

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση της παρέμβασης με ελαιόλαδο και λινέλαιο σε υγιείς εθελοντές σε δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής»



Φαρδή Σταυρούλα

ΑΜ: 20741

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Φραγκοπούλου Ελισάβετ

Μέλη:

Σκοπούλη Φωτεινή

Κοντογιάννη Μερóπη



ΑΘΗΝΑ 2011

«Επίδραση της παρέμβασης με ελαιόλαδο και λινέλαιο σε υγιείς εθελοντές σε δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ, επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο στο πειραματικό όσο και στο θεωρητικό κομμάτι της πτυχιακής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σκοπούλη Φωτεινή και την κ. Κοντογιάννη Μερóπη για την επίβλεψη της ευρύτερης ερευνητικής εργασίας στην οποία συμμετείχα με την παρούσα μελέτη και τις πολύτιμες πληροφορίες τους σχετικά με το σχεδιασμό της.

Πίνακας Περιεχομένων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ. 5

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.. 8

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ. 9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ -ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.. 10

Εισαγωγή. 10

Οξειδωτικό στρες. 11

Γενικά χαρακτηριστικά. 11

Ελεύθερες ρίζες. 12

Γενικά χαρακτηριστικά. 12

Ενεργές μορφές οξυγόνου. 20

Ενεργές μορφές αζώτου. 26

Αντιοξειδωτική λειτουργία. 30

Γενικά χαρακτηριστικά. 30

Κατάταξη αντιοξειδωτικών. 34

Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών. 38

Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. 41

Φλεγμονή. 43

Γενικά χαρακτηριστικά. 43

Κατάταξη. 43

Ενδείξεις φλεγμονής. 44

Μεσολαβητές φλεγμονής. 45

Ενζυμικά συστήματα φλεγμονής. 50

Μετανάστευση λευκοκυττάρων στους ιστούς. 50

Τερματισμός φλεγμονής. 51

Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή στην καρδιαγγειακή νόσο. 51

Αθηροσκλήρυνση: Μια φλεγμονώδης διαδικασία με προεκτάσεις οξειδωτικού στρες. 51

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η LP-PLA₂ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ.. 57

Φωσφολιπάσες. 57

Φωσφολιπάσες A₂ 57

Lp-PLA₂ 59

Γενικά. 59

LpPLA₂ και αθηροσκλήρυνση. 61

Η LpPLA₂ ως βιοχημικός δείκτης και θεραπευτικός στόχος καρδιαγγειακών νοσημάτων.
63

Lp-PLA₂ και διατροφή. 66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΤΟ ΛΙΝΕΛΑΙΟ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ 67

Εισαγωγή. 67

Σύσταση. 70

Επίδραση των συστατικών του ελαιόλαδου στην υγεία και την καρδιαγγειακή νόσο. 72

Λινέλαιο. 75

Σύσταση. 76

Λινέλαιο και καρδιαγγειακή λειτουργία. 76

Επίδραση μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην Lp-PLA₂ 78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ. 79

Ελαιόλαδο. 70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.. 81

Επιλογή εθελοντών και σχεδιασμός της μελέτης. 81

Δείγμα. 81

Σχεδιασμός της μελέτης. 82

Αξιολογήσεις. 87

Βιοχημικές και ανοσολογικές αναλύσεις. 89

Βιοχημικοί δείκτες. 89

Μέτρηση Lp-PLA₂ 90

Μέτρηση συστατικών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 91

Στατιστική ανάλυση. 92

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.. 93

Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής των εθελοντών.
93

Βιοχημικοί δείκτες πριν από κάθε παρέμβαση. 94

Σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο παρεμβάσεων. 95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.. 100

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.. 106

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA: Αραχιδονικό οξύ
AHA: Αμερικάνικη Καρδιολογική Εταιρεία
ALA: α-λινολενικό οξύ
BMI: Δείκτης Μάζας Σώματος
CAT: καταλάση
CDC: Κέντρο Ελέγχου Ασθενειών
CDP: διφωσφορική κυτοσίνη
CMP: μονοφωσφορική κυτοσίνη
CoA-IT: τρανσακετυλάση ανεξάρτητη του συνενζύμου A
COX: κυκλοοξυγενάση
cPLA2: κυτοσολική φωσφολιπάση A2
CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CYP: κυτόχρωμα P-450
Cyt c: κυτόχρωμα c
DHA: δοκοσαεξανοϊκό οξύ
ED: εντεροδιόλη
EL: εντερολακτόνη
EPA: εικοσαπεντανοϊκό οξύ
FLC: Σύμπλεγμα λιγνανίων λιναρόσπορου
FVII: Παράγοντας VII
GPx: Υπεροξειδίο της γλουταθειόνης
GSH: Ανηγγμένη γλουταθειόνη
GST: S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
ICAM-1: Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1
IL-1: Ιντερλευκίνη-1
IL-6: Ιντερλευκίνη-6
IL-8: Ιντερλευκίνη-8
INF: Ιντερφερόνη
iPLA2: ανεξάρτητη του Ca^{2+} φωσφολιπάση A2
LA: Λινελαϊκό οξύ
LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LOX: Λιποξυγενάση

Lp(a): Λιποπρωτεΐνη (a)
LTB4: Λευκοτριένιο B4
LTD4: Λευκοτριένιο D4
Lyso-PC: Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη
MCP-1: Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1
M-CSF: Παράγοντας διέγερσης αποικιών μονοκυττάρων
MPO: Μυελοϋπεροξειδάση
MDA: Μηλονυλο-διαλδεϋδη
MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NADH: Νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NF-κB: Πυρηνικός παράγοντας-κB
NOS: Συνθάση του NO
NOX: Οξειδάση του NADPH
8-OHdG: 8-υδροξυγουανίνη
Ox-LDL: Οξειδωμένη LDL
PAF: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
PAF-AH: Ακετυλδωρολάση του PAF
PAF-CPT: PAF-χολινوترανσφεράση
PAI-1: Αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PECAM: Μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίων σε ενδοθηλιακό κύτταρο
PGE2: Προσταγλανδίνη E2
PLA2: Φωσφολιπάση A2
Prx: Υπεροξειδάση
PUFA: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RNS: Ενεργές μορφές οξυγόνου
ROCl: Ενεργές μορφές χλωρίου
ROS: Ενεργές μορφές οξυγόνου
SAA: Αμυλοειδές ορού A
SDG: secoisolariciresinol diglucoside
SECO: secoisolariciresinol
SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα
SOD: Δισμουτάση του υπεροξειδίου
sPLA2: εκκρινόμενη φωσφολιπάση A2
TAL: Τρανσακετυλάση των λυσοφωσφολιποειδών εξαρτημένη από τον PAF

TAS: Τρανσακετυλάση των σφογγοσινούχων λιποειδών εξαρτημένη από τον PAF

TBARS: Ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

TG: Τριακυλογλυκερόλη

TNF: Παράγοντας νέκρωσης των όγκων

Trx: Θειορεδοξίνη

TXB2: Θρομβοξάνη B2

UA: Ουρικό οξύ

VCAM-1: Αγγειακό μόριο προσκόλλησης

VLDL: Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας

vWF: Παράγοντας von Willebrand

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η καρδιαγγειακή νόσος εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου στις σύγχρονες κοινωνίες. Στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης εμπλέκονται οι μηχανισμοί του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής, οπότε κατάλληλη ρύθμιση τους θα έχει ως αποτέλεσμα μείωση του επιπολασμού της νόσου. Το είδος των λιπαρών οξέων της διατροφής πιστεύεται ότι μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής σε υγιείς εθελοντές, μειώνοντας – σε συνδυασμό με ένα υγιεινό τρόπο ζωής- τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η Lp-PLA₂ (Lipoprotein associated Phospholipase A₂) είναι μια εξειδικευμένη φωσφολιπάση που υδρολύει τον φλεγμονώδη μεσολαβητή Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL και τα οποία εμφανίζουν ισχυρές προ-φλεγμονώδεις δράσεις. Επιδημιολογικές έρευνες αποδεικνύουν το ρόλο της Lp-PLA₂ ως ανεξάρτητο δείκτη της καρδιαγγειακής νόσου, παρόλα αυτά περιορισμένες μελέτες υπάρχουν για την επίδραση των διατροφικών συνηθειών στη δράση του ενζύμου.

Σκοπός: Η μελέτη της επίδρασης της παρέμβασης με ελαιόλαδο (μονοακόρεστα λιπαρά οξέα) και λινέλαιο (α-λινολενικό οξύ) σε δείκτες οξειδωτικού στρες και στη δράση της Lp-PLA₂.

Μεθοδολογία: 37 υγιή άτομα φυσιολογικού BMI, ηλικίας 18-37 ετών, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα κατανάλωνε 15 ml λινελαίου ανά ημέρα για 6 εβδομάδες, ενώ η δεύτερη ομάδα λάμβανε 15 ml ελαιολάδου ανά ημέρα. Μετά από μία περίοδο «κάθαρσης» 6 εβδομάδων, τα έλαια παρέμβασης αντιστράφηκαν στις δύο ομάδες. Στην αρχή και στο τέλος κάθε παρέμβασης, μετρήθηκαν η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ και τα επίπεδα της MDA.

Αποτελέσματα: Η παρέμβαση με λινέλαιο οδήγησε σε σημαντική μείωση της MDA ($p=0,042$) ενώ αντίθετα η παρέμβαση με ελαιόλαδο δεν οδήγησε σε μεταβολή της MDA ($p=0,23$). Όσον αφορά την επίδραση στην Lp-PLA₂ καμία από τις δυο παρεμβάσεις δεν επηρέασε την δραστηριότητα του ενζύμου (λινέλαιο $p=0,33$ και ελαιόλαδο $p=0,44$).

Συμπέρασμα: Η παρέμβαση με λινέλαιο φαίνεται να βελτιώνει το δείκτη λιποειδικής υπεροξείδωσης MDA. Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ δεν επηρεάζεται από την παρέμβαση με λινέλαιο και ελαιόλαδο.

ABSTRACT

Background: Cardiovascular disease is still one of the major causes of death in the western societies. The mechanisms of oxidative stress and inflammation play a great role in the pathophysiology of atherosclerosis, so appropriate modulation of their function would result in reduction of disease incidence. The kind of dietary fatty acids is thought to affect the levels of oxidative stress and inflammation markers in healthy volunteers, by reducing-in combination with a healthy lifestyle-the risk of disease occurrence. Lp-PLA₂ is a specialized phospholipase that hydrolizes the inflammatory moderator Platelet Activating Factor (PAF) and the oxidative phospholipids produced during the oxidation of LDL that show potent pro-inflammatory activity. Epidemiological research establish the role of Lp-PLA₂ as an independent marker of cardiovascular disease, albeit there is a restricted number of studies investigating the role of dietary habits in enzyme's activity.

Aim: The study of influence of intervention with olive oil (monounsaturated fatty acids) and linseed oil (α-linolenic acid) in the oxidative stress marker malondialdehyde (MDA) and in the activity of Lp-PLA₂ in healthy volunteers.

Methodology: 37 healthy volunteers with normal BMI, aged 18-37 years old, were separated in two groups. The first group consumed 15 ml of linseed oil per day and the second one consumed 15 ml of olive oil per day for 6 weeks. After a wash out period of 6 weeks, the intervention oils were reversed in 2 groups. The activity of Lp-PLA₂ and MDA levels were measured at baseline and in the end of every intervention.

Results: The intervention with linseed oil resulted in a significant reduction of MDA levels ($p=0,042$), while the intervention with olive oil had no result in MDA ($p=0,23$). Regarding the activity of Lp-PLA₂ none of the two interventions influenced the enzyme's activity (linseed oil $p=0,33$ and olive oil $p=0,44$).

Conclusion: The intervention with linseed oil is thought to ameliorate the marker of lipid peroxidation marker MDA. The activity of Lp-PLA₂ is not influenced by the intervention with both oils.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ -ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Εισαγωγή

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την Ελλάδα για το έτος 2004, το 49% όλων των θανάτων προέρχεται από καρδιαγγειακές νόσους (1), ενώ σε παγκόσμιο επίπεδο το ποσοστό υπολογίστηκε σε 29% με προοπτικές αύξησης ως το 2030. Οι καρδιαγγειακές νόσοι αποτελούν μία ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αγγείων με κυριότερες τη στεφανιαία και εγκεφαλοαγγειακή νόσο (2). Δύο γεγονότα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι η αθηροσκλήρυνση των στεφανιαίων αρτηριών και ο σχηματισμός θρόμβου στις περιοχές αυτές, που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ισχαιμίας (4). Ήδη σε νεαρή ηλικία (βρέφη και παιδιά), έχουν βρεθεί πρώιμες αθηρωματικές βλάβες, γνωστές και ως λιπώδεις γραμμώσεις, που αποτελούνται από μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα (5).

➤ Ορισμός

Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί υποκατηγορία της αρτηριοσκλήρυνσης, της αγγειακής νόσου που περιγράφει, όπως δηλώνει και το όνομά της, τη σκλήρυνση μιας αρτηρίας (6). Είναι χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που συμβαίνει κυρίως στις μεγάλου και μεσαίου μεγέθους ελαστικές και μυικές αρτηρίες και μπορεί να οδηγήσει σε οξύ κλινικό περιστατικό μέσω της θρόμβωσης και ρήξης των αθηρωματικών πλακών. Το κλινικό περιστατικό, ανάλογα με το αγγείο που αποφράσσεται, μπορεί να είναι ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο-έμφραγμα, ασταθής στηθάγχη ή αιφνίδιος θάνατος- εγκεφαλικό επεισόδιο ή περιφερική αρτηριοπάθεια (5,7).

➤ Ιστορική αναδρομή

Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα κυκλοφορούσαν διάφορες θεωρίες για την αθηροσκλήρυνση, που υποστήριζαν ότι το έναυσμα για τη δημιουργία της έδινε η διατήρηση του αρτηριακού τοιχώματος από λιποειδή. Το 1973 οι Ross και Glomset πρότειναν την υπόθεση «απόκριση στον τραυματισμό», κατά την οποία το αρχικό βήμα για την αθηρογένεση είναι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα ποικίλες αποκρίσεις που τροποποιούν τις φυσιολογικές ομοιοστατικές ιδιότητες των αγγείων. Το 1999, ο Ross ολοκλήρωσε τη θεωρία του η οποία περιγράφει ότι η αυξημένη διαπερατότητα του δυσλειτουργικού ενδοθηλίου σε αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες επαρκεί για να ξεκινήσει η αθηρογένεση. Η υπόθεση «απόκριση στον τραυματισμό» έδωσε τη θέση της στην υπόθεση της «οξειδωτικής τροποποίησης», σύμφωνα με την οποία το καθοριστικό γεγονός είναι η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας

(LDL) (3). Ωστόσο, ο Stocker αντέταξε το 2004 το υπόδειγμα «οξειδωτική απόκριση στη φλεγμονή». Σύμφωνα με αυτό, το οξειδωτικό στρες – που κατείχε τη θέση του αιτιολογικού παράγοντα στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης – διαδραματίζει δευτερεύοντα ρόλο με τη φλεγμονή να αποτελεί το κυρίαρχο γεγονός (8).

➤ Παράγοντες κινδύνου

Υπάρχουν περισσότεροι από 200 παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την αθηροσκλήρυνση, οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε γενετικούς και επίκτητους. Κλασικοί παράγοντες είναι η ηλικία, το ανδρικό φύλο, η δυσλιπιδαιμία, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η υπέρταση, το κάπνισμα, το οικογενειακό ιστορικό πρόωρης καρδιαγγειακής νόσου, η πλούσια σε λιπαρά διαίτα και η καθιστική ζωή. Από αυτούς, τα υψηλά επίπεδα της χοληστερόλης, ιδίως της LDL-χοληστερόλης, στο πλάσμα αρχικά είχε θεωρηθεί ότι είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου (7). Η συγκέντρωση της ολικής και LDL χοληστερόλης καθιερώθηκε ως βασικός παράγοντας κινδύνου από τη μακροπρόθεσμη μελέτη “Framingham Heart Study” ορίζοντας τον πρώτο βιολογικό δείκτη που σχετίζεται με την παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης. Ωστόσο, το γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός ατόμων με φυσιολογικές τιμές λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα εμφανίζει αθηροσκλήρυνση υποδηλώνει την παρουσία και άλλων σημαντικών παραγόντων που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη ασθένεια (9).

Νεότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης είναι τα αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης (a), η μειωμένη φυσική δραστηριότητα και τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης. Πιθανός παράγοντας κινδύνου αποτελεί το «οξειδωτικό στρες», το οποίο, ωστόσο, δεν είναι ούτε μετρήσιμο ούτε συγκρίσιμο ανάμεσα στα άτομα. Γι’ αυτό, ενώ έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος των στοιχείων που σχετίζονται με την οξείδωση στη διαδικασία της αθηρογένεσης χρειάζεται αρκετή ακόμη έρευνα ώστε να αποτελέσουν ένδειξη καρδιαγγειακής βλάβης (10). Γίνεται κατανοητό, επομένως, ότι η αθηροσκλήρυνση αποτελεί μία δυναμική διαδικασία με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες να παρέχουν πλήθος παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες για την εκτίμηση του κινδύνου, τη διάγνωση και την πρόγνωση της καρδιαγγειακής νόσου (9). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι έννοιες του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής, που αποτελούν παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της αθηροσκλήρυνσης.

Γενικά χαρακτηριστικά

Ο όρος «οξειδωτικό στρες», που πρωτοεμφανίστηκε το 1986 από τον Helmut Sies (11), περιγράφει μία διαταραχή στην ισορροπία ανάμεσα στα προ-οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά

μόρια που περιέχονται στον οργανισμό, προς όφελος των προ-οξειδωτικών, οδηγώντας σε πιθανή βλάβη (12). Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με ποικιλία παθολογικών καταστάσεων όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι φλεγμονώδεις νόσοι, οι ψυχολογικές ασθένειες αλλά και η διαδικασία της γήρανσης. Η επίδραση που μπορεί να έχει η διαδικασία αυτή σε κάποιο κύτταρο εξαρτάται από το είδος των οξειδωτικών μορίων, την ένταση του οξειδωτικού στρες, τη διάρκεια της δράσης του, το είδος των κυττάρων που εμφανίζουν την οξειδοαναγωγική ανισορροπία αλλά και από τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη δράση των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μεταβολιτών τους (13).

Ελεύθερες ρίζες

Γενικά χαρακτηριστικά

➤ Ορισμός

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο που περιέχει ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα τροχιακό και έχει την ικανότητα της ανεξάρτητης ύπαρξης στο χώρο (14). Το οξυγόνο είναι από μόνο του μία διπλή ρίζα καθώς έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε διαφορετικά τροχιακά, τα οποία δεν μπορούν να σχηματίσουν ζεύγος. Ωστόσο, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική ρίζα λόγω ιδιαιτεροτήτων στη διαμόρφωση των ηλεκτρονίων του (4).

Ως ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) θεωρούνται οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο-στο οποίο βρίσκεται το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο-όπως και όλα τα μόρια που μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε αυτές (μη ρίζες). Επιπλέον, δραστικά μόρια λιποειδών και υδατανθράκων όπως είναι η μηλονυλο-διαλδεϋδη (MDA) και άλλες κετοαμίνες και κετοαλδεϋδες, μπορούν να θεωρηθούν ROS (15). Ομοίως, ενεργές μορφές αζώτου (Nitrogen reactive Oxygen Species, NOS) χαρακτηρίζονται οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν άζωτο και οξυγόνο αλλά και όλες οι ενώσεις που μπορούν γρήγορα να μετατραπούν σε αυτές (16). Τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται και ως οξειδωτικά ή προ-οξειδωτικά (11).

➤ Κυτταρικές και περιβαλλοντικές πηγές ελευθέρων ριζών

Κυτταρικές πηγές

Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού που λαμβάνουν χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό σε φυσιολογικές συνθήκες έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών, είτε ως κύριο

είτε ως δευτερεύον προϊόν. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες πηγές τους που μπορούν να συναντηθούν μέσα στον οργανισμό.

Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής, υπάρχει πιθανότητα εκροής ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Στον κύκλο της ουβικινόνης, για παράδειγμα, η ελεύθερη ημικινόνη στο εσωτερικό της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ανιόντος υπεροξειδίου (O_2^-) μέσω της τυχαίας μεταφοράς του ηλεκτρονίου σε O_2 . Επίσης, στις αντιδράσεις των οξειδασών, χρησιμοποιείται οξυγόνο ως υπόστρωμα και ως προϊόντα σχηματίζονται ενεργές μορφές οξυγόνου. Ενδεικτικά αναφέρονται η οξειδάση της ξανθίνης, που απελευθερώνει O_2^- , η μονοαμινοοξειδάση και η οξειδάση των λιπαρών οξέων που και οι δύο παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Ο μεταβολισμός των ενζύμων του κυτοχρώματος P_{450} αποτελεί άλλη μία πηγή των ROS στον οργανισμό, με τα ηλεκτρόνια να διαφεύγουν από τις φλαβίνες που υπάρχουν στο ενεργό τους κέντρο ενώ και η οξειδωση της αιμοσφαιρίνης είναι σημαντική πηγή O_2^- . Περίπου 3% της αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά κύτταρα οξειδώνεται από οξυαιμοσφαιρίνη ($Fe^{2+}-O_2$) σε δεοξυ-αιμοσφαιρίνη ($Fe^{3+}-O_2^-$) και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση και απελευθέρωση O_2^- . Η διαδικασία της αναπνευστικής έκρηξης αποτελεί βασική πηγή O_2^- , $HO\bullet$, H_2O_2 , $HOCl$ και NOS . Η αναπνευστική έκρηξη είναι μέρος της άμυνας του οργανισμού και ορίζεται ως η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων οξυγόνου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την απόκριση του οργανισμού σε κάποια μόλυνση (17). Άλλες πιθανές πηγές ROS είναι τα υπεροξειδιοσώματα, τα μικροσώματα, τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα και άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη διαδικασία (4, 18, 19).

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ο ρόλος των μετάλλων στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Η διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων μετάλλων είναι αυτή που μπορεί να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή των ROS (20). Περιέχονται σε ένζυμα που συμμετέχουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό, ένζυμα που χρησιμοποιούν δηλαδή οξυγόνο, αλλά και σε συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας όπως τα κυτοχρώματα, με κύριους εκπροσώπους το σίδηρο και το χαλκό (21). Συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδωσης, παρέχοντας μονήρη ηλεκτρόνια και αλλάζοντας, κατά συνέπεια, την κατάσταση σθένους τους. Για παράδειγμα, ο σίδηρος οξειδώνεται στα κυτοχρώματα ως εξής: $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+} + e^-$, ενώ και ο χαλκός υφίσταται παρόμοια αντίδραση ως συστατικό της οξειδάσης των κυτοχρωμάτων: $Cu^+ \leftrightarrow Cu^{2+} + e^-$.

Τα μέταλλα συνεισφέρουν επίσης στις αντιδράσεις αυτοοξειδωσης, επιταχύνοντας αργές αντιδράσεις του οξυγόνου με διάφορες ενώσεις (4). Όλα τα μέταλλα δεν εμφανίζουν την ίδια τοξικότητα εξαιτίας των διαφορών που υπάρχουν στη διαλυτότητά τους, στη βιοδιαθεσιμότητά τους, στη μεταφορά τους, στη χημική δραστηριότητα καθώς και στις ουσίες που σχηματίζονται εντός του σώματος από κάθε μέταλλο (22).

Περιβαλλοντικές πηγές

Οι περιβαλλοντικές πηγές των ελευθέρων ριζών αναφέρονται σε εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν το σχηματισμό των μορίων αυτών στον οργανισμό. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται αέριοι ρυπαντές, το κάπνισμα, η ακτινοβολία, η έκθεση σε χημικές ενώσεις και η μόλυνση που προέρχεται από την ανθρώπινη δραστηριότητα. Όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση ενός ιστού σε οξυγόνο, τόσο πιο σοβαρή είναι η βλάβη που προκαλείται από την ακτινοβολία (4). Επίσης, οι εκπομπές του αυτοκινήτου περιέχουν μεγάλες ποσότητες διοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}_2\bullet$) ενώ και το όζον στα κατώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα. Άλλοι περιβαλλοντικοί ρυπαντές είναι οι αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες και τα φυτοφάρμακα. Ο καπνός του τσιγάρου αποτελεί σημαντική πηγή οξειδωτικών ενώσεων, καθώς περιέχει πληθώρα ελευθέρων ριζών με βλαπτική επίδραση στον οργανισμό καπνιστών και μη (10, 11, 15, 18).

➤ Αλυσιδωτές αντιδράσεις

Οι ρίζες αναπαράγουν νέες ρίζες καθώς έχουν την τάση να λειτουργούν σαν οξειδωτικοί παράγοντες. Αυτό σημαίνει ότι παίρνουν εύκολα ένα ηλεκτρόνιο από τα γειτονικά τους μόρια ξεκινώντας με αυτό τον τρόπο αλυσιδωτές αντιδράσεις (18). Οι αντιδράσεις αυτές χαρακτηρίζονται από συνεχή αναγέννηση ριζών, καθεμία από τις οποίες συμβάλει εκ νέου στην παραγωγή ριζών. Διακρίνεται σε τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό (19). Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις προκύπτουν ως αποτέλεσμα της υψηλής δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών, η οποία οφείλεται, κυρίως, στην ανισορροπία των ηλεκτρονίων στα τροχιακά. Η κύρια αιτία της έντονης δραστηριότητας των ριζών είναι η απόκτηση σταθερότητας με την πρόσληψη του ηλεκτρονίου που λείπει από το μόριό τους (10,11). Η υψηλή δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών θα μπορούσε να λειτουργήσει αντιοξειδωτικά, καθώς όταν δύο ελεύθερες ρίζες συναντηθούν, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους μπορούν να σχηματίσουν ζεύγος και με αυτό τον τρόπο οι δύο ρίζες να χαθούν. Από τη στιγμή, ωστόσο, που τα περισσότερα μόρια που περιέχονται στους ζωντανούς οργανισμούς δεν έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, η εμφάνιση μιας ρίζας στον οργανισμό σημαίνει αντίδραση της ρίζας με μη ρίζες και κατ' επέκταση, αναγέννηση ριζών (4). Ιδιαίτερα δραστικές είναι οι ρίζες υδροξυλίου και αλκοξειδίου ($\text{RO}\bullet$). Ωστόσο, υπάρχουν και ρίζες που είναι αρκετά σταθερές και δεν αντιδρούν εύκολα με αποτέλεσμα να έχουν μακρύτερο χρόνο ζωής σε σχέση με τις άλλες, όπως για παράδειγμα το μονοξειδίο του αζώτου (10) .

➤ Αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Οι σημαντικότερες αντιδράσεις με τις οποίες εκδηλώνεται η δράση των ελευθέρων ριζών είναι οι ακόλουθες (10):

- Αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου

Στην αντίδραση αυτή, είτε αποσπάται άμεσα ένα άτομο υδρογόνου από την ελεύθερη ρίζα είτε σημειώνεται μεταφορά ηλεκτρονίου που ακολουθείται από μεταφορά πρωτονίου. Είναι αντίδραση-κλειδί στην υπεροξειδωση των λιποειδών, στην τροποποίηση των πρωτεϊνών και στη βλάβη του DNA.

- Αντίδραση προσθήκης
- Αντίδραση αρωματικής υποκατάστασης
- β-scission αντίδραση
- Αντιδράσεις σύζευξης

➤ Φυσιολογικές και τοξικές δράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες ασκούν φυσιολογικές δράσεις στον οργανισμό αλλά μπορεί να εμφανίσουν και τοξική επίδραση στη δομή και στη λειτουργία του. Αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους: σε μέτριες συγκεντρώσεις εκδηλώνονται οι φυσιολογικές δράσεις ενώ σε μεγάλες υπερτερούν οι αρνητικές. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου είναι απαραίτητες για σημαντικές διαδικασίες όπως παραγωγή ενέργειας, σύνθεση σημαντικών βιολογικά ενώσεων, φαγοκυττάρωση καθώς και μεταγωγή σήματος μεταξύ των κυττάρων (23). Όσον αφορά την αρνητική τους δράση, υπάρχει μεγάλος αριθμός ενδείξεων που δείχνουν πιθανή αιτιολογική σχέση ανάμεσα στις ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου και σε ασθένειες όπως η καρδιαγγειακή νόσος, ο καρκίνος αλλά και η γήρανση (εικόνα 1) (10,24). Στη συνέχεια, περιγράφονται οι τοξικές δράσεις που εμφανίζουν ενδιαφέρον ως προς τη συμβολή τους στην παθογένεια του οργανισμού.

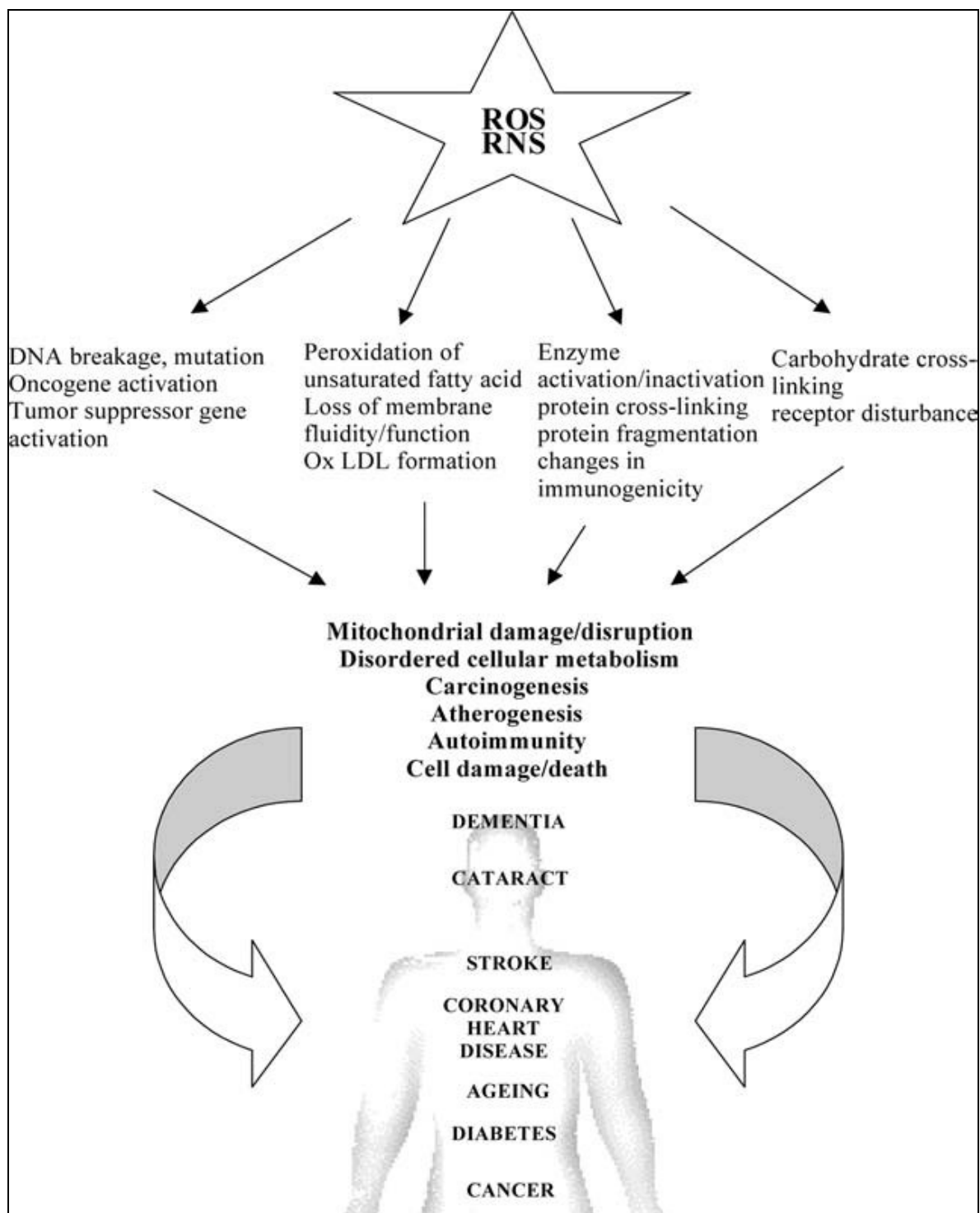
Οι τοξικές δράσεις των ελευθέρων ριζών αφορούν την οξειδωτική τροποποίηση των μακρομορίων από τις ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου. Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται στα μακρομόρια του οργανισμού, αντιδράνε με αυτά και προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, καταστροφικές τόσο για το κύτταρο όσο και για τον οργανισμό στο σύνολό του (εικόνα 1). Παραδείγματα της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται στα λιποειδή, στις πρωτεΐνες, στους υδατάνθρακες και στο DNA είναι η δυσλειτουργία των μεμβρανών, η τροποποίηση της δράσης των πρωτεϊνών, και ειδικότερα των ενζύμων, η διάσπαση των κλώνων του DNA και η τροποποίηση των βάσεων του (εικόνα 2) (10,11,18).

Οξείδωση πρωτεϊνών

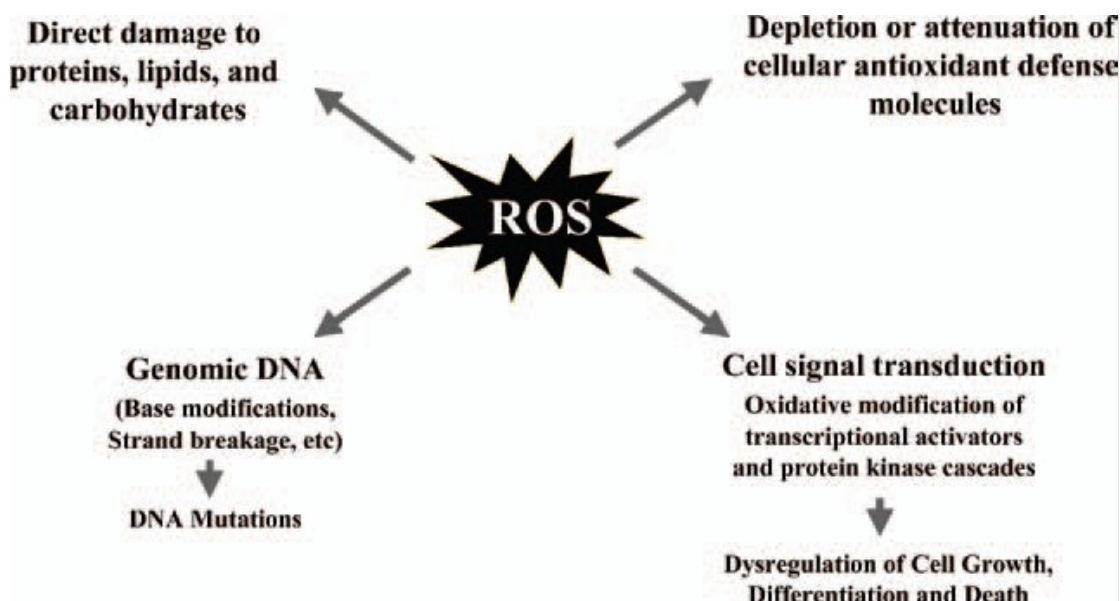
Η οξείδωση των πρωτεϊνών επηρεάζεται από το είδος των περιεχόμενων αμινοξέων. Οι θειούχες ομάδες ή οι ακόρεστοι δεσμοί που υπάρχουν σε μερικά αμινοξέα όπως η μεθειονίνη, τα καθιστούν πιο ευοξειδωτά σε σχέση με άλλα. Η οξείδωση των πρωτεϊνών εμφανίζει ιδιαίτερα καταστροφικές επιδράσεις στην περίπτωση που τα αμινοξέα που υφίστανται την επίθεση των ελευθέρων ριζών βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωσή του (18).

Οξείδωση νουκλεϊνικών οξέων

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ιδίως η ρίζα υδροξυλίου είναι υπεύθυνες για την οξείδωση των νουκλεϊνικών οξέων DNA και RNA. Στη παραγωγή των ριζών αυτών συνεισφέρει η μη ειδική δέσμευση των ιόντων σιδήρου (Fe^{2+}) στο DNA. Με τη συμβολή του σιδήρου πραγματοποιείται η αντίδραση Fenton, όπου το υπεροξειδίο του υδρογόνου ανάγεται σε ρίζα υδροξυλίου. Η ρίζα υδροξυλίου εμφανίζει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, οπότε προκαλεί τοπικές βλάβες στο DNA καθώς μόνο αυτές που παράγονται στην περιοχή γύρω από αυτό μπορούν να του επιτεθούν. Επίσης, η συγκεκριμένη δραστική ρίζα έχει τη δυνατότητα δράσης σε όλα τα συστατικά του νουκλεοτιδικού μορίου, δηλαδή στο σάκχαρο δεοξυριβόζη, στις φωσφορικές ομάδες και στις βάσεις, πουρίνες και πυριμιδίνες. Για παράδειγμα αναφέρεται η προσθήκη της $\text{HO}\cdot$ στη γουανίνη, η οποία μετατρέπεται σε ρίζα υδροξυγουανίνης και στη συνέχεια σε 8-υδροξυγουανίνη. Η τελευταία ένωση χρησιμοποιείται ως δείκτης οξείδωσης του DNA. Οξειδώσεις μπορούν να συμβούν και από τις δραστικές μορφές αζώτου όπως το υπεροξυνιτρώδες ανιόν, αλλά και πρωτεΐνες ή αλδεϋδες δεσμευμένες σε λιποειδή. Σχετικά με το RNA, το γεγονός ότι είναι μονόκλωνο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα το καθιστά πιο ευάλωτο σε οξείδωση. Οι αλλαγές που προκύπτουν στο γενετικό υλικό λόγω της δράσης των ριζών έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων, καρκίνου και άλλων παθολογιών σχετιζόμενων με την ηλικία. Οι μισοί από όλους τους ανθρώπινους καρκίνους θεωρείται ότι σχετίζονται με τη δράση των ελευθέρων ριζών στο γενετικό υλικό (4,15,18).



Εικόνα 1: Οι ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών (24).



Εικόνα 2: Άμεσες και έμμεσες επιδράσεις των ROS. (11)

Υπεροξειδωση λιποειδών

Η υπεροξειδωση των λιποειδών έχει αρνητικές προεκτάσεις τόσο σε επίπεδο τροφίμων όσο και σε επίπεδο οργανισμού. Σε επίπεδο τροφίμων μπορεί, για παράδειγμα, να οδηγήσει στην υποτίμηση της ποιότητας ενός τροφίμου ενώ σε επίπεδο οργανισμού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη των αθηρωματικών βλαβών μέσω της οξειδωτικής τροποποίησης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η λιποειδική υπεροξειδωση μπορεί να προκύψει μέσω τριών διαφορετικών πορειών: τη μη-ενζυματική, μεσολαβούμενη από ελεύθερες ρίζες αλυσιδωτή αντίδραση, τη μη-ενζυματική, μη μεσολαβούμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση και τέλος, την ενζυματική αντίδραση (10).

Η πρώτη πορεία, περιλαμβάνει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και τις βλάβες που προκαλούν στα λιποειδή, ιδίως στα φωσφολιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών. Οι κυτταρικές μεμβράνες χαρακτηρίζονται από τη λιποειδική διπλοστιβάδα που σχηματίζεται από τα φωσφολιποειδή, η οποία ελέγχει την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ της εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας περιοχής. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιποειδών αποτελούν στόχο για τις ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου. Η υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων, που ακολουθεί ως συνέπεια της δράσης των ριζών, περιλαμβάνει μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων. Ακολουθεί η περιγραφή των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, το στάδιο της έναρξης αποτελείται από μία ελεύθερη ρίζα (εναρκτήριο μόριο) και ένα λιποειδές. Η επίθεση της ρίζας στο λιποειδές έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λιποειδικών ριζών, μέσω της απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από άνθρακα γειτονικό σε διπλό δεσμό ή πιο συχνά από άνθρακα που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο διπλούς

δεσμούς. Στη συνέχεια, η λιποειδική ρίζα αντιδρά με το οξυγόνο και σχηματίζεται λιποειδικό υπεροξειδίο. Αυτή η αντίδραση ορίζει την αρχή του σταδίου της διάδοσης. Ακολουθεί αντίδραση του λιποειδικού υπεροξειδίου με κάποιο άλλο λιπαρό οξύ που έχει ως προϊόντα το λιποειδικό υδρο-υπεροξειδίο και μία νέα λιποειδική ρίζα. Η νέα λιποειδική ρίζα ξεκινάει μία δεύτερη οξειδωτική αλληλουχία αντιδρώντας με το οξυγόνο, ενώ το λιποειδικό υδρο-υπεροξειδίο δεν είναι αρκετά σταθερό και δίνει διάφορες αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές διακρίνονται σε τρία στάδια από τα οποία παράγονται ενώσεις όπως αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες, οργανικά οξέα και άλλα παραπροϊόντα. Ο αριθμός των αντιδράσεων του σταδίου της διάδοσης ανά αντίδραση έναρξης ονομάζεται μήκος κινητικής της αλυσίδας και δείχνει πόσο προχωράει η αλυσιδωτή αντίδραση. Η διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων δεν πραγματοποιείται επ'αόριστον αλλά τερματίζεται με την αντίδραση της λιποειδικής ρίζας ή του λιποειδικού υπεροξειδίου με κάποιο αντιοξειδωτικό μόριο, κυρίως με τη βιταμίνη Ε. Μπορεί, ωστόσο, να αντιδράσουν μεταξύ τους δύο ρίζες λιποειδικών υπεροξειδίων και να δώσουν ως προϊόντα μη ρίζες (κετόνες, αλκοόλες και άλλα).

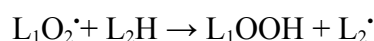
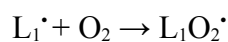
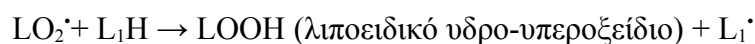
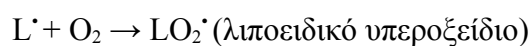
Όσον αφορά τη μη-ενζυματική, μη μεσολαβούμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση, πραγματοποιείται από κάποιες ενεργές μορφές οξυγόνου αλλά χωρίς να ακολουθείται ο μηχανισμός των ελευθέρων ριζών. Για παράδειγμα, το μονήρες οξυγόνο, αντί να αποσπάσει άτομο υδρογόνου από το λιποειδές προς σχηματισμό λιποειδικής ρίζας, προστίθεται γρήγορα στο διπλό δεσμό του λιποειδικού μορίου και παράγεται υδρο-υπεροξειδίο και/ή κυκλικό υπεροξειδίο. Τέλος, η ενζυματική λιποειδική υπεροξειδωση αναφέρεται στη δράση των λιποξυγενασών και κυκλο-οξυγενασών στα λιποειδή (10,18,25).

Πίνακας 1: Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης λιποειδών (10,18)

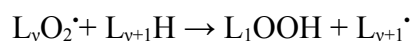
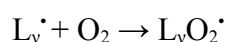
Έναρξη αλυσιδωτής αντίδρασης $\rightarrow$ ρίζα $X^{\bullet}$



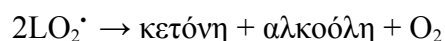
Διάδοση αλυσιδωτής αντίδρασης



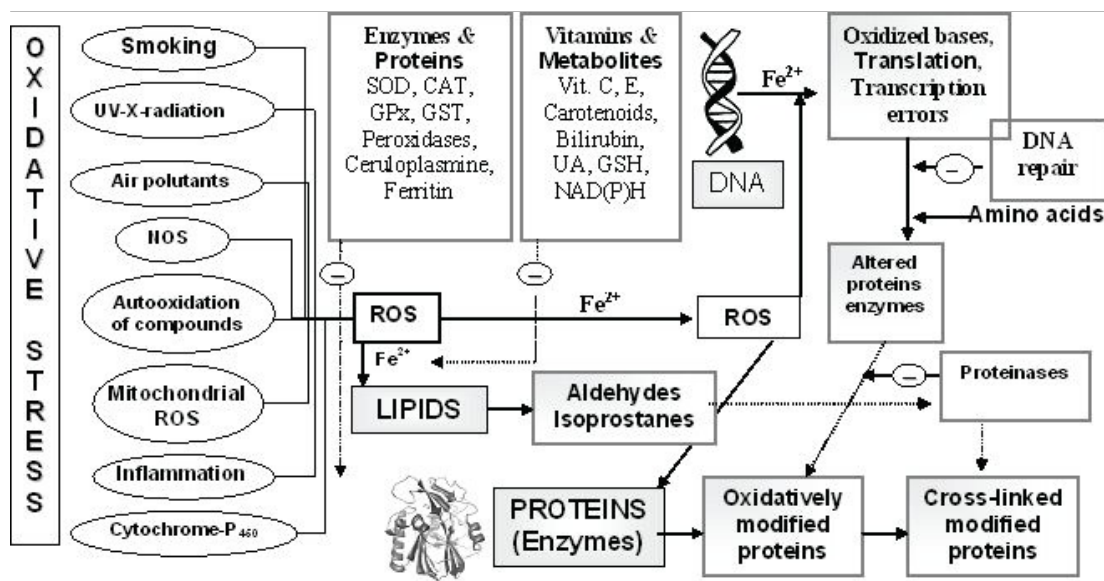
.....



Τερματισμός αλυσιδωτής αντίδρασης



Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων που συμβαίνει στο εσωτερικό του οργανισμού.



Εικόνα 3: Αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων (13)

Ενεργές μορφές οξυγόνου

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου αναφέρονται σε μόρια που περιέχουν οξυγόνο και είναι πιο δραστικά σε σχέση με το όζον που βρίσκεται στην ατμόσφαιρα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν με τη στενή έννοια του όρου-το ανιόν υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο ενώ με την ευρύτερη έννοια του όρου περιλαμβάνονται και είδη όπως οι ρίζες αλκοξειδίου και υπεροξειδίου, το λιποειδικό υδροϋπεροξείδιο, το υποχλωριώδες οξύ κ.ά. (10). Στον πίνακα 2 παρατίθενται οι ενεργές μορφές οξυγόνου και στον πίνακα 3 ο σχηματισμός τους.

Πίνακας 2: Ενεργές μορφές οξυγόνου (10,18,26)

ROS	Όνομα	Ιδιότητα
Ρίζες		
O ₂	Οξυγόνο	Διπλή ελεύθερη ρίζα, μικρή οξειδωτική ικανότητα
O ₂ ⁻	Ανιόν υπεροξειδίου	Ελεύθερη ρίζα, μεγάλη οξειδωτική ικανότητα, μικρή ικανότητα διάχυσης
HO•	Ρίζα υδροξυλίου	Ελεύθερη ρίζα, μεγάλη οξειδωτική ικανότητα
HO ₂ •	Ρίζα υδροϋπεροξειδίου	

L•	Λιποειδική ρίζα	
LO•	Ρίζα αλκοξειδίου	Ελεύθερη ρίζα
LOO•	Λιποϋπεροξειδική ρίζα	Ελεύθερη ρίζα
P•	Πρωτεϊνική ρίζα	
Μη ρίζες		
O ₃	Όζον	
¹ O ₂	Μονήρες οξυγόνο	
HOCl	Υποχλωριώδες οξύ	Ενεργή μορφή OCl ⁻
H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του υδρογόνου	Μικρή οξειδωτική ικανότητα,μεγάλη ικανότητα διάχυσης
LOOH	Λιποειδικό υδροϋπεροξείδιο	
Fe=O	Ενώσεις σιδήρου-οξυγόνου	

Πίνακας 3: Παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (10)

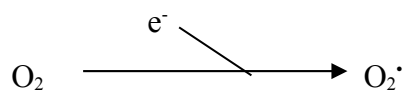
Ενεργές μορφές οξυγόνου	Σχηματισμός
O ₂ ⁻ ,ανιόν υπεροξειδίου (HO ₂ •, Ρίζα υδροϋπεροξειδίου)	Ενζυματική και μη-ενζυματική αναγωγή 1 e ⁻ στο οξυγόνο O ₂ + e ⁻ → O ₂ ⁻ ↔ HO ₂ • (pK=4,8)
HO•, Ρίζα υδροξυλίου	Ραδιόλυση του νερού, μεταλλο-καταλύομενη αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, αλληλεπίδραση NO με το ανιόν υπεροξειδίου $\text{NO} + \text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{ONOO}^{\cdot -}$ $\xrightarrow{\text{H}^+} \text{HO}^{\cdot} + \text{NO}_2$
LO• και LOO•, Ρίζες αλκοξειδίου και λιποϋπεροξειδίου	Μεταλλο-καταλύομενη αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων
H ₂ O ₂ , Υπεροξείδιο του υδρογόνου	Δράση του ενζύμου δισμουτάση (του ανιόντος υπεροξειδίου) στο ανιόν υπεροξειδίου, οξείδωση των σακχάρων

Fe=O, σύμπλοκα σιδήρου-οξυγόνου ¹ O ₂ , Μονήρες οξυγόνο	Αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη κλπ Φωτοσυνθετική οξείδωση, διμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ριζών υπεροξειδίου, αντίδραση μεταξύ του υποχλωριδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου
Υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων και πρωτεϊνών	Οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών
NO ₂ •, διοξειδίο του αζώτου	Αντίδραση της ρίζας υπεροξειδίου με το NO, μολυσμένος αέρας και κάπνισμα
•NO, μονοξειδίο του αζώτου	Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, νιτροζοθειόλες και μολυσμένος αέρας
RS•, σουλφυδριλική ρίζα	Μεταφορά ατόμου υδρογόνου από τις θειόλες
Ρίζα πρωτεΐνης	Μεταφορά ατόμου υδρογόνου από την πρωτεΐνη

- Ρίζες

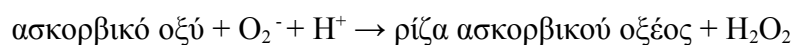
Ανιόν υπεροξειδίου (O₂⁻)

Θεωρείται πρωταρχική δραστική μορφή οξυγόνου, η οποία μπορεί να αναγεννήσει άλλες ρίζες- δευτερογενείς ROS- αντιδρώντας με άλλα μόρια άμεσα ή μέσω ένζυμο- ή μέταλλο-καταλυόμενων διαδικασιών (19). Το ανιόν υπεροξειδίου προκύπτει όταν γίνει προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μόριο του οξυγόνου. Το προστιθέμενο ηλεκτρόνιο σχηματίζει ζεύγος με ένα από τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, αφήνοντας τελικά μόνο ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο:

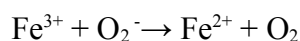


Η χημική συμπεριφορά της συγκεκριμένης ρίζας εξαρτάται από τη φύση του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένη. Σε υδατικό διάλυμα δεν είναι ιδιαίτερα δραστική, λειτουργώντας ορισμένες φορές σαν ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, αποκτώντας ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο. Ωστόσο, συχνότερα λειτουργεί σαν αναγωγικός παράγοντας, παρέχοντας το ηλεκτρόνιό της.

Οξειδωτικός παράγοντας:



Αναγωγικός παράγοντας:



Σε αντίθεση με τα υδατικά διαλύματα, σε οργανικούς διαλύτες το ανιόν υπεροξειδίου είναι αρκετά πιο δραστικό και επικίνδυνο (4,19).

Όταν το O_2^- βρίσκεται σε περίσσεια μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε βιολογικούς στόχους, όπως για παράδειγμα απενεργοποίηση βακτηριακών ενζύμων ή ακόμη και του συμπλέγματος της αφυδρογονάσης του NADH που συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα (16).

Παραγωγή O_2^-

Οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να παραχθούν με τους ακόλουθους τρόπους: μη αντιστρεπτή αντίδραση του οξυγόνου με διάφορες ενώσεις (κατεχολαμίνες, φυλλικό οξύ κ.ά.), κατά την αναπνευστική αλυσίδα, μέσω των ενζύμων των κυτοχρωμάτων P_{450} ή κατά τη διάρκεια ρυθμιστικών δράσεων του οργανισμού απέναντι σε διάφορες καταστάσεις (άμυνα, κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση) (26).

Ρίζα υδροξυλίου ($HO\bullet$)

Είναι ιδιαίτερα δραστική ρίζα και μπορεί να αντιδρά με όλα τα βιολογικά μόρια του οργανισμού από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή μαζί τους. Έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής — περίπου 10^{-9} s — γι'αυτό και αντιδρά άμεσα με όσα βιομόρια βρίσκονται κοντά στην τοποθεσία σχηματισμού του (19). Η επίθεση στους υδατάνθρακες, στα λιποειδή, στις πρωτεΐνες και στο DNA ξεκινάει μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων.

Παραγωγή $HO\bullet$

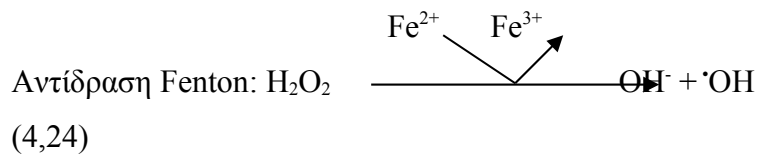
Η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να παραχθεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους μέσα στον οργανισμό. Για παράδειγμα, αν το σώμα εκτεθεί σε ακτίνες X ή γ, που είναι χαμηλού μήκους ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, τότε το νερό του οργανισμού διασπάται από τις ακτίνες και σχηματίζονται ρίζες υδροξυλίου: $H_2O \rightarrow H\bullet + OH\bullet$.

Άλλες αντιδράσεις οι οποίες παράγουν τη ρίζα υδροξυλίου είναι η αντίδραση Haber-Weiss, δηλαδή η αντίδραση μεταξύ του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του ανιόντος του υπεροξειδίου:

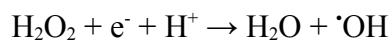


Η αντίδραση αυτή είναι αργή σε υδάτινα διαλύματα αλλά επιταχύνεται όταν υπάρχουν στο διάλυμα ελεύθερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Τα στοιχεία αυτά, παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, συνεισφέρουν στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου, αν και συνήθως βρίσκονται δεσμευμένα σε πρωτεΐνες. Σε περίπτωση, ωστόσο, που απελευθερωθεί ο σίδηρος, κατά την αντίδραση, για παράδειγμα μιας πρωτεΐνης που περιέχει

σίδηρο με ανιόν υπεροξειδίου, ακολουθεί η αντίδραση Fenton, που έχει ως προϊόν τη ρίζα υδροξυλίου.



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρά το γεγονός ότι είναι ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, μπορεί, επίσης, να αντιδράσει με άλλα ηλεκτρόνια και πρωτόνια δίνοντας τη ρίζα υδροξυλίου:



Έχει την ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες όπου μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου όπως είναι τα μιτοχόνδρια (4,16,18,26).

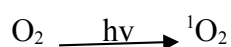
- Μη ρίζες

Μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

Το μονήρες οξυγόνο αποτελεί μία πιο δραστική μορφή του οξυγόνου (O_2). Η αυξημένη δραστηριότητά του οφείλεται σε διαμόρφωση των ηλεκτρονίων του οξυγόνου, κατά την οποία το περιφερειακό ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε υψηλότερο τροχιακό από αυτό που θα έπρεπε κανονικά να καταλαμβάνει. Έτσι, ενώ το οξυγόνο οξειδώνει τα περισσότερα μόρια με πολύ αργό ρυθμό σε θερμοκρασία δωματίου, το μονήρες οξυγόνο δρα πιο γρήγορα λειτουργώντας ως ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας (4,26). Το $^1\text{O}_2$ δηλαδή, μπορεί να αντιδράσει αμέσως με κάποιο άλλο μόριο, μεταφέροντάς του την επιπλέον ενέργεια και/ ή αλλάζοντας τη δομή του. Μόρια στα οποία επιτίθεται συχνά είναι τα απαραίτητα αμινοξέα μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη και τα λιποειδή που περιέχουν διπλούς ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ ατόμων C (24).

Παραγωγή $^1\text{O}_2$

Για να γίνει αυτή η ανακατανομή στα τροχιακά απαιτείται ενέργεια, η οποία προέρχεται από την υπεροξείδωση των λιποειδών των μεμβρανών, μέσω ενζυμικών αντιδράσεων - για παράδειγμα αναφέρεται η αναπνευστική έκρηξη των λευκών αιμοσφαιρίων - και, τέλος, μέσω φωτοευαίσθητων αντιδράσεων. Οι φωτοευαίσθητες αντιδράσεις αφορούν έγχρωμες ενώσεις οι οποίες όταν εκτίθενται στο φως απορροφούν ενέργεια από τη φωτεινή ακτινοβολία.



$h\nu$: υπεριώδης ακτινοβολία

Στον οργανισμό μπορεί να παραχθεί η συγκεκριμένη ρίζα με τη βοήθεια της ριβοφλαβίνης και της αίμης. Επίσης, οι πολύπλοκες αντιδράσεις του όζοντος με διάφορα βιολογικά μόρια παράγουν μονήρες οξυγόνο (4,26).

Όζον (O₃)

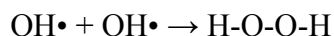
Το όζον είναι γνωστό για τον προστατευτικό ρόλο που διαδραματίζει στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας, τη στρατόσφαιρα, ως ασπίδα ενάντια στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία. Ωστόσο, στα κατώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας αποτελεί μία ανεπιθύμητη τοξική ουσία. Προκύπτει από τη δράση του φωτός σε χημικές ενώσεις του μολυσμένου αέρα των πόλεων. Είναι ερεθιστικό στα μάτια, τη μύτη και τους πνεύμονες και μπορεί να οξειδώσει και να καταστρέψει τις πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια άμεσα (4).

Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)

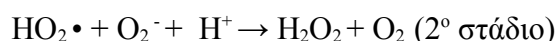
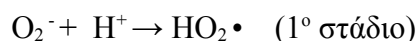
Το υπεροξειδίου του υδρογόνου ανήκει στις ενεργές μορφές οξυγόνου, αν και δεν είναι ρίζα αφού δεν έχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η κατάταξή του στις ενεργές μορφές οξυγόνου οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε ρίζα, προσλαμβάνοντας ένα μόνο ηλεκτρόνιο. Εμφανίζει μικρή οξειδωτική ικανότητα αλλά ταυτόχρονα έχει μεγάλη ικανότητα διάχυσης, ιδιότητα που το καθιστά ιδιαίτερα επικίνδυνο μόριο καθώς μπορεί να μετακινείται διαμέσου των κυττάρων προκαλώντας προβλήματα στη δομή και λειτουργία τους (4,18,21,26).

Παραγωγή H₂O₂

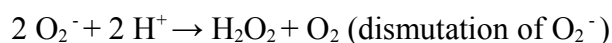
Το υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να παραχθεί στον οργανισμό με τη συμβολή άλλων ριζών οξυγόνου που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίου. Για παράδειγμα, όταν δύο ρίζες υδροξυλίου ενωθούν μεταξύ τους παράγεται H₂O₂. Η αντίδραση είναι η ακόλουθη:



Επίσης, τα ανιόντα υπεροξειδίου αντιδρούν μεταξύ τους σε υδατινά διαλύματα με αποτέλεσμα την παραγωγή H₂O₂ και οξυγόνου. Η αντίδραση γίνεται σε δύο στάδια και πραγματοποιείται αρκετά γρήγορα σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον (27):

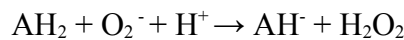


Συνολική αντίδραση:



(24)

Το ένζυμο που καταλύει την παραπάνω αντίδραση είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου. Παρόμοια δράση μπορεί να έχει και το ασκορβικό οξύ (AH_2), το οποίο εξαλείφοντας τα ανιόντα υπεροξειδίου παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου:



Μεγάλες ποσότητες H_2O_2 συναντώνται στα υπεροξυσώματα και σε ισχαιμικούς ιστούς. Σε καταστάσεις ισχαιμίας, η παραγωγή ριζών είναι το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων, διαταραχών στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και της δράσης του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (26). Η οξειδάση της ξανθίνης βρίσκεται κυρίως στο έντερο και οξειδώνει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την ξανθίνη σε ουρικό οξύ, το οποίο αποβάλλεται μέσω των ούρων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, παράγονται στις παραπάνω αντιδράσεις ρίζες υπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε περίπτωση ισχαιμίας και ιστικού τραυματισμού, σημειώνεται υπερπαραγωγή των συγκεκριμένων ριζών (4).

Άλλες οξειδάσες που παράγουν H_2O_2 ως παραπροϊόν είναι η οξειδάση του γλυκολικού οξέος στα φυτά, η οξειδάση της αμίνης, που είναι χαλκο-εξαρτώμενη και η οξειδάση του D-αμινοξέος. Το τελευταίο ένζυμο μετατρέπει τα D-αμινοξέα, που προκύπτουν από τα εντερικά βακτήρια και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, σε L- αμινοξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό για τη σύσταση των πρωτεϊνών (4,21,26).

Ενεργές μορφές αζώτου

- Ρίζες

Οξείδια του αζώτου

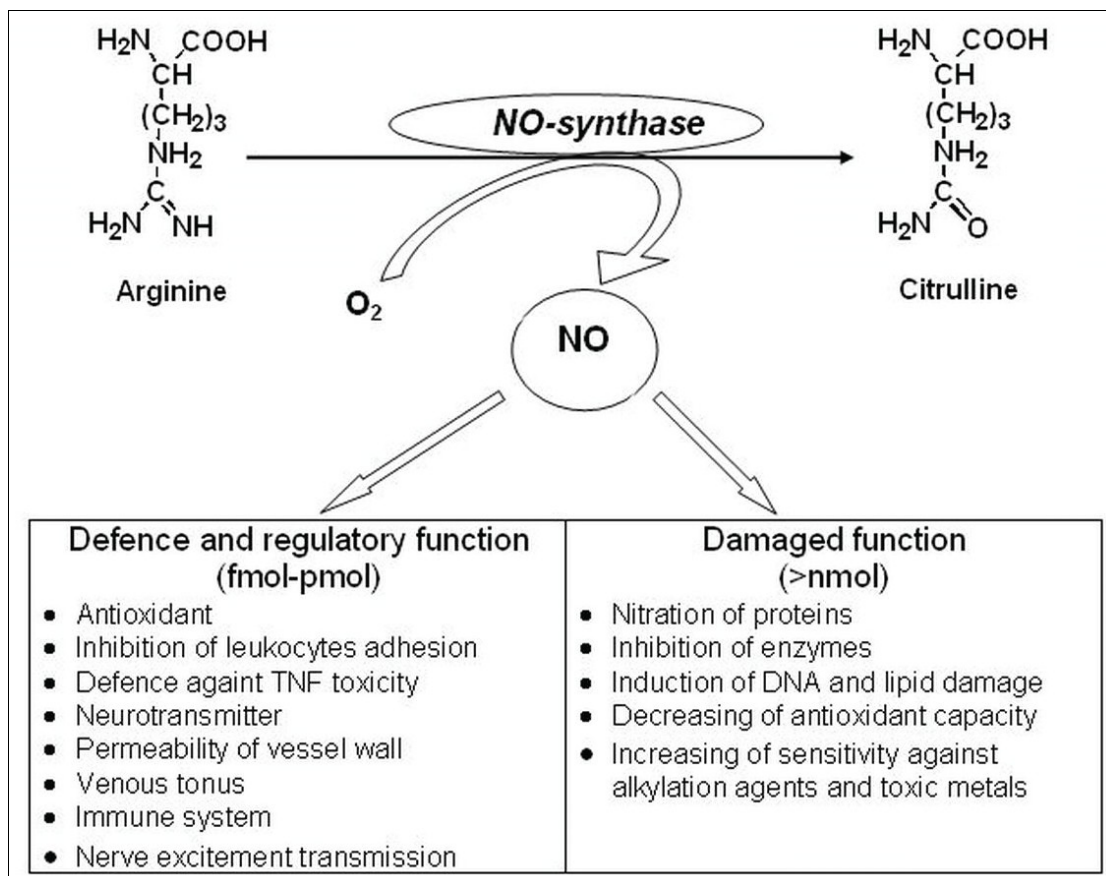
- ο Μονοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}^\bullet$)

Το μονοξείδιο του αζώτου αποτελεί μια ρίζα μεγάλης φυσιολογικής σημασίας για τον οργανισμό. Είναι η πιο γνωστή ρίζα που παράγεται από το αγγειακό σύστημα με σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο της αγγειοδιαστολής και της προσκόλλησης/ συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Παράγεται από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και από άλλους τύπους κυττάρων όπως είναι τα φαγοκύτταρα, συμμετέχοντας έτσι και στη μη ειδική άμυνα του οργανισμού (16). Εμφανίζει ιδιότητες σηματοδότησης των κυττάρων ρυθμίζοντας σημαντικές λειτουργίες τους, ενώ αποτελεί ισχυρό μεσολαβητή της κυτταρικής βλάβης σε ποικιλία καταστάσεων. Ωστόσο, είναι σχετικά αδρανές μόριο αν και λανθασμένα του αποδίδεται ο τίτλος μίας αρκετά τοξικής και αντιδραστικής ρίζας. Η σύγχυση αυτή προφανώς προέρχεται από το σχηματισμό του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος (ONO_2^-), που αποτελεί προϊόν της αντίδρασης του $\text{NO}^\bullet$ με το O_2^- . Το

ONO_2^- είναι αρκετά πιο δραστική ουσία και θεωρείται το υπεύθυνο μόριο που κρύβεται πίσω από τη συμβολή του $\text{NO}\bullet$ σε παθολογικές καταστάσεις. Το $\text{NO}\bullet$ εμφανίζει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής καθώς διαχέεται γρήγορα μέσω των ιστών στα ερυθρά αιμοσφαίρια όπου μετατρέπεται γρήγορα σε νιτρώδες οξύ αντιδρώντας με την οξυαιμοσφαιρίνη. Όμως, από τη στιγμή που θα συναντήσει στο δρόμο του το O_2^- αντιδρά ακαριαία με αυτό προς σχηματισμό ONO_2^- (28).

Παραγωγή $\text{NO}\bullet$

Παράγεται από την αργινίνη υπό τη δράση του ενζύμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (επίπεδο fmol) έχει φυσιολογικό ρόλο και παράγεται, για παράδειγμα κατά την αγγειοδιαστολή ή κατά τη μεταβίβαση των νευρικών ώσεων. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (επίπεδο >nmol) το παραγόμενο $\text{NO}\bullet$ μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις πρωτεΐνες, στα λιποειδή και στο DNA, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω του ONO_2^- (εικόνα 4) (13).



Εικόνα 4: Παραγωγή NO και συμμετοχή του σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις (13)

- ο Διοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}_2\bullet$)

Ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που συναντάται στο μολυσμένο αέρα, στον καπνό από καμμένο οργανικό υλικό και σε σημαντικό ποσοστό στον καπνό του τσιγάρου. Σχηματίζεται από την αντίδραση του NO με το O_2 . Μπορεί να αποσπάσει άτομα υδρογόνου από τα λιποειδή των μεμβρανών και να ξεκινήσει τη λιποειδική υπεροξειδωση (4).

- Μη ρίζες

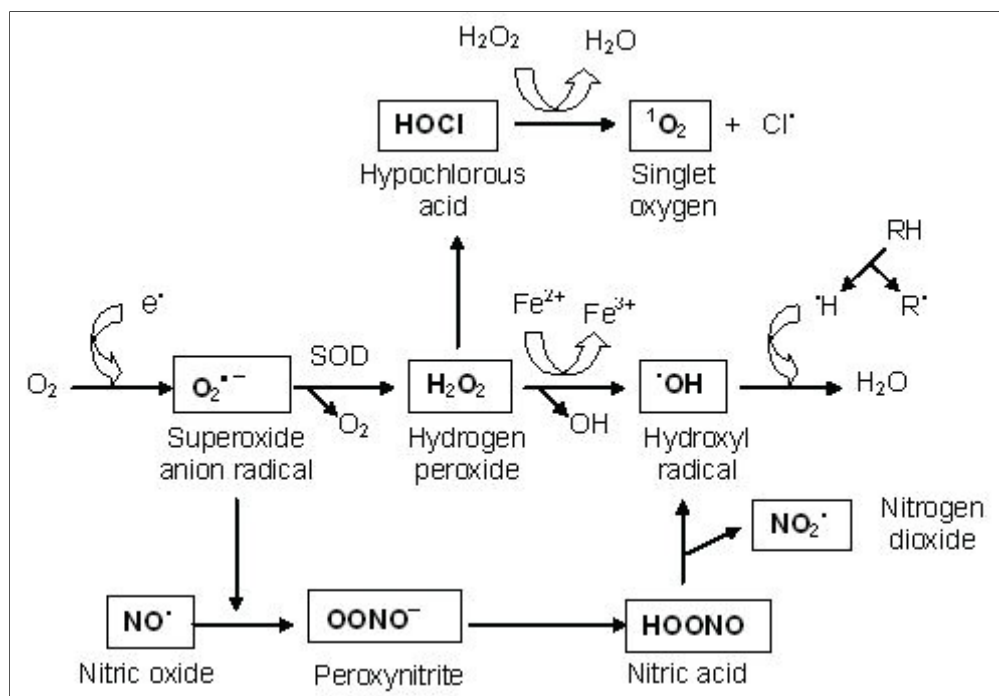
Υπεροξυ-νιτρίδιο (ONO_2^- και ONOOH)

Ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που σχηματίζεται από την αντίδραση μεταξύ του μονοξειδίου του αζώτου και του ανιόντος του υπεροξειδίου. Θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεια πολλών ασθενειών όπως η οξεία και χρόνια φλεγμονή, η σήψη και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (29). Αποτελεί ιδιαίτερα κυτταροτοξικό μόριο καθώς αντιδρά με σημαντικά βιολογικά μόρια μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι θειόλες, οι πρωτεΐνες, τα λιποειδή και τα νουκλεϊκά οξέα (18,30)

Πίνακας 4: Ενεργές μορφές αζώτου (18,26)

NOS	Όνομα	Ιδιότητα
Ρίζες		
$\text{NO}\bullet$	Ελεύθερη ρίζα μονοξειδίου του αζώτου	Ελεύθερη ρίζα, μικρή οξειδωτική ικανότητα, μεγάλη ικανότητα διάχυσης
$\text{NO}_2\bullet$	Ελεύθερη ρίζα διοξειδίου του αζώτου	Περιέχεται στην αιθαλομίχλη, στον οργανικό καπνό και στον καπνό των τσιγάρων
Μη ρίζες		
ONO_2^- ONOOH	Υπεροξυ-νιτρίδιο (Υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν και υπεροξυνιτρώδες οξύ)	Δεν είναι ελεύθερη ρίζα, μεγάλη οξειδωτική ικανότητα, μεγάλη ικανότητα διάχυσης
HNO_2	Νιτρώδες οξύ	
$\text{LOONO}\bullet$	Αλκυλοϋπεροξυνιτρίδιο	Ενεργή μορφή OCl^-

Στην εικόνα 5 απεικονίζεται η αλληλοσυσχέτιση μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μεταβολιτών τους.



Εικόνα 5: Συσχέτιση μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μεταβολιτών τους (13)

Αντιοξειδωτική λειτουργία

Γενικά χαρακτηριστικά

Οξυγόνο και τοξικότητα

Το οξυγόνο αποτέλεσε τον πρώτο αέριο ρύπο που εμφανίστηκε σε μεγάλες ποσότητες στη γη. Μία αναδρομή στο παρελθόν αποκαλύπτει ότι οι πρώτοι ζωντανοί οργανισμοί που εμφανίστηκαν στον πλανήτη ήταν υποχρεωτικά αναερόβιοι και ζούσαν σε περιβάλλον με ελάχιστη συγκέντρωση οξυγόνου. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, εξαιτίας εξελικτικών διαδικασιών, οι επιλογές που είχε ένας υποχρεωτικά αναερόβιος οργανισμός ήταν να πεθάνει ή να προσαρμοστεί στις καινούριες συνθήκες (24). Στη σύγχρονη εποχή, οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί είτε περιορίζονται σε περιβάλλον όπου δεν μπορεί να διεισδύσει το οξυγόνο είτε αναπτύσσουν αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας ώστε να προστατευτούν από την τοξικότητα του οξυγόνου. Οι τελευταίοι οργανισμοί επωφελήθηκαν από τα συστήματα αυτά καθώς τα χρησιμοποίησαν στο μεταβολισμό τους για μεταβολικούς μετασχηματισμούς και παραγωγή ενέργειας (14).

Θεωρίες για την τοξικότητα του οξυγόνου

Αρχικά, ο όρος «τοξικότητα του οξυγόνου» περιέγραφε την αρνητική επίδραση του οξυγόνου στο μεταβολισμό ενός οργανισμού μέσω της δράσης του ως άμεσου αναστολέα των ενζύμων του μεταβολισμού (4). Ωστόσο, η πρόταση αυτή εγκαταλήφθηκε, ελλείψει

πειραματικών δεδομένων που να συσχετίζουν τη δράση του οξυγόνου στα ένζυμα με κάποια άμεση επίδραση στον οργανισμό (14). Το 1954, ο Gerschmann και ο Gilbert έκαναν μία διαφορετική πρόταση σχετικά με την αιτιολογία των βλαπτικών δράσεων του οξυγόνου σε ένα ζωντανό οργανισμό. Θεώρησαν, δηλαδή, ότι ο σχηματισμός ριζών οξυγόνου είναι ο υπεύθυνος παράγοντας για τη δράση του οξυγόνου. Η ανακάλυψη των αντιοξειδωτικών αμυντικών ενζύμων δισμουτάσες του υπεροξειδίου από τους McCord και Fridovich οδήγησε στην επέκταση της προηγούμενης θεωρίας του Gerschmann σε «θεωρία της τοξικότητας του οξυγόνου που οφείλεται στο υπεροξείδιο» (“superoxide theory of oxygen toxicity”) (4,14).

Συστήματα άμυνας του οργανισμού

Γίνεται, επομένως, κατανοητό, ότι δημιουργήθηκε η ανάγκη προστασίας του οργανισμού από τις καταστροφικές επιπτώσεις του αερόβιου μεταβολισμού. Γι’αυτό το λόγο, αναπτύχθηκαν αμυντικά συστήματα που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Τα αντιοξειδωτικά αυτά συστήματα δρουν μειώνοντας την αναγέννηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και αντισταθμίζοντας τις βλαπτικές επιδράσεις τους (24).

Ως αντιοξειδωτική ένωση ορίζεται οποιαδήποτε ουσία που, όταν βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, επιβραδύνει ή αναστέλλει την οξειδωτική βλάβη σε αυτό το υπόστρωμα (12). Η οξειδωτική βλάβη αναφέρεται στην επίθεση των ενεργών μορφών οξυγόνου στα βιολογικά μόρια του οργανισμού όπως τα λιποειδή, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και το γενετικό υλικό (4). Επειδή, ωστόσο, υπήρχε κάποια δυσταξινόμηση των αντιοξειδωτικών μορίων με αυτό τον ορισμό, δηλαδή ορισμένες ενώσεις που προστατεύουν από την οξειδωτική βλάβη βρίσκονται σε σημαντικά μεγάλη συγκέντρωση σε σχέση με το οξειδώσιμο υπόστρωμα, όπως για παράδειγμα η αλβουμίνη πλάσματος, οι Halliwell και Gutteridge απλοποίησαν τον ορισμό ως οποιαδήποτε ουσία που επιβραδύνει, αναστέλλει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από μόριο-στόχο, χωρίς να ενδιαφέρει η συγκέντρωσή της σε σχέση με το υπόστρωμα (12).

Τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν, εκτός από την τοξικότητα των ελευθέρων ριζών, και από τη δράση των παραγόντων μεταγραφής που επηρεάζονται από οξειδωτικά μόρια όπως ο NF-κΒ και κατά συνέπεια από την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών και μορίων προσκόλλησης. Υπάρχει δηλαδή μία κοινή προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή από τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού (11).

ο Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα βρίσκονται κυρίως ενδοκυτταρικά με σκοπό τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας εντός των κυττάρων, ενώ μπορεί να εμφανίσουν και δράση στη

διατήρηση των εξωκυτταρικών αντιοξειδωτικών (8). Η κατάλληλη διαμερισματοποίηση, επομένως, ενισχύει τη δράση των ενζυμικών συστημάτων. Παράδειγμα της κατάλληλης διαμερισματοποίησης αποτελεί ο τρόπος δράσης των ενζύμων, δηλαδή ένζυμα τα οποία καταλύουν αντιδράσεις με προϊόντα ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε κατάλληλα κυτταρικά οργανίδια, τα υπεροξυσώματα (18). Τα υπεροξυσώματα είναι αυτόνομες ενδοκυτταρικές δομές που περιέχουν καταβολικά-οξειδωτικά ένζυμα και σε αυτά πραγματοποιούνται αντιδράσεις οξείδωσης των μακρομορίων και της αιθανόλης. Από τις αντιδράσεις οξείδωσης προκύπτουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες εξουδετερώνονται από αμυντικά ένζυμα των υπεροξειδισωμάτων που τις απομακρύνουν (31).

Επιπλέον, μέταλλα, όπως ο σίδηρος (Fe^{2+}) και ο χαλκός (Cu^{2+}) είναι σε μεγάλο βαθμό δεσμευμένα σε πρωτεΐνες στο αίμα ή στα κύτταρα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να συμμετάσχουν στην αντίδραση Fenton (18). Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται, συνήθως έχουν ειδική διαμόρφωση ώστε να εκτελέσουν άρτια το ρόλο τους ως δεσμευτές μετάλλων. Η τρανσφερίνη και η φερριτίνη προσδένουν το σίδηρο στη μορφή Fe^{3+} που είναι πιο ασφαλής σε σχέση με τη δισθενή μορφή του όσον αφορά τη συμμετοχή σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, ενώ ο χαλκός μεταφέρεται κυρίως από τη σερουλοπλασμίνη. Με το συγκεκριμένο μηχανισμό, η συγκέντρωση του ελεύθερου σιδήρου και χαλκού διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα στο αίμα, της τάξεως των 10^{-23} και 10^{-18} mol/l, αντίστοιχα, μειώνοντας τη μεταλλο-καταλυόμενη παραγωγή του $\text{OH}\cdot$ (24).

Παραδείγματα ενζυμικών αμυντικών συστημάτων αποτελούν η καταλάση, οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, η αναγωγή της γλουταθειόνης και οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου.

- Καταλάση

Η καταλάση ήταν το πρώτο αντιοξειδωτικό ένζυμο που χαρακτηρίστηκαν οι ιδιότητές του. Μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο κατά την αντίδραση: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Τα δύο στάδια της αντίδρασης είναι:

Καταλάση-Fe(III) + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ σύμπλεγμα I

Σύμπλεγμα I + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ Καταλάση-Fe(III) + $2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

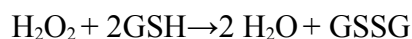
Το ένζυμο αυτό αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης και ένα μόριο NADPH , ενώ περιέχει αιμικό σίδηρο στις ενεργές περιοχές του. Ο τρόπος δράσης του είναι κυρίως τα υπεροξυσώματα, όπου παράγονται μεγάλες ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την οξείδωση μακρομορίων όπως τα λιπαρά οξέα μακριάς αλυσού, οπότε υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος για να δράσει η καταλάση.

Σε μικρότερες ποσότητες βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στα μικροσώματα των κυττάρων. Υπάρχει σε διάφορους ιστούς και κύτταρα αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό συναντάται στο ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα. Επίσης, ιδιαίτερα υψηλές ποσότητες καταλάσης περιέχονται στα ουδετερόφιλα και άλλα λευκά αιμοσφαίρια, όπου βοηθάει στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που προέρχεται από την αναπνευστική έκρηξη (18,21,26).

Η καταλάση εμφανίζει σημαντική ικανότητα διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και αποτελεί ένα από τα πιο ενεργά ένζυμα, γεγονός που αποδεικνύεται από τα μόρια H_2O_2 που καταστρέφονται ανά λεπτό ανά μόριο ενζύμου. Ωστόσο, η συγγένεια του ενζύμου με το H_2O_2 είναι χαμηλή και κατά συνέπεια απαιτούνται μεγάλες συγκεντρώσεις αντιδρώντος για να γίνει γρήγορα η αντίδραση (4).

- Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό, όπως και οργανικών υπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες:



Είναι ένζυμο εξειδικευμένο για τη γλουταθειόνη, παρέχοντας ηλεκτρόνια, μπορεί, ωστόσο, να λειτουργήσει και ως αναγωγικός παράγοντας σε πολλά διαφορετικά υπεροξείδια. Απαιτεί σελήνιο για τη δράση της, καθώς το συγκεκριμένο μέταλλο περιέχεται στο ενεργό του κέντρο ως σελήνο-κυστεΐνη (8). Έχει διάφορες ισομορφές, που εντοπίζονται σε διαφορετικές κυτταρικές τοποθεσίες. Η μορφή του ενζύμου που περιέχεται στο πλάσμα συντίθεται κυρίως στα νεφρά. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ενδοκυτταρικής μορφής του εμφανίζονται στο ήπαρ, αν και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ευρέως κατανεμημένη σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Υποκυτταρικά βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια, καθιστώντας το συγκεκριμένο ένζυμο ως τον κύριο εκκαθαριστή του H_2O_2 σε αυτά τα διαμερίσματα.

Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη βρίσκεται συνήθως σε υψηλά επίπεδα λόγω της δράσης του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης, το οποίο ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη σε γλουταθειόνη: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης είναι ένζυμο εξαρτώμενο από τα φλαβινονουκλεοτίδια και έχει παρόμοια κατανομή στους ιστούς με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

(18,21)

- Δισμουτάσες του υπεροξειδίου

Είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση μετατροπής της ρίζας του υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και οξυγόνο.



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου πρέπει στη συνέχεια να απομακρυνθεί από τα ένζυμα καταλάση ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

Το ένζυμο βρίσκεται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Υπάρχουν τρεις μορφές του ενζύμου στους ιστούς, καθεμία από τις οποίες έχει συγκεκριμένη υποκυτταρική τοποθεσία και διαφορετική κατανομή στους ιστούς. Όλες οι ισομορφές του ενζύμου συνδέονται με ιόντα μετάλλων. Απαραίτητα μέταλλα για την κυτταροπλασματική και εξωκυτταρική δισμουτάση είναι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, ενώ για τη μιτοχονδριακή μορφή το μαγγάνιο. Στις αρτηρίες συναντάται κυρίως στην εξωκυττάρια μορφή του, η οποία συντίθεται από λίγους τύπους κυττάρων ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ίσως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου μέσω της εξουδετέρωσης του $\text{O}_2^{\cdot -}$, το οποίο εξουδετερώνει τον αγγειοχαλαρωτικό παράγοντα που εκκρίνεται από το ενδοθήλιο ($\text{NO}^{\cdot}$ ή παρόμοια ένωση) (8,18,21,31).

- ο Μη-πρωτεϊνικά αντιοξειδωτικά

Εκτός από τα ενζυμικά συστήματα και τις πρωτεΐνες-δεσμευτές μετάλλων υπάρχει μεγάλος αριθμός μη-πρωτεϊνικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους που συμβάλλουν με την παρουσία τους στα αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας του οργανισμού (8).

Κατάταξη αντιοξειδωτικών

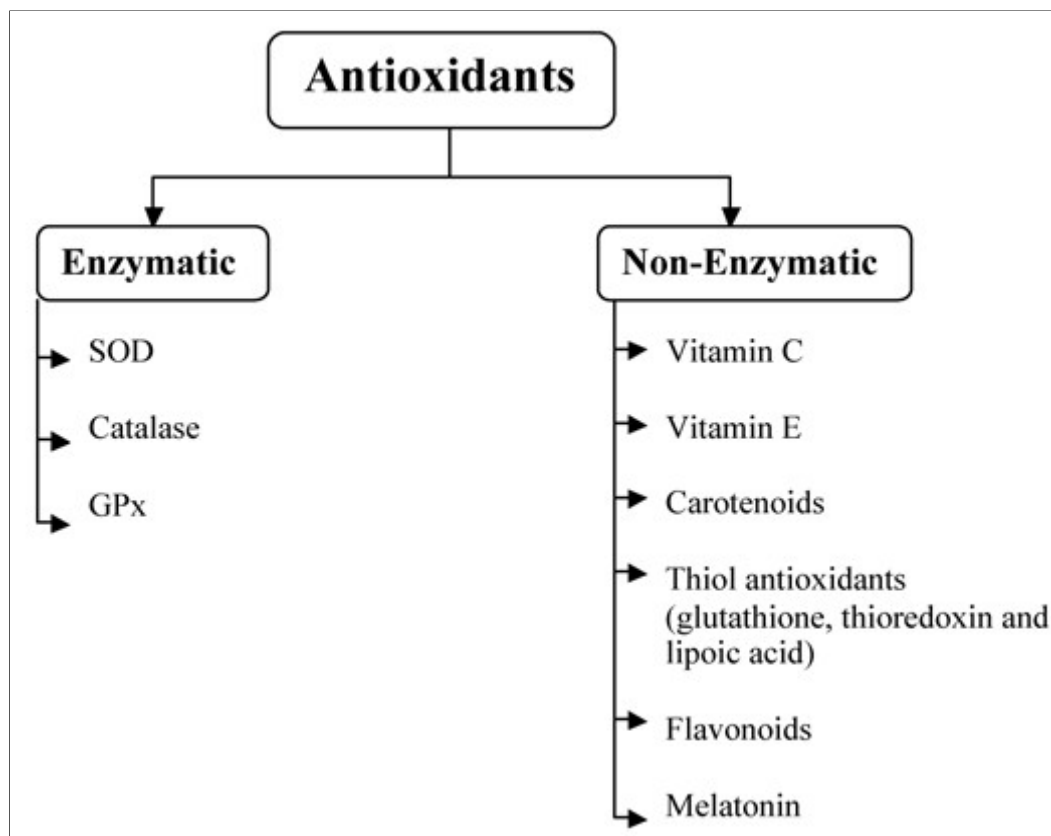
Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να χωριστούν ως εξής:

- Βάσει της διαλυτότητας τους στο νερό
 - Λιπόφιλα αντιοξειδωτικά
 - Υδρόφιλα αντιοξειδωτικά
- Βάσει της χημικής επεξεργασίας τους
 - Φυσικά αντιοξειδωτικά
 - Σύνθετα αντιοξειδωτικά
- Βάσει της προέλευσής τους
 - Ενδογενή αντιοξειδωτικά
 - Εξωγενή αντιοξειδωτικά

➤ Βάσει της ενζυμικής τους δράσης (Εικόνα 6)

- Ένζυμα
- Μη ένζυμα

Στην κατηγορία των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών περιλαμβάνονται η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και το συνένζυμο Q10, ενώ στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά ανήκουν η βιταμίνη C, το ουρικό οξύ και οι πρωτεΐνες που περιέχουν σουλφυδρυλικές ομάδες (αλβουμίνη κ.ά.). Στα φυσικά αντιοξειδωτικά περιέχονται η βιταμίνη C και E, οι πολυφαινόλες και όλες οι ενώσεις που είτε παράγονται στον οργανισμό είτε προσλαμβάνονται από τη διατροφή και εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση (18). Τα σύνθετα αντιοξειδωτικά αναφέρονται σε χημική σύνθεση φυσικών αντιοξειδωτικών στο εργαστήριο, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στη διαμόρφωση του μορίου στο χώρο (10). Ενδογενή αντιοξειδωτικά θεωρούνται αυτά που παράγονται στον οργανισμό ενώ εξωγενή χαρακτηρίζονται αυτά που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής (18).



Εικόνα 6: Κατάταξη των αντιοξειδωτικών σε ένζυμα και μη ένζυμα (32)

Στη συνέχεια, περιγράφονται οι σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις που δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό:

Βιταμίνη Ε

Θεωρείται το πιο ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό. Δρα ως εκκαθαριστής των ελευθέρων ριζών στις μεμβράνες και στα λιποπρωτεϊνικά μόρια, ενώ εμποδίζει τη λιποειδική υπεροξειδωση και τερματίζει τις αλυσιδωτές οξειδωτικές αντιδράσεις, αντιδρώντας πιο γρήγορα με τις υπεροξειδικές ρίζες απ'ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η βιταμίνη Ε δεν εμποδίζει το σχηματισμό της αρχικής λιποειδικής ρίζας σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε λιποειδικά μόρια αλλά μειώνει το σχηματισμό των δευτερογενών ριζών. Εκτός από τον αντιοξειδωτικό της ρόλο, εμφανίζει δομικό ρόλο στη σταθεροποίηση των μεμβρανών.

Συναντάται στη φύση σε οχτώ διαφορετικές μορφές, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στο βαθμό της βιολογικής τους δράσης. Οι μορφές αυτές ισοκατανέμονται σε δύο κατηγορίες, τις τοκοφερόλες (α, β, γ και δ) και τις τοκοτριενόλες (α, β, γ και δ). Οι τοκοφερόλες έχουν ένα δακτύλιο χρωμανόλης και μία ακολουθία φυτόλης και οι 4 μορφές διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό και τη θέση των μεθυλομάδων στο δακτύλιο. Οι τοκοτριενόλες είναι χημικά παρόμοιες αλλά έχουν ακόρεστες ακολουθίες (tails). Η διαιτητική βιταμίνη Ε αποτελείται κυρίως από την α- και γ- τοκοφερόλη (33).

Η πιο δραστική μορφή της βιταμίνης που βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στους ανθρώπους είναι η α-τοκοφερόλη. Δρα ως δότης ηλεκτρονίων αντιδρώντας με ελεύθερες ρίζες, κυρίως με αυτές που είναι λιποειδικής φύσης. Η α-τοκοφερόλη μπορεί να αναγεννηθεί αντιδρώντας στην υδάτινη κοινή επιφάνεια με κάποιο υδρόφιλο αντιοξειδωτικό όπως το ασκορβικό οξύ, την ανηγμένη γλουταθειόνη ή το ουρικό οξύ. Εναλλακτικά, μπορούν να συνδυαστούν δύο ρίζες α-τοκοφερόλης και να σχηματιστεί ένα σταθερό διμερές ή η ρίζα τοκοφερόλης να οξειδωθεί πλήρως σε τοκοφερυλοκίνη (18,21).

Καροτενοειδή

Είναι ομάδα που περιλαμβάνει πάνω από 600 φυσικές χρωστικές των φυτών, που δίνουν το χαρακτηριστικό κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα αντίστοιχα σε διάφορα φρούτα και λαχανικά. Ορισμένα από αυτά εμφανίζουν την ιδιότητα να είναι πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α, όπως για παράδειγμα το β-καροτένιο, το α-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη. Τα καροτενοειδή ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες βάσει της δομής τους: τις ξανθοφύλλες και τα καροτένια. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει οξυγονωμένα καροτενοειδή με καρβοξυλικές και/ή υδροξυλικές ομάδες να αποτελούν τα καταληκτικά μόρια. Παραδείγματα

είναι η λουτεΐνη, ζεοξανθίνη και η κρυπτοξανθίνη. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν υδρογονανθρακικά καροτενοειδή όπως το α- και β- καροτένιο καθώς και το λυκοπένιο (10).

Τα καροτενοειδή θεωρούνται οι πιο ισχυροί βιολογικοί καταστολείς του μονήρους οξυγόνου (21) με το λυκοπένιο να είναι το πιο ικανό για την απομάκρυνση της συγκεκριμένης ρίζας ανάμεσα στα καροτενοειδή. Αυτή η ιδιότητα του λυκοπένιου οφείλεται στη χημική του δομή: οι απομακρυσμένοι διπλοί δεσμοί, η ανοιχτή αλυσίδα και η έλλειψη ατόμων οξυγόνου προφανώς ενισχύουν τη δραστηριότητά του. Υπάρχουν, ωστόσο καροτενοειδή, όπως η νευροσπορίνη, που εμφανίζουν σημαντικότερη δράση αλλά βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο μηχανισμός δράσης τους μπορεί να είναι είτε φυσικός είτε χημικός. Στην πρώτη περίπτωση, η επιπλέον ενέργεια του μονήρους οξυγόνου μεταφέρεται στο καροτενοειδές και στη συνέχεια διασκορπίζεται στο περιβάλλον ως θερμότητα ενώ στη δεύτερη περίπτωση σημειώνεται καταστροφή του μορίου του καροτενοειδούς καθώς δέχεται το μονήρες οξυγόνο στο σύστημα των διπλών δεσμών του (10).

Τα καροτενοειδή μπορούν να δράσουν και ως αντιοξειδωτικά που διασπών την αλυσιδωτή αντίδραση (21). Τα αντιοξειδωτικά αυτά λειτουργούν μέσω της προσφοράς ενός υδρογόνου στην ασταθή λιποειδική ρίζα. Με αυτό τον τρόπο δρα και η α-τοκοφερόλη, το καλύτερο αντιοξειδωτικό αυτής της κατηγορίας όσον αφορά τα καροτενοειδή, προσφέροντας το φαινολικό υδρογόνο του σε μία λιποειδική ρίζα σχηματίζοντας μία σταθερή ρίζα (10).

Τα καροτενοειδή, ωστόσο, μπορεί να έχουν και προ-οξειδωτικό χαρακτήρα. Το β-καροτένιο, αντιδρώντας με τις λιποειδικές ρίζες, σχηματίζει μία ενδιάμεση ρίζα, η οποία αν δεν αλληλεπιδράσει με κάποια άλλη λιποειδική ρίζα προς σχηματισμό σταθερών προϊόντων, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο αναγεννώντας εκ νέου ρίζες (10,18).

Φαινολικές ενώσεις

Φυσικά αντιοξειδωτικά που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους. Δρουν αναστέλλοντας οξειδωτικά ένζυμα, δεσμεύοντας ιόντα μετάλλων ή παρέχοντας ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα τον τερματισμό αλυσιδωτών αντιδράσεων (16). Χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, τα λιγνάνια και τα φαινολικά οξέα (34,35). Μπορούν να εμφανίσουν και προ-οξειδωτικό χαρακτήρα (18).

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μεγάλη κατηγορία πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών-περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν προσδιοριστεί-που υπάρχουν σε αρκετά φρούτα, λαχανικά και ροφήματα όπως το τσάι και το κρασί. Χωρίζονται σε διάφορες ομάδες ανάλογα με τη χημική δομή τους όπως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες και οι ισοφλαβόνες (πίνακας 5). Επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν μία αρνητική σχέση μεταξύ της πρόσληψης

φλαβονοειδών και εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, ωστόσο, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για το μεταβολισμό τους και συνεπώς οποιαδήποτε συσχέτιση προφανώς οφείλεται σε συγχυτικούς παράγοντες (21).

Πίνακας 5: Ταξινόμηση φλαβονοειδών

Φλαβονοειδή	Φλαβονόλες	Φλαβανόλες	Φλαβόνες	Ισοφλαβόνες
Παραδείγματα	Κερκετίνη, καμφερόλη	Κατεχίνες	Απιγενίνη	Γενισταΐνη

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ όπως είναι η χημική της ονομασία, εμφανίζει αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Είναι υδρόφιλο αντιοξειδωτικό με υψηλή αναγωγική δύναμη και απομακρύνει τις ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου είτε άμεσα, παρέχοντας τους ηλεκτρόνια είτε έμμεσα, ανάγοντας τα ιόντα σιδήρου και χαλκού (18). Η ρίζα του ασκορβικού οξέος επαναφέρεται στην κανονική μορφή του από τη γλουταθειόνη και το NADH ή NADPH ενώ η ίδια η βιταμίνη C αναγεννά τη βιταμίνη E (εικόνα 8) (10,21,33,36)

Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Το δίκτυο άμυνας για την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών χωρίζεται στις ακόλουθες κατηγορίες (εικόνα 7 και πίνακας 6):

- 1^η γραμμή άμυνας: προληπτικά αντιοξειδωτικά, που καταστέλλουν το σχηματισμό των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου ανάγοντας για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα λιποειδικά υδροϋπεροξειδία σε νερό και λιποειδικά υδροξειδία, αντίστοιχα ή απομακρύνοντας μέσω χηλικών ενώσεων τα ιόντα μετάλλων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός.
- 2^η γραμμή άμυνας: αντιοξειδωτικά- εκκαθαριστές ριζών, που αναστέλλουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων και/ή διακόπτουν τη διάδοσή τους.
- 3^η γραμμή άμυνας: επιδιορθωτικά και de novo ένζυμα, που επιδιορθώνουν τη βλάβη και επαναφέρουν τις μεμβράνες στην αρχική τους κατάσταση.
- 4^η γραμμή άμυνας: προσαρμογή, υπό την έννοια του σχηματισμού των κατάλληλων αντιοξειδωτικών ενζύμων και της μεταφοράς τους στο σωστό σημείο, στο σωστό χρόνο και στη σωστή συγκέντρωση.

Πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός δεδομένων τα τελευταία χρόνια που αναγνωρίζουν τη δράση κάποιων αντιοξειδωτικών ως μεσολαβητές κυτταρικής σηματοδότησης στη ρύθμιση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενώσεων και των ενζύμων μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (σχήμα 5) (10,11,37).

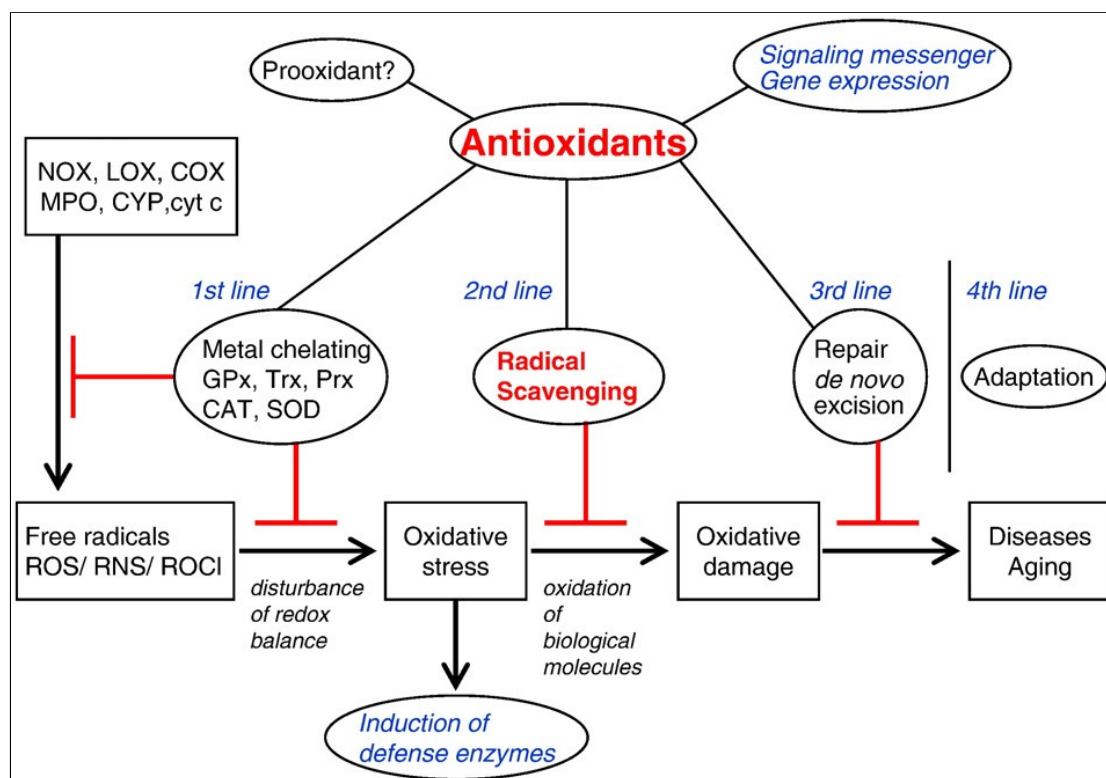
Πίνακας 6: In vivo αμυντικά συστήματα ενάντια στην οξειδωτική βλάβη (10)

I. Προληπτικά αντιοξειδωτικά	
a) Διάσπαση υδροϋπεροξειδίων και υπεροξειδίου του υδρογόνου χωρίς την εμπλοκή των ελεύθερων ριζών	
Καταλάση	Διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Κυτταρική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	Διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου και των υδροϋπεροξειδίων των ελεύθερων λιπαρών οξέων $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης πλάσματος	Διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου και των υδροϋπεροξειδίων των φωσφολιποειδών $\text{PLOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{PLOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που δρα στα φωσφολιπιδικά υδροϋπεροξειδία	Διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των φωσφολιποειδών
Υπεροξειδάση	Διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου και των υδροϋπεροξειδίων των λιποειδών $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{A}$
S-τρανσφεράση γλουταθειόνης	Διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των λιποειδών
b) Απομάκρυνση μετάλλου με σχηματισμό χηλικών ενώσεων	
Τρανσφερίνη, λακτοφερίνη	Απομάκρυνση του σιδήρου
Απτοσφαιρίνη	Απομάκρυνση της αιμοσφαιρίνης
Αιμοπηξίνη	Σταθεροποίηση της αίμης
Σερουλοπλασμίνη, αλβουμίνη	Απομάκρυνση του χαλκού
c) Απόσβεση ενεργών μορφών οξυγόνου	
Δισμουτάση υπεροξειδίου	Αποπρωτονίωση του υπεροξειδίου $2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

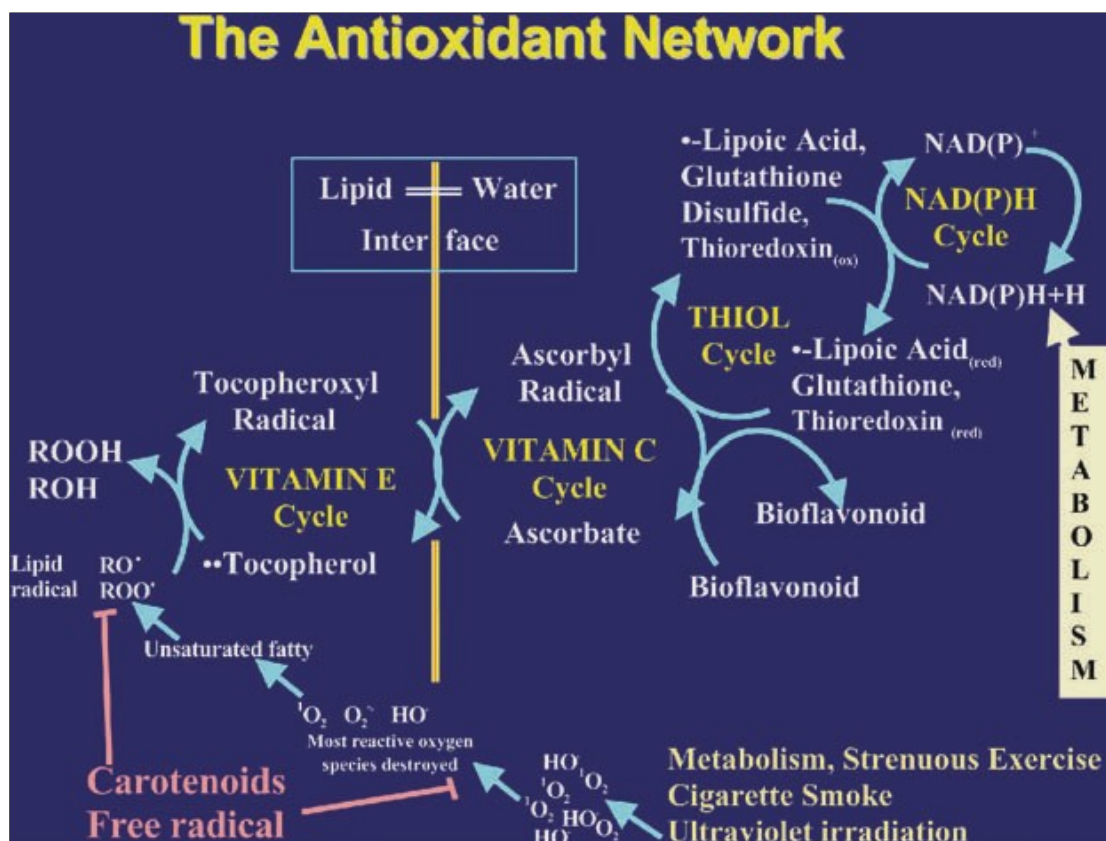
Καροτενοειδή, βιταμίνη E	Απομάκρυνση μονήρους οξυγόνου
II. Αντιοξειδωτικά- εκκαθαριστές ριζών	
Υδρόφιλα: βιταμίνη C, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, αλβουμίνη	
Λιπόφιλα: βιταμίνη E, ουβικινόλη, καροτενοειδή, φλαβονοειδή	
III. Επιδιορθωτικά και de novo ένζυμα	
Λιπάση, πρωτεάση, επιδιορθωτικά ένζυμα DNA, τρανσφεράση	
IV. Προσαρμογή	
Παραγωγή των κατάλληλων αντιοξειδωτικών ενζύμων και της μεταφοράς τους στο σωστό σημείο, στο σωστό χρόνο και στη σωστή συγκέντρωση	

Προ-οξειδωτική επίδραση των αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μόρια πέρα από την αντιοξειδωτική τους δράση μπορούν να λειτουργήσουν και ως προοξειδωτικοί παράγοντες. Η παραπάνω διαπίστωση αποτελεί το αποτέλεσμα *in vitro* ερευνών που μελέτησαν την επίδραση ισχυρών αντιοξειδωτικών (α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ, καροτένιο) στην έναρξη και επιτάχυνση οξειδωτικών διαδικασιών υπό κατάλληλες συνθήκες. Δεν είναι ακόμη κατανοητό, ωστόσο, αν η συγκεκριμένη παρατήρηση είναι σημαντική *in vivo*, καθώς υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών σε επίπεδο οργανισμού, που πιθανώς αποτρέπει τον προοξειδωτικό χαρακτήρα των ενώσεων αυτών (σχήμα 5) (10).



Εικόνα 7: Το δίκτυο άμυνας των αντιοξειδωτικών (37)



Εικόνα 8: Η αναγέννηση των αντιοξειδωτικών μορίων στο δίκτυο άμυνας των αντιοξειδωτικών (11)

Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιείται με εκτίμηση των επιπέδων των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων στον οργανισμό. Μπορεί να γίνει με άμεσες ή έμμεσες μεθόδους. Οι άμεσες μέθοδοι είναι δύσκολο να υλοποιηθούν λόγω προβλημάτων όπως ο μικρός χρόνος ημιζωής των ριζών και η έλλειψη ευαίσθητων μεθόδων εκτίμησης των χαμηλών συγκεντρώσεών τους στα κύτταρα. Γι' αυτό το λόγο, πραγματοποιούνται οι έμμεσες μέθοδοι που αφορούν στη μέτρηση άλλων συστατικών του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος όπως οι αντιοξειδωτικές ενώσεις, τα προϊόντα οξείδωσης των βιομορίων και η δραστηριότητα ή των ενζύμων που εμπλέκονται στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Η μέτρηση αυτών των δεικτών μπορεί να γίνει σε διάφορα βιολογικά δείγματα όπως στον ορό/πλάσμα, σε ομογενοποίημα κυτταρών του αίματος (λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα) ή ιστών, καθώς και στα ούρα (10).

Ένας βιολογικός δείκτης ορίζεται ως ένας δείκτης σε βιοχημικό, γενετικό ή κυτταρικό επίπεδο, που αντανakλά έκθεση σε κάποιο μίγμα, ευπάθεια σε μία ασθένεια ή την κατάσταση υγείας του υπό εξέταση ατόμου. Για παράδειγμα, ένας βιολογικός δείκτης οξειδωτικού στρες

αντανακλά τη φορτίο των ριζών (radical burden), την ευπάθεια σε κάποια οξειδωτική βλάβη και ασθένειες που επηρεάζονται από το οξειδωτικό στρες ή την κατάσταση της υγείας. (11)

Μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες αποτελούν ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα αντιδράσεων των ενεργών μορφών οξυγόνου με τα λιποειδή, τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες, το DNA και άλλα μόρια. Τα χαρακτηριστικά των μορίων που λειτουργούν ως δείκτες είναι ότι έχουν μακρύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από τις ROS και επομένως είναι καταλληλότερα για μέτρηση (10).

➤ Οξειδωτική βλάβη στο DNA

Η οξειδωτική βλάβη στο DNA μπορεί να προσδιοριστεί ex vivo με μέτρηση των τροποποιημένων βάσεων του DNA, οι οποίες προκύπτουν από την επίθεση ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου σε αυτό. Η 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG) αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιημένο δείκτη της οξειδωτικής βλάβης στο γενετικό υλικό καθώς εκκρίνεται στα ούρα. Επίσης, χρησιμοποιείται και η δοκιμασία COMET, όπου μέσω της ηλεκτροφόρησης του DNA ποσοτικοποιείται η βλάβη που έχει πραγματοποιηθεί στο γενετικό υλικό (μέτρηση «σπασμένων» νηματίων) (10,11).

➤ Οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες

Η μέτρηση της οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες βρίσκεται ακόμη σε αρχικό στάδιο. Ως βιολογικός δείκτης χρησιμοποιείται η νιτροτυροσίνη που αποτελεί το προϊόν της επίθεσης των ROS/RNS στην τυροσίνη (10). Εκτιμάται ανοσολογικά χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ηλεκτροχημική επισήμανση (HPLC-ECD). Ωστόσο, ο συγκεκριμένος δείκτης εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα που θέτουν υπό αμφισβήτηση την εγκυρότητά του. Η δοκιμασία του καρβονυλίου χρησιμοποιείται περισσότερο ως πιο ευαίσθητη μέθοδος, αν και είναι μη ειδική δοκιμασία. Βασίζεται στην αντίδραση των ROS με κατάλοιπα αμινοξέων στις πρωτεΐνες (ιδιαίτερα ιστιδίνη, αργινίνη, λυσίνη και προλίνη), με αποτέλεσμα να εμφανίζουν λειτουργίες καρβονυλίου οι οποίες μπορούν να μετρηθούν μετά από αντίδραση με τη 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνη χρησιμοποιώντας δοκιμασία ELISA (11).

➤ Οξειδωτική βλάβη στα λιποειδή

Η λιποειδική υπεροξειδωση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό συζευγμένων διενίων, λιποειδικών υδροϋπεροξειδίων και προϊόντων αποικοδόμησης όπως αλδεύδες και ισοπροστάνες.

Για την ποσοτική εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης στα λιποειδή χρησιμοποιείται ποικιλία μεθόδων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η δοκιμασία TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ), η οποία βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ του θειοβαρβιτουρικού οξέος και της μηλονυλο-διαλδεύδης, η δοκιμασία Ferrous Xylenol Orange (FOX), η μέτρηση των υδρογονανθράκων της αναπνοής, των ισοπροστανών και της οξείδωσης LDL ex vivo (10,11).

Φλεγμονή

Γενικά χαρακτηριστικά

Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία που ανήκει στα αμυντικά συστήματα του οργανισμού. Ενεργοποιείται κατά την εισβολή κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού στον οργανισμό ή κατά την καταστροφή ενός ιστού από τραυματισμό. Περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλών διαφορετικών τύπων κυττάρου και επάγει την παραγωγή μεγάλου αριθμού μεσολαβητών άλλα ενεργοποιείται και από αυτά.

Η φλεγμονώδης απόκριση περιγράφει το σύνολο των διεργασιών που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής. Συνήθως είναι καλά ρυθμιζόμενη από τον οργανισμό ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε βλάβη στον ξενιστή. Οι μηχανισμοί αρνητικής ανατροφοδότησης περιλαμβάνουν έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, αναστολή των προφλεγμονωδών καταρρακτών σηματοδότησης, μείωση των υποδοχέων των φλεγμονωδών μεσολαβητών και ενεργοποίηση των ρυθμιστικών κυττάρων. Η παθολογική φλεγμονή σχετίζεται με απώλεια της ανθεκτικότητας (tolerance) και των ρυθμιστικών διαδικασιών που προαναφέρθηκαν. Σε περίπτωση που υπάρχει εκτεταμένη φλεγμονή στον οργανισμό μπορεί να προκύψει ανεπανόρθωτη βλάβη στους ιστούς και κατ'επέκταση κάποια ασθένεια (18,33).

Κατάταξη

Η φλεγμονή κατατάσσεται σε οξεία και χρόνια, ανάλογα με το χρόνο διάρκειας και των ιστοπαθολογικών αλλαγών που παρατηρούνται.

Οξεία φλεγμονή

Πρόκειται για την αρχική φάση της φλεγμονής με άμεση έναρξη δράσης. Η οξεία φλεγμονώδης απόκριση είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη και διαρκεί σύντομο χρονικό διάστημα (ημέρες), λόγω της επίδρασης των μηχανισμών αρνητικής ανατροφοδότησης. Στη φάση αυτή, δρουν κυρίως τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα.

Χρόνια φλεγμονή

Σε περίπτωση που αποτύχει ο μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης, διαταράσσεται η ομοιοστασία του οργανισμού. Προκύπτει χρόνια φλεγμονή με μεγαλύτερη διάρκεια δράσης, σε επίπεδο ετών. Με αυτό τον τρόπο, σημειώνεται εξέλιξη στην πορεία της νόσου για διάφορες ασθένειες. Τυπικά χαρακτηριστικά της χρόνιας φλεγμονής είναι η απώλεια της λειτουργίας του φραγμού, ευαισθησία σε φυσιολογικά ερεθίσματα, διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων σε περιοχές που δεν συναντώνται συνήθως σε μεγάλες συγκεντρώσεις και υπερπαραγωγή οξειδωτικών μορίων, κυτταροκινών, χημειοκινών, εικοσανοειδών και μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (33). Τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα του αίματος που συμμετέχουν στη διαδικασία της χρόνιας φλεγμονής (18).

Επίσης, η φλεγμονή μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις τύπους, οι υποκείμενοι μηχανισμοί των οποίων επικαλύπτονται (33):

- Φλεγμονή που προέρχεται είτε από ενδογενή είτε από επίκτητη ανοσία ενάντια σε μολυσματικούς παράγοντες κατά την οποία ενεργοποιούνται κύτταρα και μεσολαβητές,
- Φλεγμονή που προκαλείται από εισπνεόμενους ερεθιστικούς παράγοντες όπως είναι το όζον,
- Αλλεργική φλεγμονή, όπου τα IgE αντισώματα προκαλούν την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διεργασίας
- Νευρογενής φλεγμονή, διαμεσολαβούμενη από το νευρικό σύστημα

Ενδείξεις φλεγμονής

Η ερυθρότητα, η αύξηση της θερμότητας, το οίδημα, ο πόνος και η απώλεια λειτουργικότητας αποτελούν τις κύριες ενδείξεις της φλεγμονής. Οι ενδείξεις αυτές είναι αποτέλεσμα των παρακάτω γεγονότων που εκδηλώνονται μετά την ιστική βλάβη:

- Αύξημένη παροχή αίματος στην περιοχή της βλάβης: η διαδικασία αυτή διευκολύνεται από την αγγειοδιαστολή που σημειώνεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, με αποτέλεσμα την αύξηση του παρεχόμενου όγκου του αίματος και της ταχύτητας ροής του. Η ερυθρότητα και η αύξηση της θερμότητας οφείλεται στην αύξηση του όγκου του αίματος.
- Αύξηση διαπερατότητας τριχοειδών: συστέλλονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλείται διαρροή υγρού από τα αιμοφόρα τριχοειδή αγγεία. Το υγρό αυτό συσσωρεύεται στην περιοχή του ιστού και προκύπτει το οίδημα. Επίσης, δίνεται η

δυνατότητα σε μεγάλα μόρια να διαπεράσουν το ενδοθήλιο, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο ορισμένους μεσολαβητές στον τόπο της φλεγμονής.

- Μετανάστευση λευκοκυττάρων: η αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων, η έκκριση χημειοελκτικών μορίων από τη φλεγμαίνουσα περιοχή και η ενεργοποίηση των μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο διευκολύνει τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της βλάβης. Ο ρόλος των λευκοκυττάρων είναι η φαγοκυττάρωση των βακτηρίων και των κατεστραμμένων κυττάρων του ιστού.
- Απελευθέρωση μεσολαβητών από τα λευκοκύτταρα στη φλεγμαίνουσα περιοχή: οι μεσολαβητές αυτοί μπορεί να είναι λιποειδικά και πρωτεϊνικά μόρια, ενεργές μορφές οξυγόνου, παράγωγα των αμινοξέων όπως είναι η ισταμίνη και ένζυμα (πρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας). Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες μπορούν να ενισχύσουν τη φλεγμονώδη διαδικασία λειτουργώντας για παράδειγμα, ως χημειοελκτικά μόρια (18,33).

Μεσολαβητές φλεγμονής

Οι μεσολαβητές της φλεγμονής εκκρίνονται είτε από κύτταρα που παίρνουν μέρος στη διαδικασία της φλεγμονής τοπικά είτε από μικροοργανισμούς που έχουν εισβάλλει στον οργανισμό και έχουν προκαλέσει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες οξείας φάσης, η ισταμίνη, οι κινίνες, τα ένζυμα του συστήματος πήξης, οι ελεύθερες ρίζες, οι κυτταροκίνες, τα εικοσανοειδή και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF).

• ***Κυτταροκίνες***

Μόρια - σήματα του οργανισμού με παρακρινή, ενδοκρινή και αυτοκρινή δράση. Παράγονται από ποικιλία κυττάρων και δρουν δεσμευόμενα σε ειδικούς υποδοχείς. Για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης απαιτούνται πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Χωρίζονται σε τέσσερις οικογένειες: τις αιμοποιητίνες, τις ιντερφερόνες (INF), τις χημειοκίνες και τους παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNF). Εμφανίζουν συνδυασμένη δράση και καθεμία από αυτές οδηγεί στην παραγωγή κάποιας άλλης κυτταροκίνης. Κυτταροκίνες με σημαντική δράση στη φλεγμονώδη διαδικασία, οξεία και χρόνια, είναι η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), ο TNF-α και η INF-γ. Οι χημειοκίνες, τέλος, είναι υπεύθυνες για τη χημειοταξία και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο (18).

• ***Πρωτεΐνες οξείας φάσης***

Αποτελούν τους πρωτεϊνικούς μεσολαβητές της φλεγμονής με το όνομά τους να υποδηλώνει την ταχύτατη αυξομείωση των επιπέδων τους σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής. Οι κυτταροκίνες είναι τα μόρια που δίνουν το σήμα για την παραγωγή τους. Παραδείγματα πρωτεϊνών οξείας φάσης είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), το αμυλοειδές Α και το ινωδογόνο (18).

- **Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης**

Είναι ειδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και συντονίζουν την κυλιόμενη κίνηση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Χωρίζονται σε σελεκτίνες, μόρια προσκόλλησης τύπου μουκίνης, ιντεγκρίνες και, τέλος, την υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών (πίνακας 7).

Πίνακας 7: Παραδείγματα μορίων της υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών

ICAM-1	ICAM-2	VCAM-1	MadCAM
Αυξάνεται σε απόκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών	Εκφράζεται συνεχώς σε χαμηλά επίπεδα	Αυξάνεται σε απόκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών	Ανιχνεύεται σε περιοχές χρόνιας φλεγμονής
Προσδένονται στην ιντεγκρίνη LFA-1	Προσδένονται στην ιντεγκρίνη LFA-1		

- **Λιποειδικοί μεσολαβητές**

Τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα) επάγουν την κινητοποίηση και διάσπαση των φωσφολιποειδών της μεμβράνης σε αραχιδονικό οξύ και λυσο-φωσφολιποειδή. Ο λυσο-PAF αποτελεί ένα λυσο-φωσφολιποειδές που μετατρέπεται στη συνέχεια σε PAF. Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται σε εικοσανοειδή (προσταγλανδίνες, θρομβοξανία και λευκοτριένια).

Εικοσανοειδή

Εκδηλώνουν διάφορες δράσεις, όπως αγγειοδιαστολή, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, χημειοταξία, σύσπαση λείων μυικών κυττάρων (πίνακας 8). Παραδείγματα αποτελούν τα λευκοτριένια B₄ και D₄ και η προσταγλανδίνη E₂.

Πίνακας 8: Δράση εικοσανοειδών

LTB ₄	PGE ₂	LTD ₄
Χημειοταξία ουδετερόφιλων	Αγγειοδιαστολή	Σύσπαση των λείων μυικών κυττάρων
Αύξηση αγγειακής διαπερατότητας (συνδιασμένη δράση)		Αύξηση αγγειακής διαπερατότητας

Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)

Ο PAF είναι σημαντικός εκπρόσωπος των γλυκεριναιθερικών λιποειδών (αιθερικός δεσμός στη θέση 1 του φωσφολιποειδούς) και η χημική του ονομασία είναι 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη. Είναι ένα ισχυρό μοριακό σήμα, με αυτοκρινή, ενδοκρινή και παρακρινή δράση. Οι φυσιολογικές του δράσεις σχετίζονται με την αιμόσταση, την αγγειακή ομοιοστασία, την αναπαραγωγή και τη λειτουργία των νεφρών ενώ κατέχει ιδιαίτερη θέση στην παθοφυσιολογία καταστάσεων όπως η φλεγμονή, η αλλεργική απάντηση και η αθηροσκλήρυνση (38). Αν και είναι δύσκολο να δηλωθούν φυσιολογικά επίπεδα για τον PAF εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης που παρουσιάζουν ενδεικτικά αναφέρεται ότι θα πρέπει να διατηρούνται σε επίπεδο 54 ± 40 pg/mL στο αίμα φυσιολογικών ατόμων ώστε να διατηρηθεί η ομοιοστατική λειτουργία του (39).

Δεν αποτελεί ένα μόνο μόριο αλλά μία οικογένεια μορίων. Η οικογένεια του PAF περιλαμβάνει τμήματα φωσφατιδυλο-χολινών που έχουν διασπαστεί οξειδωτικά και αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς του PAF καθώς έχουν παρόμοια δομή με τον PAF. Τα μόρια αυτά είναι γνωστά με τον όρο «PAF –like lipids» δηλαδή λιποειδή που μοιάζουν δομικά στον PAF. Ωστόσο, επειδή πολλά μόρια που εμφανίζουν ίδια δράση με τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων δεν σχετίζονται δομικά με αυτόν, ο όρος «PAF –like activity lipids» φαίνεται να είναι πιο ακριβής (3). Οι διαφορές στη δομή των μορίων PAF μπορεί να οφείλονται στο είδος του δεσμού που σχηματίζουν τα φωσφολιποειδή (εστερικός, αιθερικός, βινυλαιθερικός), στο μήκος της αλυσίδας και στο βαθμό εστεροποίησης των λιπαρών οξέων. Παρόμοια δράση με τον PAF στη φλεγμονώδη διαδικασία εμφανίζουν τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή, που παράγονται παράλληλα με αυτόν κατά τη μη ενζυμική οξείδωση των λιπαρών οξέων στα φωσφολιποειδή, κυρίως της λιποπρωτεΐνης LDL (18, 38).

Αποτελεί το συνδετικό κρίκο των μεσολαβητών της φλεγμονής και δρα ως συντονιστής και ενισχυτής της απάντησης κυττάρων και ιστών σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, είτε φυσιολογικής είτε παθολογικής προέλευσης. Συντίθεται από διάφορους τύπους κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση (αιμοπετάλια, μονοκύτταρα, μακροφάγα, αφρώδη κύτταρα και ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα) και επιδρά με ποικίλες δράσεις στα ίδια κύτταρα και ιστούς από τους οποίους δημιουργήθηκε προκαλώντας εκ νέου την παραγωγή του. Πρόκειται, δηλαδή, για μία αμφίδρομη σχέση μεταξύ του PAF και των άλλων εμπλεκόμενων μορίων της φλεγμονής (18).

Ο υποδοχέας του PAF ανήκει στην υπερικογενεία των επτα διαμεμβρανικών υποδοχέων και συνδέεται με τις γουανινο-νουκλεοτιδοδεσμεύουσες πρωτεΐνες (G- πρωτεΐνες). Βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αλλά υπάρχουν αναφορές που αναφέρουν την παρουσία της και στην αντίστοιχη πυρηνική και περιλαμβάνει ποικιλία δράσεων όπως η ενδοκυτταρική σηματοδότηση, φωσφορυλίωση πρωτεϊνών κ.ά. (3,38,40). Ο PAF εμφανίζει διαφορετικές δράσεις στα διάφορα κύτταρα που επιδρά, ενεργοποιώντας διαφορετικές υπομονάδες της G-πρωτεΐνης του υποδοχέα του, ανάλογα με το κύτταρο που συνδέεται (41) ενώ για την εκδήλωση της δράσης του απαιτούνται πολύ μικρές συγκεντρώσεις (επίπεδο pmolar) (42).

Η διατήρηση των επιπέδων του PAF στο αίμα σε φυσιολογικά όρια επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του ενζύμου PAF-ακετυλυδρολάση, της ύπαρξης αντιοξειδωτικών μορίων και της παρουσίας ενδογενών ή εξωγενών ανταγωνιστών του PAF (3,38).

Ανταγωνιστές PAF

Οι ανταγωνιστές του PAF χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα φυσικά προϊόντα, τα συνθετικά δομικά ανάλογα του PAF και άλλες τεχνητές ενώσεις. Χαρακτηριστικά περαδείγματα φυσικών ανταγωνιστών είναι το τερπενοειδές BN52021, που απομονώνεται από τα φύλλα του *Ginkgo Biloba* και η κατζουρενόνη, μία βενζοφουρανοειδική νεολιγνάνη που απομονώνεται το *Piper futokadsurae*. Επίσης αρκετά συστατικά τροφίμων της Μεσογειακής διατροφής όπως το κρασί και το ελαιόλαδο έχει βρεθεί ότι αναστέλουν τις δράσεις του PAF (38).

Μεταβολισμός PAF

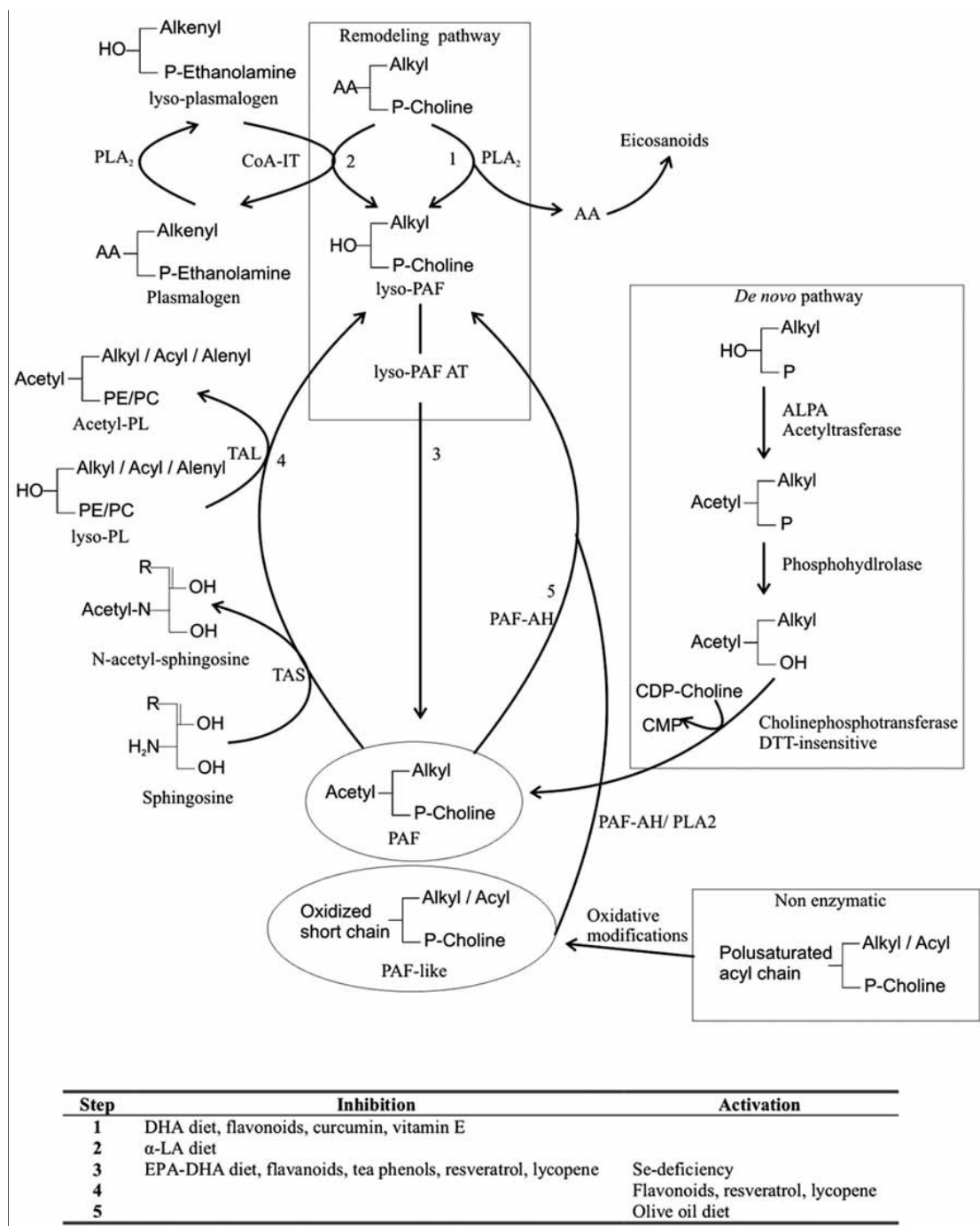
ο Βιοσύνθεση

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων παράγεται μέσω δύο ενζυμικών πορειών: την de novo πορεία και την πορεία ανασχηματισμού (εικόνα 9). Στην πρώτη περίπτωση, περιλαμβάνεται η ακετυλίωση και ακολούθως η αποφωσφορυλίωση του 1-O-αλκυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος. Η 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλη που προκύπτει από τις

παραπάνω αντιδράσεις μετατρέπεται σε PAF από το ένζυμο PAF-χολινوترανσφεράση (PAF-CPT).

Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση σημειώνεται μία δομική τροποποίηση προϋπάρχοντων φωσφολιποειδών- δομικών συστατικών των μεμβρανών-που περιέχουν αιθερικούς δεσμούς και χολίνη στο μόριό τους, γι'αυτό και η ονομασία «πορεία ανασχηματισμού». Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι ακόλουθες: υδρόλυση της ακυλομάδας που βρίσκεται στη θέση sn-2 των μεμβρανικών φωσφολιποειδών από το ένζυμο φωσφολιπάση A_2 και μεταφορά μιας ακετυλομάδας από το ακετυλο-συνένζυμο A (ακετυλο-CoA) στα λυσο-φωσφολιποειδή που προκύπτουν από την πρώτη αντίδραση. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση. Η αντίδραση σχηματισμού του λυσο- PAF μπορεί να προκύψει, επίσης, μέσω τρανσακυλίωσης ανεξάρτητης του συνενζύμου A. Και στις δύο περιπτώσεις- μεταφορά ακετυλομάδας και τρανσακυλίωση-απελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ, το οποίο συμμετέχει στη σύνθεση εικοσανοειδών που δρουν ως ισχυροί βιοδραστικοί μεσολαβητές.

Οι δύο τρόποι βιοσύνθεσης του PAF συνυπάρχουν μέσα στο κύτταρο. Ωστόσο, πιστεύεται ότι η de novo πορεία υπερισχύει σε φυσιολογικές καταστάσεις (διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων PAF στο αίμα και τους ιστούς), ενώ η ανακατασκευαστική πορεία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις (φλεγμονώδεις δράσεις) (38).



Εικόνα 9: Βιοσύνθεση και καταβολισμός του PAF (38)

ο Καταβολισμός

Το σημαντικότερο ένζυμο για την απομάκρυνση του PAF είναι η ακετυλδωρολάση που ειδικεύεται στον PAF (PAF-AH). Το ένζυμο αυτό διασπά την ακυλομάδα στη θέση sn-2 με αποτέλεσμα το σχηματισμό του βιολογικά αδρανούς λυσο- PAF (εικόνα 9) (38). Περισσότερες λεπτομέρειες για την PAF-AH θα αναφερθούν στο κεφάλαιο 2.

Ενζυμικά συστήματα φλεγμονής

Το σύστημα του συμπληρώματος, της κινίνης, της πήξης και της ινωδόλυσης αποτελούν τα τέσσερα ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής.

- ***Σύστημα συμπληρώματος***

Αποτελεί συστατικό της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού. Περιέχει περισσότερες από 30 πρωτεΐνες, διαλυτές ή ενωμένες σε κύτταρα. Η ενεργοποίησή του έχει ως αποτέλεσμα μία αλληλουχία γεγονότων που καταλήγουν στη ρύθμιση ανοσολογικών λειτουργιών όπως και στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης.

- ***Σύστημα κινινών***

Καταρράκτης ενζυμικών αντιδράσεων, που καταλήγει στο σχηματισμό της βραδυκινίνης και της καλλιδίνης. Η βραδυκινίνη είναι ισχυρός φλεγμονώδης μεσολαβητής με ποικίλες φλεγμονώδεις δράσεις όπως επαγωγή της αγγειοδιαστολής, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, σύσπαση των λείων μυικών κυττάρων και συμβολή στην αίσθηση του πόνου.

- ***Σύστημα πήξης-ινωδόλυσης***

Καταρράκτης ενζυμικών αντιδράσεων που ενεργοποιείται από τον τραυματισμό των αιμοφόρων αγγείων με σκοπό την παραγωγή της θρομβίνης. Η θρομβίνη επάγει τη δημιουργία του θρόμβου, ο οποίος περιορίζει τη φλεγμονή. Η απομάκρυνση του θρόμβου πραγματοποιείται με το σύστημα ινωδόλυσης και συγκεκριμένα με το πρωτεολυτικό ένζυμο πλασμίνη, το οποίο επάγει την ενεργοποίηση της κλασικής οδού του συμπληρώματος ενώ τα προϊόντα διάσπασής του ενζύμου εμφανίζουν χημειοτακτικές ιδιότητες για τα φαγοκύτταρα (18).

Μετανάστευση λευκοκυττάρων στους ιστούς

Τα λευκοκύτταρα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φτάνουν στην περιοχή της βλάβης για να συμμετάσχουν στη φλεγμονώδη διαδικασία. Στην πορεία τους αυτή χρειάζεται να αντιμετωπίσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν ρυθμιστικό ρόλο λειτουργώντας ως φραγμός στη μετακίνηση μακρομορίων και λευκοκυττάρων από το αίμα στους ιστούς. Η εξαγγείωση αποτελεί τη διαδικασία εισόδου και εγκατάστασης των λευκοκυττάρων στους ιστούς. Τα επιμέρους βήματα που απαιτούνται για να πραγματοποιηθεί η μετανάστευση είναι η επιβράδυνση ή κυλιόμενη κίνηση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, η προσκόλλησή τους σε αυτό, η διαπίδυσή τους στον υποενδοθηλιακό χώρο και η εισόδός τους στον ιστό, στη φλεγμαίνουσα περιοχή μέσω χημειοταξίας.

Για να πραγματοποιηθεί η μετανάστευση των λευκοκυττάρων στους ιστούς, ενεργοποιείται αρχικά το ενδοθήλιο μέσω πληθώρας χημειοτακτικών παραγόντων-για παράδειγμα αναφέρονται οι χημειοκίνες, οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος και ο PAF- με δράσεις όπως αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και ενίσχυση της σύνδεσής τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στη συνέχεια επιδρούν τα μόρια προσκόλλησης PECAM για τη διαπίδυσή τους στον υπενδοθηλιακό χώρο ενώ η διαδικασία της μετανάστευσης ολοκληρώνεται με την αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας και με τα κύτταρα των ιστών όπως και με τη μεταφορά τους μέσω χημειοταξίας στην περιοχή της βλάβης (18).

Τερματισμός φλεγμονής

Η ρύθμιση της φλεγμονώδους διεργασίας είναι αναγκαία προς αποφυγή δυσάρεστων, παθολογικών καταστάσεων. Οι παράγοντες που συνεισφέρουν στον τερματισμό της φλεγμονής είναι ο μικρός χρόνος ημιζωής των μεσολαβητών της φλεγμονής, η παραγωγή αντι-φλεγμονωδών μεσολαβητών καθώς και η αναστολή της δράσης των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών (18).

Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή στην καρδιαγγειακή νόσο

Αθηροσκλήρυνση: Μια φλεγμονώδης διαδικασία με προεκτάσεις οξειδωτικού στρες

Η αθηροσκλήρυνση χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αθηρωματικών αλλοιώσεων που προκαλούν διεύρυνση στον εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών. Οι αλλοιώσεις αυτές περιέχουν λιποειδή σε διάφορες ποσότητες και τύπους, συνδετικό ιστό, φλεγμονώδη κύτταρα και άλλα εξωκυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, ένζυμα και εναποθέσεις ασβεστίου (6). Δηλαδή, η αθηροσκλήρυνση δεν αποτελεί απλώς μία συσσώρευση λιποειδικών μορίων στο αρτηριακό τοίχωμα αλλά αντιπροσωπεύει μία σειρά κυτταρικών και μοριακών αποκρίσεων που ορίζουν τη φλεγμονώδη διαδικασία (5). Η θρόμβωση, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (43) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της συγκεκριμένης κατάστασης και μπορούν να ενοποιηθούν υπό το πρίσμα ενός κοινού μοριακού μηχανισμού που διευθύνεται από τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (3).

Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο PAF αποτελεί τον ισχυρότερο λιποειδικό μεσολαβητή της φλεγμονής. Συμβάλλει στην αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και στην προσέλκυση κυττάρων του αίματος σε αυτό με την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως σελεκτίνες και ιντεγκρίνες, συμμετέχει στις θρομβωτικές διαδικασίες, επάγει την απελευθέρωση ενεργών μορφών οξυγόνου (44) ενώ παράγεται κατά τη διάρκεια αλλά και συνεισφέρει στην

οξείδωση της LDL (3,40). Στη συνέχεια, περιγράφεται η διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης με ιδιαίτερη έμφαση στο ρόλο του PAF.

Η αθηροσκλήρυνση μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια: το σχηματισμό λιπώδους γράμμωσης, την ανάπτυξη ινώδους πλάκας και τη θρόμβωση. Τα επιμέρους στοιχεία κάθε σταδίου παρατίθενται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: Στάδια αθηροσκλήρυνσης (43)

Λιπώδης γράμμωση
A. Αυξημένη είσοδος μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα
▪ Αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα: P-σελεκτίνη, VCAM-1 ▪ Αυξημένη παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων για τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα: MCP-1 ▪ Αύξηση παραγόντων διαφοροποίησης των μονοκυττάρων: M-CSF, IL-8
B. Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων
▪ Σχηματισμός τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών που συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα στα μακροφάγα ▪ Πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών αυτών από εκκαθαριστές-υποδοχείς των μακροφάγων ▪ Μειωμένη απελευθέρωση χοληστερόλης από τα μακροφάγα
Ινώδης πλάκα
▪ Αυξημένος πολλαπλασιασμός και χημειοταξία λείων μυικών κυττάρων ▪ Ρήξη βασικής μεμβράνης ▪ Αυξημένη σύνθεση θεμέλιας ουσίας από τα λεία μυικά κύτταρα ▪ Θάνατος αφρωδών κυττάρων από νέκρωση και απόπτωση και σχηματισμός νεκρωτικού πυρήνα
Θρόμβωση
A. Αύξηση των προθρομβωτικών ιδιοτήτων των ενδοθηλιακών κυττάρων
B. Αυξημένη έκφραση λείων μυικών κυττάρων και μακροφάγων από προθρομβωτικά μόρια
Γ. Διάσπαση της θεμέλιας ουσίας του αγγειακού τοιχώματος
Δ. Ρήξη του αγγειακού τοιχώματος

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου θεωρείται το αρχικό στάδιο της αθηροσκλήρυνσης. Συνίσταται σε ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από βλάβη του ενδοθηλίου (7).

Πιθανά αίτια δημιουργίας βλάβης είναι τα υψηλά επίπεδα-κυρίως τροποποιημένης- LDL χοληστερόλης, οι προερχόμενες από τον καπνό του τσιγάρου ελεύθερες ρίζες, η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης, οι γενετικές διαφοροποιήσεις, οι αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης πλάσματος, οι λοιμώδεις μικροοργανισμοί και συνδυασμός αυτών μεταξύ τους ή με άλλους παράγοντες (5).

Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου προκαλεί αντισταθμιστικές αντιδράσεις που τροποποιούν τις φυσιολογικές, ομοιοστατικές ιδιότητές του. Αυξάνεται η διαπερατότητά του, γεγονός που συμβάλλει στην είσοδο αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στον υπενδοθηλιακό χώρο, σημειώνεται έκφραση μορίων πρόσφυσης (P-σελεκτίνη, E-σελεκτίνη), που διευκολύνουν, μέσω της σύνδεσής τους σε αυτά, την είσοδο φλεγμονωδών κυττάρων (45), λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων από τον αυλό του αγγείου στον έσω χιτώνα, επάγεται η έκφραση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (41) ενώ εμφανίζεται και μειωμένη ικανότητα αγγειοχάλασης.

Φυσιολογικά, το ενδοθήλιο παράγει τόσο αγγειοδιασταλτικούς (NO, προστακυκλίνη και βραδυκίνη) όσο και αγγειοσυσπαστικούς παράγοντες (ενδοθηλίνη). Όταν διαταραχθεί η ισορροπία μεταξύ των συγκεκριμένων παραγόντων δημιουργούνται κατάλληλες προϋποθέσεις για την έναρξη της αθηροσκληρυντικής διαδικασίας. Επίσης, το τραυματισμένο ενδοθήλιο εμφανίζει προθρομβωτικές ιδιότητες και επάγει το σχηματισμό μορίων που επιδρούν στα αιμοφόρα αγγεία, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (5,7).

Μία λιποπρωτεΐνη αποτελείται από σύμπλοκες ενώσεις μεταξύ λιποειδών και πρωτεϊνών (απο-λιποπρωτεΐνες). Η LDL περιλαμβάνει εστέρες χοληστερόλης, φωσφολιποειδή, τριγλυκερίδια και χοληστερόλη στο λιποειδικό τμήμα της και την αποπρωτεΐνη B-100 στο πρωτεϊνικό κομμάτι (18). Τα φωσφολιποειδή με πολυακόρεστη ακυλομάδα στην sn-2 θέση εμφανίζονται αρκετά συχνά στα λιποπρωτεϊνικά μόρια, γεγονός που τα καθιστά ευάλωτα στη δράση των ελευθέρων ριζών που κυκλοφορούν στον οργανισμό (46). Η οξειδωτική τροποποίηση στο λιποειδικό τμήμα των λιποπρωτεϊνών και κυρίως στη φωσφατιδυλοχολίνη με αιθερικό δεσμό στη θέση sn-1, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μορίων που δρουν σαν ισχυροί φλεγμονώδεις μεσολαβητές με δράση όμοια με αυτή του PAF (47), ενώ πιστεύεται ότι αυτά τα μόρια και ο PAF συνεισφέρουν στη φλεγμονώδη δραστηριότητα των οξειδωμένων μορίων LDL (41).

Η φλεγμονώδης διαδικασία κατά την αθηροσκλήρυνση εμφανίζεται αρχικά στο σημείο της διήθησης των λευκοκυττάρων και των λιποπρωτεϊνών στο εσωτερικό τμήμα της αρτηρίας μετά τον τραυματισμό του ενδοθηλίου, με την έκφραση των μορίων πρόσφυσης και του PAF. Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και τα όμοιά του λιποειδή απελευθερώνουν ενεργές μορφές οξυγόνου που προκαλούν την οξείδωση της LDL (38). Τα σωματίδια της LDL

υφίστανται οξείδωση στο αρτηριακό τοίχωμα αλλά και στην κυκλοφορία του αίματος όταν η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού είναι ελλιπής ή δεν λαμβάνονται αρκετά αντιοξειδωτικά από τη διατροφή. Η είσοδος της LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο, που προκύπτει από τη σύνδεσή της με τις πρωτεογλυκάνες των ενδοθηλιακών κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική οξείδωσή της από ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, διάφορες ελεύθερες ρίζες ή οξειδωτικά ένζυμα όπως η λιποξυγενάση, η μυελοπεροξειδάση κ.ά. (48, 49) ενώ κύτταρα που επίσης προάγουν οξειδωτικές τροποποιήσεις είναι τα μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (40). Εκτός από την οξείδωση της, η τροποποίηση του μορίου της μπορεί να προκύψει από γλυκοζυλίωση, υδρόλυση, πρωτεόλυση ή άλλους μηχανισμούς (5,7). Ιδιαίτερα αθηρογόνες πιστεύεται ότι είναι οι μικρές πυκνές LDL, κυρίαρχες σε άτομα με αντίσταση στην ινσουλίνη, υψηλή συγκέντρωση τριγλυκεριδίων και χαμηλή συγκέντρωση HDL (7).

Η τροποποιημένη LDL έχει χημειοτακτικές ιδιότητες έλκοντας στην περιοχή άλλα μονοκύτταρα και ενεργοποιώντας την έκφραση των γονιδίων μορίων πρόσφυσης των λευκοκυττάρων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (5). Επιπλέον, η οξειδωμένη LDL μπορεί να αναστείλει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου, να ενεργοποιήσει τον παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ και να εμφανίσει ποικιλία άλλων δράσεων (πίνακας 10) (47, 50). Με αυτό τον τρόπο, επεκτείνεται η φλεγμονώδης απόκριση καθώς ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η αντιγραφή των μακροφάγων και η είσοδος νέων μονοκυττάρων στην περιοχή της βλάβης (7).

Πίνακας 10: Πιθανοί μηχανισμοί επίδρασης της οξειδωμένης LDL και των προϊόντων της (οξειδωμένα φωσφολιποειδή) στην αθηρογένεση (50)

- Προσλαμβάνεται άμεσα από τα μακροφάγα επάγοντας το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.
- Έλκει στην περιοχή μονοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα ενώ αναστέλλει και την κινητικότητα των μακροφάγων που βρίσκονται στον υπενδοθηλιακό χώρο.
- Επάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των μακροφάγων.
- Τροποποιεί την έκφραση γονιδίων των αγγειακών κυττάρων, επάγοντας την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών (IL-1, MCP-1 κ.ά.) και μορίων προσκόλλησης.
- Οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των εκκαθαριστών-υποδοχέων στα μακροφάγα, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο, την πρόσληψή της από αυτά.
- Ενισχύει την άμυνα του οργανισμού με την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

- Η οξείδωση καθιστά την LDL πιο ευπαθή στη συσσώρευση των μορίων της στον υπενδοθηλιακό χώρο και συνεπώς στην αυξημένη πρόσληψη από τα μακροφάγα.
- Ενισχύει τις προθρομβωτικές πορείες με την επαγωγή του παράγοντα των ιστών και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων.
- Επιδρά στις αγγειοκινητικές ιδιότητες της αρτηρίας.

Ο PAF συμβάλλει στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα αιμοπετάλια προσδένονται σε μόρια κυτταρικής προσκόλλησης των κυττάρων στο σημείο του τραυματισμένου ενδοθηλίου, όπως είναι η P-σελεκτίνη και ο παράγοντας von Willebrand (vWF), σχηματίζοντας την κατάλληλη επιφάνεια για την είσοδο μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα. Η πρόσδεση των μονοκυττάρων στα αιμοπετάλια προκαλεί αμοιβαία ενεργοποίηση των δύο μορίων: τα αιμοπετάλια συνθέτουν και εκκρίνουν μεσολαβητές, μεταξύ των οποίων ενεργές μορφές οξυγόνου και MCP-1. Ο PAF επιδρά και στα δύο είδη κυττάρων ενισχύοντας την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων (3). Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων οδηγεί στη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό μονοκυττάρων και λείων μυικών κυττάρων, προωθώντας το σχηματισμό του αθηρώματος (51).

Τα μονοκύτταρα που εισέρχονται στον έσω χιτώνα μετατρέπονται σε μακροφάγα. Αρχικά, τα μόρια αυτά, δρουν προστατευτικά, απομακρύνοντας την LDL, τροποποιημένη και μη. Στην περίπτωση της τροποποιημένης μορφής, μειώνεται με αυτό τον τρόπο την επίδραση που ασκεί στο ενδοθήλιο και στα λεία μυικά κύτταρα. Τα μακροφάγα εκφράζουν στην επιφάνειά τους εκκαθαριστές υποδοχείς (“scavenger” υποδοχείς) μετά από τη δράση παραγόντων φλεγμονής όπως η ιντερφερόνη γ και ο TNF α . Η οξειδωμένη LDL δεν αναγνωρίζεται από τους LDL υποδοχείς αλλά ενεργοποιούν τους εκκαθαριστές υποδοχείς και εισέρχονται μέσω αυτών στα μακροφάγα (48). Η είσοδος της οξειδωμένης LDL σε αυτά προκαλεί το σχηματισμό λιποειδικών υπεροξειδίων που διευκολύνουν τη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης, σχηματίζοντας αφρώδη κύτταρα (5, 7). Η πρόσληψη της φυσιολογικής LDL γίνεται με βραδύτερο ρυθμό από τα μακροφάγα σε σχέση με την οξειδωμένη μορφή και έτσι ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων επιβραδύνεται (40). Επίσης, η συσσώρευση λιποειδικών μορίων ενδο- και εξω-κυτταρικά οδηγεί στο σχηματισμό των λιπωδών γραμμώσεων (πρωταρχικές αθηρωματικές αλλοιώσεις) (7).

Η αθηρωματική πλάκα, που σχηματίζεται στη συνέχεια, χαρακτηρίζεται από συσσωρευμένα λιποειδή εντός και εκτός των μακροφάγων, νέκρωση και απόπτωση των αφρωδών κυττάρων, παρουσία παραγόντων φλεγμονής και λείων μυικών κυττάρων (7). Σε περίπτωση που συνεχιστούν οι παραπάνω αντισταθμιστικές αντιδράσεις επέρχεται πάχυνση του αρτηριακού

τοιχώματος, το οποίο διαστέλλεται διαδοχικά. Η αθηρωματική πλάκα, αποτελείται από έναν πυρήνα πλούσιο σε λιποειδή που περιβάλλεται από ινώδη ιστό, την ινώδη κάψα (5). Ανάλογα με παράγοντες όπως το μέγεθος του λιποειδικού πυρήνα και η παρουσία φλεγμονωδών στοιχείων, μπορεί να επέρθει ρήξη και θρόμβωση της αθηρωματικής πλάκας οδηγώντας σε οξεία καρδιαγγειακά επεισόδια (7).

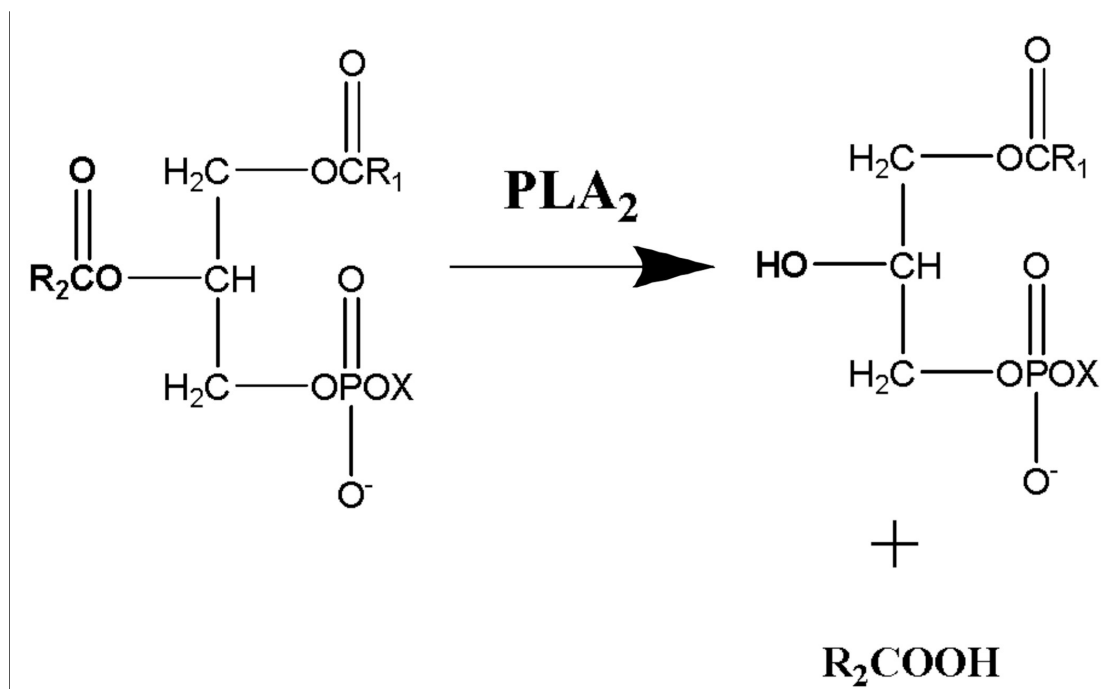
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η LP-PLA₂ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Φωσφολιπάσες

Οι φωσφολιπάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τα γλυκερινικά φωσφολιποειδή. Βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες ή και σε άλλες δομές όπως τα λυσοσωμάτια. Διακρίνονται σε πέντε τύπους ανάλογα με τη θέση του εστερικού δεσμού που υδρολύουν, εμφανίζουν δηλαδή εξειδίκευση για το συγκεκριμένο σημείο. Οι φωσφολιπάσες αυτές είναι οι ακόλουθες: φωσφολιπάση A₁, A₂, B, C και D (18).

Φωσφολιπάσες A₂

Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A₂ (PLA₂) αποτελείται από αρκετές διαφορετικές ομάδες ενζύμων, που υδρολύουν τον εστερικό δεσμό στη θέση sn-2 σε διάφορα φωσφολιποειδή (εικόνα 10). Για την ταξινόμησή τους καθιερώθηκε το 1994 ένα σύστημα αρίθμησης σε ομάδες, το οποίο ανανεώνεται συνεχώς με την ανακάλυψη νέων ενζύμων της ομάδας PLA₂. Οι πέντε κύριοι τύποι ενζύμων της PLA₂ είναι η εκκρινόμενη sPLA₂, η κυτοσολική cPLA₂, η ανεξάρτητη του ασβεστίου iPLA₂, η PAF-ακετυλυδρολάση (PAF-AH) και η λυσοσωμιακή PLA₂ (52,53).



Εικόνα 10: Η αντίδραση που καταλύεται από την υπεροξειδογενεία ενζύμων PLA₂. Το φωσφολιποειδές (αριστερά) μετατρέπεται υπό τη δράση του ενζύμου σε λύσο-φωσφολιποειδές και ελεύθερο λιπαρό οξύ (δεξιά) (52).

PAF-ακετυλνυδρολάση (PAF-AH)

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν 3 ισομορφές του ενζύμου, δύο ενδοκυτταρικές και μία εξωκυτταρική. Χαρακτηριστικό είναι ότι τα ένζυμα αυτά δεν απαιτούν Ca²⁺ για τη δράση τους, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες φωσφολιπάσες A₂. Η ονομασία του προέρχεται από την ικανότητα που έχει να υδρολύει την ακετυλομάδα από την sn-2 θέση του PAF. Οι ενδοκυτταρικές μορφές PLA₂ αποτελούνται από τα ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα GVIB και GVIII, γνωστά και ως PAF-AH II και PAF-AH Ib, αντίστοιχα, ενώ η εξωκυτταρική μορφή είναι γνωστή ως PAF-AH πλάσματος ή Lp-PLA₂ ή GVIIA PLA₂. Οι ισομορφές αυτές έχουν διαφορετικά βιοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά, ωστόσο η ενδοκυτταρική PAF-AH II και η PAF-AH πλάσματος εμφανίζουν κατά 41-43% κοινή αλληλουχία αμινοξέων. Επίσης, τα συγκεκριμένα ένζυμα διασπούν, εκτός από τον PAF, και άλλα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL ή/και το οξειδωτικό στρες (54) και τα οποία εμφανίζουν ισχυρές βιολογικές δράσεις (53, 55).

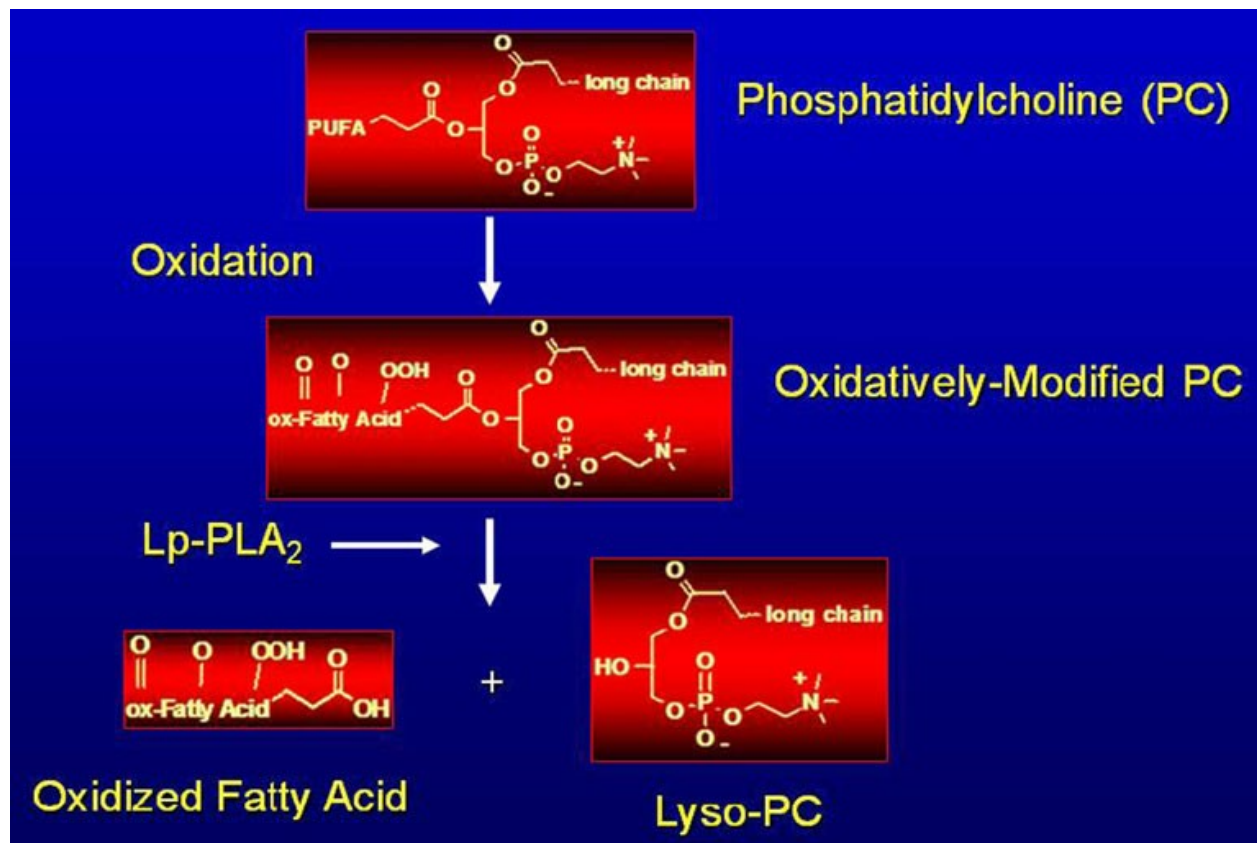
Lp-PLA₂

Γενικά

Η PAF-ακετυλδωρολάση του πλάσματος είναι μία πρωτεΐνη 441 αμινοξέων που εκκρίνεται στην κυκλοφορία μετά την απομάκρυνση ενός υδρόφοβου πεπτιδίου-σήματος από το μόριό της. Παράγεται και εκκρίνεται από το ήπαρ και τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (μονοκύτταρα/μακροφάγα, μαστοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια) (56) ιδίως τα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών (57). Η έκκριση της Lp-PLA₂ εξαρτάται από την κατάσταση της κυτταρικής διαφοροποίησης και ρυθμίζεται από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι ο PAF, διάφορες κυτταροκίνες και στεροειδείς ορμόνες. Μετά την έκκρισή της προσδένεται στις λιποπρωτεΐνες και κυκλοφορεί στο αίμα στην ενεργή μορφή της, γι' αυτό είναι γνωστή και ως Lp-PLA₂, δηλαδή φωσφολιπάση που προσδένεται στις λιποπρωτεΐνες. Το ένζυμο συνδέεται κυρίως στις μικρές πυκνές LDL (~80%) και σε μικρότερο βαθμό (<20%) στη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL). Ωστόσο, μπορεί να βρεθεί και στη λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), στη λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL) όπως και στη λιποπρωτεΐνη (a) [Lp(a)] (39, 54, 56).

Το γονίδιο της Lp-PLA₂ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 (6p21.2 - 6p21.12) και περιλαμβάνει 12 εξώνια. Ενώ υπάρχουν διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου που φαίνεται να επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, η κλινική σημασία των πολυμορφισμών αυτών δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί (58).

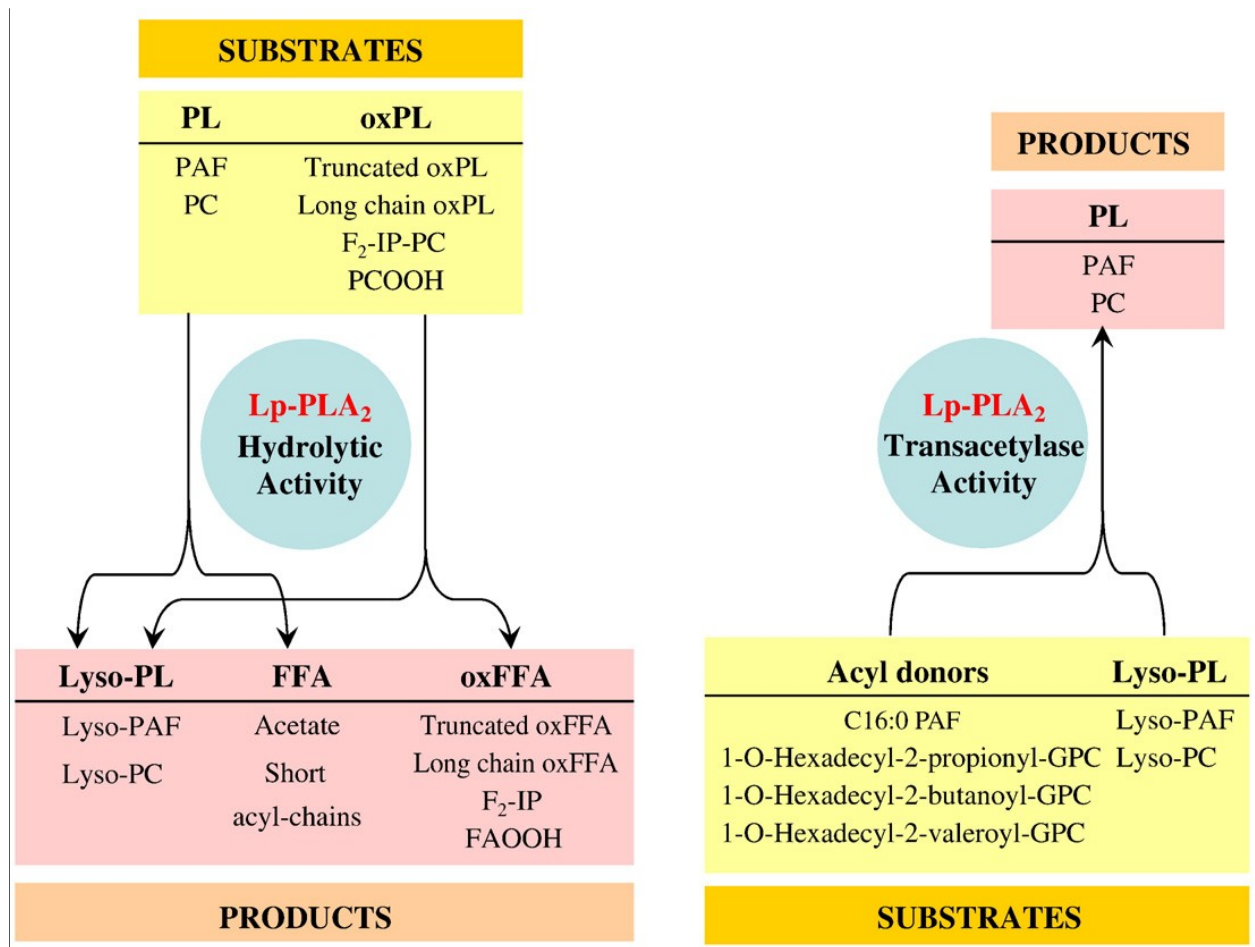
Η εκκρινόμενη PAF-AH έχει μία σχετικά ευρεία εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Για να καταλύσει την αντίδραση, το υπόστρωμα χρειάζεται να ικανοποιεί τις παρακάτω δομικές απαιτήσεις: να είναι παράγωγο γλυκερόλης με εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση και μία μετρίου βαθμού υδροφοβική αλυσίδα στη θέση sn-1, ενώ η φωσφορική ομάδα δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για να εκδηλώσει τη δράση της. Επίσης, εμφανίζει δραστηριότητα τρανσακετυλίωσης μεταφέροντας οξικό οξύ από το PAF σε λυσο-φωσφολιποειδή (εικόνα 12) (55).



Εικόνα. 11: Η δράση της Lp-PLA₂ στην οξειδωτικά τροποποιημένη φωσφατιδυλο-χολίνη, προς παραγωγή οξειδωμένων λιπαρών οξέων και λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (59)

Επίπεδα της Lp-PLA₂ σε υγιείς πληθυσμούς

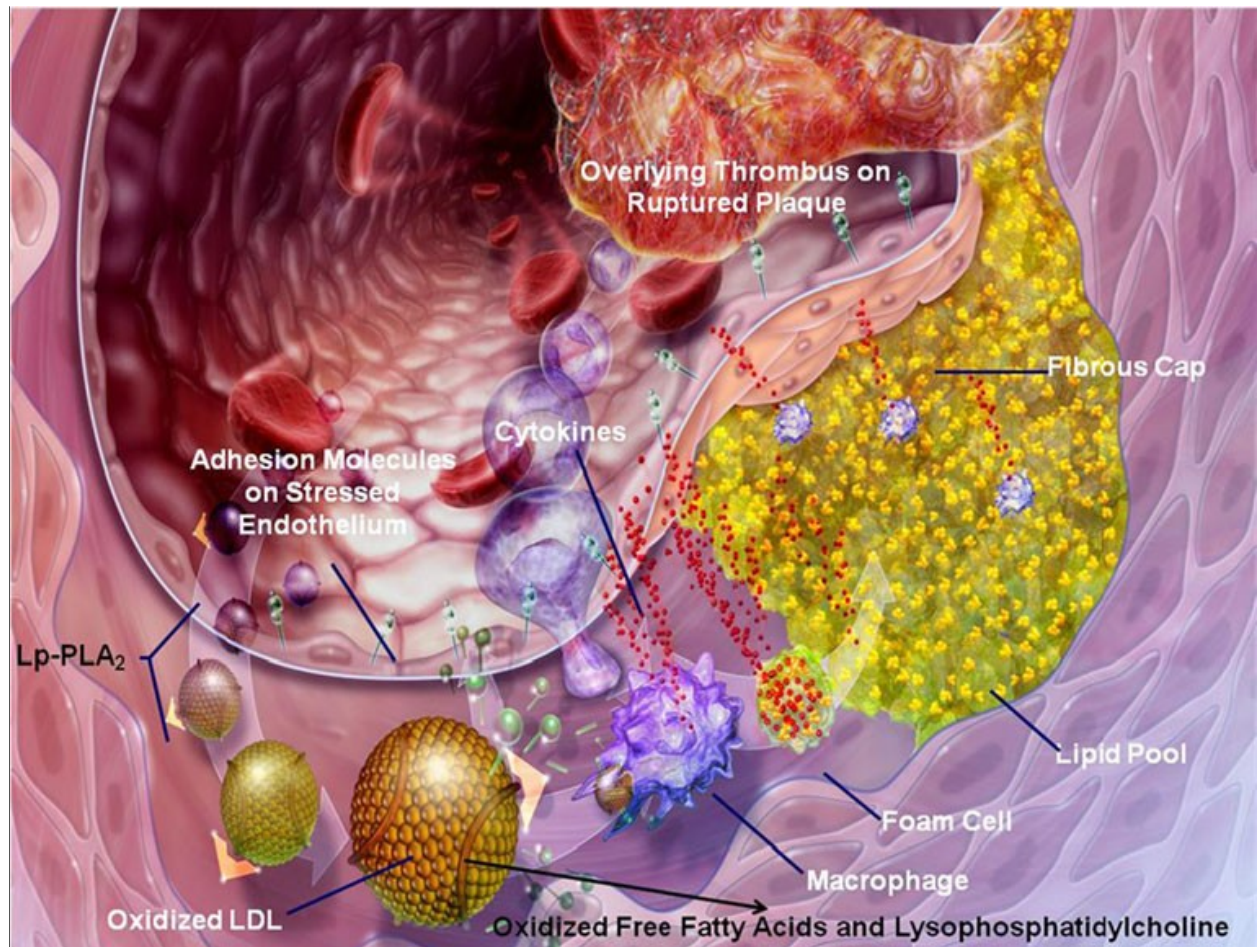
Τα επίπεδα του ενζύμου διατηρούνται σταθερά σε κάθε άτομο χωρίς να επηρεάζονται από κάποια συστηματική μόλυνση ή φλεγμονή. Η συγκέντρωσή του μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας είτε τη δραστηριότητα είτε τη μάζα του, ενώ τα δύο είδη μετρήσεων παρουσιάζουν καλή συσχέτιση μεταξύ τους. Εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη, την LDL και το λόγο LDL/HDL. Η αύξηση της ηλικίας το ανδρικό φύλο και η καυκάσια φυλή σχετίζονται με υψηλότερες τιμές του ενζύμου (58).



Εικόνα 12: Αντιδράσεις υδρόλυσης και ακετυλίωσης από την Lp-PLA₂ (56)

LpPLA₂ και αθηροσκλήρυνση

Ο ρόλος της Lp-PLA₂ στην αθηροσκλήρυνση φαίνεται να είναι αμφιλεγόμενος. Αφενός πιστεύεται ότι έχει προστατευτική δράση καθώς απομακρύνει την επιπλέον ποσότητα του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιποειδών τα οποία έχουν παρόμοια δράση με τον PAF και αφετέρου η παραγωγή λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης και οξειδωμένων μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, ουσιών με ισχυρές προφλεγμονώδεις και προαθηρογόνες δράσεις το καθιστά ένζυμο που διαδραματίζει προαθηρογόνο ρόλο (εικόνα 11) (39,59). Έρευνες δείχνουν ότι το είδος της λιποπρωτεΐνης μπορεί να ευθύνεται για το δισήμενο ρόλο του ενζύμου στην αθηροσκλήρυνση, με την LDL να σχετίζονται με την αρνητική του δράση ενώ η HDL να επωφελείται από τον αντιαθηρογόνο χαρακτήρα του, που συνεισφέρει στη γενικότερη εικόνα της HDL ως «καλής χοληστερόλης» (56).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση του ενζύμου Lp-PLA₂ σε αρτηριακό τοίχωμα με αθηροσκλήρυνση. Το ένζυμο αυτό μεταφέρεται από την LDL αλλά παράγεται και από τα μακροφάγα. Στην εικόνα διακρίνονται, επίσης, τα προϊόντα της υδρόλυσής της οξειδωμένης LDL, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) και οξειδωμένα λιπαρά οξέα (oxFA) (59)

Τα προφλεγμονώδη προϊόντα που παράγονται από την υδρόλυση του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιποειδών εμπλέκονται στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, στη φλεγμονή της αθηρωματικής πλάκας, στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα της και αποτελούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην οξείδωση της LDL και στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους απόκρισης στο αρτηριακό τοίχωμα (εικόνα 13) (60). Μία *in vivo* μελέτη έδειξε ότι η αθηροσκλήρυνση στις στεφανιαίες αρτηρίες σε αρχικό στάδιο χαρακτηρίζεται από τοπική παραγωγή της Lp-PLA₂ και λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης, με την τελευταία να σχετίζεται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (61). Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να επιδράσει στη λειτουργία του ενδοθηλίου είναι οι ακόλουθοι: αναστολή της παραγωγής του ενδοθηλιακού NO, αυξημένη παραγωγή ROS και οξειδωτικού στρες, επαγωγή της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, απόφραξη του μηχανισμού επιδιόρθωσης εμποδίζοντας τη

μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην περιοχή της ενδοθηλιακής βλάβης (62), λειτουργώντας ως χημειοελκτικός παράγοντας των μονοκυττάρων και αυξάνοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης. Επίσης, εμφανίζει κυτοτοξική δράση στα αγγειακά λεία μυικά κύτταρα ενώ προκαλεί τοπική παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο λέπτυνση της ινώδους κάψας και αποσταθεροποίηση της αρχιτεκτονικής ακεραιότητας της αθηρωματικής πλάκας μέσω καταστροφής της θεμέλιας ουσίας του κολλαγόνου, με αποτέλεσμα να την καθιστά πιο ευάλωτη στη ρήξη (59).

Η LpPLA₂ ως βιοχημικός δείκτης και θεραπευτικός στόχος καρδιαγγειακών νοσημάτων

Η συνειδητοποίηση ότι η φλεγμονή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση είχε ως αποτέλεσμα τη μελέτη μεγάλου αριθμού υποψήφιων μορίων για το ρόλο τους ως πιθανοί βιοχημικοί δείκτες και ως πιθανοί στόχοι για την ανάπτυξη καινούριων θεραπειών. Ανάμεσα τους περιλαμβάνεται και η Lp-PLA₂. Το ένζυμο αυτό έχει μελετηθεί σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες, πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης. Λόγω της θετικής συσχέτισής του με την καρδιαγγειακή νόσο έχει εκδηλωθεί έντονο ενδιαφέρον τόσο για την καθιέρωσή του ως βιοχημικός δείκτης όσο και για την ανάπτυξη φαρμακευτικών θεραπειών που το αναστέλλουν (62,63).

➤ Βιοχημικός δείκτης

Ένας βιοχημικός δείκτης μπορεί να λειτουργήσει είτε ως δείκτης κινδύνου (risk marker) είτε ως παράγοντας κινδύνου (risk factor). Ο δείκτης κινδύνου είναι ένας βιοχημικός δείκτης που σχετίζεται μόνο με την πορεία της νόσου. Αν ο βιοχημικός δείκτης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της πορείας της νόσου τότε αποτελεί και παράγοντα κινδύνου. Και τα δύο είδη δεικτών μπορεί να έχουν θετικό ή αρνητικό ρόλο (63).

Τα επίπεδά της Lp-PLA₂ στον ορό του αίματος αντανakλούν ενδοαγγειακή φλεγμονή και την παρουσία ασταθούς πλάκας ενώ μένουν σταθερά σε περιπτώσεις συστηματικής φλεγμονής, γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία του ως βιοχημικό δείκτη καρδιαγγειακής νόσου καθώς δεν επηρεάζεται από άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου, επιπρόσθετο στους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου. Ωστόσο, απαιτείται η μελέτη και άλλων βιοχημικών δεικτών, ώστε να καθιερωθούν δοκιμασίες (test) χρήσιμες στην κλινική πράξη, που θα έχουν προσθετική αξία στην εκτίμηση της κατάστασης των ασθενών (59). Για παράδειγμα, οι φλεγμονώδεις παράγοντες CRP και Lp-PLA₂ φαίνεται να έχουν συμπληρωματική δράση στον προσδιορισμό των ατόμων υψηλού κινδύνου, ο συνδυασμός των οποίων αυξάνει σημαντικά την προγνωστική αξία σε σχέση με την αντίστοιχη του κάθε

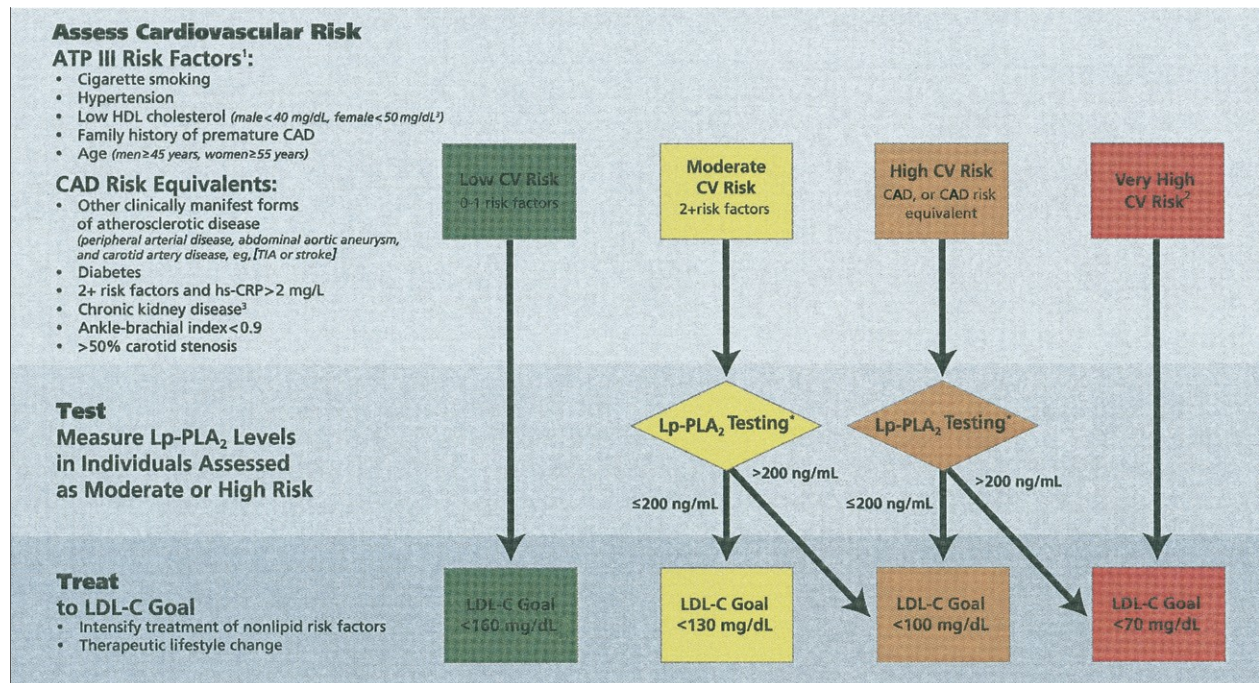
δείκτη χωριστά (64). Αυτό που χαρακτηρίζει την Lp-PLA₂ είναι ότι αποτελεί έναν μη παρεμβατικό τρόπο εκτίμησης της κλίσης μιας αθηρωματικής πλάκας προς ρήξη και κατ'επέκταση εκδήλωσης εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρά την ποικιλία των διαγνωστικών εργαλείων για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου (από το παραδοσιακό Framingham score μέχρι επεμβατικές μεθόδους όπως είναι η αγγειογραφία) καμία μέθοδος δεν μπορεί να εξετάσει την ευπάθεια μιας πλάκας προς ρήξη. Νέες μέθοδοι που εμφανίζονται για την εκτίμηση της σύστασης της αθηρωματικής πλάκας δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως, είτε γιατί είναι αρκετά παρεμβατικές ή πολύ ακριβές (59).

Πολυάριθμες επιδημιολογικές έρευνες αποδεικνύουν το ρόλο της Lp-PLA₂ ως ανεξάρτητο δείκτη της καρδιαγγειακής νόσου (59). Πρόσφατες μετα-αναλύσεις επιδημιολογικών ερευνών πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης καταδεικνύουν το συγκεκριμένο ένζυμο ως αξιόπιστο δείκτη κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και ως πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (60, 65, 66).

Για την εκτίμηση της κατάλληλης χρήσης της Lp-PLA₂ στην κλινική πράξη συστάθηκε μία επιτροπή από επιστήμονες ιατρικών σχολών της Αμερικής η οποία μελέτησε την ενσωμάτωση του συγκεκριμένου καινοφανή βιοχημικού δείκτη στις κατευθυντήριες οδηγίες για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Συγκεκριμένα, οι συστάσεις της επιτροπής ενσωματώθηκαν στις κατευθυντήριες οδηγίες της Επιτροπής για τη Θεραπεία των Ενηλίκων III (Adult Treatment Panel III, ATP III), και της Αμερικάνικης Καρδιολογικής Εταιρείας/ Κέντρου Ελέγχου των Ασθενειών (American Heart Association/Centers for Disease Control, AHA/CDC). Σύμφωνα με τις συστάσεις της επιτροπής, η Lp-PLA₂ μπορεί να λειτουργήσει σαν ένα συμπληρωματικό στοιχείο στην παραδοσιακή εκτίμηση κινδύνου σε ασθενείς με μέτριο ή υψηλό δεκαετή κίνδυνο. Από τις εργασίες της συγκεκριμένης ομάδας μελέτης προέκυψαν τα ακόλουθα δεδομένα για την Lp-PLA₂:

- Η μέτρηση του συγκεκριμένου δείκτη δεν χρειάζεται να αποτελεί τεστ διαλογής στο γενικό πληθυσμό ή στα άτομα που κατατάσσονται ως χαμηλού κινδύνου, παρά μόνο σε αυτά που κατατάσσονται ως μετρίου ή υψηλού κινδύνου, σύμφωνα με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου.
- Η Lp-PLA₂ αποτελεί αξιόπιστο δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου σε διαφορετικές εθνικότητες, ενώ το Framingham score φαίνεται να υποεκτιμά τον κίνδυνο σε μη λευκούς πληθυσμούς.
- Επίπεδα ενζύμου > 200 ng/mL σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο.

Οι συστάσεις για τη χρήση της Lp-PLA₂ σε συνδυασμό με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου ως δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου καθώς και οι στόχοι μείωσης των επιπέδων της LDL ανάλογα με το στάδιο κινδύνου παρουσιάζονται στην εικόνα 14 (67).



Εικόνα 14: Lp-PLA₂ και κλασικοί παράγοντες κινδύνου στην εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου (67)

➤ Θεραπευτικός στόχος

Η Lp-PLA₂ αποτελεί θεραπευτικό στόχο που μελετάται σε κλινικές μελέτες πρόληψης της καρδιαγγειακής νόσου (60). Προκλινικές μελέτες δείχνουν ότι η αναστολή της Lp-PLA₂ μειώνει δραστικά την αθηρογένεση (57). Η υπολιπιδαιμική θεραπεία με στατίνες, φιβράτες, νιασίνη, ω-3 λιπαρά οξέα και εξετιμιβίδη ελαττώνουν εκτός από την LDL και τα επίπεδα της Lp-PLA₂ πλάσματος (59, 61) ενώ μία νέα, πολλά υποσχόμενη κατηγορία ενώσεων αποτελούν οι αζετιδινόνες, οι οποίες αναστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ (64). Έρευνες που έχουν γίνει με αζετιδινόνες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* δείχνουν αναστολή της υδρόλυσης των οξειδωμένων φωσφολιποειδών και της παραγωγής κυτταροκινών, ενώ μία καινούρια αζετιδινόνη (SB0848) έδειξε να αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου στις αθηρωματικές πλάκες κατά 80% σε 14 μέρες (62). Μία νέα κατηγορία φαρμάκων, η δαραπλαντίβη (darapladib) μελετάται σε κλινικές μελέτες. Αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της Lp-PLA₂, μπλοκάροντας το ενεργό κέντρο της σερίνης. Στόχος του συγκεκριμένου φαρμάκου είναι να λειτουργήσει ως αντι-αθηροσκληρυντική θεραπεία συμπληρωματικά προς τις καθιερωμένες υπολιπιδαιμικές

θεραπείες. Τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι στιγμής (φάσεις I και II κλινικών μελετών) αναφέρουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, χωρίς να αναφερθούν παρενέργειες, αλλά δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη η δράση του στα επίπεδα της Lp-PLA₂. Δύο κλινικές μελέτες φάσης III (STABILITY, SOLID) βρίσκονται σε εξέλιξη και αναμένονται αποτελέσματα το 2013 και 2014, αντίστοιχα (58,59).

Lp-PLA₂ και διατροφή

Οι μελέτες που εξετάζουν τη σχέση ανάμεσα στην Lp-PLA₂ και τη διατροφή είναι περιορισμένες. Σε μία μεγάλη συγχρονική μελέτη υγιών ανδρών και γυναικών μελετήθηκε η σχέση ανάμεσα σε διαιτητικούς παράγοντες και τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂. Η αντικατάσταση 5% της ενέργειας που προέρχεται από υδατάνθρακες με ενέργεια από πρωτεΐνες καθώς και η κατανάλωση αλκοόλ συσχετίστηκαν με μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου (68). Σε μία άλλη μελέτη παρέμβασης χορηγήθηκε υποθερμιδική δίαιτα για απώλεια βάρους σε 28 υγιείς, μη διαβητικές παχύσαρκες γυναίκες με σκοπό να εκτιμηθούν οι επιδράσεις της απώλειας βάρους στη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ και να εξεταστεί η σχέση μεταξύ των αλλαγών στη δραστηριότητα του ενζύμου και των μεταβολών στις μικρές και πυκνές LDL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 10% απώλεια του βάρους μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται αλλαγές στα επίπεδα χοληστερόλης των μικρών και πυκνών LDL παρά μόνο στη χοληστερόλη των VLDL. Αυτό πιθανώς σημαίνει ότι η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου λόγω αλλαγών στη διατροφή οφείλεται σε μηχανισμό διαφορετικό από τη μείωση της LDL, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει από τη χρήση υπολιπιδαιμικών θεραπειών, όπου η μείωση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μείωση της LDL (69).

Η συνδυασμένη δράση αλλαγών στον τρόπο ζωής και συνδυασμού φαρμακευτικής αγωγής για τη μείωση των λιποειδών του πλάσματος στη μείωση των επιπέδων της Lp-PLA₂ ήταν το αντικείμενο μελέτης κλινικής έρευνας σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς. Επίσης, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ των αλλαγών στην Lp-PLA₂ και στην LDL. Η φαρμακευτική αγωγή περιελάμβανε ω-3 λιπαρά οξέα από ιχθυέλαιο (1 g/ημέρα), νιασίνη μακράς δράσης (500 mg/ημέρα), υδροχλωρική χολεσεβελάμη και ένα σταθερό συνδυασμό 10 mg εξετιμίβης και 40 mg σιμβαστατίνης. Οι αλλαγές στον τρόπο ζωής αναφέρονται στη διατροφή και την άσκηση. Συγκεκριμένα, κάθε εθελοντής λάμβανε εξατομικευμένο διαιτολόγιο με θερμιδική πρόσληψη ανάμεσα στις 1500 και 1800 θερμίδες με χαμηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους (6% των συνολικών θερμίδων) και υδατανθράκων (20% των ολικών θερμίδων) ενώ σχετικά με την άσκηση έγινε σύσταση για 30 λεπτά έντονου περπατήματος 5 ημέρες την εβδομάδα. Τα

αποτελέσματα έδειξαν μείωση των επιπέδων του ενζύμου κατά 33%, αλλαγή που μπορεί μερικώς μόνο να εξηγηθεί από τη μεταβολή των επιπέδων της LDL (70).

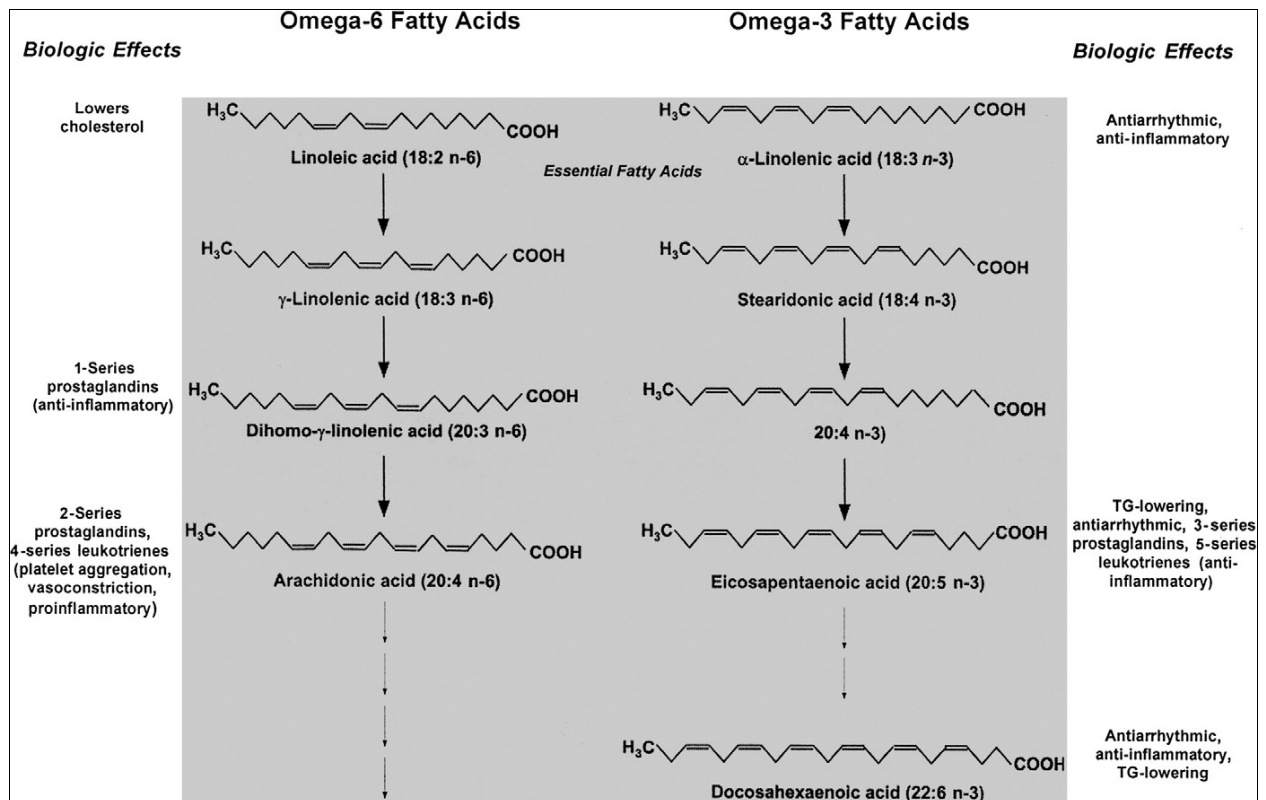
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΤΟ ΛΙΝΕΛΑΙΟ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Εισαγωγή

Το είδος των λιπαρών οξέων της διατροφής εμφανίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της καρδιαγγειακής νόσου. Τα λιπαρά οξέα ταξινομούνται σε κορεσμένα (SFAs), πολυακόρεστα (PUFAs) και μονοακόρεστα (MUFAs) ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι διπλών δεσμών και τον αριθμό αυτών (έναν ή περισσότερους) (31). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα θεωρούνται συστατικό της διατροφής που επηρεάζει τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και περιέχονται σε τρόφιμα όπως το γάλα, το τυρί, το βούτυρο και το κρέας του αρνιού (71). Μία επιτροπή επιστημόνων πρόσφατα, μελέτησε τα σύγχρονα δεδομένα που προκύπτουν για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα της διατροφής και την καρδιαγγειακή νόσο. Συγκεκριμένα, επιδημιολογικές, κλινικές και μηχανικές μελέτες συμφωνούν ότι ο κίνδυνος για καρδιαγγειακή νόσο μειώνεται με αντικατάσταση των SFAs από PUFAs και ειδικότερα η αντικατάσταση κατά 1% των SFAs από PUFAs σε μία δυτικού τύπου δίαιτα συνεισφέρει σε μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 2-3%. Όσον αφορά τους υδατάνθρακες, δεν υπάρχει ξεκάθαρο όφελος από την αντικατάσταση των SFAs, αν και μπορεί να προκύψει θετικό αποτέλεσμα αν οι υδατάνθρακες είναι μη επεξεργασμένοι και χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη, ενώ υπάρχουν ανεπαρκή στοιχεία για την επίδραση της αντικατάστασης των SFAs με MUFAs στην καρδιαγγειακή νόσο. Δύο σημεία που τονίζονται από τους ειδικούς της επιτροπής είναι ότι για να εκτιμηθεί ο ρόλος ενός διατροφικού στοιχείου στον καρδιαγγειακό κίνδυνο θα πρέπει να εξετάζεται η επίδρασή του σε πολλαπλούς βιοχημικούς δείκτες και όχι μόνο σε έναν, ταυτόχρονα με τη χρήση κλινικών καταληκτικών σημείων της καρδιαγγειακής νόσου. Το δεύτερο σημείο αναφέρεται στα τρόφιμα που περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα: δεν είναι αποκλειστικά το περιεχόμενο των SFAs που επιδρά στον καρδιαγγειακό κίνδυνο αλλά θα πρέπει να εξεταστούν και τα επιμέρους συστατικά κάθε τροφίμου (72).

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα χωρίζονται σε ω-3, ω-6, ω-7 και ω-9 λιπαρά οξέα, ανάλογα με τη θέση του πρώτου ακόρεστου δεσμού, ξεκινώντας την αρίθμηση από το μεθυλικό άκρο του λιπαρού οξέος (άνθρακας «ω»). Από τις κατηγορίες αυτές, τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα είναι τα περισσότερο μελετημένα, καθώς σε αυτά περιλαμβάνονται τα απαραίτητα λιπαρά, το ω-6 λινελαϊκό οξύ (LA) και το ω-3 α-λινολενικό οξύ (ALA), τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν στον ανθρώπινο οργανισμό και πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Τα ω-7 και ω-9 προέρχονται από το παλμιτελαϊκό και το ελαϊκό οξύ, αντίστοιχα. Μέσα στον οργανισμό το LA μετατρέπεται σε αραχιδονικό οξύ (AA) ενώ το ALA σε εικοσαπενταενικό (EPA) και

δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA). Το AA και το EPA αποτελούν πρόδρομες μορφές διαφορετικών τάξεων προφλεγμονωδών ή αντιφλεγμονωδών εικοσανοειδών, αντίστοιχα (εικόνα 15). Διατροφικές πηγές των ω -6 αποτελούν τα περισσότερα φυτικά έλαια όπως το σογιέλαιο και το ηλιανθέλαιο, τα δημητριακά και οι ξηροί καρποί, ενώ κύρια πηγή των ω -3 λιπαρών οξέων είναι τα λιπαρά κυρίως ψάρια και τα οστρακοειδή (με τη μορφή των EPA και DHA), ενώ βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στο λινέλαιο και στο κραμβέλαιο (canola oil) (με τη μορφή του ALA) (73,74).



Εικόνα 15: Δομή, λειτουργία και μεταβολική τύχη των απαραίτητων λιπαρών οξέων (75)

Μια πρόσφατη ανασκόπηση επιδημιολογικών ερευνών και μελετών που έκαναν χρήση εικονικού σκευάσματος, σε ανθρώπους με και χωρίς προηγούμενη καρδιαγγειακή νόσο, σχετικά με την κατανάλωση ω -3 λιπαρών οξέων από ψάρια έδειξε σημαντική μείωση της θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο και του αιφνιδίου θανάτου σε άτομα χωρίς προηγούμενη εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και μείωση της θνησιμότητας τόσο καρδιαγγειακής όσο και άλλης αιτιολογίας σε μελέτες δευτερογενούς πρόληψης (73). Οι ευεργετικές επιδράσεις των ω -3 λιπαρών οξέων, πιθανόν να οφείλονται στην ικανότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, την αρτηριακή πίεση, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την αρρυθμία και την αθηρογένεση (73,76).

Σχετικά με τα ω-3 λιπαρά οξέα φυτικής προέλευσης, το αποτέλεσμα ανασκόπησης του 2004 είναι ότι το ALA αποτελεί βασικό καρδιοπροστατευτικό συστατικό, ωστόσο, όπως δηλώνεται από τους συγγραφείς, δεν είναι γνωστό αν οι θετικές επιδράσεις του ALA οφείλονται στο ίδιο ή στη μετατροπή του σε μακράς αλυσού ω-3 λιπαρά οξέα και ακολούθως σε εικοσανοειδή που εμφανίζουν μειωμένη φλεγμονώδη δράση (77). Ωστόσο, συστηματική ανασκόπηση 46 μελετών, εκ των οποίων οι 14 ήταν τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες, οι 25 προοπτικές μελέτες και οι 7 μελέτες ασθενών-μαρτύρων, έδειξε ότι η αυξημένη κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων από ψάρια ή συμπληρώματα ιχθυελαίων οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα θανάτων οποιασδήποτε αιτιολογίας, καρδιακού και αιφνιδίου θανάτου και πιθανόν εγκεφαλικού επεισοδίου, εύρημα που δεν ισχύει για το ALA (78). Είναι εμφανές ότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά το ρόλο του α-λινολενικού οξέος στην καρδιαγγειακή νόσο.

Τα ω-6 λιπαρά οξέα εμφανίζουν αμφιλεγόμενο ρόλο στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου, καθώς κάποιες έρευνες δείχνουν θετική επίδραση μέσω βελτίωσης του λιπιδαιμικού προφίλ, ενώ άλλες αντικρούουν το συγκεκριμένο αποτέλεσμα (74). In vitro μελέτες και έρευνες σε πειραματόζωα προτείνουν ότι το λινελαϊκό και άλλα ω-6 λιπαρά οξέα μπορεί να είναι προφλεγμονώδη ή προθρομβωτικά αν και προοπτικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η υψηλή πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων είναι καρδιοπροστατευτική (79).

Σχετικά με τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, υπάρχει μία ασυμφωνία ανάμεσα στα επιδημιολογικά δεδομένα σε ανθρώπους και στα πειραματικά μοντέλα σε πειραματόζωα. Τα τελευταία, δεν δείχνουν να υπάρχει κάποια διαφορά ανάμεσα στα μονοακόρεστα και κορεσμένα λιπαρά οξέα όσον αφορά τις επιδράσεις στην καρδιαγγειακή νόσο. Η κλασική Μελέτη των Επτά Χωρών, που διεξήχθη από τον Keys πριν από μισό περίπου αιώνα, ωστόσο, παρουσίασε σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη Μεσογειακή Διατροφή και την καρδιαγγειακή νόσο. Αν και πλούσια σε λίπος (33-40% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης), το χαμηλότερο ποσοστό θανάτου από καρδιαγγειακά νοσήματα σημειώθηκε στις περιοχές που ακολουθούσαν το συγκεκριμένο πρότυπο και αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το λίπος προέρχεται κυρίως από το ελαιόλαδο, που είναι πλούσια πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Οπότε θεωρήθηκε ότι το υψηλό ποσοστό της Μεσογειακής Διατροφής σε μονοακόρεστα δρα καρδιοπροστατευτικά. Άλλες επιδημιολογικές μελέτες δεν φαίνεται να συνηγορούν με το εύρημα αυτό, ίσως λόγω επίδρασης συγχυτικών παραγόντων, όπως είναι η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων. Προοπτικές μελέτες που έχουν μελετήσει την πρόσληψη MUFA σε σχέση με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο οδηγούν σε ασαφή συμπεράσματα, καθώς άλλες μελέτες αποδεικνύουν την προστατευτική δράση των MUFA, ενώ άλλες δεν δείχνουν κάποια συσχέτιση (80).

Ο Αμερικάνικος Διαιτολογικός Σύλλογος (American Dietetic Association, ADA) κάνει τις ακόλουθες συστάσεις σχετικά με την πρόσληψη του λίπους: το ολικό λίπος να κυμαίνεται μεταξύ 20-35% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης, εκ των οποίων λιγότερο από 10% να είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα και μέχρι 25% και 10% να είναι τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, αντίστοιχα (80).

Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, ενός διατροφικού προτύπου που σχετίζεται με μειωμένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Για την εκτίμηση της προσκόλλησης σε αυτό, έχουν δημιουργηθεί αρκετά σκορ (81), τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στις μελέτες για να αποτιμήσουν τη σχέση μεταξύ του συγκεκριμένου προτύπου και της νοσηρότητας/θνησιμότητας καθώς και άλλων δεικτών (82-87). Η αυξημένη κατανάλωση ελαιόλαδου είναι ένα από τα βασικά συστατικά του παραπάνω σκορ όταν λειτουργεί ως δείκτης μειωμένης θνησιμότητας (88). Το 2004, το US Food and Drug Administration (FDA) ενέκρινε τη χρήση ισχυρισμών υγείας για το ελαιόλαδο: η κατανάλωση 23 γρ. ελαιολάδου σε αντικατάσταση ίδιας ποσότητας κορεσμένου λίπους είναι ικανή να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (89).

Σύσταση

Το ελαιόλαδο μπορεί να χωριστεί σε δύο κλάσματα όσον αφορά την περιεκτικότητά του σε διάφορα συστατικά. Το κύριο κλάσμα συνίσταται από σαπωνοποιήσιμες γλυκερινούχες ενώσεις με τη μορφή των τριακυλογλυκερολών που αποτελούν το 98-99 % του ελαίου ενώ τα μικροσυστατικά στοιχεία του συναντώνται σε ποσοστό 1-2 % και περιέχουν μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά (88). Στην τελευταία κατηγορία περιέχονται ενώσεις όπως μονο- και διακυλο- γλυκερόλες, φωσφολιποειδή, κηροί, εστέρες στερολών, υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, ελεύθερες στερόλες, τοκοφερόλες, χλωροφύλλες, καροτενοειδή και φαινολικές ενώσεις (91). Τα συστατικά του ελαιολάδου και οι ποσότητες στις οποίες συναντώνται, παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Το ποσοστό των λιπαρών οξέων και των μικροσυστατικών (92) μπορεί, επίσης, να διαφέρει από δείγμα σε δείγμα ανάλογα με τη ζώνη παραγωγής του ελαιολάδου. Κυρίαρχοι παράγοντες για την εμφάνιση αυτών των διαφοροποιήσεων είναι το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα, η ποικιλία και ο βαθμός ωριμότητας των ελαίων κατά τη συλλογή τους (91).

Πίνακας 11:Σύσταση ελαιολάδου (93)

Συστατικό	Εξαιρετικά Παρθένο Ελαιόλαδο	Παρθένο Ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο
Γλυκερινούχο τμήμα			
Λιπαρά οξέα (g/100g)			
Ελαϊκό οξύ (oleic)	83,1	78,7	78,6
Παλμιτικό οξύ	6,6	8,6	9,1
Λινελαϊκό οξύ	5,1	8,3	6,2
Στεαρικό οξύ	2,8	1,9	3,4
Παλμιτελαϊκό οξύ	0,4	1,1	0,6
α-Λινολενικό οξύ	0,6	—	0,4
γ- Λινελαϊκό οξύ	0,4	—	0,5
Μη γλυκερινούχο τμήμα			
Συστατικό (mg/kg)			
Αλειφατικές αλκοόλες			
C18-C30 αλκοόλες	≤200	≤200	≤200
Τριτερπένια	500-3000	500-3000	500-3000
Ολικές στερόλες	1260,8	687,4	1366,6
Χοληστερόλη	1,9	2,8	2,0
Δ ⁵ -αβεναστερόλη	91,5	35,1	82,7
β-σιτοστερόλη	1124,4	640,9	1268,8
Σιτοστανόλη	7,3	2,3	1,1
Στιγμαστερόλη	8,2	6,4	12,0
Πρωτεΐνες (μg/kg)	1,76	1,76	1,26
Μη γλυκερινούχοι εστέρες	100-250	100-250	100-250
Κηροί	≤250	≤250	≤250
Υδρογονάνθρακες			
Σκουαλένιο	4.277	ND	2.598
β-καροτένιο	0,33-4,0	ND	ND
Πολυφαινόλες			
Λιπόφιλες			
α-τοκοφερόλες	300	ND	200
Τοκοτριενόλες	ND	ND	—

Υδρόφιλες Υδροτυροσόλη ρ-τυροσόλη	40-1000	40-1000	—
	Θεωρούνται τα κύρια συστατικά των πολυφαινολών, αν και οι πληροφορίες είναι αντιφατικές στο να ποσοτικοποιήσουν τις συνολικές συγκεντρώσεις, που εξαρτώνται από τις τεχνικές άρδευσης και συγκομιδής		

Επίδραση των συστατικών του ελαιόλαδου στην υγεία και την καρδιαγγειακή νόσο

Ο συνδυασμός της υψηλής περιεκτικότητας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (κυρίως ελαϊκό οξύ) με τα μικροσυστατικά του ελαιόλαδου το καθιστά έλαιο μοναδικό στο είδος του για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του καθώς και για την αντιαθηρογόνο δράση του (90, 94). Ωστόσο, ανάλογα με την ποιότητά του-παρθένο ή εξευγενισμένο ελαιόλαδο-σχετίζεται και η ποσότητα των μικροσυστατικών που περιέχει, με το παρθένο ελαιόλαδο να αποτελεί την αρτιότερη σε θρεπτικά συστατικά μορφή (89).

▪ **Καρδιαγγειακό σύστημα**

Η επίδραση του ελαιόλαδου στους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο είναι η ακόλουθη: βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ, μειώνοντας τις τριακυλογλυκερόλες και αυξάνοντας την HDL όταν αντικαθιστά μέρος των υδατανθράκων της διατροφής ενώ μειώνονται τα επίπεδα της LDL μετά από αντικατάσταση των κορεσμένων λιπών. Επίσης, συμβάλλει στον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο διαβητικών ατόμων (89) ενώ σημειώνεται αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση ελαιόλαδου και στις τιμές τόσο της διαστολικής όσο και της συστολικής αρτηριακής πίεσης (95). Ωστόσο, το ελαιόλαδο-πέρα από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου-διαδραματίζει ενεργό ρόλο στον υποκείμενο μηχανισμό της αθηροσκλήρυνσης με δράσεις όπως μείωση της προσκόλλησης και χημειοταξίας των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, μείωση του προθρομβωτικού περιβάλλοντος κ.ά. (96, 97). Στην εικόνα 16 παρουσιάζονται οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των συστατικών του ελαιόλαδου στη λειτουργία του ενδοθηλίου (90).

→ Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες /αντιθρομβωτικές ιδιότητες

Δύο διαδικασίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του θρόμβου είναι η πήξη και η ινωδόλυση. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελεί βασική παράμετρο στη διαδικασία σχηματισμού θρόμβου στο αίμα και συγκεκριμένα ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) φαίνεται να συμμετέχει ενεργά. Οι ανταγωνιστές του PAF εμφανίζουν

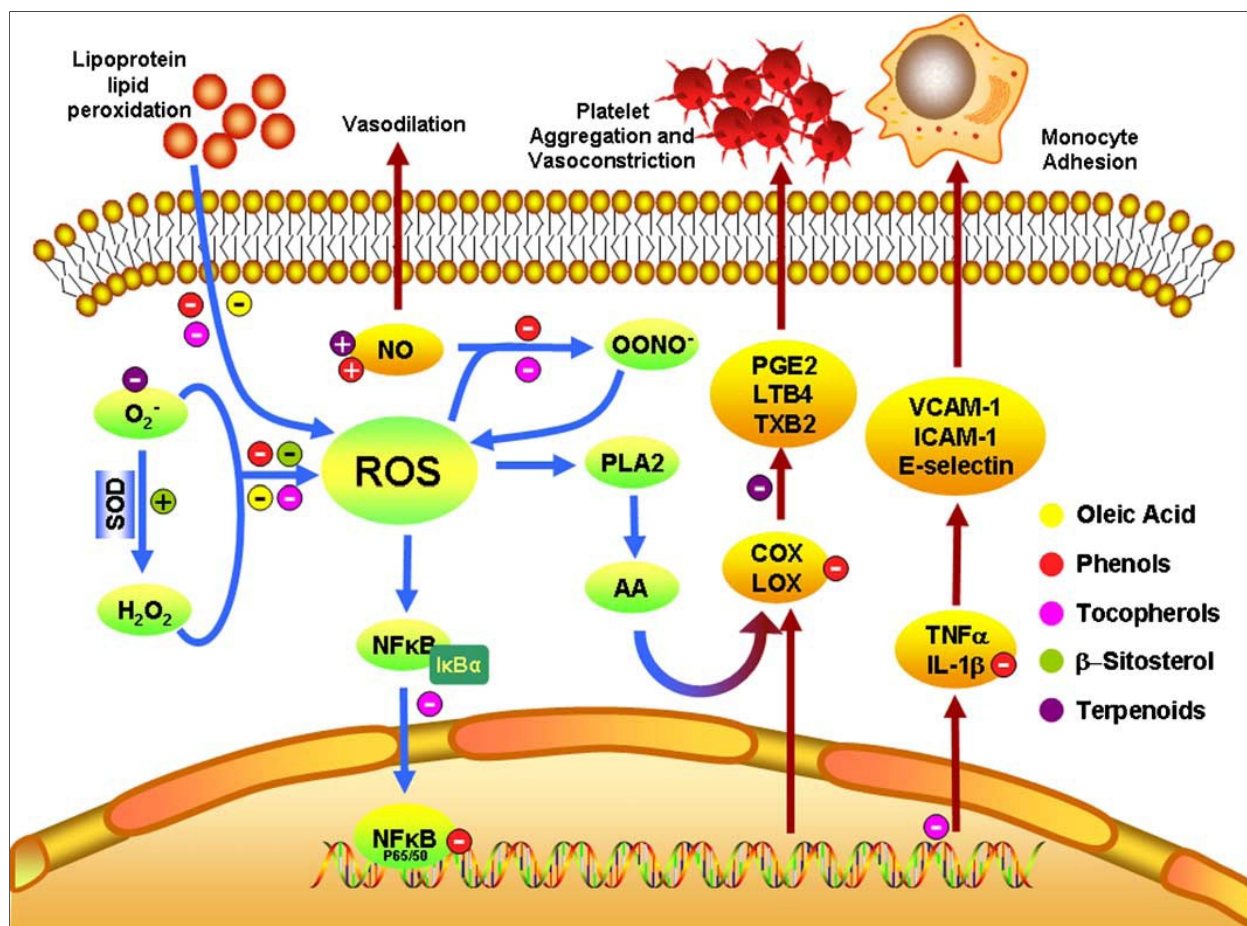
προστατευτική δράση έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της έναρξης/εξέλιξης της αθηροσκλήρυνσης (96). Έρευνα σε κουνέλια, στα οποία δόθηκε πλούσια σε χοληστερόλη διαίτα (ομάδα A), ενισχυμένη με ελαιόλαδο (ομάδα B) ή εκχύλισμα πολικών λιποειδών του ελαιολάδου (ομάδα C) ή εκχύλισμα ουδέτερων λιποειδών του ελαιολάδου (ομάδα D) έδειξε ότι η ομάδα B και C εμφάνισε μειωμένη ικανότητα της επαγόμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μειωμένη πάχυνση της αθηρωματικής βλάβης και διατήρηση της ελαστικότητας του αρτηριακού τοιχώματος. Μειωμένη ικανότητα του πλάσματος σε οξείδωση παρατηρήθηκε στις ομάδες B, C και D ενώ υψηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου PAF-AH είχαν οι ομάδες A, B και D. Το εκχύλισμα πολικών λιποειδών του ελαιολάδου είναι πλούσιο σε ανταγωνιστές του PAF οι οποίοι ανήκουν στην τάξη των φωσφολιποειδών, των γλυκολιποειδών και των φαινολικών ενώσεων. Αντίστοιχα, το εκχύλισμα ουδέτερων λιποειδών περιλαμβάνει λιπαρά οξέα, τριακυλογλυκερόλες, βιταμίνη E και άλλες ενώσεις. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα ευρήματα αυτά απαιτούν περαιτέρω έρευνα, καθώς η μελέτη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συστατικά που περιέχονται στο εκχύλισμα των ουδέτερων λιποειδών δεν μπορούν από μόνα τους να επιβραδύνουν την αθηροσκληρυντική διαδικασία, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι δεν έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία της αθηρογένεσης στο συγκεκριμένο μοντέλο ζώων. Αντίθετα, οι ανταγωνιστές του PAF θεωρούνται αναπόσπαστο κομμάτι των θετικών επιδράσεων του ελαιολάδου ανάντια στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης (98). Το ελαιόλαδο επιδρά και σε άλλους δείκτες όπως είναι η θρομβοξάνη B₂ (TXB₂), η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂), ο παράγοντας πήξης von Willebrand (vWF), ο παράγοντας VII (FVII) και τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, PAI-1 (96).

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του ελαιολάδου μπορούν να αποδοθούν στο ελαϊκό οξύ αλλά και στα μικροσυστατικά του. Συγκεκριμένα, το ελαϊκό οξύ αναστέλλει την έκφραση μορίων πρόσφυσης (VCAM-1, ICAM-1), μειώνει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επηρεάζει διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες. Ο συνδυασμός της χαμηλής ικανότητας στην οξείδωση του ελαϊκού οξέος με την εκκαθαριστική ικανότητα των μικροσυστατικών του ελαιολάδου στις ρίζες έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποίησης προφλεγμονωδών παραγόντων μεταγραφής, όπως ο NFκB. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες συστατικών όπως η α-τοκοφερόλη, η β-σιτοστερόλη, τα τριτερπένια και οι φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου έχουν εκτενώς μελετηθεί σε ανθρώπους ως προς τις αντιφλεγμονώδεις και αγγειοπροστατευτικές δράσεις τους (96). Επιδρούν σε φλεγμονώδεις δείκτες όπως η θρομβοξάνη B₂ (TXB₂), το λευκοτριένιο B₄ (LTB₄), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) (97). Επίσης στο ελαιόλαδο έχουν βρεθεί ενώσεις που αναστέλλουν τις δράσεις του PAF και

επομένως εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση και όπως αναφέρθηκε ανηκούν στην τάξη των φωσφολιποειδών, των γλυκολιποειδών και των φαινολικών ενώσεων (99)

→ Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η οξείδωση της LDL αποτελεί καθοριστικό σημείο για την έναρξη της αθηροσκληρυντικών αλλοιώσεων. Το είδος του λίπους που καταναλώνεται από τη διατροφή επηρεάζει τη σύσταση των μορίων της LDL με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να επιδέχονται ευκολότερα οξείδωση, λόγω των διπλών δεσμών, σε σχέση με τα μονοακόρεστα. Επίσης, μία δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες εμφανίζει ίδια ή μικρότερη αποτελεσματικότητα στη μείωση της οξείδωσης της LDL συγκρινόμενη με υψηλή σε μονοακόρεστα δίαιτα (92,93,96). Όσον αφορά την επίδραση των μικροσυστατικών στην οξείδωση, τα κύρια αντιοξειδωτικά που απαντώνται στις ελιές είναι τα καροτενοειδή και οι φαινολικές ενώσεις, με κυριότερες την ελευρωπαΐνη, την υδροξυτυροσόλη και την α-τοκοφερόλη. Η α-τοκοφερόλη είναι ενεργή μορφή της βιταμίνης Ε και αν και περιέχεται σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο, η καθημερινή κατανάλωση ενισχύει το συνολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του ανθρώπινου σώματος, προστατεύοντας από τις ελεύθερες ρίζες και τη λιποειδική υπεροξείδωση (93). Μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα, είτε *in vivo* είτε *in vitro*, έχουν δείξει ότι οι φαινόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο εμφανίζουν θετικές επιδράσεις σε διάφορες παραμέτρους, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι λιποπρωτεΐνες πλάσματος, η οξειδωτική βλάβη - τόσο στην LDL όσο και στο DNA - και συγκεκριμένοι φλεγμονώδεις δείκτες (92,100).



Εικόνα 16: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των συστατικών του ελαιολάδου στην ενδοθηλιακή λειτουργία. (90)

Λινέλαιο

Ο λιναρόσπορος είναι καρπός που καλλιεργείται σε 50 περίπου χώρες κυρίως του βόρειου ημισφαίριου, μεταξύ των οποίων οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, η Κίνα και η Ινδία. Η ύπαρξή του είναι γνωστή από την αρχαιότητα σε περιοχές όπως το Ιράν, η Ιορδανία και η Συρία και θεωρείται ότι αποτελούσε συστατικό του ψωμιού ενώ είχε και καθαρτική δράση. Από το 1990 άρχισε να χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία υγιεινής διατροφής ως συστατικό πολλών προϊόντων λόγω ευρημάτων που του προσέδιδαν πολλά οφέλη για την υγεία. Τα συστατικά του που σχετίζονται με την υγεία περιλαμβάνουν τα λιγνάνια (κυρίως το secoisolariciresinol diglucoside, SDG, που αποτελεί αντιοξειδωτικό μόριο), το α-λινολενικό οξύ (ALA) και μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες όπως είναι το κόμμι (101). Τα λιγνάνια είναι αναστολείς των υποδοχέων του PAF και έχουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ το ALA καταστέλλει την παραγωγή της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF), την αναπνευστική έκρηξη των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και την παραγωγή ριζών οξυγόνου που απελευθερώνονται από τα μονοκύτταρα (102).

Σύσταση

Ο λιναρόσπορος αποτελεί σπόρο που καλλιεργείται για το λάδι του, οπότε προκύπτει το λινέλαιο. Η περιεκτικότητα του λιναρόσπορου σε λάδι είναι περίπου 38-45% , ανάλογα με την τοποθεσία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος και της καλλιέργειας. Το 96% των συνολικών λιποειδών του λινέλαιου είναι ουδέτερα λιποειδή (ακυλογλυκερόλες και λιπαρά οξέα), εκ των οποίων το 95-98% είναι τριακυλογλυκερόλες, ενώ τα πολικά λιποειδή (γλυκολιποειδή και φωσφολιποειδή) αποτελούν το 1,4%. Το 50-62% των λιπαρών οξέων στο λινέλαιο είναι α-λινολενικό οξύ (101) και το 15-18% λινελαϊκό οξύ. Το αλεύρι του λιναρόσπορου αποτελεί το 55-68% της μάζας του λιναρόσπορου, περιέχοντας περίπου 16,4 mg/g SDG. Η συγκέντρωση του SDG στο λιναρόσπορο κυμαίνεται από 0,6-1,8 g/100 g. Το σύμπλεγμα των λιγνανίων του λιναρόσπορου (FLC) περιέχει 34-38% SDG, 15-21% γλυκοζίδιο του κινναμικού οξέος και 9,6-11% υδροξυμεθυλγλουταρικό οξύ κατά βάρος. Στο σώμα το SDG μεταβολίζεται σε secoisolariciresinol (SECO), εντεροδιόλη (ED) και εντερολακτόνη (EL). Όλα τα παραπάνω συστατικά του συμπλέγματος των λιγνανίων είναι αντιοξειδωτικά, εκτός από το υδροξυμεθυλγλουταρικό οξύ, που είναι υπολιπιδαιμικός παράγοντας (103).

Λινέλαιο και καρδιαγγειακή λειτουργία

Το λινέλαιο δεν φαίνεται να επιδρά σημαντικά στη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής και συνεπώς στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης. Στις δράσεις του περιλαμβάνονται η καταστολή της παραγωγής των ριζών οξυγόνου από τα λευκοκύτταρα ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις (> 14 g/ημέρα) μειώνει τα επίπεδα των μεσολαβητών φλεγμονής στο πλάσμα. Επίσης, δεν επηρεάζει τις τιμές των λιποειδών του πλάσματος, όπως και δεν μειώνει την αρτηριακή πίεση. Στη συνέχεια, γίνεται αναφορά στα πειραματικά δεδομένα που υπάρχουν για το λινέλαιο σε σχέση με την αθηροσκλήρυνση και τα λιποειδή του ορού, τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, τα μόρια προσκόλλησης, τους αιμοστατικούς παράγοντες, την πίεση του αίματος και την αντιοξειδωτική δραστηριότητα (103).

→ Λιποειδή ορού

Έρευνες σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια δεν έδειξαν σημαντική επίδραση του λινελαίου (χορήγηση 5% της συνολικής ενέργειας της δίαιτας ως λινέλαιο) στο λιπιδαιμικό προφίλ και την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης (104), όπως επίσης δεν επιδρούν στα λιποειδή του ορού νορμοχοληστερολαιμικών κουνελιών. Επίσης, δεν μείωσε τα επίπεδα των τριακυλογλυκερολών (TG) στο αίμα υπερχοληστερολαιμικών ποντικών (103). Οι περισσότερες έρευνες στους ανθρώπους δεν αναφέρουν αλλαγή στα επίπεδα των λιποειδών του ορού (σε δόσεις από 1-14

g/ημέρα ALA ή 28 g λινελαίου), αν και μεγαλύτερη δόση (60 g/ημέρα) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μικρή μείωση των TG (105).

→ **Λινέλαιο και φλεγμονώδεις μεσολαβητές**

Σε έρευνα με υγιείς παχύσαρκους ενήλικες με αυξημένη περιφέρεια μέσης και μέση ηλικία τα 38 έτη, η χορήγηση κάψουλας λινελαίου (ALA: 5% της συνολικής ενέργειας) για 8 εβδομάδες δεν επηρέασε τα επίπεδα της CRP, του SAA, της IL-6 και του TNF-α (106). Άλλη έρευνα έδειξε, ωστόσο, μείωση της CRP (107), της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6, IL-1 και TNF-α) από μονοκύτταρα κύτταρα του αίματος και του TNF-α στον ορό (108) μετά από χορήγηση δίαιτας πλούσιας σε ALA - 6,5% της ενέργειας ALA, προερχόμενο από καρύδια (37 g), καρυδέλαιο (15 g) και λινέλαιο (13,5-20,3 g) - σε διάστημα 6 εβδομάδων. Κατανάλωση 15 ml λινελαίου για τρεις μήνες από δυσλιπιδαιμικούς άνδρες είχε ως αποτέλεσμα μείωση της CRP, του SAA και της IL-6 (109).

→ **Λινέλαιο και μόρια προσκόλλησης**

Έρευνα σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 51 έτη έδειξε ότι η κατανάλωση 15 mL λινελαίου την ημέρα για 12 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων του sVCAM-1 κατά 18,7% (110), ενώ άλλη έρευνα που χορήγησε την ίδια ποσότητα λινελαίου για το ίδιο χρονικό διάστημα σε δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς με διαφορετικούς γονότυπους της απολιποπρωτεΐνης E (γονίδια ε2, ε3, ε4) έδειξε ελάττωση των επιπέδων ορισμένων δεικτών φλεγμονής (SAA, CRP, M-CSF, IL-6) στους φορείς του γονότυπου ε3/ε3 και ε3/ε4 αλλά όχι στους φορείς του αλληλόμορφου ε2 (111).

→ **Λινέλαιο και αιμοστατικοί παράγοντες**

Μία έρευνα σε κουνέλια έδειξε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται τόσο από τη θρομβίνη όσο και από το ινωδογόνο αλλά όχι από την αδενοσίνη (112). Έρευνα σε ποντίκια δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές στους παράγοντες πήξης (παράγοντας II, V, VII-X και ινωδογόνο) (113). Η χορήγηση λινελαίου (5,9 g ALA/ημέρα) για 12 εβδομάδες αύξησε το χρόνο αιμορραγίας και τον αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων-1, μείωσε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την παραγωγή θρομβοξάνης B2 ενώ δεν είχε κάποια επίδραση στο ινωδογόνο (114).

→ **Λινέλαιο και αρτηριακή πίεση**

Το λινέλαιο δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη μείωση της αρτηριακής πίεσης, όπως προκύπτει από έρευνες σε ανθρώπους. Συγκεκριμένα, η χορήγηση λινελαίου (9,2 g ALA/ημέρα) για 6 εβδομάδες σε άτομα με αρτηριακή πίεση μεταξύ 112-138 mm Hg (συστολική) και 65-89 mm Hg (διαστολική) και ήπια υπερχοληστερολαιμία δεν είχε επίδραση στις τιμές της πίεσης (115).

→ **Λινέλαιο και αντιοξειδωτική δραστηριότητα**

Έρευνες σε πειραματόζωα είχαν ποικίλα αποτελέσματα που κυμαίνονταν από επιδείνωση, στασιμότητα ή βελτίωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, όπως φαίνεται από την επίδραση στη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η κατάλαση και η δισμουτάση του υπεροξειδίου (103).

Αν και δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στο λινέλαιο και την αθηροσκλήρυνση, ο λιναρόσπορος, ο λιναρόσπορος με χαμηλή περιεκτικότητα σε ALA, το FLC και το SDG φαίνεται να καταστέλλουν την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης. (103)

Επίδραση μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην Lp-PLA₂

Δύο ερευνητές έχουν μελετήσει ως τώρα, την επίδραση των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα επίπεδα της Lp-PLA₂. Ο Pedersen μελέτησε την επίδραση των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα επίπεδα του ενζύμου στο πλάσμα χρησιμοποιώντας ως εικονικό έλαιο το ελαιόλαδο. 60 υγιείς ενήλικες με μέση ηλικία τα 38 έτη χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, στις οποίες χορηγήθηκαν κάψουλες με μέτρια (2 g) ή υψηλή (6,6 g) δόση ω-3 λιπαρών οξέων ή ελαιόλαδο, αντίστοιχα, για 12 εβδομάδες. Τα επίπεδα του ενζύμου δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση των ω-3 λιπαρών οξέων και στις 3 ομάδες ενώ δεν διέφεραν και μεταξύ των ομάδων (116).

Ο Nelson μελέτησε την επίδραση των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και του α-λινολενικού οξέος στα επίπεδα και τη δραστηριότητα του ενζύμου στο πλάσμα χρησιμοποιώντας ως εικονικό έλαιο το ελαιόλαδο. 59 υγιείς ενήλικες με μέση ηλικία τα 61 έτη χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, στις οποίες χορηγήθηκαν ισοθερμιδική δίαιτα ενισχυμένη με εικοσαπενταενικό οξύ και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ στη μορφή του ιχθυέλαιου ή α-λινολενικό οξύ με τη μορφή του λινέλαιου ή ελαιόλαδο ως εικονικό φάρμακο, αντίστοιχα, για 8 εβδομάδες. Μετά το τέλος της παρέμβασης δεν σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα ή στη δραστηριότητα του ενζύμου, ωστόσο, υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στην οξειδωμένη LDL και τα επίπεδα του ενζύμου, προτείνοντας ότι

για να υπάρξει αλλαγή στη μάζα της Lp-PLA_2 απαιτείται τροποποίηση του μορίου της οξειδωμένης LDL (117).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ

Η καρδιαγγειακή νόσος εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου στις σύγχρονες κοινωνίες. Στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης εμπλέκονται οι μηχανισμοί του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής, οπότε κατάλληλη ρύθμιση τους θα έχει ως αποτέλεσμα μείωση του επιπολασμού της νόσου. Το είδος των λιπαρών οξέων της διατροφής πιστεύεται ότι μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής σε υγιείς εθελοντές, μειώνοντας – σε συνδυασμό με ένα υγιεινό τρόπο ζωής- τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η Lp-PLA₂ (Lipoprotein associated Phospholipase A₂) είναι μια εξειδικευμένη φωσφολιπάση που υδρολύει τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL και τα οποία εμφανίζουν ισχυρές προ-φλεγμονώδεις δράσεις. Επιδημιολογικές έρευνες αποδεικνύουν το ρόλο της Lp-PLA₂ ως ανεξάρτητο δείκτη της καρδιαγγειακής νόσου, παρόλα αυτά περιορισμένες μελέτες υπάρχουν για την επίδραση των διατροφικών συνηθειών στη δράση του ενζύμου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει και να συγκρίνει την επίδραση της παρέμβασης με ελαιόλαδο και λινέλαιο σε υγιείς εθελοντές σε δείκτες οξειδωτικού στρες και στη δράση της Lp-PLA₂

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Επιλογή εθελοντών και σχεδιασμός της μελέτης

Δείγμα

Το μέγεθος του δείγματος υπολογίστηκε με τη χρήση ανάλυσης ισχύος. Σύμφωνα με την ανάλυση ένα δείγμα 40 ατόμων θα εξασφάλιζε ισχύ περίπου στο 85% σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας αμφίπλευρων ελέγχων $\alpha=0,05$ για διαφορές μεγαλύτερες της μισής τυπικής απόκλισης στη συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης. Στη μελέτη εντάχθηκαν συνολικά 53 άτομα αλλά τη μελέτη ολοκλήρωσαν τελικά επιτυχώς 37. Το μέγεθος του τελικού δείγματος (37 άτομα) εξασφάλιζε στατιστική ισχύ μεγαλύτερη του 80%. Τα κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού από τη μελέτη περιγράφονται στον πίνακα 12.

Οι εθελοντές ενημερώθηκαν για τη μελέτη μέσω φυλλαδίου που αναρτήθηκε στους πίνακες ανακοινώσεων του Πανεπιστημίου και μέσω ηλεκτρονικού μηνύματος που διακινήθηκε από τους ερευνητές. Μετά την ενημέρωσή τους για το σχεδιασμό της μελέτης, ζητήθηκε έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους σε αυτή. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Στη μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 53 άτομα, ηλικίας 18-37 ετών, υγιείς, που είχαν Δείκτη Μάζας Σώματος $19,0-28,0 \text{ Kg/m}^2$ και δεν λάμβαναν συστηματική φαρμακευτική αγωγή ή συμπληρώματα διατροφής. Επίσης, ζητήθηκε από τους εθελοντές να έχουν σταθερό σωματικό βάρος ($\pm 1 \text{ Kg}$) τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της μελέτης. Από το αρχικό δείγμα της μελέτης αποχώρησαν συνολικά 16 άτομα. Οι λόγοι αποχώρησης των ατόμων αυτών ήταν οι ακόλουθοι: αδυναμία συμμόρφωσής τους με τις απαιτήσεις του πειραματικού σχεδιασμού (τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του λινέλαιου καθιστούσαν δύσκολη την καθημερινή κατανάλωσή του) για 14 από αυτούς, επιδείνωση των συμπτωμάτων ευερέθιστου εντέρου - από το οποίο ήδη έπασχε ένας εθελοντής - με την πρόσληψη του λινέλαιου και, τέλος, λόγω λάθος κατανόησης του πειραματικού σχεδιασμού ένας εθελοντής κατανάλωσε το έλαιο της παρέμβασης το μισό χρονικό διάστημα από το προβλεπόμενο.

Πίνακας 12: Κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού από τη μελέτη

Κριτήρια εισαγωγής	Κριτήρια αποκλεισμού
• Ηλικία 18-35 ετών • Φυσιολογικό σωματικό βάρος • Θα πρέπει να αναφέρεται σταθερό	• Διαβήτης, δυσλιπιδαιμίες, υπέρταση (ΑΠ>145/90mmHg), καρδιαγγειακές παθήσεις ή άλλα χρόνια νοσήματα-λοιμώξεις

σωματικό βάρος (± 1 Kg) τους 3 τελευταίους μήνες πριν την παρέμβαση. • Να είναι γενικά υγιείς.	• Άτομα που λαμβάνουν φάρμακα όπως: ➤ Αντιυπερτασικά ➤ Αντιλιπιδαιμικά ➤ Αντισυλληπτικά ➤ Μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη ➤ Πασίπινα ➤ Βιταμίνες και συμπληρώματα διατροφής συστηματικά (ιδιαίτερα τους 3 τελευταίους μήνες) • Έγκυες γυναίκες • Αθλητές
--	--

Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη ακολούθησε διασταυρούμενο πειραματικό σχεδιασμό. Αυτό σημαίνει ότι υπήρχαν ταυτόχρονα δύο ομάδες παρέμβασης με διαφοροποιήσεις που περιγράφονται στη συνέχεια. Στην πρώτη φάση της παρέμβασης, δόθηκαν οδηγίες στους εθελοντές ώστε να καταναλώνουν 15 ml ελαίου της παρέμβασης ημερησίως σε αντικατάσταση του συνήθους, σε μία δόση μαζί με το κύριο γεύμα για διάστημα 6 εβδομάδων. Στην ομάδα A, το έλαιο παρέμβασης ήταν το λινέλαιο ενώ στην ομάδα B λάμβαναν ελαιόλαδο. Μετά το πέρας της πρώτης φάσης, υπήρξε μία περίοδος 6 εβδομάδων, που ήταν ελεύθερη παρέμβασης, δηλαδή καμία από τις δύο ομάδες δεν κατανάλωνε κάποιο έλαιο. Έπειτα από αυτό το διάστημα, ακολούθησε η δεύτερη φάση της παρέμβασης όπου η ομάδα A κατανάλωνε ελαιόλαδο και η ομάδα B λινέλαιο για 6 εβδομάδες (πίνακας 13). Σε όλη τη διάρκεια της παρέμβασης, ακολουθήθηκε η συνήθης δίαιτα από τους εθελοντές χωρίς να τους ζητηθεί να κάνουν οποιαδήποτε αλλαγή πέρα από την πρόσληψη του εκάστοτε ελαίου.

Πίνακας 13: Σχεδιασμός της μελέτης

Ομάδα	Τύπος ελαίου	Χρονικό διάστημα
A	Λινέλαιο	1-6 εβδομάδες
B	Ελαιόλαδο	
Περίοδος ελεύθερη παρέμβασης (wash-out period)		7-12 εβδομάδες
A	Ελαιόλαδο	13-18 εβδομάδες
B	Λινέλαιο	

Στην προκαταρκτική συνάντηση πριν την έναρξη της παρέμβασης, ο εθελοντής:

- Ενημερωνόταν για το σχεδιασμό της μελέτης
- Ελεγχόταν ότι πληρούσε τα κριτήρια ένταξης
- Δήλωνε έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή του
- Λάμβανε τα απαραίτητα προς συμπλήρωση έγγραφα για την επόμενη συνάντηση
- Εκπαιδευόταν σε βασικές τεχνικές συμπλήρωσης ημερολογίου καταγραφής διαιτητικής πρόσληψης

Οι συνεδρίες στην αρχή και το τέλος κάθε παρέμβασης περιελάμβαναν τα εξής στοιχεία: ανθρωπομετρικές μετρήσεις, αιμοληψία, έλεγχο συμμόρφωσης, συμπλήρωση ερωτηματολογίου σωματικής δραστηριότητας, παραλαβή συμπληρωμένων ημερολογίων (πριν από κάθε αιμοληψία ζητήθηκε από τους εθελοντές να καταγράψουν τη διαιτητική τους πρόσληψη για 3 ημέρες). Στην πρώτη συνεδρία, συμπληρωνόταν επιπρόσθετα και ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ), ενώ στο τέλος κάθε περιόδου παρέμβασης συμπληρωνόταν ένα ερωτηματολόγιο αποδοχής του ελαίου παρέμβασης. Στον πίνακα 14, παρουσιάζονται αναλυτικά οι υποχρεώσεις ανά συνεδρία.

Πίνακας 14:Υποχρεώσεις ανά συνεδρία

Χρονοδιάγραμμα συνεδριών	Υποχρεώσεις
Προκαταρκτική συνάντηση, πριν την έναρξη της μελέτης	▪ Ενημέρωση εθελοντή για διάρκεια-τρόπο διεξαγωγής του πρωτοκόλλου ▪ Έλεγχος κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού στη μελέτη ▪ Έγγραφη συγκατάθεση ▪ Παράδοση στο συμμετέχοντα κενού ημερολογίου καταγραφής τροφίμων-εκπαίδευση τρόπου συμπλήρωσης
1 ^η συνάντηση (baseline)	▪ Παραλαβή συμπληρωμένου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων – έλεγχος από διαιτολόγο ελλείψεων-διευκρινήσεις ▪ Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ▪ Ερωτηματολόγιο σωματικής δραστηριότητας

	▪ Ύψος, βάρος, περιφέρειες μέσης-ισχίων ▪ Αιμοληψία-Φυγοκέντρωση-αποθήκευση ορού και πλάσματος στους -80°C. ▪ Παράδοση 1^{ου} ελαίου –ποσότητα για 6 εβδομάδες (~650 ml)-εκπαίδευση για τρόπο χορήγησης (ημερήσια ποσότητα σε μία δόση, παράλληλα με κύριο γεύμα)
7 ^η εβδομάδα (τέλος 1 ^{ης} φάσης παρέμβασης)	▪ Επιστροφή κενών δοχείων ελαίου από το συμμετέχοντα ▪ Παράδοση συμπληρωμένου ημερολογίου τροφίμων από το συμμετέχοντα-έλεγχος από διαιτολόγο ελλείψεων-διευκρινίσεις ▪ Ερωτηματολόγιο σωματικής δραστηριότητας ▪ Ύψος, βάρος, περιφέρειες μέσης-ισχίων ▪ Αιμοληψία-Φυγοκέντρωση-αποθήκευση ορού και πλάσματος στους -80°C. ▪ Παράδοση στο συμμετέχοντα νέου ημερολογίου καταγραφής προκειμένου να το φέρει συμπληρωμένο στην αρχή της 2^{ης} περιόδου παρέμβασης
Περίοδος κάθαρσης (Wash-out) (6 εβδομάδες)	
13 ^η εβδομάδα	▪ Παραλαβή συμπληρωμένου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων – έλεγχος από διαιτολόγο ελλείψεων-διευκρινήσεις ▪ Ερωτηματολόγιο σωματικής

	δραστηριότητας ▪ Ύψος, βάρος, περιφέρειες μέσης-ισχίων ▪ Αιμοληψία-Φυγοκέντρωση-αποθήκευση ορού και πλάσματος στους -80°C. ▪ Παράδοση 2^{ου} ελαίου –ποσότητα για 6 εβδομάδες (~650 ml)-εκπαίδευση για τρόπο χορήγησης
19 ^η εβδομάδα (τέλος μελέτης)	▪ Επιστροφή κενών δοχείων ελαίου από το συμμετέχοντα ▪ Παράδοση συμπληρωμένου ημερολογίου τροφίμων από το συμμετέχοντα-έλεγχος από διαιτολόγο ελλείψεων-διευκρινίσεις ▪ Ερωτηματολόγιο σωματικής δραστηριότητας ▪ Ύψος, βάρος, περιφέρειες μέσης-ισχίων ▪ Αιμοληψία-Φυγοκέντρωση-αποθήκευση ορού και πλάσματος στους -80°C.

Στους πίνακες 15 και 16 παρουσιάζονται η θρεπτική ανάλυση των δύο ελαίων της παρέμβασης σύμφωνα με τους παραγωγούς, καθώς και η σύστασή τους σε διάφορα λιπαρά οξέα, αντίστοιχα, όπως προσδιορίστηκε στο εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Πίνακας 15: Θρεπτική ανάλυση λινέλαιου και ελαιόλαδου παρέμβασης

Θρεπτικά συστατικά	Λινέλαιο (Flora, Canada) (100 ml)	Παρθένο ελαιόλαδο (Μινέρβα) (100 ml)
Ενέργεια (Kcal)	830	824
Πρωτεΐνες (g)	5	0
Υδατάνθρακες (g)	0	0
Λίπος (g)	92	92
Κορεσμένα λιπαρά οξέα (g)	8	13
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (g)	20	73
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (g)	61	6
Ω-3 λιπαρά οξέα (g)	49	Δεν υπάρχουν δεδομένα
Ω-6 λιπαρά οξέα (g)	12	Δεν υπάρχουν δεδομένα
Χοληστερόλη (mg)	0	0
Φυτικές ίνες (g)	0	0
Νάτριο (mg)	0	0

Πίνακας 16: Η ανάλυση των λιπαρών οξέων των δύο ελαίων και για τις δύο ομάδες, όπως προκύπτει από αναλύσεις του εργαστηρίου Χημείας, Βιοχημείας και Φυτικοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Λιπαρό οξύ	Λινέλαιο	Ελαιόλαδο
14:0	0,04	0,02
15:0	0,02	0,00
16:0	5,00	11,05
16:1ω9t	0,01	
16:1 ω9	0,03	0,14
16:1 ω7	0,08	0,75
17:0	0,06	0,05
18:0	3,95	2,67
18:1ω9c	20,05	75,11
18:1 ω7	0,52	1,31
18:1others	0,00	0,01
18:2 trans	0,05	0,02
18:2ω6cc	15,10	6,23
18:3ω3	54,16	0,85
20:0	0,00	0,32
20:1ω9	0,17	0,33
20:2ω6	0,03	0,00
22:0	0,17	0,17
24:0	0,09	0,06

Αξιολογήσεις

Ανθρωπομετρία

▪ Ύψος-βάρος

Οι εθελοντές ζυγίστηκαν με ελαφρύ ρουχισμό, χωρίς υποδήματα σε ζυγό με ενσωματωμένο αναστημόμετρο, που είχε ακρίβεια 0,5 Kg. Το ύψος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm με τα πόδια ενωμένα και το “Frankfurt plane” του κεφαλιού σε οριζόντια θέση παράλληλα με το έδαφος. Το “Frankfurt plane” του κεφαλιού αποτελεί την οριζόντια γραμμή που εκτείνεται από το κάτω άκρο της κόγχης του ματιού και το μέσο της μύτης ως το μέσο περίπου του αυτιού. Ο Δείκτης Μάζας Σώματος υπολογίστηκε ως το πηλίκο του βάρους (Kg) προς το ύψος² (m²).

▪ Περιφέρειες

Οι περιφέρειες μέσης και ισχίων μετρήθηκαν με ακρίβεια 0,1 cm, με τη χρήση πλαστικής μεζούρας. Ως περιφέρεια μέσης μετρήθηκε η μικρότερη δυνατή περιφέρεια στη μέση ενώ ως περιφέρεια ισχίων η μεγαλύτερη περιφέρεια στο ύψος των γλουτών. Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίστηκε και ο λόγος περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων.

Αξιολόγηση χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής (δίαιτα-σωματική δραστηριότητα)

▪ Αξιολόγηση διαιτητικής πρόσληψης

Οι διαιτητικές συνήθειες αξιολογήθηκαν με τη χρήση ενός ημιποσοτικοποιημένου Ερωτηματολογίου Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων (ΕΣΚΤ/FFQ) και ενός 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής διαιτητικής πρόσληψης πριν από κάθε αιμοληψία.

Η δομή του ΕΣΚΤ ήταν η ακόλουθη:

- 10 κατηγορίες τροφίμων (γαλακτοκομικά, φρούτα, λαχανικά, κρέατα, δημητριακά-αρτοσκευάσματα, όσπρια, γλυκά, αναψυκτικά, αλκοολούχα ποτά και άλλα τρόφιμα) με 76 τρόφιμα συνολικά.
- Έγχρωμο Μεριδολόγιο, όπου απεικονίζονταν εικόνες τροφίμων σε δύο (μικρή, μεγάλη), τρεις (μικρή, μεσαία, μεγάλη) και τέσσερις (πολύ μικρή, μικρή, μεσαία, μεγάλη) προζυγισμένες μερίδες, ανάλογα με το είδος του τροφίμου. Οι εθελοντές προσδιόριζαν την ποσότητα από κάθε τρόφιμο που κατανάλωναν, δείχνοντας την αντίστοιχη εικόνα ή συνδυασμό εικόνων.

Το ερωτηματολόγιο ήταν αυτοσυμπληρούμενο, εκτός από τη συμπλήρωση των ποσοτήτων, τις οποίες συμπλήρωνε ο διαιτολόγος μετά την υπόδειξη του εθελοντή με τη χρήση του Μεριδολογίου. Το συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο βασίστηκε σε αντίστοιχο των Willet et al (118).

Όσον αφορά το 3ήμερο ημερολόγιο καταγραφής, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες στη μελέτη να καταγράψουν τη διαιτητική τους πρόσληψη για τρεις ημέρες-δύο καθημερινές και μία μέρα από το Σαββατοκύριακο-πριν από κάθε αιμοληψία. Ο προσδιορισμός των ποσοτήτων έγινε με τη χρήση ζυγού, οικιακών μεζούρων (κούπες, κουτάλια κ.ά.) και κοινώς γνωστών αντικειμένων όπως σπιρτόκουτο, τράπουλα κ.ά. Για τη σωστή συμπλήρωση του ημερολογίου έγινε εκπαίδευση από διαιτολόγο στην αρχή του πρωτοκόλου, πριν την πρώτη αιμοληψία, ενώ κάθε φορά γινόταν έλεγχος του ημερολογίου από το διαιτολόγο για τυχόν ασάφειες-παραλείψεις. Στο συγκεκριμένο στάδιο, χρησιμοποιήθηκε και το Μεριδολόγιο ως μέτρο εκτίμησης των ποσοτήτων.

Από το ΕΣΚΤ υπολογίστηκαν η κατανάλωση ομάδων τροφίμων-σε ισοδύναμα ή μικρομερίδες- και το Σκορ Μεσογειακής Διατροφής (MedDiet Score), όπως παρουσιάζεται από τους Panagiotakos et al (84).

Με τη χρήση του προγράμματος Nutritionist Pro (Axxya Systems LLC 2007) έγινε η ανάλυση των ημερολογίων καταγραφής, από το οποίο υπολογίστηκαν ο μέσος όρος των τριών ημερών για τα ακόλουθα στοιχεία: ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη, ημερήσια πρόσληψη πρωτεϊνών, υδατανθράκων, ολικού λίπους, κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και αλκοόλης. Για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα υπολογίστηκε επιπρόσθετα η μέση ημερήσια πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων, ως πρόσληψη λινελαϊκού οξέος, και η μέση ημερήσια πρόσληψη α-λινολενικού οξέος, εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA) και δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA). Επιπλέον, υπολογίστηκε η μέση ημερήσια πρόσληψη των βιταμινών A, E και C, σεληνίου και διαιτητικών ινών.

▪ Αξιολόγηση σωματικής δραστηριότητας

Χρησιμοποιήθηκε ένα ερωτηματολόγιο σωματικής δραστηριότητας, σχεδιασμένο και αξιολογημένο για την αξιοπιστία του από το εργαστήριο Κλινικής Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου(119). Σε αυτό υπολογίζεται η ημερήσια και εβδομαδιαία κατανάλωση ενέργειας με τη βοήθεια των MET. Οι ερωτήσεις που περιλαμβάνει κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες. Στην πρώτη, καταγράφεται η φυσική δραστηριότητα στην εργασία, στη δεύτερη η φυσική δραστηριότητα στο σπίτι, στην τρίτη αναφέρεται η φυσική δραστηριότητα στις κοινωνικές εκδηλώσεις (σινεμά, καφέ, χορός, βόλτα με φίλους) ενώ η τέταρτη αφορά τη συστηματική άσκηση.

Αξιολόγηση μη συμμόρφωσης

Η συμμόρφωση των εθελοντών αξιολογήθηκε με τους παρακάτω τρόπους:

- Ογκομέτρηση και άθροισμα του εναπομείναντος ελαίου σε καθεμία από τις κενές φιάλες που επιστρεφόταν από τους εθελοντές κάθε τρεις εβδομάδες σε συνδυασμό με προφορική εκτίμηση της κατανάλωσης από τους εθελοντές. Συνολικός όγκος μικρότερος από 100 mL αποτελεί δείκτη καλής συμμόρφωσης. Εθελοντές που δεν είχαν καλή συμμόρφωση σταματούσαν να συμμετέχουν στη μελέτη και τα στοιχεία τους διαγράφονταν από τη βάση δεδομένων.
- Σε κάθε αιμοληψία, εκτός από την απομόνωση ορού και πλάσματος, πραγματοποιήθηκε και απομόνωση ερυθροκυττάρων και φύλαξη αυτών σε βαθιά κατάψυξη για τον προσδιορισμό της ενσωμάτωσης σε αυτά των λιπαρών οξέων της παρέμβασης. Η επιλογή των ερυθροκυττάρων βασίζεται στην ικανότητα τους να αποτελούν καλό δείκτη της εκτίμησης της διαιτητικής πρόσληψης των λιπαρών οξέων για το διάστημα των τελευταίων 3 μηνών. Η σύσταση των ερυθροκυττάρων σε λιποειδή ποικίλει ανάλογα με το είδος των λιπαρών οξέων που προσλαμβάνονται από την τροφή. Με χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) ελέγξαμε τη σύσταση των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα και με χρήση εσωτερικού προτύπου (internal standard) πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της σύστασης των λιπαρών οξέων που απορροφήθηκε από τις μεμβράνες. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, έδωσε ως αποτέλεσμα την περιεκτικότητα των μεμβρανών σε κάθε λιπαρό οξύ και εκτιμήθηκε κατά πόσο υπερτερούσαν τα λιπαρά οξέα του ελαίου που καταναλώθηκε σε κάθε περίοδο.

Βιοχημικές και ανοσολογικές αναλύσεις

Αιμοληψία και διαχείριση δειγμάτων

Οι αιμοληψίες γίνονταν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο μεταξύ 9:00-10:00 μετά από 12ωρη νηστεία. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για παραλαβή ορού και πλάσματος από μέρος του δείγματος. Από το υπόλοιπο δείγμα, μέσω ειδικών κατεργασιών απομονώνονταν ερυθρά αιμοσφαίρια και πλάσμα πλούσιο σε λευκοκύτταρα. Μετά από τις κατεργασίες τα δείγματα φυλάσσονταν σε βαθιά κατάψυξη (- 80 ° C).

Βιοχημικοί δείκτες

Στο πλαίσιο προηγούμενων μελετών είχαν μετρηθεί στον πληθυσμό της μελέτης οι ακόλουθοι βιοχημικοί δείκτες: ολική χοληστερόλη, LDL χοληστερόλη, HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γλυκόζη νηστείας, αδιπονεκτίνη, TNF και CRP. Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ και τα επίπεδα της MDA στο πλάσμα.

Μέτρηση Lp-PLA₂

Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας της εξωκυτταρικής PAF-AH χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Διάλυμα Tris-HCl/EGTA), το οποίο περιέχει:
 - 1mM EGTA
 - 0.1M Tris-HCl pH 7.2
- Διάλυμα 1mM DTNB σε Tris-HCl. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στο σκοτάδι στους 0°C για 8 ώρες και παρασκευάζεται την ημέρα που χρησιμοποιείται.
- Διάλυμα αποθήκευσης υποστρώματος 2.5μg/μl (4.63mM) thio-PAF: εξατμίζεται μέχρι ξηρού το διάλυμα της συσκευασίας, το οποίο περιέχει 5mg thio-PAF. Στη συνέχεια, αναδιαλύεται σε 2ml αιθανόλης και μοιράζεται σε κατάλληλο αριθμό eppendorfs, τα οποία περιέχουν 130μl διαλύματος. Σε κάθε aliquot περιέχονται 325μg thio-PAF. Τα aliquots φυλάσσονται στους -80° C μέχρι την ενζυμική δοκιμασία.
- Διάλυμα εργασίας υποστρώματος 198.5μM thio-PAF: λαμβάνεται 1 aliquot stock διαλύματος thio-PAF. Εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το περιεχόμενο αναδιαλύεται σε 3mL buffer. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C για μια εβδομάδα.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής:

- Τοποθέτηση των κατάλληλων ποσοτήτων ρυθμιστικού διαλύματος 1, διαλύματος DTNB και ορού σε ELISA plate. Η προσθήκη 170μl διαλύματος υποστρώματος, στη συνέχεια, έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της αντίδρασης (πίνακας 12).
- Ανακίνηση για 30 sec και καταγραφή του χρόνου εκκίνησης (t=0) της αντίδρασης.
- Φωτομέτρηση στα 405 nm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 min μετά την εκκίνηση ώστε να κατασκευαστεί καμπύλη.

Πίνακας 17: Ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Buffer (μl)	Ορός (μl)	DTNB (μl)	Διάλυμα υποστρώματος (μl)
Τυφλό	15	-	40	170
Δείγμα	5	10	40	170

Η δραστηρότητα του ενζύμου υπολογίζεται ως εξής:

Αρχικά προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό. Αυτό πραγματοποιείται με επιλογή δύο σημείων (t_1 και t_2) από την καμπύλη $Abs=f(t)$ της ενζυμικής δοκιμασίας και υπολογισμό της μεταβολής της απορρόφησης, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta A_{405} / \text{min} = \frac{A_{405}^{t_2} - A_{405}^{t_1}}{t_2 - t_1}$$

Έπειτα, προσδιορίζεται η $\Delta A_{405}/\text{min}$ για το τυφλό και αφαιρείται από αυτή των δειγμάτων.

Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας της PAF-AH χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος. Η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το συντελεστή ϵ του DTNB. Μια μονάδα (unit) του ενζύμου υδρολύει 1 μmol 2-thio PAF ανά λεπτό στους 25° C.

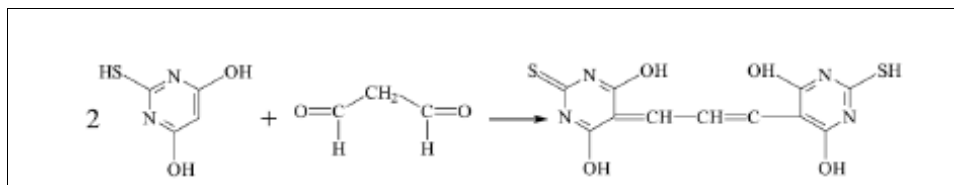
$$\text{Activity} = \frac{\Delta A_{405} / \text{min}}{\epsilon_{405}^{\text{DTNB}} \times l} \times \frac{V_{\text{assay}}}{V_{\text{enzyme}}} \times (\text{sample dilution})$$

Όπου $\epsilon_{414}=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{405}=12.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $l=0.784 \text{ cm}$ (η οπτική διαδρομή), $V_{\text{assay}}=0.225\text{mL}$, $V_{\text{enzyme}}=0.01\text{mL}$.

Η δραστηριότητα εκφράζεται σε $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

Μέτρηση συστατικών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)

Η μέτρηση του οξειδωτικού στρες στα μόρια των λιποειδών έγινε με τη μέθοδο TBARS. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση (σχήμα 10) ανάμεσα στη μηλονική διαλδεύδη (MDA) - ένα από τα κύρια προϊόντα της λιποειδικής υπεροξειδωσης - και το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), κατά την οποία παράγεται το έγχρωμο μόριο TBA- MDA, που προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 17: Η αντίδραση του TBA με το MDA προς σχηματισμό TBA- MDA

Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και διαλύματα:

- Όργανα
 - Φυγόκεντρος
 - Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Διαλύματα
 - Διάλυμα HCl 0,01M
 - Διάλυμα NaOH 0,1N
 - Διάλυμα BHT (5 μM)
 - Διάλυμα Φωσφορικού οξέος 0,2M

- Διάλυμα TBA 0,11M
- Πρότυπο διάλυμα MDA 200μM
- Διάλυμα Φωσφορικού οξέος H_3PO_4 85%
- Βουτανόλη

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη αντιδραστηρίων σε πλαστικούς σωλήνες: 100 μ L ορού ή 200 μ L πρότυπου διαλύματος MDA ή απεσταγμένου νερού (τυφλός προσδιορισμός), 25 μ L BHT (5μM), 200 μ L φωσφορικό οξύ 0,2M και 25 μ L TBA 0,11M.
- Έντονη ανάδευση και παραμονή στους 90°C για 60 λεπτά.
- Τοποθέτηση στο ψυγείο (4°C) για 10 λεπτά.
- Προσθήκη 500 μ L βουτανόλης, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 10 λεπτά, για το διαχωρισμό των δύο φάσεων.
- Παραλαβή της πάνω φάσης (βουτανολική φάση) και μεταφορά σε καινούριους σωλήνες.
- Φυγοκέντρηση της βουτανολικής φάσης σε 12000 rpm για 10 λεπτά.
- Παραλαβή του υπερκειμένου σε κυψελίδες φωτομέτρου και μέτρηση της απορρόφησης στα 535 nm.

Να σημειωθεί ότι γινόταν καινούρια καμπύλη αναφοράς σε κάθε ημέρα ανάλυσης και ότι πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της MDA στα δείγματα ορού έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς και έχει εκφραστεί ως μ M.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των στοιχείων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 18.0. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων της παρέμβασης έγιναν με βάση την Ανάλυση Διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA. Οι συγκρίσεις μεταξύ των τιμών στην αρχή και τη λήξη κάθε παρέμβασης έγινε με τη χρήση του κριτηρίου Student's t-test για ζευγαρωτές μεταβλητές. Για τον έλεγχο της κανονικότητας των μεταβλητών του δείγματος έγινε το τεστ Kolmogorov- Smirnof. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές ως απόλυτες τιμές ή συχνότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής των εθελοντών

Από τα 37 άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη, 8 ήταν άνδρες και 29 γυναίκες, ηλικίας $25,6 \pm 5,9$ ετών. Ο Δείκτης Μάζας Σώματος ήταν φυσιολογικός ενώ και η περιφέρεια μέσης και το πηλίο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων ήταν ενδεικτικά μη κεντρικής κατανομής του σωματικού λίπους και στις δύο χρονικές στιγμές που έγιναν οι μετρήσεις, καθιστώντας τα άτομα σε χαμηλού κινδύνου για εμφάνιση παθήσεων που σχετίζονται με την παχυσαρκία.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής, το 21,6% των εθελοντών ήταν καπνιστές. Σχετικά με τις διατροφικές συνήθειες, το Σκορ Μεσογειακής Διατροφής ήταν 34 ± 4 (τα όρια του σκορ κυμαίνονται από 0-55: 0-20 χαμηλή προσκόλληση, 21-35 μέτρια προσκόλληση, 36-55 υψηλή προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή), ενώ η ημερήσια ενεργειακή κατανάλωση ανέρχεται στις 2016 ± 323 και 2003 ± 386 Kcal/ημέρα, αντίστοιχα για τις δύο χρονικές στιγμές πριν από κάθε παρέμβαση. Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες, είναι εμφανές ότι οι εθελοντές ήταν γενικά υγιείς, όπως προβλέπεται και από τα κριτήρια ένταξης, με φυσιολογικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και ένα σχετικά υγιεινό τρόπο ζωής.

Στους πίνακες 18 και 19 παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής, αντίστοιχα, πριν από κάθε παρέμβαση.

Πίνακας 18: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν από κάθε παρέμβαση

	Λινέλαιο		Ελαιόλαδο		
Μεταβλητή	Ελάχιστη - μέγιστη τιμή	Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	Ελάχιστη - μέγιστη τιμή	Μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση	p-value
Βάρος (Kg)	51,0-98,0	$61,8 \pm 10,0$	52,0-100,0	$62,1 \pm 10,2$	
Ύψος (m)	1,5-1,9	$1,7 \pm 0,1$	1,5-1,9	$1,7 \pm 0,1$	
BMI (Kg/m ²)	18,0-28,1	$21,9 \pm 2,5$	18,0-28,1	$21,9 \pm 2,6$	0,853
Περιφέρεια μέσης (cm)	63,0-95,0	$77,1 \pm 8,7$	64,0-96,0	$76,9 \pm 8,3$	0,910
Πηλίο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων	0,7-0,9	$0,78 \pm 0,07$	0,7-0,9	$0,8 \pm 0,07$	0,714

Πίνακας 19: Χαρακτηριστικά τρόπου ζωής

	Λινέλαιο		Ελαιόλαδο		
Μεταβλητή	Ελάχιστη - μέγιστη τιμή	Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	Ελάχιστη - μέγιστη τιμή	Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	p-value
Φυσική δραστηριότητα (Kcal)	1537-2759	2016±323	1528-3187	2003±386	0,87
Med Diet Score	26-44	34±4	26-44	34±4	

Βιοχημικοί δείκτες πριν από κάθε παρέμβαση

Στους πίνακες 20 και 21 αναγράφονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν από κάθε παρέμβαση. Συγκεκριμένα, στον πίνακα 20 σημειώνονται οι βιοχημικοί δείκτες της ολικής, της LDL και της HDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης και ορισμένων δεικτών φλεγμονής (hsCRP, TNF, αδιπονεκτίνη) (πίνακας 20), ενώ στον πίνακα 21 παρουσιάζονται οι δείκτες που μετρήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης πτυχιακής (Lp-PLA₂ και TBARS). Και στους δύο πίνακες, οι βιοχημικοί δείκτες δεν διαφέρουν μεταξύ των ομάδων (p>0,05).

Πίνακας 20: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την κατανάλωση του ελαίου παρέμβασης

	Λινέλαιο		Ελαιόλαδο		
Βιοχημικός δείκτης	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή	Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή	Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	p-value
Χοληστερόλη (mg/dl)	120-242	179±29	117-234	172±27	0,34
LDL (mg/dl)	55-157	104±25	58-160	99±23	0,44
HDL (mg/dl)	39-101	64±13	35-101	60±14	0,61
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	31-159	65±27	34-152	62±21	0,63
Γλυκόζη (mg/dl)	72-104	87±7	76-101	86±7	0,65
hsCRP (mg/L)	0,16-3,8	0,54±0,7	0,16-6,0	0,67±1,0	0,55
TNF (pg/ml)	1,68-17,5	3,90±3,6	1,66-16,3	3,83±3,6	0,93
Αδιπονεκτίνη (μg/ml)	3,37-8,8	6,22±1,3	3,93-9,7	6,47±1,2	0,41

Πίνακας 21: Τα επίπεδα της Lp-PLA₂ και των TBARS πριν από κάθε παρέμβαση

	Λινέλαιο		Ελαιόλαδο		p-value
	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή	Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή	Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	
Lp-PLA ₂ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)	0,0079-0,0362	0,0238±0,0056	0,0066-0,0392	0,0239±0,0061	0,95
TBARS (MDA, μM)	0,23-1,11	0,77±0,21	0,43-1,49	0,7401±0,22	0,51

Οι συσχετίσεις μεταξύ των βιοχημικών δεικτών πριν από κάθε παρέμβαση για κάθε έλαιο ήταν οι ακόλουθες:

Λινέλαιο

Η Lp-PLA₂ σχετίζεται θετικά με:

- τα τριγλυκερίδια ($p=0,018$, $r=0,392$) και
- τη γλυκόζη ($p=0,04$, $r=0,471$)

Τα TBARS σχετίζονται θετικά με:

- τα τριγλυκερίδια ($p=0,014$, $r=0,408$) και
- τον TNF ($p=0,039$, $r=0,346$)

Ελαιόλαδο

Η Lp-PLA₂ σχετίζεται θετικά με τη γλυκόζη ($p=0,01$, $r=0,510$) και αρνητικά με την HDL ($p=0,015$, $r= - 0,414$). Για τα TBARS δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βιοχημικών δεικτών.

Σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο παρεμβάσεων

Όπως αναφέρθηκε στο κομμάτι της μεθοδολογίας, διαπιστώθηκε η συμμόρφωση των εθελοντών στην κατανάλωση των ελαίων. Η διαφορά στη σύσταση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων σε ALA πριν και μετά την παρέμβαση με λινέλαιο είναι στατιστικά σημαντική ($p<0,01$) ενώ η παρέμβαση με ελαιόλαδο δεν έφερε κάποια αλλαγή στη σύσταση ($p=0,554$), όπως και αναμενόταν.

Λινέλαιο

Στους πίνακες 22 και 23 παρουσιάζονται οι τιμές των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών και των βιοχημικών δεικτών, αντίστοιχα, πριν και μετά την παρέμβαση με λινέλαιο.

Πίνακας 22: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση με λινέλαιο

	ΠΙΠΙΝ	META	p-value
BMI (Kg/m ²)	21,8± 2,5	21,8± 2,6	0,95
Περιφέρεια μέσης (cm)	77,1 ± 8,7	77,4 ± 8,6	0,14
Πηλίκιο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων	0,77± 0,068	0,78± 0,065	0,14

Πίνακας 23: Βιοχημικοί δείκτες των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση με λινέλαιο

	ΠΙΠΙΝ	META	p-value
Χοληστερόλη (mg/dl)	179±29	170,1±24,5	0,005
LDL (mg/dl)	104±25	97,2±23,4	0,004
HDL (mg/dl)	62±13	60,8±13,3	0,45
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	65±27	60,44±19,09	0,18
Γλυκόζη (mg/dl)	87±7	86,6±6,9	0,70
hsCRP (mg/L)	0,54±0,7	1,3±3,7	0,16
TNF (pg/ml)	3,90±3,6	3,7±3,7	0,93
Αδιπονεκτίνη (μg/ml)	6,22±1,3	6,2±1,2	0,27
Lp-PLA2 (μmol/min/ml)	0,0238±0,0056	0,023±0,006	0,33
TBARS (μM)	0,77±0,21	0,71±0,15	0,042

Ελαιόλαδο

Στους πίνακες 24 και 25 παρουσιάζονται οι τιμές των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών και των βιοχημικών δεικτών, αντίστοιχα, πριν και μετά την παρέμβαση με ελαιόλαδο.

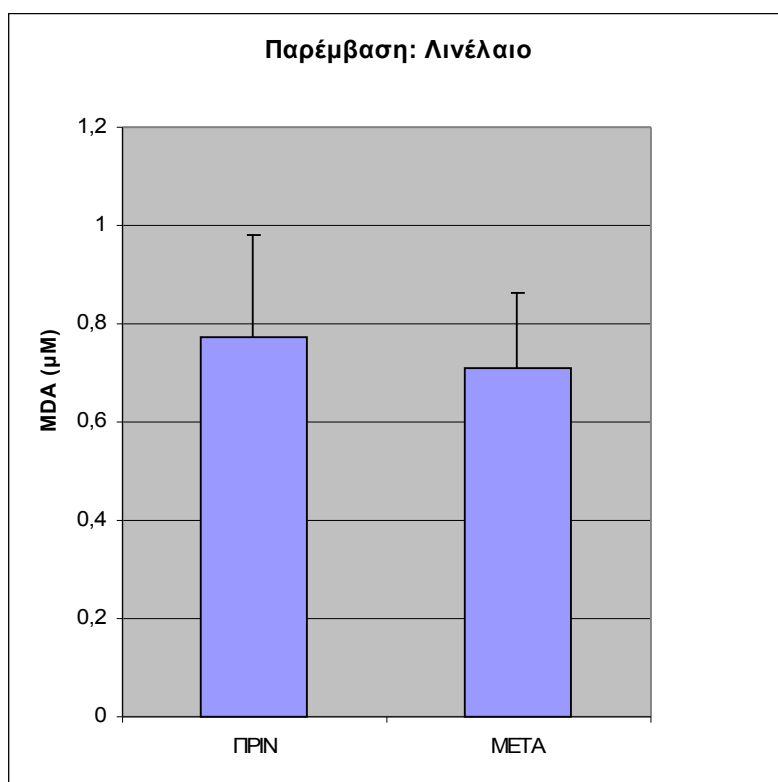
Πίνακας 24: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση με ελαιόλαδο

	ΠΙΠΙΝ	META	p-value
BMI (Kg/m ²)	21,9±2,6	21,8±2,61	0,007
Περιφέρεια μέσης (cm)	76,9±8,3	77,45±8,63	0,60
Πηλίκιο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων	0,80±0,07	0,78±0,07	0,54

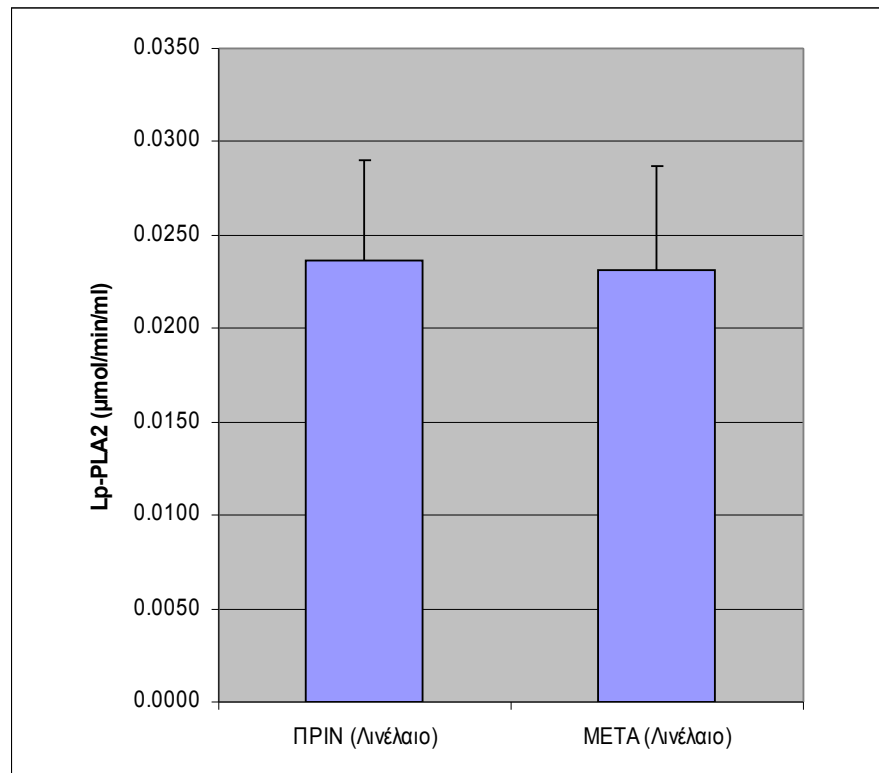
Πίνακας 25: Βιοχημικοί δείκτες των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση με ελαιόλαδο

	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	p-value
Χοληστερόλη (mg/dl)	172±27	173±26	0,70
LDL (mg/dl)	99±23	100±23	0,77
HDL (mg/dl)	60±14	60,00±13,2	0,84
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	63±22	67±22	0,31
Γλυκόζη (mg/dl)	86±7	85±5	0,29
hsCRP (mg/L)	0,67±1,0	0,47±0,4	0,24
TNF (pg/ml)	3,83±3,6	3,78±3,7	0,66
Αδιπονεκτίνη (μg/ml)	6,47±1,2	6,43±1,3	0,79
Lp-PLA2 (μmol/min/ml)	0,0239±0,006	0,024±0,006	0,44
TBARS (μM)	0,74±0,22	0,79±0,21	0,23

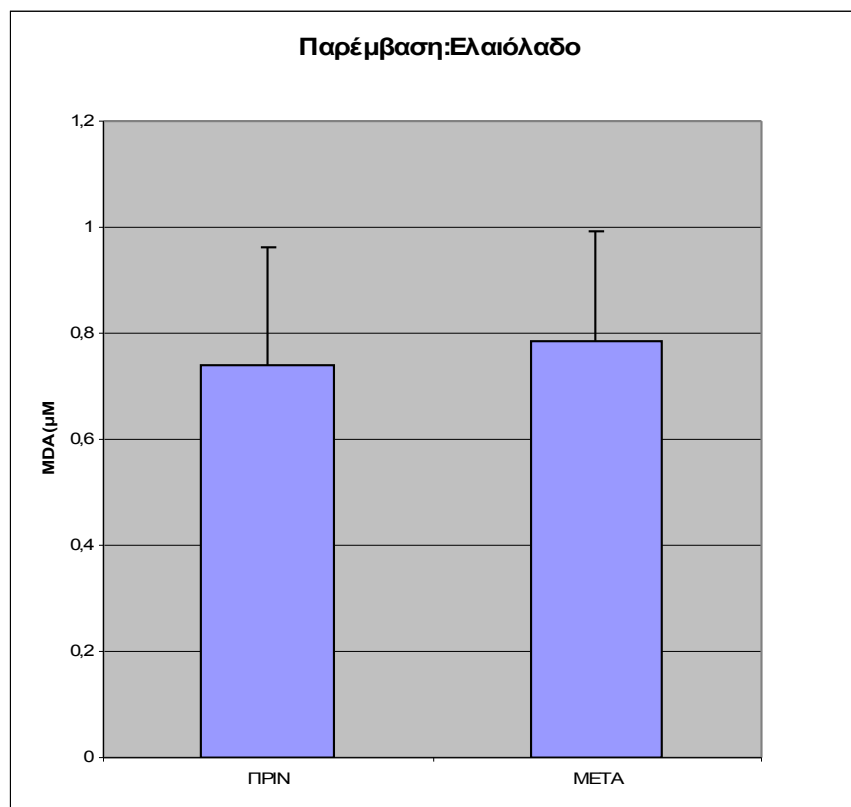
Στις εικόνες 18, 19, 20 και 21 φαίνεται σχηματικά η επίδραση του λινελαίου και του ελαιολάδου στο MDA και στην Lp-PLA₂.



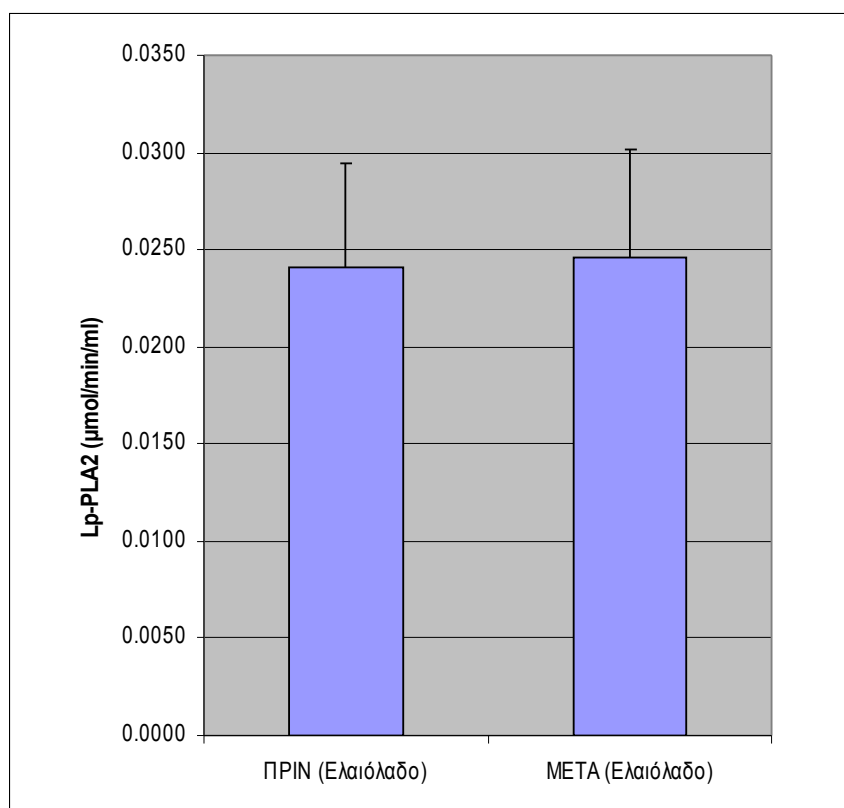
Εικόνα 18: Τα επίπεδα της MDA πριν και μετά την παρέμβαση με λινέλαιο (p=0,042).



Εικόνα 19: Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ πριν και μετά την παρέμβαση με λινέλαιο (p=0,33)



Εικόνα 20: Τα επίπεδα της MDA πριν και μετά την παρέμβαση με ελαιόλαδο (p=0,23).



Εικόνα 21: Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ πριν και μετά την παρέμβαση με ελαιόλαδο (p=0,44)

Καμία από τις δύο παρεμβάσεις δεν επηρέασε τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ (p=0,33 και p=0,44 για λινέλαιο και ελαιόλαδο, αντίστοιχα) ενώ όσον αφορά το MDA μείωση επήλθε στα επίπεδα των TBARS μόνο στην ομάδα του λινελαίου (p=0,042) σε αντίθεση με την ομάδα του ελαιολάδου (p=0,23). Ομοίως, οι δείκτες φλεγμονής TNF, αδιπονεκτίνη και CRP δεν είχαν σημαντική στατιστικά διαφορά.

Στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (BMI, περιφέρεια μέσης, πηλίκο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων) δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά εκτός από το BMI, το οποίο μειώθηκε μετά την παρέμβαση με ελαιόλαδο (p=0,007). Τέλος, η ολική χοληστερόλη και η LDL μειώθηκαν μετά από την παρέμβαση με λινέλαιο (p=0,005 και p=0,004, αντίστοιχα), ενώ δεν επηρεάστηκαν η HDL, τα τριγλυκερίδια και η γλυκόζη νηστείας. Η παρέμβαση με ελαιόλαδο δεν επέφερε κάποια αλλαγή στους βιοχημικούς δείκτες.

Οι συσχετίσεις μεταξύ των βιοχημικών δεικτών μετά από κάθε παρέμβαση για κάθε έλαιο ήταν οι ακόλουθες:

Λινέλαιο

Η Lp-PLA₂ σχετίζεται θετικά με τα τριγλυκερίδια ($p=0,03$, $r=0,479$), τη χοληστερόλη ($p=0,05$, $r=0,320$) και την LDL-χοληστερόλη ($p=0,011$, $r=0,417$). Για τα TBARS δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βιοχημικών δεικτών.

Ελαιόλαδο

Η Lp-PLA₂ σχετίζεται θετικά με τη γλυκόζη ($p=0,03$, $r=0,361$) και τα τριγλυκερίδια ($p=0,046$, $r=0,335$) και αρνητικά με την HDL ($p=0,001$, $r= - 0,526$). Για τα TBARS δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βιοχημικών δεικτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο όσο και στη χώρα μας. Ειδικότερα, η αθηροσκλήρυνση των στεφανιαίων αρτηριών, μία από τις βασικότερες συνιστώσες στην εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου, είναι μία εν δυνάμει αναστρέψιμη κατάσταση, καθώς η γενετική προδιάθεση και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν εξίσου στην εμφάνισή της. Το φλεγμονώδες και οξειδωτικό υπόβαθρο της αθηροσκλήρυνσης έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για μείωση των συγκεκριμένων παραμέτρων και βελτίωση της καρδιαγγειακής λειτουργίας. Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης κυρίως μέσω της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας από ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικά ένζυμα ή ιόντα μετάλλων. Η φλεγμονή - στα πλαίσια της αθηροσκλήρυνσης - περιλαμβάνει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μονοκύτταρα, μακροφάγα καθώς και τα αιμοπετάλια και τους μεσολαβητές της φλεγμονής (κυτταροκίνες, πρωτεΐνες οξείας φάσης, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, λιποειδικοί μεσολαβητές) να συμμετέχουν σε μία σειρά αλληλένδετων γεγονότων σε κάθε στάδιο της αθηροσκληρυντικής βλάβης.

Από τους σημαντικότερους λιποειδικούς μεσολαβητές είναι ο PAF. Έχει αναγνωριστεί ως ισχυρό μοριακό σήμα με φυσιολογικό και παθοφυσιολογικό ρόλο. Η σύνθεσή του από κύτταρα που συναντώνται στις αθηροσκληρυντικές αλλοιώσεις των αρτηριών όπως είναι τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αφρώδη κύτταρα και τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα να επιδρά με ποικίλες δράσεις στα ίδια κύτταρα από τα οποία δημιουργήθηκε προκαλώντας εκ νέου την παραγωγή του. Πρόκειται, δηλαδή, για μία αμφίδρομη σχέση μεταξύ του PAF και των άλλων μορίων της φλεγμονής.

Η Lp-PLA₂, το ένζυμο που διασπά τον PAF καθώς και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL, είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός καινοφανής βιοχημικός δείκτης καρδιαγγειακής νόσου, καθώς τα αυξημένα επίπεδά της στον ορό του αίματος αντανακλούν ενδοαγγειακή φλεγμονή ενώ μένουν σταθερά σε περιπτώσεις συστηματικής φλεγμονής. Γι'αυτό έχει προταθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει σαν ένα συμπληρωματικό στοιχείο στην παραδοσιακή εκτίμηση κινδύνου σε ασθενείς με μέτριο ή υψηλό δεκαετή κίνδυνο. Επίσης, έχει μελετηθεί η δράση κλασικών φαρμάκων της υπολιπιδαιμικής θεραπείας στα επίπεδα του ενζύμου ενώ μελετάται και μία νέα κατηγορία φαρμάκων (αναστολέας της ενζυμικής δραστηριότητας της Lp-PLA₂), που μπορεί να δράσει συμπληρωματικά προς τις καθιερωμένες υπολιπιδαιμικές θεραπείες.

Ωστόσο, το πρώτο στάδιο κάθε θεραπευτικής προσέγγισης περιλαμβάνει αλλαγές στον τρόπο ζωής, με τη διατροφή και την άσκηση να κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο. Το είδος των

λιπαρών οξέων της διατροφής σχετίζεται, όπως αναφέρθηκε, με την παθογένεια της νόσου. Τα ω-3 λιπαρά οξέα που προέρχονται από τα ψάρια έχουν μελετηθεί εκτενώς για την καρδιοπροστατευτική τους δράση. Ωστόσο, οι έρευνες με τα φυτικής προέλευσης ω-3 λιπαρά οξέα (και συγκεκριμένα το απαραίτητο λιπαρό οξύ ALA) οδηγούν σε ασαφή αποτελέσματα. Όσον αφορά τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, βασικό θεραπευτικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής, θεωρήθηκαν ότι είναι από τους παράγοντες που συμβάλουν στη μειωμένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακή νόσο στις μεσογειακές χώρες.

Το λινέλαιο αποτελεί πλούσια πηγή ALA ενώ το ελαιόλαδο περιέχει κυρίως μονοακόρεστα λιπαρά οξέα με το ελαϊκό οξύ να κυριαρχεί και ποικιλία μικροσυστατικών με αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι έρευνες που μελετούν την επίδραση των συγκεκριμένων ελαίων στους δείκτες MDA και Lp-PLA₂ είναι περιορισμένες τόσο στους ανθρώπους όσο και στα πειραματόζωα. Επομένως, η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τη διερεύνηση και τη σύγκριση της επίδρασης της παρέμβασης με ελαιόλαδο και λινέλαιο σε δείκτες οξειδωτικού στρες και στην δράση του ενζύμου Lp-PLA₂. Στη συνέχεια συγκρίνονται τα ευρήματα της συγκεκριμένης έρευνας για τους βιοχημικούς δείκτες που παρουσιάστηκαν στα αποτελέσματα με αυτές άλλων ερευνών τόσο πριν όσο και μετά την παρέμβαση.

Πριν την παρέμβαση, οι τιμές των βιοχημικών δεικτών του λιπιδαιμικού και γλυκαιμικού προφίλ ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Συγκεκριμένα, η ολική, η LDL και η HDL χοληστερόλη είχαν τιμές < 200 , < 160 και > 40 mg/dl, αντίστοιχα ενώ οι τιμές των τριγλυκεριδίων και της γλυκόζης ήταν < 150 και < 100 mg/dl, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τους δείκτες φλεγμονής, μόνο για την hsCRP έχουν γίνει επίσημες συστάσεις βάσει των οποίων ταξινομούνται τα άτομα σε χαμηλού, μέτριου και υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου με επίπεδα hsCRP της τάξης < 1 mg/dl, $1-3$ mg/dl και > 3 mg/dl, αντίστοιχα (120). Για το δείγμα της μελέτης, τα επίπεδα αυτά κυμαίνονταν σε $0,54 \pm 0,73$ mg/dl και $0,67 \pm 1,06$ mg/dl στην ομάδα του λινελαίου και ελαιολάδου, αντίστοιχα, κατατάσσοντας τα άτομα στις δύο πρώτες κατηγορίες.

Τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης, μιας αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης που εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα, είναι $6,2 \pm 1,3$ μg/ml και $6,5 \pm 1,3$ μg/ml, αντίστοιχα για την ομάδα του λινελαίου και ελαιολάδου. Επίσης, οι τιμές του TNF είναι $3,9 \pm 3,6$ pg/ml στην ομάδα του λινελαίου και $3,8 \pm 3,6$ pg/ml στην ομάδα του ελαιολάδου. Από ένα δείγμα της μελέτης «ATTICA» που περιελάμβανε ενήλικες που δεν είχαν καρδιαγγειακή νόσο, επιλέχθηκε τυχαία ένα μικρότερο δείγμα 532 ανδρών και γυναικών ηλικίας 42 ± 11 ετών και εξετάστηκε πως σχετίζεται η μακρόχρονη προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή με τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης μετρήθηκε και ο TNF. Χρησιμοποιώντας το MedDiet Score το

δείγμα χωρίστηκε σε τρεις ομάδες, χαμηλή προσκόλληση (0-20), μέτρια προσκόλληση (21-35) και υψηλή προσκόλληση (36-55) στη Μεσογειακή Διατροφή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο υψηλότερη είναι η προσκόλληση τόσο αυξημένα είναι τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης και μειωμένα τα επίπεδα του TNF. Συγκρίνοντας τις τιμές των συγκεκριμένων δεικτών φλεγμονής που προέρχονται από την ομάδα της μέτριας προσκόλλησης (αδιπονεκτίνη: $3,6 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$, TNF: $7,3 \pm 4,2 \text{ pg/ml}$) με αυτές της παρούσας μελέτης είναι εμφανές ότι οι τελευταίες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης και χαμηλότερα επίπεδα TNF. Η επιλογή της συγκεκριμένης ομάδας προσκόλλησης έγινε γιατί προσεγγίζει αυτή των εθελοντών της παρέμβασης με τα δύο έλαια (Med Diet Score = $33,9 \pm 4,03$). Το αποτέλεσμα της σύγκρισης μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το δείγμα της μελέτης «ΑΤΤΙΚΑ» ήταν μεγαλύτερης ηλικίας, υπέρβαρο και εμφάνιζε υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία και σε μικρότερο ποσοστό διαβήτη (86). Σε άλλη έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών σχημάτων διατροφής στα επίπεδα της αδιπονεκτίνης πλάσματος. Το δείγμα αποτελούνταν από 196 φαινομενικά υγιείς γυναίκες, ηλικίας $48,3 \pm 12,3$ ετών. Οι τιμές αδιπονεκτίνης ήταν $16,8 \pm 6,8 \mu\text{g/ml}$, αρκετά υψηλότερες από αυτές των εθελοντών αυτής της μελέτης, αν και ήταν μεγαλύτερης ηλικίας και υπέρβαρες, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από το διατροφικό πρότυπο που ακολουθούσαν οι γυναίκες της μελέτης και περιελάμβανε υψηλή κατανάλωση δημητριακών ολικής άλεσης και χαμηλών σε λίπος γαλακτοκομικών προϊόντων και χαμηλή κατανάλωση επεξεργασμένων δημητριακών (121).

Σχετικά με τη δραστικότητα της Lp-PLA₂, τα επίπεδα της στους εθελοντές είναι $0,0238 \pm 0,0056 \mu\text{mol/min/ml}$ και $0,0239 \pm 0,0061 \mu\text{mol/min/ml}$ πριν την παρέμβαση με λινέλαιο και ελαιόλαδο, αντίστοιχα. Σύγκρισή τους με αυτές άλλων ερευνών δείχνει παρόμοιες στην δραστικότητα του ενζύμου. Για παράδειγμα η δραστικότητα του ενζύμου βρέθηκε ότι είναι $0,0248 \pm 0,0045 \mu\text{mol/min/ml}$ σε δείγμα 52 ανδρών χωρίς καρδιαγγειακή νόσο στους οποίους εξετάστηκε η επίδραση της σύστασης του σώματος στη δραστικότητα του ενζύμου. Οι ελαφρώς υψηλότερες τιμές μπορούν να εξηγηθούν από τη μεγαλύτερη ηλικία ($43,7 \pm 13,3$ ετών) και το υψηλότερο BMI αυτών ($27,4 \pm 3,8 \text{ Kg/m}^2$) ενώ οι 48 γυναίκες που συμμετείχαν στην ίδια μελέτη εμφάνιζαν χαμηλότερες τιμές ($0,0196 \pm 0,005 \mu\text{mol/min/ml}$) (122). Σε δείγμα 28 παχύσαρκων μη διαβητικών γυναικών ηλικίας $41,5 \pm 11,1$ ετών, στις οποίες ερευνήθηκε η επίδραση της απώλειας βάρους στη δραστικότητα της Lp-PLA₂, οι τιμές αυτές ήταν αυξημένες τόσο πριν ($0,049 \pm 0,016 \mu\text{mol/min/ml}$) όσο και μετά ($0,044 \pm 0,013 \mu\text{mol/min/ml}$) την απώλεια βάρους (69).

Από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι η Lp-PLA₂ σχετίζεται θετικά με τα τριγλυκερίδια, τη γλυκόζη, την ολική και την LDL χοληστερόλη στην ομάδα του λινελαίου ενώ σχετίζεται αρνητικά με την HDL χοληστερόλη και θετικά με τη γλυκόζη και τα τριγλυκερίδια στην ομάδα

παρέμβασης με το ελαιόλαδο. Οι συσχετίσεις για τα τριγλυκερίδια, την LDL και την HDL χοληστερόλη συμφωνούν με αυτά άλλων ερευνών, ωστόσο άλλοι παράγοντες που έχουν θετική συσχέτιση με τη δραστικότητα του ενζύμου είναι η ηλικία, η απολιποπρωτεΐνη B και το BMI (68, 69, 122).

Όσον αφορά τα TBARS, πραγματοποιήθηκε μία μεγάλη έρευνα σε τυχαίο δείγμα του πληθυσμού σε δύο διαφορετικές περιοχές της δυτικής Νέας Υόρκης κατά το διάστημα 1996-1998, όπου μελετήθηκαν τα επίπεδα διαφόρων δεικτών οξειδωτικού στρες. Το δείγμα αποτελούνταν από 894 άνδρες και 903 γυναίκες ηλικίας $58,6 \pm 11$ ετών και $57,3 \pm 10,4$ ετών, αντίστοιχα. Οι τιμές των TBARS ήταν $1,4 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/L}$ για τους άνδρες και $1,3 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/L}$ για τις γυναίκες. Τα TBARS σχετίστηκαν θετικά με τα τριγλυκερίδια, το BMI και τη γλυκόζη αίματος και για τα δύο φύλα, ενώ μόνο στις γυναίκες υπήρξε θετική συσχέτιση και με την ολική χοληστερόλη (123). Σε μία έρευνα που έγινε σε δύο περιοχές της Καλιφόρνια κατά το έτος 1998-1999 μετρήθηκαν οι τιμές της MDA με χρήση TBARS σε 298 υγιείς ενήλικες ηλικίας $46,6 \pm 13,6$ ετών. Οι τιμές της ήταν $0,81 \pm 0,55$ $\mu\text{mol/L}$ και εμφάνιζαν ισχυρή συσχέτιση με τη CRP και την ολική χοληστερόλη (124). Το αποτέλεσμα της τελευταίας μελέτης προσεγγίζει τις τιμές των TBARS της παρούσας μελέτης ($0,77 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/L}$ και $0,74 \pm 0,22$ $\mu\text{mol/L}$, για λινέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα) ενώ η πρώτη έρευνα προφανώς έχει μεγαλύτερες τιμές λόγω της μεγαλύτερης ηλικίας των εθελοντών. Τα TBARS της ομάδας του λινελαίου σχετίζονται θετικά με τα τριγλυκερίδια και τον TNF.

Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι οι εθελοντές της μελέτης εμφανίζουν ένα καλό βιοχημικό προφίλ όσον αφορά τους λιπιδαιμικούς και τους φλεγμονώδεις δείκτες και τον οξειδωτικό δείκτη MDA.

Τα αποτελέσματα της παρέμβασης με τα δύο έλαια έδειξαν μία στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των TBARS και των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης μετά από την παρέμβαση με το λινέλαιο, ενώ το ελαιόλαδο σχετίστηκε με μείωση του BMI. Οι έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με τη λήψη λινελαίου και την επίδρασή του στο δείκτη λιποξειδικής υπεροξειδωσης MDA, μετρούμενο με τη μέθοδο των TBARS, περιορίζονται στα πειραματόζωα. Ένας άλλος σημαντικός δείκτης λιποξειδικής υπεροξειδωσης είναι οι F2-ισοπροστανίνα. 36 υγιείς άνδρες ηλικίας 51 ± 2 έτη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στις οποίες χορηγήθηκαν 9 g λινελαίου ή ελαιολάδου την ημέρα με τη μορφή κάψουλας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των F2-ισοπροστανίων στο πλάσμα και στα ούρα μεταξύ των δύο παρεμβάσεων. Το μοναδικό εύρημα της έρευνας ήταν η αύξηση των επιπέδων των F1-φυτοπροστανίων, που αποτελούν προϊόντα οξείδωσης του ALA, στην ομάδα του λινελαίου, προφανώς λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς του πλάσματος σε ALA ή/και της

παρουσίας F1-φυτοπροστανίων στο λινέλαιο (125). Σε μία διπλά τυφλή, κλινική μελέτη του 2008, χορηγήθηκαν τέσσερα διαφορετικά έλαια (ιχθυέλαιο, λινέλαιο, έλαιο σπόρου κάνναβης και εικονικό έλαιο το ηλιέλαιο) σε 86 υγιείς εθελοντές με μέση ηλικία τα 34 έτη με σκοπό να μελετηθεί η επίδρασή τους στο λιπιδαιμικό προφίλ, στην οξειδωση της LDL, σε φλεγμονώδεις δείκτες (CRP, TNF) και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Οι εθελοντές λάμβαναν 2 κάψουλες του 1 g η καθεμία για διάστημα 12 εβδομάδων. Στην κάψουλα του λινελαίου περιέχονταν 511 mg ALA. Σε καμία παρέμβαση δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην αντίσταση της LDL στην οξειδωση (lag time) και στους άλλους δείκτες που μελετήθηκαν (126). Πρέπει να σημειωθεί ότι μελέτες σε πειραματόζωα που τους έχουν χορηγηθεί έλαια πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα έχουν δείξει αυξημένο οξειδωτικό στρες (TBARS) σε ιστούς όπως η καρδιά και το ήπαρ όπου λαμβάνει χώρα σε μεγάλο ποσοστό η ενσωμάτωση των ω-3 λιπαρών οξέων (127).

Σχετικά με την επίδραση του λινελαίου στα λιποειδή του πλάσματος, έρευνα σε κουνέλια δεν έδειξε κάποια διαφοροποίηση στα λιποειδή του ορού (ολική χοληστερόλη, LDL χοληστερόλη, HDL χοληστερόλη και τριγλυκερίδια) ή στην έκταση της υπερχοληστερολαιμικής αθηροσκλήρυνσης μετά τη χορήγηση λινελαίου. Στα πλαίσια αυτής της έρευνας, μελετήθηκε και η MDA πλάσματος που δεν επηρεάστηκε από την κατανάλωση λινελαίου. Συγκεκριμένα, τα κουνέλια χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες με τα εξής χαρακτηριστικά: η ομάδα I είναι η ομάδα ελέγχου όπου καταναλώνει τη συνήθη δίαιτα, η ομάδα II καταναλώνει τη συνήθη δίαιτα με προσθήκη 5% λινελαίου, η ομάδα III περιλαμβάνει υπερχοληστερολαιμική δίαιτα (0,5% χοληστερόλη) και η ομάδα IV υπερχοληστερολαιμική δίαιτα με προσθήκη λινελαίου (0,5% χοληστερόλη και 5% λινέλαιο) (104).

Μία άλλη μελέτη ερευνήσε τη χορήγηση 3 g ALA με τη μορφή λινελαίου σε κάψουλα στις λιποπρωτεΐνες του ορού χρησιμοποιώντας ως placebo κάψουλες ελαιολάδου. Ο πληθυσμός της μελέτης ήταν 49 ασθενείς χρόνιων ασθενειών αφροαμερικανικής προέλευσης και η διάρκεια της παρέμβασης 26 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της LDL και HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στις δύο ομάδες ενώ αυξήθηκε η ολική χοληστερόλη στην ομάδα του λινελαίου (128).

Σχετικά με τη δραστικότητα της Lp-PLA₂, η μοναδική έρευνα που έχει γίνει για τη μελέτη της επίδρασης του α-λινολενικού οξέος του λινελαίου στα επίπεδα και τη δραστικότητα του ενζύμου Lp-PLA₂ στο πλάσμα χρησιμοποιώντας ως εικονικό έλαιο το ελαιόλαδο είναι αυτή από τον Nelson. 59 υγιείς ενήλικες-ελεύθεροι διαβήτη, καρδιαγγειακής νόσου και άλλων φλεγμονωδών καταστάσεων-με μέση ηλικία τα 61 έτη χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, στις οποίες χορηγήθηκαν ισοθερμιδική δίαιτα ενισχυμένη με κάψουλες που περιείχαν εικοσαπενταενικό οξύ και δοκοσαεξαενοϊκό οξύ στη μορφή του ιχθυελαίου (2 g EPA/DHA και 9 g ελαιόλαδο) ή α-

λινολενικό οξύ με τη μορφή του λινέλαιου (11 g) ή ελαιόλαδο ως εικονικό φάρμακο (11 g), αντίστοιχα, για 8 εβδομάδες. Οι τιμές της δραστηριότητας του ενζύμου ήταν αυξημένες σε σχέση με αυτές της παρούσας μελέτης πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι οι εθελοντές ήταν ηλικιωμένοι. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των ομάδων στη δραστηριότητα του ενζύμου (117).

Τέλος, ένα άλλο εύρημα της συγκεκριμένης εργασίας είναι η στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους στην ομάδα του ελαιολάδου. Σε δείγμα της ελληνικής μελέτης EPIC μελετήθηκε η προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή σε σχέση με το βάρος, που έδειξε ότι οι δύο αυτές μεταβλητές δεν σχετίζονταν μεταξύ τους (129) ενώ άλλη μελέτη από την Ισπανία έδειξε ότι η προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή σχετίζεται αντίστροφα με το BMI (130).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η παρέμβαση με λινέλαιο βελτιώνει το δείκτη λιποειδικής υπεροξειδωσης MDA. Αντίθετα η δραστηριότητα της Lp-PLA2 δεν επηρεάζεται από την παρέμβαση με λινέλαιο και ελαιόλαδο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. World Health Organization 2006, Highlights on health in Greece 2004, (http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/103220/GRE_Highlights.pdf)
2. World Health Organization, Fact sheet No 317, January 2011, (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>)
3. Demopoulos A. Constantinos, Karantonis C. Haralabos, Smaragdi Antonopoulou, Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 705–716
4. Gutteridge John, Halliwell Barry, Antioxidants in nutrition, health and disease, Oxford University Press 1994
5. Ross R.: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115-126
6. Fishbein A. Gregory, Fishbein C. Michael, Arteriosclerosis Rethinking the Current Classification, *Arch Pathol Lab Med*—Vol 133, August 2009
7. Μελιδώνης Ανδρέας, Καρδιομεταβολικός Κίνδυνος, Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, 2007
8. Stocker Roland, Keaney F. John, Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis, *Physiol Rev* 84:1381–1478, 2004
9. Ferri Nicola, Paoletti Rodolfo, Corsini Alberto, Biomarkers for atherosclerosis: pathophysiological role and pharmacological modulation, *Current Opinion in Lipidology* 2006, 17:495–501
10. Papas M. Andreas, Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health, CRC Press, 1999
11. Surh Young-Joon, Packer Lester, Oxidative stress, inflammation and health, Taylor and Francis Group, 2005
12. Halliwell Bary, Biochemistry of oxidative stress, Biochemical Society Transactions (www.biochemsoctrans.org), The authors journal compilation, 2007 Biochemical Society
13. Durackova Z., Some Current Insights into Oxidative Stress, *Physiol. Res.* 59: 459-469, 2010
14. Halliwell Bary, Cross E. Carrol, Oxygen – derived species: their relation to human disease and environmental stress, *Environ Health Perspect* 102(suppl 10):5-12(1994)

15. Gracy R.W.,Talent J.M., Kong Y., Conrad C.C.,Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?, *Mutation Research* 428 (1999) 17-22
16. Darley-USmar Victor, Halliwell Bary, Blood Radicals: Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal Ions and the Vascular System, *Pharmaceutical Research* Vol. 13, No 5, 1996
17. Halliwell Bary, Phagocyte-derived reactive species:salvation or suicide?, *Trends in Biochemical Sciences* Vol.31 No.9, 2006
18. Δημόπουλος Κ.,Αντωνοπούλου Σ., Βασική Βιοχημεία, 2^η έκδοση, ΑΘΗΝΑ 2009
19. Buonocore Giuseppe, Perrone Serafina, Tataranno Maria Luisa, Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15 (2010) 186-190
20. Jomova K., Valko M.,Advances in metal-induced oxidative stress and human disease,*Toxicology*(2011),doi:10.1016/j.tox.2011.03.001
21. Young I S,Woodside J V, Antioxidants in health and disease,*J Clin Pathol* 2001;54:176-186
22. Stohs S.J., Bagchi D., Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free radical, Biology and Medicine*,Vol.18,No. 2,pp. 321-336,1995
23. Dröge W., Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002
24. Benzie F. F. Iris,Evolution of antioxidant defence mechanisms, *Eur J Nutr* 39 : 53–61 (2000)
25. Pratt A. Derek, Tallman A. Keri, Porter A. Ned, Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks, *Accounts of chemical research* 2011 April 12 (Epub ahead of print)
26. Gropper Sareen, Smith Jack, Groff James, Διατροφή και μεταβολισμός 2, ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2008
27. Halliwell Bary, Gutteridge John, The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Molec. Aspects Med.* Vol. 8, pp. 89-193, 1985
28. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87: 315-424, 2007

29. Radi Rafael, Peluffo Gonzalo, Alvarez Noel Mari'a, Naviliat Mercedes, Cayota Alfonso, Unraveling peroxynitrite formation in biological systems, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 30, No. 5, pp. 463–488, 2001
30. Packer Michael , Scarlett Jared, Martin Stephen, Peroxynitrite: A Biologically Significant Oxidant, *Gen. Pharmac.* Vol. 31, No. 2, pp. 179–186, 1998
31. Gropper Sareen, Smith Jack, Groff James, Διατροφή και μεταβολισμός 1, ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007
32. Flora Swaran, Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:4, 191-206; September/October 2009
33. Calder P.C., Albers R., Antoine J.M., Blum S., Bourdet-Sicard R., Ferns G.A., Folkerts G.,Friedmann P.S., Frost G.S.,Guarner F., Lovik M., Macfarlane S., Meyer P.D.,M'Rabet L., Serafini M., van Eden W., van Loo J., Vas Dias W.,Vidry S.,Winklhofer-Roob B.M., Zhao J., Inflammatory disease processes and interactions with nutrition, *British Journal of Nutrition*, Vol.101, Supplement No.S1 May 2009
34. Fraga G. Cesar, Galleano Monica, Verstraeten V. Sandra, Oteiza I. Patricia, Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols, *Molecular Aspects of Medicine* 31 (2010) 435–445
35. Biesalski K. Hans, Polyphenols and inflammation: basic interactions, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2007, 10:724–728
36. Evans Patricia, Halliwell Barry, Micronutrients: oxidant/antioxidant status, *British Journal of Nutrition* (2001), 85, Suppl. 2, S67-S74
37. Niki E. , Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo, *Free Radical Biology & Medicine* 49 (2010) 503–515
38. Nomikos Tzortzis, Fragopoulou Elizabeth, Antonopoulou Smaragdi, Food Ingredients and Lipid Mediators, *Current Nutrition & Food Science*, 2007, 3, 255-276
39. Karasawa Ken, Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1761 (2006) 1359–1372
40. Evangelou A.M.,Platelet Activating Factor (PAF): Implications for Coronary Heart and Vascular Diseases, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (1994) 50, 1-28

41. Marathe K. Gopal, Zimmermann A. Guy, Prescott M. Stephen , McIntyre M. Thomas, Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL, *Vascular Pharmacology* 38 (2002) 193-200
42. Marathe K. Gopal, Prescott M. Stephen, Zimmermann A. Guy, McIntyre M. Thomas, Oxidized LDL Contains Inflammatory PAF-Like Phospholipids, *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:139-142
43. Berliner A. Judith, Lipid oxidation products and atherosclerosis, *Vascular Pharmacology* 38 (2002) 187– 191
44. Rouis Mustapha, Nigon Fabienne, Chapman John, Platelet activating factor is a potent stimulant of the production of active oxygen species by human monocyte-derived macrophages, *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 156, No. 3, 1988
45. Tselepis D. Alexandros, Chapman M. John, Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase, *Atherosclerosis Supplements* 3 (2002) 57-/68
46. Zimmermann A. Guy, Prescott M. Stephen , McIntyre M. Thomas, Oxidatively Fragmented Phospholipids as Inflammatory Mediators: The Dark Side of Polyunsaturated Lipids, *J. Nutr.* 125: 1661S-1665S, 1995
47. Marathe K. Gopal, Harrison A. Kathleen, Murphy C. Robert, Prescott M. Stephen, Zimmermann A. Guy, McIntyre M. Thomas, Bioactive Phospholipid Oxidation Products, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol 28, No. 12, pp. 1762-1770, 2000
48. Yoshida Hiroshi, Kisugi Reiko, Mechanisms of LDL oxidation, *Clinica Chimica Acta* 411 (2010) 1875–1882
49. Gaut P. Joseph, Heinecke W. Jay, Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11:103-112
50. Witztum J., Steinberg D., The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does It Hold for Humans, *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11:93–102
51. Troxler M., Dickinson K. and Homer-Vanniasinkam S., Platelet function and antiplatelet therapy, *British Journal of Surgery* 2007; 94: 674–682
52. Burke E. John, Dennis A. Edward, Phospholipase A2 Biochemistry, *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009 February; 23(1): 49

53. Schaloske Ralph, Dennis Edward, The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system, *Biochimica et Biophysica Acta* 1761 (2006) 1246–1259
54. Karabina Sonia-Athina, Ninio Ewa Plasma PAF-acetylhydrolase: An unfulfilled promise?, *Biochimica et Biophysica Acta* 1761 (2006) 1351–1358
55. Karasawa Ken, Harada Ayako, Satoh Noriko, Inoue Keizo, Setaka Morio, Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH), *Progress in Lipid Research* 42 (2003) 93–114
56. Tellis Constantinos, Tselepis Alexandros, The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma, *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (2009) 327–338
57. Sudhir Krishnankutty, Lipoprotein-associated phospholipase A2, vascular inflammation and cardiovascular risk prediction, *Vascular Health and Risk Management* 2006;2(2) 153–156
58. Epps K., Wilensky R., Lp-PLA2 – a novel risk factor for high-risk coronary and carotid artery disease, *J InternMed* 2011;269: 94–106
59. Colley K., Wolfert R., Cobble M., Lipoprotein associated phospholipase A2: role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk, *EPMA Journal* (2011) 2:27–38
60. Thompson A., Gao P., Orfei L., Watson S., Di Angelantonio E., Kaptoge S., Ballantyne C., Cannon C., Criqui M., Cushman M., Hofman A., Packard C., Thompson S., Collins R., Danesh J., The Lp-PLA2 Studies Collaboration, Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies, *Lancet*. 2010 May 1; 375(9725): 1536–1544
61. Lavi S., McConnell J., Rihal C., Prasad A., Mathew V., Lerman L., Lerman A., Local Production of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Lysophosphatidylcholine in the Coronary Circulation: Association With Early Coronary Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Humans, *Circulation* 2007;115;2715-2721
62. Lerman A., McConnell J., Lipoprotein-Associated Phospholipase A2: A Risk Marker or a Risk Factor?, *Am J Cardiol* 2008;101[suppl]: 11F–22F
63. Nambi Vijay, Ballantyne Christie, Lipoprotein-associated Phospholipase A₂: Pathogenic Mechanisms and Clinical Utility for Predicting Cardiovascular Events, *Current Atherosclerosis Reports* 2006, 8:374-381

64. Sudhir Krishnankutty, Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, a Novel Inflammatory Biomarker and Independent Risk Predictor for Cardiovascular Disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005 90:3100-3105
65. Madjid M., Ali M., Willerson J., Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 as a Novel Risk Marker for Cardiovascular Disease; A Systematic Review of the Literature, *Tex Heart Inst J* 2010;37(1):25-39
66. Garza C., Montori V., McConnell J., Somers V., Kullo I., Lopez-Jimenez F., Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review, *Mayo Clin Proc.* 2007;82(2):159-165
67. Davidson M., Corson M., Alberts M., Anderson J., Gorelick P., Jones P., Lerman A., McConnell J., Weintraub H., Consensus Panel Recommendation for Incorporating Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Testing into Cardiovascular Disease Risk Assessment Guidelines, *Am J Cardiol* 2008; 101[suppl]:51F–57F
68. Hatoum Ida, Nelson Jeanenne, Cook Nancy, Hu Frank, Rimm Eric, Dietary, lifestyle, and clinical predictors of lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity in individuals without coronary artery disease, *Am J Clin Nutr* 2010;91:786–93
69. Tzotzas T., Filippatos T., Triantos A., Bruckert E., Tselepis A., Kiortsis D., Effects of a low-calorie diet associated with weight loss on lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in healthy obese women, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2008) 18, 477-482
70. Reddy K., Singh M., Batsell R., Bangit J., Miraskar R., Zaheer M., Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Mass Is Significantly Reduced in Dyslipidemic Patients Treated With Lifestyle Modification and Combination Lipid-Modifying Drug Therapy, *Prev Cardiol.* 2010;13:130–134
71. Ζαμπέλας Αντώνιος, Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία παθολογίας, τόμος 1, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007
72. Astrup A., Dyerberg J., Elwood P., Hermansen K., Hu F., Jakobsen M., Kok F., Krauss R., Lecerf J., LeGrand P., Nestel P., Rise'rus U., Sanders T., Sinclair A., Stender S., Tholstrup T., Willett W., The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010?, *Am J Clin Nutr* 2011;93:684–8

73. Saremi A., Arora R., The Utility of Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease, *American Journal of Therapeutics* 16, 421–436 (2009)
74. Russo G., Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention, *biochemical pharmacology* 77 (2009) 937–946
75. Psota T., Gebauer S., Kris-Etherton P., Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk, *Am J Cardiol* 2006;98[suppl]:3i–18i
76. Gazi I., Liberopoulos E., Saougos V., Elisaf M., Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids: The Current Evidence, *Hellenic J Cardiol* 47: 223-231, 2006
77. Lorgeril M., Salen P., Alpha-linolenic acid and coronary heart disease, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2004) 14:162-169
78. Wang C., Harris W., Chung M., Lichtenstein A., Balk E., Kupelnick B., Jordan H., Lau J., n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review, *Am J Clin Nutr* 2006;84:5–17
79. Erkkila A., de Mello V., Rise'rus U., Laaksonen D., Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach, *Progress in Lipid Research* 47 (2008) 172–187
80. Gillingham L., Harris-Janz S., Jones P., Dietary Monounsaturated Fatty Acids Are Protective Against Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease Risk Factors, *Lipids* (2011) 46:209–228
81. Bach A. , Serra-Majem L., Carrasco J., Roman B., Ngo J., Bertomeu I., Obrador B., The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review, *Public Health Nutrition*: 9(1A), 132–146
82. Trichopoulou A.,Kouris-Blazos A.,Wahlqvist M.,Gnardellis C., Laggiou P.,Polychronopoulos E.,Vassilakou T.,Lipworth L., Trichopoulos D., Diet and overall survival in elderly people, *BMJ* 1995;311:1457-60
83. Trichopoulou A., Costacou T.,Bamia C. , Trichopoulos D., Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population, *N Engl J Med* 2003;348:2599-608
84. Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Arvaniti F., Stefanadis C., Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and

obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore, Preventive Medicine 44 (2007) 335–340

85. Kavouras S., Panagiotakos D., Pitsavos C., Chrysoshoou C., Arnaoutis G., Skoumas Y., Stefanadis C., Physical Activity and Adherence to Mediterranean Diet Increase Total Antioxidant Capacity: The ATTICA Study, Cardiology Research and Practice Volume 2011, Article ID 248626
86. Fragopoulou E., Panagiotakos D., Pitsavos C., Tampourlou M., Chrysoshoou C., Nomikos T., Antonopoulou S., Stefanadis C., The association between adherence to the Mediterranean diet and adiponectin levels among healthy adults: the ATTICA study, Journal of Nutritional Biochemistry 21 (2010) 285–289
87. Chrysoshoou C., Panagiotakos D., Pitsavos C., Das U., Stefanadis C., Adherence to the Mediterranean Diet Attenuates Inflammation and Coagulation Process in Healthy Adults The ATTICA Study, J Am Coll Cardiol 2004;44: 152–8
88. Trichopoulou Antonia, Bamia Christina, Trichopoulos Dimitrios, Anatomy of health effects of Mediterranean diet: Greek EPIC prospective cohort study, BMJ 2009; 338:b2337
89. Perez-Jimenez F., Ruano J., Perez-Martinez P., Lopez-Segura F., Lopez-Miranda J., The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone, Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1199 – 1208
90. Perona J., Cabello-Moruno R., Ruiz-Gutierrez V., The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function, Journal of Nutritional Biochemistry 17 (2006) 429–445
91. Boskou Dimitrios, Olive Oil Chemistry and Technology, AOCS Press, 1996
92. Fito Montserrat, Torre Rafael, Covas Maria-Isabel, Olive oil and oxidative stress, Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1215-1224
93. Huang Christina, Sumpio Bauer, Olive oil, the Mediterranean diet and cardiovascular health, J Am Coll Surg Vol 207, No 3, September 2008
94. Lo'pez-Miranda J., Pe'rez-Jime'nez F., Ros E., De Caterina R., Badimo'n L., Covas M., Escrich E., Ordova's J., Soriguer F., Abia' R., Alarco'n de la Lastra C., Battino M., Corella D., Chamorro-Quiro's J., Delgado-Lista J., Giugliano D., Esposito K., Estruch R., Fernandez-Real J., Gaforio J., La Vecchia C., Lairon D., Lo'pez-Segura F., Mata P., Mene'ndez J., Muriana F., Osada J., Panagiotakos D., Paniagua J., Pe'rez-Martinez P., Perona J., Peinado

- M., Pineda-Priego M., Poulsen H., Quiles J., Ramí'ez-Tortosa M., Ruano J., Serra-Majem L., Sola' R., Solanas M., Solfrizzi V., de la Torre-Fornell R., Trichopoulou A., Uceda M., Villalba-Montoro J., Villar-Ortiz J., Visioli F., Yiannakouris N., Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Ja'e'n and Co'rdoba (Spain) 2008, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2010) 20, 284-294
95. Psaltopoulou Theodora, Naska Androniki, Orfanos Philippos, Trichopoulos Dimitrios, Mountokalakis Theodoros, Trichopoulou Antonia, Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study, *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1012-18
 96. Covas Maria-Isabel, Olive oil and the cardiovascular system, *Pharmacological Research* 55 (2007) 175-186
 97. Carluccio Maria Annunziata, Massaro Marika, Scoditti Egeria, De Caterine Raffaele, Vasculoprotective potential of olive oil components, *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 1225-1234
 98. Karantonis H., Antonopoulou S., Perrea D, Sokolis D., Theocharis S., Kavantzias N., Iliopoulos D., Demopoulos C., In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2006) 16, 174-185
 99. Karantonis H., Antonopoulou S., Demopoulos C., Antithrombotic Lipid Minor Constituents from Vegetable Oils. Comparison between Olive Oils and Others, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1150-1160
 100. Cicerale Sara, Lucas Lisa, Keast Russell, Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil, *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 458-479
 101. Hall Clifford, Tulbek Mehmet, Xu Yingying, Flaxseed, *Adv Food Nutr Res.* 2006;51:1-97
 102. Prasad K., Mantha S., Muir A., Westcott N., Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid, *Atherosclerosis* 136 (1998) 367-375

103. Prasad Kailash, Flaxseed and cardiovascular health, *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54: 369-377
104. Lee P., Prasad K., Effects of Flaxseed Oil on Serum Lipids and Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits, *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut* 8(3):227-235, 2003
105. Harris W., n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: human studies, *Am J Clin Nutr* 1997;65(suppl): 164S-54S
106. Nelson T., Stevens J., Hickey M., Inflammatory markers are not altered by an eight week dietary α -linolenic acid intervention in healthy abdominally obese adult males and females, *Cytokine* 38 (2007) 101–106
107. Zhao G., Etherton T., Martin K., West S., Gillies P., Kris-Etherton P., Dietary α -Linolenic Acid Reduces Inflammatory and Lipid Cardiovascular Risk Factors in Hypercholesterolemic Men and Women, *J. Nutr.* 134: 2991–2997, 2004
108. Zhao G., Etherton T., Martin K., West S., Gillies P., Kris-Etherton P., Dietary α -linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects, *Am J Clin Nutr* 2007;85:385–91
109. Rallidis L., Paschos G., Liakos G., Velissaridou A., Anastasiadis G., Zampelas A., Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients, *Atherosclerosis* 167 (2003) 237-242
110. Rallidis L., Paschos G., Liakos G., Papaioannou M., Panagiotakos D., Anastasiadis G., Zampelas A., The effect of diet enriched with α -linolenic acid on soluble cellular adhesion molecules in dyslipidaemic patients, *Atherosclerosis* 174 (2004) 127–132
111. George K. Paschos, Nikos Yiannakouris, Loukianos S. Rallidis, Ian Davies, Bruce A. Griffin, Demosthenes B. Panagiotakos, Fotini N. Skopouli, Vasilios Votteas and Antonis Zampelas, Apolipoprotein E Genotype in Dyslipidemic Patients and Response of Blood Lipids and Inflammatory Markers to Alpha-Linolenic Acid, *Angiology* Volume 56, Number 1, 2005
112. Vas Dias F., Gibney M., Taylor T., The Effect of Polyunsaturated Fatty Acids of the n-3 and n-6 Series on Platelet Aggregation and Platelet and Aortic Fatty Acid Composition in Rabbits, *Atherosclerosis*, 43 (1982) 245-257

113. Leray C., Wiesel M., Freund M., Cazenave J., Gachet C., Long-Chain n-3 Fatty Acids Specifically Affect Rat Coagulation Factors Dependent on Vitamin K : Relation to Peroxidative Stress, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21;459-465
114. Freese R., Mutanen M., α -Linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects, *Am J Clin Nutr* 1997;66:591-8
115. Kestin M., Clifton P., Belling G., Nestel P., 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
116. Pedersen Maria, Koenig Wolfgang, Christensen Jeppe, Schmidt Eric, The effect of marine n-3 fatty acids in different doses on plasma concentrations of Lp-PLA₂ in healthy adults, *Eur J Nutr* (2009) 48:1-5
117. Nelson T.L., Hokanson J.E., Hickey M.S., Omega-3 fatty acids and lipoprotein associated phospholipase A₂ in healthy older adult males and females, *Eur J Nutr* 2011 Apr;50(3):185-93.
118. Willett C., Sampson L., Stampfer J., Rosner B., Bain C., Witschy J., Hennekens H., Speizer E., Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire, *Am J Epidemiol* 1985 Jul;122(1):51-65
119. Kollia M, Kavouras SA, Gioxari A, Maraki M, Sidossis LS. Development, validity and reliability of the Harokopio Physical Activity Questionnaire in Greek adults. In: Proceedings of the 8th Panhellenic Congress on Nutrition and Dietetics. Athens, Greece: Abstract Book; 2006, p. 130–1
120. Pearson T., Mensah G., Alexander R., Anderson J., Cannon R., Criqui M., Fortmann S., Hong Y., Myers G., Rifai N., Smith S., Taubert K., Tracy R., Vinicor F., Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association, *Circulation* 2003;107;499-511
121. Yannakoulia M., Yiannakouris N., Melistas L., Kontogianni M., Malagaris I., Mantzoros C., A dietary pattern characterized by high consumption of whole-grain cereals and low-fat dairy products and low consumption of refined cereals is positively associated

with plasma adiponectin levels in healthy women, *Metabolism Clinical and Experimental* 57 (2008) 824–830

122. Detopoulou P., Nomikos T., Fragopoulou E., Panagiotakos D., Pitsavos C., Stefanadis C., Antonopoulou S., Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity, platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in leukocytes and body composition in healthy adults, *Lipids in Health and Disease* 2009, 8:19
123. Trevisan M., Browne R., Ram M., Muti P., Freudenheim J., Carosella A., Armstrong D., Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population, *Am J Epidemiol* 2001;154:348–56
124. Block G., Dietrich M., Norkus E., Morrow J., Hudes M., Caan B., Packer L., Factors associated with oxidative stress in human populations, *Am J Epidemiol* 2002;156:274–85
125. Barden A., Croft K., Durand T., Guy A., Mueller M., Mori T., Flaxseed Oil Supplementation Increases Plasma F1-Phytosterols in Healthy Men, *J. Nutr.* 139: 1890–1895, 2009
126. Kaul N., Kreml R., Austria J., Richard M., Edel A., Dibrov E., Hirono S., Zettler M., Pierce G., A Comparison of Fish Oil, Flaxseed Oil and Hempseed Oil Supplementation on Selected Parameters of Cardiovascular Health in Healthy Volunteers, *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 27, No. 1, 51–58 (2008)
127. L'Abbé MR, Trick KD, Beare-Rogers JL Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr.* 1991 Sep;121(9):1331-40
128. Charles R. Harper, Megan C. Edwards, Terry A. Jacobson, Flaxseed Oil Supplementation Does Not Affect Plasma Lipoprotein Concentration or Particle Size in Human Subjects, *J. Nutr.* 136: 2844–2848, 2006
129. Antonia Trichopoulou, Androniki Naska, Philippos Orfanos, and Dimitrios Trichopoulos, Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study, *Am J Clin Nutr* 2005;82:935–40
130. Helmut Schroder, Jaume Marrugat, Juan Vila, Maria I. Covas, Roberto Elosua, Adherence to the Traditional Mediterranean Diet Is Inversely Associated with Body Mass Index and Obesity in a Spanish Population, *J. Nutr.* 134: 3355–3361, 2004

