TNF- α and IL-1 β by 30% in four weeks. These cytokines are known to induce a large increase in MCSF secretion from both vascular endothelial and smooth muscle cells in cultures (27), and thus are supposed to control MCSF expression. It is, therefore, quite possible that ALA can reduce MCSF levels by suppression of eicosanoid production. Furthermore, ALA can reduce IL-6 synthesis by suppressing the production of TNF- α and IL-1, as IL-6 is released in response to stimulation by these monocyte-derived cytokines. The decrease in serum IL-6 levels shown in the present study is consistent with reports in the literature on n-3 fatty acids, as reviewed by McCarty (51). IL-6 is a pleiotropic cytokine (52), which in turn controls SAA and CRP hepatic production (23).

Another novel finding of our study is that genetic variation in apo E gene locus influences responsiveness of inflammatory markers to ALA supplementation. To the best of our knowledge, no previous studies have explored potential associations between the apo E genotype and the response of inflammatory markers to n-3 fatty acids, while two studies (53,54) have indicated a significant impact of the phenotypic

variation in apo E on serum CRP levels. Manttari et al (53) reported an association between apo E polymorphism and CRP levels in dyslipidaemic middle-aged men, with $\epsilon 3/\epsilon 3$ homozygotes exhibiting higher serum CRP levels compared to carriers of the $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles. In another study showing a negative and independent influence of apo E on CRP concentrations in obese adults, Bach-Ngohou et al (54) reported that serum CRP levels were strongly and inversely correlated with serum apo E levels only in the subgroup of $\epsilon 3/\epsilon 3$ subjects, while no significant correlation was found in the $\epsilon 3/\epsilon 4$ subgroup. The results from these studies suggest a potential specific effect of apo E isoforms on inflammation. In our group of dyslipidaemic subjects, no significant association of apo E genotype with baseline CRP levels, or with IL-6, SAA and MCSF levels was observed, but the greatest benefits in inflammatory markers following ALA supplementation were evident in apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ individuals. More specifically, while a significant reduction in SAA and MSCF levels in response to ALA was found in the groups of $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ subjects, in addition to a significant reduction in CRP and IL-6 levels in $\epsilon 3/\epsilon 3$ subjects, no significant beneficial changes in inflammatory markers were detected in the subgroup of $\epsilon 2$ allele carriers. These results indicate that a high ALA intake may not benefit dyslipidaemic subjects with the $\epsilon 2$ allele, at least in terms of cytokine suppression and the inflammatory response. Our findings, however, are based on a relative small number of $\epsilon 2$ allele carriers and need confirmation from further studies.

As a consequence of the smaller number of subjects in each apo E genotype subgroup, especially in the groups of $\epsilon 4$ and $\epsilon 2$ allele carriers, the power to detect differences in the parameters examined before and after the intervention period was decreased in the subgroup analysis. However, that fact that we were able to detect differences of statistical significance in the small group of $\epsilon 4$ allele carriers provides reassurance regarding the validity of the data presented herein. It must be noted that the distribution of apo E alleles in our group of dyslipidaemic subjects was not different to the one which was reported previously in a group of 240 healthy Greek subjects (48), and it is also quite close to that reported elsewhere for other southern European populations (55,56).

Here, it is critical to point out the importance of the difference of gene and diet distribution between different populations on atherogenesis. Indeed, distribution of apo E alleles in the Greek population (57) is markedly different from the distribution in the Northern European populations (58). Furthermore, the diet of the Greek population has many differences in comparison to the diet of the Northern Europeans (59). It is therefore quite possible that the effect of apo E genotype on the response of inflammatory markers to ALA is specific for the Greek population. In fact, gene-diet interactions may account at least in part for the differences noted between populations in the dietary response (60). The concept of gene-diet interaction describes the modulation of the effect of a dietary component on a specific phenotype (e.g. plasma lipid concentration) by a genetic polymorphism. Alternatively, the notion refers to the dietary modification of the effect of a genetic variant on a phenotypic trait. Although there is a number of studies on the impact of gene-diet interactions on disease development, the insight of gene-diet interplay still remain to be elucidated.

The molecular mechanisms involved in interaction between isoforms of apo E and the inflammatory response are unknown, but the fact that apo E has been involved in the regulation of the inflammatory response (4) suggests that such links could exist. *In vitro* cellular studies have shown that apo E inhibits the proliferation of T lymphocytes (61) and can suppress mitogen-activated proliferation of both CD4 and

CD8 T cells (7). Data from these studies show a direct correlation between the inhibitory activity of different lipoprotein fractions and their content of apo E. Interestingly, this anti-proliferative activity is not a direct cytotoxic effect, and other outcomes of mitogen stimulation are equally affected, including T lymphocyte IL-2 and interferon- γ production (4,7). However, it is not yet clear where and how apo E is acting to inhibit lymphocyte responsiveness or how in general it modulates the inflammatory process. Further studies are needed to clarify these issues and to delineate how apo E isoforms could modulate the effects of n-3 fatty acids on inflammation.

A number of limitations of the present study need to be addressed. Firstly, the study is a single-blind, placebo controlled parallel study instead of a two phase cross-over dietary intervention that is inherently more powerful to reveal statistically significant differences. However, a cross-over design might raise the problem of carry-over effect, since there is lack of data on the wash-out period needed after ALA supplementation. A second limitation of this study is that the daily dose of ALA we provided by the flaxseed oil is difficult to be achieved by the usual diet. Nevertheless, products like spreads enriched in the appropriate fatty acids can be produced for this purpose by relevant industries. A last limitation refers to the small number of subjects in the groups of $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ carriers. This is a common problem of intervention studies in which compliance of participants is low.

In summary, our data show that ALA supplementation to dyslipidaemic subjects has a beneficial effect on MCSF and other systemic markers of inflammation and that the apo E genotype influences responsiveness to this dietary treatment. Due to the limited number of $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ allele carriers, these results need confirmation in a larger study in which genotyping is prospective and used to select subjects. This would allow equal numbers of genetic variants to be tested and thus maximise statistical power. Nevertheless, our study has provided preliminary evidence to suggest a role for the common apo E polymorphism in modulating the effects of n-3 PUFAs on inflammation, a finding that, if confirmed, may have potential clinical significance.

Acknowledgments

We thank the volunteers who took part in this study. The authors also thank Dr. G. Anastasiadis, Dr. E. Karpodini, Dr. E. Theriou, and the staff of the Department of Cardiology, Laiko University Hospital, for their assistance. This project was supported by the Greek Ministry of Development, General Secretariat for Research and Technology (grant 97EL-55) and in part by Becel Institute/Unilever Bestfoods Greece.

References

1. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 299-309.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
3. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-1255.
4. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 243-251.
5. Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis DP. Apolipoprotein E polymorphism and Atherosclerosis. *Angiology* 2003; 54: 59-71.
6. Brand K, Mackman N, Curtiss LK. Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J Clin Invest* 1993; 91: 2031-2039.
7. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol* 1994; 159: 124-139.
8. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
9. Boerwinkle E, Visvikis S, Welsh D, et al. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Med Gene.* 1987; 27: 567-582.
10. Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H. Serum cholesterol response to dietary cholesterol and apoprotein E phenotype. *Lancet* 1988; 2: 1261.
11. Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P et al. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1994; 35: 1965-1975.
12. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996; 313: 84-90.
13. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE et al. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 890-897.
14. de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994; 343:1454-1459.
15. Kromhout D, Keys A, Aravanis C et al. Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 889-894.
16. Sandker GW, Kromhout D, Aravanis C et al. Serum cholesteryl ester fatty acids and their relation with serum lipids in elderly men in Crete and The Netherlands. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 201-208.
17. Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 1028-1034.

18. Wardlaw GM, Snook JT, Lin MC, Puangco MA, Kwon JS. Serum lipid and apolipoprotein concentrations in healthy men on diets enriched in either canola oil or safflower oil. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 104-110.
19. Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998; 80: 163-167.
20. Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 221-227.
21. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 343-348.
22. Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, Velissaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A. Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 2003; 167: 237-242.
23. Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 2000; 343: 1179-1182.
24. Koenig W, Sund M, Frohlich M et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999; 99: 237-242.
25. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 537-547.
26. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3186-3190.
27. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 301-316.
28. DeGraba TJ. Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* 1997; 49: 15-19.
29. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1730-1736.
30. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990; 83: 59-67.
31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
32. Reymer WA, Groenemeyer BE, van de Burg R, Kastelein J. Apolipoprotein E genotyping on agarose gels. *Clin.Chem* 1995; 41: 1046-1047.
33. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1645-1654.

34. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*. 1999; 354: 447-455.
35. Harris WS, Park Y, Isley WL. Cardiovascular disease and long-chain omega-3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 9-14.
36. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002; 21: 495-505.
37. Nydahl M, Gustafsson IB, Ohrvall M, Vessby B. Similar serum lipoprotein cholesterol concentrations in healthy subjects on diets enriched with rapeseed and with sunflower oil. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 128-137.
38. Singer P, Wirth M, Berger I. A possible contribution of decrease in free fatty acids to low serum triglyceride levels after diets supplemented with n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1990; 83: 167-175.
39. Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 11: 485-491.
40. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 116-122.
41. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G et al. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 2001; 36: 1183-1193.
42. Kew S, Banerjee T, Minihane AM et al. Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1287-1295.
43. Ordovas JM. The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 171-187.
44. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC et al. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1990-1997.
45. Nestel PJ, Pomeroy SE, Sasahara T et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1163-1170.
46. Deiana L, Res GM, Carru C et al. Lack of influence of apolipoprotein E4 on lipoprotein levels in the island population of Sardinia. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 290-294.
47. Aguilar CA, Talavera G, Ordovas JM et al. The apolipoprotein E4 allele is not associated with an abnormal lipid profile in a native American population following its traditional lifestyle. *Atherosclerosis* 1999; 142: 409-414.
48. Kolovou G, Yiannakouris N, Hatzivassiliou M et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with myocardial infarction in Greek patients with coronary artery disease. *Curr Med Res Opin* 2002; 18: 118-124.
49. Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum free cultures. *J Immunol* 1987; 139: 3703-3709.

50. Caughey GE, Pouliot M, Cleland LG, James MJ. Regulation of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta synthesis by thromboxane A2 in non-adherent human monocytes. *J Immunol* 1997; 158: 351-358.
51. McCarty MF. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med Hypotheses* 1999; 52: 465-477.
52. Herity NA. Interleukin 6: a message from the heart. *Heart* 2000; 84: 9-10.
53. Manttari M, Manninen V, Palosuo T, Ehnholm C. Apolipoprotein E polymorphism and C-reactive protein in dyslipidemic middle-aged men. *Atherosclerosis* 2001; 156: 237-238.
54. Bach-Ngohou K, Nazih H, Nazih-Sanderson F et al. Negative and independent influence of apolipoprotein E on C-reactive protein (CRP) concentration in obese adults. Potential anti-inflammatory role of apoE in vivo. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1752-1758.
55. James RW, Boemi MG, Giansanti R, Fumelli R, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Tromb* 1993; 13: 1456-1459.
56. Bailleul S, Couders R, Landais V, Lefevre G, Rainhvarg D, Etienne J. Direct phenotyping of human apolipoprotein E in plasma: application to population frequency distribution in Paris (France). *Hum Hered* 1993; 43: 159-165.
57. Kolovou GD, Daskalova DC, Hatzivassiliou M et al. The epsilon 2 and 4 alleles of apolipoprotein E and ischemic vascular events in the Greek population – Implications for the interpretation of similar studies. *Angiology* 2003; 54: 51-58.
58. Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M et al. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis* 2000; 152: 475-488.
59. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003; 348: 2599-2608.
60. Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1098-1111.
61. Pepe MG, Curtiss LK. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol* 1986; 136: 3716-3723.

Table 1. Fatty acid, total sterols and total tocopherols composition of the flaxseed oil (per 100 grams).

<i>Constituents</i>	
Palmitic acid (g)	5.9
Stearic acid (g)	3.6
Oleic acid (g)	18.2
Linoleic acid (g)	13.9
alpha-linolenic acid (g)	54.2
Total sterols (g)	0.4
Total tocopherols (mg)	54.27

Table 2. Characteristics and diet composition of the subjects according to apo E genotype.

<i>Variable</i>	All subjects (n=50)	$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	<i>P</i> -value
Age (yrs)	50.4 $\pm$ 7.3	51.1 $\pm$ 5.0	52.0 $\pm$ 7.1	47.6 $\pm$ 6.8	0.031
BMI (kg/m ²)	28.4 $\pm$ 3.4	27.6 $\pm$ 2.5	28.5 $\pm$ 3.9	28.7 $\pm$ 2.6	0.70
Systolic BP (mm Hg)	121.8 $\pm$ 12.0	120.7 $\pm$ 11.0	122.4 $\pm$ 12.7	120.7 $\pm$ 11.2	0.68
Diastolic BP (mm Hg)	79.2 $\pm$ 8.5	79.3 $\pm$ 7.9	79.3 $\pm$ 9.3	78.5 $\pm$ 7.1	0.75
WBCs (x10 ³)	6.8 $\pm$ 1.9	7.4 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 2.0	6.1 $\pm$ 1.2	0.23
Smokers (yes/no)	22/28	4/3	15/18	3/7	0.53
<i>Dietary intake</i>					
Energy (Kcal)	2181 $\pm$ 243	2213 $\pm$ 262	2177 $\pm$ 250	2196 $\pm$ 231	0.49
Proteins %	15.1 $\pm$ 2.4	15.0 $\pm$ 3.3	15.2 $\pm$ 5.4	14.9 $\pm$ 4.4	0.59
Carbohydrates %	47.7 $\pm$ 3.8	48.3 $\pm$ 6.3	47.5 $\pm$ 12.4	48.0 $\pm$ 7.5	0.77
Fat %	35.9 $\pm$ 4.1	36.5 $\pm$ 4.6	35.7 $\pm$ 8.5	37.1 $\pm$ 5.3	0.63
SFAs (%)	16.1 $\pm$ 3.6	16.2 $\pm$ 3.2	16.1 $\pm$ 3.4	16.1 $\pm$ 3.5	0.30
MUFAs (%)	14.9 $\pm$ 3.3	14.5 $\pm$ 3.4	14.7 $\pm$ 3.2	15.5 $\pm$ 3.7	0.39
PUFAs (%)	5.5 $\pm$ 1.2	5.3 $\pm$ 1.6	5.5 $\pm$ 1.3	5.5 $\pm$ 1.4	0.47
ALA (g)	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	0.53
EPA (g)	0.3 $\pm$ 0.06	0.4 $\pm$ 0.10	0.3 $\pm$ 0.09	0.4 $\pm$ 0.06	0.62
DHA (g)	0.2 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.07	0.2 $\pm$ 0.06	0.2 $\pm$ 0.08	0.82
Cholesterol (mg)	216 $\pm$ 27.0	215 $\pm$ 29.3	216 $\pm$ 28.2	214 $\pm$ 26.4	0.73
Alcohol %	1.3 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	0.57
Vitamin C (mg)	120.1 $\pm$ 14.6	120.2 $\pm$ 23.3	119.7 $\pm$ 18.1	119.3 $\pm$ 20.4	0.46
Dietary fiber (g)	25.4 $\pm$ 3.0	25.8 $\pm$ 4.5	25.2 $\pm$ 4.2	24.7 $\pm$ 4.5	0.38

BMI, body mass index; BP, blood pressure; WBCs, white blood cells, SFAs, saturated fatty acids; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; ALA, alpha-linolenic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid.

Table 3. Serum lipoprotein profile of dyslipidaemic subjects before and after a 12-week ALA supplementation period and in subgroups determined by apo E genotype.

<i>Variable</i>	Before	After	<i>P</i> -value ^a
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	
Total cholesterol (mmol/L)*			
All (n=50)	5.98 $\pm$ 0.87	5.84 $\pm$ 0.95	0.27
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	5.70 $\pm$ 1.02	5.72 $\pm$ 1.32	0.94
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	6.12 $\pm$ 0.83	5.92 $\pm$ 0.85	0.16
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	5.72 $\pm$ 0.86	5.66 $\pm$ 1.06	0.89
LDL- cholesterol (mmol/L)*			
All (n=50)	3.97 $\pm$ 0.95	3.90 $\pm$ 0.92	0.33
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	3.74 $\pm$ 0.79	3.48 $\pm$ 0.76	0.29
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	4.16 $\pm$ 0.79	3.95 $\pm$ 0.91	0.10
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	3.89 $\pm$ 0.83	3.88 $\pm$ 1.10	0.57
LDL density (g/mL)*			
All (n=50)	1.029 $\pm$ 0.003	1.029 $\pm$ 0.004	0.88
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	1.028 $\pm$ 0.004	1.028 $\pm$ 0.004	0.56
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	1.029 $\pm$ 0.003	1.029 $\pm$ 0.004	0.91
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	1.030 $\pm$ 0.004	1.030 $\pm$ 0.003	0.65
HDL- cholesterol (mmol/L)*			
All (n=50)	1.10 $\pm$ 0.27	1.06 $\pm$ 0.26	0.011
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	1.13 $\pm$ 0.29	1.10 $\pm$ 0.27	0.51
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	1.12 $\pm$ 0.26	1.08 $\pm$ 0.28	0.008
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	1.00 $\pm$ 0.28	0.97 $\pm$ 0.18	0.53
Triglycerides (mmol/L)*			
All (n=50)	1.74 $\pm$ 0.95	1.83 $\pm$ 1.01	0.38
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	1.60 $\pm$ 0.47	1.70 $\pm$ 0.67	0.20
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	1.83 $\pm$ 1.01	1.95 $\pm$ 1.15	0.39
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	1.51 $\pm$ 1.01	1.47 $\pm$ 0.45	0.83
Apo A-I (g/L)*			
All (n=50)	1.27 $\pm$ 0.15	1.23 $\pm$ 0.17	0.030
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	1.20 $\pm$ 0.18	1.16 $\pm$ 0.14	0.18
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	1.28 $\pm$ 0.14	1.24 $\pm$ 0.18	0.036
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	1.25 $\pm$ 0.16	1.24 $\pm$ 0.16	0.88
Apo B (g/L)*			
All (n=50)	1.22 $\pm$ 0.14	1.21 $\pm$ 0.18	0.60
$\epsilon 2/\epsilon 3$ (n=7)	1.20 $\pm$ 0.14	1.17 $\pm$ 0.22	0.48
$\epsilon 3/\epsilon 3$ (n=33)	1.23 $\pm$ 0.13	1.20 $\pm$ 0.16	0.64
$\epsilon 3/\epsilon 4$ (n=10)	1.20 $\pm$ 0.18	1.26 $\pm$ 0.22	0.26

ALA, alpha-linolenic acid; Apo, apolipoprotein

* No significant differences among apo E groups at entry

^a *P*-values by paired *t*-tests. Logarithmic transformation was performed for triglycerides, apo A-I and apo B values before analysis.

Table 4. Serum inflammatory markers levels of dyslipidaemic subjects before and after a 12-week ALA supplementation period and in subgroups determined by apo E genotype.

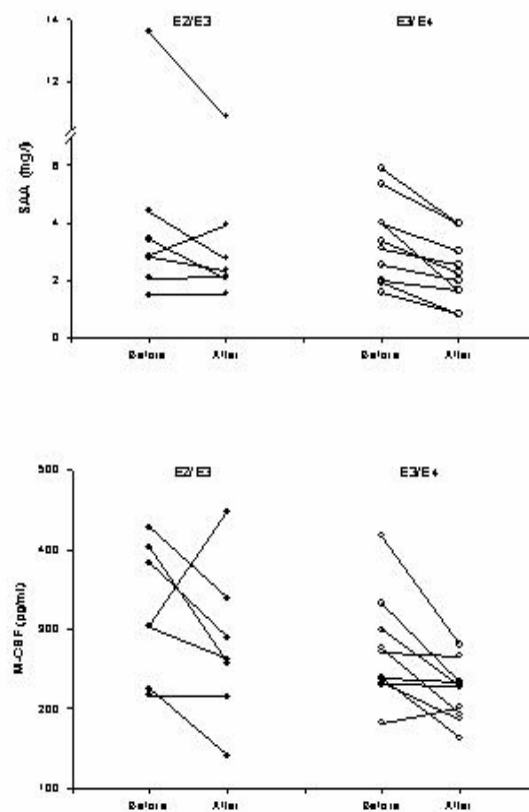
	Before		After		
<i>Variable</i>	Mean ± SD	Median [25 th -75 th percentile]	Mean ± SD	Median [25 th -75 th percentile]	<i>P</i> -value ^a
SAA (mg/L) *					
All (n=48)	4.4 ± 4.1	3.2 [2.3-5.3]	3.0 ± 2.7	2.4 [1.6-3.8]	<0.001
ε2/ε3 (n=7)	4.4 ± 4.2	2.9 [2.1-4.4]	3.7 ± 3.3	2.3 [2.1-3.9]	0.24
ε3/ε3 (n=31)	4.7 ± 4.7	3.0 [2.3-5.4]	3.1 ± 2.9	2.4 [1.5-3.9]	0.014
ε3/ε4 (n=10)	3.4 ± 1.4	3.2 [2.0-4.3]	2.3 ± 1.1	2.1 [1.4-3.2]	0.005
CRP (mg/L) *					
All (n=50)	3.01 ± 3.95	1.24 [0.71-3.70]	1.57 ± 1.65	0.93 [0.56-1.93]	0.002
ε2/ε3 (n=7)	3.23 ± 2.73	1.43 [1.07-5.78]	1.85 ± 1.28	1.84 [0.53-2.98]	0.091
ε3/ε3 (n=33)	3.29 ± 4.54	1.24 [0.62-3.37]	1.69 ± 1.88	0.99 [0.56-1.79]	0.013
ε3/ε4 (n=10)	1.94 ± 2.19	1.09 [0.66-2.48]	0.97 ± 0.77	0.71 [0.35-1.68]	0.33
MCSF (pg/mL)*					
All (n=50)	310 ± 84	295 [258-364]	250 ± 75	241 [193-280]	<0.001
ε2/ε3 (n=7)	323 ± 84	304 [225-403]	276 ± 99	262 [196-339]	0.18
ε3/ε3 (n=33)	319 ± 87	295 [265-365]	253 ± 77	248 [192-281]	<0.001
ε3/ε4 (n=10)	272 ± 66	255 [232-307]	221 ± 36	229 [192-242]	0.017
IL-6 (pg/mL) *					
All (n=50)	3.2 ± 2.8	2.2 [1.4-3.9]	2.4 ± 1.7	1.7 [1.3-2.9]	0.024
ε2/ε3 (n=7)	2.7 ± 1.0	2.5 [1.7-3.3]	2.4 ± 1.2	2.1 [1.6-3.4]	0.61
ε3/ε3 (n=33)	3.4 ± 3.3	2.3 [1.3-4.3]	2.5 ± 1.9	1.7 [1.3-3.0]	0.028
ε3/ε4 (n=10)	2.5 ± 1.8	1.7 [1.2-4.5]	1.8 ± 1.0	1.6 [1.2-2.3]	0.37

ALA, alpha-linolenic acid; SAA, serum amyloid A; CRP, C-reactive protein; MCSF, macrophage colony stimulating factor; IL-6, interleukin-6

* No significant differences among apo E groups at entry by Kruskal-Wallis test

^a *P*-values by non-parametric (Wilcoxon) test

Figure 1. Individual values for serum concentrations of serum amyloid A (SAA) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) before and after a 12-week alpha-linolenic acid (ALA) supplementation period in the apolipoprotein $\epsilon 2/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype groups.



Ε. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη εξέτασε τις επιδράσεις του ALA, του πρόδρομου των ω-3 λιπαρών οξέων σε μια σειρά παραγόντων κινδύνου για CHD. Η υπόθεση μας είναι ότι η αυξημένη πρόσληψη ALA μπορεί να είναι ανάλογη της μέτριας πρόσληψης EPA και DHA σε ότι αφορά την ευεργετική επίδραση στην αθηρογενετική διαδικασία. Σε αντίθεση με τη μέτρια πρόσληψη EPA και DHA, μια πρόσληψη ALA ανάλογη με την πρόσληψη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν επηρεάζει την *in vitro* επιδεκτικότητα της LDL στην οξείδωση [219,220]. Αυτό αποτελεί ένα πιθανό πλεονέκτημα της χρήσης διαιτητικού ALA σε σύγκριση με τα EPA και DHA. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα του ALA της διατροφής να ασκεί τις αντι-αθηρογενετικές του δράσεις εξαρτάται από τη μετατροπή του σε EPA και DHA [209,210]. Σχεδιάσαμε αυτή τη μελέτη με στόχο να βελτιστοποιήσουμε τις συνθήκες για τη μετατροπή αυτή.

Το ALA μετατρέπεται σε EPA και DHA μέσω μια σειράς αντιδράσεων προσθήκης διπλών δεσμών και επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας. Το λινελαϊκό οξύ (LA) χρησιμοποιεί το ίδιο μεταβολικό «μονοπάτι» για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων με μεγαλύτερη αλυσίδα και περισσότερους διπλούς δεσμούς. Κατά συνέπεια τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα ανταγωνίζονται για τα ίδια ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τις αντιδράσεις που περιορίζουν το ρυθμό στο μεταβολικό «μονοπάτι». Παρόλο που το ALA είναι το προτιμητέο υπόστρωμα για την Δ6-δεσατουράση (ένζυμο υπεύθυνο για την αρχική αντίδραση προσθήκης διπλού δεσμού που περιορίζει το ρυθμό) το πλεόνασμα του LA στις τυπικές δίαιτες των ανθρώπων οδηγεί σε μεγαλύτερη συνολικά μετατροπή του LA σε σύγκριση με το ALA, πιθανότατα λόγω του υψηλού λόγου LA προς ALA που υπάρχει στα κύτταρα. Τα λιπαρά οξέα της διατροφής ενσωματώνονται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών των κυττάρων με τέτοιο τρόπο ώστε η σύνθεση των μεμβρανών σε λιπίδια να αντανakλά τη διατροφική τους πρόσληψη. Τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών αποτελούν υπόστρωμα για αντιδράσεις περαιτέρω προσθήκης διπλών δεσμών και επιμήκυνσης. Ο λόγος ω-3 προς ω-6 της δίαιτας, και πιο συγκεκριμένα ο λόγος ALA/LA, έχει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της αποτελεσματικότητας της μετατροπής του ALA σε PUFAs μεγαλύτερης αλυσίδας.

Ο πληθυσμός που επιλέγηκε για τη μελέτη αποτελούνταν από άτομα με δυσλιπιδαιμία, τα οποία είναι τεκμηριωμένο ότι βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης [18]. Η επιλογή αυτή έγινε ώστε να εξασφαλιστεί ότι η προηγούμενη αποτυχία να παρατηρήσουμε σημαντική μείωση των επιπέδων των λιπιδίων στο πλάσμα μετά τη χορήγηση ALA δεν αντικατοπτρίζει την φυσική αντίσταση των φυσιολογικών συγκεντρώσεων των λιπιδίων στο πλάσμα μέσω ομοιοστατικών μηχανισμών του μεταβολισμού έναντι μιας επιπλέον μείωσης. Στη βάση της στατιστικής ισχύς υπολογίσαμε ότι ένας αριθμός 25 ατόμων σε κάθε ομάδα θα μας επιτρέψει να ανιχνεύσουμε διαφορές του 5% στα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στον ορό με μια πιθανότητα προσδιορισμού 95%. 76 από το σύνολο των 100 ατόμων που αρχικά εγγράφηκαν, ολοκλήρωσαν τη μελέτη.

Με τη χρήση διατροφικής αξιολόγησης πριν την παρέμβαση, καταναίμαμε τον πληθυσμό της μελέτης σε δύο ομάδες ανάλογα με τη διαίτα που ακολουθούσε. Η πρώτη ομάδα ακολουθούσε μια διαίτα με χαρακτηριστικά της ελληνικής εκδοχής της Μεσογειακής διαίτας, όπως αυτή περιγράφηκε για τους Κρητικούς που συμμετείχαν στη Μελέτη των Επτά Χωρών τη δεκαετία του 1960 [150]. Η διαίτα της άλλης ομάδας ήταν ένας δυτικοποιημένος τύπος της ελληνικής διαίτας. Η υιοθέτηση ενός διαιτολογίου Μεσογειακού τύπου έχει βρεθεί να μειώνει την εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων [155], ενώ η συνήθης διαίτα στις χώρες της Μεσογείου έχει συσχετισθεί με μειωμένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο [28]. Από την άλλη μεριά, η διαίτα των δυτικών κοινωνιών σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για CHD [27]. Η σύγκριση των δύο ομάδων με τις διαφορετικές δίαιτες χρησιμεύει ως ιδανικό μοντέλο για την εξέταση της πιθανής επίδρασης ενός διαιτολογίου Μεσογειακού τύπου στη δράση του ALA της διατροφής σε παράγοντες κινδύνου για την αθηροσκλήρωση.

Συμπληρώσαμε τις δίαιτες των εθελοντών με δύο διαφορετικά έλαια φυτικών σπόρων: λινέλαιο, πλούσιο σε ALA και καρδαμέλαιο πλούσιο σε LA. Το καρδαμέλαιο χρησιμοποιήθηκε ως το έλαιο της ομάδας ελέγχου για τρεις λόγους: α) η ενέργεια που προερχόταν από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα θα πρέπει να είναι ίδια στις δύο ομάδες, καθώς η συνολική πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών στον ορό [221] και τις δράσεις των λιπαρών οξέων σε δείκτες της φλεγμονής [222], β) Το LA έχει είτε ουδέτερη ή προφλεγμονώδη δράση στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα [223] σε αντίθεση με το ελαϊκό οξύ, το άλλο κοινώς χρησιμοποιούμενο λιπαρό οξύ στην ομάδα ελέγχου, το οποίο έχει πιθανά αντιφλεγμονώδεις δράσεις [224]. Λόγω των

αντίθετων δράσεων των ALA και LA στις απαντήσεις των κυττάρων της φλεγμονής, το LA είναι ικανό να χρησιμεύσει ως λιπαρό οξύ ελέγχου για την εξέταση της επίδρασης του ALA σε δείκτες της φλεγμονής, γ) Στόχος μας ήταν να εξετάσουμε τις επιδράσεις διαφορετικών λόγων ω-6/ω-3 στους παράγοντες κινδύνου που ελέγχθηκαν. Η χορήγηση LA στην ομάδα ελέγχου οδήγησε σε λόγο LA:ALA 13.2:1.

Υπάρχει ένας περιορισμός που αφορά το σχεδιασμό της μελέτης. Η μελέτη είναι μια απλή-τυφλή μελέτη παράλληλου σχεδιασμού με χρήση εικονικού φαρμάκου αντί για μια μελέτη διασταυρούμενων ομάδων δύο φάσεων η οποία είναι ισχυρότερη στην αποκάλυψη στατιστικών διαφορών. Η απόφασή μας βασίστηκε στην έλλειψη στοιχείων για την περίοδο «αποτοξίνωσης» που απαιτείται μετά τη χορήγηση ALA. Οι συγκεντρώσεις του EPA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος, των αιμοπεταλίων και των μονοπύρηνων κυττάρων βρέθηκαν αυξημένες μετά από τη χορήγηση 9 γραμμαρίων ALA/ημέρα για 4 εβδομάδες [209]. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα δεδομένα για τη διάρκεια της περιόδου κατά την οποία οι συγκεντρώσεις EPA ή DHA μπορούν να παραμείνουν αυξημένες μετά το τέλος της χορήγησης ALA. Ο σχεδιασμός διασταυρούμενων ομάδων δεν επιλέχθηκε ώστε να αποφευχθεί το φαινόμενο της παραμονής επιδράσεων από προηγούμενο χρονικό διάστημα. Υπολογίζοντας μια ενδιάμεση περίοδο «αποτοξίνωσης» τουλάχιστον 2 μηνών, η διάρκεια της μελέτης θα έπρεπε να επιμηκυνθεί από τους 3 στους 8 μήνες. Ένας τέτοιος σχεδιασμός θα δημιουργούσε προβλήματα συμμόρφωσης των εθελοντών, συνυπολογίζοντας ότι η συμμόρφωση στον ελληνικό πληθυσμό είναι σχετικά χαμηλή.

Ένας άλλος περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι ότι δεν αναλύθηκε η σύνθεση των φωσφολιπιδίων του πλάσματος και των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα. Για το λόγο αυτό, δεν μπορέσαμε να εξετάσουμε τον βαθμό ενσωμάτωσης του ALA στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών μετά τη χορήγηση ALA. Παρόλα αυτά η συμμόρφωση των εθελοντών αξιολογήθηκε μέσω της επιστροφής των άδειων μπουκαλιών των ελαίων. Πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεν μπορέσαμε να συγκρίνουμε τις συγκεντρώσεις αραχιδονικού οξέος και EPA στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών μεταξύ των ομάδων που έλαβαν τα διαφορετικά έλαια. Ήταν κατά συνέπεια αδύνατο να αποδώσουμε άμεσα τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ομάδων που έλαβαν τα διαφορετικά συμπληρώματα στις διαφορές της σύνθεσης των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα και την επακόλουθη παραγωγή εικοσανοειδών. Επιπλέον, δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί ανάλυση της συσχέτισης ανάμεσα στη σύνθεση των

φωσφολιπιδίων του πλάσματος και των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα και τα επίπεδα λιπιδίων ή δεικτών φλεγμονής στο πλάσμα. Η ομάδα που ακολουθούσε τη Μεσογειακού/Κρητικού τύπου διαίτα χαρακτηρίστηκε από αυξημένη πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως ελαϊκού οξέος) μέσω της κατανάλωσης ελαιόλαδου. Από την άλλη μεριά, η ομάδα που ακολουθούσε τη δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα εμφάνισε αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων. Οι διαφορές στην πρόσληψη λιπαρών οξέων ανάμεσα στις δύο ομάδες δυνητικά αντανakλώνται στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων του πλάσματος και των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα. Έτσι, η συσχέτιση των επιπέδων λιπιδίων και δεικτών φλεγμονής στο πλάσμα με τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα θα μπορούσε να παρέχει μια ένδειξη της σχέσης της διαίτας με τους παραπάνω δείκτες και να εξηγεί περαιτέρω την επίδραση της διαίτας στην αντιφλεγμονώδη δράση του ALA.

Τα επίπεδα των μακράς αλυσού ω-3 λιπαρών οξέων στα αιμοπετάλια και το πλάσμα φαίνεται ότι επηρεάζονται τόσο από το επίπεδο του ALA στη διαίτα όσο και από το λόγο του ως προς το LA [225]. Μια ημερήσια δόση 9.5 γραμμαρίων ALA για 6 μήνες, με λόγο LA:ALA 1.4:1 έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την αναλογία του EPA, όχι όμως και του DHA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος [220]. Μια αύξηση κατά 2,5 φορές περίπου της συγκέντρωσης του EPA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος και των ουδετερόφιλων παρατηρήθηκε επίσης μετά από χορήγηση 13.7 γραμμαρίων ALA την ημέρα για 4 εβδομάδες και λόγο LA:ALA 0.6:1 [197]. Παρομοίως, η κατανάλωση διαίτας με λόγο ALA:LA 1:1.2 και ημερήσια πρόσληψη ALA 12 γραμμαρίων τριπλασίασε το περιεχόμενο των φωσφολιπιδίων των αιμοπεταλίων σε EPA [226]. Από την άλλη μεριά, η συμπλήρωση της διαίτας με μέτρια δόση ALA (2 γραμμάρια/ημέρα) σε συνδυασμό με λόγο LA:ALA 3.5:1 απέτυχε να αυξήσει τις συγκεντρώσεις των ALA, EPA και DHA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος και των μονοπύρηνων κυττάρων [180]. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι μόνο μια αυξημένη πρόσληψη ALA της τάξης των 9 γραμμαρίων ανά ημέρα, σε συνδυασμό με χαμηλό λόγο LA:ALA είναι ικανή να αυξήσει την περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων του πλάσματος και των μεμβρανών μιας σειράς κυττάρων σε EPA. Συνυπολογίζοντας προηγούμενες μελέτες για το ALA της διατροφής και την δυνατότητα κλινικής εφαρμογής των αποτελεσμάτων μας καταλήξαμε σε μια ημερήσια δόση 8.1 γραμμαρίων ALA με λόγο LA:ALA 1.3:1. Ένας περιορισμός των προηγούμενων μελετών ήταν η μικρή διάρκεια της περιόδου χορήγησης, κατά την

οποία είναι δυνατό το ALA να μην κατάφερε να αυξήσει τις συγκεντρώσεις EPA και/ή DHA στους ιστούς. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε μια περίοδος χορήγησης 12 εβδομάδων.

Οι εθελοντές της μίας από τις ομάδες της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν ώστε να ακολουθούν ένα διαιτολόγιο Μεσογειακού/Κρητικού τύπου. Η διατροφική αξιολόγηση αποδείχθηκε ικανοποιητική στην αναγνώριση αυτών των ατόμων όπως προκύπτει από τις εκτιμήσεις της διατροφικής πρόσληψης θρεπτικών συστατικών που βασίστηκε στα στοιχεία των ημερολογίων καταγραφής τροφίμων καθώς και μέσω της σύγκρισης με τη δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση για τη συμμόρφωση με τα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διαίτας έγινε σε μια ομάδα του ελληνικού πληθυσμού. Σε ότι αφορά τον πληθυσμό, έχει αναφερθεί ότι μέρος του σύγχρονου ελληνικού πληθυσμού έχει διατροφικές συνήθειες οι οποίες προσομοιάζουν στενά την Μεσογειακή διαίτα [227], όπως αυτή περιγράφηκε για τους Έλληνες στην Μελέτη των Επτά Χωρών [27]. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ακρίβεια της αξιολόγησης της Μεσογειακής διαίτας σε ότι αφορά τις επιλογές τροφίμων και τη σύσταση των τροφίμων σε θρεπτικά συστατικά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το ALA της διατροφής δεν είχε ευεργετική δράση στα επίπεδα λιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών ή την πυκνότητα της LDL ενώ βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στον ορό. Από την άλλη μεριά, η χορήγηση LA μείωσε τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύθηκαν περαιτέρω μετά τον έλεγχο για τον πολυμορφισμό του γονιδίου της apo E. Σε συνδυασμό με άλλες πρόσφατες μελέτες, η μελέτη μας συμβάλλει στην ανάπτυξη μιας νέας γενικά αποδεκτής άποψης ότι το ALA δεν επηρεάζει τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος και ότι οι επίδραση του στην αθηροσκλήρωση είναι ανεξάρτητη του μεταβολισμού των λιπιδίων. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι το ALA βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα δεικτών φλεγμονής στον ορό, (ενώ το LA δεν είχε καμία επίδραση) χωρίς να επηρεάζει τον αριθμό των λευκοκυττάρων στην κυκλοφορία. Η δράση αυτή σχετίζεται με τη διαίτα που ακολουθούσαν οι εθελοντές της μελέτης. Τα άτομα που ακολουθούσαν ένα διαιτολόγιο Μεσογειακού/Κρητικού τύπου δεν παρουσίασαν διαφορά στα επίπεδα των δεικτών της φλεγμονής μετά τη χορήγηση ALA. Αντίθετα, τα επίπεδα των δεικτών της φλεγμονής μειώθηκαν σημαντικά στα άτομα που ακολουθούσαν μια δυτικοποιημένη ελληνική διαίτα. Διάφορα στοιχεία της Μεσογειακής διαίτας,

συγκεκριμένα η αυξημένη πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων [228], αντιοξειδωτικών βιταμινών [229], διαιτητικών ινών [218] και η μειωμένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων [230], έχουν συσχετισθεί αρνητικά με παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση. Παρόλα αυτά, η εξέταση των επιδράσεων διαφορετικών θρεπτικών συστατικών σε παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης ήταν πέρα από τους σκοπούς της παρούσας μελέτης. Μια ακόμη παρατήρηση που έγινε στη μελέτη μας ήταν η συσχέτιση του γονότυπου της apo E με την ανταπόκριση των δεικτών της φλεγμονής στη χορήγηση του ALA. Το ALA μείωσε τα επίπεδα των φλεγμονωδών δεικτών στα άτομα που έφεραν τους γονότυπους ε3/ε3 και ε3/ε4, όχι όμως και στα άτομα που έφεραν το ε2 αλληλόμορφο.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με την αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο ALA και τον κίνδυνο CHD που έχει φανεί σε προηγούμενες μελέτες [181-184]. Πιο συγκεκριμένα, υποστηρίζουμε την ιδέα ότι οι αντι-αθηρογόνες ιδιότητες του ALA οφείλονται στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του. Επιπρόσθετα, η δίαιτα και ο γονότυπος της apo E βρέθηκαν να επηρεάζουν τη δράση του ALA στη φλεγμονή. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν τις σύνθετες σχέσεις θρεπτικών συστατικών και γονιδίων στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η μελλοντική έρευνα στο πεδίο αυτό θα πρέπει να επικεντρωθεί σε δύο ερωτήσεις: Πρώτον, ποιοι είναι οι ενδοκυτταριοί μηχανισμοί μέσω των οποίων μειώνονται τα επίπεδα των δεικτών της φλεγμονής μετά τη χορήγηση ALA; Πρόσφατες ανακαλύψεις στο πεδίο της μοριακής βιολογίας που εξετάζει το γενετικό υπόβαθρο της αθηροσκλήρωσης έριξαν φως στη σημασία της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων θεωρώντας την ως πιθανό μηχανισμό υπεύθυνο των αντιφλεγμονωδών επιδράσεων των PUFAs. Μια σειρά διαφορετικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων εξετάστηκαν και βρέθηκαν να τροποποιούν την ενεργοποίηση του παράγοντα του πυρήνα κB ή να λειτουργούν ως συνδετά μόρια για τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων. Οι προαναφερθέντες μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν ως ρυθμιστές της φλεγμονώδους απάντησης. Μελλοντικές μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια και προσέγγιση της λειτουργίας του γενετικού υλικού απαιτούνται ώστε να διευκρινισθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου το ALA μπορεί να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων ώστε να ασκήσει τις αντι-αθηρογόνες και αντιφλεγμονώδεις του δράσεις.

Μια δεύτερη ερώτηση αφορά το κατά πόσο μια δίαιτα πλούσια σε ALA είναι ικανή να δράσει ευεργετικά σε ότι αφορά την υγεία του γενικότερου πληθυσμού. Μελλοντικές μελέτες που αφορούν στρατηγικές σχεδιασμένες να αυξήσουν την πρόσληψη ALA με τρόπο ρεαλιστικό για μακροχρόνια χρήση στο γενικό πληθυσμό θα πρέπει να υλοποιηθούν. Η εφαρμογή τέτοιων στρατηγικών αφορά την χρήση ποικιλίας τροφίμων που είτε είναι φυσικά πλούσια είτε είναι εμπλουτισμένα σε ALA. Τα επιλεγμένα τρόφιμα θα πρέπει να είναι κύρια συστατικά μιας τυπικά ελληνικής διαίτας, για παράδειγμα τρόφιμα που καταναλώνονται συχνά και όχι κατά διαστήματα. Τρόφιμα που χρησιμοποιούνται αρκετά στην παραδοσιακή ελληνική δίαιτα, για παράδειγμα τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και τα άγρια χόρτα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό.

ΣΤ. Περίληψη

Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να εξετάσουμε την επίδραση του α-λινολενικού οξέος (ALA) της διατροφής σε παράγοντες που σχετίζονται με τη διαδικασία σχηματισμού της αθηροματικής πλάκας. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε την επίδραση του ALA στα επίπεδα λιπιδίων, φλεγμονωδών δεικτών και διαλυτών μορφών των μορίων προσκόλλησης των κυττάρων στο πλάσμα δυσλιπιδαιμικών ατόμων, μιας ομάδας που τεκμηριωμένα βρίσκεται σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης. Οι επιδράσεις του ALA εξετάστηκαν επίσης σε συνάρτηση με το είδος του διαιτολογίου και το γονότυπο της απολιποπρωτεΐνης E.

Οι εθελοντές έλαβαν 8.1 γραμμάρια ALA ημερησίως για 12 εβδομάδες, μέσω 15ml λινελαίου. Η ομάδα ελέγχου έλαβε 11.2 γραμμάρια λινελαϊκού οξέος (LA) μέσω 15ml καρδαμελαίου. Ο λόγος LA:ALA στην ομάδα αναφοράς ήταν 1.3:1 ενώ στην ομάδα ελέγχου ήταν 13.2:1.

Οι συμμετέχοντες στη μελέτη κατανεμηθήκαν επίσης σε ομάδες ανάλογα:

A. με τις διατροφικές τους συνήθειες: α) ομάδα ατόμων που ακολουθούν μια Μεσογειακού/Κρητικού τύπου δίαιτα και β) ομάδα ατόμων που ακολουθούν ένα δυτικοποιημένο ελληνικό διαιτολόγιο.

B. με το γονότυπο της απολιποπρωτεΐνης E: α) ομάδα ε2/ε3, β) ομάδα ε3/ε3, γ) ομάδα ε3/ε4.

Η χορήγηση ALA δεν επηρέασε τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος, μείωσε όμως σημαντικά τα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), αμυλοειδούς α του ορού (SAA), παράγοντα ενεργοποίησης σειράς μακροφάγων (M-CSF) και ιντερλευκίνης-6 (IL-6). Σε ότι αφορά τις διαλυτές μορφές των μορίων προσκόλλησης των κυττάρων, μειώθηκαν τα επίπεδα του διαλυτού μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1, η μείωση αυτή όμως δεν διέφερε ανάμεσα στην ομάδα αναφοράς και την ομάδα ελέγχου. Η μείωση των δεικτών της φλεγμονής ήταν μεγαλύτερης έκτασης και αφορούσε περισσότερους δείκτες στην ομάδα των ατόμων που ακολουθούσαν ένα δυτικοποιημένο ελληνικό διαιτολόγιο. Από την άλλη μεριά, η χορήγηση ALA μείωσε τα επίπεδα των φλεγμονωδών δεικτών στα άτομα με γονότυπο ε3/ε3 και ε3/ε4, όχι όμως και στους φορείς του ε2 αλληλομόρφου.

Συμπερασματικά, η μείωση του λόγου LA:ALA μέσω της χορήγησης ALA φαίνεται να ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση σε ότι αφορά τα επίπεδα μεσολαβητών της φλεγμονής στο πλάσμα δυσλιπιδαιμικών ατόμων. Η δράση αυτή είναι δυνατό να σχετίζεται με το είδος της δίαιτας καθώς και τη γενετική προδιάθεση των ατόμων.

Z. Αναφορές

1. Virchow R. Cellular Pathology, John Churchill, London, 1858.
2. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Lewis B. Influx in vivo of low density, intermediate density and very low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentration, extent of aortic lesion and lipoprotein particle size as determinants. *Arterioscler Thromb* 1992;12:6-18.
3. Nielsen LB, Stender S, Kjeldsen K, Nordestgaard BG. Effect of angiotensin II and enalapril on transfer of low-density lipoprotein into aortic intima in rabbits. *Circ Res* 1994;75:63-9.
4. Schwenke DC, St Clair RW. Influx, efflux, and accumulation of LDL in normal arterial areas and atherosclerotic lesions of white Carneau pigeons with naturally occurring and cholesterol-aggravated aortic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1368-81.
5. Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1-5.
6. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88:1785-92.
7. Berliner JA, Schwartz DS, Territo MC, Andalibi A, Almada L, Lusis AJ, Quismorio D, Fang ZP, Fogelman AM. Induction of chemotactic cytokines by minimally oxidized LDL. *Adv Exp Med Biol* 1993;351:13-8.
8. Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, Vajkoczy P, von Andrian UH, Hubner C, Berndt MC, Steinberg D, Messmer K, Arfors KE. P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab Invest* 1994;71:380-6.
9. Hamilton JA, Byrne R, Jessup W, Kanagasundaram V, Whitty G. Comparison of macrophage responses to oxidized low-density lipoprotein and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF or CSF-1). *Biochem J* 2001;354:179-87.
10. Lawrence MB and Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859-73.
11. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-9.
12. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:9-12.
13. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 2002;15:439-46.
14. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. National Cholesterol Education Program: third report of the Expert Panel on Detection, Evaluation. and Treatment of High Blood Cholesterol (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002;106:3143-421.
15. Strong JP. Atherosclerosis in primates: introduction and overview. *Primates Med* 1976;9:1-15.

16. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy. *Med Clin North Am* 1982;66:335-62.
17. Scriver CR. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:69-101.
18. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835-8.
19. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
20. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD, for the MRFIT Research Group. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986;256:2823-8.
21. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I: Reduction in the incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984;251:351-64.
22. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II: The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984;251:365-74.
23. Rossouw JE, Lewis B, Rifkind BM. The value of lowering cholesterol after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1990;323:1112-9.
24. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1990;322:1700-7.
25. Wong ND, Wilson PWF, Kannel WB. Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1991;115:687-93.
26. McGill HC Jr. Introduction to the geographic pathology of atherosclerosis. *Lab Invest* 1968;18:465-7.
27. Keys A, Arvanis C, Blackburn H. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1980;381.
28. Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordjevic BS, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Mohacek I, Nedeljkovic S, Puddu V, Punsar S, Taylor HL, Conti S, Kromhout D, Toshima H. The Seven Countries Study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med* 1984;13:141-54.
29. Kagan A, Harris BR, Winkelstein W Jr, Johnson KG, Kato H, Syme SL, Rhoads GG, Gay ML, Nichaman MZ, Hamilton HB, Tillotson J. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii, and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J Chron Dis* 1974;27:345-64.
30. Toor M, Katchalsky A, Agmon J, Allalouf D. Atherosclerosis and related factors in immigrants to Israel. *Circulation* 1960;22:265-79.
31. Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med* 2002;113:13-24.

32. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary artery disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
33. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, for the West of Scotland Coronary Intervention Study Group. Prevention of coronary artery disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
34. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996;335:1001-9.
35. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998;81:7-12.
36. Assmann G, Schulte H, Funke H, von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998;19:8-14.
37. Durrington PN. Triglycerides are more important in atherosclerosis than Epidemiology has suggested. *Atherosclerosis* 1998;141:57-62.
38. Blackenhorn DH, Nessim SA, Johnson RL, Sanmarco ME, Azen SP, Cashin-Hemphill L. Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA* 1987;257:3233-40.
39. Mack WJ, Krauss RM, Hodis HN. Lipoprotein subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS): treatment effects and relation to coronary angiographic progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:697-704.
40. Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999;40:1933-49.
41. Ericsson CG, Hamsten A, Nilsson J, Grip L, Svane B, Faire U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male post-infarction patients. *Lancet* 1996;347:849-53.
42. Frick MH, Syvanne M, Nieminen MS, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesaniemi A, Pasternack A, Taskinen MR, for the Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. *Circulation*. 1997;96:2137-43.
43. Gianturco SH, Ramprasad MR, Lin AH-Y, Song R, Bradley WA. Cellular binding site and membrane binding proteins for triglyceride-rich lipoproteins in human monocytes-macrophages and THP-1 monocytic cells. *J Lipid Res* 1994;35:1674-87.
44. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PWF, Schaefer EJ. Change in particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1284-90.
45. Schaefer EJ, Levy RI, Anderson DW, Dannu RN, Brewer HB. Plasma triglycerides in regulation of HDL-cholesterol. *Lancet* 1978;2:391-3.
46. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoproteins – the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321:1311-6.

47. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975;1:16-9.
48. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Med* 1977;62:707-14.
49. Breslow JL. Familial disorders of high density lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. 1989:2031-52.
50. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9607-11.
51. Barter PJ, Rye K. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:82-7.
52. Navab M, Berliver JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:481-8.
53. Sanguinetti SM, Brites FD, Fasulo V, Verona J, Elbert A, Wikinski RL, Schreier LE. HDL oxidability and its protective effect against LDL oxidation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Nutr Metab* 2001;14:27-36.
54. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000;41:1481-94.
55. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000;41:1495-1508.
56. Cockerill G, Rye K, Gamble J, Vadas MA, Barter PJ. High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1987-94.
57. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, Oral B, Nithyanathan S, Taylor G, Haskard DO. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:910-7.
58. Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S, Chyu KY, Xu XO, Yano J, Shah PK, Nilsson J, Cercek B. Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periaortic cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:465-8.
59. Krauss RM, and Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982;23:97-104.
60. Campos H, Genest JJ Jr, Blijlevens E, Mc Namara JR, Jenner JL, Ordovas JM et al. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1992;12:187-95.
61. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988;260:1917-21.

62. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 1996;276:875-81.
63. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, Hennekens CH. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1996;276:882-8.
64. Lamerche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. *Circulation* 1997;95:69-75.
65. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3542-56.
66. Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu'yen TD, et al. Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *J Biol Chem* 1994;269:511-9.
67. Campos H, Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM. Differences in receptor binding of LDL subfractions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:794-801.
68. De Graaf J, Hak-Lemmers HLM, Hectors MPC, Demacker PNM, Hendriks JCM, Stalenhoef AFH. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991;11:298-306.
69. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, et al. Susceptibility of small, dense low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med* 1993;94:350-6.
70. Nielsen LB. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996;123:1-15.
71. Ander V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996;124:261-71.
72. Fager G, Wiklund O, Olofsson SO, Wilhelmsen L, Bondjers G. Multivariate analyses of serum apolipoproteins and risk factors in relation to acute myocardial infarction. *Arteriosclerosis* 1981;1:273-9.
73. Buring JE, O'Connor GT, Goldhaber SZ, Rosner B, Herbert PN, Blum CB, Breslow JL, Hennekens CH. Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. *Circulation* 1992;85:22-9.
74. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1987;113:589-97.
75. Mero N, Vantol A, Scheek LM, Vangent T, Labeur C, Rosseneu M, et al. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *J Lipid Res* 1998;39:1493-502.
76. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein. *Nature* 1991;353:265-7.
77. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, Houdebine LM, Deneffe P. Inhibition of

- atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996;94:713-7.
78. Castro G, Nihoul LP, Dengremont C, de Geitere C, Delfly B, Tailleux A, Fievet C, Duverger N, Deneffe P, Fruchart JC, Rubin EM. Cholesterol efflux, lecithin-cholesterol acyltransferase activity, and pre- β particle formation by serum from human apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-I/apolipoprotein A-II transgenic mice consistent with the latter being less effective for reverse cholesterol transport. *Biochemistry* 1997;36:2243-9.
 79. Brown MS, Goldstein JL. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
 80. Sniderman AD, Wolfson C, Teng B, Franklin FA, Bachorik PS, Kwiterovich PO, Jr. Association of hyperapobetalipoproteinemia with endogenous Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1982;97:833-9.
 81. Avogaro P, Bittolo BG, Gazzolato G, Quinci GB. Are apolipoproteins better discriminators than lipid for atherosclerosis? *Lancet* 1979;1:910-3.
 82. Breunzell HD, Sniderman AD, Albers JJ, Kwiterovich PO Jr. Apoprotein B and AI and coronary heart disease in humans. *Arteriosclerosis* 1984;4:79-83.
 83. Bhatnagar D, Durrington PN. Clinical value of apolipoprotein measurements. *Ann Clin Biochem* 1991;28:427-37.
 84. Genest JJ, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Wilson PFW, Schaefer EJ. Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1991;90:149-57.
 85. Genest JJ, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner JL, Silberman SR, Anderson KM, Wilson RWF, Salem DN, Schaefer EJ. Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormality in men with premature coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:792-802.
 86. Sedlis SP, Shechtman KB, Ludbrook PA, Sobel BE, Schonfeld G. Plasma apoproteins and the severity of coronary artery disease. *Circulation* 1986;73:978-86.
 87. Kwiterovich PO Jr, Coresh J, Derby C, Smith HH, Bachorik PS, Pearson TA. Comparison of the plasma levels of apolipoproteins B and A-I, and other risk factors in men and women with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1992;9:1015-21.
 88. Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, Cantin B, Bernard PM, Dagenais GR, Despres JP. Apoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a 5-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1996;94:273-8.
 89. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001;358:2026-33.
 90. Elovson J, Chatterton JE, Bell GT, Schumaker VN, Reuben MA, Puppione DL, Reeve JR Jr, Young NL. Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1988;29:1461-73.
 91. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-30.
 92. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258:468-71.

93. Linton MF, Hasty AH, Babaev VR, Fazio S. Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *J Clin Invest* 1998;101:1726-36.
94. Zhu YH, Bellosta S, Langer C, Bernini F, Pitas RE, Mahley RW, et al. Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E-deficient mouse plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7585-90.
95. Pepe MG, Curtiss LK. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol* 1986;136:3716-23.
96. Nikoulin IR, Curtiss LK. An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo. *J Clin Invest* 1998;101:223-34.
97. Bach-Ngohou K, Nazih H, Nzih-Sanderson F, Zair Y, Le Carrer D, Krempf M, Bard JM. Negative and independent influence of apolipoprotein E on C-reactive protein (CRP) concentration in obese adults. Potential anti-inflammatory role of apo E in vivo. *Int J Obes* 2001;25:1752-8.
98. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
99. Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995;41:1068-86.
100. Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987;80:1571-7.
101. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991;49:338-49.
102. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S et al. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105-13.
103. Kataoka S, Robbins DC, Cowan LD, et al. Apolipoprotein E polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:918-25.
104. Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ et al. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993;71:160-5.
105. Lehtinen S, Lehtimäki T, Sisto T, et al. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiography verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis* 1995;114:83-91.
106. Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J et al. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995;91:265-9.
107. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DEL. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene and severity of coronary artery disease defined by angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1030-4.
108. Stengard JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative

- frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum Genet* 1998;103:234-41.
109. Schiele F, DeBacquer D, Vincent-Viry M et al. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis* 2000;152:475-88.
 110. Manttari M, Manninen V, Palosuo T, Ehnholm C. Apolipoprotein E polymorphism and C-reactive protein in dyslipidemic middle-aged men. *Atherosclerosis* 2001;156:237-8.
 111. Huttunen JK, Manninen V, Manttari M, Koskinen P, Romo M, Tenkanen L, Heinonen OP, Frick MH. The Helsinki Heart Study: central findings and clinical implications. *Ann Med* 1991;23:155-9.
 112. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
 113. de Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 1982;47:239-43.
 114. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elavation of C-reactive protein in “active” coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65:168-72.
 115. Libby P, et al. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
 116. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;343:1139-47.
 117. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000;101:235-8.
 118. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3186-90.
 119. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
 120. Coetzee GA, Strachan AF, van der Westhuyzen DR, Hoppe HC, Jeenah MS, de Beer FC. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J Biol Chem* 1986;261:9644-51.
 121. Steinmetz A, Hocke G, Saile R, Puchois P, Fruchart JC. Influence of serum amyloid A on cholesterol esterification in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1989;1006:173-8.
 122. Peristeris P, Gaspar A, Gros P, Laurent P, Bernon H, Bienvenu J. Effects of serum amyloid A protein on lymphocytes, HeLa, and MRC5 cells in culture. *Biochem Cell Biol* 1989;67:365-70.
 123. Shainkin-Kestenbaum R, Zimlichman S, Lis M, Lidor C, Pomerantz M, Knyszynski A, et al. Effect of serum amyloid A, HDL-apolipoprotein on endothelial cell proliferation: implication of an enigmatic protein to atherosclerosis. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1997;2:79-84.
 124. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lioyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, et al. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration,

- adhesion and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1994;180:203-9.
125. Xu L, Badolato R, Murphy WJ, Longo DL, Anver M, Hale S, et al. A novel biologic function of serum amyloid A: induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J Immunol* 1995;155:1184-90.
 126. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulation factors. *Science* 1987;236:1229-37.
 127. Strieter RM, Kunkel SI, Showel HJ, Remic DG, Phan SH, Ward PA, Marks RM. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β . *Science* 1989;243:1467-9.
 128. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992;140:301-16.
 129. Ishibashi S, Inaba T, Shimano H, Harada K, Inoue I, Mokuno H et al. Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocytes-derived macrophages. *J Biol Chem* 1990;265:14109-17.
 130. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8264-8.
 131. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
 132. Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:433-42.
 133. Liao HS, Matsumoto A, Itakura H, Doi T, Honda M, Kodama T, Geng YJ. Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1872-80.
 134. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:1-20.
 135. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107:85-97.
 136. Mulvihill N, Fole B, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J* 2002;23:1569-74.
 137. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gottojr AM, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997;96:4219-25.
 138. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88-92.
 139. de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:423-6.

140. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-43.
141. Luc G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis* 2003;170:169-76.
142. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:1336-42.
143. Smieja M, Yusuf S, Gnarpe J, Gnarpe H, Yi Q, Olsson G, et al. Inflammatory markers and risk of subsequent cardiovascular events in the HOPE trial. *Circulation (Scientific Session Abstracts)* 2001
144. Haim M, Tanne D, Boyko V, Reshef T, Goldbourt U, Leor J, Mekori YA, Behar S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1133-8.
145. Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, et al. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1765-70.
146. De Caterina R, Basta G, Lazzerini G, Dell'Omo G, Petrucci R, Morale M, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2646-54.
147. Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nodt T, Weiss T, Boehme M, et al. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:505-12.
148. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996;93:672-82.
149. Trichopoulou A, Vasilopoulou E. Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr* 2000;84:205-9.
150. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970;41:1-211.
151. Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Karvonen M, Katan M, Missinen A, Nedeljkovic S, Pekkanen J, Pekkarinen M, Punsar S, Rasanen L, Simic B, Toshima H. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 1995;24:308-15.
152. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *Br Med J* 1995;311:1457-60.
153. Osler M, Schroll M. Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community. *Int J Epidemiol* 1997;26:155-9.
154. Kouris-Blazos A, Gnardellis Ch, Wahlqvist ML, Trichopoulos D, Gukito W, Trichopoulou A. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to

- other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr* 1999;82:57-61.
155. de Lorgeril M, Renaud S, Marmelle N et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994;343:1454-59.
 156. Singh RB, Dubnov G, Niaz MA, Ghosh S, Singh R, Rastogi SS, Manor O, Pella D, Berry EM. Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): a randomised single-blind trial. *Lancet* 2002;360:1455-61.
 157. Kromhout D, Keys A, Aravanis C, et al. Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *Am J Clin Nutr* 1989;49:889-94.
 158. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Vassilakou T, Gnardellis Ch, Polychronopoulos E, Venizelou M, Ligiou P, Wahlqvist M, Trichopoulos D. The diet and survival of elderly Greeks; a link to the past. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1346S-1350S.
 159. Dyerberg J, Bang HO, Hjerne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* 1975;28:958-66.
 160. Shekelle RB, Missell L, Paul O, et al. Fish consumption and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;313:820. Letter
 161. Kromhout D, Feskens EJ, Bowles CH. The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population. *Int J Epidemiol* 1995;24:340-5.
 162. Daviglus ML, Stamler J, Orenica AJ, et al. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997;336:1046-53.
 163. Zhang J, Sasaki S, Amano K, et al. Fish consumption and mortality from all causes, ischemic heart disease, and stroke: an ecological study *Prev Med* 1999;28:520-9.
 164. Mizushima S, Moriguchi EH, Ishikawa P, et al. Fish intake and cardiovascular risk among middle-aged Japanese in Japan and Brazil. *J Cardiovasc Risk* 1997;4:191-9.
 165. Hu FB, Bronner L, Willett WC, et al. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 2002;287:1815-21.
 166. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial Reinfarction: Diet and Reinfarction Trial. *Lancet* 1989;2:757-61.
 167. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999;354:447-55.
 168. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1645-54.
 169. Howe PR. Dietary fats and hypertension: focus on fish oil. *Ann N Y Acad Sci* 1997;827:339-52.
 170. Knapp HR. Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1687-98.
 171. Kang JX, Leaf A. Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids: recent studies. *Circulation* 1996;94:1774-80.
 172. Calder PC. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids. *Proc Nutr Soc* 1996;55:737-74.

173. Nestel PJ. Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 1990;10:149-67.
174. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann Nutr Metab* 1997;41:203-34.
175. Calder PC. Dietary fatty acids and lymphocyte function. *Proc Nutr Soc* 1998;57:487-502.
176. Grimble RF. Dietary lipids and the inflammatory response. *Proc Nutr Soc* 1998;57:535-42.
177. Endres S. n-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis. *Lipids* 1996;31:239-42.
178. Ernst E, Saradeth T, Achhammer G. n-3 fatty acids and acute-phase proteins. *Eur J Clin Invest* 1991;21:77-82.
179. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1829-36.
180. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, Calder PC. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 2001;36:1183-93.
181. Guallar E, Aro A, Jimenez FJ, et al. Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1111-8.
182. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:890-7.
183. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, et al. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996;313:84-90.
184. Djousse L, Pankow JS, Eckfeldt JH, et al. Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2001;74:612-9.
185. Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival-4. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:485-91.
186. Natvig H, Borchgrevink CF, Dedichen J, Owren PA, Schiotz EH, Westlund K. A controlled trial of the effect of linolenic acid on incidence of coronary heart disease. The Norwegian vegetable oil experiment of 1965-66. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;105:1-20.
187. Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ, et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:221-7.
188. McDonald BE, Gerrard JM, Bruce VM, Corner EJ. Comparison of the effect of canola oil and sunflower oil on plasma lipids and lipoproteins and on in vivo thromboxane A2 and prostacyclin production in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 1989;50:1382-8.

189. Chan JK, Bruce VM, McDonald BE. Dietary alpha-linolenic acid is as effective as oleic acid and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1230-4.
190. Wardlaw GM, Snook JT, Lin MC, Puangco MA, Kwon JS. Serum lipid and apolipoprotein concentrations in healthy men on diets enriched in either canola oil or safflower oil. *Am J Clin Nutr* 1991;54:104-10.
191. Sabate J, Fraser GE, Burke K, Knutsen SF, Bennett H, Lindsted KD. Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men. *N Engl J Med* 1993;328:603-7.
192. Nydahl M, Gustafsson IB, Ohrvall M, Vessby B. Similar serum lipoprotein cholesterol concentrations in healthy subjects on diets enriched with rapeseed and with sunflower oil. *Eur J Clin Nutr* 1994;48:128-37.
193. Pang D, Allman-Farinelli MA, Wong T, Barnes R, Kingham KM. Replacement of linoleic acid with alpha-linolenic acid does not alter blood lipids in normolipidaemic men. *Br J Nutr* 1998;80:163-7.
194. Sanders TAB, Roshanai F. The influence of different types of ω -3 PUFA on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin Sci* 1983;64:91-9.
195. Mest HJ, Beitz J, Heinroth I, Block HU, Forster W. The influence of linseed oil diet on fatty acid pattern in phospholipids and thromboxane formation in platelets in man. *Klin Wochenschr* 1983;61:187-91.
196. Kelley DS, Nelson GJ, Love JE, Branch LB, Taylor PC, Schmidt PC, Mackey BE, Iacono JM. Dietary alpha-linolenic acid alters tissue fatty acid composition, but not blood lipids, lipoproteins or coagulation status in humans. *Lipids* 1993;28:533-7.
197. Mantzioris E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary substitution with an alpha-linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1304-9.
198. Kestin M, Clifton P, Belling GB, Nestel PJ. n-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 1990;51:1028-34.
199. Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:485-91.
200. Singer P, Wirth M, Berger I. A possible contribution of decrease in free fatty acids to low serum triglyceride levels after diets supplemented with n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1990;83:167-75.
201. Singh RB, Rastogi SS, Verma R, Laxmi B, Singh R, Ghosh S, Niaz MA. Randomised controlled trial of cardioprotective diet in patients with recent acute myocardial infarction: results of one year follow up. *BMJ* 1992;304:1015-9.
202. Almario RU, Vonghavaravat V, Wong R, Kasim-Karakas SE. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 2001;74:72-9.
203. Santoli D, Phillips PD, Colt TL, Zurier RB. Suppression of interleukin-2-dependent human T cell growth in vitro by prostaglandin E (PGE) and their precursor fatty acids. *J Clin Investig.* 1990;85:424-32.

204. Rotondo D, Earl CRA, Laing KJ, Kaimakamis D. Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim Biophys Acta* 1994;1223:185-94.
205. Bates EJ, Ferrante A, Smithers L, Poulos A, Robinson BS. Effect of fatty acid structure on neutrophil adhesion, degranulation and damage to endothelial cells. *Atherosclerosis* 1995;116:247-59.
206. Calder PC, Newsholme EA. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clin Sci* 1992;82:695-700.
207. Jeffery NM, Sanderson P, Sherrington EJ, Newsholme EA, Calder PC. The ration of $\omega 6$ to $\omega 3$ polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids* 1996;31:737-45.
208. Kelley DS, Branch LB, Love JE, Taylor PC, Rivera YM, Iacono JM. Dietary alpha-linolenic acid and immunocompetence in humans. *Am J Clin Nutr* 1991;53:40-46.
209. Mantzioris E, Clenand LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;72:42-8.
210. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor α and interleukin 1β production of diets enriched in $\omega 3$ fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996;63:116-22.
211. Hirashiki A, Yamada Y, Murase Y, Suzuki Y, Kataoka H, Morimoto Y, Tajika T, Murohara T, Yokota M. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1429-37.
212. Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1098-111.
213. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002;155:487-95.
214. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC et al. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1990-7.
215. Wolfram G. Dietary fatty acids and coronary heart disease. *Eur J Med Res* 2003;8:321-4.
216. McNamara DJ. Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:310-20.
217. Clarke R, Armitage J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:411-5.
218. Anderson JW. Whole grains protect against atherosclerotic cardiovascular disease. *Proc Nutr Soc.* 2003;62:135-42.
219. Södergren E, Gustafsson IB, Basu S, Nourooz-Zadeh J, Nälsén C, Turpeinen A, Berglund L, Vessby B. A diet containing rapeseed oil-based fats does not increase lipid peroxidation in humans when compared to a diet rich in saturated fatty acids. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:922-31.
220. Finnegan YE, Minihane AM, Leigh-Firbank EC, Kew S, Meijer GW, Muggli R, Calder PC, Williams CM. Plant- and marine-derived n-3

- polyunsaturated fatty acids have differential effects on fasting and postprandial blood lipid concentrations and on the susceptibility of LDL to oxidative modification in moderately hyperlipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2003;77:783-95.
221. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992;12:911-9.
 222. Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669-73.
 223. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 2001;36:1007-24.
 224. Yaqoob P. Monounsaturated fatty acids and immune function. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:9-13.
 225. Chan JK, McDonald BE, Gerrard JM, Bruce VM, Weaver BJ, Holub BJ. Effect of dietary α -linolenic acid and its ratio to linoleic acid on platelet and plasma fatty acids and thrombogenesis. *Lipids* 1993;28:811-7.
 226. Allman-Farinelli MA, Hall D, Kingham K, Pang D, Petocz P, Favaloro EJ. Comparison of the effects of two low fat diets with different α -linolenic:linoleic acid ratios on coagulation and fibrinolysis. *Atherosclerosis* 1999;142:159-68.
 227. Costacou T, Bamia C, Ferrari P, Riboli E, Trichopoulos D, Trichopoulou A. Tracing the Mediterranean diet through principal components and cluster analyses in the Greek population. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:1378-85.
 228. Lada AT, Rudel LL. Dietary monounsaturated versus polyunsaturated fatty acids: which is really better for protection from coronary heart disease? *Curr Opin Lipidol* 2003;14:41-6.
 229. Gotto AM. Antioxidants, statins, and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1205-10.
 230. Kris-Etherton PM, Yu S. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1628S-1644S.